

Einfluss von *Transforming Growth Factor-beta1* (TGF- β 1)
Genpolymorphismen auf die Hepatitis C induzierte Leberfibrose *in vivo*
und Modulation der TGF- β 1 Synthese, Prozessierung und Sekretion
durch die Serin-Protease Furin, das *latent TGF- β binding protein-1*
und Polymorphismen der TGF- β 1 Signalsequenz *in vitro*

Von der Medizinischen Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen
Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der
Medizin genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Simone Mohren

aus

Mönchengladbach

Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr. rer. nat. Ralf Weiskirchen

Herr Privatdozent
Dr. rer. nat. Tammo Ostendorf

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 2008

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Für meine Lieben

Publikationen

Teilpublikationen:

Weiskirchen, R., Mohren, S., Weiskirchen, S., Gressner, AM.: Gene polymorphism within the coding region of TGF-beta1 affect cellular synthesis, secretion and processing of TGF-beta1 via latent TGF-beta binding protein-1 (LTBP-1). *J. Hepatol.* 2008;48(Suppl2):S22

Weiskirchen, R., Borkham-Kamphorst, E., Meurer, SK., Drews, F., Mohren, S., Hermann, J., Gressner, O., Scherner, O., Vreden, WN, Kovalenko, E., Bomble, M., Gressner, AM. A complex network of intra- and intercellular mediators regulate cellular activation and transdifferentiation of hepatic stellate cells. J. Bosch, AK. Burroughs, F. Lammert, D. Lebrecht, T. Sauerbruch (eds.). Springer Verlag, Heidelberg, Germany. 2008;45-69.

Drews, F., Knobel, S., Moser, M., Muhlack, KG., Mohren, S., Stoll, C., Bosio, A., Gressner, AM., Weiskirchen, R.: Disruption of the latent transforming growth factor- β binding protein-1 gene causes alteration in facial structure and influences TGF- β bioavailability. *BBA Mol. Cell Res.* 2007;1783:34-48.

Mohren, S., Vreden, WN., Gressner, AM., Weiskirchen, R.: Gene polymorphisms in the secretory signal peptide of TGF- β 1 affect the cellular synthesis, secretion and processing of TGF- β 1 and secretion is modulated by the latent TGF- β binding protein-1 (LTBP-1) and furin protease. *Z. Gastroenterol.* 2007;45:854.

Mohren, S., Gressner, AM., Weiskirchen, R.: Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms are relevant risk factors for hepatic fibrogenesis in patients suffering from Hepatitis C infection. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2006;44:A153.

Mohren, S., Mengsteab, S., Gressner, AM., Kühnen, E., Drebber, U., Dienes, HP., Odenthal, M., Weiskirchen R.: Analysis of transforming growth factor- β 1 gene polymorphisms in patients with Hepatitis C infection. *Z. Gastroenterol.* 2006;44:791.

Weitere Publikationen:

Weiskirchen, R., Meurer, SK., Scherner, O., Vreden, WN., Drews, F., Mohren, S., Hermann, J., Gressner, OA., Gressner, AM.: Novel aspects of extra- and intracellular transforming growth factor- β signaling in hepatic stellate cells. Abstractbuch zum Meeting "Mechanisms of Fibrogenesis in chronic liver diseases and strategies towards novel therapeutic approaches". 2007;10-11.

Wedemeyer, I., Petmecky, K., Drebber, U., Kuehnen, E., Mohren, S., Weiskirchen R., Canbay, A., Odenthal, M., Dienes, HP.: Adiponectin as a modulator of hepatic fibrosis in chronic HCV-infection. *Z. Gastroenterol.* 2007;45:129.

Wedemeyer, I., Petmecky, K., Drebber, U., Kühnen, E., Mohren, S., Weiskirchen, R., Canbay, A., Odenthal, M., Dienes, HP.: Adiponevtin as a putative modulator of hepatitis in chronic HCV-infection. *Z. Gastroenterol.* 2007;45:864.

Wedemeyer, I., Petmecky, K., Drebber, U., Kühnen, E., Mohren, S., Weiskirchen, R., Canbay, A., Odenthal, M., Dienes, HP.: Adiponevtin as a putative modulator of hepatitis in chronic HCV-infection. *Pathology Research and Practice.* 2007;203:378.

Inhaltsverzeichnis

Publikationen	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	4
2.1 Leberfibrose und Leberzirrhose	4
2.1.1 Leber: Allgemeines	4
2.1.2 Definition und Pathologie der Leberfibrose und Leberzirrhose	5
2.1.3 Pathobiochemie der Leberfibrose	7
2.1.4 Rolle von TGF- β 1 bei der Fibrogenese	9
2.1.5 Klinik, Diagnostik und Therapie der Leberzirrhose	10
2.1.6 Hepatitiden: <i>Grading</i> und <i>Staging</i> der chronischen Hepatitis	13
2.1.7 Hepatitis C Virus und Hepatitis C Virus Infektion	14
2.2 <i>Transforming Growth Factor-β1</i>	15
2.2.1 TGF- β 1: Allgemeines	15
2.2.2 Vom Gen zum biologisch aktiven Zytokin	15
2.2.2.1 TGF- β 1 Genstruktur	16
2.2.2.2 Synthese, Prozessierung und Sekretion von TGF- β 1	16
2.2.2.3 TGF- β 1 Latenz und Aktivierung	18
2.2.2.4 Regulation von Expression, Sekretion und biologischer Aktivität	20
2.2.3 TGF- β 1 Rezeptoren und Signaltransduktion	21
2.2.4 Inaktivierung und Abbau von TGF- β 1	22
2.2.5 Klinische Bedeutung von TGF- β 1	23
2.3 Genetische Polymorphismen	24
2.3.1 Polymorphismen: Allgemeines	24
2.3.2 Genetische Faktoren der Fibrogenese	24
2.3.3 Polymorphismen im TGF- β 1 Gen	27
3. Arbeitsmethoden	28
3.1 LightCycler Analysen	28
3.1.1 Geräte	28
3.1.2 Verbrauchsartikel	28
3.1.3 Chemikalien	28
3.1.4 Kits	28
3.1.5 Primer	28
3.1.6 Sonden	29
3.2 Molekularbiologie und Zellkultur	30
3.2.1 Geräte	30
3.2.2 Verbrauchsartikel	30
3.2.3 Chemikalien	31
3.2.4 Puffer und Lösungen	32
3.2.5 Multireaktionssysteme/Kits	37
3.2.6 Enzyme	37

3.2.7	Primer	37
3.2.8	Antikörper	38
3.2.9	Biologische Materialien	38
3.2.9.1	Plasmide	38
3.2.9.2	Bakterienstämme	38
3.2.9.3	Eukaryotische Zellen	38
4.	Arbeitsmethoden	39
4.1	LightCycler Analysen	39
4.1.1	Isolierung von DNA aus Paraffinschnitten	39
4.1.1.1	Paraffinierung	39
4.1.1.2	Herstellung und Färbung von Paraffinschnitten	39
4.1.1.3	Entparaffinierung und Zelllyse für DNA-Isolierung	40
4.1.1.4	DNA-Extraktion	40
4.1.2	LightCycler	41
4.1.2.1	Grundlagen der Schmelzpunktanalyse	41
4.1.2.2	FRET: <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>	41
4.1.2.3	LightCycler-Programm und Schmelzpunktanalyse	42
4.1.2.4	Arbeitsschritte	43
4.2	Molekularbiologie	44
4.2.1	PCR: Polymeraskettenreaktion	44
4.2.2	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	45
4.2.3	Elektroelution von DNA aus Agarosegelen	45
4.2.4	Aufbereitung von Dialyseschläuchen	46
4.2.5	Sequenzierung	46
4.2.6	Restriktionsenzymverdau	47
4.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten	47
4.2.8	Hitzeschocktransformation von Bakterien	48
4.2.9	Minipräparation von Plasmid-DNA	49
4.2.10	Großpräparation von Plasmid-DNA	49
4.2.11	Photometrie	51
4.2.12	Herstellung kompetenter Bakterien	51
4.2.13	Überprüfung der Kompetenz	51
4.3	Zellkultur	52
4.3.1	Kulturbedingungen	52
4.3.2	Zellen auftauen	52
4.3.3	Zellen kultivieren	52
4.3.4	Zellen trypsinisieren	52
4.3.5	Zellen einfrieren	53
4.3.6	Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA	53
4.3.7	Herstellung von Proteinlysaten	53
4.3.8	TCA-Fällung	53
4.3.9	Lyophilisation	54
4.3.10	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels DC-Testung	54
4.3.11	SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot	54
4.3.12	Konfokale Mikroskopie	56
4.3.13	Immunfluoreszenzmikroskopie	56
4.3.14	ELISA: <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	57
5.	Ergebnisse	59
5.1	LightCycler Analysen	59
5.1.1	LightCycler Analysen: Allgemeines	59

5.1.2	Polymorphismus –509	61
5.1.2.1	Auswahl der optimalen DNA-Sequenz	61
5.1.2.2	Primer	61
5.1.2.3	Sonden	62
5.1.2.4	LightCycler-Programm	64
5.1.2.5	Analysen der Allelvarianten	64
5.1.3	Polymorphismus Codon 10	67
5.1.4	Polymorphismus Codon 25	73
5.1.5	Polymorphismus Codon 263	78
5.1.6	Statistik	82
5.2	Humanes TGF- β 1: Vektorkonstruktion und Expression	88
5.2.1	Molekularbiologische Experimente: Allgemeines	88
5.2.2	hTGF- β 1-EGFP	90
5.2.2.1	Vektorsynthese	90
5.2.2.2	hTGF- β 1-EGFP Konstrukt in CHO Zellen	92
5.2.2.3	hTGF- β 1-EGFP Konstrukt in LX-2 Zellen	97
5.2.3	hTGF- β 1-Flag	101
5.2.3.1	Vektorsynthese	101
5.2.3.2	hTGF- β 1-Flag Konstrukt in CHO Zellen	103
5.2.3.3	hTGF- β 1-Flag Konstrukt in LX-2 Zellen	104
5.2.4	<i>Full-length</i> hTGF- β 1-Flag	106
5.2.4.1	Vektorsynthese	106
5.2.4.2	<i>Full-length</i> hTGF- β 1-Flag in CHO Zellen	106
5.2.4.3	<i>Full-length</i> hTGF- β 1-Flag in LX-2 Zellen	110
5.2.5	Einbau der Polymorphismen	113
5.3	Weiterführende Zellkulturexperimente	116
5.3.1	Experimente: Allgemeines	116
5.3.2	Einflüsse von Furin und LTBP-1 auf die hTGF- β 1 Synthese, Prozessierung und Sekretion	118
5.3.2.1	Ko-Expression von hTGF- β 1, Furin und/oder LTBP-1 in CHO Zellen	119
5.3.2.2	Ko-Expression von hTGF- β 1, Furin und/oder LTBP-1 in LX-2 Zellen	127
5.3.3	Einfluss der hTGF- β 1 Signalsequenzpolymorphismen auf die hTGF- β 1 Synthese und Sekretion	134
5.3.3.1	Einflüsse der Polymorphismen in CHO Zellen	135
5.3.3.2	Einflüsse der Polymorphismen in LX-2 Zellen	138
6.	Diskussion	142
6.1	<i>In vivo</i> Experimente	142
6.1.1	Design humaner Assoziationsstudien	142
6.1.2	Auswirkungen von hTGF- β 1 Polymorphismen auf Entzündungs- und Fibrosegrad	144
6.2	<i>In vitro</i> Experimente	147
6.2.1	Vektorsynthese und hTGF- β 1 Expression und Sekretion in der Zellkultur	147
6.2.2	Einflüsse von Furin und LTBP-1 auf die hTGF- β 1 Synthese, Prozessierung und Sekretion	149
6.2.3	Einflüsse der hTGF- β 1 Signalsequenzpolymorphismen auf die hTGF- β 1 Synthese und Sekretion	152
6.3	Schlussfolgerung	157
7.	Literaturverzeichnis	160

8.	Danksagung	172
9.	Erklärung zur Datenaufbewahrung	174
10.	Lebenslauf	175

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin	FRED	<i>Fluorescence Resonance Energy</i>
abs.	absolut		<i>Transfer</i>
ALD	<i>alcoholic liver disease</i>	g	Gramm
α -SMA	<i>α-smooth muscle actin</i>	G	Guanin
AK	Antikörper	G	<i>Grading</i>
ApoE	Apolipoprotein E	γ -GT	γ -Glutamyl-Transferase
Arg	Arginin	GDF	<i>growth/differentiation factor</i>
ATP	Adenosintriphosphat	GFP	<i>green fluorescent protein</i>
BMP	<i>bone morphogenic proteine</i>	GOT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
bp	Basenpaar	gp	Glykoprotein
BSA	<i>bovines serum albumin</i>	GPT	Glutamat-Oxalazetat-Trans-
C	Cytosin		aminase
Ca ²⁺	Kalzium	HBV	Hepatitis B Virus
CD	<i>cluster of differentiation</i>	HCV	Hepatitis C Virus
CMV	Cytomegalievirus	HE	Hämatoxylin-Eosin
CHO	<i>Chinese hamster ovary cells</i>	HEK	<i>human embryonal kidney</i>
d.h.	das heißt	HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
Cys	Cystein	H ₂ O	Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified</i>	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
DMSO	Dimethylsulfoxid	HSC	<i>hepatic stellate cell</i>
DNA	<i>desoxyribonucleid acid</i>	IL	Interleukin
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat	Ile	Isoleucin
DOC	<i>desoxycholic acid Na-salt</i>	INF	Interferon
DTT	Dithiothreitol	kDa	Kilodalton
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	kg	Kilogramm
ELISA	<i>Enzyme-linked Immuno</i>	LAP	<i>latency-associated peptid</i>
	<i>Sorbent Assay</i>	LB	Luria-Bertani Medium
EGFP	<i>enhanced green fluorescent</i>	LC	LightCycler
	<i>protein</i>	Leu	Leucin
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>	LLC	<i>large latent complex</i>
EtBr	Ethidiumbromid	LPS	Lipopolysaccharid
EtOH	Ethanol	LTBP	<i>latente TGF-β binding protein</i>
EZM	extrazelluläre Matrix	μ l	Mikroliter
FKS	<i>foetal bovine serum</i>	mg	Milligramm
For-Primer	Forward-Primer	MFB	Myofibroblasten

VII

Mg ²⁺	Magnesium	TBE	Tris-HCl, Borsäure, EDTA
ml	Milliliter	TβR	TGF-β Rezeptor
mM	Millimol	TBS	Tris-HCl, Borsäure, Saline
MMP	Matrixmetalloproteinase	TBST	Tris-HCl, Borsäure, Saline, Tween
MnSOD	<i>manganese superoxide dismutase</i>	TCA	Trichloressigsäure
Na	Natrium	TE	Tris-HCl, EDTA
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat	TGN	trans-Golgi Netzwerk
NaCl	Natriumchlorid	TGF-β1	<i>Transforming Growth Factor-beta1</i>
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid	TIMP	<i>tissue inhibitor of metallo- proteinases</i>
NaOAc	Natriumacetat	T _m	Schmelztemperatur
ng	Nanogramm	TNF	Tumornekrose Faktor
nM	Nanomol	Thr	Threonin
nm	Nanometer	TS	Tris-Saline
OD	optische Dichte	V	Volt
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese	VT	Volumenanteil
PBC	primär biliäre Zirrhose	z.B.	zum Beispiel
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>		
PC	Pro-Proteinkonvertase		
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>		
PJ	Propidiumjodid		
PSC	primär sklerosierende Cholangitis		
rER	raues endoplasmatisches Retikulum		
RNA	<i>ribonucleic acid</i>		
ROS	<i>reactive oxygen species</i>		
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>		
Pro	Prolin		
Rev-Primer	Reverse-Primer		
rpm	<i>rounds per minute</i>		
S	<i>Staging</i>		
SARA	<i>smad anchor for receptor activation</i>		
SLC	<i>small latent complex</i>		
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>		
T	Thymin		

1. Zusammenfassung

Transforming Growth Factor-beta1 (TGF- β 1) ist ein multifunktionales Zytokin mit vielfältigen Aufgaben in physiologischen und pathologischen Organprozessen. Im Rahmen vieler Erkrankungen verändert sich die extrazelluläre TGF- β 1-Konzentration, die z.B. bei fibrosierenden Krankheiten erhöht ist. Zudem sind genetisch bedingte interindividuelle Unterschiede der TGF- β 1-Plasmakonzentration beschrieben. Um die komplexen Einflüsse auf die TGF- β 1 Expression, Synthese, Prozessierung und Sekretion besser verstehen zu können, ist es wichtig die Rolle involvierter Proteine wie der *subtilisin/kexin-like* Serin-Endoprotease Furin und des TGF- β 1 Bindungsproteins LTBP-1 sowie genetischer Varianten zu kennen. Das Wissen um die physiologischen Verhältnisse erlaubt pathologische Abläufe nachzuvollziehen, gezielt zu beeinflussen und im Falle von genetischen Polymorphismen Erkrankungsrisiken abzuschätzen. TGF- β 1 Genpolymorphismen werden als Faktoren der zeitlich sehr variablen Leberfibroseentwicklung und -progression in Folge einer chronischen Hepatitis C Infektion diskutiert. Auf welche Weise sie die TGF- β 1 Wirkung modulieren, wurde in der vorliegenden Arbeit analysiert.

Im ersten Teil der Experimente wurde der Einfluss des TGF- β 1 Genpolymorphismus im Promotorbereich an Position –509 sowie der SNPs in Codon 10, Codon 25 und Codon 263 auf die Hepatitis C induzierte Leberfibrose *in vivo* untersucht. Dazu wurden entzündliche Aktivität (*Grading*) und Fibrosegrad (*Staging*) von 430 Leberbiopsaten bestimmt, die DNA aus dem in Paraffin eingebetteten Gewebe isoliert und die Genotypen mittels LightCycler Analysen ermittelt. Für die Polymorphismen in Codon 10, Codon 25 und Codon 263 waren in Vorversuchen LightCycler-Programme entworfen worden, die für diese Experimente optimiert werden mussten. Zur Analyse des Polymorphismus an Position –509 wurde ein neues LightCycler-Programm etabliert. Anschließend wurden Geschlecht und Polymorphismen statistisch mit *Grading* und *Staging* korreliert. Außerdem wurde untersucht, ob Patienten mit milder Fibrose statistisch signifikant unterschiedliche Allelfrequenzen aufweisen als Patienten mit schwerer Fibrose. Abschließend wurden die einzelnen Polymorphismen auf Abhängigkeiten überprüft.

Bei der Datenanalyse zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und dem Fibrosegrad ($p=0,0030$) sowie der Art des Polymorphismus in Codon 10 und dem Fibrosegrad ($p=0,0183$). Dabei waren Patienten mit schwerer Fibrose häufiger heterozygot als Patienten mit milder Fibrose. Für die anderen Polymorphismen ergab sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Art des Polymorphismus und dem *Staging*. Außerdem hatten die Polymorphismen keinen Einfluss auf die entzündliche Aktivität.

Bei der Analyse der Allelfrequenzen des Promotorpolymorphismus zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen „milde Fibrose“ und „schwere Fibrose“. Patienten mit milder Fibrose wiesen signifikant häufiger das T-Allel und signifikant seltener das C-Allel auf ($p=0,019$). Außerdem zeigten Patienten der Gruppe „schwere Fibrose“ verglichen mit der Allelverteilung des Gesamtkollektivs signifikant häufiger das C-Allel ($p=0,019$) und signifikant seltener das T-Allel ($p=0,019$). Zwischen den Gruppen „milde Fibrose“ und „schwere Fibrose“ zeigte sich dabei kein Unterschied in den Allelfrequenzen der anderen Polymorphismen.

Bei der Analyse der Haplotypen ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Promotorpolymorphismus und dem Polymorphismus in Codon 10 sowie Codon 263. Außerdem zeigte sich eine Assoziation zwischen den Polymorphismen in Codon 10 und Codon 25.

Im zweiten Teil der Experimente wurden die Einflüsse der Proteinkonvertase Furin und des Bindungsproteins LTBP-1 sowie der Polymorphismen in Codon 10 und Codon 25 auf Expression und Sekretion des humanen TGF- β 1 *in vitro* analysiert. Zunächst wurden Vektoren synthetisiert, die hTGF- β 1 C-terminal mit EGFP oder dem Flag-Oktapeptid fusionierten und das Gen unter die Kontrolle des CMV-Promotors stellten. Diese Plasmide wurden in CHO und LX-2 Zellen eingebracht und die Funktion der Konstrukte mittels Western Blot Analysen, Konfokal- und Immunfluoreszenzmikroskopie überprüft.

Die Rollen von Furin und LTBP-1 bei der hTGF- β 1 Synthese, Prozessierung und Sekretion wurden durch Ko-Expressionsexperimente untersucht. Dabei wurden die Zellen entweder alleine mit dem hTGF- β 1-Flag Expressionskonstrukt oder zusätzlich mit einem Furin und/oder LTBP-1 Expressionskonstrukt transfiziert. Nach 72 Stunden wurden die Zellen geerntet und die hTGF- β 1-Flag-Konzentration der Zelllysate bzw. Überstände der 4 Ansätze in Western Blot und ELISA Analysen verglichen. Außerdem wurden die *in vivo* vorkommenden Allelvarianten 10Leu/25Arg, 10Pro/25Pro und 10Pro/25Arg der Signalsequenz in hTGF- β 1-Flag Expressionskonstrukte kloniert und deren Einflüsse ebenfalls durch Western Blot und ELISA Analysen untersucht. Der eingesetzte Flag-ELISA wurde für diese Experimente neu etabliert.

Die hTGF- β 1 Expressionsplasmide waren sowohl in CHO als auch in LX-2 Zellen aktiv. Durch die Fusion mit dem unter UV-Licht grün fluoreszierenden EGFP konnte in der Konfokalmikroskopie gezeigt werden, dass hTGF- β 1 intrazellulär hauptsächlich im Zytosol in dichten Vesikeln konzentriert vorliegt.

Synthese und proteolytische Spaltung von hTGF- β 1 wurden durch Furin und LTBP-1 in den beiden Zellsystemen in unterschiedlicher Weise beeinflusst. In CHO Zellen steigerte die Furin und/oder LTBP-1 Ko-Expression die hTGF- β 1-Konzentration in Zelllysaten und Über-

ständen. Dagegen wurde die hTGF- β 1 Synthese in LX-2 Zellen durch Ko-Expression supprimiert.

Unter den Kulturbedingungen Transfektion bei hoher Zelldichte, Reduktion der FKS-Konzentration auf 0,2% nach 24 Stunden und Ernten der Zellen nach weiteren 48 Stunden führte die Nukleotidsubstitution an Position +869 von Thymin durch Cytosin sowie der Austausch von Guanin durch Cytosin an Position +915 des hTGF- β 1 Gens zu einer Abnahme der hTGF- β 1-Konzentration in Zelllysat und Überstand.

2. Einleitung

2.1 Leberfibrose und Leberzirrhose

2.1.1 Leber: Allgemeines

Die Leber ist mit einem durchschnittlichen Gewicht von 1,5 kg das größte parenchymatöse Organ des menschlichen Körpers. Sie liegt, über die Facies diaphragmatica mit dem Zwerchfell verwachsen, überwiegend im rechten Oberbauch in enger Nachbarschaft zu Gallenblase, Gallengang, Pankreas, Magen, Duodenum und Colon [1,2]. Die Funktionen der Leber sind vielfältig. Sie erfüllt lebenswichtige metabolische, synthetische, katabole und biotransformatorische Aufgaben. Zudem dient die Leber als Speicher- und Ausscheidungsorgan [1,2].

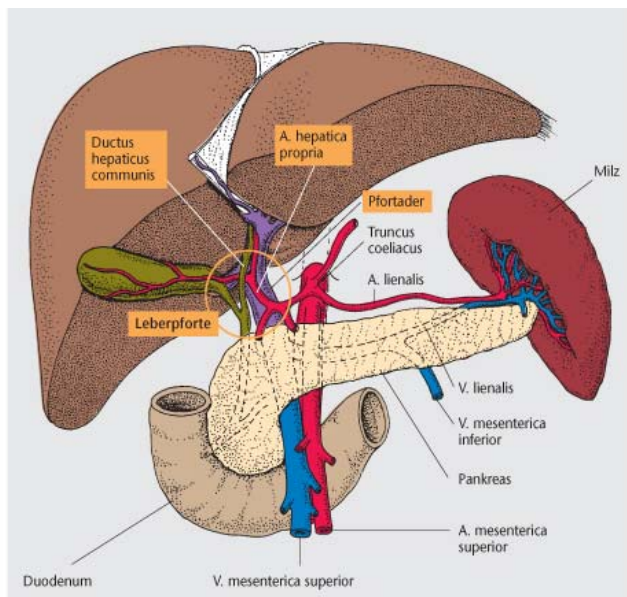


Abb. 1: Oberbauchorgane ohne Magen in der Vorderansicht.

Dargestellt ist die physiologische Anatomie des Oberbauches mit Leber, Gallenblase, Pankreas, Milz, Duodenum und den zugehörigen Gefäßen. Der Magen ist nicht abgebildet.

Renz-Polster *et al.* 2006 [5]

Das klassische Leberläppchen auch Zentralvenenläppchen genannt, stellt die morphologische Untereinheit der Leber dar. Die Leberbälkchen bestehen aus einer Zellschicht von Leberepithelzellen (Hepatozyten) und laufen parallel zu den Sinusoiden und Gallenkanalikuli auf die Zentralvene zu. Durch die Sinusoide fließt Mischblut aus den Leberarterien und der Pfortader, welches über die Zentralvene zur Lebervene und über die Vena cava inferior zum rechten Atrium strömt. Die Definition des Leberazinus bezieht sich auf die funktionelle Einheit der Leberstruktur. Ein Leberazinus umfasst Teile zweier benachbarter Zentralvenenläppchen. Die Ecken des im Anschnitt rhombenförmigen Azinus werden von den Zentralvenen der beiden Leberläppchen und zwei Periportalfeldern gebildet. Die Periportalfelder bestehen aus lockerem Bindegewebe, in welches eine Interlobulararterie und -vene, ein kleiner Gallengang, Lymphgefäße sowie sympathische und parasympathische Nerven

eingebettet sind. Arterie, Vene und Gallengang werden zusammen als Glisson-Trias bezeichnet. Aufgrund unterschiedlicher Sauerstoff-, Nährstoff- und Hormonkonzentrationen des sinusoidalen Mischblutes sowie der metabolischen Heterogenität der Hepatozyten lässt sich der Leberazinus in drei Zonen gliedern. Diese drei Zonen werden durch Hypoxie, Noxen und andere toxische Einflüsse in unterschiedlichem Ausmaß geschädigt. Die periportalen Bezirke sind besonders anfällig gegenüber toxischen Substanzen, während die zentrolobulären Areale empfindlicher auf Sauerstoffmangel und Minderdurchblutung reagieren [1,2].

Die Leberepithelzellen sind an zahlreichen Stoffwechselprozessen wie der Entgiftung von Ammoniak und Bilirubin, dem Abbau von körpereigenen Hormonen und Medikamenten, der Glukoneogenese, dem Lipidstoffwechsel und der Synthese von Exportproteinen beteiligt. Die Apices der kubischen oft diploiden und teilweise mehrkernigen Hepatozyten bilden die epithellosen Gallenkanalikuli, in welche die Gallensalze aktiv sezerniert werden. Die Mikrovilli der Hepatozytenbasis reichen ohne abgrenzende Basalmembran in den Disse-Raum. Der Disse-Raum dient dem Stoffaustausch zwischen dem sinusoidalen Blut und den Hepatozyten und enthält wenige Kollagenfibrillen, hauptsächlich Kollagen-III und die perisinusoidalen Hepatischen Sternzellen (HSCs). Diese fibroblastenähnlichen, im Ruhezustand abgerundeten Zellen, die auch als Lipozyten oder Ito-Zellen bezeichnet werden, weisen zahlreiche Vitamin-A-haltige Lipidtropfen auf und produzieren das spärliche Bindegewebe des Disse-Raumes. Der Disse-Raum steht in direktem Kontakt zu den Sinusoiden. Diese werden von Endothelzellen begrenzt, die zahlreiche Poren ohne Diaphragmen aufweisen und keiner Basalmembran aufliegen. Die Poren gewährleisten den für die Funktion der Leber wichtigen ausgeprägten Stoffaustausch. Durch diese anatomischen Verhältnisse können bis auf die zellulären Bestandteile des Blutes alle Nährstoffe, Hormone, Abbauprodukte und Toxine in den Disse-Raum übertreten und die Hepatozyten erreichen. Analog können von den Hepatozyten in den Disse-Raum abgegebene Stoffwechselprodukte frei in das Blut diffundieren [1,2]. Die Kupffer-Zellen stellen Makrophagen des retikulo-histiozytären Systems dar, liegen in den Wänden der Sinusoide und reichen mit ihren Zellfortsätzen in deren Lumen [1,2].

2.1.2 Definition und Pathologie der Leberfibrose und Leberzirrhose

Leberfibrose und Leberzirrhose sind die gemeinsame Endstrecke chronischer Leberschädigungen unterschiedlicher Genese. Die Ursachen dieser pathologischen Entwicklung können toxisch, infektiös, metabolisch, autoimmun, biliär oder kardial sein. In den Industrieländern sind Alkoholabusus und chronische Virushepatitiden die häufigsten ätiologischen Faktoren. Leberfibrose und Leberzirrhose sind gekennzeichnet durch eine Bindegewebs-

vermehrung, objektivierbar durch die Bestimmung des Gesamtkollagengehaltes. Neben der gesteigerten Synthese von Kollagen, hauptsächlich Kollagen-I und Kollagen-III werden auch Matrixbestandteile wie Elastin, Glykoproteine, Proteoglykane und Hyaluronsäure vermehrt abgelagert. Außerdem ändert sich die molekulare Morphologie der Matrixproteine. Der Umbau der Leber wird durch Reparationsmechanismen nach Zellschädigung, immunologische Mechanismen und/oder die primäre Stimulation kollagenbildender Zellen ausgelöst [1,3].

Bei der Leberfibrose bleibt im Gegensatz zur Leberzirrhose die normale Läppchenarchitektur erhalten. Neben der allgemeinen Bindegewebszunahme kommt es zu einer Verschiebung der relativen Verhältnisse der natürlichen Matrixkomponenten. Der Kollagen-I-, Hyaluronan-, Chondroitinsulfat- und Dermatansulfatgehalt nimmt bei relativer Abnahme der Kollagen-III- und Heparansulfatkonzentration zu [1]. Neben der vermehrten Bildung extrazellulärer Matrixproteine wird auch ein verminderter Abbau des Bindegewebes durch Hemmung von Matrixmetalloproteinasen für die Fibrosierung verantwortlich gemacht. Durch die Kollagenablagerung im Disse-Raum wird der Stoffaustausch beeinträchtigt und die Leberfunktion gestört. Außerdem verliert das sinusoidale Endothel seine Fenestration. Die so verursachte Kapillarisation der Sinusoide schränkt den Stoffaustausch zwischen Hepatozyten und sinusoidalem Mischblut weiter ein. Folge des strukturellen Umbaus ist eine Widerstandserhöhung im Leberstrombett mit portaler Hypertension, Ösophagusvarizenbildung und der Entwicklung portosystemischer Shunts [1,2,3].



Abb. 2: Zirrhotische Leber.
Die Leber ist makroskopisch hart und knotig. Das Bild zeigt eine kleinknotige Zirrhose.

Böcker *et al.* 2004 [1]

Die Leberzirrhose ist das irreversible Endstadium der Leberfibrose. Der Übergang von der Leberfibrose zur Leberzirrhose dauert bei den meisten Patienten etwa 15 bis 20 Jahre [4]. Die Ausbildung von portoportal und portozentralen Bindegewebssepten im Laufe der ausgedehnten Ablagerung von Kollagen im Disse-Raum und den Periportalfeldern, die

Destruktion und Leberzellnekrose, die ungeordnete Regeneration und die Veränderung der Durchblutungsverhältnisse führen zu einer irreversiblen Zerstörung der lobulären und vasikulären Leberarchitektur. Daraus resultieren zunehmende Minderperfusion des Gewebes und Insuffizienz der Leber.

Die zirrhotische Leber ist bei fortgeschrittener Zerstörung und zunehmender Bindegewebsbildung klein, hart und knotig. Makroskopisch wird die z.B. durch chronischen Alkoholabusus verursachte mikronoduläre Leberzirrhose mit Regeneratknoten kleiner 3 mm von der v.a. bei Virushepatitiden auftretenden makronodulären Zirrhose mit Regeneratknoten einer Größe von 3 mm bis zu 3 cm unterschieden. Bei der Mischform finden sich mikro- und makronoduläre Areale. Histologisch können eine aktive Form, bei der eine ätiologische Einteilung noch möglich ist, und eine stationäre Form differenziert werden [1,3,5].

2.1.3 Pathobiochemie der Leberfibrose

Für die exzessive Produktion von Kollagenen und den anderen Bestandteilen der extrazellulären Matrix werden hauptsächlich aktivierte Hepatische Sternzellen (HSCs), in die Leber eingewanderte Myofibroblasten (MFBs) des Knochenmarks und portale Fibroblasten verantwortlich gemacht [6,7]. Es wird vermutet, dass transdifferenzierte HSCs 80% und MFBs bis zu 20% der extrazellulären Matrix synthetisieren und dagegen die portalen Fibroblasten eine untergeordnete Rolle spielen [7,8]. Außerdem trägt die Metaplasie von epithelialeem zu mesenchymalem Gewebe zu einem Anstieg der bindegewebsbildenden Zellen bei [9].

Eine Vielzahl von Leberschädigungen verursacht z.B. durch Alkoholabusus, Infektionen, Cholestase oder das Metabolische Syndrom führen initial zu Nekrose und Apoptose der Leberzellen mit Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Aktivierung von latentem TGF- β . Geschädigte Hepatozyten und Gallengangsepithelien setzen inflammatorische Zytokine und lösliche Faktoren frei, die Kupffer-Zellen aktivieren und T-Zellen rekrutieren. Freie Radikale und verschiedene Zytokine wie TGF- β 1, TNF- α , PDGF und IL-6 stimulieren die HSCs und fördern deren Transdifferenzierung. Die aktivierten HSCs produzieren vermehrt Komponenten der EZM, Zytokine, Chemokine, Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren [4,10].

Die nicht-parenchymatösen HSCs stellen etwa 5% der Leberzellen. Morphologisch sind die ruhenden sinusoidalen Hepatischen Sternzellen durch einen kompakten Zellkörper mit sternförmigen zytoplasmatischen Zellfortsätzen und zahlreichen Vitamin-A-haltigen Fetttropfen, in denen sie 80% des Leber Vitamin-A speichern, charakterisiert. Die nicht aktivierten HSCs haben vielfältige lokale und systemische Funktionen. Sie regulieren unter anderem die Vitamin-A-Homeostase des Körpers [11], modulieren den sinusoidalen Blutfluss [12] und die

hepatische Mikrozirkulation [13], synthetisieren die in der gesunden Leber gering vorhandene extrazelluläre Matrix (EZM) des Disse-Raumes und setzen Gewebshormone frei [14]. Außerdem gelten HSCs als potentiell Antigen-präsentierende Zellen [15,16].

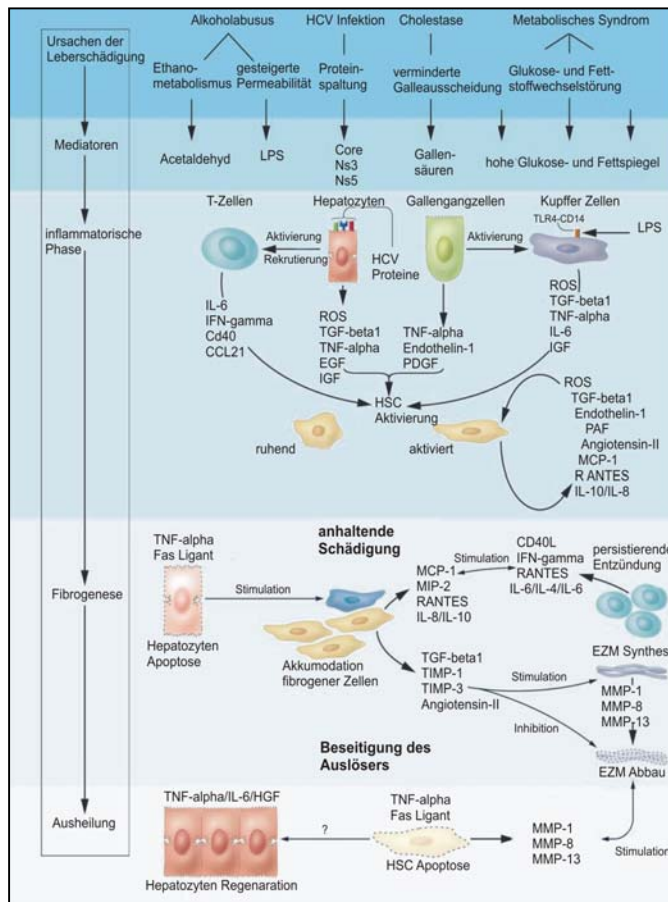
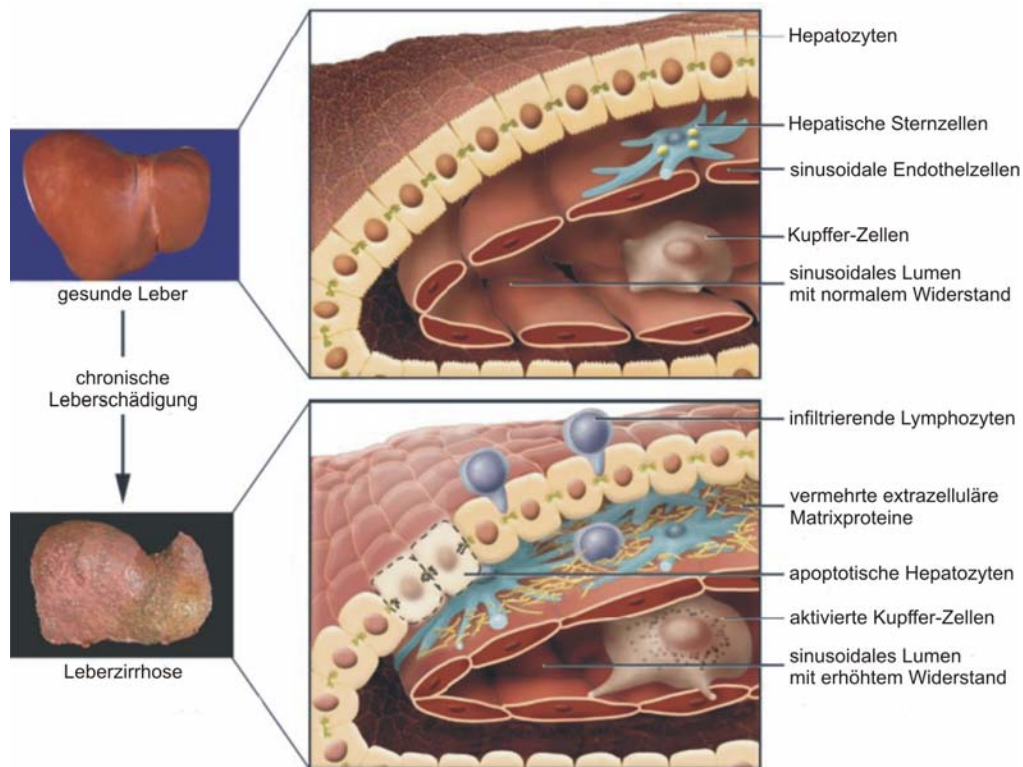


Abb. 3: Fibrogenese.

Erkrankungen wie chronischer Alkoholabusus, HCV Infektion, Cholestase oder das Metabolische Syndrom können zur Freisetzung von leberschädigenden Mediatoren führen. Diese verursachen eine Entzündungsreaktion mit Aktivierung und Rekrutierung von T-Zellen und Aktivierung von Kupffer-Zellen. T-Zellen, Hepatozyten, Gallengangszellen und Kupffer-Zellen setzen verschiedene Zytokine frei, welche die Transdifferenzierung von ruhenden HSCs zu MFBs fördern. Aktivierte HSCs setzen ebenfalls Zytokine und andere Mediatoren frei, die durch auto- und parakrine Wirkungen die Transdifferenzierung vorantreiben. Bei anhaltenden, schädigenden Einflüssen und Apoptose von Hepatozyten akkumulieren fibrogene Zellen, welche die Entzündungsreaktion aufrecht erhalten und vermehrt Bestandteile der EZM synthetisieren sowie deren Abbau hemmen. Fällt der schädigende Stimulus weg, kann es gegebenenfalls zu einer Ausheilung kommen mit Apoptose von aktivierten HSCs und Regeneration von Hepatozyten.

Modifiziert nach Bataller *et al.* 2005 [4]

Im Mittelpunkt der Fibrogenese steht die Transdifferenzierung von Hepatischen Sternzellen zu Myofibroblasten (MFBs), die den Hauptteil der extrazellulären Matrix produzieren [17]. Durch die von Nachbarzellen wie Hepatozyten, Kupffer-Zellen, Endothelzellen, Thrombozyten und Lymphozyten freigesetzten Mediatoren werden die HSCs stimuliert und ändern ihren Phänotyp. Sie transdifferenzieren unter Verlust der Retinoidtropfen zu proliferierenden, fibrogenen, kontraktile und α -smooth muscle actin (α SMA) exprimierenden Zellen, die verschiedene pro-fibrogene Faktoren wie TGF- β 1 [18], PDGF [19,20], reaktive Sauerstoffradikale [21,22], Acetaldehyd [23,24], Lipidmediatoren [25] sezernieren und deren Rezeptoren exprimieren. Durch autokrine Stimulation wird die Aktivierung aufrechterhalten und die Transdifferenzierung gefördert. Aktivierte HSCs produzieren exzessiv EZM, regulieren den EZM-Abbau und modulieren die Immunantwort der Leukozyten. Die Produktion von Bestandteilen der EZM wird durch transkriptionale und post-transkriptionale Faktoren beeinflusst [4].



Modifiziert nach Bataller *et al.* 2005 [4]

Abb. 4: Veränderungen von Leberparenchym, Disse-Raum und Sinusoid im Rahmen der Fibrogenese.

Dargestellt ist oben links ein makroskopisches Bild einer gesunden Leber. Rechts ist schematisch der Aufbau des Disse-Raumes mit Paranchymzellschicht und Sinusoid abgebildet. Im Disse-Raum liegen die ruhenden Vitamin-A-haltigen Hepatischen Sternzellen, Bindegewebe ist kaum vorhanden. Die sinusoidalen Endothelzellen sind gefenestert und ermöglichen einen regen Stoffaustausch zwischen Blut und Hepatozyten.

Bei chronischer Leberschädigung kommt es zur Einwanderung von Entzündungszellen und Apoptose von Hepatozyten. Die Hepatischen Sternzellen werden aktiviert, verlieren ihre Fetttropfen, proliferieren und bilden vermehrt EZM. Dies führt zur Ablagerung von Kollagen im Disse-Raum und zur Kapillarisation des sinusoidalen Endothels mit Verschluss der Fenestrationsen. Der Stoffaustausch wird behindert und das Lumen der Sinusoide eingeengt, wodurch der Flusswiderstand steigt. Die mikroskopischen Veränderungen bewirken die portale Hypertension mit Minderversorgung der perizentralen Hepatozyten. Makroskopisch zeigt sich die zirrhotische Leber wie unten links dargestellt hart und knotig.

Bei chronischer Leberschädigung kommt es zu einer Ansammlung von aktivierten HSCs und portalen MFBs am Ort der Zellregeneration. Die gesteigerte Produktion von Matrixbestandteilen, Matrixmetalloproteinasen wie MMP-2 und deren Inhibitoren wie TIMP-1 und TIMP-3 führt zu vermehrter Ablagerung und Umbau des hepatischen Bindegewebes. Das lockere Bindegewebe wird durch große Mengen von unlöslichem fibrillärem Kollagen ersetzt. Dieser Umbau führt zur Kapillarisation der Sinusoide und zum Verlust der typischen Leberarchitektur bis hin zu zirrhotischen Veränderungen [4].

2.1.4 Rolle von TGF- β 1 bei der Fibrogenese

Alle nicht-parenchymalen Zellen der Leber wie HSCs, Kupffer-Zellen und sinusoidale Endothelzellen können TGF- β 1 synthetisieren. Hepatozyten sind nicht in der Lage TGF- β 1

zu produzieren. Weil das Zytokin trotzdem intrazellulär nachgewiesen werden kann, wird vermutet, dass sie den inaktiven TGF- β 1 Komplex aufnehmen und bei Schädigung freisetzen [26,27].

TGF- β 1 ist neben PDGF der potenteste pro-fibrogene Faktor in der Entwicklung der Organfibrose mit multiplen Wirkungen auf Geweberegeneration, EZM Produktion, Wachstum und Apoptose [27]. In der Leber kontrolliert TGF- β 1 die Proliferation der Hepatozyten und die Leberregeneration, inhibiert die Zellproliferation, induziert die Apoptose von parenchymalen Zellen und reguliert die Immunantwort. In der Frühphase der Gewebeschädigung wird die TGF- β 1 Produktion rasch induziert [28]. Das freigesetzte TGF- β 1 bewirkt die Rekrutierung von Entzündungszellen, HSCs und MFBs, die noch mehr TGF- β 1 synthetisieren [28].

TGF- β 1 hat komplexe Wirkungen auf die HSC Aktivierung, Transdifferenzierung und deren Matrixproduktion. Das Zytokin hemmt die Proliferation der Hepatischen Sternzellen und induziert die Transkription TGF- β 1-abhängiger Gene. Die Synthese von Matrixbestandteilen wie Kollagen, Proteoglykanen und Glykoproteinen sowie von MMPs und TIMPs wird ebenso wie die Produktion und Freisetzung von Zytokinen und anderen Mediatoren gefördert [18,26,30]. So führt TGF- β 1 zu vermehrter Synthese und Sekretion der pro-fibrotischen Faktoren CTGF und ED-A und erhöht die intrazelluläre Produktion von H_2O_2 in aktivierten Hepatischen Sternzellen [31,32]. Die freigesetzten Mediatoren entfalten vielfältige auto- und parakrine Wirkungen und es entsteht ein Autoregulationsmechanismus, der die Aktivierung und Transdifferenzierung der HSCs aufrechterhält.

Die Wirkung von TGF- β 1 auf die Hepatischen Sternzellen verändert sich im Laufe der Transdifferenzierung. Ruhende HSCs und HSCs in der frühen Aktivierungsphase reagieren stark auf die Stimulation mit TGF- β 1. Volldifferenzierte MFBs zeigen kein Ansprechen auf TGF- β 1, sie produzieren die Matrixbestandteile TGF- β 1 unabhängig [33].

2.1.5 Klinik, Diagnostik und Therapie der Leberzirrhose

Die Symptome der Leberzirrhose resultieren aus hepatozellulärer Funktionsstörung und portaler Hypertension. Neben den klinischen Zeichen der Leberschädigung zeigen viele Patienten die Symptomen der zugrunde liegenden Erkrankung.

Die hepatozelluläre Funktionsstörung führt bei 70% der Patienten zu Allgemeinsymptomen wie Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Leistungsminderung und eventuell zu einer Gewichtsabnahme. Auffallen können Leberhautzeichen wie Spider naevi, Palmar- und Plantarerythem sowie Lacklippen. Hormonelle Störungen führen bei Männern zu Potenzstörungen, Verlust der Sekundärbehaarung (Bauchglatze) und Gynäkomastie. Frauen leiden unter Menstruationsstörungen bis hin zur sekundären Amenorrhoe. Verursacht durch die portale Hypertension klagen 60% der Leberzirrhotiker über Druck- und Völlegefühl im Oberbau.

Zusätzlich können Ösophagusvarizen entstehen, mit der Gefahr von Rupturen und lebensbedrohlichen Blutungen. Die Dekompensation der Leberschädigung führt zu Ikterus, hämorrhagischen Diathesen, Malnutrition mit Kachexie, Aszites, Ödemen und hepatischer Enzephalopathie bis hin zum Leberausfallkoma. Die Leberzirrhose stellt eine Präkanzerose dar und führt bei 3-6% der Zirrhosepatienten im Jahr zu der Entwicklung eines primären hepatozellulären Karzinoms [3,5].

Bei der klinischen Untersuchung zeigt sich meist eine Hepatosplenomegalie. In späteren Stadien ist die Leber klein und hart tastbar. Zusätzlich können Meteorismus, Aszites und Ödeme auffallen [3,5].

Typische Serumparameter dienen als diagnostische Faktoren bei Leberschädigung und Leberinsuffizienz. Die verminderte Syntheseleistung führt zum Abfall der Cholinesterase-, Antithrombin-III- und Albuminkonzentrationen sowie der Werte Vitamin-K-abhängiger Gerinnungsfaktoren. Durch die Schädigung des Parenchyms steigen die Transaminasen GOT und GPT. Außerdem zeigt sich eine Erhöhung der γ -GT bei Cholestase und von Bilirubin und Ammoniak bei verminderter metabolischer Leistung [3,5]. Im Rahmen der Fibrogenese steigen außerdem die Serumkonzentrationen von Proteinen, die direkt in den Fibroseprozess involviert sind, wie beispielsweise das N-terminale Pro-Peptid des Kollagen-III, Hyaluronsäure und Gewebeinhibitoren der MMPs. In Zukunft soll die massenspektroskopische Bestimmung des Serumproteinmusters (Proteomics) helfen eine Fibrose zu diagnostizieren und ihren Verlauf zu beurteilen [4].

In der Sonographie stellt sich die zirrhotische Leber inhomogen und mit unregelmäßiger Oberfläche dar. Diese Untersuchungsmethode erlaubt eine genaue Beurteilung von Komplikationen wie portaler Hypertension mit Splenomegalie und Aszites. Die Lebermorphologie kann außerdem durch CT, MRT und die Laparoskopie beurteilt werden [3,5]. Eine neue, nicht-invasive bildgebende Methode der Diagnostik bei Leberzirrhose ist der FibroScan. Das Gerät nutzt die transiente Elastographie für die Messung der Lebersteifigkeit [34,35].

Die invasive Feinnadelpunktion sonographiegesteuert oder ideal unter laparoskopischer Sicht, gilt immer noch als Goldstandard für Diagnosesicherung, Verlaufskontrolle und Bestimmung des Fibrorestadiums [3,5]. In Zukunft sollen Kombinationen aus Serumfibrosemarkern und FibroScan die diagnostische Genauigkeit nicht-invasiver Methoden erhöhen und eine Verlaufskontrolle ohne Leberbiopsie möglich machen.

Zur Prognoseabschätzung bei Leberzirrhose und für die Planung einer stadienabhängigen optimalen Therapie wird klinisch der Child-Pugh-Score eingesetzt. Als Kriterien dienen die Serumkonzentrationen von Albumin und Bilirubin sowie der Quick-Wert. Des weiteren wird die Ausprägung des Aszites und der hepatischen Enzephalopathie beurteilt. Patienten, die

mit Child A klassifiziert wurden, haben eine hohe 1-Jahres-Überlebensrate. Bei Child B liegt die Letalität innerhalb eines Jahres bei 20-40%, bei Child C bei 40-60% [3,5].



Abb. 5: endoskopisches Bild einer zirrhotischen Leber.

Der Leberrand ist nicht scharfkantig sondern abgerundet. Die Leberoberfläche erscheint unregelmäßig und höckrig.

Renz-Polster et al. 2006 [5]

Im Vordergrund der Behandlung steht die Therapie der Grunderkrankung. Dazu kommen allgemeine Maßnahmen wie die Vermeidung von Hepatotoxinen und eine eiweiß- und kalorienreiche Ernährung. Neben der Therapie von Komplikationen ist eine regelmäßige Kontrolle durch Sonographie und die Bestimmung des α_2 -Fetoproteins zur Früherkennung eines hepatozellulären Karzinoms etwa alle sechs Monate besonders wichtig. Als ultima ratio gilt die Lebertransplantation, die einzige mögliche Therapie bei Dekompensation der Leberschädigung [3,5].

Das zunehmende Wissen über die Pathophysiologie der Fibrogenese ermöglicht die Entwicklung gezielter Therapien. Medikamentöse Therapieoptionen wären der Einsatz von anti-fibrotischem INF- α oder INF- γ , von Antioxidantien wie Vitamin-E, N-Acetylcystein oder Glutathion sowie von ACE-Hemmern oder Sartanen zur Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems [4,36]. TGF- β 1 stellt als potentestes Fibrogen einen sinnvollen Angriffspunkt für eine *molecular targeted therapy* dar. Die Wirkungen von TGF- β 1 können experimentell *in vivo* und *in vitro* auf unterschiedliche Weise blockiert werden. Die TGF- β 1 Synthese kann durch den Einsatz von *anti-sense* RNA inhibiert [37] und die Aktivierung des latenten TGF- β 1 durch Blockade von Proteasen wie Thrombospondin-1 (TSP-1) [38] und Plasmin [39] gehemmt werden. Aktives TGF- β 1 kann durch TGF- β 1 bindende Proteine wie Dekerin, BMP-7 und α_2 -Makroglobulin [36,40], durch löslichen T β R [41,42] und durch die Expression dominant negativer TGF- β Rezeptoren [41] abgefangen oder durch TGF- β 1 Antikörper [43] eliminiert werden. Außerdem ist es möglich die Signaltransduktion durch Überexpression inhibitorischer Smad Proteine zu unterbrechen [44]. Allerdings ist eine langfristige systemische Inhibition aufgrund der Multifunktionalität dieses Zytokins

problematisch. Ziel vieler Forschungsgruppen ist deshalb die Entwicklung organ- oder zellspezifischer TGF- β 1 Suppressionsstrategien [36].

2.1.6 Hepatitiden: *Grading* und *Staging* der chronischen Hepatitis

Die Hepatitis ist eine Entzündung der Leber charakterisiert durch hepatozelluläre Nekrosen mit nachfolgender Infiltration des Gewebes mit hauptsächlich lymphozytären Entzündungszellen [3,5].

Auslösende Faktoren einer akuten Hepatitis können Infektionen mit Viren, Bakterien oder Pilzen, toxische Einflüsse durch Alkohol, Medikamente oder Vergiftungen sowie Schwangerschaft und immunologische Prozesse sein [3,5].

Die klinische Diagnose einer chronischen Hepatitis kann gestellt werden, wenn Symptome und typische laborchemische Veränderungen mindestens sechs Monate persistieren. Histopathologische Kriterien einer chronischen Hepatitis sind die hauptsächlich portalen rundzelligen Entzündungsinfiltrate fakultativ einhergehend mit portaler Bindegewebsvermehrung und entzündungszelliger Infiltration mit hepatozellulären Nekrosen in der parenchymatösen Grenzlamelle [45]. Ursächlich kommen Virusinfektionen, hauptsächlich hervorgerufen durch die Hepatitisviren B und C, Autoimmunprozesse, Medikamente und Toxine, Stoffwechselerkrankungen sowie kryptogene Faktoren infrage [3,5,45]. Die alkoholische und die nichtalkoholische Steatohepatitis werden, obwohl sie die Kriterien einer chronischen Hepatitis größtenteils erfüllen, nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (CGP), der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen (DGVS) und des Kompetenznetzes Hepatitis (Hep-Net) nicht in die Definition einbezogen [45].

Die Indikation zur Leberbiopsie wird gestellt, wenn ihr Ergebnis für die weiteren therapeutischen Maßnahmen von Bedeutung ist. Die histopathologische Analyse des Biopsats stellt den Goldstandard für die Bestimmung der entzündlichen Aktivität und des Fibrosestadiums dar [46] und hat prädiktive Bedeutung für das therapeutische Ansprechen [47]. Zusätzlich dient sie der Diagnosestellung einer Hepatitis, der Beurteilung ihrer Chronizität sowie der ätiologischen Abklärung [3,45].

Für die Bestimmung von Fibrosestadium (*Staging*) und entzündlicher Aktivität (*Grading*), definiert durch das Ausmaß des nekroinflammatorischen Gewebeschadens, empfehlen die Leitlinien der Pathologie die Verwendung des *Scoring*-Systems nach Desmet *et al.* [48] in der Routinediagnostik [44]. Das *Staging* ist unter Berücksichtigung anderer Faktoren wie Alter und *Grading* das wichtigste histologische Kriterium der Prognoseabschätzung und maßgebend für Therapieindikation und -auswahl. Der Desmet-Score unterscheidet 5 Stufen der Leberfibrose, die verbal als keine, milde, mäßige, schwere Fibrose und das letzte Stadium als Zirrhose bezeichnet und die numerisch in Grad 0-4 eingeteilt werden [45]. Die

entzündliche Aktivität einer chronischen Hepatitis ist variabel und kann sowohl ab- als auch zunehmen. Ihre Bestimmung erlaubt deshalb nur eine Beurteilung des Entzündungsgrades zum Biopsiezeitpunkt. Allerdings kann zusammen mit dem Fibrosestadium, auch wenn Infektionszeitpunkt und Erstmanifestation nicht bekannt sind, eine prognostische Aussage gemacht werden. Der Desmet-Score differenziert eine minimale, milde, mäßige und schwere hepatische Entzündung entsprechend Grad 1 bis 4 [48].

2.1.7 Hepatitis C Virus und Hepatitis C Virus Infektion

Das Hepatitis C Virus ist ein Einzelstrang-Plus-RNA-Virus aus der Gruppe der Flaviviren mit hoher genetischer Variabilität. Die Übertragung erfolgt überwiegend parenteral meistens durch Bluttransfusionen oder im Rahmen von Drogenmissbrauch. Die akute Infektion verläuft zu 75% asymptomatisch, die restlichen 25% zeigen nur milde unspezifische Symptome mit leichtem bis mittelgradigem Transaminasenanstieg. Bei mehr als 50-80% persistiert das Virus und es entwickelt sich eine chronische Hepatitis, die bei mindestens 20% der Betroffenen innerhalb von 10-20 Jahren in eine Leberzirrhose mündet, in deren Verlauf ein primäres hepatozelluläres Karzinom entstehen kann. Die chronische Hepatitis C ist in Europa und Nordamerika für 40% der Leberzirrhosen und 60% der primären Leberzellkarzinome verantwortlich [3,5]. Die Hepatitis C induzierte Leberfibrose ist histologisch initial periportal lokalisiert. Pathogenetisch wird vermutet, dass im Laufe der Erkrankung bestimmte Virusproteine Entzündungsreaktionen, Apoptose und Fibrogenese fördern. Das Core-Protein und NS5A beeinflussen beispielweise den hepatischen Lipidstoffwechsel und fördern die intrazelluläre Fettakkumulation durch Interaktion mit Apolipoprotein A1 und A2 [49]. Außerdem bewirken sie die Freisetzung von Sauerstoffradikalen [50,51].

Die Diagnose erfolgt durch den Nachweis von anti-HCV-Antikörpern mittels ELISA oder Immunoblot oder von HCV-RNA durch Polymerasekettenreaktion. Die Bestimmung der HCV-RNA erlaubt eine Aussage über die Infektiosität des Virusträgers. Bis jetzt gibt es im Unterschied zur Hepatitis B Infektion keine Schutzimpfung für die Prävention einer Infektion mit dem Hepatitis C Virus. Die Entwicklung eines solchen Impfstoffes ist deshalb Gegenstand intensiver Forschungen. Einige Studien haben bereits gezeigt, dass eine T-Zell-Vakzine bei Schimpansen zu einer hinreichenden Immunität verhelfen kann, die zwar nicht die Infektion an sich aber die Viruspersistenz verhindern konnte [52].

Therapiert wird bei akuter Infektion mit einer Interferon- α Monotherapie für 24 Wochen. Bei chronischer Infektion und erhöhten Transaminasen wird versucht, das Virus mit einer Kombinationstherapie aus PEG-Interferon- α und Ribavirin über 24 bei Genotyp 1 und 4 sowie 48 Wochen bei Genotyp 2 und 3 zu eradizieren [3,5]. Die Möglichkeit einer individualisierten Therapie wird diskutiert.

2.2 Transforming Growth Factor- β 1

2.2.1 TGF- β 1: Allgemeines

TGF- β 1 ist ein Zytokin aus der Gruppe der Wachstumsfaktoren, deren Signaltransduktion über Rezeptor-Serin/Threonin-Kinasen vermittelt wird [53].

Zu der TGF- β -Superfamilie zählen mehr als 30 verwandte, evolutionär hoch konservierte Proteine, die eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellwachstum und -differenzierung spielen und essentielle Funktionen in der Embryogenese übernehmen. Mitglieder sind z.B. die drei Isoformen des TGF- β , Aktivine, Inhibine, *bone morphogenic proteins* (BMPs), *growth/differentiation factors* (GDFs) und das Anti-Müller-Hormon [18,54,55]. Alle werden als Prä-Pro-Proteine mit einer hydrophoben Signalsequenz, einer Pro-Domäne und einer maturen C-terminalen Domäne synthetisiert. Die biologisch aktiven Proteine sind über Disulfidbrücken verbundene Homodimere [55,56].

Die humanen TGF- β Isoformen TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 sind, obwohl ihre Gene auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind, zu 80% homolog [26]. Sie sind in zahlreiche physiologische und pathologische Prozesse wie Wundheilung, Entwicklung, Onkogenese, Immunmodulation und Arteriosklerose involviert [57]. TGF- β 1 stellt die meist vorhandene und am besten charakterisierte Form dar und wird hauptsächlich in Endothelzellen und Zellen des hämatopoetischen Systems synthetisiert. Dabei weisen Thrombozyten, aus denen TGF- β 1 zuerst isoliert wurde, die höchste intrazelluläre TGF- β 1-Konzentration auf.

2.2.2 Vom Gen zum biologisch aktiven Zytokin

Die Synthese von Proteinen beginnt mit der Transkription ihrer Gene im Zellkern. Die RNA-Polymerase erstellt eine Kopie der für das Protein kodierenden DNA-Sequenz in Form eines einzelsträngigen RNA-Moleküls. Die Transkriptionsrate kann durch Bindung verschiedener Faktoren an Verstärkersequenzen moduliert werden. Nach post-transkriptionaler Modifikation des primären RNA-Transkriptes verlässt die mRNA G-Protein-anhängig den Zellkern über die Kernporen. Im Zytosol beginnt die Translation mit Bindung der ribosomalen Untereinheiten an das Start-Codon der mRNA. Das Ribosom entfernt sich im Laufe der Elongation der Proteinsynthese vom 5'-Ende der mRNA, sodass sich mit einem Abstand von etwa 30 Nukleotiden weitere Ribosomen an die mRNA lagern können. Erreicht das Ribosom ein Stop-Codon, zerfällt dieses in seine Untereinheiten und das Polypeptid wird freigesetzt [53].

Sekretorische Proteine wie TGF- β 1 müssen ko-translational in das raue endoplasmatische Retikulum (rER) transportiert werden. N-terminal befindet sich eine Signalsequenz aus etwa 20 hydrophoben Aminosäuren. Verlässt das Signalpeptid die große ribosomale Untereinheit, wird es von einem Signalerkennungspartikel erkannt und zusammen mit dem Ribosom

gebunden. Die Proteinbiosynthese wird unterbrochen bis der Erkennungspartikel über einen Rezeptor an die Membran des rER bindet und Signalpeptid mit Ribosom an das Translocon abgibt. Das Protein wird bei fortlaufender Synthese in das Lumen transloziert, wo das Signalpeptid durch eine Signalpeptidase abgespalten wird und die initialen post-translationalen Modifikationen stattfinden. Während und nach der Synthese sorgen Chaperone für die ordnungsgemäße Faltung. Die Proteine werden in ausknospenden Vesikeln durch den Golgi-Apparat in das trans-Golgi Netzwerk transportiert. Dort erfolgt die Verpackung in sekretorische Vesikel und deren Sortierung. Auf dem Weg durch den Golgi-Komplex wird die im rER begonnene Glykosylierung der Proteine vervollständigt [53].

2.2.2.1 TGF- β 1 Genstruktur

Das TGF- β 1 Gen liegt auf Chromosom 19 q13.1-q13.3. Es setzt sich aus sieben Exons und sechs Introns zusammen und kodiert für 390 Aminosäuren (AS) [58].

In der Literatur sind 2 Promotoren beschrieben, von denen die Transkription ausgehen kann. Diese enthalten weder eine TATA- noch eine CAAT-Box, dafür aber eine GC-reiche Region, welche für die Transkription des TGF- β 1 Gens essenziell ist [59]. Verschiedene regulierende Bereiche auf der DNA sind bekannt. Von besonderer Bedeutung ist der 132bp-umfassende Abschnitt zwischen Position -453 und -323, der für die TGF- β 1 Autoregulation verantwortlich gemacht wird [60].

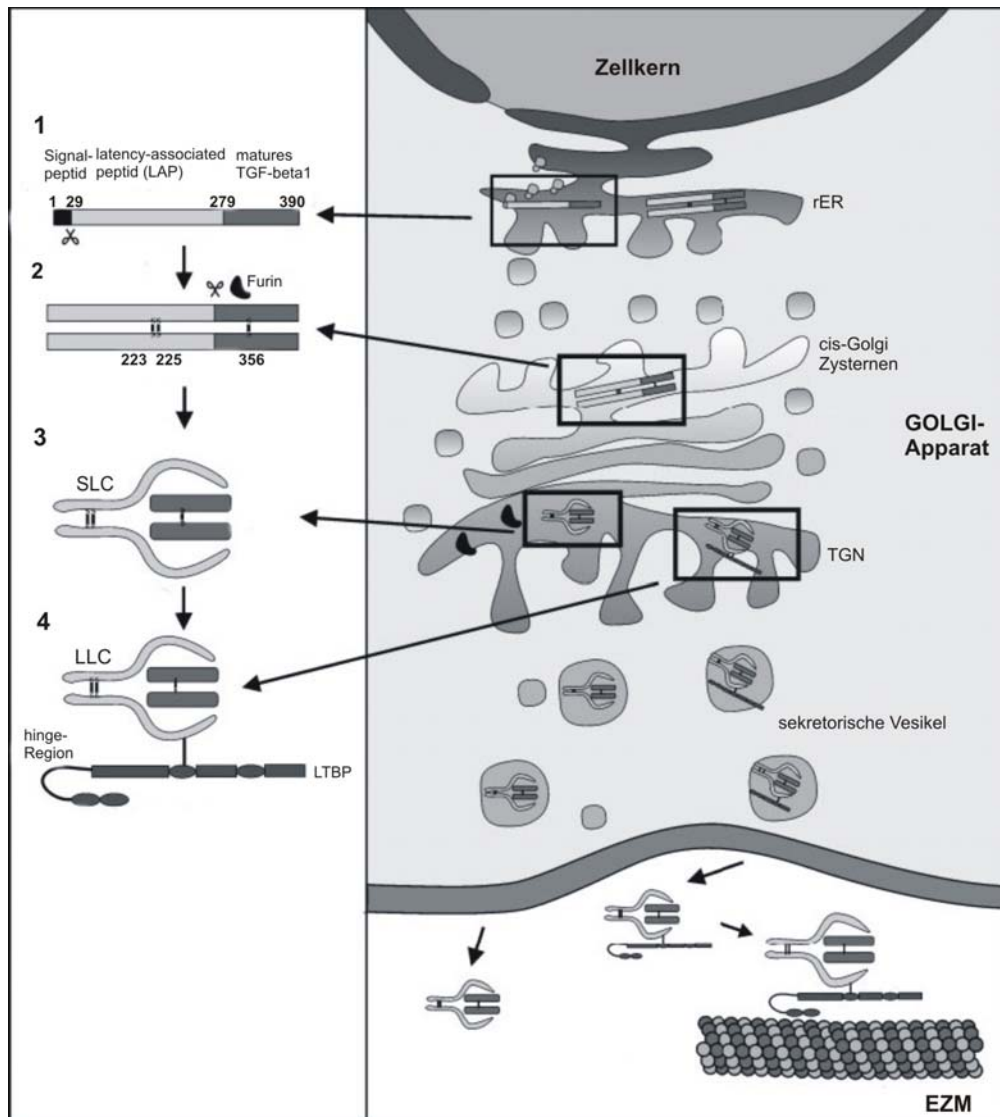
2.2.2.2 Synthese, Prozessierung und Sekretion von TGF- β 1

TGF- β 1 wird wie alle Mitglieder der TGF- β -Superfamilie als Prä-Pro-Protein mit einer typischen hydrophoben Signalsequenz, einer Pro-Region und dem C-terminal lokalisierten maturen Protein synthetisiert, das schnell dimerisiert.

Die Abspaltung der Signalsequenz zwischen Gly-29 und Leu-30 erfolgt ko-translational während der Translokation in das Lumen des rER [61]. Die Dimerisierung des Vorläuferproteins und die Formierung der korrekten Disulfidbrücken finden während oder kurz nach der Proteinbiosynthese statt [62]. Dabei bilden Cysteinreste an Position 223 und 225 jedes Monomers Disulfidbrückenbindungen [63], welche die Pro-Region verbinden. Das C-terminale TGF- β 1 wird dagegen durch 9 Disulfidbrücken zusammengehalten [64].

Nach der Synthese im rER wird das TGF- β 1 Vorläuferprotein über die cis-Golgi Zisternen zu den trans-Golgi Zisternen und weiter in das trans-Golgi Netzwerk (TGN) transportiert. Die endoproteolytische Spaltung des Homodimers zwischen zwei Argininen an Position 278 und 279 im Bereich der basischen Sequenz Arg-Arg-X-Arg erfolgt überwiegend im TGN katalysiert durch eine Pro-Proteinkonvertase (PC) [67]. Dubois *et al.* zeigten, dass die Kalzium-abhängige *subtilisin/kexin-like* Serin-Protease Furin die wichtigste TGF- β 1 Konver-

tase darstellt. Es wird allerdings vermutet, dass ihre Funktion durch andere Mitglieder der PC-Familie wie PC5B, PACE-4 und PC7 teilweise ersetzt oder ergänzt werden kann [68].



Modifiziert nach Janssens *et al.* 2005 [55]

Abb. 6: TGF-β1 Synthese und Sekretion.

1: Das Signalpeptid veranlasst die Synthese des Prä-Pro-Proteins am rER. Während der Translokation ins Lumen erfolgt die Abspaltung der hydrophoben Signalsequenz.

2: Das Vorläuferprotein dimert unter Ausbildung von Disulfidbrücken und wird zu den cis-Golgi Zysten transportiert.

3: Im Golgi-Apparat finden die post-translationalen Modifikationen statt. Die Pro-Proteinkonvertase Furin katalysiert die Endoproteolyse des dimeren Pro-Proteins zwischen AS 278 und 279. LAP und TGF-β1 bleiben nicht kovalent verbunden und bilden den *small latent complex* (SLC).

4: Der SLC kann über eine Disulfidbrücke mit einem singulären LTBP verknüpft werden. Der Komplex wird als *large latent complex* (LLC) bezeichnet. Über das Bindungsprotein LTBP kann der LLC kovalent mit der EZM verbunden werden.

Furin ist ein ubiquitär exprimiertes Typ-I Transmembranprotein mit Hauptlokalisation im TGN, das zwischen Zellmembran, frühen Endosomen und TGN zirkuliert. Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung der 56 AS umfassenden zytoplasmatischen Domäne regulieren die Furinkonzentration in den einzelnen Kompartimenten [69]. Furin prozessiert neben TGF-β1

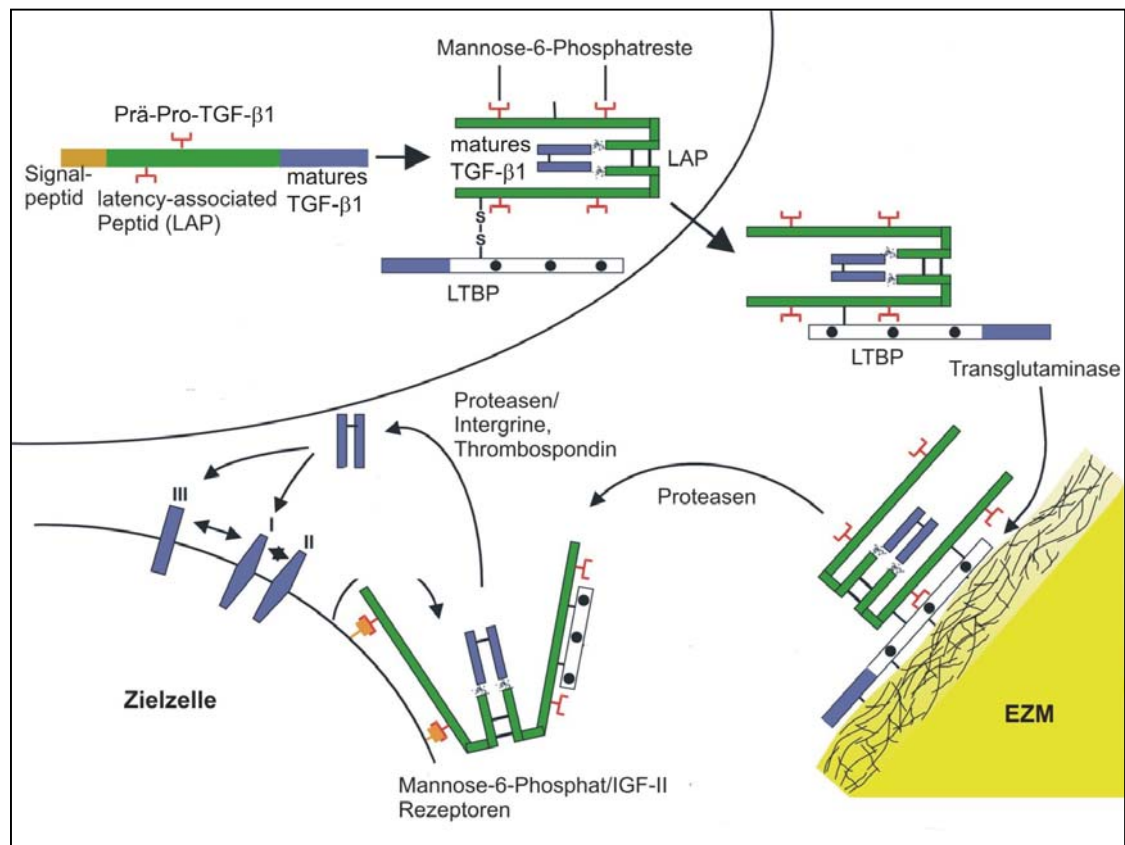
auch Neurotransmitter, Serumproteine, Rezeptoren, virale Glykoproteine wie das HIV Glykoprotein gp160 und bakterielle Toxine [68,69].

Das mature TGF- β 1 Dimer und seine dimere Pro-Region bleiben nach Endoproteolyse nicht-kovalent verbunden und bilden den *small latent complex* (SLC) [70]. Die Pro-Region ist dabei für die biologische Inaktivität des TGF- β 1 verantwortlich und wird als *TGF- β 1 latency-associated peptid* (β 1-LAP) bezeichnet [62]. Die meisten Zellen wie hämatopoetische Zellen und Immunzellen sezernieren einen hochmolekularen Komplex, den *large latent complex* (LLC), in dem β 1-LAP kovalent mit einem singulären *latent TGF- β binding protein* (LTBP) verbunden ist [61]. Diese Assoziation wird über eine Disulfidbrücke zwischen Cys-33 des β 1-LAP und einem Cysteinrest des LTBP vermittelt [71]. LTBP ist ein Mitglied der LTBP/Fibrillin-Proteinfamilie, die Fibrillin-1, Fibrillin-2, und Fibrillin-3 sowie die vier Isoformen des LTBP umfasst. Das Bindungsprotein spielt keine Rolle bei der TGF- β 1 Latenz [62], soll aber für die korrekte Prozessierung und Sekretion wichtig [72] und für die Verankerung an die EZM verantwortlich sein [73]. Die Komplexbildung erfolgt wahrscheinlich vor der Endoproteolyse in den cis-Golgi Zisternen [74].

2.2.2.3 TGF- β 1 Latenz und Aktivierung

Die meisten Zellen sezernieren TGF- β 1 als *large latent complex* (LLC), der an die extrazelluläre Matrix gebunden wird und nicht mit TGF- β 1 Rezeptoren der Zellmembranen interagieren kann. Die Konzentration von aktivem TGF- β 1 wird hauptsächlich durch die Rekrutierung dieses biologisch inaktiven Gewebereservoirs reguliert. Im Rahmen von Matrixveränderungen oder als Antwort auf andere Reize kann latentes TGF- β 1 schnell und gezielt mobilisiert werden und in kurzer Zeit extra- und intrazelluläre Signalwege in Gang setzen. Annes *et al.* vermuteten, dass bei diesem Regulationsvorgang LTBP als Lokalisationsregulator, β 1-LAP als Detektor, und TGF- β 1 als Effektor fungieren mit der Hauptfunktion, Veränderungen des extrazellulären Milieus zu registrieren und eine Antwort zu initiieren [75]. Die Assoziation des LLC mit der EZM wird über LTBP vermittelt. Das Enzym Transglutaminase verknüpft die N-terminale Region des Bindungsproteins kovalent mit Proteinen der extrazellulären Matrix [73,76,77]. Außerdem wird vermutet, dass auch der C-Terminus des LTBP an der Verankerung des Komplexes in der EZM beteiligt sein kann [78].

Das so gespeicherte TGF- β 1 kann durch sequenzielle Proteolyse des LTBP katalysiert durch verschiedene Serin-Proteasen wie Plasmin, Thrombin und Leukozytenelastase von der extrazellulären Matrix gelöst werden [79]. Dabei wird LTBP an der Proteinase-sensiblen *hinge Region* zwischen der EZM Bindungsdomäne und der SLC Bindungsstelle gespalten. Der freie Komplex kann über Mannose-6-phosphatreste des β 1-LAP an Kationen unabhängigen *Mannose-6-phosphat/Insulin-like growth factor-II* Rezeptoren (M6P-IGF-II Rezeptoren) der Zielzellmembran binden [80].



Modifiziert nach Gressner et al. 2002 [18]

Abb. 7: TGF-β1 Sekretion, Latenz und Aktivierung.

TGF-β1 wird als Prä-Pro-Protein synthetisiert. Vor der Sekretion wird im ersten Schritt ko-translational die N-terminale hydrophobe Signalsequenz abgespalten. Die Endoprotease Furin trennt die Pro-Region und das mature TGF-β1 zwischen der 278. und 279. AS. Die Pro-Region, auch als *TGF-β1-latency-associated peptid* (β1-LAP) bezeichnet, bleibt nicht kovalent mit dem matten TGF-β1 verbunden. Nach weiteren Modifikationen wie Glykosylierung und Phosphorylierung im Golgi-Apparat wird das dimere latente TGF-β1 über ein β1-LAP Monomer mit LTBP verbunden und sezerniert. Extrazellulär wird der *large latent complex* (LLC) über das LTBP in einer Transglutaminase-abhängigen Reaktion kovalent mit Bestandteilen der EZM verknüpft. Durch proteolytische Spaltung z.B. durch Plasmin oder Thrombin des LTBP wird der LLC von der EZM gelöst und bindet über Mannose-6-Phosphatreste des β1-LAP an M6P/IGF-II Rezeptoren der Zielzellen. Die Rezeptorbindungsstellen des matten TGF-β1 werden nach proteolytischer Spaltung durch z.B. Plasmin oder Cathepsin D oder Konformationsänderung durch Interaktion mit z.B. Integrinen oder Thrombospondin des LAP frei. Darauf kann TGF-β1 an seine Rezeptoren (TβR-I, TβR-II und TβR-III) binden und intrazelluläre Signalkaskaden in Gang setzen.

Auch nach Abspaltung von der EZM ist der Komplex aus SLC und verkürztem LTBP inaktiv [62]. β1-LAP blockiert die biologisch wirksamen Regionen des TGF-β1 Dimers, über die der Kontakt zu den TGF-β1 Rezeptoren vermittelt wird. Das mature TGF-β1 kann *in vivo* und *in vitro* durch Spaltung von β1-LAP mittels Proteasen wie Plasmin, Cathepsin G oder MMP-2, Konformationsänderungen des β1-LAP, induziert durch Bestandteile der EZM wie bestimmte Integrine oder Thrombospondin-1, sowie die Zerstörung der nicht-kovalenten Bindung zwischen β1-LAP und TGF-β1 durch Hitze oder Ansäuerung aktiviert werden [75].

2.2.2.4 Regulation von Expression, Sekretion und biologischer Aktivität

Die Regulation der TGF- β 1 Expression, Sekretion und biologischen Aktivität erfolgt auf verschiedenen Ebenen.

Die Genexpression kann durch unterschiedlichste Faktoren induziert oder supprimiert werden. TGF- β 1 unterliegt z.B. einer ausgeprägten Autoregulation für die, wie in Abschnitt 2.2.2.2 bereits beschrieben, bestimmte Sequenzen auf der DNA verantwortlich sind [60]. Außerdem wird eine Regulation durch Steroidhormone, Retinoide und Vitamin-D vermutet [81,82]. Eine Kontrolle der Syntheserate kann außerdem post-transkriptional durch Beeinflussung der mRNA Stabilität erfolgen. Die Regulationsmechanismen auf translationaler und post-translationaler Ebene sind im Detail noch nicht ganz verstanden, es ist allerdings belegt, dass die mRNA-Konzentration in der Zelle nicht immer mit der Sekretionsrate übereinstimmt [83]. Die post-translationalen Kontrollmechanismen scheinen demnach wichtiger zu sein als die Kontrolle der Transkription. Ein entscheidender Schritt in der Regulation der biologischen Wirkung ist die Aktivierung des latenten TGF- β 1.

Die TGF- β Isoformen zeigen *in vitro* nahezu dieselben Effekte, wogegen sich ihre Funktionen *in vivo* weitgehend voneinander unterscheiden. Zurückgeführt wird diese Beobachtung auf genetische Unterschiede der Pro-Regionen. Sequenzanalysen ergaben nur eine 34-38%ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz der LAP Isoformen gegenüber einer bis zu 80%igen Homologie von TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 [75]. Annes *et al.* stellten die Hypothese auf, dass die LAP Isoformen auf unterschiedliche Stimuli das latente TGF- β freisetzen und die spezifischen Wirkungen von TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 bedingen. Außerdem vermuteten sie, dass unbekannte Proteine LAP binden und die Aktivierung des latenten TGF- β verhindern können [75].

Die Bindungsproteine übernehmen eine wichtige Rolle in den Kontrollmechanismen der biologischen TGF- β 1 Aktivität. LTBP soll wichtig für die korrekte TGF- β 1 Prozessierung und Sekretion sowie für dessen Lokalisations- und Aktivierungskontrolle sein. LTBP-1 weist ein sehr variables Molekulargewicht zwischen 126 kDa und 210 kDa auf. Dafür werden zwei unterschiedliche Promotoren, alternatives Splicing und zellspezifisches Processing verantwortlich gemacht. Es konnte nachgewiesen werden, dass die längere LTBP-1 Form effektiver an die extrazelluläre Matrix bindet und eine Aktivierung des Komplexes erschwert, wogegen das kürzere LTBP-1 eine Lösung von der EZM begünstigt [77]. Außerdem findet sich ein unterschiedliches Expressionsmuster der LTBP Isoformen verschiedener Zellen.

Die Regulation von Synthese und Sekretion der TGF- β 1-aktivierenden Faktoren wie Plasmin, bestimmten Integrinen und Thrombospondin-1 sowie der TGF- β 1-bindenden Proteine wie α_2 -Makroglobulin und Decorin ist ebenfalls von großer Bedeutung. Alle diese Proteine unterliegen wiederum einer Regulation durch Aktivatoren und Inhibitoren. TGF- β 1 beeinflusst die

Genexpression der meisten Proteine, die an seiner Synthese, Prozessierung, Sekretion und Aktivierung bzw. Inaktivierung beteiligt sind. Dadurch ergibt sich ein sehr komplexes Netzwerk aus fördernden und hemmenden Faktoren auf den verschiedenen Ebenen, deren Mechanismen im Einzelnen noch nicht ausreichend verstanden sind.

2.2.3 TGF- β 1 Rezeptoren und Signaltransduktion

TGF- β 1 Zelloberflächenrezeptoren sind Glykoproteine mit einer Cystein-reichen Domäne, einer einzelnen Transmembran- α -Helix und einem zytoplasmatischen Anteil mit Kinaseaktivität [53]. Es werden Typ-I, Typ-II und Typ-III TGF- β Rezeptoren unterschieden [84,85]. Alle drei TGF- β Isoformen binden an einen heterotetrameren Transmembranrezeptorkomplex bestehend aus dimerem Typ-I und dimerem Typ-II Rezeptor mit zytoplasmatischer Serin/Threonin Kinase [53].

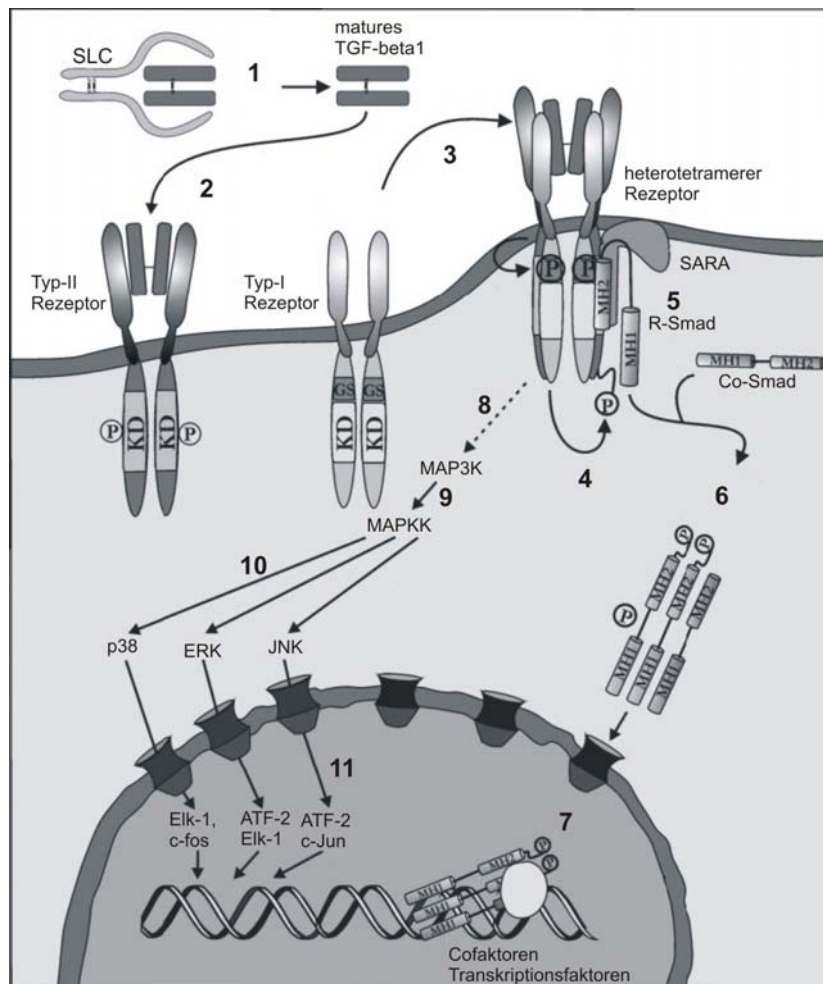


Abb.8: TGF- β 1 Signaltransduktion.

1: Aktivierung des latenten TGF- β 1 2: Bindung des Dimers an den T β R-II 3: T β R-II rekrutiert den T β R-I und T β R-II bilden ein Heterotetramer 4: konstitutiv aktiver T β R-II phosphoryliert T β R-I

Smad-abhängiger Weg:

5: Phosphorylierung der R-Smads 6: R-Smads bilden Heteromere mit Co-Smads und translokalisieren in den Zellkern 7: Regulation der Genexpression von TGF- β 1 Zielgenen

Smad-unabhängiger Weg:

8: Aktivierung der MAP3K 9: Aktivierung der MAPKK 10: Die MAPKK phosphoryliert und aktiviert p38, ERK und JNK 11: Homo- und Heterodimerisierung von Transkriptionsfaktoren und Regulation der Expression TGF- β 1-abhängiger Gene

Modifiziert nach Janssens *et al.* 2005 [55]

In Abwesenheit des Liganden liegen die Rezeptoren als Homodimere vor. Die Typ-III Rezeptoren Endoglin und Betaglykan sind akzessorische Rezeptoren, die durch Modulation der Ligandenbindungsspezifität indirekt an der Signaltransduktion beteiligt sind [86,87].

Bindet matures TGF- β 1 an den Typ-II Rezeptor (T β R-II) rekrutiert dieser den Typ-I Rezeptor (T β R-I). Der konstitutiv aktive Typ-II Rezeptor des Heterotetramers phosphoryliert und aktiviert den Typ-I Rezeptor. Darauf folgt die Phosphorylierung intrazellulär assoziierter *receptor-regulated* Smad Proteine (R-Smads) durch den T β R-I. An der klassischen TGF- β 1 Signalkaskade sind hauptsächlich die R-Smads Smad2 und Smad3 beteiligt. Die Interaktion zwischen Smad2 und Rezeptor wird durch das membranverankerte Adaptermolekül SARA (*Smad anchor for receptor activation*) vermittelt. Dieses bindet das unphosphorylierte Smad2 Protein und präsentiert dieses dem T β R-I. Smad3 bindet SARA-unabhängig an den Typ-I Rezeptor [17].

Nach der Phosphorylierung der R-Smads lösen sich diese von dem Rezeptor, ändern ihre Konformation und bilden Heteromere mit *common-mediator* Smad4 (Co-Smad4) [55,88]. Der Smad-Komplex transloziert in den Zellkern und reguliert TGF- β -abhängige Gene entweder durch direkte Bindung an die DNA oder Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren [89,90].

TGF- β 1 induziert die Synthese der *inhibitory* Smad-Proteine (I-Smads) Smad6 und Smad7, die den TGF- β 1 Signalweg inhibieren. Smad7 bindet an den TGF- β Rezeptorkomplex, blockiert die R-Smad Bindungsstellen und verhindert die R-Smad Aktivierung [88,91]. Außerdem können die I-Smads den Abbau des Rezeptorkomplexes initiieren [92,93]. Sie sind Bestandteile der negativen Rückkopplung zur Verhinderung überschießender TGF- β 1 Wirkungen.

Neben den Smad-abhängigen werden auch Smad-unabhängige Signaltransduktionswege beschrieben. TGF- β 1 kann alle drei MAPK Signalwege aktivieren. Zwischen den verschiedenen Signalwegen gibt es zahlreiche Kreuzreaktionen. Die ras/MEK/ERK MAP Kinasekaskade moduliert z.B. die Smad-Aktivität. Abhängig vom jeweiligen Zelltyp fördern oder hemmen die Interaktionen der verschiedenen Wege die TGF- β Signaltransduktion [54,94].

2.2.4 Inaktivierung und Abbau von TGF- β 1

TGF- β 1 wird durch Bindung an verschiedene Faktoren wie α_2 -Makroglobulin [95] oder Proteoglykane wie Decorin [96] und Biglycan [97,98] inaktiviert. Obwohl auch Hämato-poetische Zellen den *large latent complex* sezernieren, liegt das TGF- β 1 im Serum hauptsächlich an α_2 -Makroglobulin gebunden vor. Es wird vermutet, dass bei Thrombozyten-degranulation freigesetztes TGF- β 1 im Blutplasma durch Proteolyse aktiviert und durch die

Bindung an α_2 -Makroglobulin eine überschießende systemische Wirkung verhindert wird [99]. Eventuell wird TGF- β 1 daneben durch Bindung an Typ-III Rezeptoren und deren Internalisierung abgebaut.

Außerdem wird vermutet, dass TGF- β 1 von verschiedenen Zellen wie z.B. den Hepatozyten aufgenommen werden kann. Die Ausscheidung erfolgt über Niere und Leber [100,101].

2.2.5 Klinische Bedeutung von TGF- β 1

TGF- β 1 reguliert ein breites Spektrum biologischer Prozesse wie Zellproliferation, -differenzierung, -überleben, -migration, Immun- und Entzündungsreaktionen sowie die Produktion von extrazellulärer Matrix. Fehlende oder falsche Regulation der TGF- β 1 Sekretion, Aktivierung oder Signaltransduktion führt zu vielfältigen Erkrankungen, bei denen die normale Gewebearchitektur verloren geht. TGF- β 1 defiziente Mäuse versterben in der 3. bis 5. Woche post partum an multiplen Organentzündungen und Autoimmunprozessen [102,103].

Wie in Kapitel 2.1 für die Leber ausführlich beschrieben, spielt TGF- β 1 eine wichtige Rolle bei der Genese fibrosierender Erkrankungen. In Tierexperimenten führte die systemische Überexpression zur Fibrose hauptsächlich von Leber, Nieren und Lunge. Eine organspezifische TGF- β 1 Überexpression bewirkte eine selektive Fibrosierung [104,105,106]. Klinisch findet man eine Erhöhung der TGF- β 1 mRNA Expression und TGF- β 1-Konzentration bei Patienten mit Leber-, Nieren- und Lungenfibrose sowie bei Patienten, die unter Systemischer Sklerose, Osteomyelofibrose, proliferativer Vitreoretinopathie oder Sklerodermie leiden [107].

Außerdem ist TGF- β 1 an der Genese von Karzinomen, Arteriosklerose, Osteoporose und neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt. TGF- β 1 könnte bei einigen dieser Erkrankungen als Diagnose- oder Prognosefaktor genutzt werden. Erhöhte TGF- β 1 Serumwerte fanden sich z.B. bei Patienten mit invasivem Prostatakarzinom [108] und aggressiven Kolorektalen Karzinomen [109]. Studien konnten zeigen, dass eine hohe TGF- β 1 mRNA-Konzentration mit geringem Überleben bei Magenkarzinom [110] und eine gesteigerte TGF- β 1 Ausscheidung im Urin diagnostischer und prognostischer Faktor für Zirrhose bedingte primäre Hepatozelluläre Karzinome sein kann [111]. Außerdem ergab sich ein Zusammenhang zwischen hohen TGF- β 1 Plasmaspiegeln und gesteigertem Fibroserisiko bei Frauen mit Mammakarzinom und Radiatio [112].

2.3 Genetische Polymorphismen

2.3.1 Polymorphismen: Allgemeines

Als genetischer Polymorphismus wird das Vorhandensein von mehr als einem Allel eines Gens innerhalb einer Population bezeichnet. Die Häufigkeit jeder Variante muss bei mindestens einem Prozent liegen und das Auftreten darf nicht durch wiederholte Spontanmutationen oder zufällige Veränderungen bedingt sein. Es kann sich um Substitutionen, Deletionen, Insertionen oder Amplifikationen einzelner Nukleotide oder ganzer Genabschnitte handeln, die in allen somatischen Zellen und den Keimzellen zu finden sind. Der Austausch einer einzelnen Base wird als *single nucleotide polymorphism* (SNP) bezeichnet [53].

2.3.2 Genetische Faktoren der Fibrogenese

Erkrankungen unterschiedlichster Ätiologien können, wie in Kapitel 2.1 beschrieben, zur Entwicklung einer Leberfibrose bis hin zur Zirrhose führen. Der Krankheitsverlauf ist dabei allerdings interindividuell sehr variabel. Allgemein können Alter, Geschlecht, Rasse, Lebenswandel, Komorbiditäten und genetische Varianten auf die Entwicklung Einfluss nehmen. Zahlreiche Studien postulieren, dass Genpolymorphismen bei der Leberfibroseprogression im Rahmen z.B. von chronischem Alkoholabusus, Autoimmunhepatitiden oder einer Hepatitis C Virus Infektion eine entscheidende Rolle spielen. Die genetischen Polymorphismen aller in die Fibrogenese involvierten Gene sind potentiell einflussnehmende Größen im variablen Krankheitsverlauf [113]. Dabei können Polymorphismen in Genen, die für Regulatoren des Immunsystems, pro- oder anti-inflammatorische Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren oder Fibrosefaktoren kodieren, eine Leberschädigung beschleunigen oder hemmen. Mögliche Kandidatengene sind in Tabelle 1 dargestellt. Polymorphismen können dabei Enzymaktivitäten, die Expressions- und Sekretionsrate von Proteinen oder Immunreaktionen beeinflussen. Die biologische Aktivität von Zytokinen, die in verschiedene pathobiochemische Prozesse involviert sind, kann gesteigert oder herabgesetzt sein. Polymorphismen können auf unterschiedlichen Ebenen wirken und das Individuum sowohl anfälliger für Schädigungen machen, als auch die Krankheitsentwicklung verändern.

Im Folgenden sind einige Ergebnisse von Genotyp-Phänotyp-Analysen am Beispiel von durch chronischen Alkoholabusus, Autoimmunhepatitiden und Hepatitis C Virus Infektion induzierter Leberfibrose dargestellt. Eine Zusammenfassung zeigt Tabelle 2. Die Literatur zu diesen Themen ist allerdings oft widersprüchlich und die Resultate waren von anderen Autoren nicht immer reproduzierbar.

Pathophysiologie	vermittelnde Mediatoren	Kandidatengene
Vulnerabilität für bestimmte ätiologisches Agents ↓	Alkohol PBC chronische HCV Infektion	ADH, ALDH I TNF- α , Vitamin D Haptoglobin
Leberschädigung/ oxidativer Stress ↓	LPS Signalweg Todesrezeptor Liganden ROS Generation	CD14 Fas CYP2E1, MnSOD, HFE
Immunantwort Einwanderung von Entzündungszellen ↓	HLA Moleküle Zytokine Chemokine	HLA II Allele TNF- α INF- γ , IL-10 IL-1 β
HSC Aktivierung ↓	Wachstumsfaktoren pro-fibrogene Zytokine	Angiotensinogen Leptin, TGF- β
gesteigerte Kollagensynthese verminderter Kollagenabbau	pro-fibrogene Zytokine Kollagenasen/TIMPs	TGF- β TIMP-1, Plasminogen

Modifiziert nach Bataller *et al.* 2003 [114]

Tabelle 1: Pathogenese der Leberfibrose, ausführende Mediatoren und Kandidatengene, deren Polymorphismen auf die Fibrogenese Einfluss nehmen können.

Als ätiologische Faktoren der Leberfibrogenese kommen z.B. chronischer Alkoholabusus, PBC und die chronische HCV Infektion infrage. Die individuelle Vulnerabilität für alkoholische Leberschäden kann durch genetische Varianten der ADH oder ALDH modifiziert werden. Die Prädisposition für PBC oder die Neigung zur HCV Persistenz wird z.B. durch Mutationen der HLA-II Allele beeinflusst. Die gesteigerte Bildung von ROS oder die Aktivierung des LPS Signalweges fördert die Schädigung der Leber, beteiligt sind daran z.B. CD14 und Cytochrom P450IIE1. Im Rahmen der Fibrogenese wird das Immunsystem aktiviert und Entzündungszellen wandern in das geschädigte Gewebe. Bestimmte HLA-II Allele und Polymorphismen von Zytokinen und Chemokinen können diesen Prozess beeinflussen. Die HSC Aktivierung wird durch Wachstumsfaktoren und pro-fibrogene Zytokine wie TGF- β 1 getriggert. Es wird vermutet, dass genetische Polymorphismen von an der Aktivierung der HSC sowie am Umbau der EZM beteiligten Faktoren die individuell variable Krankheitsprogression mitbedingen können.

Die alkoholtoxische Leberschädigung entsteht im Rahmen komplexer Wechselwirkungen zwischen Lebenswandel des Patienten, Umweltbedingungen und genetischen Faktoren [115]. Dabei zeigen einzelne Individuen eine sehr variable Alkoholempfindlichkeit. Mutationen in Enzymen des Alkoholmetabolismus wie der Alkohol-Dehydrogenase oder der Aldehyd-Dehydrogenase können die Konzentration des hepatotoxischen Acetaldehyds erhöhen und eine alkoholische Leberschädigung begünstigen [116,117,118,119]. Studien ergaben, dass u.a. eine durch Mutationen in der Promotorregion bedingte vermehrte TNF- α -Konzentration mit schwerer Steatohepatitis assoziiert ist [120]. Superoxiddismutase und Glutathion-S-Transferase neutralisieren freie Sauerstoffradikale. Veränderungen ihrer Aktivitäten können die Progression der alkoholischen Leberschädigung beeinflussen [121].

Die primär biliäre Zirrhose ist eine gegen Gallengangsepithelien gerichtete Autoimmunerkrankung. Zwillingsstudien ergaben, dass bestimmte HLA Allele für die Entwicklung der primär biliären Zirrhose (PBC) prädisponieren [122]. Mutationen von pro-inflammatorischen Zytokinen oder dem Vitamin-D Rezeptor können den Krankheitsverlauf beeinflussen. Einige Allelvarianten des Apolipoprotein E Gens bedingen ein von der Norm abweichendes Ansprechen auf die Standardtherapie mit Ursodeoxycholsäure [123].

Kandidatengene	Proteinfunktion	Genotyp	Effekt auf Proteinebene	Fibrogenese	Erkrankung	Literatur
IL-10	anti-inflammatorisch	-627 C zu A	verminderte Transkription	gesteigert	ALD	130
IL-1 β	pro-inflammatorisch	-511 C zu T -3953 T zu C	gesteigerte Sekretion	gesteigert	ALD/PBC	130, 131
IL-1 Rezeptor	pro-inflammatorisch	VNTR Intron2	gesteigerte Transkription	gesteigert	ALD/PBC	133
Angiotensinogen	pro-fibrogen	-6 G zu A	gesteigerte Transkription	gesteigert	HCV	132
HLA-II Haplotypen	Immunantwort	Allele	variabel	variabel	HCV/PBC/AIH	132, 134, 135
TNF- α	pro-inflammatorisch	-308 G zu A	gesteigerte Transkription	gesteigert	HCV/PBC/ALD	120, 133, 136, 137
CD-14	LPS Rezeptor	-159 C zu T	gesteigerte Transkription	gesteigert	ALD	138
CTLA-4	Immunantwort	-66 A zu G	gesteigerte Transkription	gesteigert	ALD	139
MnSOD	Antioxidant	1193 C zu T	unnormale Funktion	gesteigert	ALD	121
TAP-2	Immunantwort	0201 Allel	unbekannt	gesteigert	ALD	124
ApoE	Virus Penetration	epsilon4 Allel	unnormale Funktion	gesteigert	HCV	123

Modifiziert nach Bataller *et al.* 2003 [114]

Tabelle 2: Beispiele für nachgewiesene Einflüsse von Polymorphismen auf die Expression, Sekretion oder Funktion des jeweiligen Proteins sowie auf die Fibrogenese.

Zu jedem Kandidatengen sind die Funktion des kodierten Proteins, der untersuchte Genotyp, die Auswirkungen der Mutation auf Proteinebene und der Einfluss auf die Fibrogenese angegeben. Außerdem ist aufgeführt, bei welcher Krankheit die Analysen durchgeführt und welcher Literatur die Ergebnisse entnommen wurden.

Im Fall der Hepatitis C induzierten Leberschädigung konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit im Hinblick auf Lebererkrankungen positiver Familienanamnese in jüngerem Alter eine Zirrhose entwickeln [124]. Diese Ergebnisse legen die Beteiligung genetischer Faktoren nahe. Dabei können genetische Variablen die Neigung zur Chronifizierung, die Progression der Fibrogenese oder das Ansprechen auf die antivirale Therapie beeinflussen. So können z.B. Mutationen von Bestandteilen des Immunsystems (HLA-Allele, TAP2) eine

Hepatitis C Virus Persistenz begünstigen oder verhindern [124,125,126]. Andere Studien belegen, dass der Krankheitsverlauf durch Polymorphismen von Faktoren des Renin/Angiotensin/Aldosteronsystems, IL-10, TNF- α oder TGF- β 1 und das Ansprechen auf die antivirale Therapie durch Mutationen Interferon-induzierter Proteine sowie Kombinationen gekoppelter Polymorphismen des RANTES Gens moduliert wird [127,128, 129].

2.3.3 Polymorphismen im TGF- β 1 Gen

TGF- β 1 stellt, wie in Kapitel 2.1 beschrieben, den potentesten pro-fibrogenen Mediator in der Genese der Leberfibrose dar. Deshalb wird vermutet, dass einige Polymorphismen des Gens am interindividuell variablen Verlauf der Leberschädigung beteiligt sind. Bis jetzt sind acht TGF- β 1 Genpolymorphismen bekannt.

Im Promotorbereich befinden sich drei Nukleotidsubstitutionen [140,141]. An Position –988 kann das Nukleotid Cytosin (C) gegen Adenin (A) ausgetauscht und an Position –800 kann statt Guanin (G) ein Adenin (A) positioniert sein. Das Nukleotid Thymin (T) kann in Position –509 der TGF- β 1-Promotorregion Cytosin (C) substituieren. Die 5'-untranslatierte Region weist an Position +72 eine C-Insertion auf. Dabei beschrieben Derynck *et al.* acht aufeinanderfolgende Cytosine [58], wogegen Kim *et al.* nur sieben Cytosine detektierten [59]. In Intron 4 konnte eine C-Deletion aufgezeigt werden [58].

Im kodierenden Bereich finden sich drei *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), die zu einem Aminosäureaustausch führen. Zwei davon liegen im Bereich der Signalsequenz in Codon 10 und Codon 25. An Position +869 in Exon 1 kann statt Thymin Cytosin lokalisiert sein. Codon 10 kodiert damit nicht mehr für die Aminosäure Leucin (CTG) sondern für Prolin (CCG). Der Polymorphismus an Position +915 führt durch Substitution von Guanin durch Cytosin zu einem Aminosäureaustausch von Arginin (CGG) zu Prolin (CCG). Der dritte Polymorphismus befindet sich in der Pro-Region des TGF- β 1 Vorläuferproteins. In Exon 5 an Position +1632 wird das Nukleotid Cytosin durch Thymin ersetzt und Codon 263 kodiert damit nicht für Threonin sondern für Isoleucin [140].

3. Arbeitsmaterial

3.1 LightCycler Analysen

3.1.1 Geräte

Gerät	Firma
LightCycler™	Roche, Deutschland
LightCycler™ Centrifuge Adapters	Roche, Deutschland
5415 D, Zentrifuge	Eppendorf, Deutschland
Z 233 MK, Zentrifuge	Biotron Labortechnik GmbH, Deutschland

3.1.2 Verbrauchsartikel

Verbrauchsartikel	Firma
LightCycler Kapillaren 20µl	Roche, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße 1,5ml	Eppendorf, Deutschland
Pipetman 10µl, Pipette	Eppendorf, Deutschland
Pipetman 100µl, Pipette	Eppendorf, Deutschland
Pipetman 200µl, Pipette	Eppendorf, Deutschland
Pipetman 1000µl, Pipette	Eppendorf, Deutschland
Pipettenspitzen, gestopft 10µl	Biozym, Deutschland
Pipettenspitzen, gestopft 100µl	Biozym, Deutschland
Pipettenspitzen, gestopft 200µl	Biozym, Deutschland
Pipettenspitzen, gestopft 1000µl	Biozym, Deutschland

3.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Firma
DMSO	Fluka, Österreich
Glucogen	Fermentas Life Sciences

3.1.4 Kits

Kit	Firma
LC-FastStart DNA Master Hybridisation Probes	Roche, Deutschland
Purgene™ DNA Isolierungskit	Biozym, Deutschland

3.1.5 Primer

Bezeichnung	Sequenz	Firma
Arg25Pro-For2	5'-CTA GGT TAT TTC CGT GGG-3'	MWG, Deutschland
Arg25Pro-Rev2	5'-CCT TGG CGT AGT AGT CG-3'	MWG, Deutschland
For4	5'-GGA GAG CAA TTC TTA CAG GTG-3'	MWG, Deutschland
K1	5'-CTC CTA CCT TTT GCC GGG AG-3'	MWG, Deutschland

K2	5'-GAC AGG ATC TGG CCG CGG AT-3'	MWG, Deutschland
Rev2	5'-CAG GCG GAG AAG GCT TAA TC-3'	MWG, Deutschland
HW09-For	5'-AAG CAG GGT TCA CTA CCG GC-3'	MWG, Deutschland
HW10-Rev	5'-AGG CCT CCA TCC AGG CTA CA-3'	MWG, Deutschland

3.1.6 Sonden

Bezeichnung	Sequenz	Firma
-509-A1	5'-AGG GTG TCA GTG GGA GGA GGG GGC AA-Fluo-3'	Metabion, Deutschland
Leu10Pro-A	5'-TCC CCC ATG CCG CCC TCC GGG CT-Fluo-3'	Metabion, Deutschland
Arg25Pro-A	5'-GCT ACC GCT GCT GTG GCT ACT GGT GCT-Fluo-3'	Metabion, Deutschland
Thr263Ile-A	5'-LC-Red640-GAG AGG GCC CAG CAT CTG CAA AGC T-P-3'	Metabion, Deutschland
-509-S1	5'-LC-Red640-AGG ACA CCT GAG GGA TGG A-P-3'	Metabion, Deutschland
Leu10Pro-S	5'-LC-Red640-CGG CTG CTG CCG CTG CT-P-3'	Metabion, Deutschland
Arg25Pro-S	5'-LC-Red640-ACG CCT GGC CCG CCG-P-3'	Metabion, Deutschland
Thr263Ile-S	5'-ATG GCC ACC CCG CT-Fluo-3'	Metabion, Deutschland

3.2 Molekularbiologie und Zellkultur

3.2.1 Geräte

Gerät	Firma
ABI 310 Genetic Analyzer, Sequenziermaschine	Applied Biosystems, USA
Agarose Gel-Elektrophorese System	Febikom Labortechnik, Deutschland
Axiovert 136 M, Mikroskop	Zeiss, Deutschland
Beckman Avanti™ J-15, Zentrifuge	Beckman Coulter, USA
Beckman Optima L-70k, Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, USA
Biofuge pico centrifuge, Zentrifuge	Heraus Instruments, Deutschland
Biofuge 15R, Zentrifuge	Kendro Laboratory Products, Deutschland
Cary 50 Probe, UV-Vis Spectrophotometer	Varian, USA
Certomat BS-1, Inkubationsschüttelschrank	B. Braun, Deutschland, Deutschland
Ecoline 011, Wasserbad	Lauda
Eismaschine	Ziegra, Deutschland
ER 7600, Mikrowelle	Toshiba, Japan
Hera Safe® HSP12, Flow-Bench	Heraeus, Deutschland
Function Line UT 20P	Heraeus, Deutschland
INTAS DNA-Gel-Documentation Imager	INTAS, Deutschland
Leica DMLB, Mikroskop	Leica, Deutschland
Lumi-Imager™ ECL	Boehringer Mannheim, Deutschland
MicroBeta Jet 1470 Scintillation and Luminescence Counter	PerkinElmer, USA
Mikroprocessor, pH-Meter	WTW, Deutschland
MilliQ Water Purification System, Wasserreinigungssystem	Millipore S.A., Frankreich
Pipetman 10µl, Pipette	Eppendorf, Deutschland
Pipetman 20µl, Pipette	Eppendorf, Deutschland
Pipetman 100µl, Pipette	Eppendorf, Deutschland
Pipetman 200µl, Pipette	Eppendorf, Deutschland
Pipetman 1000µl, Pipette	Eppendorf, Deutschland
Power Pack PP 2000, Power Supply	Biometra, Deutschland
Red Rocker PR50, Schüttler	Hoefer Pharmacia Biotech, USA
Suprasil, Quarzküvette für DNA-Quantifizierung	Hellma, Deutschland
T3 Thermocycler, PCR-Gerät	Biometra, Deutschland
Thermomixer 5436, Heizschüttler	Eppendorf, Deutschland
Titramax™ 100, Mikrotiterplattenschüttler	Heidolph, Deutschland
UV Tisch NP 90	Konrad Benda, Deutschland
Vacuum-Zentrifuge	Savant
Victor 1450 Multilable Counter	Wallac, Finnland
Voltage Power Pack PP2000, Power Supply	Biometra, Deutschland
Vortex Genie2	Fisher Scientific, USA
ZBE 151, Eismaschine	Ziegra, Deutschland
X Cell Blot Module, Western Blot Kammersystem	Invitrogen, USA
X Cell Sure Lock™ Mini-Cell, Elektrophoresekommer	Invitrogen, USA

3.2.2 Verbrauchsartikel

Verbrauchsartikel	Firma
Centri-Sep Columns, Sequenziersäulchen	Princeton Separations, USA
Lab-Tek®-II Chamber slide™	Nalge Nunc International, USA
Mikroreaktionsgefäß 0,5ml	Eppendorf, Deutschland
Mikroreaktionsgefäß 1,5ml	Sarstedt, Deutschland

Mikroreaktionsgefäß 2ml	Sorenson Bio Science Inc., USA
Nitrozellulosemembran	Pierce Biotechnology, USA
Petrischalen Ø 60mm	Sarstedt, Deutschland
Petrischalen Ø 100mm	Sarstedt, Deutschland
Pipettenspitzen 10µl	Eppendorf, Deutschland
Pipettenspitzen 200µl	Eppendorf, Deutschland
Pipettenspitzen 1000µl	Eppendorf, Deutschland
PP-Röhrchen 15ml	Greiner, Deutschland
PP-Röhrchen 50ml	Greiner, Deutschland
Skalpell	Feather Safety Razor Co, Japan
Samper med, Handschuhe	Semperit, Österreich
6-Well Multiplatte, Zellkultur	Sarstedt, Deutschland

3.2.3 Chemikalien

Chemikalie	Firma
Aceton	Merck, Deutschland
Agarose seaKem®	Cambrex, USA
Ammoniumacetat	Merck, Deutschland
Ampicillin	Sigma, Deutschland
Bacto™ Agar	BD Bioscience, USA
Bench Mark™	Invitrogen, Deutschland
Bicin	AppliChem, Deutschland
Biotin Blocking Solution	DrakoCytomation, USA
Bis-Tris	AppliChem, Deutschland
Borsäure	Merk, Deutschland
Bromphenolblau	Merk, Deutschland
BSA	Sigma, Deutschland
CaCl ₂	Merk, Deutschland
Chloroform	Sigma, Deutschland
DMEM	Camprex, Belgien
DMSO	Fluka, Österreich
DOC	Merk, Deutschland
DTT	Sigma, Deutschland
dNTPs	Roche, Deutschland
EDTA	Merk, Deutschland
Eisessig	Merk, Deutschland
Enzympuffer B	Roche, Deutschland
Enzympuffer H	Roche, Deutschland
Enzympuffer M	Roche, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma, Deutschland
Foetal Bovine Serum	PAA Laboratories GmbH, Deutschland
Fischgelatine	Sigma, Deutschland
Formaldehyd, 36,5%	Carl Roth GmbH & Co, Deutschland
Fugene	Roche, Deutschland
Glucose	Sigma, Deutschland
Glycerin	Sigma, Deutschland
HCl, 1M	Merk, Deutschland
HEPES	Carl Roth GmbH & Co, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co, Deutschland
Kaliumacetat	Merk, Deutschland
KCl	Merk, Deutschland
Lamda-DNA- <i>Hind</i> III Digest	BioLaps

L-Glutamin	Cambrex, Belgien
LiCl	Merk, Deutschland
Lysozym	Roche, Deutschland
MgCl ₂	Merk, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH & Co, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co, Deutschland
MOPS	Carl Roth GmbH & Co, Deutschland
Na ₂ CO ₃	Merk, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	Merk, Deutschland
NaCl	Merk, Deutschland
Natriumacetat	Merk, Deutschland
Natriumhydroxid	Merk, Deutschland
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell, Deutschland
Nucleotid-Mix	Roche, Deutschland
NuPAGE Bis-Tris Gel 4-12%	Invitrogen, Deutschland
NuPAGE Tris-Acetat Gel 3-8%	Invitrogen, Deutschland
NuPAGE LDS-Puffer	Invitrogen, Deutschland
Paraformaldehyd	Merk, Deutschland
Pen-Strep (Penicillin/Streptomycin)	Cambrex, Belgien
Phenol	Carl Roth GmbH & Co, Deutschland
Polyethylenglycol	Fluka Chemie AG, Schweiz
Ponceau S	Sigma, Deutschland
Propidiumjodid	Sigma, Deutschland
RPMI 1640 Medium	PAA Laboratories GmbH, Deutschland
Sequenzpuffer mit EDTA (10x)	Applied Biosystem, USA
SDS	Carl Roth GmbH & Co, Deutschland
Stop-Lösung, ELISA	R&D System, Deutschland
Tritiplex III	Merk, Deutschland
Trichloressigsäure	Merk, Deutschland
Triton X-100	Sigma, Deutschland
Trizma® base	Sigma, Deutschland
Trypsin-EDTA (10X)	PAA Laboratories GmbH, Deutschland
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co, Deutschland
T4-Ligasepuffer	Roche, Deutschland
Waschpuffer, ELISA	R&D System, Deutschland

3.2.4 Puffer und Lösungen

Ammoniumacetat (10M)

20ml: 15,42g Ammoniumacetat wurden ad 20ml H₂O gelöst. Die Lösung wurde sterilfiltriert.

Ampicillin (100mg/ml)

10ml: 1g Ampicillin wurde in sterilem H₂O gelöst und in 1ml Aliquots bei –20°C gelagert.

Block-Puffer

100ml: 5g Milchpulver wurden in 100ml 1xTBST gelöst.

Blockierungslösung-I

100ml: 50ml FKS, 10ml 10x PBS und 10ml 1% BSA wurden zusammengegeben und mit sterilem H₂O wurde auf 100ml aufgefüllt.

Blockierungslösung-II

100ml: Zu 50ml 1% BSA wurden 50ml PBS und 100µl Fischgelatine gegeben.

Blotting-Puffer (für Western Blot)

100ml: 5g Milchpulver wurden in 100ml 1x TBS sorgfältig gelöst.

Bromphenolblaulösung (w/v)

10ml: 50mg Bromphenolblau wurden in 10ml sterilem H₂O gelöst und bei 4°C gelagert.

1% (w/v) BSA in PBS pH 7,4

100ml: 1g Albumin wurde in 100ml PBS pH 7,4 gelöst.

CaCl₂ (1M)

100ml: 14,7g CaCl x 2 H₂O wurden ad 100ml gelöst, danach autoklaviert.

DMEM-Medium (0,2%)

50ml: Zu 50ml DMEM-Medium wurden 500µl Pen-Strep, 1ml L-Glutamin und 100µl FKS gegeben. Das Medium wurde bei 4°C gelagert.

DMEM-Medium (2%)

500ml: Zu 500ml DMEM-Medium wurden 5ml Pen-Strep, 10ml L-Glutamin und 10ml FKS gegeben. Das Medium wurde bei 4°C gelagert.

DMEM-Medium (10%)

500ml: Zu 500ml DMEM-Medium wurden 5ml Pen-Strep, 10ml L-Glutamin und 50ml FKS gegeben. Das Medium wurde bei 4°C gelagert.

DOC (1mg/ml)

50ml: 50mg Na-DOC wurden in 50ml sterilem H₂O gelöst.

DTT (500 mM)

10ml: 0,77g DTT wurden ad 10ml 0,01M NaOAc pH 6,0 gelöst, sterilfiltriert, zu 500µl aliquotiert und bei -20°C gelagert.

EDTA-Lösung (500 mM), pH 8,0

500ml: 93,06g Tritiplex III wurden in 350ml sterilem H₂O unter Zugabe von 10g NaOH-Plättchen gelöst. Unter ständiger pH-Kontrolle wurde soviel 5M NaOH zugegeben, bis der pH-Wert 8,0 betrug. Es wurde mit H₂O auf ein Volumen von 500ml aufgefüllt und die Lösung autoklaviert.

Einfriermedium

20ml: Zu 11ml DMEM-Medium wurden 5ml FKS und 4ml DMSO gegeben und gut gemischt.

ELISA-Puffer

50ml: In 5ml 1M Tris-HCl wurden 0,5g BSA gelöst. Dazu wurden 100µl 1M MgCl₂ und 250µl Tween 20 gegeben und gut gemischt. Mit sterilem H₂O wurde auf ein Endvolumen von 50µl aufgefüllt.

Ethidiumbromid (10 mg/ml)

5ml: 50mg Ethidiumbromid wurden in 5ml sterilem H₂O gelöst und lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

Glukose (1M)

100ml: 18,0g Glukose wurden in 100ml sterilem H₂O gelöst und sterilfiltriert. Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

HCl (1M)

100ml: 1ml 1M HCl wurden mit sterilem H₂O auf 100ml aufgefüllt.

H₂O, steril

Destilliertes H₂O wurde abgefüllt und autoklaviert.

Kaliumacetat (5 M)

500ml: 245,38g CH₃COOK wurden ad 500ml H₂O gelöst und autoklaviert.

KCl (1 M)

10ml: 7,45g KCl wurden ad 100ml H₂O gelöst und autoklaviert.

LB-Medium

1l: 10g Tryptone, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl wurden in 1l destilliertem H₂O gelöst und autoklaviert. Lagerung bei 4°C.

Lithiumchlorid (5 M)

100ml: 21,2g LiCl wurden ad 100ml sterilem H₂O gelöst und autoklaviert.

Lösung-I (Plasmidpräparation)

100ml: 5ml Glucose, 2ml 500mM EDTA (pH 8,0), 2,5ml Tris-HCl (pH 8,0) und 90,5ml steriles H₂O wurden gemischt und bei 4°C gelagert.

Lösung-II (Plasmidpräparation)

100ml: In 85ml sterilem H₂O wurden 10ml NaOH und 5ml 20% SDS (w/v) gelöst. Die Lösung musste vor der Präparation stets frisch angesetzt werden.

Lösung-III

200ml: 121ml 5M Kaliumacetatlösung, 23ml Eisessig und 57ml steriles H₂O wurden gemischt und bei 4°C gelagert.

Lysozymlösung (10mg/ml)

5ml: 50mg Lysozym wurden in 5ml Lösung-I aufgenommen. Vor Gebrauch musste die Lösung stets frisch angesetzt werden.

MES-SDS Laufpuffer (20x)

500ml : 97,6g MES, 60,6g Bis-Tris, 10g SDS und 3g EDTA wurden in 500ml sterilem H₂O gelöst.

MgCl₂ (1 M)

100ml: 20,00g MgCl₂ wurden ad 100ml H₂O gelöst und autoklaviert.

MOPS (1 M)

100ml: 20,93g MOPS wurden in 60ml H₂O gelöst, mit 5M NaOH ein pH-Wert von 7,0 eingestellt und mit H₂O auf 100ml aufgefüllt und dann sterilfiltriert.

MOPS SDS-Laufpuffer

500ml: 104,6g MOPS, 60,6g Bis-Tris, 10g SDS und 3g EDTA wurden ad 500ml sterilem H₂O gelöst.

Natriumacetat (3 M) pH 6,8 (zur DNA-Fällung)

100ml: 24,6g Natriumacetat wurden in 60ml H₂O gelöst, mit Eisessig wurde ein pH von 6,8 eingestellt und mit H₂O auf 100ml aufgefüllt. Die Lösung wurde anschließend autoklaviert.

NaCl (5 M)

200ml: 58,44g NaCl wurden ad 200ml H₂O gelöst und autoklaviert.

NaCl (1,6 M)/PEG-Lösung (13% (w/v) (für Plasmidpräparation)
100ml: 13g PEG und 9,35g NaCl wurden in 100ml sterilem H₂O gelöst.

NaOH (2M)
100ml: 8g NaOH-Plättchen wurden in 100ml sterilem H₂O gelöst.

NaOH (5 M)
100ml: 20g NaOH-Plättchen wurden in 100ml sterilem H₂O gelöst und in einer Polyethylenflasche gelagert.

1,2N NaOH/0,5M HEPES
100ml: 11,9g HEPES wurden in 75ml sterilem H₂O gelöst, 12ml 10N NaOH zugegeben und gut gemischt.

NuPAGE Transferpuffer (20x)
126ml: 10,2g Bicine, 13,08g Bis-Tris und 0,75g EDTA wurden ad 126ml H₂O gelöst.

PBS pH 7,4 (10x)
1l: 80g NaCl, 2g KCl, 14,2g Na₂HPO₄ und 2,04g KH₂PO₄ wurden in 1l sterilem H₂O gelöst und der pH mit HCl auf 7,4 eingestellt.

Permeabilisierungslösung
0,1g Natriumacitrat wurden in 100ml sterilem H₂O gelöst. Dazu wurden 100µl Triton X-100 gegeben und gut gemischt.

Propidiumjoidlösung (10mg/ml)
10mg PJ wurden in 1ml HBSS gelöst und bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Proteinlaufpuffer 1x (für Western Blot)
2l: 2g SDS (20%), 6g Trizma base und 28,75g Glycin wurden in 2l H₂O gelöst.

RPMI 1640 Medium (0,2%)
50ml: Zu 50ml RPMI 1640 Medium wurden 500µl Pen-Strep, 1ml L-Glutamin und 100µl FKS gegeben. Das Medium wurde bei 4°C gelagert.

RPMI 1640 Medium (10%)
500ml: Zu 500ml RPMI 1640 Medium wurden 5ml Pen-Strep, 10ml L-Glutamin und 50ml FKS gegeben. Das Medium wurde bei 4°C gelagert.

Ripa (pH 7,2)
1l: In 20ml Nonidet P-40 wurden 2,42g Bis-Tris, 8,76g NaCl, 1g SDS und 5g DOC gelöst und gut gemischt. Mit sterilem H₂O wurde auf ein Endvolumen von 1l aufgefüllt.

Ripa + Complete
50ml: In 50ml Ripa wurde 1 Plättchen Complete gelöst und bei -20°C gelagert.

SDS (20%)
100ml: 20g SDS wurden in 100ml sterilem H₂O gelöst.

SDS-Gelladepuffer (2x)
10ml: 1ml 1M Tris-HCl, 2ml 20% SDS, 2ml 1% Bromphenolblau und 2ml Glycin wurden gemischt. Mit sterilem H₂O wurde auf ein Endvolumen von 10ml aufgefüllt.

STE-Puffer
1l: 20mM 5M NaCl, 2ml 500 mM EDTA und 190ml 1 M Tris-HCl pH 8,0 wurden in 968ml sterilem H₂O gelöst, autoklaviert und bei 4°C gelagert.

Stop-Mix (für Agarosegelelektrophorese)

5ml: 0,2ml 500mM EDTA (pH 8,0), 1ml Bromphenolblaulösung, 1,7ml Glyzerin und 0,126ml 20% SDS-Lösung wurden mit H₂O auf 5ml aufgefüllt und bei 4°C gelagert.

TBE (10x)

1l: 108g Trisbase, 55g Borsäure und 7,44g Titriplex III wurden in 1l H₂O gelöst und autoklaviert.

TBS (10x)

500ml: 10ml 1M Tris-HCl pH 7,5, 151ml 5M NaCl wurden mit H₂O auf 500ml aufgefüllt und autoklaviert.

TBST (10x)

500ml: 500ml TBS wurden mit 500µl Tween 20 versetzt und gut gemischt.

TE (pH 8,0)

100ml: 1ml 1M Tris-HCl pH 8,0 und 0,2ml 500 mM EDTA pH 8,0 wurden in 98,8ml H₂O gelöst und anschließend autoklaviert.

TFB-I-Lösung

100ml: 2,5ml 4M RbCl, 5ml MnCl₂, 1ml 1M CaCl₂, 0,6ml 3 M KOAc pH 6,0 und 15ml Gyzerin wurden vermischt und mit sterilem kaltem H₂O auf ein Endvolumen von 100ml aufgefüllt.

Die Lösung wurde vor Gebrauch stets frisch angesetzt und kühl bei 4°C gelagert.

TFB-II-Lösung

100ml: 1ml 1M MOPS pH 7,0, 7,5ml 1M CaCl₂, 1ml 1M NaCl und 15ml Glyzerin wurden vermischt und mit sterilem kaltem H₂O auf ein Endvolumen von 100ml aufgefüllt.

Die Lösung wurde vor Gebrauch stets frisch angesetzt und kühl bei 4°C gelagert.

Transferpuffer (für Western Blot)

1l: 5,82g Tris, 2,93g Glycerin, 1,875ml 20% SDS und 200ml Methanol wurden mit H₂O auf 1l aufgefüllt.

Tris-HCl (1 M) pH 8,0

1l : 122,1g Bis-Tris wurden in 800ml H₂O gelöst und mit konzentrierter HCl einen pH-Wert von 8,0 eingestellt. Mit H₂O wurde auf ein Endvolumen von 1l aufgefüllt und die Lösung autoklaviert.

TS

500ml: 0,495g Glukose wurden in 450ml sterilem H₂O gelöst. Dazu wurden 15ml 5M NaCl, 2,5ml 1M KCl und 12,5ml 1M Tris-HCl pH 8,0 gegeben. Mit sterilem H₂O wurde auf ein Endvolumen von 500ml aufgefüllt.

Waschpuffer (Western Blot)

1l: 12,1g Trizbase, 148,1g NaCl, 25ml Tween 20 und 2,5ml NP wurden mit sterilem H₂O gemischt, mit HCl auf pH 7,5 eingestellt und anschließend mit H₂O auf 1l aufgefüllt.

3.2.5 Multireaktionssysteme/Kits

Multireaktionssysteme/Kit	Firma
anti-Flag® HS M2, beschichtete 96-Multiwellplatte	Sigma, Deutschland
pGEM-Teasy Vektor System 1	Promega, Deutschland
Substrate Reagent Pack, Substratreagenz A + B, ELISA	Pierce Biotechnology, USA
SuperSignal®West Dura Extended Duration Substrat	Pierce Biotechnology, USA

3.2.6 Enzyme

Enzym	Firma
<i>Bam</i> HI	NEB, USA
<i>Eco</i> RI	NEB, USA
<i>Fse</i> I	NEB, USA
<i>Hind</i> III	NEB, USA
<i>Not</i> I	NEB, USA
<i>Pst</i> I	NEB, USA
Taq-DNA-Polymerase	Roche, Deutschland
Trypsin (10x)	PAA Laboratory, Österreich
T4-DNA-Ligase	Roche, Deutschland
RNase	Roche, Deutschland

3.2.7 Primer

Bezeichnung	Sequenz	Firma
MA001	5'-AAT GTC GTA ACA ACT CCG CC-3'	MWG, Deutschland
MB001	5'-GCA CTG CAC GCC GTA GGT CAG-3'	MWG, Deutschland
Mut4	5'-CTC GAG CAC TTG CAG GAG CGC ACG-3'	MWG, Deutschland
TGF1	5'-CTA CTA CGC CAA GGA GGT C-3'	MWG, Deutschland
TGF4	5'-CCG TGG AGC TGA AGC AAT AG-3'	MWG, Deutschland
SIM001	5'-GCT AGC CCT GTT CGC GCT CTC GGC-3'	MWG, Deutschland
SIM002	5'-AAG CTT GCA GGA GCG CAC GAT CAT G-3'	MWG, Deutschland
SIM003	5'-AGC CCT GTT CGC GCT CTC GGC-3'	MWG, Deutschland
SIM004	5'-AAG CTT GCT GCA CTT GCA GGA GCG CAC-3'	MWG, Deutschland
T7-Primer	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	MWG, Deutschland

3.2.8 Antikörper

Antikörper	Firma
anti-Flag M2, monoklonaler <i>mouse</i> 1. Antikörper	Sigma, Deutschland
anti-Furin, polyklonaler <i>rabbit</i> 1. Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti-GFP, polyklonaler <i>rabbit</i> 1. Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti- <i>goat</i> IgG, 2. Antikörper	Sigma, Deutschland
anti-LTBP-1, polyklonal <i>goat</i> 1. Antikörper	Clontech, Deutschland
anti- <i>mouse</i> IgG, 2. Antikörper	DAKO, Deutschland
anti- <i>mouse</i> IgG, 2. Antikörper	Sigma, Deutschland
anti- <i>rabbit</i> IgG, 2. Antikörper	Sigma, Deutschland
anti-TGF- β 1 Antikörper, biotiniliert	R&D System, Deutschland
Biotin Blocking System	DAKO, Deutschland
Streptavidin-FITC	DAKO, Deutschland
Streptavidin-HRP	R&D System, Deutschland

3.2.9 Biologische Materialien

3.2.9.1 Plasmide

Vektor	Firma
pReceiver-M02-CMV-hFurin	RZPD, Deutschland
LTBP-1 Vektor	Dieser Vektor wurde von Herrn Dr. rer. nat. Falko Drews zur Verfügung gestellt.
pCMV-Tag4A	Stratagene, Deutschland
p Δ E1sp1A-CMV- <i>full-length</i> TGF- β 1	Dieser Vektor wurde von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ralf Weiskirchen zur Verfügung gestellt.
pEGFP-N1	Clontech, Deutschland
pGEM-Teasy Vektor	Promega, Deutschland

3.2.9.2 Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp	Firma
JM105, E.coli	endA1 glnV44 sbcB15 rpsL thi-1 Δ (lac-proAB) [F' traD36 proAB ⁺ lacI ^q lacZ Δ M15] hsdR4(rk ⁻ mk ⁺)	ATTC Cellculture
XL2-Blue	endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 lac gln V44 F'[:Tn10 proAB ⁺ lac ^q Δ (lacZ)M15 Amy Cm ^R	ATTC Cellculture

3.2.9.3 Eukaryotische Zellen

Bezeichnung	Firma
CHO	ATCC Cell culture, Deutschland
LX-2	erhalten von Dr. Scott L. Friedman

4. Arbeitsmethoden

4.1 LightCycler Analysen

4.1.1 Isolierung von DNA aus Paraffinschnitten

4.1.1.1 Paraffinierung

Die verwendeten Biopsien wurden in der Universitätsklinik Köln sowie in anderen Krankenhäusern entnommen. Die Einbettung des Gewebes wurde vor Ort maschinell oder manuell durchgeführt. Im Folgenden wird das im Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Universitätsklinik Aachen verwendete Protokoll zur Einbettung von Gewebe in Paraffinblöcke beschrieben.

Die Gewebeproben wurden in 4%igem Paraformaldehyd fixiert und darin mindestens 24 Stunden inkubiert. Dann wurde das Paraformaldehyd verworfen und das Gewebe durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt und dabei entwässert. Die Proben wurden je nach Dicke 2x 20-45 Minuten in Xylol inkubiert, welches das Gewebe für Paraffin durchgängig machte. Die Lösungsmittel wurden in den nächsten Schritten durch Paraffin ausgetauscht. Dafür wurden die Gewebeproben in die jeweilige Kapsel gelegt und für 2 Stunden bei 60°C in Paraffinbad-I gegeben. Es folgte eine 2-stündige Inkubation in Paraffinbad-II und eine Inkubation über Nacht in Paraffinbad-III. Am Folgetag wurden die Proben eingeblockt.

4.1.1.2 Herstellung und Färbung von Paraffinschnitten

Die Paraffinblöcke wurden mit einem Mikrotom in Schichten von 1,5µm Dicke geschnitten, in einem 40°C warmen Wasserbad gestreckt, auf die Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37°C getrocknet. Zum Entparaffinieren wurden die Schnitte zuerst über 3x 2 Minuten Xylolbad und absteigende Alkoholreihe geführt. Das Gewebe wurde in Paraformaldehyd nachfixiert und anschließend gefärbt. Von den Schnitten wurden Hämatoxilin-Eosin-Färbungen (HE-Färbung) sowie Trichrom-Färbungen nach Gomori angefertigt.

Bei der HE-Färbung erscheinen die Zellkerne blau, Kollagen und Zytoplasma rot.

Die Schnitte wurden 3x 10 Minuten in Xylol inkubiert und anschließend durch eine absteigende Isopropanolreihe geführt (5 Minuten 98% Isopropanol, 5 Minuten 96% Isopropanol, 5 Minuten 90% Isopropanol, 5 Minuten 80% Isopropanol, 5 Minuten 70% Isopropanol). Nach einer 5-minütigen Inkubation in Wasser wurden sie 5 Minuten in Hämalaun-Lösung nach Mayer gestellt und anschließend kurz unter Leitungswasser gespült. Die Schnitte wurden 15 Minuten in fließendem Wasser gebläut, 3 Minuten in 1% Eosin inkubiert und kurz ausgewaschen. Es folgten 5 Sekunden Inkubation in 70%igem Isopropanol, 5 Sekunden 80%igem Isopropanol, 5 Sekunden 90%igem Isopropanol und 2x 5

Minuten 100%igem Isopropanol. Danach wurden die Schnitte 3 Minuten in Xylol gestellt und in Eukitt eingedeckt.

Die Trichrom-Färbung nach Gomori ist eine Spezialfärbung mit Silbernitrat, die argyrophile Bindegewebsfasern dunkelbraun bis schwarz darstellt. Das Zytoplasma der Zellen färbt sich rot, wogegen ihre Zellkerne blau-schwarz erscheinen. Kollagenfasern grenzen sich durch einen grünen Farbton vom restlichen Gewebe ab. Weil Bindegewebe bei der Gomori-Färbung hervorgehoben wird, eignet sich diese Färbung besonders zur Darstellung von fibrosierten Organen.

Die entparaffinierten Schnitte wurden in destilliertes Wasser gelegt und danach bei Raumtemperatur über Nacht oder bei 56°C für 1 Stunde in Brouinsche-Lösung gestellt. Bevor die Schnitte unter fließendem Wasser gründlich ausgewaschen werden konnten, mussten diese abkühlen. Es folgte die Kernfärbung mit Weigertschen Eisenhämatoxylin für 2 Minuten und erneutes Auswaschen für 10 Minuten. Die Schnitte wurden 10-20 Minuten in Trichrom-Lösung gestellt und danach 2 Minuten mit 0,5%iger Essigsäure gespült. Bei zu kräftiger Färbung wurde in Differenzierungsflüssigkeit entfärbt. Die Schnitte wurden in 90%iges Isopropanol gestellt und zuletzt mit Isopropanol abs., Xylol und Harzeinschluss fixiert.

4.1.1.3 Entparaffinierung und Zelllyse für DNA-Isolierung

Um DNA aus dem in Paraffin eingebetteten Gewebe zu gewinnen, wurden zuerst je 3x 7,5µm des Paraffinblockes mit einem Mikrotom abgehobelt und in ein 1,5ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Pro Tube wurden 295µl *Cell Lysis Solution* und 5µl Proteinase-K Mix zupipettiert, gevortext und anschließend kurz zentrifugiert. Die Proben wurden über Nacht bei 65°C im Schüttler inkubiert. Dabei verflüssigte sich das Paraffin und trennte sich vom Lebergewebe, gleichzeitig wurden die Zellen des Leberbiopsats lysiert. Nach Abkühlung bildete das Paraffin eine feste Schicht auf dem flüssigen Gewebelysat. Das Lysat wurde nach Durchdringen der harten Oberfläche vorsichtig abgezogen und in ein neues Mikroreaktionsgefäß gegeben.

4.1.1.4 DNA-Extraktion

Die Isolation und Aufreinigung der Gewebe-DNA wurde mit dem *Puregene® DNA Purification Kit* der Firma Gentra Systems durchgeführt.

Das lysierte Gewebe wurde mittels Salzfällung von Proteinen und anderen Kontaminationen getrennt. Hierfür wurden 100µl *Protein Precipitation Solution* zu den Proben gegeben, 20 Sekunden gevortext und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer 3-minütigen Zentrifugation bei 13000g, wurde der wässrige Überstand abgezogen und in neue Mikroreaktionsgefäße überführt, in die 300µl Isopropanol sowie 0,5µl Glykogen als *DNA-Carrier* vorgelegt worden waren. Die Proben wurden vorsichtig 50x invertiert und 3 Minuten bei 13000g zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 300µl 70%igem EtOH gewaschen. Nach vorsichtigem Mischen folgte eine 2-minütige Zentrifugation bei 13000g. Das Pellet wurde nach Abziehen des Überstandes bei Raumtemperatur unter dem Abzug getrocknet. Um die DNA wieder in Lösung zu bringen, wurden dem Pellet 50µl *DNA Hydration Solution* zugesetzt und 1 Stunde bei 65°C inkubiert. Die Proben wurden bei –20°C gelagert.

4.1.2 LightCycler

4.1.2.1 Grundlagen der Schmelzpunktanalyse

Der LightCycler ermöglicht eine effiziente *Real-Time PCR* gekoppelt mit einer schnellen Differenzierung von Genpolymorphismen durch Schmelzpunktanalyse. Die Detektion von Punktmutationen durch den LightCycler beruht dabei auf dem Prinzip des *Fluorescence Resonance Energie Transfers* (FRET).

Es wurden zwei fluorophorgekoppelte Oligonukleotide eingesetzt, die spezifische Sequenzen des PCR-Produktes erkennen und binden konnten. Die Interaktion und damit der Energietransfer zwischen den beiden unterschiedlich markierten Sonden konnte nur stattfinden, wenn die Fluorophore in engem Kontakt zueinander standen und die Dipole parallel ausgerichtet waren. Diese Bedingungen wurden nur erfüllt, wenn beide Oligonukleotide an ihre spezifische Sequenzen gebunden vorlagen. Die Zahl der gebundenen Sonden war temperaturabhängig und deren Schmelzpunkte wurden von dem Grad der Komplementarität zwischen Sonden- und DNA-Sequenz bestimmt. Ein Basenaustausch verschob die Schmelztemperatur durchschnittlich um 4 bis 8°C.

4.1.2.2 FRET: *Fluorescence Resonance Energy Transfer*

Das Prinzip des *Fluorescence Resonance Energy Transfer* wurde zuerst 1946 von Theodor Förster beschrieben. Es handelt sich um einen strahlungsfreien Energietransfer von einem Fluoreszenzfarbstoff auf einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff. Das angeregte Donor-Fluorophor überträgt die Energie nicht in Form von Fluoreszenz sondern durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung auf das Akzeptor-Fluorophor. Um diese Interaktion möglich zu machen, müssen bestimmte Bedingungen gegeben sein: Das Emissionsspektrum des Donors muss mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. Daraus ergibt sich, dass der maximal mögliche Energietransfer durch die Größe der übereinstimmenden Flächen der Spektren bestimmt wird. Zusätzlich müssen die Fluorophore parallele elektronische Schwingungsebenen und einen Abstand von nur wenigen Nanometern aufweisen. Der Energietransfer kann über die Abnahme der Emissionsintensität des Donors oder die Zunahme der Emissionsintensität des Akzeptors detektiert werden.

Mit Bindung der LightCycler-Sonden an die komplementären DNA-Sequenzen erfüllen sich die oben genannten Voraussetzungen für den *Fluorescence Resonance Energy Transfer*. Die

Fluorophore liegen nur durch wenige Basenpaare getrennt nahe beieinander und die Dipole sind parallel ausgerichtet. Das Donor-Fluorophor wird von einer externen Lichtquelle des LightCyclers angeregt und überträgt einen Teil seiner Energie durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung an den Akzeptor. Dieser wird angeregt und emittiert Licht einer anderen Wellenlänge, das vom LightCycler gemessen werden kann.

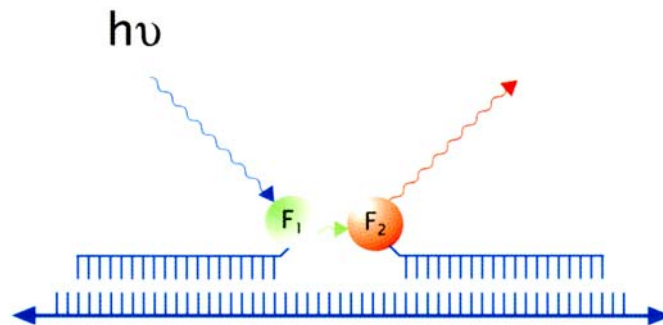


Abb. 9: Fluorescence Resonance Energy Transfer mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden. F1 entsprach bei den LightCycler Analysen Fluoreszein, F2 dem Fluorophor LightCycler-Red640.

FRET macht man sich in der Molekularbiologie bei der Quantifizierung von Nukleinsäure während der *Real-Time* quantitativen PCR und wie hier bei der Detektion von Punktmutationen zunutze. Außerdem findet die Methode Anwendung bei dem Nachweis von Proteininteraktionen, der Messung von Konformationsänderungen und vielem mehr.

4.1.2.3 LightCycler-Programm und Schmelzpunktanalyse

Zu Beginn des Programms wurden die Proben auf 95°C erhitzt. Bei dieser hohen Temperatur wurden thermolabile *blocking-groups* von Aminosäuren der *FastStart Taq*-Polymerase gelöst und diese auf so aktiviert. Während der Amplifikation wurden die verschiedenen PCR-Schritte durchlaufen. In der Denaturierungsphase lagen die genomische DNA, Primer und Sonden als Einzelstränge vor. Das Fluoreszein des Donors wurde mit blauem Licht einer Wellenlänge von 470nm angeregt und emittierte grünes Licht der Wellenlänge 530nm, das vom LightCycler nicht erfasst werden konnte. Bei Erreichen der Annealing-Temperatur banden Sonden und Primer an die spezifischen Sequenzen der eingesetzten DNA. Mit der Hybridisierung kamen die Fluorophore der Sonden in enge Nachbarschaft. In dieser Konstellation konnte der Donor, der durch das blaue Licht erregt worden war, Energie an LightCycler-Red640 übertragen. In der Folge wurde das Fluorophor (LightCycler-Red640) angeregt und emittierte Licht der Wellenlänge 640nm. Das rote Licht konnte im Gegensatz zum grünen Licht vom LightCycler gemessen werden. Die Elongation erfolgte bei einer Temperatur von 72°C. Zu diesem Zeitpunkt waren die Sonden bereits von der DNA gelöst oder wurden während der Primer-Extension von der DNA-Polymerase verdrängt. Am Ende der Replikation lag die eingesetzte DNA in doppelter Menge als

Doppelstrang vor. Mit der Denaturierung trennten sich die DNA-Einzelstränge und der nächste PCR-Zyklus wurde eingeleitet. Insgesamt wurden je nach Protokoll 45 bis 55 Zyklen durchlaufen. Auf die Amplifikation folgte die Schmelzpunktanalyse. Während der Schmelzpunktanalyse wurde die Temperatur schrittweise erhöht. Mit langsam steigender Temperatur hybridisierten die Sonden zunehmend bis alle Oligonukleotide an die DNA gebunden waren, um sich bei weiter fortschreitender Temperaturerhöhung wieder von der DNA zu trennen. Die Menge, der an die DNA gebundenen Sonden, nahm stetig ab, wobei sich die Sensor-Sonden vor den Anchor-Sonden lösten. Desto mehr Sonden von der DNA denaturierten, desto schwächer wurde das Signal des emittierten Lichtes. Die Energieabnahme wurde registriert, vom Computer analysiert und in Form von Kurven abgebildet. Die Schmelztemperatur wurde durch den Austausch einer Base abhängig von der Art des Basenaustausches und den umliegenden Basenpaaren um etwa 4 bis 8°C herabgesetzt. Auf diese Weise konnten Wildtyp und Mutante differenziert werden, wobei der Sensor je nach Wunsch komplementär zu Wildtyp oder Mutante war. Deshalb konnte abhängig vom Sonden-Design die Schmelztemperatur bei Punktmutation fallen oder steigen. Im letzten Schritt wurden die Proben auf 40°C abgekühlt und konnten entnommen werden.

4.1.2.4 Arbeitsschritte

Für jeden LightCycler-Ansatz wurden 10µM LightCycler *FastStart DNA Master Hybrid Probes*, 4mM MgCl₂, 0,5µM For- und Rev-Primer, 0,3µM Anchor und Sensor und 5% DMSO eingesetzt. Zunächst wurden die einzelnen Komponenten auf Eis aufgetaut und kurz anzentrifugiert. Für einen Ansatz wurden 2µl *LightCycler Master Hybrid Probes*, 2,4µl MgCl₂, 1µl For- und Rev-Primer, 1,33µl Anchor- und Sensor-Sonde und 1µl DMSO in ein 1,5ml Mikroreaktionsgefäß pipettiert. Mit Wasser wurde auf ein Endvolumen von 20µl minus der eingesetzten DNA-Menge aufgefüllt. Der MasterMix wurde in Gaskapillaren überführt und als Letztes die jeweilige DNA vorsichtig zupipettiert. Die Gaskapillaren wurden für 1 Minute bei 4°C und 80g zentrifugiert. Dadurch sammelte sich die Lösung am Boden der Kapillaren. Die Glaskapillaren wurden in das LightCycler-Rondell gestellt, der Deckel geschlossen und nach Eingabe der Daten das entsprechende Programm gestartet. Nach etwa 1 Stunde, abhängig von Zykluszahl und Anzahl der Proben (maximal 32), konnten die Ergebnisse ausgewertet und die Proben entnommen werden. Die Proben wurden verworfen oder durch Anzentrifugation in ein 1,5ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Die amplifizierte DNA wurde dann entweder bei 4°C gelagert oder direkt mit Stop-Mix versetzt, auf ein Agarosegel aufgetragen und durch Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt. Durch die Elektrophorese konnte die Länge des amplifizierten Fragmentes bestimmt und mit der Sollgröße verglichen werden. So konnte beurteilt werden, ob bei der PCR das richtige Fragment vervielfältigt wurde und gegebenenfalls eine Sequenzierung durchgeführt werden.

4.2 Molekularbiologie

4.2.1 PCR: Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion ist eine *in vitro* Methode zur Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen. Die enzymatische Vervielfältigung verläuft in drei sich wiederholenden Zyklen. Im Denaturierungsschritt werden die Wasserstoffbrückenbindungen der Doppelhelix gelöst und die DNA-Stränge getrennt. Es folgt die Anlagerung der Primer (Annealing) an die komplementären Sequenzen der DNA-Einzelstränge. Während der Elongation werden die Primer am 3'-Ende durch eine DNA-Polymerase komplementär zur Matrize verlängert.

Die PCR beginnt mit der Erwärmung der Proben auf 95°C, gefolgt von mehreren PCR-Zyklen. Dabei können Temperaturen, Inkubationszeiten und Anzahl der Zyklen variieren, abhängig von den verwendeten Primern, der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes und der Menge der eingesetzten Startmoleküle. Die Annealing-Temperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur (T_m) der Primer, dabei liegt die optimale Temperatur meist ca. 5°C unterhalb der ermittelten Primer T_m . T_m ist definiert als die Temperatur, bei der 50% der Primer frei in Lösung vorliegen. Sie wird durch die Anzahl der Basenpaare und den G/C bzw. A/T Anteil bestimmt. Dabei erhöht jede Adenin- bzw. Thymin-Base die Temperatur durchschnittlich um 2°C, jede Cytosin- bzw. Guanin-Base um 4°C, folglich steigt die Schmelztemperatur mit der Länge der Primer und bei gleicher bp-Zahl mit zunehmendem G/C Anteil. Bei der Entscheidung über die Anzahl der Zyklen muss berücksichtigt werden, dass sich die DNA-Ausbeute mit steigender Zykluszahl erhöht, die Wahrscheinlichkeit für Punktmutationen aber ebenfalls zunimmt. Wird sehr wenig DNA eingesetzt, können bis zu 50 Zyklen für eine hinreichende Ausbeute nötig sein. Sind die Startmoleküle hoch konzentriert, können 20 Zyklen ausreichen.

Für den PCR-Ansatz benötigt man die *Taq*-Polymerase und *Taq*-Polymerasepuffer, um optimale Bedingungen für eine effektive PCR zu schaffen. Verwendet wurde die *Taq*-DNA-Polymerase der Firma Boehringer Mannheim, eine hoch progressive 5'-3'-DNA-Polymerase ohne 5'-3'-Exonukleaseaktivität. Weiter braucht man dNTPs in einer Konzentration von 10mM, einen For- sowie einen Rev-Primer, Wasser, um auf das gewünschte Endvolumen aufzufüllen, und natürlich die DNA.

Zuerst wurden auf Eis jeweils 1µl (200ng) des 1:5 verdünnten For- bzw. Rev-Primers in ein 0,5µl Mikroreaktionsgefäß pipettiert. Von der DNA wurden etwa 7ng eingesetzt, dazu wurden 5µl 10x Polymerasepuffer, 2µl dNTPs (10mM) und 2µl DNA-Polymerase gegeben. Mit Wasser wurde auf 50µl Endvolumen aufgefüllt. Die PCR wurde im Biometra® T3 Thermocycler durchgeführt. Im Thermocycler wurden die Proben zunächst 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Es folgten 30 PCR-Zyklen mit Denaturierung für 1 Minute bei 95°C, Annealing für 1 Minute bei 60°C und Elongation für 3 Minuten bei 72°C. Zuletzt wurden die Proben 10 Minuten bei 72°C inkubiert und dann auf 4°C abgekühlt.

4.2.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Jede beliebige Nukleinsäure, wie durch PCR amplifizierte DNA und Plasmid-DNA, kann mittels Gelelektrophorese nach ihrer Molekulargröße aufgetrennt werden. Dabei wandern kleine DNA-Moleküle unter Einfluss eines elektrischen Feldes schneller durch die engmaschige Gelmatrix in Richtung Kathode als größere. Auf diese Weise werden Nukleinsäurestränge nach ihrer Größe getrennt. Gleiche Moleküle laufen in sog. diskreten Zonen, den Banden, deren Größe durch Vergleich mit Strängen bekannter bp-Anzahl bestimmt werden kann. Die Nukleinsäurebanden können durch Zugabe von Ethidiumbromid (EtBr) unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht werden.

Zunächst wurde Agarose abgewogen, mit 1x TBE gemischt, aufgekocht, mit EtBr versetzt und auf einen abgedichteten Gelschlitten gegossen. Beim Abkühlen verfestigte sich die zähflüssige Lösung. Die Agarosekonzentration des Gels wurde nach der Fragmentgröße gewählt. Fragmente mit geringer Molekulargröße wurden in einem hochprozentigen, Fragmente mit einer hohen Anzahl an bp in einem niedrigprozentigen Gel effektiver aufgetrennt. Der Agaroseanteil lag je nach Fragmentlänge zwischen 0,8% und 1,5 %. In den Gelschlitten wurde ein Kamm gesteckt, sodass beim Erhärten des Gels Taschen entstanden, in welche die aufzutrennende DNA gefüllt werden konnte. Die DNA-Lösung wurde mit Stop-Mix versetzt und auf das Gel geladen. Stop-Mix erhöht die spezifische Dichte der DNA-Lösung, sodass sich beim Füllen der Geltaschen die DNA am Boden absetzt, zudem macht es durch seine blaue Farbe die Lauffront sichtbar. Der Gelschlitten wurde in eine Gelkammer, die mit 1x TBE gefüllt war, überführt und die DNA zusammen mit einem Marker aufgetragen. Der Marker wurde nach der Länge der zu erwartenden bzw. gesuchten Fragmente ausgewählt. Dabei wurde bei kurzen Fragmenten ein Marker mit ebenfalls hauptsächlich kurzen Fragmenten verwendet und umgekehrt. Bei den Versuchen wurde für Fragmente geringer Basenpaarzahl ein 100bp-Marker und für die restlichen der λ -HindIII-Marker eingesetzt. Die Kammer wurde geschlossen und eine Spannung zwischen 30V und 80V angelegt. Dabei wanderte die negativ geladene DNA zur Kathode und wurde auf ihrem Weg der Größe nach aufgetrennt. Durch den Zusatz von EtBr konnten die einzelnen DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und anhand des Markers die Größe bestimmt werden.

4.2.3 Elektroelution von DNA aus Agarosegelen

Bei der Elektroelution wurde die DNA im elektrischen Feld aus dem Agarosegel gelöst und anschließend aufgereinigt. Dafür wurde die gewünschte Bande unter UV-Licht ausgeschnitten und in vorbehandelte, am unteren Ende abgeklemmte Dialyseschläuche gegeben. Die Dialyseschläuche wurden luftblasenfrei mit 0,1x TBE gefüllt und zusätzlich am oberen Ende abgeklemmt. Die Schläuche wurden in eine mit 0,1x TBE gefüllte Gelapparatur überführt und es wurde eine elektrische Spannung von 200V angelegt. In diesem Feld

wanderte die negativ geladene DNA aus dem Agarosegel und konzentrierte sich in der Flüssigkeit im Lumen des Dialyseschlauches. Nach 1 Stunde konnte der Strom abgestellt und die Flüssigkeit aus den Schläuchen abgezogen werden. Zur Fällung wurden 0,1VT 3M NaOH und 2,5VT EtOH abs. zugegeben und mindestens 30 Minuten bei -80°C gelagert. Nach der Inkubation wurde 15 Minuten bei 4°C und 15000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 60 μl 70%igem kaltem EtOH gewaschen. Es folgte eine weitere Zentrifugation unter gleichen Bedingungen für 10 Minuten. Der Überstand wurde abgezogen und das Pellet in der *Speed vac* unter Vakuum getrocknet. Dieses wurde im letzten Schritt in Wasser aufgenommen und bei -20°C weggefroren.

4.2.4 Aufbereitung von Dialyseschläuchen

Vor Gebrauch mussten die Dialyseschläuche vorbehandelt werden. Dialyseschläuche unterschiedlicher Länge wurden in einem Liter Wasser mit 20g gelöstem NaHCO_3 und 2ml 500mM EDTA pH 8,0 für 10 Minuten gekocht. Diese wurden anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen und erneut 10 Minuten in einer Lösung von einem Liter Wasser und 2ml 500mM EDTA pH 8,0 gekocht. Die Dialyseschläuche wurden bei 4°C gelagert.

4.2.5 Sequenzierung

Zur Kontrolle der Aminosäuresequenz wurde die gewonnene DNA sequenziert.

Die Sequenzierung wurde in einem 0,5ml Mikroreaktionsgefäß mit einem Endvolumen von 20 μl angesetzt. Der verwendete Primer (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurde zunächst 1:50 verdünnt, für die Sequenzierung wurden 2 μl eingesetzt. Zu den 2 μl Primerlösung wurden 8 μl Sequenzier-Mix (RR-Mix) und die DNA pipettiert. Dabei sollte die DNA-Menge zwischen 200ng und 500ng liegen. Mit Wasser wurde auf ein Volumen von 20 μl aufgefüllt. Die Sequenzier-PCR erfolgte in einem Biometra® T3 Thermocycler.

Für die Sequenzierung wurden die Proben vom T3 Thermocycler zunächst 5 Minuten auf 95°C erhitzt und die Temperatur für 30 Sekunden gehalten. Es folgten 50 Zyklen mit Denaturierung für 1 Minute bei 95°C , Annealing für 20 Sekunden bei 50°C und Elongation für 4 Minuten bei 60°C . Im letzten Schritt wurden die Proben auf 4°C abgekühlt und konnten entnommen werden. In der Zwischenzeit wurden Sequenziersäulchen mit je 800 μl Wasser für mindestens 30 Minuten, meist über Nacht, aufgequollen. Das Wasser wurde aus den Säulchen abgelassen und diese wurden für 2 Minuten bei 750g zentrifugiert. Das überschüssige Wasser wurde verworfen, die Säulchen in Mikroreaktionsgefäße gestellt und der 20 μl Sequenzieransatz vorsichtig auf die Säulchen pipettiert. Die Säulchen wurden erneut zusammen mit den dazugehörigen Mikroreaktionsgefäßen für 2 Minuten bei 750g zentrifugiert. Die Sequenzierlösung wanderte durch das Gel, überschüssige Bestandteile wurden abgefangen und die DNA-Lösung sammelte sich im Mikroreaktionsgefäß. In der *Speed vac*

wurde der DNA das Wasser entzogen und das zurückgebliebene Pellet wurde mit 25µl *ABI Prism® Template Supression Reagent* versetzt und für 2 Minuten bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend auf Eis gestellt und in *Genetic Analyser 5,5ml Sample Tubes* überführt. Die Sequenzierung wurde im *ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer* durchgeführt.

4.2.6 Restriktionsenzymverdau

Die in der Molekularbiologie verwendeten Restriktionsenzyme sind meist Endonukleasen, welche DNA innerhalb einer Erkennungssequenz ohne ATP Verbrauch und ohne Methyltransferaseaktivität schneiden. Restriktionsenzyme erkennen hauptsächlich palindromische Sequenzen von vier, sechs oder acht Basenpaaren. Man unterscheidet zwei verschiedene Schnittformen: Eine Gruppe von Restriktionsenzymen verdaut die DNA-Stränge der Doppelhelix versetzt, sodass überlappende einander komplementäre singuläre DNA-Fragmente sog. *sticky ends* entstehen. Die andere Gruppe von Restriktionsendonukleasen schneidet doppelsträngige DNA an nur einer Stelle, es entstehen *blunt ends*, ohne dass entsprechende klebrige Überhänge verbleiben. *Sticky ends* sind leichter ligierbar.

Die eingesetzten Restriktionsendonukleasen benötigten ein bestimmtes Milieu, um effektiv arbeiten zu können. Hierbei spielten Faktoren wie pH-Wert und Salzkonzentrationen eine Rolle. Um diese Bedingungen zu gewährleisten, musste jedem Ansatz ein Puffer zugesetzt werden, der auf das verwendete Enzym abgestimmt war. Wurden in einem Ansatz verschiedene Enzyme gebraucht, musste derjenige Puffer gewählt werden, in dem jedes einzelne Enzym eine möglichst optimale Aktivität zeigte. Der fertig gelieferte Puffer war 10fach konzentriert und sollte zum Restriktionsverdau einfach konzentriert vorliegen d.h., bei einem Endvolumen von 30µl wurden 3µl Puffer eingesetzt. Zum Verdau von 1µl DNA wurden 3 Units des jeweiligen Enzyms verwendet, wobei 1µl Enzym ungefähr 10 Units entsprach. Auf das gewählte Endvolumen wurde wenn nötig mit Wasser aufgefüllt und der Ansatz eine Stunde bei 37°C inkubiert.

4.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die DNA-Ligase ist ein unverzichtbares Instrument zur stabilen Einbringung von DNA-Fragmenten in Expressionsvektoren. Sie verbindet DNA-Einzelstränge durch die Synthese einer Esterbindung zwischen einem Phosphatrest und dem Zucker Desoxyribose. Auf diese Weise können die, beim DNA-Verdau entstehenden *sticky ends*, neu verknüpft werden. Ebenso, aber mit geringerer Effektivität, können manche Ligasen die kovalente Bindung von *blunt ends* katalysieren.

Die am häufigsten verwendeten Ligasen sind die T4-DNA-Ligase und die E. coli Ligase. Die T4-Ligase benötigt als Co-Faktor ATP, die bakteriellen DNA-Ligasen sind NAD-abhängig.

Die hier eingesetzte T4-Ligase wird heute in der Molekularbiologie hauptsächlich verwendet, weil sie effektiver arbeitet und sowohl *blunt ends* als auch *sticky ends* verknüpft.

Für die Ligation wurde standardmäßig ein Gesamtvolumen von 20µl angesetzt. Zuerst wurden Vektor und Insert in einem molaren Verhältnis von 1:3 vorgelegt. Dann wurden 2µl 10x Ligasepuffer und zuletzt 2µl Enzym zupipettiert. Der Ligationsansatz wurde mindestens 12h bei 16°C inkubiert.

4.2.8 Hitzeschocktransformation von Bakterien

Im folgenden Schritt wurden kompetente Bakterien mit den neu klonierten Expressionsvektoren transformiert.

Zunächst wurde ein 200µl Aliquot kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut, diese auf 10µl der jeweiligen DNA in Mikroreaktionsgefäße pipettiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. In der Inkubationszeit lagerte sich die DNA an die Wand der Bakterien, um im nächsten Schritt, dem Hitzeschock, in die Bakterien aufgenommen zu werden. Während der 2-minütigen Inkubation bei 42°C wurde die Bakterienzellwand vorübergehend permeabel, sodass die Plasmid-DNA diese penetrieren konnte. Die erhitzten Bakterien wurden anschließend 2 Minuten auf Eis abgekühlt und dann 600µl LB-Medium zugesetzt. Um optimale Bedingungen zur Bakterienvermehrung zu schaffen, wurden diese bei 37°C und 225rpm für eine Stunde geschüttelt.

Mit der Internalisierung der Vektoren erhielten die Bakterien ein Resistenzgen gegen ein bestimmtes Antibiotikum. Damit ausschließlich Kolonien erfolgreich transformierter Bakterien wuchsen, wurden diese auf geeignete Selektionsplatten ausplattiert. Für die Transformation mit dem pGEM-Vektor wurde dem Agar Ampicillin zugesetzt, wogegen bei dem pEGFP-N1-Vektor und dem pCMV-Tag 4A-Vektor Kanamycin das Antibiotikum der Wahl war. Die nötige minimale und maximale Antibiotikakonzentration konnte entsprechenden Tabellen entnommen werden. Die empfohlene Ampicillinkonzentration lag bei 100µg/ml. Das Antibiotikum Kanamycin sollte in einer Konzentration von 50µg/ml eingesetzt werden. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurden von den gewachsenen Bakterienkolonien einige ausgewählt, in 3ml LB-Medium mit Antibiotikazusatz geimpft und zusammen mit einer Leerkontrolle über Nacht bei 37°C 225rpm geschüttelt. Eine milchige Trübung des Mediums zeigte eine starke Bakterienvermehrung an, dementsprechend blieb die Leerkontrolle klar.

4.2.9 Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Minipräparation ermöglicht eine schnelle Gewinnung der Plasmid-DNA. Dadurch kann in kürzester Zeit mit relativ geringem Materialverbrauch abgeklärt werden, ob das Insert richtig orientiert in den Vektor eingebaut und mutationsfrei ist.

Für die Plasmidminipräparation wurden je Ansatz ca. 1,5ml Bakteriensuspension in ein Mikroreaktionsgefäß überführt, 30 Sekunden zentrifugiert und der Überstand abgezogen. Das Pellet wurde in 100µl kalter Lösung-I aufgenommen und zur Resuspension gevortext. Anschließend wurden 200µl frisch angesetzte Lösung-II dazugegeben, geschüttelt und 2 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 150µl kalter Lösung-III und intensivem Mischen folgte erneut eine Inkubation auf Eis für 3 Minuten. Dann wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur und 15000rpm zentrifugiert. Je 500µl Phenol/Chloroform im Verhältnis 1:1 wurden vorgelegt und der Überstand dazu pipettiert. Nach 2-minütigem Vortexen wurde zur Phasentrennung erneut 5 Minuten zentrifugiert. Die obere Phase wurde vorsichtig abgezogen und in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der DNA wurde 1ml EtOH abs. zugesetzt, 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 4°C und 15000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und jedes Pellet mit 70µl kaltem 70%igem EtOH gewaschen. Es folgte eine weitere 10-minütige Zentrifugation unter gleichen Bedingungen. Danach wurde der Überstand abgezogen und das Pellet in der *Speed vac* getrocknet. Als letzten Schritt wurde das Pellet in 20µl TE aufgenommen.

4.2.10 Großpräparation von Plasmid-DNA

Die Plasmid-Großpräparation ist aufwendiger als die Minipräparation, ermöglicht aber eine quantitativ und qualitativ bessere Aufreinigung von DNA. Deshalb hatte, obwohl beide Protokolle DNA-Aufreinigung ermöglichen, jede Methode im Verlauf des Experiments seine eigenständige Aufgabe. Nach der Bakterientransformation und Vermehrung wurde durch Minipräparation von mehreren Kolonien je Ansatz erste Plasmid-DNA gewonnen. Diese DNA wurde genutzt um mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung zu eruieren, in welcher Kolonie die Vektoren fehlerfrei vorlagen. Für die Großpräparation wurden ausschließlich die Bakterienkulturen verwendet, bei denen durch die Vorversuche gesichert worden war, dass die Plasmide alle Anforderungen erfüllten. Nur die aus der Großpräparation gewonnene Plasmid-DNA wurde in folgenden Versuchen zur Transfektion von eukaryotischen Zellen eingesetzt.

Am Tag vor der Großpräparation wurden 250ml Antibiotika-haltigen LB-Mediums mit ca. 1,5ml der Bakterienkultur angeimpft und bei 37°C und 225rpm geschüttelt. Unter diesen optimalen Bedingungen vermehrten sich die Bakterien rasant, weshalb sich das Medium über Nacht trübte. Am nächsten Tag wurde der Bakteriensusud in GSA-Becher überführt und für 15 Minuten bei 4°C und 5000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50ml kaltem STE-Puffer resuspendiert. Nach einer weiteren 15-minütigen Zentrifugation wurde der Überstand wieder verworfen, das Pellet in 10ml kalter Lösung-I aufgenommen und gut resuspendiert. Nach Zugabe von 1ml Lysozymlösung folgte eine Inkubation von 10 Minuten auf Eis. 20ml frisch angesetzte Lösung-II wurden zugesetzt und

für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 15ml kalte Lösung-III zugegeben und für 10 Minuten auf Eis gestellt. Es wurde für 15 Minuten bei 4°C und 8000rpm zentrifugiert und der Überstand durch drei Lagen Mull in einen neuen GSA-Becher filtriert. Dem Filtrat wurden 30ml Isopropanol zugesetzt, die Lösung gut gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 8000rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet getrocknet. Das Pellet wurde in 2ml TE aufgenommen und mit 2ml 5M LiCl versetzt. Die Lösung wurde in 15ml Falkongefäße überführt und für 10 Minuten bei 4°C und 10000rpm zentrifugiert. Im Fällungsschritt wurde der Überstand zu 6ml Isopropanol gegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 4°C und 10000rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1ml 70%igem ETOH gewaschen. Es folgte eine erneute Zentrifugation für 5 Minuten bei 4°C und 10000rpm. Danach wurde das Pellet getrocknet, in 500µl TE aufgenommen und die Lösung in Mikroreaktionsgefäße überführt. Es wurden 20µl RNase-Lösung zugesetzt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit wurde die bakterielle RNA abgebaut. Danach wurden 540µl 1,6M NaCl/13% PEG zupipettiert und gevortext. Es folgt eine 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 15000rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 400µl TE aufgenommen. Während einer Inkubation von 30 Minuten bei 37°C wurde das Pellet gelöst und gegebenenfalls durch vorsichtiges Auf- und Abziehen per Pipette sorgfältig resuspendiert. Der Lösung wurden 400µl Phenol zugesetzt und mindestens 2 Minuten gevortext. Nach einer Zentrifugation von 5 Minuten und 15000rpm in der Laborzentrifuge wurde der Überstand zu 800µl Phenol/ Chloroform im Verhältnis 1:1 pipettiert und erneut für mindestens 2 Minuten gevortext. Durch eine weitere Zentrifugation von 5 Minuten bei 15000rpm und Raumtemperatur erfolgte die zweite Phasentrennung. Es wurde erneut die obere Phase vorsichtig abgezogen und in ein Mikroreaktionsgefäß zu 400µl Chloroform pipettiert, gevortext und weitere 5 Minuten zentrifugiert. Dadurch wurde die dritte Phasentrennung erreicht und die Plasmid-DNA konzentrierte sich wie in den vorherigen Schritten in der oberen wässrigen Phase. Der Überstand wurde abgezogen und in ein Mikroreaktionsgefäß mit vorgelegten 100µl 10M Ammoniumacetatlösung pipettiert. Dazu wurde 1ml EtOH abs. gegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei genügend hohem DNA-Gehalt konnte man diese als weiß-durchsichtigen Schleier ausfallen sehen. Der 5-minütigen Zentrifugation bei 4°C und 15000rpm folgten die Verwerfung des Überstandes und das Waschen des Pellets in 120µl 70%igem EtOH. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und das Pellet in der *Speed vac* unter Vakuum getrocknet. Zuletzt wurde das Pellet in 500µl TE aufgenommen und gelöst. Es folgte die photometrische Bestimmung des DNA-Gehalts.

4.2.11 Photometrie

Die DNA-Konzentration wurde mit dem *UV-Visible* Photometer der Firma Varian bestimmt. Die zu quantifizierende DNA wurde 1:200 verdünnt und in eine Quarzküvette überführt. Die Normierung erfolgte mittels destilliertem Wasser. Weil das Absorptionsmaximum von Desoxyribonukleinsäure bei 260nm lag, wurde die DNA-Menge bei einer Wellenlänge von 260nm gemessen. Um eine Aussage über die Reinheit der DNA machen zu können, wurde zusätzlich eine Messung bei 280nm durchgeführt. Anschließend wurde der Quotient aus der optischen Dichte bei 260nm und bei 280nm gebildet, dabei war ein Wert $< 1,8$ ein Indikator für eine mögliche Kontamination mit Proteinen und aromatischen Verbindungen, ein Wert > 2 sprach für eine Verunreinigung mit RNA. Die DNA-Konzentration berechnete sich nach der Formel: $\mu\text{g/ml} = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50\mu\text{g/ml}$.

4.2.12 Herstellung kompetenter Bakterien

Um Bakterien transformieren zu können, musste die Bakterienwand genügend durchlässig für DNA sein. Aus diesem Grunde mussten die verwendeten Bakterien für die Transformation vorbereitet werden. Die Hauptkultur wurde 1/100 angeimpft und ca. 2 Stunden bei 30°C und 225rpm geschüttelt. Dabei sollten die sich vermehrenden Zellen das Medium bis zu einer optischen Dichte von $\text{OD } 600 = 0,5$ trüben. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. 2x 100ml Bakterienkultur wurden in je 2x 50ml Falconröhrchen überführt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 3000rpm. Der Überstand wurde abgegossen und je 25ml frisch angesetzter TFB-I-Lösung zugegeben. Nach Resuspension der Pellets wurde weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen beider Falconröhrchen vereinigt und die Suspension 10 Minuten bei 3000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es wurden 4ml TFB-II-Lösung zugegeben. Das Pellet wurde sorgfältig resuspendiert und in 200µl Aliquoter in 1,5ml Mikroreaktionsgefäße bei -80 °C weggefroren.

4.2.13 Überprüfung der Kompetenz

Um die Kompetenz der Bakterien zu bestimmen, wurde eine Testtransformation durchgeführt. Dabei wurden 200µl der Bakteriensuspension mit 1µg einer beliebigen Plasmid-DNA transformiert. Die Bakterien wurden in Verdünnungsreihen auf geeignete Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurden die Bakterienkolonien gezählt und es wurde mittels der Verdünnungsfaktoren die Kompetenz errechnet. Es konnten Konzentrationen von $1 \times 10^6/\mu\text{g}$ DNA erreicht werden.

4.3 Zellkultur

4.3.1 Kulturbedingungen

Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert.

Die Auswahl des Medium war abhängig von den zu kultivierenden Zellen. CHO Zellen wuchsen in RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10% FKS und 1% Penicillin und Streptomycin (10000U Penicillin/ml, 10000µg Streptomycin/ml). Die „Hamster Ovarien Zellen“ (CHO Zellen) sind nicht in der Lage die Aminosäure Prolin selbst zu synthetisieren, und deshalb auf die Substitution im Medium angewiesen. Die LX-2 Zelllinie wurde in DMEM-Medium kultiviert. Diesem Medium wurden 2% FKS, 1% Penicillin und Streptomycin (10000U Penicillin/ml, 10000µg Streptomycin/ml, sowie 2% L-Glutamin (200mM L-Glutamin in 0,85% NaCl-Lösung) zugesetzt.

4.3.2 Zellen auftauen

Ein Aliquot der jeweiligen Zellen wurde auf Eis aufgetaut und in 10ml Standardmedium resuspendiert. Danach wurden die Zellen auf einer Petrischale von 100mm Durchmesser ausplattiert. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt, um das zelltoxische DMSO zu entfernen.

4.3.3 Zellen kultivieren

Die Zellen wuchsen im Brutschrank unter den oben genannten Bedingungen. Das Medium wurde je nach Zelldichte und Bedarf alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Die Mediumvolumina waren abhängig von der Plattengröße. Ø100mm Petrischalen wurden mit 10-14ml, Wells mit 60mm Durchmesser mit 4ml Medium befüllt.

4.3.4 Zellen trypsinisieren

Bei hinreichender Zelldichte auf den Ø100mm Petrischalen wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurde das alte Medium abgezogen und die Zellen 3x mit 5ml TS gewaschen. Die Zellen wurden unter Zugabe von 2ml 1x Trypsin für 2 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und von der Platte gelöst. Die Zellsuspension wurde in 8ml Medium pro Platte aufgenommen. Je nach Bedarf wurden die Zellen auf unterschiedlich große Petrischalen ausplattiert. Den Ø100mm Petrischalen wurden 8ml Medium und 2ml Zellsuspension zugesetzt. Die Ø60mm Platten wurden mit 3ml Medium und 1ml Zellsuspension gefüllt, wogegen in die 6-Well-Platten 2ml Medium und 500µl Zellsuspension pipettiert wurden.

4.3.5 Zellen einfrieren

Im ersten Schritt wurde das Medium abgezogen und die Zellen jeder Platte wurden 2x mit 5ml TS gewaschen. Pro Platte wurden 2ml 1x Trypsin zugegeben und 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden gelöst und die Zellsuspension in Zellkulturmedium überführt, wobei pro ml 1x Trypsin 3-4 ml Medium eingesetzt wurden. Während der 5-minütigen Inkubation wurde das zelltoxische Trypsin inaktiviert. Nachfolgend wurde für 5 Minuten bei 4°C und 1000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Zellkulturmedium auf Eis resuspendiert. Anschließend wurden 10ml Einfriermedium zugegeben und Aliquots von 1ml bei -80°C gelagert.

4.3.6 Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA

Die verwendeten Zellen wurden in Ø60mm Petrischalen kultiviert. Mindestens 1 Stunde vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Wie oben beschrieben wurde für CHO Zellen 10%iges RPMI 1640 Medium verwendet, für die LX-2 Zellen 2%iges DMEM-Medium. Zur Transfektion wurden 3µl Fugene pro µg DNA mit 100µl serumfreiem Medium versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mischung wurde in ein separates Tube auf die DNA pipettiert und für weitere 15 Minuten inkubiert. In dieser Zeit bildeten DNA und Transfektionsreagenz einen Komplex. Das Medium/Fugene/DNA Gemisch wurde vorsichtig auf die Zellen gegeben und diese unter Standardbedingungen kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgezogen und durch 0,2%iges Medium ersetzt.

4.3.7 Herstellung von Proteinlysaten

Am 3. Tag nach der Transfektion bzw. 48h nach Mediumwechsel wurden die Zellen geerntet. Zuerst wurde das Medium abgezogen, in 2ml Mikroreaktionsgefäße überführt und für 10 Minuten bei 4°C und 10000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2ml Tube oder ein 15ml Falconröhrchen pipettiert. Die Zellen wurden 3x mit 5ml 1x PBS gewaschen und danach mit 250µl Ripa + Complete versetzt. Die Zellen lysierten und wurden mit Zellschabern von der Platte gelöst. Das Zelllysate wurde in ein 1,5ml Mikroreaktionsgefäß gegeben und 10 Minuten bei 4°C und 15000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt.

4.3.8 TCA-Fällung

Im ersten Schritt wurde 1ml Überstand mit 100µl DOC (1mg/ml) und 150µl TCA (67-72%) versetzt und 30 Minuten bei 4°C und 10000rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet 2x mit Aceton gewaschen. Dabei wurden jeweils 500µl

Aceton eingesetzt, 5 Minuten bei 4°C und 15000rpm zentrifugiert und der Überstand abgezogen. Das Pellet wurde in 20µl Ripa + Complete und 20µl 2x SDS-Gel-Ladepuffer gelöst.

4.3.9 Lyophilisation

Um eine höhere Proteinkonzentration zu erreichen, wurden die Überstände in einigen Fällen zunächst lyophilisiert. Lyophilisation oder Gefriertrocknung ist ein technisches Verfahren zum Entzug von Wasser aus Objekten in gefrorenem Zustand in einer Vakuumkammer. Dabei wird der flüssige Aggregatzustand übergangen und der Feststoff geht direkt in die Gasphase über.

Zuerst wurden die 2ml Überstand in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei Sollwerten von -2°C und 0,011mbar getrocknet. Das Lyophilisat wurde in 140µl Ripa + Complete aufgenommen und bei -20°C gelagert.

4.3.10 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels DC-Testung

Es wurden jeweils 5µl Standard bzw. Probe in Doppelbestimmung auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. In jedes Well wurden zuerst 25µl Reagenz A (20µl Reagenz S pro ml Reagenz A) und danach 200µl Reagenz B pipettiert. Es wurde kurz gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 690nm.

4.3.11 SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot

Beim Western Blot werden durch Elektrophorese aufgetrennte Proteine auf eine Trägermembran transferiert und dort immobilisiert.

Je nach Bedarf wurden zwischen 10µg und 250µg Protein pro Probe mit 2x SDS-Gel-Ladepuffer und 5µl DTT versetzt und 10 Minuten bei 95°C aufgekocht. Das Detergenz SDS band an die Proteine und neutralisierte so deren Eigenladung, die Proteine denaturierten und DTT reduzierte die Cysteinbrücken. Die negativen Komplexe unterschieden sich nach Zerstörung von Sekundär-, Tertiär- und Quaterstrukturen ausschließlich durch ihre Größe. Bei diesen Experimenten wurde nach dem Tank Blot Verfahren gearbeitet. Für den Nachweis niedermolekularer Proteine wurde ein 1 bzw. 1,5mm dickes 4-12% Bis-Tris-Gel verwendet, auf das bis zu 30µl bzw. 40µl Probe aufgetragen werden konnte. Der Kamm wurde vorsichtig aus dem Gel entfernt, die Taschen mit Puffer gespült und das Gel in die Elektrophoresekammer gesteckt. Zusätzlich zu den Proben wurden 10µl Seebblue Marker auf das Gel geladen. Abhängig vom eingesetzten Laufpuffer gaben die farbigen Banden des Markers festgelegte Molekulargewichte an. Bei kleinen Proteinen wurde 1x MES-SDS-Laufpuffer ausgewählt, von dem 500ml in die Western Blot Kammer gefüllt wurden. Es wurde

eine Spannung von 150V für ca. 1 Stunde angelegt. Die SDS-Proteinkomplexe wanderten zur Kathode und wurden auf ihrem Weg nach Molekulargewicht aufgetrennt. Wenn die 3kDa Bande des Markers das Gel vollständig durchlaufen hatte, wurde das Gel der Apparatur entnommen und die Taschen sowie der untere Rand wurden entfernt, sodass das Gel etwa eine Fläche von 6x 8cm hatte. Das zurechtgeschnittene Gel wurde in Transferpuffer gewaschen. Die ebenfalls 6x 8cm große Whatman-Membran wurde ca. 10 Minuten in 30%igem Methanol aktiviert. Pro Blot wurden 6 Filterpapiere sowie die verwendeten Schwämme in Transferpuffer gelegt.

Der Blot hatte folgenden Aufbau: (Anode) 3-4 in Transferpuffer getränkte Schwämme, 3 Filterpapiere, Bis-Tris-Gel, Nitrozellulosemembran, 3 Filterpapiere, 3-4 in Transferpuffer getränkte Schwämme (Kathode).

Die Blotkammer wurde mit kaltem Transferpuffer gefüllt. Damit die Kammer nicht überhitzte, wurde sie zusätzlich auf Eis gestellt. Es wurde 2 Stunden bei 40V geblottet. Durch das elektrische Feld lösten sich die Proteine aus dem Gel und absorbierten an der Membran, wobei die Lokalisation der getrennten Proteine erhalten blieb. Die Nitrozellulosemembran wurde der Blotapparatur entnommen, in 1x TBST gewaschen und mit Ponceau S gefärbt. Durch die Färbung konnte überprüft werden, ob die Proteinauftrennung erfolgreich war, gleichzeitig diente sie als Ladekontrolle. Die Membran wurde in 1x TBST entfärbt und anschließend, um unspezifische Bindungen zu minimieren, für 30 Minuten bis 2 Stunden mit Block-Puffer geblockt. Der Primärantikörper wurde in vorgegebener Konzentration in einem Volumen von 10ml bis 15ml Block-Puffer auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C geschwenkt. Am nächsten Tag wurde die Membran 4x 5 Minuten in 1x TBST gewaschen und der mit Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper, gegen das speziensspezifische Fab-Segment des Primärantikörpers mit Block-Puffer verdünnt zugegeben. Die Membran wurde darin mindestens 2 Stunden unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Membran 3x 5 Minuten in 1x TBST und anschließend 2x 5 Minuten in 1x TBS gewaschen. Die Membran wurde mit 1000µl Entwicklungslösung benetzt, die von der Peroxidase des Sekundärantikörpers umgesetzt wurde. Die Entwicklungslösung bestand 1:1 aus *Luminol/Enhancer Solution* und *Peroxidase Buffer*. Nach kurzer Inkubation konnte das Signal mit dem Lumi ImagerTM detektiert werden.

Um große Proteine zu detektieren, wurde ein 3-8%iges Tris-Acetat-Gel eingesetzt. Es wurde 1x Tris-Acetat-Gellaufpuffer verwendet und als Marker diente ebenfalls der Seebblue Marker der Firma Invitrogen. Weil sich hochmolekulare Proteine langsamer von dem Gel lösen und an die Membran absorbieren, musste bis zu 5 Stunden geblottet werden. Der Transferpuffer wurde nicht wie in den anderen Experimenten mit Methanol, sondern mit Ethanol versetzt, welches die Effizienz des Blotvorgangs verbessern sollte. Um das Signal zu verstärken, wurde die Nitrozellulosemembran nach Inkubation mit dem primären Antikörper 4x mit 1x

TBST gewaschen und in einer 1:1000 Lösung des biotinierten Antikörpers gegen die Fab-Domäne des Primärantikörpers geschüttelt. Nach 1 Stunde wurde die Membran 4x mit 1x TBST gewaschen und 1 Stunde in Streptavidin-HRP Lösung inkubiert. Die Messung im Lumi Imager™ erfolgte wie oben beschrieben.

4.3.12 Konfokale Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie erreicht durch Unterdrückung der optischen Informationen außerhalb der Fokalebene eine bessere räumliche Auflösung als die konventionelle Lichtmikroskopie. Verwendet wurde ein konfokales Laserrastermikroskop. Dieses rasterte das Objekt Punkt für Punkt mit einem Laserstrahl, wobei die Fluoreszenzmoleküle im Lichtweg angeregt und die Signale vom Detektor aufgefangen wurden. Die gesammelten Bildpunkte wurden vom angeschlossenen Computer zu einem vollständigen Bild zusammengesetzt.

Für die Konfokalmikroskopie wurden die CHO bzw. LX-2 Zellen in dem Chamber slide™ System kultiviert. Bei diesem System wuchsen die Zellen in zwei Kammern direkt auf dem Objektträger. Jedes Well wurde mit 2ml Medium befüllt und es wurden verschiedene Volumina der Zellsuspensionen zugegeben. Die Chamber slides™ wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen transfiziert, wobei 2µg Vektor-DNA eingesetzt wurden. 24 Stunden später folgte ein Mediumwechsel und nach weiteren 24 Stunden konnten die Zellen fixiert werden. Dafür wurde das Medium abgezogen und die Zellen 2x mit 1x PBS gewaschen. In jede Kammer wurden 2ml 4%iges Paraformaldehyd gegeben und für 15 Minuten im Dunklen inkubiert. Anschließend wurde das Paraformaldehyd abgezogen und die Zellen wurden 2x mit 1x PBS gewaschen. Nach der Fixierung der Zellen auf dem Objektträger konnten die Kammerbegrenzungen abgehoben werden. Auf die Objektträger wurde pro Well 1 Tropfen Antifade pipettiert und die Deckgläser vorsichtig luftblasenfrei auf die Zellen gelegt. Abschließend wurden die Deckgläser mit klarem Nagellack abgedichtet.

Die konfokale Mikroskopie wurde mit freundlicher Hilfe von Herrn Dr. Müller-Newen aus dem Institut für Biochemie der RWTH-Aachen durchgeführt.

4.3.13 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde zur Lokalisierung des rekombinanten Flaggekoppelten TGF-β1 Proteins verwendet.

Die Kultivierung erfolgte in 6-Well Platten. Dafür wurde in jedes Well ein Deckglas gelegt, Medium zugegeben und für 1 bis 2 Tage im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit bildete sich ein Biofilm auf den Gläsern, sodass die Zellen anschließend besser anwachsen konnten. Die Zellen wurden in unterschiedlichen Konzentrationen ausplattiert und die Wells bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Transfektion mit 2µg des Vektors wurde nach etwa 24 Stunden durchgeführt. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium gewechselt. Zwei Tage nach

Transfektion wurden die Zellen fixiert. Dazu wurde das Medium abgezogen und die Zellen wurden 3x mit 1x PBS gewaschen. Die Deckgläser wurden mit 4%igem Paraformaldehyd benetzt und 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3x mit 1x PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung wurden die Platten auf Eis gestellt und jedes Well genau 2 Minuten mit 2ml Permeabilisierungslösung inkubiert. Die Zellen wurden 3x mit 1x PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurde das endogene Biotin mit dem *Blocking System* der Firma DAKO blockiert. Dafür wurden auf jedes Deckglas 2-3 Tropfen Avidin gegeben und für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden sie 3x mit 1x PBS gewaschen und mit 2-3 Tropfen Biotin benetzt. Nach 10-minütiger Inkubation wurden die Zellen erneut 3x mit 1x PBS gewaschen. In jedes Well wurden 2ml Blockierungslösung pipettiert. Dann wurden die Platten für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden 3x mit 1x PBS gewaschen und 200µl des Primärantikörpers zugegeben. Für ein Deckglas pro Versuch wurde als Negativkontrolle *mouse* IgG 1:200 verdünnt verwendet. Die fixierten Zellen wurden über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer gelagert. Am Folgetag wurden die Zellen zuerst 3x 5 Minuten mit 1x PBS gewaschen und die Deckgläser danach mit 200µl einer 1:200 Verdünnung *anti-mouse* IgG-Biotin benetzt. Die Platten wurden 30 Minuten bei 37°C geschüttelt und anschließend 3x 5 Minuten mit 1x PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden 200µl Streptavidin-FITC in einer Verdünnung von 1:100 auf die Deckgläser pipettiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Streptavidin-FITC band an das Biotin des Sekundärantikörpers und ermöglichte mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat die Lokalisierung des Zielproteins durch Nachweis von Fluoreszenzlicht bei gleichzeitiger Verstärkung. Nach der 1-stündigen Inkubation wurden die fixierten Zellen 3x 5 Minuten mit 1x PBS und darauf 2x 5 Minuten mit sterilem Wasser gewaschen. Zur Kernfärbung wurden die Zellen mit Propidiumjodid behandelt. Propidiumjodid bindet ähnlich wie Ethidiumbromid an die DNA und fluoresziert rot im ultravioletten Licht. Dafür wurden die Deckgläser 30 Sekunden mit 200µl einer 10µg/µl konzentrierten Propidiumjodidlösung inkubiert und die Zellen anschließend gründlich mit Wasser gewaschen. Die Deckgläser wurden mit MOWIOL auf Objektträgern eingedeckt und bei 4°C im Dunkeln gelagert.

4.3.14 ELISA: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

Bei dem verwendeten Sandwich-ELISA war ein spezifischer Antikörper an die Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Der im Überschuss vorhandene Festphasenantikörper reagierte mit dem in der Probe enthaltenen Antigen, wobei das Antigen fest mit dem Antikörper der 96-Well Mikrotiterplatte verknüpft wurde. Der mit Biotin markierte Detektionsantikörper band an ein anderes Epitop des Antigens. Im nächsten Schritt wurde das Biotin dieses Antikörpers durch Meerrettichperoxidase-gekoppeltes Streptavidin erkannt. Nach Zugabe eines Substrates wurde dieses von der Peroxidase umgesetzt. Dabei entstand ein

optisch aktives Hydroperoxid, das die Substratlösung zunächst blau und nach Zugabe der Stop-Lösung gelb färbt.

Um spezifisch das mit Flag-gekoppelte überexprimierte TGF- β 1 zu detektieren, wurden für den ELISA anti-Flag® HS 96-Well Platten gewählt. Der monoklonale IgG1 *mouse* Antikörper ist über seine Fc-Domäne kovalent an die Platte gebunden und erkennt das Flag-Oktapeptid unabhängig von seiner Position im Fusionsprotein. So konnte ausgeschlossen werden, dass im Medium enthaltenes oder endogen produziertes TGF- β 1 mit erfasst wurde. Als Detektionsantikörper wurde ein biotinilierter TGF- β 1 Antikörper verwendet. Der lyophilisierte Antikörper wurde in sterilem Tris-Puffer mit 0,1% BSA gelöst und hatte eine Konzentration von 50 μ g/ml. Außerdem wurde Streptavidin-HRP eingesetzt.

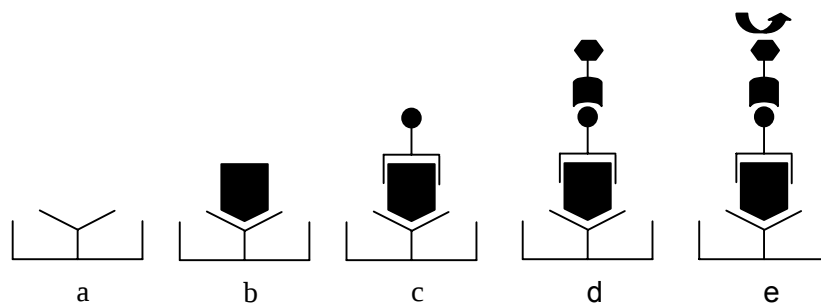


Abb. 10: Sandwich ELISA.

- a. Well mit anti-Flag M2 Festphasenantikörper
- b. TGF- β 1-Flag Antigen bindet an Festphasenantikörper
- c. Biotin-gekoppelter anti-TGF- β 1 Detektionsantikörper bindet anderes Epitop des Antigens
- d. Streptavidin gekoppelt mit Meerrettichperoxidase erkennt Biotin
- e. Meerrettichperoxidase setzt Substrat um

Vor der Durchführung des ELISAs musste das im Komplex gebundene dimere TGF- β 1 in die monomere Form überführt und aktiviert werden. Dazu wurden 80 μ l der verdünnten Probe mit 16 μ l 1N HCl versetzt, gut gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Neutralisation wurden 16 μ l 1,2N NaOH/0,5M HEPES zupipettiert. Nach erneutem Mischen konnte das Assay durchgeführt werden. Im ersten Schritt wurden jeweils 100 μ l der zuvor aktivierten Probe in ein Well pipettiert und die Platte wurde 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Proben abgezogen und die Platte 4x mit 300 μ l 1x Waschpuffer gewaschen. Jedes Well wurde mit 100 μ l des biotinierten TGF- β 1 Detektionsantikörpers gefüllt und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde erneut 4x mit 300 μ l 1x Waschpuffer gewaschen und 100 μ l Streptavidin-HRP 1:1500 mit ELISA-Puffer verdünnt in die Wells pipettiert. Nach einer 1-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte 4x mit 300 μ l 1x Waschpuffer gewaschen. In jedes Well wurden 100 μ l *Substrat Solution* bestehend aus einer 1:1 Mischung aus Substrat Lösung A und B gegeben. Nach etwa 20 Minuten Inkubation im Dunklen wurden 50 μ l *Stop Solution* zugegeben und gut gemischt. Die Absorption wurde bei 450nm für 1 Sekunde gemessen.

5. Ergebnisse

5.1 LightCycler Analysen

5.1.1 LightCycler Analysen: Allgemeines

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss verschiedener TGF- β 1 Polymorphismen auf entzündliche Aktivität und Fibrosegrad einer chronischen Virushepatitis *in vivo* untersucht. Es standen Lebergewebeproben von zwei Kollektiven infizierter Patienten zur Verfügung. Das erste Kollektiv bestand aus Patienten der Datenbank des deutschen Kompetenznetzes Hepatitis (Hep-Net), das zweite setzte sich aus Patienten des Pathologischen Instituts der Universitätsklinik Köln zusammen. Die Charakterisierung der Patientenkollektive ist in Tabelle 3 dargestellt.

Kollektive	Insgesamt (Hep-Net + Köln)	Hep-Net	Köln
Anzahl der Patienten	430	195	235
Alter zum Zeitpunkt der Biopsie in Jahren	45+/-13 Median=43 MIN=18 MAX=85	44+/-14 Median=43 MIN=18 MAX=81	46+/-13 Median=43 MIN=18 MAX=85
Frauen	173	79	94
Männer	245	110	135
Geschlecht unbekannt	12	6	6
Hepatitis B	29	29	-
Hepatitis C	396	161	235
Hepatitis B + C	3	3	-
Hepatitis B + D	1	1	-
Hepatitis B + C + D	1	1	-

Tabelle 3: Beschreibung der beiden Patienten Kollektive.

Im ersten Schritt wurde die DNA aus Paraffinschnitten isoliert und aufgereinigt. Anschließend wurden die TGF- β 1 Polymorphismen im Promotorbereich –509 sowie in Codon 10, Codon 25 und Codon 263 von insgesamt 430 Patienten mittels LightCycler bestimmt und mit Entzündungs- und Fibrosegrad korreliert. In der Histologie wurde die entzündliche Aktivität sowie die Ausprägung der Leberfibrose nach dem Score von Desmet *et al.* beurteilt [48]. Für die späteren Analysen wurden die Patienten in jeweils zwei Gruppen aufgeteilt. Die Patienten mit histologisch gering ausgeprägter Entzündung G0-G2 wurden denen mit hochgradiger Entzündung G3-G4 gegenübergestellt. Ebenso wurden Patienten mit dezentraler Fibrose S0-S2 mit Patienten, die histologisch schwere Bindegewebsvermehrung S3-S4 aufwiesen, verglichen.

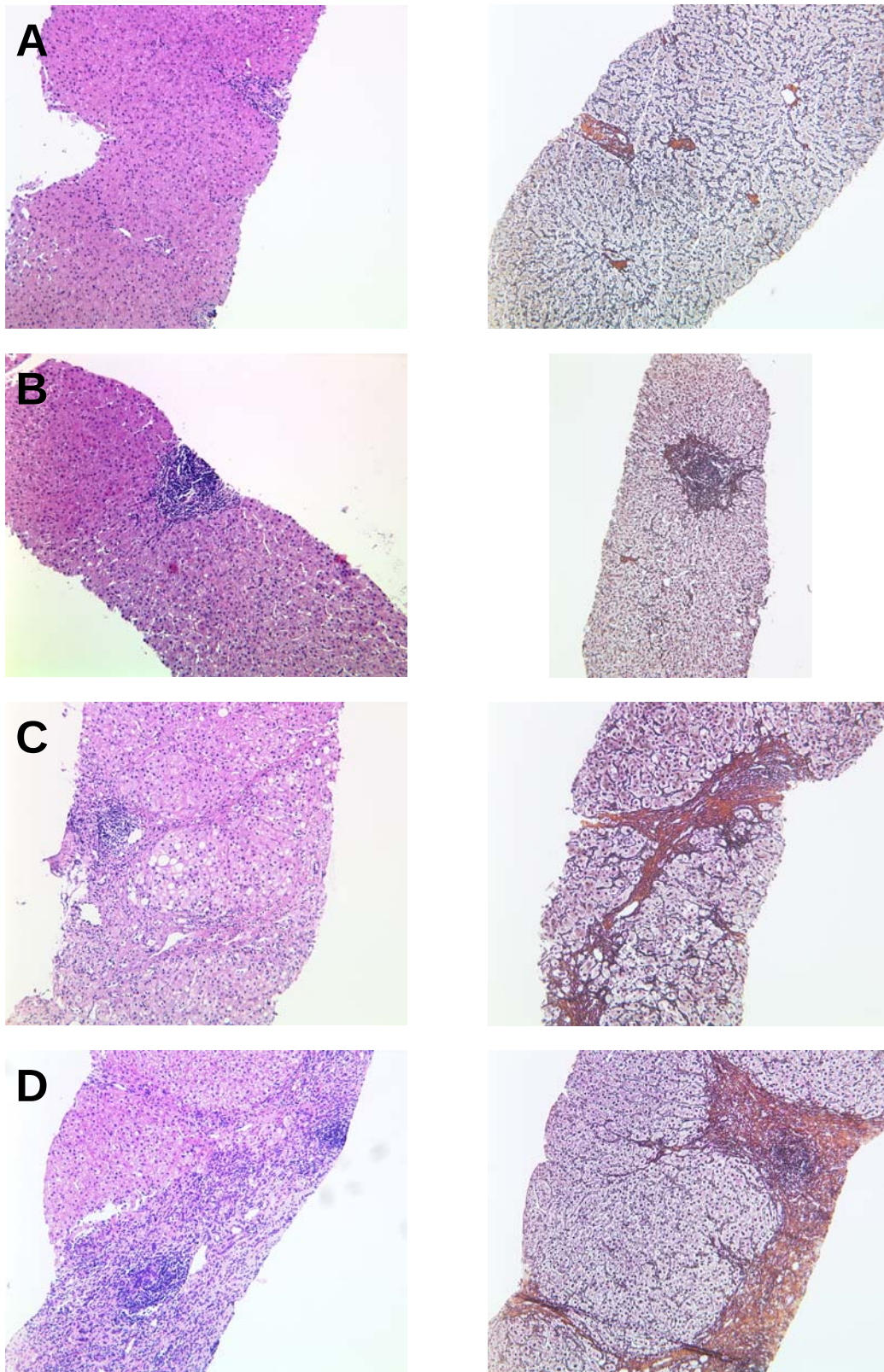


Abb. 11: Histologie der Leberbiopsate.

Dargestellt sind die Fibrosestadien 1-4 nach Desmet *et al.* [48].

Links: HE-Färbung. Rechts: Trichrom-Färbung nach Gomori.

A: S1

B: S2

C: S3

D: S4

5.1.2 Polymorphismus –509

Für die LightCycler Analysen des TGF- β 1 Polymorphismus an Stelle –509 der Promotor-region wurde ein neues LightCycler-Programm etabliert. Dazu mussten Primer und Sonden synthetisiert und ein LightCycler-Protokoll erstellt werden.

5.1.2.1 Auswahl der optimalen DNA-Sequenz

Zu Beginn der Versuche wurde deutlich, dass die aus Paraffinblöcken gewonnene genomische DNA in kleinen Fragmenten vorlag. Deshalb sollte, um eine optimal effektive PCR zu gewährleisten, das zu amplifizierende Fragment möglichst kurz sein. Gleichzeitig musste genügend Zeit für den Energietransfer zur Verfügung stehen. Um beiden Anforderungen gerecht zu werden, mussten bei der Auswahl der passenden DNA-Sequenz und der Lage von Sonden und Primern bestimmte Regeln befolgt werden:

Die Bindungsstelle der Sonden sollte beispielsweise möglichst nahe am 3'-Ende des DNA-Einzelstranges und so weit wie möglich von der Primer-Bindungsstelle desselben Stranges entfernt liegen. Die optimale Lokalisation der Sonden wäre auf Höhe der Primer-Bindungsstelle des Gegenstranges, ohne dass sich die Sequenzen von Primer und Sonden überlappen. Diese Anordnung ermöglicht auch bei kurzem PCR-Produkt genügend Zeit für die Hybridisierung der Sonden und die Energieübertragung, bevor diese von der *Taq*-Polymerase verdrängt werden.

5.1.2.2 Primer

Die Lage von Forward- und Reverse-Primer (For- und Rev-Primer) bestimmt die Länge des PCR-Produktes. Der For-Primer ist komplementär zum 3'-Ende des *Antisense*- und der Rev-Primer komplementär zum *Sense*-Strang.

Die Anzahl der Basen dieser Oligonukleotide sollte bei der LightCycler Analyse zwischen 18 und 24 liegen. Kürzere Primer würden die Sequenzspezifität verringern, wogegen die Spezifität durch zusätzliche Basenpaare nicht wesentlich erhöht würde. For- und Rev-Primer sollten ungefähr dieselbe Schmelztemperatur aufweisen. Diese sollte zwischen 55°C und 65°C liegen und konnte mit der Formel $T_m(^{\circ}\text{C}) = A/T \times 2^{\circ}\text{C} + G/C \times 4^{\circ}\text{C} - 2^{\circ}\text{C}$ grob abgeschätzt werden. Die Primer mussten deshalb möglichst gleich lang sein und einen ähnlichen G/C-Anteil aufweisen, der zwischen 40 und 60% liegen sollte. Der G/C-Anteil beeinflusste die Schmelztemperatur mehr als die Anzahl der Basenpaare.

Außerdem sollte ein Ungleichgewicht an Purin- und Pyrimidin-reichen Domänen vermieden werden. Bei der Primersequenz war weiter zu beachten, dass an der 3'-Region die Replikation startet und hier besonders wichtig war, dass diese keine Sekundärstruktur, keine repetitiven Sequenzen, keine Palindrome oder hoch degenerative Sequenzen aufwies. Die

Primer durften nicht komplementär zueinander und im Fall der LightCycler Analysen auch nicht komplementär zu den Sonden sein.

Unter Berücksichtigung der oben genannten Punkte wurden mehrere Primerpaare synthetisiert. Die PCR wurde zunächst im Biometra T3 Thermocycler durchgeführt. Dabei wurde zu Beginn eine Schmelztemperatur gewählt, die 5°C unter der errechneten Primer T_m lag. Die PCR-Produkte wurden anschließend auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen, im elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt und die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht. Nachdem in der herkömmlichen PCR die Funktion der Primer gesichert worden war, wurde die erste LightCycler-PCR gefahren. Die Produkte wurden ebenfalls durch Gelelektrophorese aufgetrennt und das Ergebnis unter UV-Licht überprüft.

Die Primer For4 mit der Nukleinsäuresequenz 5'-d(GGAGAGCAATTCTTACAGGTG)-3' und Rev2 mit der Frequenz 5'-(CAGGCGGAGAAGGCTTAATC)-3' ermöglichten die Synthese eines kurzen Fragmentes bei gutem PCR-Ergebnis und wurden für die folgenden Versuche eingesetzt.

5.1.2.3 Sonden

Im nächsten Schritt mussten Sonden für die Schmelzpunktanalyse synthetisiert werden.

Sonden sind Oligonukleotide, die zu spezifischen Sequenzen der eingesetzten DNA komplementär und durch Fluorophore markiert sind. Sie binden ebenso wie die Primer an das PCR-Produkt, dienen aber nicht der Elongation, sondern der Detektion von Punktmutationen. Die Nomenklatur der Sonden scheint zu Beginn etwas kompliziert, vereinfacht sich aber, wenn man berücksichtigt, dass die verschiedenen Bezeichnungen unterschiedliche Teilaspekte der Oligonukleotide beleuchten. Es handelt sich um voneinander unabhängige Begriffe, die parallel verwendet werden. Neben der Differenzierung zwischen Donor- und Akzeptor-Sonde unterscheidet man Sensor- und Anchor-Sonde.

Grundlage ist zum einen das Prinzip des *Fluorescence Resonance Energie Transfers*. Hierbei betrachtet man die Orientierung und Markierung der Oligonukleotide. Definitionsgemäß trägt die Donor-Sonde das Donor-Fluorophore und die Akzeptor-Sonde das Akzeptor-Fluorophore. Die Begriffe „Sensor“ und „Anchor“ beziehen sich auf die Lage der Punktmutation, in der zu den Oligonukleotiden komplementären DNA-Sequenz.

Bei der Mutationsanalyse war das 3'-Ende der Donor-Sonde mit Fluorescein verknüpft und lag in 5'-Richtung. Das am 5'-Ende mit LightCycler-Red640 markierte 3'-Oligonukleotid stellte den Akzeptor dar. Die Sensor-Sonde umfasste immer die Mutationssequenz und war deshalb ausschlaggebend für die Differenzierung zwischen Wildtyp und Mutante.

Um die Elongation der Sonden während der PCR zu verhindern, musste deren 3'-Ende modifiziert werden. Die Donor-Sonde war am 3'-Ende bereits Fluorescein markiert und

bedurfte deshalb keiner weiteren Veränderungen. Im Gegensatz dazu war das 3'-Ende der Akzeptor-Sonde, die ausschließlich am 5'-Ende modifiziert war, frei und hätte bei der PCR verlängert werden können. Damit der Akzeptor nicht selber als Primer fungieren konnte, wurde das 3'-Ende phosphoryliert und die Elongation durch die zusätzliche Phosphatgruppe geblockt.

Die Schmelztemperatur (T_m) der Sonden sollte höher als die der Primer sein, um zusätzliche Zeit für den Energie Transfer zu gewinnen. Als Regel galt: die T_m der Sonden sollte 5-10°C über der Primer T_m liegen, ohne zu stabile Sonden zu generieren, die Differenz sollte nicht mehr als 10-20°C betragen. Die Schmelztemperatur der Anchor-Sonde sollte wiederum höher sein als die T_m des Sensors. Dadurch wurde sichergestellt, dass die Sonde, welche die Mutation umfasste, den Energietransfer und die Emission von messbarem Licht kontrollierte. Deshalb musste die Anchor-Sonde länger und der G/C Anteil höher sein. Zudem durfte die Sequenz der Sonden nicht komplementär zu der Primer-Sequenz sein, es mussten repetitive, monotone oder selbst-komplementäre Sequenzen, sowie G/C Cluster und extrem Purin-reiche Regionen vermieden werden. Donor und Akzeptor mussten nahe beieinanderliegen, damit der Energietransfer durch Dipol-Dipol-Interaktion stattfinden konnte. Der Abstand der Oligonukleotide sollte zwischen 1 und 5 Basenpaaren liegen.

Die Auswahl der Sonden erfolgte mit Hilfe des Sonden Design Programms der LightCycler-Software. Verwendet wurden die Sensor-Sonde –509-S1 mit der Frequenz 5'-LC-Red640-(AGGACACCTGAGGGATGGA)-P-3' und die Anchor-Sonde –509-A1 mit der Frequenz 5'-(AGGGTGTCTAGTGGGAGGAGGGGGCAA)-Fluo-3'.

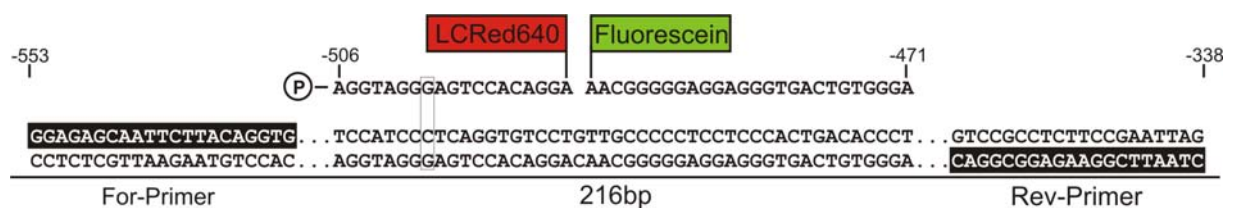


Abb. 12: Lokalisation von Primern und Sonden zur Analyse des *single nucleotide polymorphism* an Position –509.

Mit dem For-Primern For4 und dem Rev-Primer Rev2 wurde ein 216bp TGF- β 1 Genfragment amplifiziert und mit den fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden –509-S1 und –509-A1 der Polymorphismus an Position –509 der Promotorregion detektiert. Die Punktmutation wurde von der LC-Red640-markierten Sensor-Sonde umfasst, die komplementär zur Wildtypsequenz war.

5.1.2.4 LightCycler-Programm

Das LightCycler-Programm für den Polymorphismus im Promotorbereich an Position –509 wurde zu Beginn nach den vorgegebenen Anweisungen des Herstellers entworfen. Dabei waren die verschiedenen Variablen abhängig von der Basenpaarlänge des PCR-Fragmentes und/oder von der Basenpaaranzahl der Oligonukleotide. Nach dem ersten Lauf wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt und die PCR-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht. Schmelztemperatur, Inkubationszeit der Elongation und Zykluszahl wurden mehrfach variiert und für das endgültige Programm die Bedingungen gewählt, bei denen die Banden am kräftigsten waren. Im nächsten Schritt wurden die Schmelzkurven durch Modifikation der Segmente der Schmelzpunktanalyse optimiert.

Arbeitsschritte	Segment	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Änderung (°C/s)	Zykluszahl
Denaturierung	1	95	600	20	1
Amplifikation	1	95	10	20	45
	2	59	10	20	
	3	72	8	20	
Schmelzpunktanalyse	1	95	60	20	1
	2	39	30	20	
	3	78	0	0,2	
Abkühlung	1	40	30	20	1

Tabelle 4: LightCycler-Programm „TGF-β1-Promotor-509“.

Das LightCycler-Programm setzte sich aus den Arbeitsschritten Denaturierung, Amplifikation, Schmelzpunktanalyse und Abkühlung zusammen, die jeweils in verschiedene Segmente unterteilt waren. In der Denaturierung wurden die Proben bei einer Temperaturänderung von 20°C/s für 600s auf 95°C erhitzt. Die Amplifikation entsprach der Polymerasekettenreaktion mit Denaturierung bei 95°C für 10s, Annealing bei 59°C für 10s und Elongation bei 72°C für 8s. Dieser Zyklus wurde 45x durchlaufen. Anhand des gemessenen Lichtes ermittelte der LightCycler während der Schmelzpunktanalyse die Schmelzkurven. Die Temperatur wurde dabei in Segment 3 um 0,2°C/s auf 78°C gesteigert. Im letzten Schritt werden die Proben auf 40°C abgekühlt.

5.1.2.5 Analyse der Allelvarianten

Die Berechnungen des LightCyclers lieferten drei unterschiedliche Kurvenverläufe. Es zeigten sich Kurven mit einem *Peak* bei 61°C, Kurven mit einem *Peak* bei 55°C und Kurven sowohl mit einem *Peak* bei 61°C als auch einem bei 55°C. Die Sensor-Sonde –509-S1 war dabei komplementär zur Wildtypsequenz.

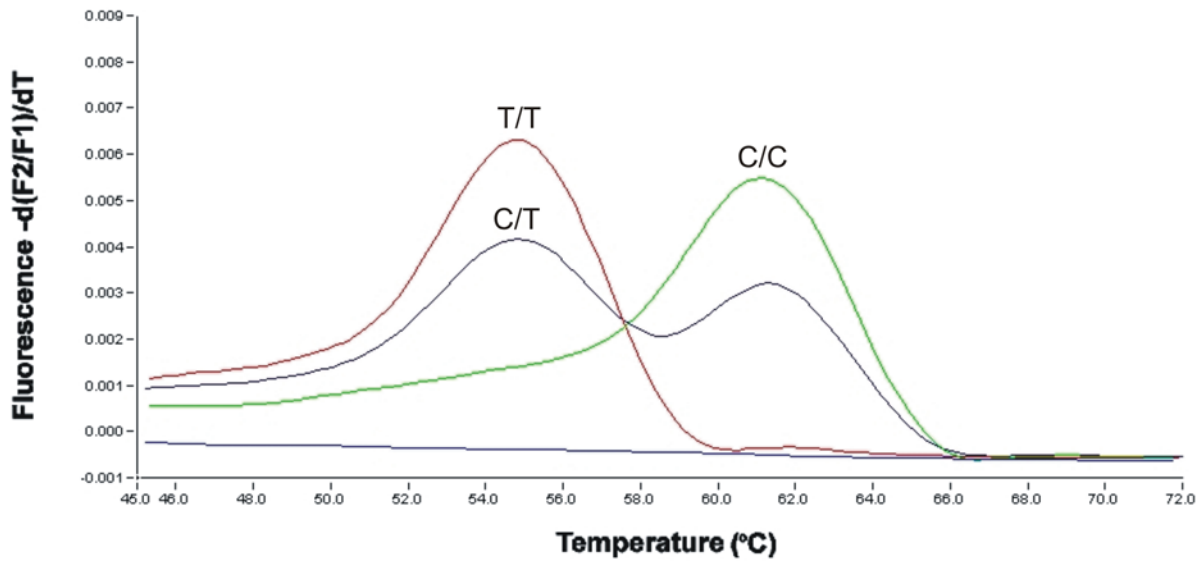
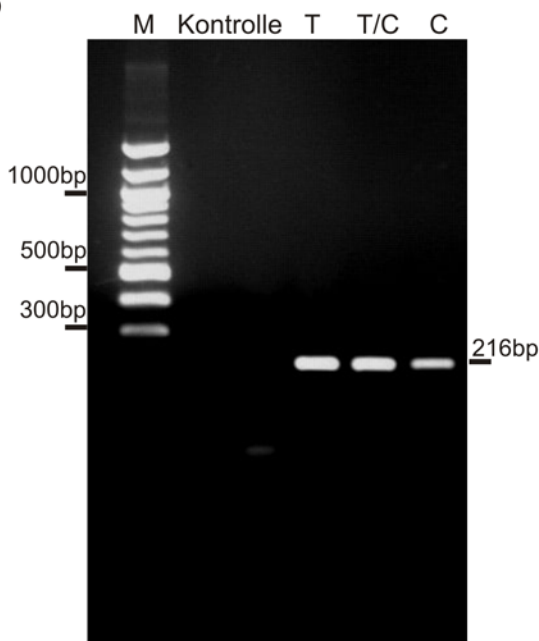
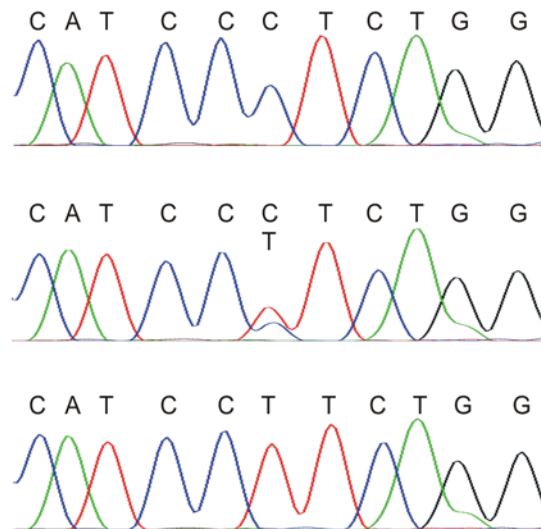
A**B****C**

Abb. 13: Mutationsanalyse des Promotorpolymorphismus an Position -509.

A: Schmelzpunktanalyse der verschiedenen Allelvarianten.

Probanden, die in beiden Allelen an Stelle -509 des TGF- β 1 Gens Cytosin aufwiesen, zeigten in der LightCycler-Kurve einen *Peak* bei 61°C. Der Austausch von Cytosin durch Thymin bewirkte eine Erniedrigung der Schmelztemperatur um 6°C. Folglich waren Probanden mit einem *Peak* bei 55°C homozygot für Thymin. Ein *Peak* sowohl bei 55°C als auch bei 61°C kennzeichnete heterozygote Probanden.

B: Agarosegelelektrophorese.

Die Produkte der LightCycler-PCR wurden auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und im elektrischen Feld aufgetrennt. Unter UV-Licht wurde das 216bp-umfassende PCR-Fragmente sichtbar.

C: Sequenzierung.

Die DNA-Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, die DNA-Proben isoliert und sequenziert. Die dargestellten Sequenzen verifizierten die Ergebnisse der Schmelzpunktanalyse.

Nach Angaben des Herstellers verringert ein Basenaustausch die Schmelztemperatur durchschnittlich um 4-8°C. Folglich sollte der Schmelzkurvenpeak bei höherer Temperatur den Wildtyp und bei niedrigerer Temperatur die Punktmutation an Position –509 kennzeichnen. Diese Interpretation der LightCycler-Kurven musste bewiesen werden.

Es wurden LightCycler-Proben jeder Kurvenvariante auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und die DNA-Fragmente im elektrischen Feld aufgetrennt. Unter UV-Licht wurden die Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend eluiert, aufgereinigt und sequenziert.

Durch die Sequenzierung konnte gesichert werden, dass ein Proband, dessen DNA bei der LightCycler Analyse einen *Peak* bei 61°C zeigte, an Position –509 des TGF-β1-Promotors homozygot Cytosin trug. Probanden, die an dieser Stelle auf beiden Allelen Thymin aufwiesen, konnten durch einen *Peak* bei 55°C identifiziert werden. Ein *Peak* sowohl bei 61°C als auch bei 55°C kennzeichnete Heterozygote.

Nach Etablierung des LightCycler-Programms wurden alle DNA-Proben der beiden Kollektive gemessen. Von den insgesamt 430 Patienten konnte bei 413 der Genotyp bestimmt werden. Dabei waren 212 Patienten (51,3%) homozygot für Cytosin, 52 Patienten (12,6%) homozygot für Thymin und 149 Patienten (36,1%) heterozygot. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Allelhäufigkeiten des Hep-Net und des „Kölner Kollektivs“. Die Häufigkeitsverteilung ist in Tabelle 5 aufgeführt.

Promotor -509	Insgesamt	Hep-Net	Köln
	413	190	223
C/C	212 51,3%	92 48,4%	120 53,8%
C/T	149 36,1%	77 40,5%	72 32,3%
T/T	52 12,6%	21 11,1%	31 13,9%

Tabelle 5: Häufigkeitsverteilung Promotor –509.

Insgesamt konnte mittels LightCycler Analyse der Genotyp von 413 Patienten erfolgreich bestimmt werden. Dabei stammten 190 Patienten aus dem Hep-Net Kollektiv und 223 Patienten aus dem „Kölner Kollektiv“.

Homozygot für Cytosin waren insgesamt 212 Patienten (51,3%), davon 92 Patienten aus dem Hep-Net und 120 Patienten aus dem „Kölner Kollektiv“. Die Heterozygotenhäufigkeit lag zusammengekommen bei 36,1% (149 Patienten), im Hep-Net Kollektiv bei 40,5% (77 Patienten) und im „Kölner Kollektiv“ bei 32,3% (72 Patienten). Die restlichen 52 (12,6%) der 413 Patienten waren homozygot für Thymin, entsprechend 21 Patienten aus dem Hep-Net und 31 Patienten aus dem „Kölner Kollektiv“.

Anschließend wurde die Verteilung der Genotypen in Bezug auf *Grading* und *Staging* berechnet. Dabei wurden ausschließlich isoliert Hepatitis C infizierte Patienten einbezogen. In die Analysen gingen deshalb statt der ursprünglich 413 erfolgreich gemessenen Patienten nur 377 ein. Die Häufigkeitsverteilung änderte sich dabei nicht signifikant. Von diesen 377 Patienten waren 195 homozygot für Cytosin, 134 heterozygot und 48 homozygot für Thymin. Es wurde berechnet, wie hoch der prozentuale Anteil der Patienten mit geringer entzündlicher Aktivität (G0-G2) und mit hoher entzündlicher Aktivität (G3-G4) bzw. mit gering ausgeprägter Fibrosierung (S0-S2) und schwerer Fibrosierung (S3-S4) war. Dabei wiesen 84% der C/C-Patienten, 81% der C/T-Patienten und 92% der Pro/Pro-Patienten eine niedrige entzündliche Aktivität auf. Die restlichen 16% der C/C-Patienten, 19% der C/T-Patienten und 8% der T/T-Patienten wurden einem hohen Entzündungsgrad zwischen G3 und G4 zugeordnet. Histologisch gering ausgeprägte Fibrose (S0-S2) wurde bei 66% der C/C-Patienten, 72% der C/T-Patienten und 83% der T/T-Patienten festgestellt. Einen hohen Fibrosegrad zwischen S3 und S4 wiesen 34% der C/C-Patienten, 28% der C/T-Patienten und 17% der T/T-Patienten auf. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt, die statistische Auswertung folgt in Abschnitt 4.1.6.

Grading				Staging			
	n=376	G0-G2	G3-G4		n=377	S0-S2	S3-S4
C/C	194	163 84%	31 16%	C/C	195	129 66%	66 34%
C/T	134	109 81%	25 19%	C/T	134	96 72%	38 28%
T/T	48	44 92%	4 8%	T/T	48	40 83%	8 17%

Tabelle 6: Verteilung der Genotypen des Promotorpolymorphismus an Position -509 in Bezug auf *Grading* und *Staging*.

Insgesamt waren von den 413 erfolgreich gemessenen Patienten 377 isoliert Hepatitis C infiziert. Unter den 377 Patienten war bei einem Patienten das *Grading* nicht bekannt war. Dadurch reduzierte sich die Patientenzahl bezüglich des *Gradings* auf 376.

5.1.3 Polymorphismus Codon 10

Das LightCycler-Programm für den TGF- β 1 Genpolymorphismus in Codon 10 war bereits von Tag *et al.* für Experimente mit Blutproben etabliert worden [142]. Die Messungen, der aus Paraffin isolierten DNA, erwiesen sich allerdings schon in den ersten Versuchen als ineffektiver. Durch Erhöhung der Amplifikationszyklen von 45 auf 50 konnte die Ausbeute gesteigert werden. Verglichen mit den in Abschnitt 5.1.2 beschriebenen LightCycler Analysen, waren die Messungen des Polymorphismus in Codon 10 dennoch unbefriedigend.

Der Genotyp konnte nur bei einem Bruchteil der Patienten bestimmt werden. Die meisten Messungen waren negativ.

Arbeitsschritte	Segment	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Änderung (°C/s)	Zykluszahl
Denaturierung	1	95	600	20	1
Amplifikation	1	95	10	20	50
	2	59	10	20	
	3	72	20	20	
Schmelzpunktanalyse	1	95	60	20	1
	2	45	30	20	
	3	78	0	0,2	
Abkühlung	1	40	30	20	1

Tabelle 7: LightCycler-Programm „TGF- β 1Leu10Pro“.

Das LightCycler-Programm setzte sich aus den Arbeitsschritten Denaturierung, Amplifikation, Schmelzpunktanalyse und Abkühlung zusammen, die jeweils in verschiedene Segmente unterteilt waren. In der Denaturierung wurden die Proben bei einer Temperaturänderung von 20°C/s für 600s auf 95°C erhitzt. Die Amplifikation entsprach der Polymerasekettenreaktion mit Denaturierung bei 95°C für 10s, Annealing bei 59°C für 10s und Elongation bei 72°C für 20s. Dieser Zyklus wurde 50x durchlaufen. Anhand des gemessenen Lichtes ermittelte der LightCycler während der Schmelzpunktanalyse die Schmelzkurven. Die Temperatur wurde dabei in Segment 3 um 0,2°C/s auf 78°C gesteigert. Im letzten Schritt wurden die Proben auf 40°C abgekühlt.

Die DNA schien durch Einbettung des Gewebes in Paraffin, anschließende Entparaffinierung und Aufreinigung in kleine Fragmente zerlegt vorzuliegen. Mit den ursprünglich verwendeten Primern Arg25Pro-For2 mit der Nukleinsäuresequenz 5'-d(CTAGGTTAT-TTCCGTGGG)-3' und Arg25Pro-Rev2 mit der Sequenz 5'-d(CCTTGCGTAGTAGTCG)-3' wurde ein 523bp großes Fragment vervielfältigt. Dieses Fragment war für die Analysen zu lang. Mit den neuen Primern K1 mit der Nukleinsäuresequenz 5'-d(CTCCTACCTTTT-GCCGGGAG)-3' und K2 mit der Sequenz 5'-d(GACAGGATCTGGCCGCGGAT)-3' konnte ein 270bp-Fragment amplifiziert werden, was die Ermittlung des Genotyps von mehr DNA-Proben möglich machte.

Für die Analysen wurden die Sensor-Sonde Leu10Pro-S mit der Sequenz 5'-LC-Red640-(CGGCTGCTGCCGCTGCT)-P-3' und die Anchor-Sonde Leu10Pro-A mit der Frequenz 5'-(TCCCCCATGCCGCCCTCCGGGCT)-Fluo-3' eingesetzt.

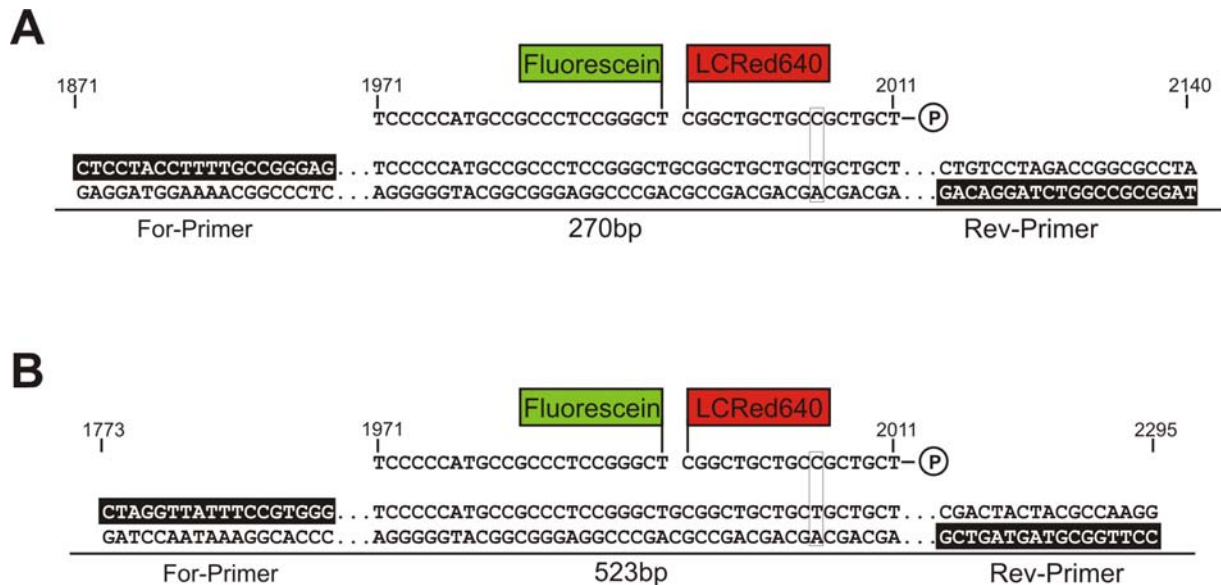


Abb. 14: Lokalisation von Primern und Sonden zur Analyse des *single nucleotide polymorphism* in Codon 10.

A: Primer K1 und K2, 270bp-Fragment.

Mit dem For-Primer K1 und dem Rev-Primer K2 wurde ein 270bp TGF- β 1 Genfragment amplifiziert und mit den fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden Leu10Pro-S und Leu10Pro-A der Polymorphismus an Position +869 detektiert. Die Punktmutation wurde von der LC-Red640-markierten Sensor-Sonde umfasst, die komplementär zu der Codon Sequenz CCG und somit zur Mutation war.

B: Primer Arg25Pro-For2 und Arg25Pro-Rev2, 523bp-Fragment.

Mit dem For-Primer Arg25Pro-For2 und dem Rev-Primer Arg25Pro-Rev2 wurde ein 523bp TGF- β 1 Genfragment amplifiziert und mit den fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden Leu10Pro-S und Leu10Pro-A der Polymorphismus an Position +869 detektiert. Die Punktmutation wurde von der LC-Red640-markierten Sensor-Sonde umfasst, die komplementär zu der Codon Sequenz CCG und somit zur Mutation war.

In den LightCycler-Kurven zeigte sich bei einem Patienten, der in Codon 10 für Leucin kodierte, ein *Peak* bei 56°C. Da die verwendete Sensor-Sonde komplementär zur Punktmutation war, führte der Basenaustausch zu einer Erhöhung der Sondenschmelztemperatur um 11°C. Ein *Peak* sowohl bei 56°C als auch bei 67°C kennzeichnete einen heterozygoten Patienten. Die Analyse von DNA eines homozygot für Prolin kodierenden Patienten ergab in den LightCycler-Kurven einen *Peak* bei 67°C.

Um die richtige Auswertung der LightCycler-Kurven sicherzustellen, wurden Proben aller drei Kurvenvarianten auf ein 1,5%iges Agarosegel geladen und durch Elektrophorese aufgetrennt. Unter UV-Licht wurden die DNA-Banden ausgeschnitten, die DNA aus dem Gel isoliert und aufgereinigt. Anschließend wurden die Proben sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung stimmten mit den Kurvenverläufen überein.

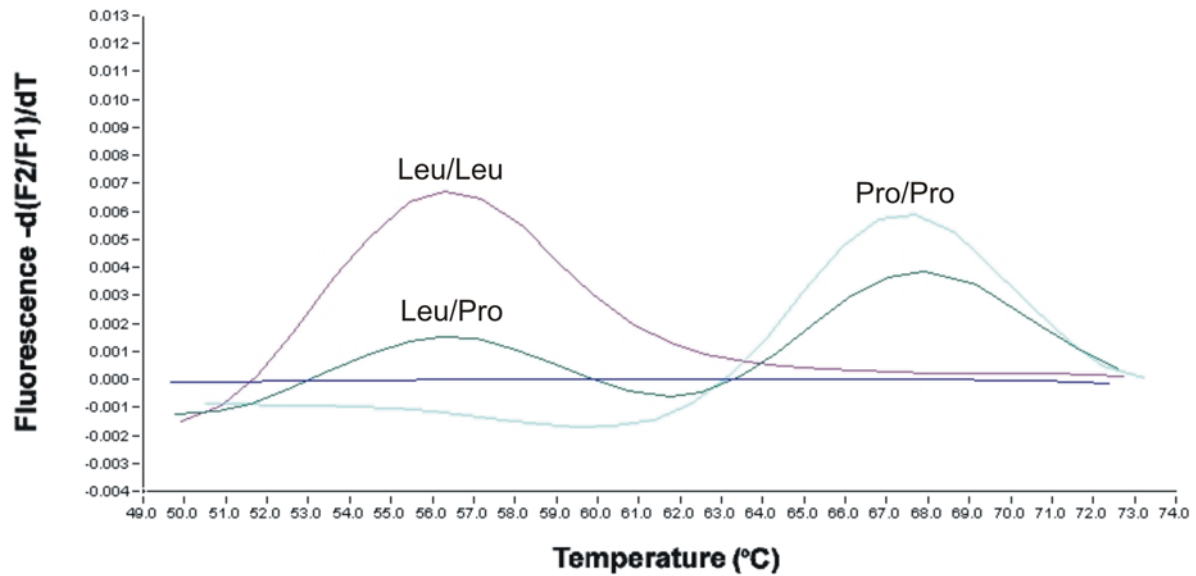
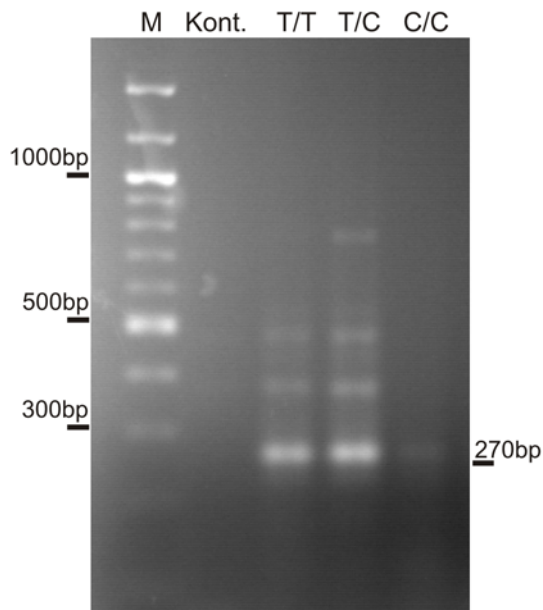
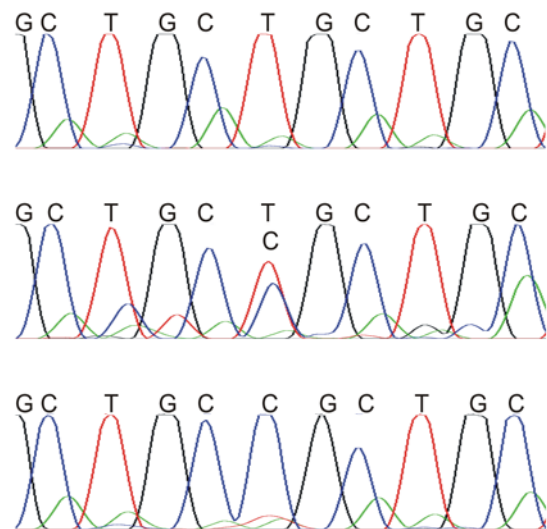
A**B****C**

Abb. 15: LightCycler Analyse Codon 10 mit den Primern K1 und K2.

A: Schmelzpunktanalyse der verschiedenen Allelvarianten.

Probanden, die in beiden Allelen des TGF-β1 Gens für Leucin kodierten, zeigten in der LightCycler-Kurve einen Peak bei 56°C. Der Austausch von Thymin durch Cytosin bewirkte eine Erhöhung der Schmelztemperatur um 11°C. Folglich waren Probanden mit einem Peak bei 67°C homozygot für die Aminosäure Prolin an 10. Stelle des Proteins. Ein Peak sowohl bei 56°C als auch bei 67°C kennzeichnete heterozygote Probanden.

B: Agarosegelelektrophorese.

Die Produkte der LightCycler-PCR wurden auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und im elektrischen Feld aufgetrennt. Unter UV-Licht wurde das 270bp-umfassende PCR-Fragmente sichtbar.

C: Sequenzierung.

Die DNA-Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, die DNA-Proben isoliert und sequenziert. Die dargestellten Sequenzen verifizierten die Ergebnisse der Schmelzpunktanalyse.

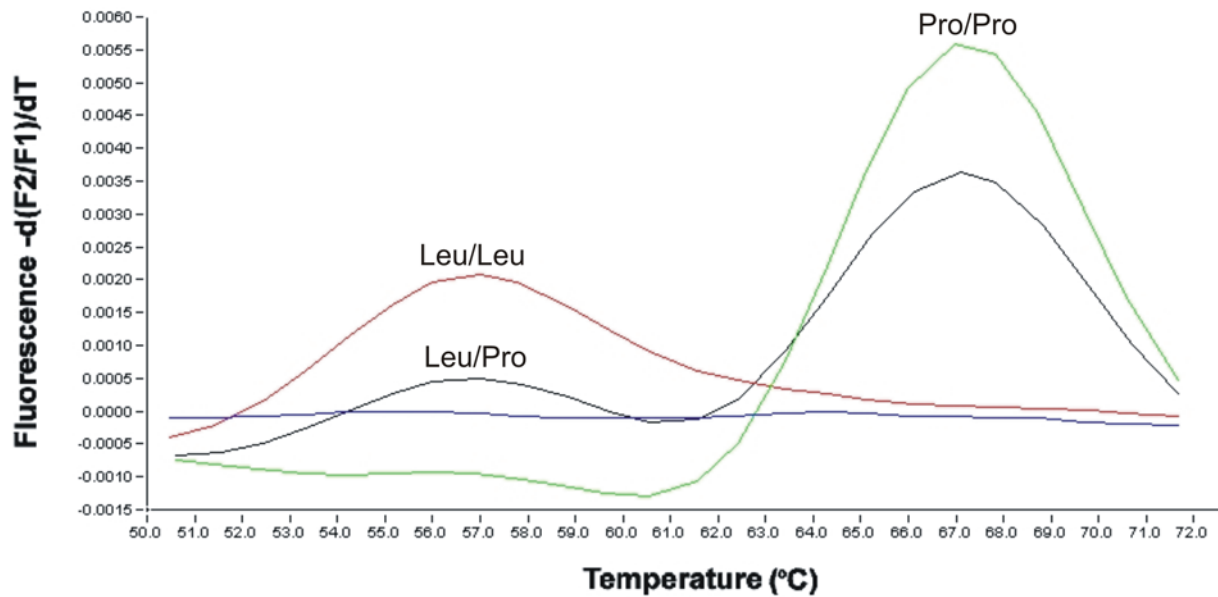
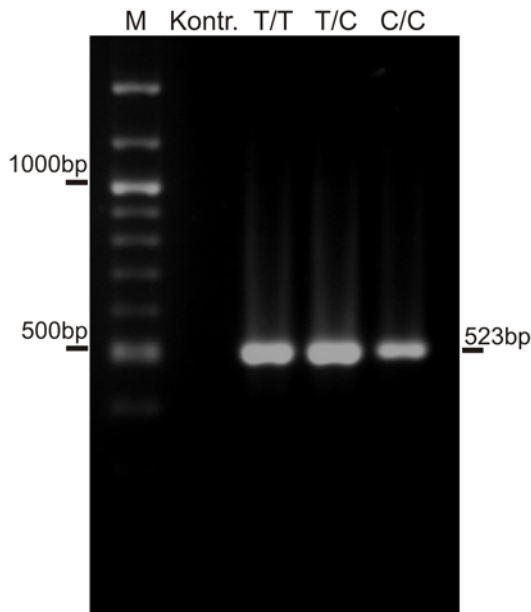
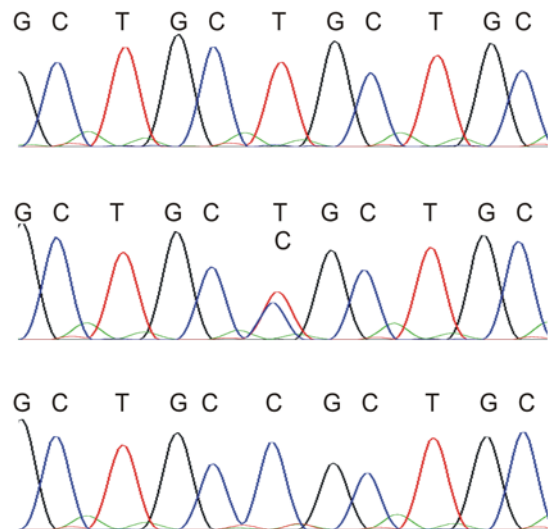
A**B****C**

Abb. 16: LightCycler Analyse Codon 10 mit den Primern Arg25Pro-For2 und Arg25Pro-Rev2.

A: Schmelzpunktanalyse der verschiedenen Allelvarianten.

Probanden, die in beiden Allelen des TGF- β 1 Gens für Leucin kodierten, zeigten in der LightCycler-Kurve einen Peak bei 56°C. Der Austausch von Thymin durch Cytosin bewirkte eine Erhöhung der Schmelztemperatur um 11°C. Folglich waren Probanden mit einem Peak bei 67°C homozygot für die Aminosäure Prolin an 10. Stelle des Proteins. Ein Peak sowohl bei 56°C als auch bei 67°C kennzeichnete heterozygote Probanden.

B: Agarosegelelektrophorese.

Die Produkte der LightCycler-PCR wurden auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und im elektrischen Feld aufgetrennt. Unter UV-Licht wurde das 523bp-umfassende PCR-Fragmente sichtbar.

C: Sequenzierung.

Die DNA-Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, die DNA-Proben isoliert und sequenziert. Die dargestellten Sequenzen verifizierten die Ergebnisse der Schmelzpunktanalyse.

Mit diesem LightCycler-Programm wurden die Proben von allen 430 Patienten gemessen. Der Genotyp konnte aber nur bei 362 Patienten bestimmt werden. Dabei waren 136 Patienten (37,5%) homozygot für Leucin, 60 Patienten (16,6%) homozygot für Prolin und 166 Patienten (45,9%) heterozygot. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Allelfrequenzen des Hep-Net und des „Kölner Kollektivs“. Die Häufigkeitsverteilung ist in Tabelle 8 dargestellt.

Codon 10	Insgesamt	Hep-Net	Köln
	362	186	176
Leu/Leu	136 37,5%	66 35,5%	70 39,8%
Leu/Pro	166 45,9%	94 50,5%	72 40,9%
Pro/Pro	60 16,6%	26 14,0%	34 19,3%

Tabelle 8: Häufigkeitsverteilung Codon 10.

Insgesamt konnte mittels LightCycler Analyse der Genotyp von 362 Patienten erfolgreich bestimmt werden. Dabei stammten 186 Patienten aus dem Hep-Net Kollektiv und 176 Patienten aus dem „Kölner Kollektiv“.

Homozygot für Leucin waren insgesamt 136 Patienten (37,5%), davon 66 Patienten aus dem Hep-Net und 70 Patienten aus dem „Kölner Kollektiv“. Die Heterozygotenhäufigkeit lag zusammengenommen bei 45,9% (166 Patienten), im Hep-Net Kollektiv bei 50,5% (94 Patienten) und im „Kölner Kollektiv“ bei 40,9% (72 Patienten). Die restlichen 60 Patienten (16,6%) der 362 Patienten waren homozygot für Prolin, entsprechend 26 Patienten aus dem Hep-Net und 34 Patienten aus dem „Kölner Kollektiv“.

Auch bei diesem Versuch wurde die Verteilung der Genotypen in Bezug auf *Grading* und *Staging* berechnet. Dabei wurden nur isoliert Hepatitis C infizierte Patienten einbezogen. Die Häufigkeiten der Genotypen änderten sich dabei nicht signifikant. Von den erfolgreich gemessenen Proben gingen 326 in die Analyse ein. Eine niedrige entzündliche Aktivität zwischen G0 und G2 wiesen 86% der Leu/Leu-Patienten, 78% der Leu/Pro-Patienten und 89% der Pro/Pro-Patienten auf. Folglich zeigten 14% der Leu/Leu-Patienten, 22% der Leu/Pro-Patienten und 11% der Pro/Pro-Patienten ein *Grading* zwischen G3 und G4. Histologisch gering ausgeprägte Fibrose zwischen S0 und S2 wurde bei 73% der Leu/Leu-Patienten, 65% der Leu/Pro-Patienten und 79% der Pro/Pro-Patienten festgestellt. Ein hoher Fibrosegrad zwischen S3 und S4 wurde 27% der Leu/Leu-Patienten, 35% der Leu/Pro-Patienten und 21% der Pro/Pro-Patienten zugeteilt.

Die gesamten Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst und die statistische Auswertung folgt in Abschnitt 5.1.6.

Grading				Staging			
	n=325	G0-G2	G3-G4		n=326	S0-S2	S3-S4
Leu/Leu	123	106 86%	17 14%	Leu/Leu	124	90 73%	34 27%
Leu/Pro	146	114 78%	32 22%	Leu/Pro	146	95 65%	51 35%
Pro/Pro	56	50 89%	6 11%	Pro/Pro	56	44 79%	12 21%

Tabelle 9: Verteilung der Genotypen des Polymorphismus in Codon 10 in Bezug auf *Grading* und *Staging*.

Insgesamt waren von den 362 erfolgreich gemessenen Patienten 326 isoliert Hepatitis C infiziert. Unter den 326 Patienten war bei einem Patienten das *Grading* nicht bekannt. Dadurch reduzierte sich die Patientenzahl bezüglich des *Gradings* auf 325.

5.1.4 Polymorphismus Codon 25

Für die Analyse des Polymorphismus in Codon 25 wurden die gleichen Primer verwendet wie bei der Untersuchung des Polymorphismus in Codon 10. Dementsprechend ergaben sich ähnliche Probleme. Die Messungen waren zu einem großen Teil negativ und nicht auswertbar. Nach Anpassung des LightCycler-Programms durch Erhöhung der Amplifikationszyklenzahl von 45 auf 50 wurde der Hauptteil der Messungen mit dem Primerpaar K1 und K2 durchgeführt.

Arbeitsschritte	Segment	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Änderung (°C/s)	Zykluszahl
Denaturierung	1	95	600	20	1
Amplifikation	1	95	10	20	50
	2	59	10	20	
	3	72	20	20	
Schmelzpunktanalyse	1	95	60	20	1
	2	40	30	20	
	3	80	0	0,2	
Abkühlung	1	40	30	20	1

Tabelle 10: LightCycler-Programm „TGF-β1Arg25Pro“.

Das LightCycler-Programm setzte sich aus den Arbeitsschritten Denaturierung, Amplifikation, Schmelzpunktanalyse und Abkühlung zusammen, die jeweils in verschiedene Segmente unterteilt waren. In der Denaturierung wurden die Proben bei einer Temperaturänderung von 20°C/s für 600s auf 95°C erhitzt. Die Amplifikation entsprach der Polymerasekettenreaktion mit Denaturierung bei 95°C für 10s, Annealing bei 59°C für 10s und Elongation bei 72°C für 20s. Dieser Zyklus wurde 50x durchlaufen. Anhand des gemessenen Lichtes ermittelte der LightCycler während der Schmelzpunktanalyse die Schmelzkurven. Die Temperatur wurde dabei in Segment 3 um 0,2°C/s auf 80°C gesteigert. Im letzten Schritt wurden die Proben auf 40°C abgekühlt.

Als Sonden wurden die Sensor-Sonde Arg25Pro-S mit der Sequenz 5'-LC-Red640-(ACGCCTGGCCCGCCG)-P-3' und die Anchor-Sonde mit der Sequenz 5'-(GCTACCGCT-GCTGTGGCTACTGGTGCT)-Fluo-3' eingesetzt.

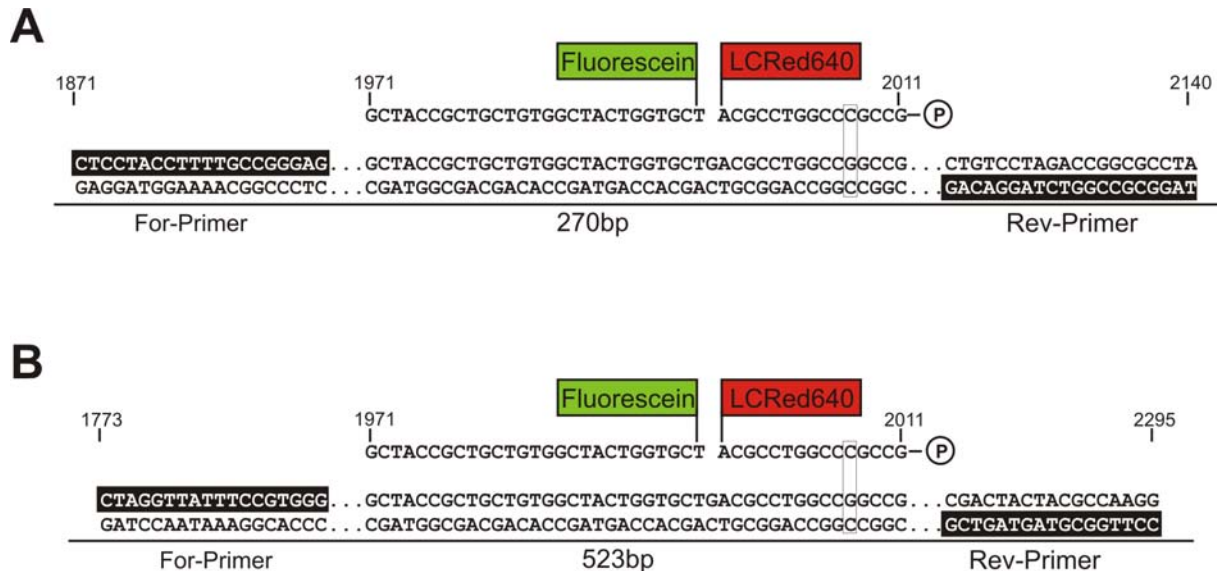


Abb. 17: Lokalisation von Primern und Sonden zur Analyse des *single nucleotide polymorphism* in Codon 25.

A: Primer K1 und K2, 270bp-Fragment.

Mit dem For-Primer K1 und dem Rev-Primer K2 wurde ein 270bp TGF- β 1 Genfragment amplifiziert und mit den fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden Arg25Pro-S und Arg25Pro-A der Polymorphismus an Position +915 detektiert. Die Punktmutation wurde von der LC-Red640-markierten Sensor-Sonde umfasst, die komplementär zu der Codon Sequenz CCG und somit zur Mutation war.

B: Primer Arg25Pro-For2 und Arg25Pro-Rev2, 523bp-Fragment.

Mit dem For-Primer Arg25Pro-For2 und dem Rev-Primer Arg25Pro-Rev2 wurde ein 523bp TGF- β 1 Genfragment amplifiziert und mit den fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden Arg25Pro-S und Arg25Pro-A der Polymorphismus an Position +915 detektiert. Die Punktmutation wurde von der LC-Red640-markierten Sensor-Sonde umfasst, die komplementär zu der Codon Sequenz CCG und somit zur Mutation war.

Die verwendete Sensor-Sonde war komplementär zur Punktmutation. Deshalb zeigten Patienten, die in Codon 25 homozygot für Leucin kodierten, den *Peak* bei niedrigerer Temperatur als die Patienten, die homozygot für Prolin kodierten. Dabei lag die Schmelztemperatur des Wildtyps bei 51°C und die der Mutante bei 65°C. Der Basenaustausch führte also zu einer Erhöhung der Sondenschmelztemperatur um 14°C. Eine LightCycler-Kurve mit einem *Peak* bei 51°C und einem zweiten bei 65°C ließ auf Heterozygotie schließen.

Die Deutung der Kurven wurde durch Sequenzierung gesichert. Dabei wurden LightCycler-Proben der drei Kurvenvarianten durch Gelelektrophorese aufgetrennt, die Banden unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA aufgereinigt. Es folgte die Sequenzierung der DNA, welche die Genotypen bestätigte. Auf diese Weise wurde sowohl das kurze Fragment mit einer Länge von 270bp, als auch das lange Fragment mit einer Länge von 523bp überprüft.

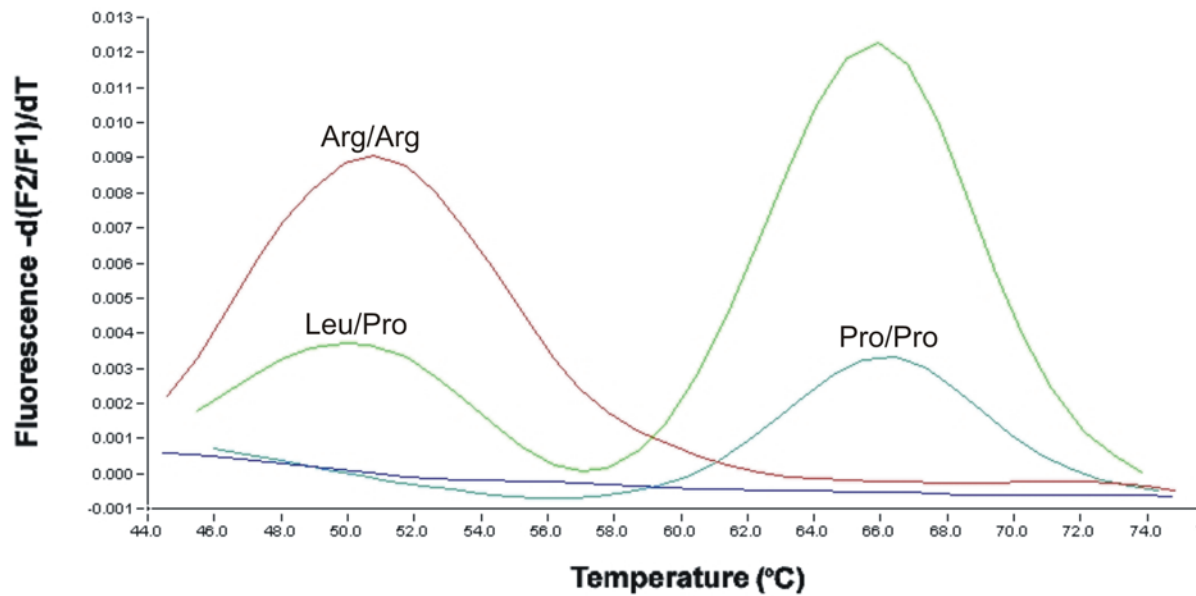
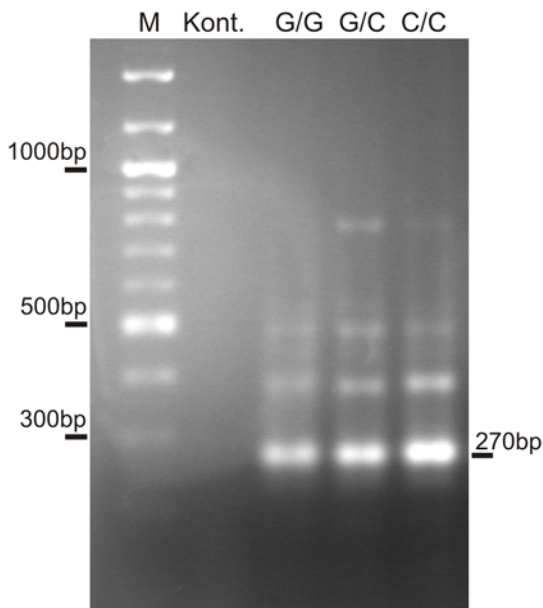
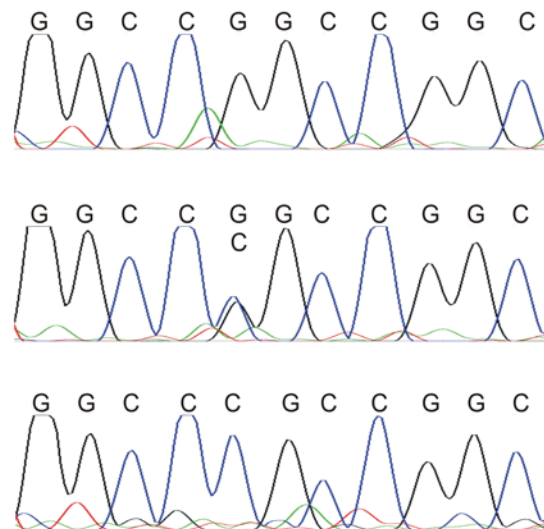
A**B****C**

Abb. 18: LightCycler Analyse Codon 25 mit den Primern K1 und K2.

A: Schmelzpunktanalyse der verschiedenen Allelvarianten.

Probanden, die in beiden Allelen des TGF-β1 Gens für Arginin kodierten, zeigten in der LightCycler-Kurve einen Peak bei 51°C. Der Austausch von Guanin durch Cytosin bewirkte eine Erhöhung der Schmelztemperatur um 14°C. Folglich waren Probanden mit einem Peak bei 51°C homozygot für die Aminosäure Prolin an 25. Stelle des Proteins. Ein Peak sowohl bei 51°C als auch bei 65°C kennzeichnete heterozygote Probanden.

B: Agarosegelelektrophorese.

Die Produkte der LightCycler-PCR wurden auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und im elektrischen Feld aufgetrennt. Unter UV-Licht wurde das 270bp-umfassende PCR-Fragmente sichtbar.

C: Sequenzierung.

Die DNA-Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, die DNA-Proben isoliert und sequenziert. Die dargestellten Sequenzen verifizierten die Ergebnisse der Schmelzpunktanalyse.

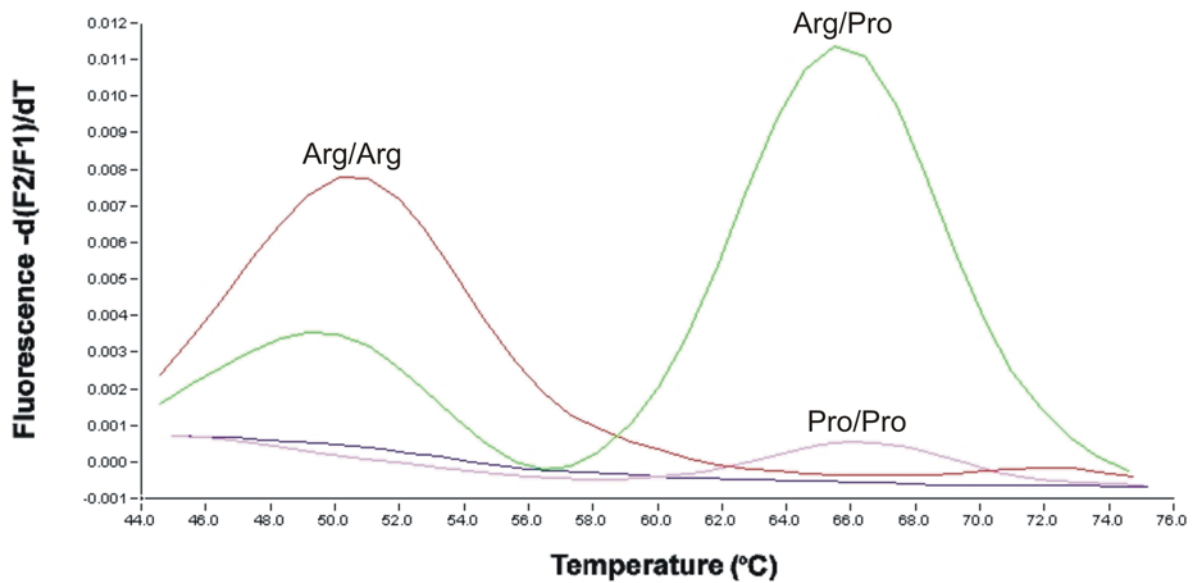
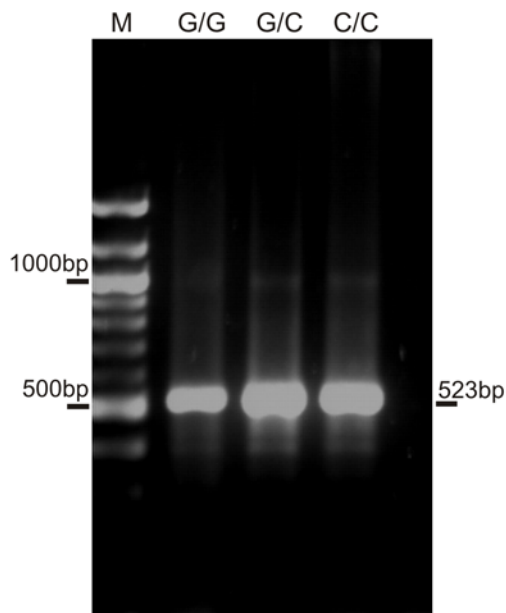
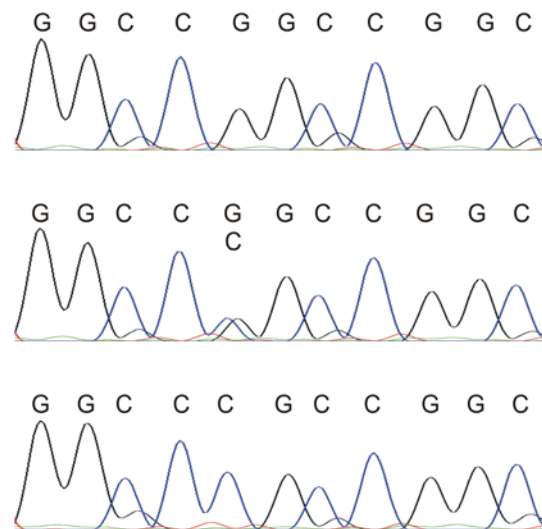
A**B****C**

Abb. 19: LightCycler Analyse Codon 25 mit den Primern Arg25Pro-For2 und Arg25Pro-Rev2.

A: Schmelzpunktanalyse der verschiedenen Allelvarianten.

Probanden, die in beiden Allelen des TGF- β 1 Gens für Arginin kodierten, zeigten in der LightCycler-Kurve einen Peak bei 51°C. Der Austausch von Guanin durch Cytosin bewirkte eine Erhöhung der Schmelztemperatur um 14°C. Folglich waren Probanden mit einem Peak bei 65°C homozygot für die Aminosäure Prolin an 10. Stelle des Proteins. Ein Peak sowohl bei 51°C als auch bei 65°C kennzeichnete heterozygote Probanden.

B: Agarosegelelektrophorese.

Die Produkte der LightCycler-PCR wurden auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und im elektrischen Feld aufgetrennt. Unter UV-Licht wurde das 523bp-umfassende PCR-Fragmente sichtbar.

C: Sequenzierung.

Die DNA-Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, die DNA-Proben isoliert und sequenziert. Die dargestellten Sequenzen verifizierten die Ergebnisse der Schmelzpunktanalyse.

Mit dem LightCycler-Programm wurde der Polymorphismus in Codon 25 der 430 Patienten bestimmt. Dabei war die Messung von 360 Proben erfolgreich. Insgesamt waren 84,2% entsprechend 303 Patienten homozygot für Guanin an Position +915 des TGF- β 1 Gens und somit homozygot für Arginin. 50 Patienten (13,9%) zeigten in den LightCycler Analysen zwei Piks und waren heterozygot. Nur 7 Patienten (1,9%) der gemessenen Patienten kodierten in beiden Allelen für Prolin. Im Hep-Net Kollektiv war kein Patient homozygot für Prolin, alle 7 Patienten gehörten dem „Kölner Kollektiv“ an. Die Häufigkeitsverteilung ist in Tabelle 11 dargestellt.

Codon 25	Insgesamt	Hep-Net	Köln
	360	186	174
Arg/Arg	303 84,2%	157 84,4%	146 83,9%
Arg/Pro	50 13,9%	29 15,6%	21 12,1%
Pro/Pro	7 1,9%	0 0%	7 4%

Tabelle 11: Häufigkeitsverteilung Codon 25.

Insgesamt konnte mittels LightCycler Analyse der Genotyp von 360 Patienten erfolgreich bestimmt werden. Dabei stammten 186 Patienten aus dem Hep-Net Kollektiv und 174 Patienten aus dem „Kölner Kollektiv“.

Der Großteil der Patienten insgesamt 303 (84,2%) waren homozygot für Arginin, davon 157 Patienten aus dem Hep-Net und 146 aus dem „Kölner Kollektiv“. Die Heterozygotenhäufigkeit lag zusammengekommen bei nur 13,9% (50), dabei waren 29 Patienten dem Hep-Net und 21 Patienten dem „Kölner Kollektiv“ zuzurechnen. Patienten, die homozygot für Prolin kodierten, waren allein im „Kölner Kollektiv“ (7 bzw. 4%) zu finden.

Auch für den Polymorphismus in Codon 25 wurden die Genotypen in Bezug zu *Grading* und *Staging* gesetzt. Da nur isoliert Hepatitis C infizierte Patienten mit einbezogen wurden, lag die Patientenzahl bei 323. Die Häufigkeitsverteilung änderte sich aber nicht wesentlich. Statt bei 84,2% lag die Anzahl der homozygot Arginin Patienten bei 83%. Die Anzahl der Heterozygoten betrug nicht 13,9% sondern 15%. Eine niedrige entzündliche Aktivität zwischen G0 und G2 wiesen 83% der Arg/Arg-Patienten, 81% der Arg/Pro-Patienten und 100% der Pro/Pro-Patienten auf. Folglich zeigten 17% der Arg/Arg-Patienten, 19% der Arg/Pro-Patienten und 0% der Pro/Pro-Patienten ein *Grading* zwischen G3 und G4. Histologisch gering ausgeprägte Fibrose (S0-S2) wurde bei 72% der Arg/Arg-Patienten, 67% der Arg/Pro-Patienten und 57% der Pro/Pro-Patienten festgestellt. Ein hoher Fibrosegrad zwischen S3 und S4 wurde 28% der Arg/Arg-Patienten, 33% der Arg/Pro-Patienten und 43% der Pro/Pro-Patienten zugeteilt. Die Ergebnisse sind ausführlich in Tabelle 12 zusammengefasst und die statistische Auswertung folgt in Abschnitt 5.1.6.

Grading				Staging			
	n=322	G0-G2	G3-G4		n=323	S0-S2	S3-S4
Arg/Arg	267	222 83%	45 17%	Arg/Arg	268	194 72%	74 28%
Arg/Pro	48	39 81%	9 19%	Arg/Pro	48	32 67%	16 33%
Pro/Pro	7	7 100%	0 0%	Pro/Pro	7	4 57%	3 43%

Tabelle 12: Verteilung der Genotypen des Polymorphismus in Codon 10 in Bezug auf *Grading* und *Staging*.

Insgesamt waren von den 360 erfolgreich gemessenen Patienten 323 isoliert Hepatitis C infiziert. Unter den 323 Patienten war bei einem Patienten das *Grading* nicht bekannt. Dadurch reduzierte sich die Patientenzahl bezüglich des *Gratings* auf 322.

5.1.5 Polymorphismus Codon 263

Das von Wang *et al.* etablierte LightCycler-Programm zur Analyse des Polymorphismus in Codon 263 musste nicht modifiziert werden [143].

Arbeitsschritte	Segment	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Änderung (°C/s)	Zykluszahl
Denaturierung	1	95	600	20	1
Amplifikation	1	95	10	20	45
	2	59	10	20	
	3	72	20	20	
Schmelzpunktanalyse	1	95	60	20	1
	2	39	30	20	
	3	74	0	0,2	
Abkühlung	1	40	30	20	1

Tabelle 13: LightCycler-Programm „TGF-β1-Thr263Ile“.

Das LightCycler-Programm setzte sich aus den Arbeitsschritten Denaturierung, Amplifikation, Schmelzpunktanalyse und Abkühlung zusammen, die jeweils in verschiedene Segmente unterteilt waren. In der Denaturierung wurden die Proben bei einer Temperaturänderung von 20°C/s für 600s auf 95°C erhitzt. Die Amplifikation entsprach der Polymerasekettenreaktion mit Denaturierung bei 95°C für 10s, Annealing bei 59°C für 10s und Elongation bei 72°C für 20s. Dieser Zyklus wurde 45x durchlaufen. Anhand des gemessenen Lichtes ermittelte der LightCycler während der Schmelzpunktanalyse die Schmelzkurven. Die Temperatur wurde dabei in Segment 3 um 0,2°C/s auf 74°C gesteigert. Im letzten Schritt wurden die Proben auf 40°C abgekühlt.

Das mit den Primern HW09-For mit der Nukleinsäuresequenz 5'-d(AAGCAGGGT TCACTACCGGC)-3' und HW10-Rev mit der Sequenz 5'-(AGGCCTCCATCCAGGCTACA)-3' amplifizierte 182bp-Fragment war kurz genug, um mit diesem System fast alle Patienten-

proben erfolgreich messen zu können. Zur Detektion der Punktmutation wurden die Sensor-Sonde Thr263Ile-S mit der Sequenz 5'-(ATGGCCACCCCGCT)-Fluo-3' und die Anchor-Sonde Thr263Ile-A mit der Sequenz 5'-LC-Red640-(GAGAGGGCCCAGCATCTGCAAA GCT)-P-3' eingesetzt.

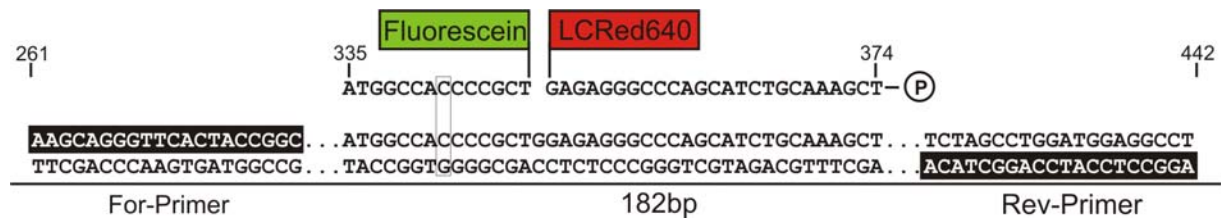


Abb. 20: Lokalisation von Primern und Sonden zur Analyse des *single nucleotide polymorphism* in Codon 263.

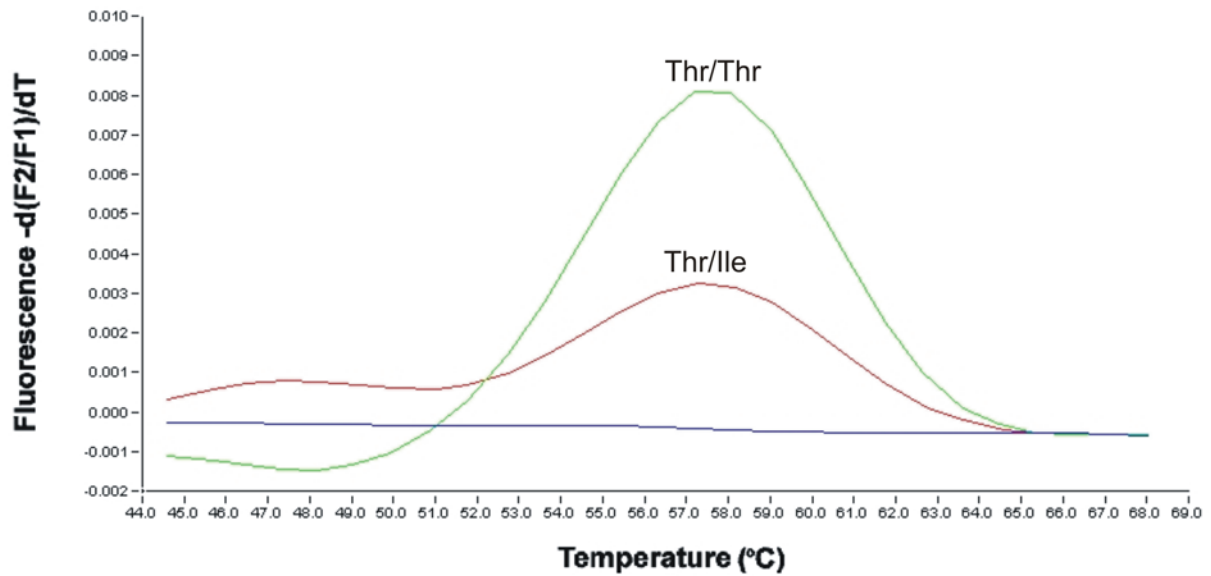
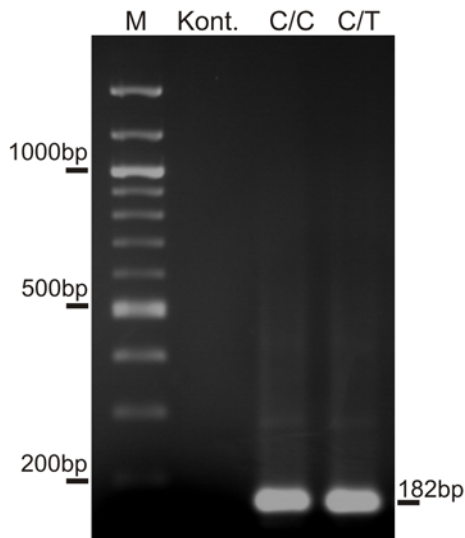
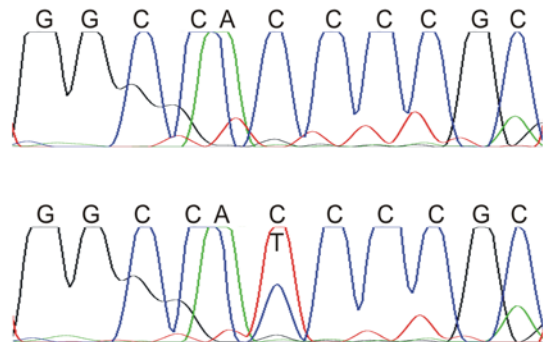
Mit dem For-Primer HW09-For und dem Rev-Primer HW10-Rev wurde ein 182bp TGF- β 1 Genfragment amplifiziert und mit den fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden Thr263Ile-S und Thr263Ile-A der Polymorphismus an Position +1632 detektiert. Die Punktmutation wurde von der Fluorescein-markierten Sensor-Sonde umfasst, die komplementär zur Wildtypsequenz war.

Die Fluorescein-markierte Sensor-Sonde war komplementär zur Wildtypsequenz. Der Austausch von Cytosin durch die Nukleinsäure Thymin führte zur Erniedrigung der Sonden-schmelztemperatur um 12°C. Wies eine Probe der LightCycler Analyse einen *Peak* bei 60°C auf, kodierte der Patient homozygot für Threonin in Codon 263. Ein *Peak* sowohl bei 60°C als auch bei 48°C zeigte einen heterozygoten Patienten an. Eine LightCycler-Kurve mit nur einem *Peak* bei 48°C wurde nicht gesehen.

Um die Aussagen der LightCycler Analyse zu beweisen, wurden die Proben durch Gelelektrophorese aufgetrennt und die DNA eluiert. Die anschließende Sequenzierung bestätigte, dass Patienten mit einem *Peak* homozygot für Threonin waren und Patienten mit zwei *Peaks* auf einem Allel für Threonin und auf dem zweiten Allel für Isoleucin kodierten.

Mit diesem Programm wurden LightCycler-Messungen der 430 DNA-Proben durchgeführt. Dabei konnte der Genotyp bei 415 Patienten erfolgreich bestimmt werden. Von diesen 415 Patienten waren 395 (95,2%) homozygot für Threonin. Die Homozygotenfrequenz lag im Hep-Net Kollektiv bei 94,2% und im „Kölner Kollektiv“ bei 96%. Es zeigte sich insgesamt ein Heterozygotenanteil von 4,8%. Im Hep-Net Kollektiv kodierten 11 Patienten (5,8%) und im „Kölner Kollektiv“ 9 Patienten (4%) in einem Allel für Isoleucin.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 zusammengestellt.

A**B****C****Abb. 21: LightCycler Analyse Codon 263.**

A: Schmelzpunktanalyse der verschiedenen Allelvarianten.

Probanden, die in beiden Allelen des TGF- β 1 Gens für Threonin kodierten, zeigten in der LightCycler-Kurve einen *Peak* bei 60°C. Der Austausch von Guanin durch Cytosin bewirkte eine Erniedrigung der Schmelztemperatur um 12°C. Probanden, die heterozygot in einem Allel für Threonin, im anderen für Isoleucin kodierten, wiesen in der Schmelzpunktanalyse sowohl einen *Peak* bei 60°C als auch einen bei 48°C auf.

B: Agarosegelelektrophorese.

Die Produkte der LightCycler-PCR wurden auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und im elektrischen Feld aufgetrennt. Unter UV-Licht wurde das 182bp-umfassende PCR-Fragmente sichtbar.

C: Sequenzierung.

Die DNA-Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, die DNA-Proben isoliert und sequenziert. Die dargestellten Sequenzen verifizierten die Ergebnisse der Schmelzpunktanalyse.

Codon 263	Insgesamt	Hep-Net	Köln
	415	190	225
Thr/Thr	395 95,2%	179 94,2%	216 96,0%
Thr/Ile	20 4,8%	11 5,8%	9 4,0%
Ile/Ile	0 0%	0 0%	0 0%

Tabelle 14: Häufigkeitsverteilung Codon 263.

Insgesamt konnte mittels LightCycler Analyse der Genotyp von 415 Patienten erfolgreich bestimmt werden. Dabei stammten 190 Patienten aus dem Hep-Net Kollektiv und 225 Patienten aus dem „Kölner Kollektiv“.

Der Großteil der Patienten insgesamt 395 (95,2%) waren homozygot für Threonin, davon 179 Patienten aus dem Hep-Net und 216 aus dem „Kölner Kollektiv“. Die Heterozygotenhäufigkeit lag zusammengenommen bei nur 4,8% (20), dabei waren 11 Patienten dem Hep-Net und 9 Patienten dem „Kölner Kollektiv“ zuzurechnen. Patienten, die homozygot für Isoleucin kodierten, gab es weder im Hep-Net noch im „Kölner Kollektiv“.

Für den Polymorphismus in Codon 263 wurden die Genotypen in Bezug zu *Grading* und *Staging* gesetzt. Da nur isoliert Hepatitis C infizierte Patienten mit einbezogen wurden, lag die Anzahl der Patienten bei 379. Die Häufigkeitsverteilung änderte sich dabei nicht. Die Homozygotenfrequenz betrug nicht 95,2 sondern 96%. Heterozygote Patienten machten einen Anteil von 4 statt 4,8% aus.

Eine niedrige entzündliche Aktivität zwischen G0 und G2 wiesen 84% der Thr/Thr-Patienten und 76% der Thr/Ile-Patienten auf. Die restlichen 16% der Thr/Thr-Patienten und 24% der Thr/Ile-Patienten waren einem hohen *Grading* zwischen G3 und G4 zuzurechnen. Histologisch gering ausgeprägte Fibrose zwischen S0 und S2 zeigten 69% der Thr/Thr-Patienten und 88% der Thr/Ile-Patienten. Ein hoher Fibrosegrad zwischen S3 und S4 wurde bei 31% der Thr/Thr-Patienten und 12% der Thr/Ile-Patienten festgestellt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 zusammengefasst und die statistische Auswertung folgt in Abschnitt 5.1.6.

Grading				Staging			
	n=378	G0-G2	G3-G4		n=379	S0-S2	S3-S4
Thr/Thr	361	305 84%	56 16%	Thr/Thr	362	251 69%	111 31%
Thr/Ile	17	13 76%	4 24%	Thr/Ile	17	15 88%	2 12%
Ile/Ile	0	0 0%	0 0%	Ile/Ile	0	0 0%	0 0%

Tabelle 15: Verteilung der Genotypen des Polymorphismus in Codon 263 in Bezug auf *Grading* und *Staging*.

Insgesamt waren von den 415 erfolgreich gemessenen Patienten 379 isoliert Hepatitis C infiziert. Unter den 379 Patienten war bei einem Patienten das *Grading* nicht bekannt. Dadurch reduzierte sich die Patientenzahl bezüglich des *Gradings* auf 378.

5.1.6 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Dr. Stanzel aus dem Institut für medizinische Statistik der RWTH-Aachen mit dem Computerprogramm SAS 9.1.

Analysiert wurde die Abhängigkeit der einzelnen Polymorphismen sowie der Einfluss der Polymorphismen auf die entzündliche Aktivität (*Grading*) und den Fibrosegrad (*Staging*).

Zunächst wurde für die beiden Zielparameter *Grading* und *Staging* separat ein multiples logistisches Regressionsmodell mit den folgenden 6 Risikofaktoren durchgeführt: Promotor-polymorphismus an Position –509, Polymorphismus Codon 10, Polymorphismus Codon 25, Polymorphismen Codon 263, Kollektiv und Geschlecht. Es wurde ein Signifikanzniveau von $p=0,05$ festgelegt. Nach Bonferroni-Adjustierung konnte $p \leq 0,025$ als signifikant angesehen werden.

Wie in Tabelle 16 dargestellt, hatte keiner der 6 Faktoren einen statistisch signifikanten Einfluss auf die entzündliche Aktivität. Es bestand allerdings ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus in Codon 10 und dem Fibrosegrad mit $p=0,0183$ sowie dem Geschlecht und dem Fibrosegrad mit $p=0,0030$. Der Tabelle 9 ist zu entnehmen, dass der Anteil der Patienten mit ausgeprägter Fibrose bei den Leu/Leu-Patienten bei 27%, bei den Leu/Pro-Patienten bei 35% und bei den Pro/Pro-Patienten bei 21% lag. Damit zeigten die Heterozygoten prozentual häufiger ein *Staging* zwischen S3 und S4 als die homozygote Patienten.

Grading		Staging	
Variable	p-Wert	Variable	p-Wert
Promotor –509	0,1325	Promotor –509	0,0610
Codon 10	0,0583	Codon 10	0,0183
Codon 25	0,6094	Codon 25	0,2732
Codon 236	0,9754	Codon 236	0,2958
Kollektiv	0,0847	Kollektiv	0,7530
Geschlecht	0,8889	Geschlecht	0,0030

Tabelle 16: Multiple logistische Regression.

Signifikanzniveau nach Bonferroni-Adjustierung $p=0,025$. Signifikante p-Werte fett gedruckt.

In einem zweiten Ansatz wurde überprüft, ob ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Allelfrequenzen einzelner Polymorphismen und den Patientengruppen „milde Fibrose“ (S0-S2) und „schwere Fibrose“ (S3-S4) nachzuweisen war. Die Allelfrequenzen wurden mit Hilfe der De Finetti's Parabola bestimmt. Die Kollektive hatten wie in Tabelle 17 dargestellt keinen Einfluss auf die Allelfrequenzen.

Polymorphismus	insgesamt	Hep-Net	Köln
Promotor (C/T)	0,69/0,31	0,69/0,31	0,70/0,30
Codon 10 (T/C)	0,60/0,40	0,61/0,39	0,60/0,40
Codon 25 (G/C)	0,91/0,09	0,92/0,08	0,90/0,10
Codon 236 (C/T)	0,98/0,02	0,97/0,03	0,98/0,02

Tabelle 17: Allelfrequenzen.

Allelfrequenzen berechnet mit dem Programm WinPop3 nach dem Prinzip der De Finetti's Parabola.

Die Allelfrequenzen wurden getrennt für die Gruppen „milde Fibrose“ und „schwere Fibrose“ berechnet. Die Ergebnisse sind Tabelle 18 zu entnehmen.

	gesamt		Hep-Net		Köln	
	S0-S2	S3-S4	S0-S2	S3-S4	S0-S2	S3-S4
Promotor -509	n=265	n=112	n=110	n=43	n=155	n=69
C/C	129 48,68%	66 58,93%	49 44,54%	25 58,14%	80 51,61%	41 59,42%
C/T	96 36,23%	38 33,93%	46 41,82%	16 37,21%	50 32,26%	22 31,88%
T/T	40 15,09%	8 7,14%	15 13,64%	2 4,65%	25 16,13%	6 8,70%
Allelfrequenzen	<i>C=0,6680</i> <i>T=0,3321</i>	<i>C=0,7590</i> <i>T=0,2411</i>	<i>C=0,6545</i> <i>T=0,3455</i>	<i>C=0,7674</i> <i>T=0,2326</i>	<i>C=0,6774</i> <i>T=0,3226</i>	<i>C=0,7536</i> <i>T=0,2464</i>
Codon 10	n=229	n=97	n=107	n=42	n=122	n=55
Leu/Leu	90 39,30%	34 35,05%	37 34,58%	16 38,10%	53 43,44%	18 32,73%
Leu/Pro	95 41,48%	51 52,58%	54 50,47%	20 47,62%	41 33,61%	31 56,36%
Pro/Pro	44 19,21%	12 12,37%	16 14,95%	6 14,30%	28 22,95%	6 10,91%
Allelfrequenzen	T=0,6004 C=0,3996	T=0,6135 C=0,3866	T=0,5982 C=0,4019	T=0,6191 C=0,3809	T=0,6025 C=0,3976	T=0,6091 C=0,3909
Codon 25	n=230	n=93	n=107	n=42	n=123	n=51
Arg/Arg	194 84,35%	74 79,57%	87 81,31%	34 80,95%	107 86,99%	40 78,43%
Arg/Pro	32 13,91%	16 17,20%	20 18,69%	8 19,05%	12 9,76%	8 15,69%
Pro/Pro	4 1,74%	3 3,23%	0 0,00%	0 0,00%	4 3,25%	3 5,88%
Allelfrequenzen	G=0,9132 C=0,0869	G=0,8817 C=0,1193	G=0,9066 C=0,0934	G=0,9047 C=0,0953	G=0,8862 C=0,1139	G=0,8628 C=0,1373
Codon 263	n=266	n=113	n=110	n=43	n=156	n=70
Thr/Thr	251 94,36%	111 98,23%	102 92,73%	43 100%	149 95,51%	68 97,14%
Thr/Ile	15 5,64%	2 1,77%	8 7,27%	0 0,00%	7 4,49%	2 2,86%
Ile/Ile	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%
Allelfrequenzen	C=0,9718 T=0,0282	C=0,9912 T=0,0089	C=0,9637 T=0,0363	C=1,0000 T=0,0000	C=0,9775 T=0,0225	C=0,9857 T=0,0114

Tabelle 18: Absolute und relative Häufigkeiten der verschiedenen Polymorphismen und deren Allelfrequenzen.

Abgebildet sind die Ergebnisse gesplittet in Gesamt-, Hep-Net und „Kölner Kollektiv“. Gegenübergestellt werden jeweils die Gruppe der Patienten mit hochgradiger Fibrose und die Gruppe der Patienten mit milder Fibrose. Die Allelfrequenzen wurden mit dem Programm WinPop3 berechnet. Die Allelfrequenzen des Promotorpolymorphismus sind fett und kursiv hervorgehoben.

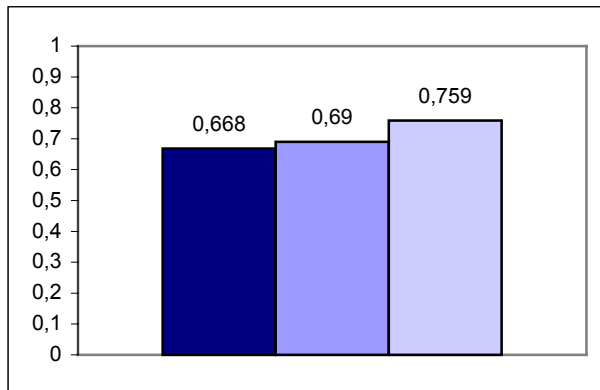
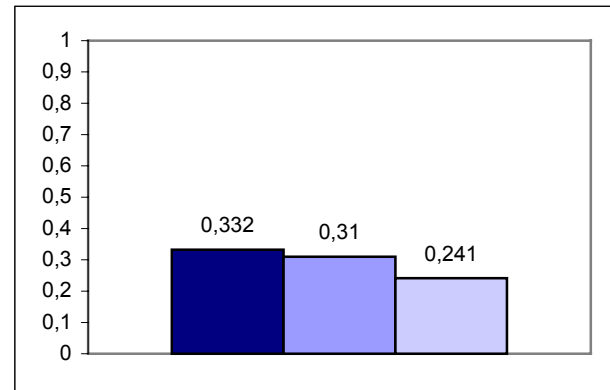
C-Allel**T-Allel**

Abb. 22: Allelfrequenzen des Promotorpolymorphismus.

1. Säule: Gruppe „milde Fibrose“
2. Säule: Gesamtkollektiv
3. Säule: Gruppe „schwere Fibrose“

Insgesamt trat an Position –509 des TGF- β 1-Promotors Cytosin mit einem Anteil von 0,69 und Thymin mit einem Anteil von 0,31 auf. Die Allelfrequenzen der Gruppen „milde Fibrose“ und „schwere Fibrose“ unterschieden sich signifikant. Verglichen mit dem Gesamtkollektiv zeigten Patienten mit schwerer Fibrose signifikant häufiger das C-Allel bzw. seltener das T-Allel.

Die Analyse der Allelfrequenzen des Promotorpolymorphismus ergab, dass sich die Allelverteilung der Gruppe „milde Fibrose“ von der Allelverteilung der Gruppe „schwere Fibrose“ unterschied. Bei Patienten mit milder Fibrose trat das C-Allel mit einer Frequenz von 0,668 und das T-Allel mit einer Frequenz von 0,332 auf. Dagegen hatte das C-Allel bei Patienten mit schwerer Fibrose einen Anteil von 0,759 und das T-Allel einen Anteil von 0,241. Der Unterschied war signifikant mit $p=0,019$. Außerdem zeigten Patienten der Gruppe „schwere Fibrose“ verglichen mit der Allelverteilung des Gesamtkollektivs signifikant häufiger das C-Allel ($p=0,019$) und signifikant seltener das T-Allel ($p=0,019$).

Bei den anderen Polymorphismen waren zwischen den zwei Gruppen keine Abweichungen der Allelfrequenzen in Abhängigkeit vom Fibrosegrad nachzuweisen.

Im nächsten Schritt wurde die Abhängigkeit einzelner Polymorphismen mithilfe des exakten Fischer Tests analysiert. Diese Untersuchung sollte Aufschluss über die vorkommenden Allele des TGF- β 1 Gens geben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 zusammengefasst. Weiterführend wurden die Kombinationen der Polymorphismen ausgezählt. In Tabelle 20 sind die Allelvarianten dargestellt.

Insgesamt ergaben die Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen dem Promotorpolymorphismus und dem Polymorphismus in Codon 10 sowie Codon 263. Außerdem zeigte sich eine Assoziation zwischen den Polymorphismen in Codon 10 und Codon 25.

	Leu10Leu	Leu10Pro	Pro10Pro	Arg25Arg	Arg25Pro	Pro25Pro	Thr/Thr	Thr/Ile
C/C	<0,0001	<0,0001	0,0070	0,1139	0,2194	0,1243	<0,0001	<0,0001
C/T	<0,0001	<0,0001	0,1754	0,4083	0,6291	0,4292	0,0163	0,0163
T/T	<0,0001	0,0070	<0,0001	0,0926	0,4851	0,6027	0,0125	0,0125
Leu10Leu	-	-	-	<0,0001	<0,0001	0,1009	0,0154	0,0154
Leu10Pro	-	-	-	0,2985	<0,0001	0,0468	0,1241	0,1241
Pro10Pro	-	-	-	0,1532	0,0155	<0,0001	0,2933	0,2933
Arg25Arg	-	-	-	-	-	-	0,4148	0,4148
Arg25Pro	-	-	-	-	-	-	0,1472	0,1472
Pro25Pro	-	-	-	-	-	-	0,2760	0,2760
Thr/Thr	-	-	-	-	-	-	-	-
Thr/Ile	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 19: p-Werte des exakten Fisher-Tests zur Untersuchung der Abhängigkeiten zwischen den einzelnen Polymorphismen.

Signifikanzniveau $p=0,05$. Signifikante p-Werte sind kursiv gedruckt.

Wenn ein Proband auf einem Allel im TGF- β 1-Promotor an Position -509 ein Cytosin aufwies, kodierte er in Codon 10 dieses Gens statistisch häufiger für Leucin als für Prolin. Kodierte ein Proband in Codon 25 für Prolin, kodierte er in dieser Studie auch in Codon 10 für Prolin. Die Kombinationen Arg25Pro und Leu10Leu bzw. Pro25Pro und Leu10Pro oder Leu10Leu traten nicht auf.

-509	n	Codon 10	n	Codon 25	n	Codon 263	n
C/C	181	Leu10Leu	128	Arg25Arg	128	Thr263Thr	128
						Thr263Ile	-
						Ile263Ile	-
				Arg25Pro	-	Thr263Thr	-
						Thr263Ile	-
						Ile263Ile	-
				Pro25Pro	-	Thr263Thr	-
						Thr263Ile	-
						Ile263Ile	-
		Leu10Pro	44	Arg25Arg	17	Thr263Thr	16
						Thr263Ile	1
						Ile263Ile	-
				Arg25Pro	27	Thr263Thr	27
						Thr263Ile	-
						Ile263Ile	-
				Pro25Pro	-	Thr263Thr	-
						Thr263Ile	-
						Ile263Ile	-
		Pro10Pro	10	Arg25Arg	1	Thr263Thr	1
						Thr263Ile	-
						Ile263Ile	-
Arg25Pro	3			Thr263Thr	3		
				Thr263Ile	-		
				Ile263Ile	-		
Pro25Pro	6			Thr263Thr	6		
				Thr263Ile	-		
				Ile263Ile	-		

C/T	131	Leu10Leu	6	Arg25Arg	6	Thr263Thr	5
						Thr263Ile	1
						Ile263Ile	-
				Arg25Pro	-	Thr263Thr	-
						Thr263Ile	-
						Ile263Ile	-
		Leu10Pro	109	Pro25Pro	-	Thr263Thr	-
						Thr263Ile	-
						Ile263Ile	-
				Arg25Arg	102	Thr263Thr	94
						Thr263Ile	8
						Ile263Ile	-
				Arg25Pro	7	Thr263Thr	7
						Thr263Ile	-
						Ile263Ile	-
		Pro10Pro	15	Pro25Pro	-	Thr263Thr	-
						Thr263Ile	-
						Ile263Ile	-
				Arg25Arg	6	Thr263Thr	5
						Thr263Ile	1
						Ile263Ile	-
				Arg25Pro	8	Thr263Thr	8
						Thr263Ile	-
						Ile263Ile	-
				Pro25Pro	1	Thr263Thr	-
						Thr263Ile	1
						Ile263Ile	-

T/T	47	Leu10Leu	3	Arg25Arg	3	Thr263Thr	3
						Thr263Ile	-
						Ile263Ile	-
				Arg25Pro	-	Thr263Thr	-
						Thr263Ile	-
						Ile263Ile	-
		Leu10Pro	10	Pro25Pro	-	Thr263Thr	-
						Thr263Ile	-
						Ile263Ile	-
				Arg25Arg	8	Thr263Thr	5
						Thr263Ile	3
						Ile263Ile	-
				Arg25Pro	2	Thr263Thr	2
						Thr263Ile	-
						Ile263Ile	-
		Pro10Pro	34	Pro25Pro	-	Thr263Thr	-
						Thr263Ile	-
						Ile263Ile	-
				Arg25Arg	32	Thr263Thr	29
						Thr263Ile	3
						Ile263Ile	-
				Arg25Pro	2	Thr263Thr	2
						Thr263Ile	-
						Ile263Ile	-
				Pro25Pro	-	Thr263Thr	-
						Thr263Ile	-
						Ile263Ile	-

Tabelle 20: Allelvarianten.

5.2 Humanes TGF- β 1: Vektorkonstruktion und Expression

5.2.1 Molekularbiologische Experimente: Allgemeines

Zu Beginn der *in vitro* Experimente mussten geeignete TGF- β 1 Expressionsvektoren kloniert werden. Das humane TGF- β 1 (hTGF- β 1) sollte durch die Sequenz des Vektors mit einem Molekül gekoppelt werden, welches mit spezifischen Methoden detektiert werden kann. Diese Anordnung ermöglichte den selektiven Nachweis des rekombinanten Zytokins unabhängig von endogen synthetisiertem oder im Medium enthaltenem TGF- β 1.

Kriterien für die Wahl eines geeigneten Fusionsmoleküls waren das Vorhandensein möglichst guter Nachweisverfahren. Ein selektiver Antikörper für Western Blot Analysen sollte erhältlich und Möglichkeiten für fluoreszenzmikroskopische Darstellungen oder die Detektion mittels ELISA sollten gegeben sein. Zusätzlich sollte das getaggte Oligopeptid, Polypeptid oder Protein räumliche Struktur und Kinetik des Zytokins möglichst wenig beeinflussen.

Zur Expression des hTGF- β 1 wurden zwei Vektorsysteme ausgewählt. Zum einen der pEGFP-N1 Vektor der Clontech Laboratories und der pCMV-Tag4A Vektor der Firma Stratagene.

Der pEGFP-N1 Vektor enthält eine Nukleinsäuresequenz, die für das *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) eine optimierte Variante des *green fluorescent protein* (GFP) mit 5-10-fach stärkerer Expression kodiert. Dieses Protein fluoresziert unter UV-Licht grün und hat ein Excitationsmaximum bei 488nm und ein Emissionsmaximum bei 507nm.

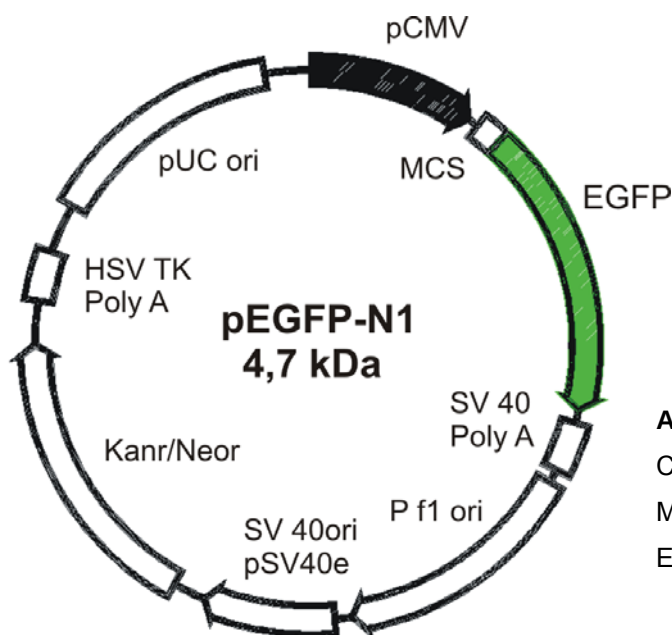


Abb. 23: pEGFP-N1 Vektor.

CMV-Promotor: Nukleotid-Position 1-589

MCS: Nukleotid-Position 591-671

EGFP Gen: Nukleotid-Position 672-1408

EGFP kann fluoreszenz- und konfokalmikroskopisch nachgewiesen werden und erlaubt die Analyse der intrazellulären Lokalisation eines damit fusionierten Proteins. Ein spezifischer Antikörper gegen das 30 kDa große Protein ist bei der Firma Santa Cruz erhältlich.

Die Genkassette steht unter der Kontrolle des *immediate early-Promotor* des Cytomegalievirus (CMV). Die Multiklonierungssequenz (MCS) befindet sich zwischen dem CMV-Promotor und der für EGFP-kodierenden Sequenz.

hTGF- β 1 wurde in diesem Vektor bei Einhaltung des Leserasters mit dem N-Terminus des EGFP fusioniert. Obwohl EGFP mit 30 kDa ein relevantes Molekulargewicht aufweist, eignete es sich durch die optische Nachweisbarkeit gut zur Verfolgung des Proteinsynthesewegs.

In dem pCMV-Tag4A Vektorsystem wurde hTGF- β 1 C-terminal mit dem Flag-Oktapeptid fusioniert. Flag hat die Aminosäuresequenz DYKDDDDK, ist sehr klein und beeinflusst normalerweise nicht die Funktion des gekoppelten Proteins. Ein spezifischer Antikörper kann bei der Firma Sigma bestellt werden, zusätzlich kann dort auch eine mit diesem Antikörper beschichtete 96-Well Platte zur Etablierung eines ELISAs erworben werden. Die Genkassette steht wie bei dem pEGFP-N1 Vektor unter der Kontrolle des CMV-Promotors.

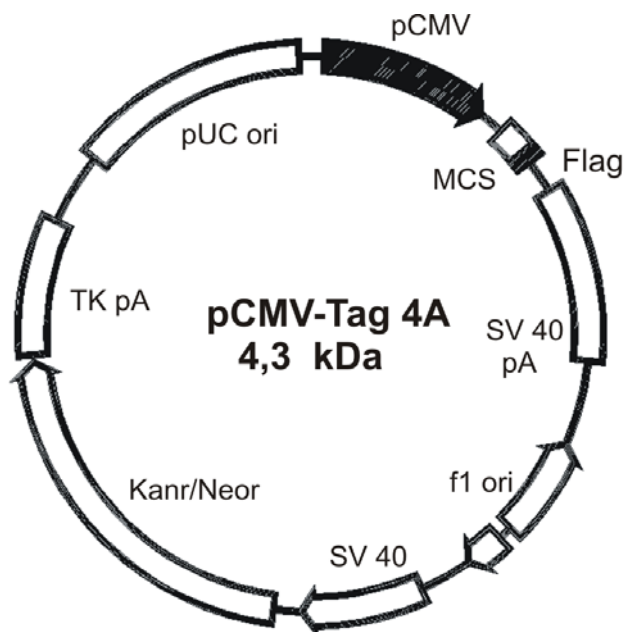


Abb. 24: pCMV-Tag 4A Vektor.

CMV-Promotor: Nukleotid-Position 1-602

MCS: Nukleotid-Position 651-743

Flag-Tag: Nukleotid-Position 744-767

T3-Primer Bindungsstelle:

Nukleotid-Position 620-639

T7-Primer Bindungsstelle:

Nukleotid-Position 819-840

Für die Expression der hTGF- β 1 Konstrukte in Zellkulturexperimenten wurden *Chinese hamster ovary cells* (CHO Zellen) und LX-2 Zellen, die immortalisierten humanen Hepatischen Sternzellen entsprechen, eingesetzt.

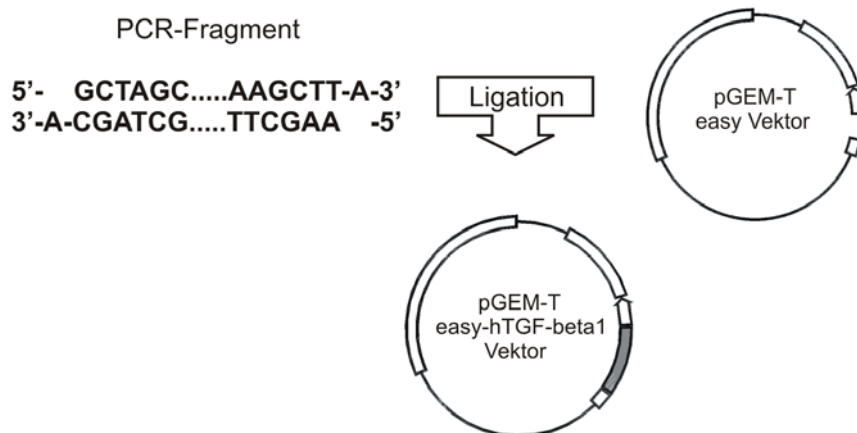
5.2.2 hTGF- β 1-EGFP

Um die Expression des rekombinanten humanen TGF- β 1 in der Fluoreszenzmikroskopie verfolgen und den Syntheseweg in der konfokalen Mikroskopie räumlich darstellen zu können, wurde ein Expressionsplasmid kloniert, der das hTGF- β 1 Gen mit der für das *enhanced green fluorescent protein* kodierenden Nukleinsäuresequenz fusionierte.

5.2.2.1 Vektorsynthese

Im ersten Schritt wurde eine PCR auf dem Klon p Δ E1sp1A-CMV-*full-length* TGF- β 1 durchgeführt. Verwendet wurde der For-Primer SIM001 mit der Sequenz 5'-d(GCTAGC CCTGTTCGCGCTCTCGGC)-3' und der Rev-Primer SIM002 mit der Sequenz 5'-d(AAGCTT GCAGGAGCGCACGATCATG)-3'. Durch diese PCR entstand am 5'-Ende des Fragmentes eine Schnittstelle für *NheI* und am 3'-Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *HindIII*. Das hTGF- β 1 Genfragment umfasste 46 Nukleinsäuren des 5'-untranslatierten Bereiches, das Start-Codon AUG und das hTGF- β 1 Gen bis zum 388. Codon. Bei diesem Ansatz gingen neben dem Stop-Codon zwei C-terminale Aminosäuren (CS) verloren.

A



B

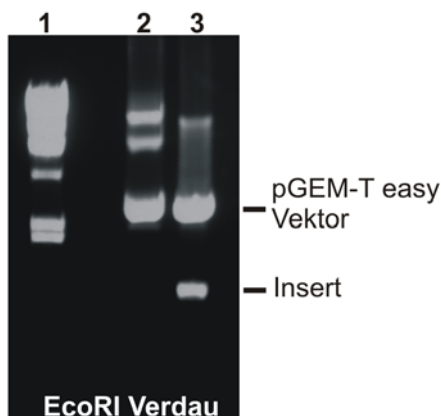


Abb. 25: Synthese des pGEM-T easy-hTGF- β 1 Vektors.

A: Das hTGF- β 1 PCR-Fragment wurde mit dem linearen pGEM-Teasy Vektor ligiert. Daraus entstand der pGEM-Teasy-hTGF- β 1 Vektor.

B: Auf ein 0,8%iges Agarosegel wurde der pGEM-Teasy-hTGF- β 1 Vektor unverdaut (Spur 2) und mit *EcoRI* geschnitten (Spur 3) aufgetragen. In Spur 1 wurde der λ -*HindIII* Marker auf das Gel geladen. Die 3319bp Bande in Spur 2 entspricht dem unverdauten pGEM-Teasy-hTGF- β 1 Vektor. In Spur 3 zeigt sich die Bande des verdauten Vektors bei etwa 3000bp und die 319bp-Bande des Inserts.

Das PCR-Produkt wurde auf ein 1,5%iges Agarosegel geladen und mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Unter UV-Licht wurde das 300bp-Fragment ausgeschnitten, eluiert und die DNA durch EtOH aufgereinigt. Jedes PCR-Fragment trägt nach der Amplifizierung am 3'-Ende die Nukleinsäure Adenin. Der lineare pGEM-Teasy Vektor weist am 5'-Ende ein Thymin auf. Durch diese Konstellation konnte das PCR-Fragment direkt mit dem linearen pGEM-Teasy Vektor ligiert werden. Das neu synthetisierte zirkuläre Plasmid wurde mittels Plasmid-Minipräparation amplifiziert. Verwendet wurden Bakterien des *E. coli* Stamms JM105, die auf Ampicillin-haltigen Selektionsplatten kultiviert wurden. Die aufgereinigte DNA wurde nach der Minipräparation mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut, auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Auf diese Weise konnte schnell überprüft werden, ob das Fragment richtig in die Klon integriert worden war. Der pGEM-Teasy Vektor weist zwei *EcoRI* Schnittstellen, eine N-terminal und die andere C-terminal von der Multiklonierungssequenz, auf. Nach Verdau und anschließender Elektrophorese der Vektor-DNA zeigten sich im UV-Licht zwei Banden eine Plasmid-Bande bei ca. 3000bp und die Bande des ausgeschnittenen Inserts bei 319bp. Bei Verdau des pGEM-Teasy Vektors ohne Insert zeigte sich nur die Plasmid-Bande. Bevor die DNA für weitere Versuche verwendet wurde, mussten Punktmutationen, die zum Aminosäureaustausch führen würden, ausgeschlossen werden. Sequenziert wurde mit den Primern Mut4, SIM001, SIM002, TGF1 und TGF4. Nach der Sequenzierung wurden Klone mit richtig eingebautem Fragment und fehlerfreier Aminosäuresequenz durch Plasmid-Großpräparation vervielfältigt. Die durch Großpräparation gewonnene DNA war rein und hoch konzentriert. Sie wurde für die weiteren Versuche eingesetzt.

Im nächsten Schritt wurden der pGEM-Teasy-hTGF- β 1 Vektor und der pEGFP-N1 Vektor mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *HindIII* geschnitten. Die verdaute DNA wurde auf ein 0,8%iges Agarosegel geladen und im elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt. Die diskreten Banden konnten unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit dem Skalpell ausgeschnitten werden. Das 300bp große hTGF- β 1 Fragment und der ca. 4700bp große lineare pEGFP-N1 Vektor wurden aus dem Agarosegel eluiert und die DNA durch EtOH-Fällung aufgereinigt. Es folgte die Ligation von Insert und linearisiertem Vektor. Kompetente XL2-blue Bakterien wurden mit der Plasmid-DNA transformiert und auf Kanamycin-haltigen Selektionsplatten ausplattiert. Das Plasmid wurde mittels Plasmid-Minipräparation amplifiziert und die aufgereinigte Plasmid-DNA mit den Primern MA001 und MB001 sequenziert. Auf diese Weise wurden die Plasmid-Insert-Übergänge überprüft. Es musste gesichert werden, dass Plasmid und Insert in richtiger Orientierung ligiert worden waren und das Leseraster erhalten geblieben war. Die pCMV-hTGF- β 1-EGFP Klone, die keinen Fehler aufwiesen, wurden mittels Plasmid-Großpräparation vervielfältigt und die gewonnene DNA in den folgenden Zellkulturexperimenten eingesetzt.

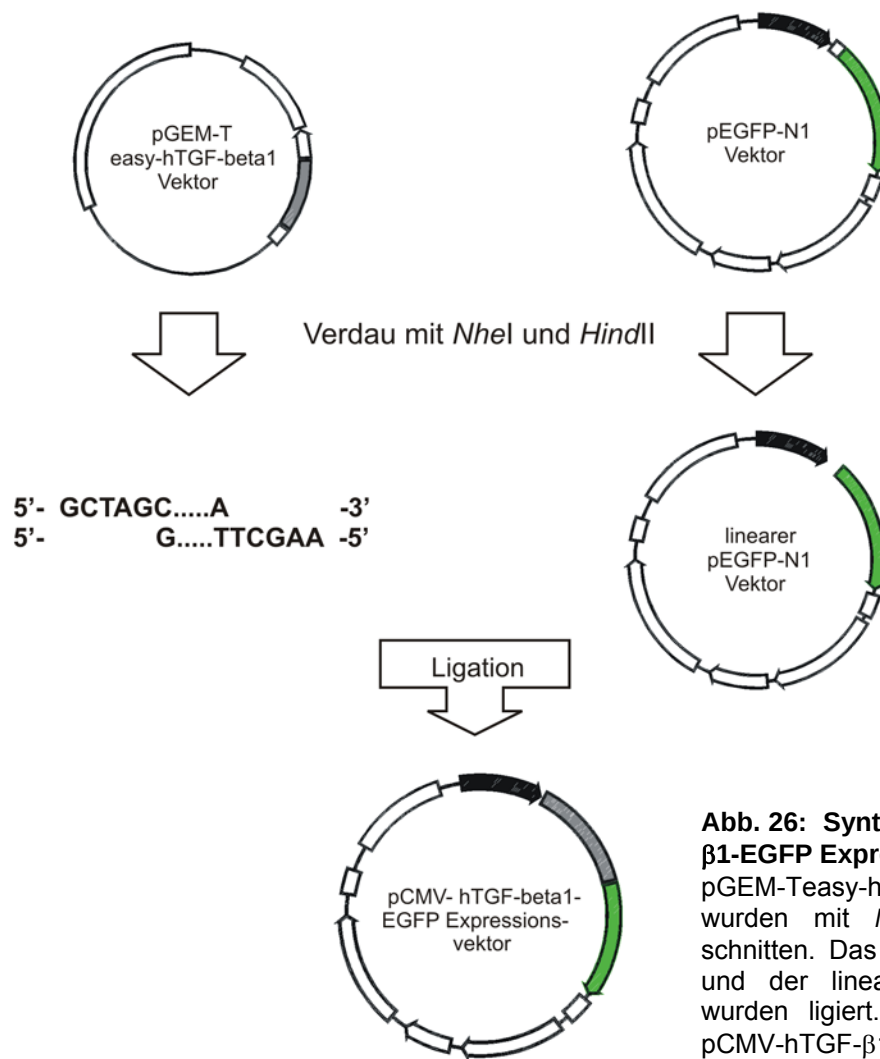


Abb. 26: Synthese des pCMV-hTGF-β1-EGFP Expressionsvektors.

pGEM-Teasy-hTGF-β1 und pEGFP-N1 wurden mit *NheI* und *HindIII* geschnitten. Das hTGF-β1 Genfragment und der lineare pEGFP-N1 Vektor wurden ligiert. Daraus entstand der pCMV-hTGF-β1-EGFP Expressionsvektor

5.2.2.2 hTGF-β1-EGFP Konstrukt in CHO Zellen

Nach Gewinnung größerer Mengen reiner Plasmid-DNA durch Großpräparation wurde die Funktion des pCMV-hTGF-β1-EGFP Expressionsvektors in Zellkulturexperimenten überprüft. Dann wurden CHO Zellen mit 2µg Plasmid-DNA transfiziert. Ein Mediumwechsel mit Herabsetzen der FKS-Konzentration auf 0,2% erfolgte nach 24 Stunden. Weitere 48 Stunden später wurde der Überstand abgezogen und die Zellen wurden geerntet.

Die Expression des hTGF-β1-EGFP-Fusionsproteins konnte unter dem Mikroskop durch das bei UV-Licht grün fluoreszierende EGFP überprüft werden. Mit pEGFP-N1 transfizierte CHO Zellen dienten als Positivkontrolle. Unter UV-Licht fluoreszierten Zellen die EGFP exprimierten grün. Auf diese Weise konnte auch die Transfektionseffizienz abgeschätzt werden, die weder in dem in Abb. 27 gezeigten Experiment noch in den darauf folgenden hoch war. Nicht transfizierte Zellen zeigten keine Fluoreszenz. Die mit dem hTGF-β1-EGFP Expressionskonstrukt transfizierten Zellen unterschieden sich mikroskopisch nicht von der Negativkontrolle. Fluoreszenz konnte nicht nachgewiesen werden.

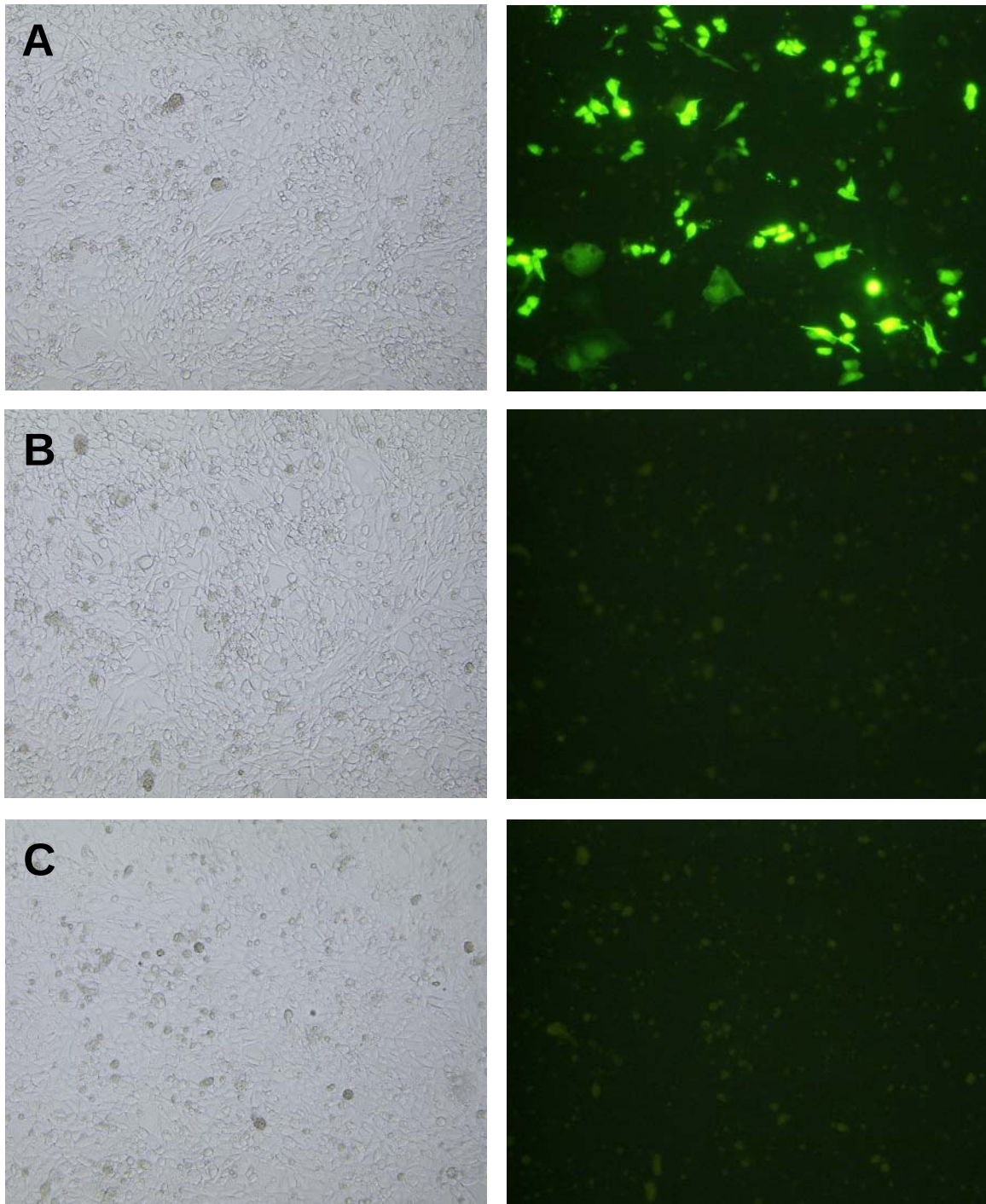


Abb. 27: Mikroskopische Bilder von CHO Zellen am 3. Tag nach Transfektion.

A-C: lichtmikroskopisches Bild links, fluoreszenzmikroskopisches Bild rechts.

A: Mit 2µg pEGFP-N1 Vektor transfizierte Zellen. Erfolgreich transfigierte Zellen fluoreszieren unter UV-Licht grün.

B: Die Bilder zeigen nicht transfigierte Zellen. Unter UV-Licht ist keine Fluoreszenz nachweisbar.

C: Zellen transfigiert mit 2µg pCMV-hTGF-β1-EGFP. In der Fluoreszenzmikroskopie sind keine hTGF-β1-EGFP synthetisierenden Zellen zu erkennen.

Für die Western Blot Analysen wurden die Überstände der Zellen abgezogen und die Proteine durch TCA-Fällung aufkonzentriert. Die CHO Zellen wurden mit Ripa + Complete lysiert und von den Platten gelöst.

Die Western Blots wurden wie in Kapitel 4.3 beschrieben durchgeführt. Als Marker diente der Seebblue Marker der Firma Invitrogen. Es wurden 15µg Zelllysate bzw. 30µl Überstand auf das 8-12%ige 1mm dicke Bis-Tris-Gel aufgetragen. Als Primärantikörper wurde der polyklonale *rabbit* anti-GFP Antikörper 1:1000 verdünnt eingesetzt. Dadurch konnte selektiv das rekombinante hTGF-β1-EGFP nachgewiesen werden. Positivkontrollen und Proben wurden im Doppelansatz nicht reduziert und durch 5µl DTT reduziert aufgetragen.

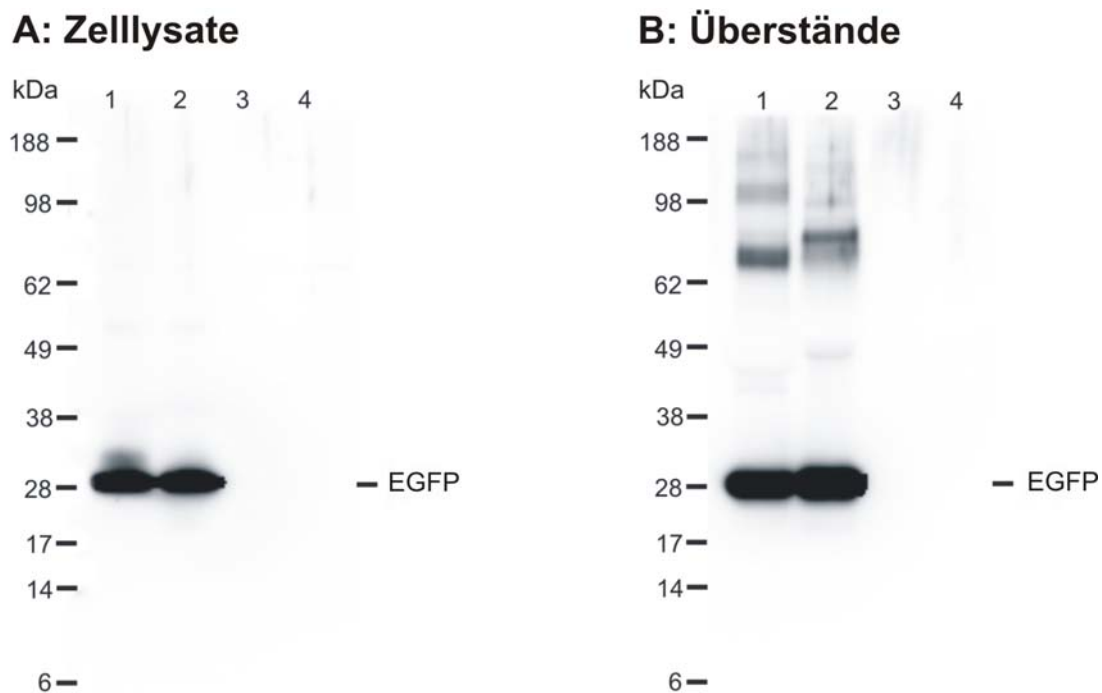


Abb. 28: 8-12%iges Bis-Tris-Gel, anti-GFP Antikörper.

A: Western Blot der Zelllysate, aufgetragen wurden 15µg Protein.

Spur 1 und 2 zeigen das Zelllysate von mit pEGFP-N1 transfizierten Zellen, einmal nicht reduziert (Spur 1) und einmal reduziert (Spur 2). Mit dem *rabbit* anti-GFP Antikörper ließ sich das etwa 30 kDa schwere EGFP nachweisen. In den Spuren 3 und 4 wurden je 15µg der Probe von mit pCMV-hTGF-β1-EGFP transfizierten Zellen auf das Gel geladen. Weder in der Spur 3 der nicht reduzierten Probe noch in der Spur 4 der reduzierten Probe ist eine Proteinbande zu erkennen.

B: Western Blot der Überstände, aufgetragen wurden 30µl des durch TCA-Fällung aufgereinigten Überstandes.

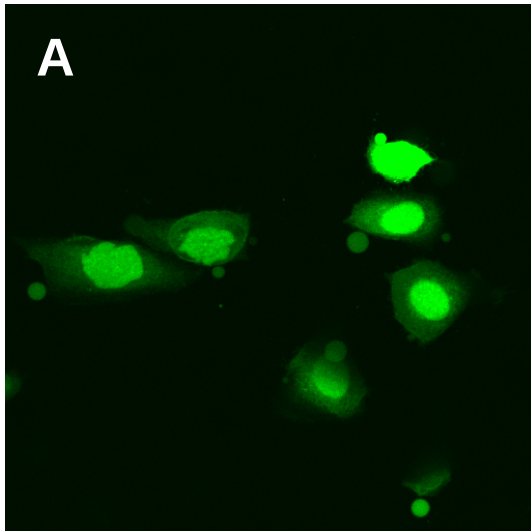
Spur 1 und 2 zeigen den Überstand von mit pEGFP-N1 transfizierten Zellen, einmal nicht reduziert (Spur 1) und einmal mit 5µl DTT reduziert (Spur 2). Die EGFP-Bande liegt bei 30 kDa. In den Spuren 3 und 4 wurden 30µl der Proben von mit pCMV-hTGF-β1-EGFP transfizierten Zellen auf das Gel geladen. Weder in der nicht reduzierten Probe (Spur 3) noch in der reduzierten Probe (Spur 4) ist ein spezifisches Protein nachweisbar.

Im Western Blot konnte in der Positivkontrolle sowohl im Zelllysate als auch im Überstand das etwa 30 kDa große EGFP nachgewiesen werden. EGFP lag als Monomer ohne Disulfidbrückenbindung vor, deshalb änderte sich das Molekulargewicht unter reduzierenden Bedingungen nicht. Das rekombinante hTGF-β1-EGFP-Fusionsprotein konnte auch bei

maximal aufgetragener Proteinmenge weder im Zelllysat noch im Überstand detektiert werden.

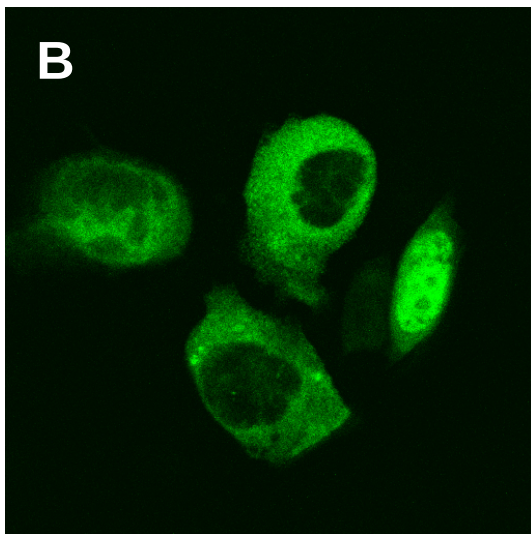
Zur weiteren Analyse wurden konfokalmikroskopische Bilder der transfizierten CHO Zellen nach dem in Kapitel 4.3 beschriebenen Protokoll angefertigt. Bei der konfokalen Mikroskopie konnte eine bessere Auflösung erreicht und eine Aussage über die intrazelluläre Lokalisation der Proteine gemacht werden.

Das grün fluoreszierende EGFP wurde von den mit pEGFP-N1 transfizierten CHO Zellen der Positivkontrolle synthetisiert und reicherte sich überwiegend im Zellkern an, der homogen grün leuchtete. Im Gegensatz dazu fluoreszierten die Zellkerne der mit pCMV-hTGF- β 1-EGFP transfizierten Zellen inhomogen. Das exprimierte Fusionsprotein konzentrierte sich hauptsächlich im Zytosol der Zellen. Mit dem 63er Objektiv des Laserrastermikroskops ergab sich eine hohe räumliche Auflösung. Das rekombinante Protein sammelte sich im Zytosol der Zellen in dichten Vesikeln. Trotz fehlendem Nachweis von Expression und Sekretion des hTGF- β 1-EGFP-Fusionsprotein in Western Blot und Fluoreszenzmikroskopie ließ sich das rekombinante Protein konfokalmikroskopisch detektieren.



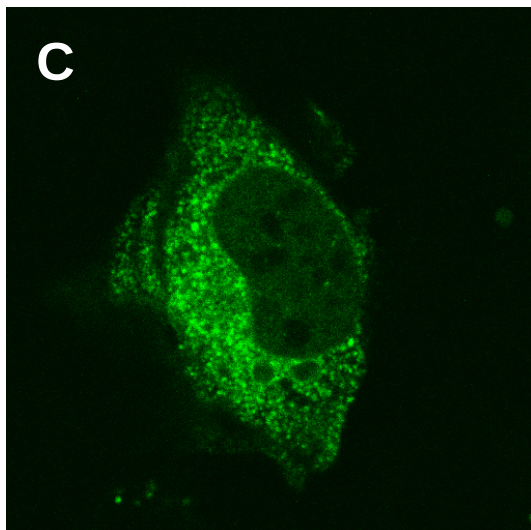
A: Aufnahme mit dem 20er Objektiv.

Die Zellen wurden im Chamber slide™ System kultiviert und mit 2µg pEGFP-N1 Expressionsvektor transfiziert. Das grün fluoreszierende EGFP färbte den Kern homogen. Das Zytoplasma zeigte nur eine geringe Fluoreszenz.



B: Aufnahme mit dem 20er Objektiv.

Die Zellen wurden im Chamber slide™ System kultiviert und mit 2µg pCMV-hTGF-β1-EGFP Expressionsvektor transfiziert. Fluoreszenz zeigte sich hauptsächlich im Zytoplasma der CHO Zellen. Der Kern leuchtete nur inhomogen.



C: Aufnahme mit dem 63er Objektiv.

Die Zellen wurden im Chamber slide™ System kultiviert und mit 2µg pCMV-hTGF-β1-EGFP Expressionsvektor transfiziert. Das grün fluoreszierende hTGF-β1-EGFP sammelte sich im Zytoplasma in dichten Vesikeln. Der Kern leuchtete inhomogen.

Abb. 29: Konfokalmikroskopische Bilder transfizierter CHO Zellen aufgenommen mit einem Laserrastermikroskop.

5.2.2.3 hTGF- β 1-EGFP Konstrukt in LX-2 Zellen

Die Plasmid-DNA des hTGF- β 1-EGFP Konstruktes wurde zusätzlich zu den CHO Zellen in LX-2 Zellen eingebracht.

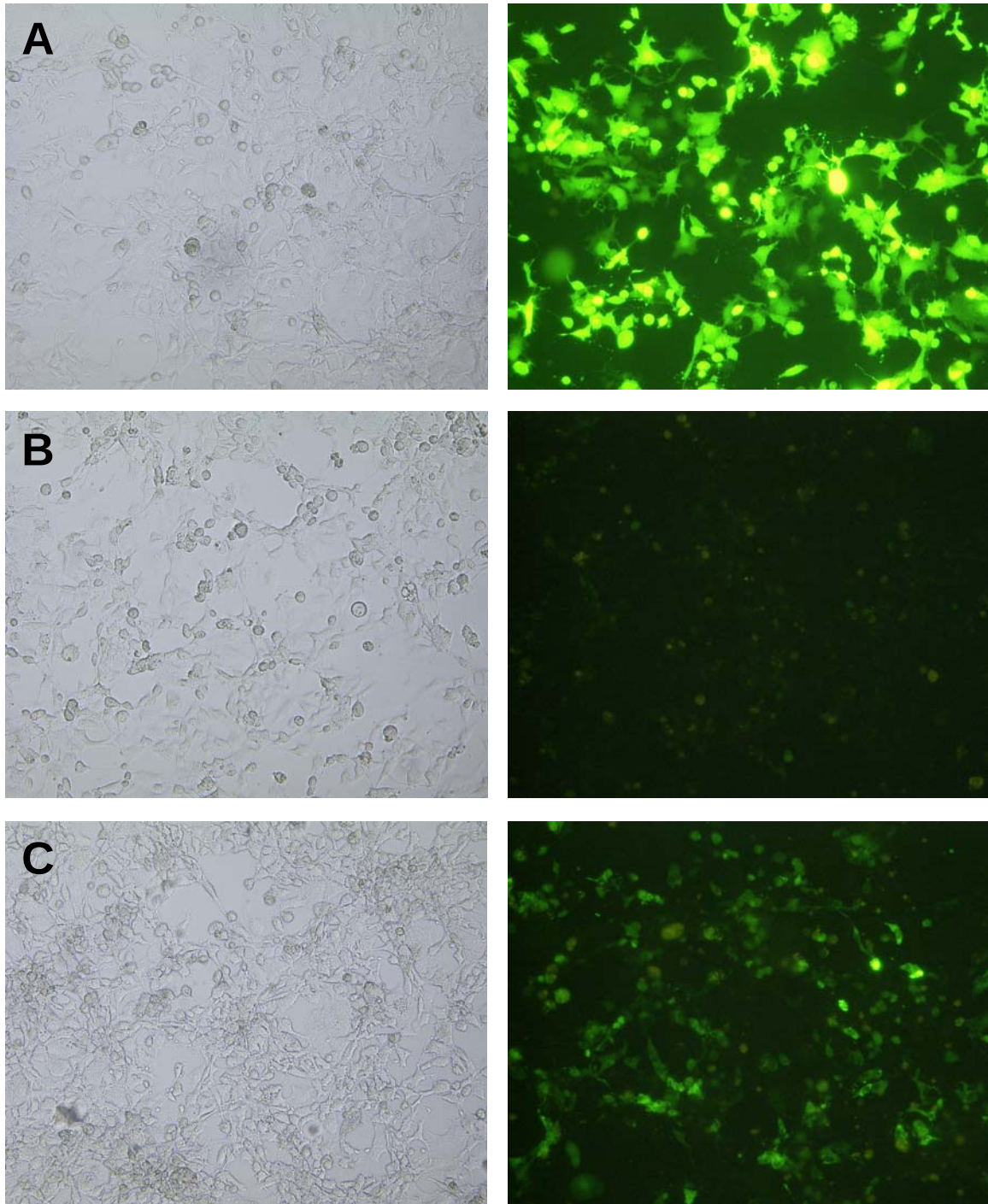


Abb. 30: Mikroskopische Bilder von LX-2 Zellen am 3. Tag nach Transfektion.

A-C: lichtmikroskopisches Bild links, fluoreszenzmikroskopisches Bild rechts.

A: Mit 2 μ g pEGFP-N1 Vektor transfizierte Zellen, erfolgreich transfizierte Zellen fluoreszieren unter UV-Licht grün.

B: Die Bilder zeigen nicht transfizierte Zellen. Unter UV-Licht ist keine Fluoreszenz nachweisbar.

C: Zellen transfiziert mit 2 μ g pCMV-hTGF- β 1-EGFP. Die Zellen, die das rekombinante Fusionsprotein synthetisieren, leuchten grün.

Auch bei den Experimenten mit der LX-2 Zelllinie wurde am 3. Tag nach Transfektion das Medium abgezogen, die Zellen wurden 2x mit 1x PBS gewaschen und danach die mikroskopischen Bilder angefertigt.

Für die Western Blot Analysen wurden die Proteine der Überstände mittels TCA-Fällung höher konzentriert. Dadurch konnte eine größere Menge an Proteinen auf das Gel geladen werden. Jeweils 15µg Zelllysate wurden mit SDS-Geladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Von den Überständen wurden 30µl eingesetzt.

Die Proben wurden in zwei Spuren einmal nicht reduziert und einmal durch 5µl DTT reduziert aufgetragen. Im Gegensatz zu den mit hTGF-β1-EGFP transfizierten CHO Zellen konnte bei den Experimenten mit der LX-2 Zelllinie das rekombinante Fusionsprotein nachgewiesen werden. Die reduzierte Probe des Zelllysates zeigte eine Bande bei etwa 64-72 kDa, die dem monomeren Pro-hTGF-β1-EGFP entsprach. Pro-hTGF-β1-EGFP ist ein Pro-Protein bestehend aus LAP und hTGF-β1 gekoppelt mit EGFP. Nicht reduziert lag dieses Protein als dimeres Makromolekül vor, welches ein höheres Molekulargewicht aufwies.

Die dem Pro-hTGF-β1-EGFP entsprechende Bande zeigte sich auch im Western Blot des Überstandes. Zusätzlich bildete sich eine Bande bei etwa 42-44 kDa. Diese Bande bestand aus dem immobilisiertem, mit EGFP gekoppelten monomeren hTGF-β1 (12-14 kDa). Das auch bei der Spaltung des Pro-hTGF-β1-EGFP frei werdende N-terminale LAP konnte mit dem Antikörper gegen das an den C-Terminus gebundene EGFP nicht detektiert werden. Eine weitere schwache Bande, die isoliertem EGFP entsprach, war in dieser Probe ebenfalls zu erkennen. Bei intakten Disulfidbrücken der nicht reduzierten Probe zeigte sich eine höhermolekulare Banden zusammen mit unspezifischen Banden und einer schwachen EGFP-Bande.

Im Western Blot konnte in der Positivkontrolle sowohl des Zelllysates als auch des Überstandes das etwa 30 kDa große EGFP nachgewiesen werden. Die Negativkontrolle war in beiden Fällen leer.

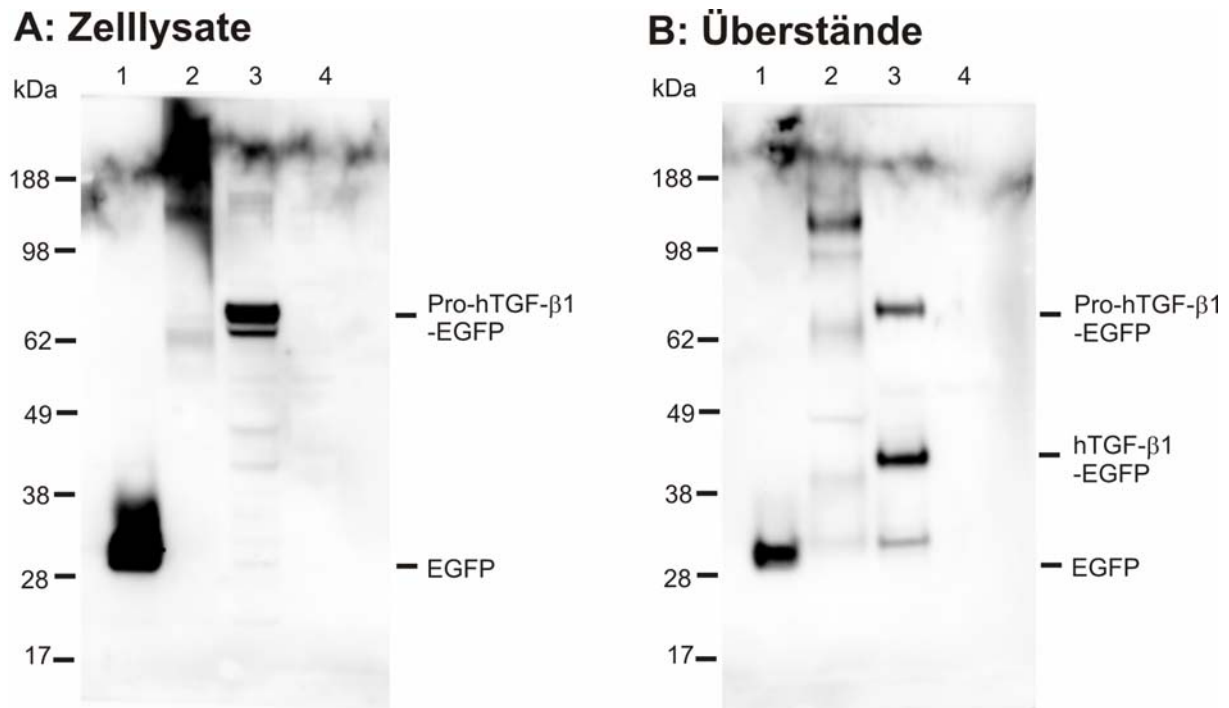


Abb. 31: 8-12%iges Bis-Tris-Gel, anti-GFP Antikörper.

A: Western Blot der Zelllysate, aufgetragen wurden 15 μg Protein.

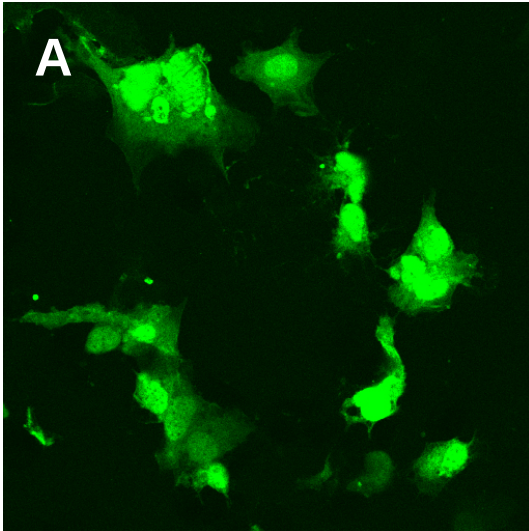
Spur 1 zeigt das Zelllysate von mit pEGFP-N1 transfizierten Zellen. Mit dem *rabbit* anti-GFP Antikörper ließ sich das etwa 30 kDa schwere EGFP nachweisen. In den Spuren 2 und 3 wurden je 15 μg der Probe von mit pCMV-hTGF-β1-EGFP transfizierten Zellen auf das Gel geladen, einmal nicht reduziert (Spur 2) und einmal mit 5 μl DTT reduziert (Spur 3). In Spur 3 ist bei einem Molekulargewicht von etwa 64-72 kDa die Bande des mit EGFP fusionierten monomeren Pro-hTGF-β1 zu erkennen. In Spur 2 liegt die Bande des dimeren Pro-hTGF-β1-EGFP bei über 98 kDa. In Spur 4, der Negativkontrolle, zeigt sich keine Proteinbande.

B: Western Blot der Überstände, aufgetragen wurden 30 μl des durch TCA-Fällung aufgereinigten Überstandes.

Spur 1 zeigt den Überstand von mit pEGFP-N1 transfizierten Zellen. Die EGFP-Bande liegt bei etwa 30 kDa. In den Spuren 2 und 3 wurden 30 μl der Proben von mit pCMV-hTGF-β1-EGFP transfizierten Zellen auf das Gel geladen. In der reduzierten Probe (Spur 3) kann ebenfalls eine Bande bei 64-72 kDa, die der Bande des Pro-hTGF-β1-EGFP-Fusionsprotein des Zelllysates entspricht, detektiert werden. Eine weitere Bande liegt bei etwa 42-44 kDa. Diese Bande repräsentiert das monomere hTGF-β1-EGFP. Die Banden in Spur 2 entsprechen den dimeren Proteinen. Zusätzlich ist die 30 kDa EGFP-Bande schwach zu erkennen. Die Negativkontrolle (Spur 4) enthält kein nachweisbares Protein.

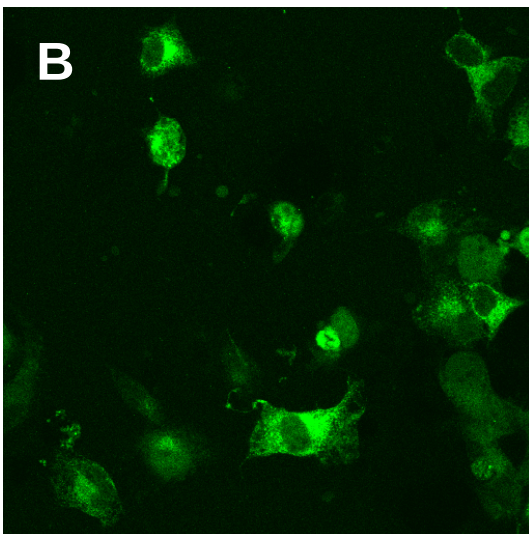
Zur weiteren Analyse wurden wie bei den CHO Zellen konfokal mikroskopische Aufnahmen der transfizierten LX-2 Zellen angefertigt.

In der Positivkontrolle konzentrierte sich das fluoreszierende EGFP, wie bei den Aufnahmen von mit pEGFP-N1 transfizierten CHO Zellen, im Zellkern, der sich homogen grün darstellte. Mit dem 20er Objektiv des Laserrastermikroskops konnte ein Unterschied in der intrazellulären Lokalisation des EGFP und hTGF-β1-EGFP nachgewiesen werden. Das Fusionsprotein zeigte die höchste Konzentration im Zytosol der LX-2 Zellen. Der Zellkern fluoreszierte nur geringfügig und inhomogen. Mit dem 63er Objektiv war eine gute räumliche Darstellung der Proteinlokalisation möglich. Das rekombinante hTGF-β1-EGFP sammelte sich in dichten Vesikeln im Zytosol der Zellen. Expression und Sekretion konnten auf diese Weise sichtbar gemacht werden.



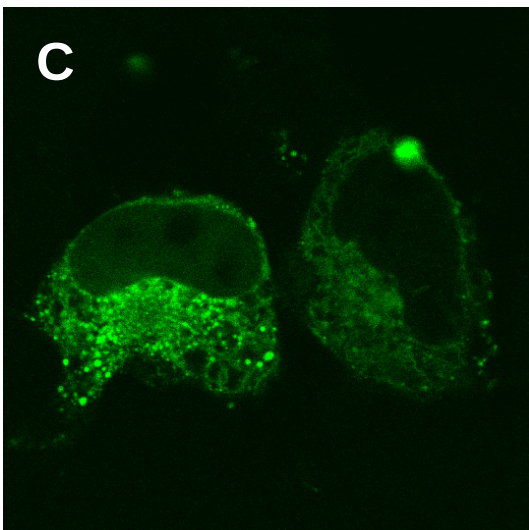
A: Aufnahme mit dem 20er Objektiv.

Die Zellen wurden im Chamber slide™ System kultiviert und mit 2µg pEGFP-N1-Expressionsvektor transfiziert. Das grün fluoreszierende EGFP färbte den Kern homogen. Das Zytoplasma fluoreszierte demgegenüber nur gering.



B: Aufnahme mit dem 20er Objektiv.

Die Zellen wurden im Chamber slide™ System kultiviert und mit 2µg pCMV-hTGF-β1-EGFP Expressionsvektor transfiziert. Fluoreszenz zeigte sich hauptsächlich im Zytoplasma der LX-2 Zellen. Der Kern leuchtete nur schwach und inhomogen.



C: Aufnahme mit dem 63er Objektiv.

Die Zellen wurden im Chamber slide™ System kultiviert und mit 2µg pCMV-hTGF-β1-EGFP Expressionsvektor transfiziert. Das grün fluoreszierende rekombinante Fusionsprotein konzentrierte sich in dichten Vesikeln im Zytoplasma der Zellen. Der Zellkern zeigte wenig Fluoreszenz.

Abb. 32: Konfokalmikroskopische Bilder transfizierter LX-2 Zellen aufgenommen mit einem Laserrastermikroskop.

5.2.3 hTGF- β 1-Flag

In dem zweiten Expressionsvektor sollte das humane TGF- β 1 Gen mit der Nukleinsäuresequenz des Flag-Oktapeptids fusioniert werden.

5.2.3.1 Vektorsynthese

Ausgangsplasmid war erneut der 8663bp-umfassende Plasmid p Δ E1sp1A-CMV-*full-length* TGF- β 1. Mit dem For-Primer SIM003 der Sequenz 5'-d(AGCCCTGTTCGCGCTCTCGGC)-3' und dem Rev-Primer SIM002 der Nukleinsäuresequenz 5'-d(AAGCTTGCAGGAGCGCAC GATCATG)-3' wurde die PCR durchgeführt. Das entstehende Fragment setzte sich aus 46bp des 5'-untranslatierten Bereiches, dem Start-Codon und dem hTGF- β 1 Gen bis auf das Stop-Codon und die letzten 6 für Aminosäuren kodierenden Basenpaare plus drei zusätzliche bp des Rev-Primers zusammen. Mit dem Rev-Primer wurde am 3'-Ende des Fragmentes eine *Hind*III Schnittstelle integriert. Das PCR-Produkt wurde auf ein 1,5%iges Agarosegel geladen und mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Unter UV-Licht wurde das 303bp-Fragment aus dem Gel geschnitten, eluiert und die DNA durch EtOH Fällung aufgereinigt.

Analog zu dem in Abb. 25 dargestellten Prinzip wurde das hTGF- β 1 Genfragment in den pGEM-Teasy Vektor kloniert und durch Plasmid-Minipräparation amplifiziert. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *Eco*RI verdaut, auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen und durch Elektrophorese nach der Größe aufgetrennt. Anhand des bei der Elektrophorese entstehenden Bandenmusters konnten Plasmide, in welche das Fragment eingebaut worden war, differenziert werden. Die verdaute DNA des pGEM-Teasy-hTGF- β 1 Expressionsvektors zeigte nach der Elektrophorese zwei diskrete Banden, wogegen bei Verdau des pGEM-Teasy Vektors nur eine DNA-Bande zu erkennen war. Es folgte die Sequenzierung der Klone mit den Primern Mut4, SIM001, SIM003, TGF1 und TGF4 um sicher zu stellen, dass keine relevanten Punktmutationen vorlagen. Klone ohne Punktmutation wurden mittels Plasmid-Großpräparation vervielfältigt.

Im nächsten Schritt wurden der pGEM-Teasy-hTGF- β 1 Vektor sowie der pCMV-Tag4A Vektor mit den Restriktionsenzymen *Not*I und *Hind*III verdaut, auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen und im elektrischen Feld aufgetrennt. Die diskreten Banden des 320bp hTGF- β 1 Genfragmentes und des ca. 4300bp linearisierten pCMV-Tag4A Vektors wurden ausgeschnitten und mittels Elektroelution aus dem Agarosegel isoliert. Es folgte die Ligation von Insert und Vektor. Kompetente XL-2-blue Bakterien wurden mit 10 μ l des Ligationsansatzes transformiert, auf Kanamycin-haltigen Selektionsplatten kultiviert und die Plasmide durch Minipräparation amplifiziert. Die Insert-Vektor-Übergänge wurden mit den Primern MA001 und T7 überprüft. Der pCMV-Tag4A-hTGF- β 1 Expressionsvektor mit richtig orientiertem

Genabschnitt und erhaltenem Leseraster wurde mittels Großpräparation vervielfältigt, um hinreichende Mengen reiner DNA zu erhalten.

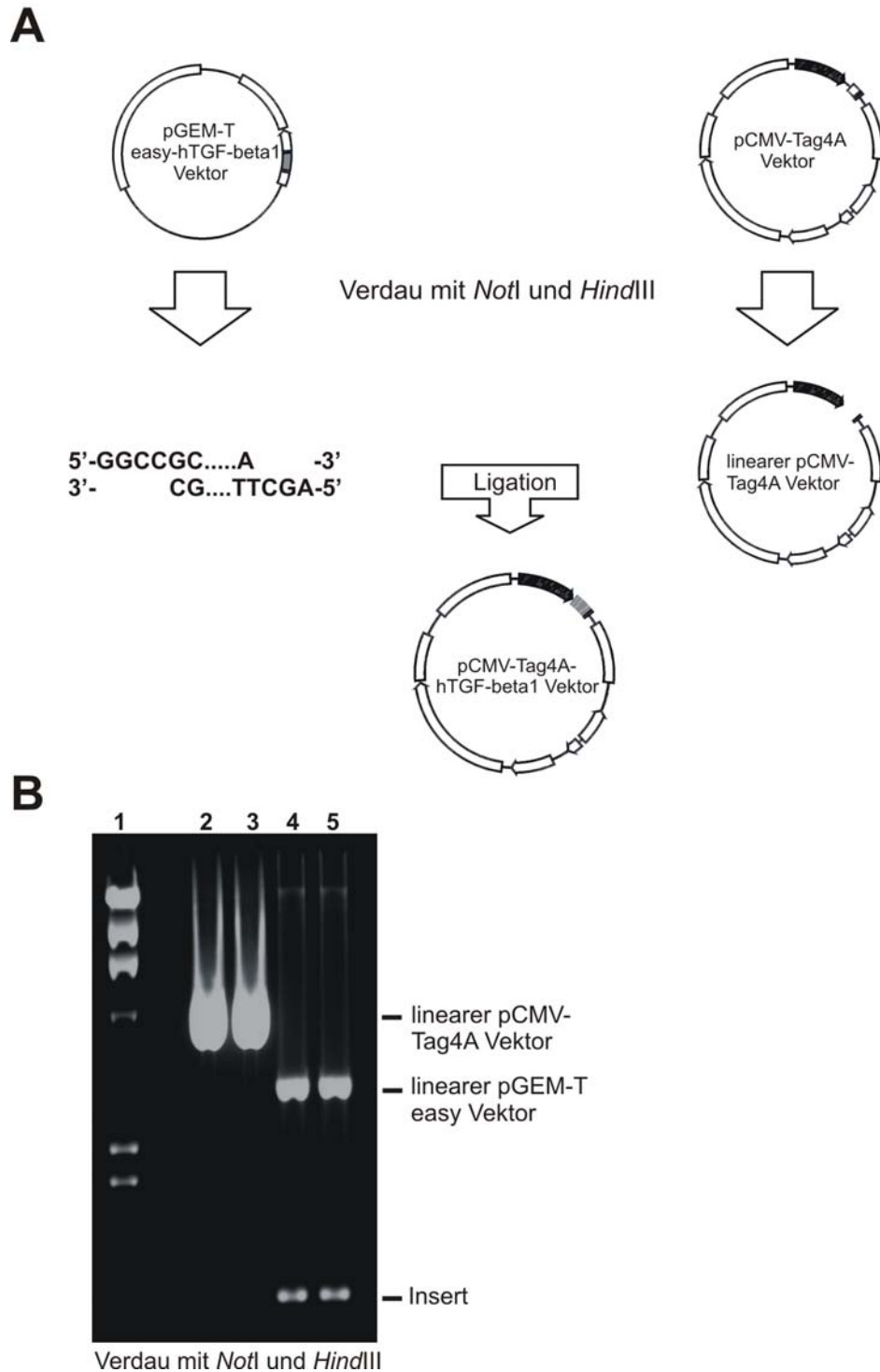


Abb. 33: Synthese des pCMV-Tag4A-hTGF- β 1 Expressionsvektors.

A: Der pGEM-Teasy-hTGF- β 1 Vektor und der pCMV-Tag4A Vektor wurden mit *NotI* und *HindIII* geschnitten. Das hTGF- β 1 Genfragment wurde mit dem linearen pCMV-Tag4A Vektor ligiert. Daraus entstand der pCMV-Tag4A-hTGF- β 1 Expressionsplasmid.

B: Auf ein 0,8%iges Agarosegel wurden die Restriktionsansätze jeweils in zwei Spuren neben dem λ -*HindIII* Marker (Spur 1) aufgetragen. Die Bande in Spur 2 und 3 repräsentieren den verdauten pCMV-Tag4A Vektor. In Spur 4 und 5 zeigen sich jeweils zwei Banden, die etwa 3000bp-Bande des linearen pGEM-Teasy Vektors und die 320bp-Bande des hTGF- β 1 Genfragmentes.

5.2.3.2 hTGF- β 1-Flag Konstrukt in CHO Zellen

CHO Zellen wurden nach dem Protokoll aus Kapitel 4.3 mit 2 μ g pCMV-Tag4A-hTGF- β 1 transfiziert. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgezogen und durch 0,2%iges Medium ersetzt. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen geerntet.

Vorexperimente hatten ergeben, dass in Western Blot Analysen von unbehandeltem Überstand kein hTGF- β 1-Flag nachzuweisen war. Die Proteine des Überstandes mussten deshalb vor Durchführung weiterer Versuche aufkonzentriert werden. Für den einfachen Nachweis von Expression und Sekretion wurden die Proteine mittels TCA-Fällung aufgereinigt.

Die Western Blots wurden wie in Kapitel 4.3 beschrieben durchgeführt. Der monoklonale *mouse* anti-Flag M2 Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 wurde genutzt, um selektiv das rekombinante hTGF- β 1-Flag zu detektieren. Nach Proteinkonzentrationsbestimmung mittels DC-Testung wurden 15 μ g Protein des Zelllysates auf das Gel geladen. Vom Überstand wurden 30 μ l eingesetzt. Die Proben wurden in zwei Spuren einmal nicht reduziert und einmal durch 5 μ l DTT reduziert neben einer Negativkontrolle aufgetragen. Zur Bestimmung der Lauffront und zur Berechnung von Molekulargewichten wurden 10 μ l Seebblue Marker eingesetzt.

Im Zelllysate konnte unter reduzierenden Bedingungen mit dem gegen das Flag-Oktapeptid gerichteten Antikörper eine Bande bei etwa 44-56 kDa nachgewiesen werden. Dieses immobilisierte Protein entsprach dem Pro-hTGF- β 1-Flag-Fusionsprotein, bestehend aus monomerem LAP und monomerem hTGF- β 1-Flag (12-14kDa). Unreduziert zeigte sich die hochmolekulare Bande des dimeren Proteins bei etwa 90-121 kDa. Die Spur der Negativkontrolle war leer.

In der nicht reduzierten Probe des Überstandes konnte ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 90-121 kDa detektiert werden. Nach Reduktion des Überstandes mit 5 μ l DTT konnte wie im Zelllysate das Pro-hTGF- β 1-Flag-Fusionsprotein bei 44-56 kDa nachgewiesen werden. Neben zwei unspezifischen hochmolekularen Banden war ein Protein mit einem Molekulargewicht von 12-14 kDa zu differenzieren. Dieses Molekulargewicht entsprach dem des monomeren hTGF- β 1-Flag. Das N-terminale LAP ließ sich mit dem gegen Flag gerichteten Antikörper nicht darstellen. In den Proben der nicht transfizierten Zellen konnten keine spezifischen Banden nachgewiesen werden.

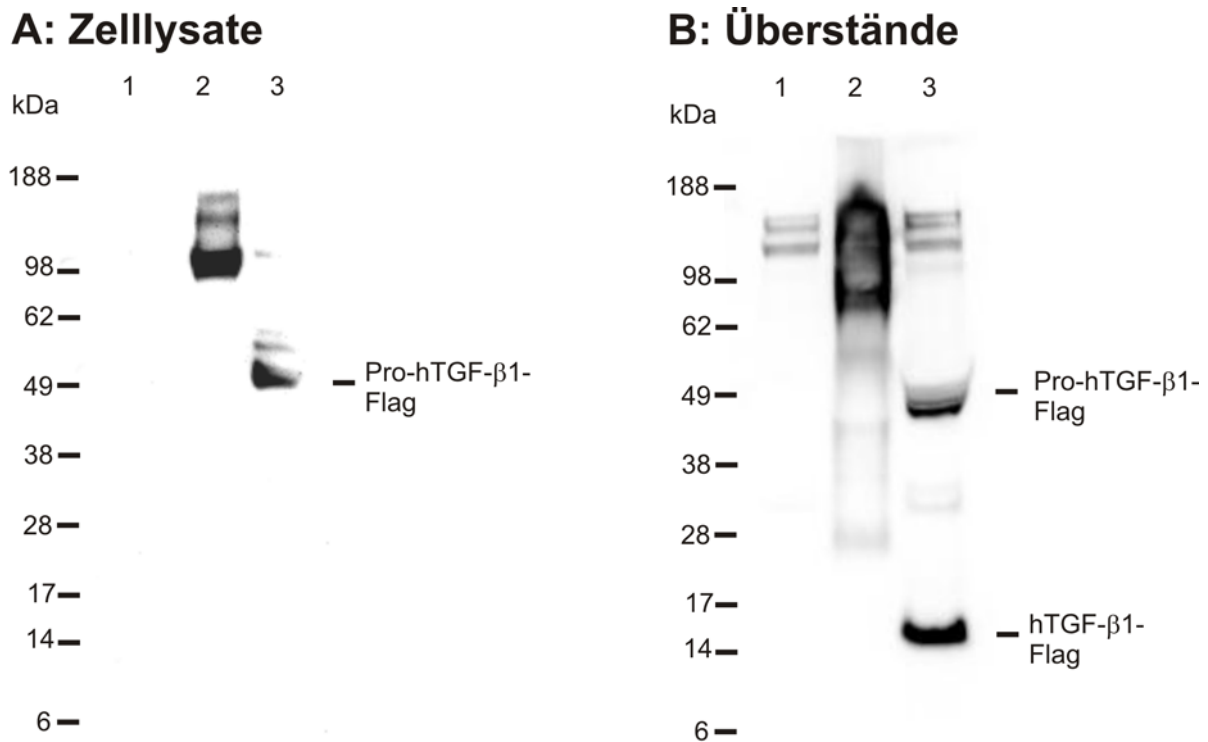


Abb. 34: 8-12%iges Bis-Tris-Gel, anti-Flag M2 Antikörper.

A: Western Blot der Zelllysate, aufgetragen wurden 15µg Protein.

Spur 1 zeigt das Zelllysate nicht transfizierter Zellen. In den Spuren 2 und 3 wurden je 15µg Protein des Zelllysates von mit pCMV-Tag4A-hTGF-β1 transfizierten CHO Zellen auf das Gel geladen, einmal nicht reduziert (Spur 2) und einmal durch Zugabe von 5µl DTT reduziert (Spur 3). In Spur 3 stellt sich eine Proteinbande bei etwa 44-56 kDa dar. Sie entspricht dem mit Flag gekoppelten Pro-hTGF-β1. In der nicht reduzierten Probe zeigt sich das dimere Pro-hTGF-β1-Flag bei einem Molekulargewicht von etwa 88-112 kDa (Spur 2).

B: Western Blot der Überstände, aufgetragen wurden 30µl des durch TCA-Fällung aufgereinigten Überstandes.

In Spur 1 wurde die Negativkontrolle nicht transfizierter Zellen aufgetragen. Hier bilden sich zwei hochmolekulare unspezifische Banden. Spur 2 und 3 zeigen den Überstand von mit pCMV-Tag4A-hTGF-β1 transfizierten Zellen, einmal nicht reduziert (Spur 2) und einmal reduziert (Spur 3). In der reduzierten Probe ergeben sich 2 Banden, eine bei 12-14 kDa, die dem monomeren hTGF-β1-Flag entspricht, und eine bei 44-56 kDa homolog zu Spur 3 des Zelllysates in Abb. 34B. Zusätzlich zeichnen sich dieselben hochmolekularen Banden ab, die in der Kontrolle zu sehen sind. In der nicht reduzierten Probe lässt sich eine Bande von etwa 88-112 kDa nachweisen. Diese Bänder zeigen die dimeren Formen des hTGF-β1-Flag.

5.2.3.3 hTGF-β1-Flag Konstrukt in LX-2 Zellen

LX-2 Zellen wurden ebenfalls mit 2µg pCMV-Tag4A-hTGF-β1 transfiziert. Am 3. Tag nach Transfektion wurde der Überstand abgezogen und die Zellen mit Ripa + Complete lysiert und geerntet. Mittels TCA-Fällung wurden die Proteine des Überstandes aufgereinigt und höher konzentriert.

Um Expression und Sekretion des hTGF-β1-Flag-Fusionsproteins zu überprüfen, wurden Western Blots durchgeführt. Dafür wurden 15µg Protein des Zelllysates und 30µl Überstand auf ein 8-12%iges 1mm dickes Bis-Tris-Gel geladen. Negativkontrolle und Probe wurden reduziert und nicht reduziert aufgetragen.

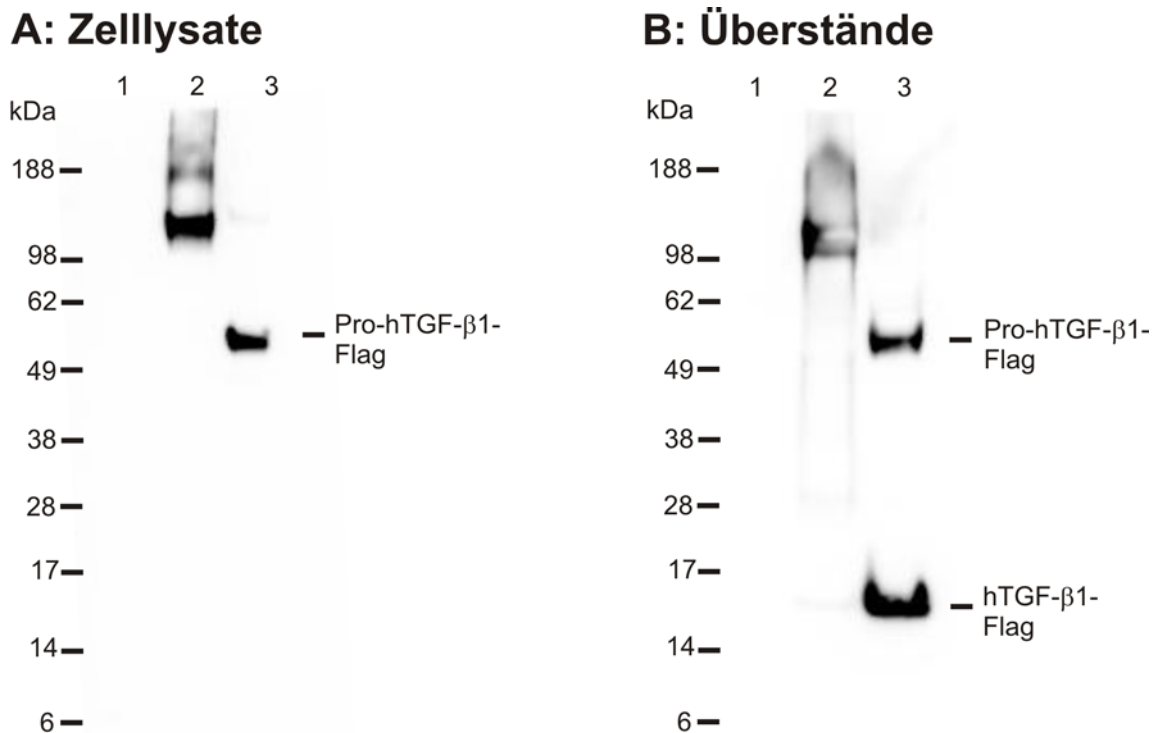


Abb. 35: 8-12%iges Bis-Tris-Gel, anti-Flag M2 Antikörper.

A: Western Blot der Zelllysate, aufgetragen wurden 15µg Protein.

Spur 1 zeigt das Zelllysate nicht transfizierter LX-2 Zellen. In den Spuren 2 und 3 wurden Proben der mit pCMV-Tag4A-hTGF-β1 transfizierten Zellen aufgetragen; nicht reduziert (Spur 2) und reduziert (Spur 3). In Spur 3 ist die 44-56 kDa Bande des Pro-hTGF-β1-Flag zu erkennen. Die Bande in Spur 2 entspricht der dimeren nicht reduzierten Form des Pro-Proteins.

B: Western Blot der Überstände, aufgetragen wurden 30µl des durch TCA-Fällung aufgereinigten Überstandes.

In Spur 1 wurde die Negativkontrolle nicht transfizierter Zellen aufgetragen. Die Spuren 2 und 3 zeigen den Überstand von mit pCMV-Tag4A-hTGF-β1 transfizierten LX-2 Zellen. In der reduzierten Spur 3 bilden sich 2 Banden. Eine bei etwa 44-56 kDa analog zum Zelllysate dem Pro-hTGF-β1-Flag entsprechend und eine bei 12-14 kDa. Das Molekulargewicht der niedermolekularen Bande stimmt mit dem des monomeren hTGF-β1-Flag überein. Die nicht reduzierte Probe (Spur 2) zeigt eine Bande, die etwa das doppelte Molekulargewicht des Pro-hTGF-β1-Flag aufweist und das dimere Protein darstellt.

Die Western Blots der Zelllysate zeigten in der reduzierten Probe, der mit pCMV-Tag4A-hTGF-β1 Expressionsvektor transfizierten Zellen, eine Bande bei etwa 44-56 kDa. Diese entsprach dem Pro-hTGF-β1-Flag-Fusionsprotein in der monomeren Form. In der nicht reduzierten Probe konnte das dimere Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 88-112 kDa detektiert werden.

In der reduzierten Spur des Überstandes, von mit pCMV-Tag4A-hTGF-β1 transfizierten Zellen, bildete sich ebenfalls die 44-56 kDa schwere Bande des Pro-Proteins. Daneben zeigte sich die 12-14 kDa Bande des rekombinanten monomeren hTGF-β1-Flag. Im nicht reduzierten Überstand ließ sich ein hochmolekulares Protein, den dimeren Formen des hTGF-β1 entsprechend, nachweisen.

Die Negativkontrollen von Zelllysate und Überstand waren leer.

5.2.4 *Full-length* hTGF- β 1-Flag

Das in Kapitel 5.2.3 beschriebene hTGF- β 1-Flag-Fusionsprotein wurde in beiden Zelllinien exprimiert und sezerniert, konnte im Überstand aber nur nach Anreicherung der Proteine nachgewiesen werden. Dies bedeutete einen höheren zeitlichen und materiellen Aufwand. Um eventuelle Einflüsse der C-terminal fehlenden Aminosäuren zu testen und die Ausbeute des rekombinanten Proteins zu optimieren, wurde ein neuer Vektor konstruiert, mit dem *full-length* hTGF- β 1 gekoppelt mit Flag synthetisiert werden konnte.

5.2.4.1 Vektorsynthese

Für die PCR auf dem p Δ E1sp1A-CMV-*full-length*-hTGF- β 1 wurde der For-Primer SIM003 mit der Sequenz 5'-d(AGCCCTGTTTCGCGCTCTCGGC)-3' und der Rev-Primer SIM004 mit der Nukleinsäuresequenz 5'-d(AAGCTTGCTGCACTTGACAGGAGCGCAC)-3' eingesetzt. Das pCMV-Tag4A-*full-length*-hTGF- β 1 Expressionskonstrukt wurde wie in Kapitel 5.2.3 beschrieben kloniert.

5.2.4.2 *Full-length* hTGF- β 1-Flag Konstrukt in CHO Zellen

Der pCMV-Tag4A-*full-length*-hTGF- β 1 Vektor wurde in CHO eingebracht und Expression und Sekretion wurden mittels Western Blot analysiert. Außerdem wurde das rekombinante Protein durch Immunfluoreszenz nachgewiesen.

CHO Zellen wurden mit 2 μ g des Expressionsvektors transfiziert. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und dabei die FKS-Konzentration von 10% auf 0,2% herabgesetzt. Weitere 48 Stunden später wurde das Medium abgezogen, in Mikroreaktionsgefäße überführt und für Western Blot Analysen verwendet. Die Zellen wurden mit Ripa + Complete lysiert und von den Platten gelöst. Der Proteingehalt wurde mittels DC-Testung bestimmt.

Im ersten Schritt wurde überprüft, ob die Sekretionsrate des *full-length* hTGF- β 1-Flag ausreichte, um das rekombinante Protein im Überstand ohne vorausgehende TCA-Fällung nachzuweisen.

Der Western Blot wurde wie in Kapitel 4.3 beschrieben durchgeführt. In einem Ansatz wurden 15 μ l des Mediums mit 15 μ l 2x SDS-Gelladepuffer versetzt und auf ein 8-12%iges Bis-Tris-Gel geladen. In einer zweiten Spur wurden 15 μ l Medium, 3 μ l DTT und 12 μ l SDS-Gelladepuffer aufgetragen. Zur Bestimmung der Lauffront und zur Berechnung der Molekulargewichte diente der Seebule Marker.

In den Western Blot Analysen der nicht reduzierten Probe waren Banden zu differenzieren, die den dimeren Formen des Pro-Proteins (88-112 kDa) entsprachen. Die reduzierte Probe zeigte eine schwache Bande bei etwa 50 kDa, dem Molekulargewicht des Pro-hTGF- β 1-

Flag. Aber analog zu den Ergebnissen aus Abschnitt 5.2.3, konnte das mature hTGF- β 1-Flag-Fusionsprotein im Western Blot des Mediums nicht zufriedenstellend dargestellt werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in den folgenden Versuchen die Proteine des Überstandes durch TCA-Fällung aufkonzentriert.

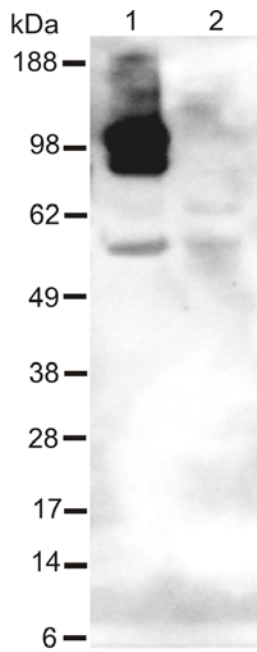


Abb. 36: 8-12%iges Bis-Tris-Gel, anti-Flag M2 Antikörper.

In Spur 1 wurden 15 μ l nicht reduzierten Überstandes transfizierter CHO Zellen versetzt mit 15 μ l SDS-Gelladepuffer auf das Bis-Tris-Gel aufgetragen, aufgetrennt und durch das Tank-Blot Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Mit dem anti-Flag M2 Antikörper ließen sich drei Banden differenzieren. Eine Bande ist hier bei etwa 50 kDa zu erkennen, zwei weitere ineinander übergehende Banden zeigen sich zwischen der 62 kDa Bande und der 98 kDa Bande des Markers. Diese entsprechen dem dimeren Pro-Protein.

In Spur 2 wurde die Probe zusätzlich mit 3 μ l DTT versetzt aufgetragen. Es ist eine schwache Bande bei etwa 50 kDa zu erkennen. Weitere Proteinbanden sind nicht zu differenzieren.

In den nächsten Western Blots wurden neben 10 μ l Seebblue Marker, 15 μ g Protein des Zelllysates auf ein 8-12%iges Bis-Tris-Gel geladen. Vom gefällten Medium wurden 30 μ l eingesetzt. In eine Tasche des Gels wurde die reduzierte Negativkontrolle geladen. Die Proben wurden in zwei Spuren einmal nicht reduziert und einmal durch Zugabe von 5 μ l DTT reduziert aufgetragen.

Die Western Blots der Zelllysate zeigten in der Negativkontrolle nicht transfizierter Zellen und den Proben transfizierter CHO Zellen mehrere unspezifische Banden. Unter reduzierenden Bedingungen konnte eine Bande bei 44-56 kDa detektiert werden. Das mit dem anti-Flag M2 Primärantikörper nachgewiesene Protein entsprach dem intrazellulären Pro-hTGF- β 1-Flag, bestehend aus LAP, hTGF- β 1 und dem C-terminalen Flag-Protein. Unter nicht reduzierenden Bedingungen zeigte sich eine Bande bei 44-49 kDa. In der Negativkontrolle bildeten sich bei diesen Molekulargewichten keine Banden.

Die Ergebnisse der Western Blots des Zelllysates von mit pCMV-Tag4A-*full-length*-hTGF- β 1 transfizierten CHO Zellen unterschieden sich in allen Versuchen von den Western Blots der mit pCMV-Tag4A-hTGF- β 1 transfizierten Zellen. Neben den zusätzlichen unspezifischen Banden waren die Befunde in der nicht reduzierten Probe am auffälligsten. Im Vergleich zwischen den Zellen, die *full-length* hTGF- β 1-Flag überexprimierten und denen, die hTGF-

β 1-Flag synthetisierten, hatte das nicht reduzierte Pro-hTGF- β 1-Flag unterschiedliche Molekulargewichte. Bei den Experimenten mit *full-length* hTGF- β 1-Flag wurde reproduzierbar eine Bande bei 44-49 kDa detektiert. Der Western Blot des 2 Aminosäuren defizitären hTGF- β 1-Flag Proteins zeigte dagegen, wie in Abschnitt 5.2.3 beschrieben, in der nicht reduzierten Spur eine Bande bei 88-112 kDa.

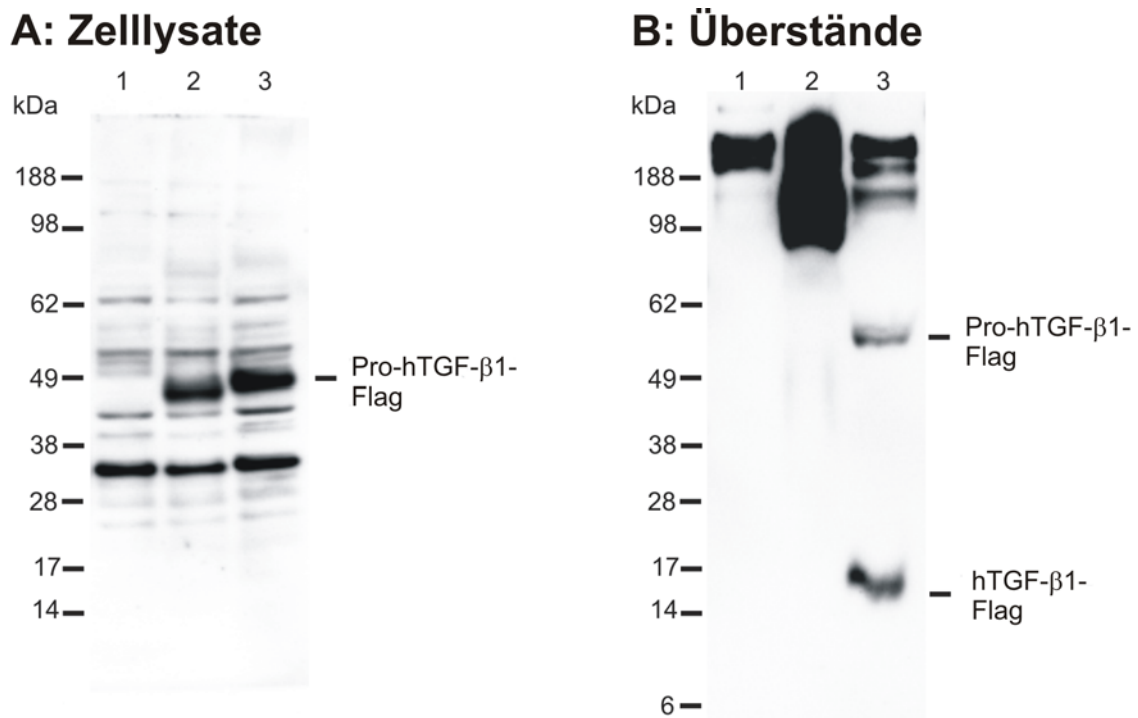


Abb. 37: 8-12%iges Bis-Tris-Gel, anti-Flag M2 Antikörper.

A: Western Blot der Zelllysate, aufgetragen wurden 15 μ g Protein.

Spur 1 zeigt das reduzierte Zelllysate nicht transfizierter Zellen. In den Spuren 2 und 3 wurden je 15 μ g Protein des Zelllysates von mit pCMV-Tag4A-*full-length*-hTGF- β 1 transfizierten CHO Zellen auf das Gel geladen, einmal nicht reduziert (Spur 2) und einmal durch Zugabe von 5 μ l DTT reduziert (Spur 3). In allen 3 Spuren zeichnen sich unspezifische Banden bei ca. 30 kDa, 40 kDa, 50 kDa und 60 kDa ab. Bei etwa 44-56 kDa kann durch das C-terminal fusionierte Flag die Pro-hTGF- β 1-Flag Bande detektiert werden, welche sich in der Negativkontrolle nicht darstellt. Spur 2 und Spur 3 unterscheiden sich nur wenig, wobei das Molekulargewicht der Bande in Spur 2 niedriger ist als in Spur 3.

B: Western Blot der Überstände, aufgetragen wurden 30 μ l des durch TCA-Fällung aufgereinigten Überstandes.

In Spur 1 wurde die reduzierte Negativkontrolle nicht transfizierter Zellen aufgetragen. Hier ergeben sich zwei hochmolekulare unspezifische Banden. Spur 2 und 3 zeigen den Überstand von mit pCMV-Tag4A-*full-length*-hTGF- β 1 transfizierten Zellen, einmal nicht reduziert (Spur 2) und einmal reduziert (Spur 3). In der reduzierten Probe sind 2 Banden, eine bei 12-14 kDa, die dem monomeren hTGF- β 1-Flag entspricht, und eine bei 44-56 kDa homolog zu Spur 3 des Zelllysates in Abb. 37A nachzuweisen. Zusätzlich zeichnen sich dieselben hochmolekularen Banden ab, die in der Kontrolle zu sehen sind. In der nicht reduzierten Probe lässt sich eine Bande von etwa 88-112 kDa detektieren. Diese Bande zeigt die dimeren Formen des hTGF- β 1-Flag.

Das Bandenmuster der Überstände zeigte keine Auffälligkeiten. In der Negativkontrolle waren hochmolekulare unspezifische Banden nachweisbar, die auch in der reduzierten Probe zu detektieren waren. Sonst war die Negativkontrolle leer. In der unreduzierten Probe des Überstandes konnte ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 90-121 kDa

dargestellt werden. Nach Reduktion des Überstandes mit 5µl DTT konnte wie im Zelllysat das Pro-hTGF-β1-Flag-Fusionsprotein bei 44-56 kDa nachgewiesen werden. Neben den zwei unspezifischen hochmolekularen Banden war ein Protein mit einem Molekulargewicht von 12-14 kDa zu differenzieren. Dieses Molekulargewicht entsprach dem des muren hTGF-β1.

Zur weiteren Analyse wurden Immunfluoreszenzaufnahmen der transfizierten CHO Zellen nach dem in Kapitel 4.3 beschriebenen Protokoll angefertigt.

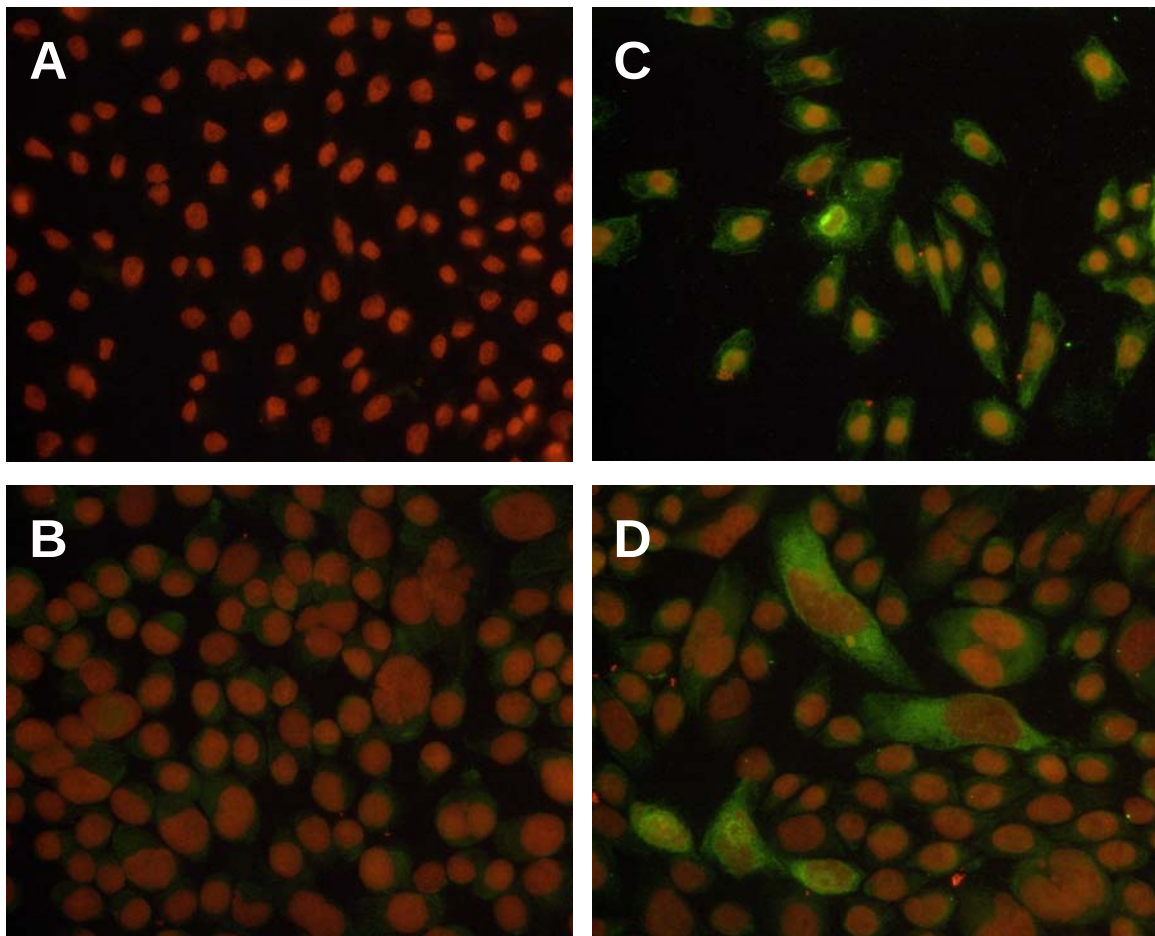


Abb. 38: Immunfluoreszenzaufnahmen transfizierter CHO Zellen.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop stellte sich das rekombinant hergestellte und mit Antikörpern markierte humane TGF-β1 grün dar, die Kerne heben sich rot von der Umgebung ab.

A+B: Negativkontrolle, 20er Objektiv (A) und 40er Objektiv (B). Die Zellkerne leuchteten durch die Propidiumjodidfärbung rot.

C+D: Mit 2µg pCMV-Tag4A-*full-length*-hTGF-β1 transfizierte CHO Zellen, 20er Objektiv (A) und 40er Objektiv (B). Die Zellkerne leuchteten durch die Propidiumjodidfärbung rot. Erfolgreich transfizierte Zellen fluoreszierten grün.

Die CHO Zellen wurden in 6-Wells kultiviert, in die zuvor Deckgläser gelegt und in 10%igem DMEM-Medium inkubiert worden waren, und mit 2µg pCMV-Tag4A-*full-length*-hTGF-β1 transfiziert. Ein Mediumwechsel erfolgte nach 24 Stunden. Am 2. Tag nach Transfektion wurden die CHO Zellen mit 4%igem Paraformaldehyd fixiert. Als Primärantikörper wurde der

monoklonale *mouse* anti-Flag M2 Antikörper eingesetzt. Dieser Antikörper detektierte ausschließlich das rekombinante Protein. Auf diese Weise konnten Transfektionseffizienz, Expression und intrazelluläre Lokalisation überprüft werden.

Nicht transfizierte CHO Zellen dienten als Negativkontrolle. Durch das im UV-Licht fluoreszierende Propidiumjodid, das mit der DNA interkalierte, färbten sich die Zellkerne rot. Weitere Fluoreszenz war nicht nachweisbar.

Die CHO Zellen, die erfolgreich mit 2µg pCMV-Tag4A-*full-length*-hTGF-β1 transfiziert worden waren, leuchteten grün. Die Zellkerne stellten sich unter dem Mikroskop wie die der Negativkontrolle rot fluoreszierend dar. Vereinzelt waren Zellen zu erkennen, in denen sich das hTGF-β1-Flag in Vakuolen im Zytoplasma sammelte. Die Transfektionseffizienz war jedoch in allen Versuchen gering.

5.2.4.3 *Full-length* hTGF-β1-Flag Konstrukt in LX-2 Zellen

Mit der LX-2 Zelllinie wurden ebenfalls nach Transfektion mit pCMV-Tag4A-*full-length*-hTGF-β1 Western Blot Analysen zur Überprüfung von Expression und Sekretion sowie Immunfluoreszenzuntersuchungen durchgeführt.

LX-2 Zellen wurden mit 2µg des Expressionsvektors transfiziert. Am 3. Tag nach Transfektion wurden die Zellen geerntet. Zuerst wurde das Medium abgezogen und in ein 1,5ml Tube überführt. Die Zellen wurden gewaschen und anschließend mit Ripa + Complete lysiert und von der Platte gelöst.

In den ersten Western Blot Analysen wurde überprüft, ob die Sekretionsmenge hoch genug war, um das rekombinante hTGF-β1-Flag im Überstand nachweisen zu können, ohne die enthaltenen Proteine aufzureinigen. Dazu wurden 15µl des Mediums mit 2x SDS-Gelladepuffer versetzt, zusammen mit 10µl Seebule Marker in einer Spur nicht reduziert und in einer Spur durch Zusatz von 3µl DTT reduziert auf ein 8-12%iges Bis-Tris-Gel aufgetragen, und die Proteine im elektrischen Feld aufgetrennt. Diese wurden nach dem Tank-Blot Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und dort immobilisiert. Mit dem anti-Flag M2 Primärantikörper sollte spezifisch das rekombinante Protein detektiert werden.

Im Western Blot des nicht aufgereinigten Mediums zeigte sich in der nicht reduzierten Probe eine Bande auf Höhe der 98 kDa Bande des Seebule Markers. Diese repräsentierte die dimeren Pro-hTGF-β1-Flag Proteine. In der durch Zugabe von 3µl DTT reduzierten Probe konnte eine dezente Bande bei dem Molekulargewicht des monomeren Pro-hTGF-β1-Flag (44-56 kDa) nachgewiesen werden. Das Probenmaterial war aber nicht ausreichend konzentriert, um das mature monomere hTGF-β1 detektieren oder eine kräftige Pro-hTGF-

β 1-Flag-Bande darstellen zu können. Wie bei den Experimenten mit CHO Zellen war die hTGF- β 1-Flag-Konzentration im Überstand zu gering, um weiterführende Experimente erfolgreich durchzuführen. Die Proteine des Überstandes wurden deshalb mittels TCA-Fällung aufkonzentriert.

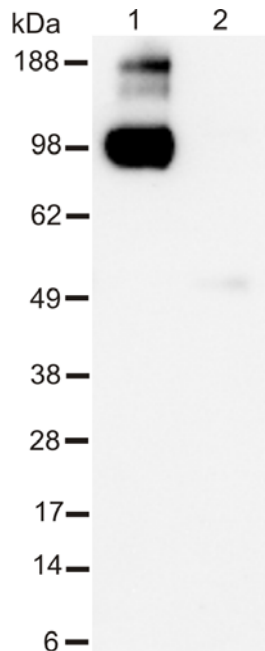


Abb. 39: 8-12%iges Bis-Tris-Gel, Anti-Flag M2 Antikörper.

In Spur 1 wurden 15 μ l nicht reduzierten Überstandes transfizierter LX-2 Zellen versetzt mit 15 μ l SDS-Gelladepuffer auf das 8-12%ige Bis-Tris-Gel geladen. Mit dem anti-Flag M2 Antikörper ließen sich drei Banden differenzieren. Eine Bande zeigt sich hier bei etwa 98 kDa dem Molekulargewicht des dimeren Pro-hTGF- β 1-Flag. Zusätzlich sind zwei höhermolekulare Proteinbanden zu detektieren.

In Spur 2 wurde die Probe zusätzlich mit 3 μ l DTT versetzt und auf das Gel geladen. Reduziert ist eine schwache Bande bei etwa 50 kDa zu erkennen. Weitere Proteinbanden können nicht differenzieren werden.

In den folgenden Western Blot Analysen wurden zum Nachweis von Expression und Sekretion 15 μ g Protein des Zelllysates nach Proteinkonzentrationsbestimmung mittels DC-Testung und 30 μ l des durch TCA-Fällung aufgereinigten Überstand eingesetzt. Neben 10 μ l Seebblue Marker zur Bestimmung der Lauffront wurden die Proben in einer Spur nicht reduziert und in einer reduziert zusammen mit einer Negativkontrolle auf ein 8-12%iges Gel geladen und die Elektrophorese mit anschließendem Western Blot wie in Kapitel 4.3 beschrieben durchgeführt.

Die Western Blot Analysen von Zelllysaten und Überständen der LX-2 Zellen ergaben ähnliche Befunde wie die der CHO Zelllinie. Die Untersuchungen der Zelllysate zeigten in der reduzierten Probe der mit pCMV-Tag4A-*full-length*-hTGF- β 1 transfizierten Zellen neben einigen unspezifischen Banden, die sich auch in der reduzierten Negativkontrolle abbildeten, eine Proteinbande bei 44-56 kDa. Dieses mit anti-Flag M2 Antikörper detektierte Protein entsprach dem rekombinanten Pro-hTGF- β 1-Flag. Ohne Zugabe von DTT konnten anders als bei den Versuchen mit dem pCMV-Tag4A-hTGF- β 1 Expressionsvektor zwei Banden dargestellt werden. In beiden Fällen zeigte sich eine hochmolekulare Bande, dem dimären Pro-hTGF- β 1-Flag entsprechend, zusätzlich war eine zwischen 40 kDa und 48 kDa abzugrenzen. In der Negativkontrolle war keine dieser Banden nachzuweisen.

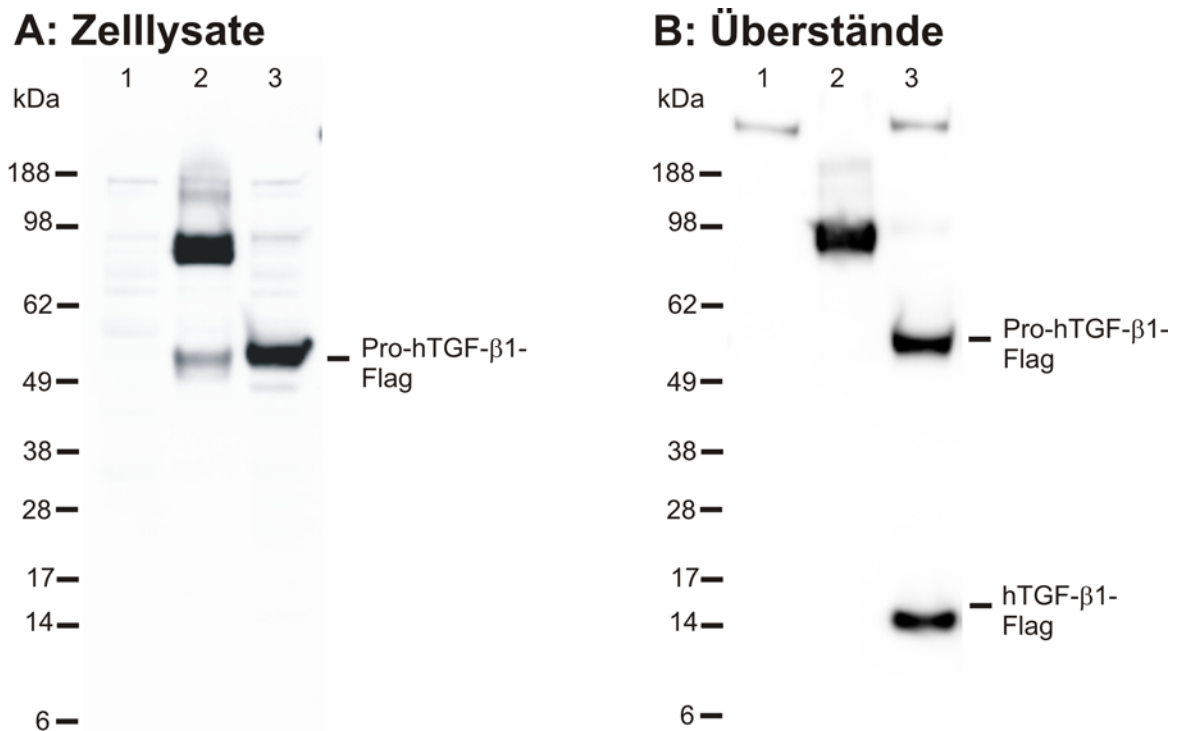


Abb. 40: 8-12%iges Bis-Tris-Gel, anti-Flag M2 Antikörper.

A: Western Blot der Zelllysate, aufgetragen wurden 15 µg Protein.

Spur 1 zeigt das reduzierte Zelllysate nicht transfizierter Zellen. In den Spuren 2 und 3 wurden je 15 µg Protein des Zelllysates von mit pCMV-Tag4A-*full-length*-hTGF-β1 transfizierten LX-2 Zellen auf das Gel geladen, einmal nicht reduziert (Spur 2) und einmal durch Zugabe von 5 µl DTT reduziert (Spur 3). Die Negativkontrolle (Spur 1) zeigt keine spezifische Bande. In der nicht reduzierten Probe dominieren zwei Banden, eine zwischen 62 und 98 kDa, die zweite mit einem Molekulargewicht zwischen 40 und 48 kDa. In Spur 3 kann bei etwa 44-56 kDa die Pro-hTGF-β1-Flag-Bande detektiert werden, welche in der Negativkontrolle nicht nachzuweisen ist.

B: Western Blot der Überstände, aufgetragen wurden 30 µl des durch TCA-Fällung aufgereinigten Überstandes.

In Spur 1 wurde die reduzierte Negativkontrolle nicht transfizierter Zellen aufgetragen. Hier zeigt sich eine hochmolekulare unspezifische Bande. Der Überstand von mit pCMV-Tag4A-*full-length*-hTGF-β1 transfizierten Zellen wurde in Spur 2 nicht reduziert und in Spur 3 reduziert auf das Gel geladen. In der reduzierten Probe ergeben sich 2 Banden, eine bei 12-14 kDa, die dem monomeren TGF-β1-Flag entspricht, und eine bei 44-56 kDa homolog zu Spur 3 des Zelllysates in Abb. 40A. Zusätzlich zeigt sich dieselbe hochmolekulare unspezifische Bande wie in der Negativkontrolle. In der nicht reduzierten Probe lässt sich eine Proteinbande zwischen der 62 kDa und 98 kDa Bande des Markers nachweisen. Diese Bande entspricht der dimeren Formen des hTGF-β1-Flag.

In den Western Blots der Überstände ließ sich in der reduzierten Probe der transfizierten Zellen ebenfalls die 44-56 kDa Bande des Pro-Proteins detektieren. Daneben zeigte sich eine Bande bei 12-14 kDa. Das Molekulargewicht entsprach dem des muren monomeren hTGF-β1 fusioniert mit dem Flag-Oktapeptid. Die Negativkontrolle war für diese Banden leer.

Zur weiterführenden Untersuchung der Funktionalität des *full-length* hTGF-β1 Expressionskonstruktes wurden ebenfalls Immunfluoreszenz Aufnahmen angefertigt.

In der Immunfluoreszenzmikroskopie erschienen die Zellkerne durch die Färbung mit Propidiumjodid rot. Die Negativkontrolle zeigte keine weitere Fluoreszenz.

In den transfizierten Zellen konnte zusätzlich die grüne Fluoreszenz des rekombinanten *full-length* hTGF- β 1-Flag-Fusionsprotein intrazellulär nachgewiesen werden. hTGF- β 1-Flag leuchtete inhomogen im Zytoplasma der Zellen. Die Transfektionseffizienz lag bei der LX-2 Zelllinie deutlich über der bei CHO Zellen.

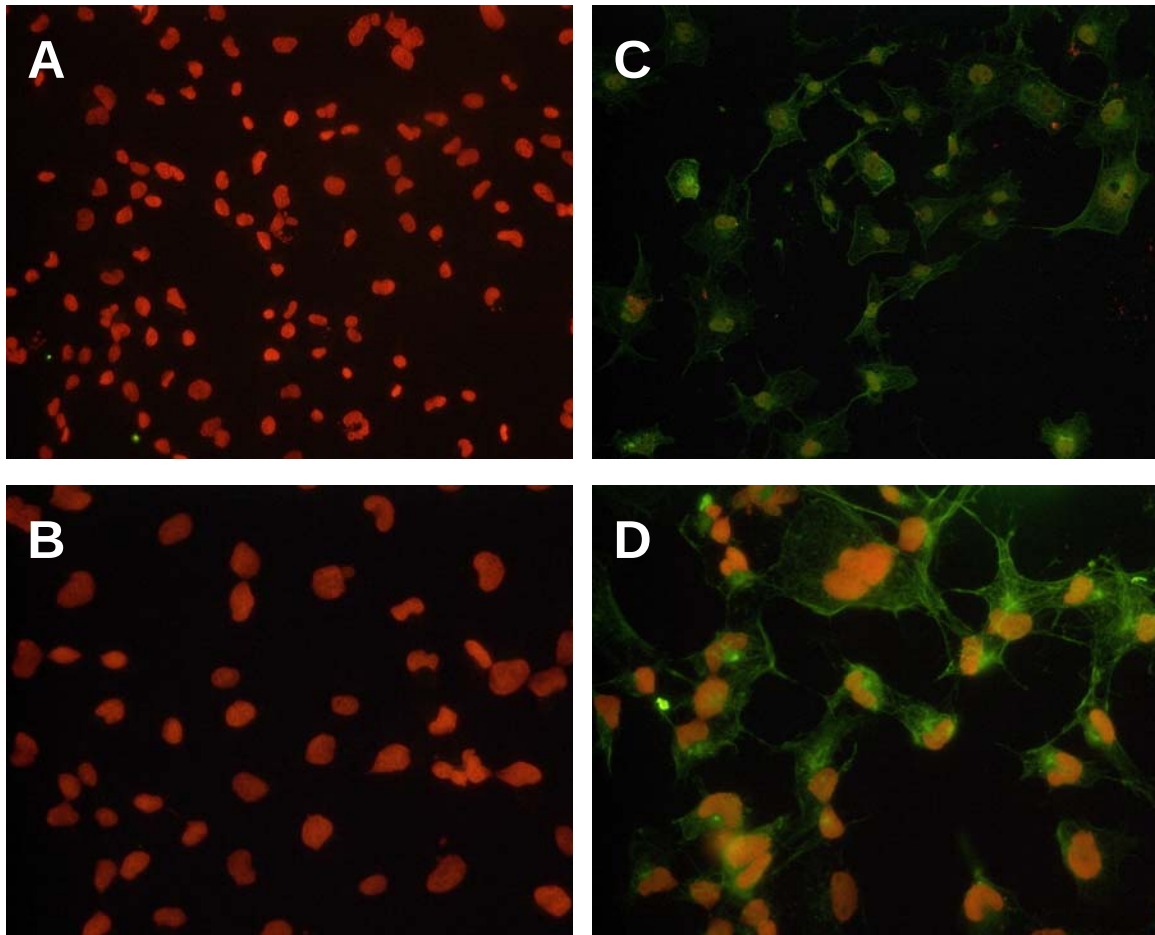


Abb. 41: Immunfluoreszenz Aufnahmen transfizierter LX-2 Zellen.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop stellte sich das rekombinant hergestellte und mit Antikörpern markierte humane TGF- β 1 grün dar. Die Kerne heben sich rot von der Umgebung ab.

A+B: Negativkontrolle, 20er Objektiv (A) und 40er Objektiv (B). Die Zellkerne leuchteten durch die Propidiumjodidfärbung rot.

B+D: Mit 2 μ g pCMV-Tag4A-*full-length*-hTGF- β 1 transfizierte LX-2 Zellen, 20er Objektiv (A) und 40er Objektiv (B). Die Zellkerne leuchteten durch die Propidiumjodidfärbung rot. Erfolgreich transfizierte Zellen fluoreszierten grün.

5.2.5 Einbau der Polymorphismen

Um den Einfluss der hTGF- β 1 Polymorphismen in Codon 10 und Codon 25 der Signalsequenz auf Synthese und Sekretion zu untersuchen, mussten die drei *in vivo* vorkommenden Allelvarianten in einen hTGF- β 1 Expressionsplasmid kloniert werden. Zunächst wurden PCRs aus Patienten-DNAs mit dem For-Primer 5'-d(CTAGGTTATTTC-CGTGGG)-3'

und dem Rev-Primer 5'-d(CCTTGGCGTAGTAGTCG)-3' durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,5%iges Agarosegel geladen und im elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt. Unter UV-Licht konnten die 523bp-umfassenden Genfragmente ausgeschnitten werden. Anschließend wurde die DNA durch Elektroelution isoliert und durch EtOH Fällung aufgereinigt.

Die hTGF- β 1 Fragmente wurden mit dem linearen pGEM-Teasy Vektor ligiert. Kompetente XL2-blue Bakterien wurden mit den Plasmiden transfiziert und auf Ampicillin-haltigen Selektionsmedien ausplattiert. Die Plasmid DNA wurde durch Minipräparation amplifiziert und anschließend sequenziert. Drei Plasmide mit den gesuchten Sequenzen wurden entsprechend der vorkommenden Allele ausgewählt.

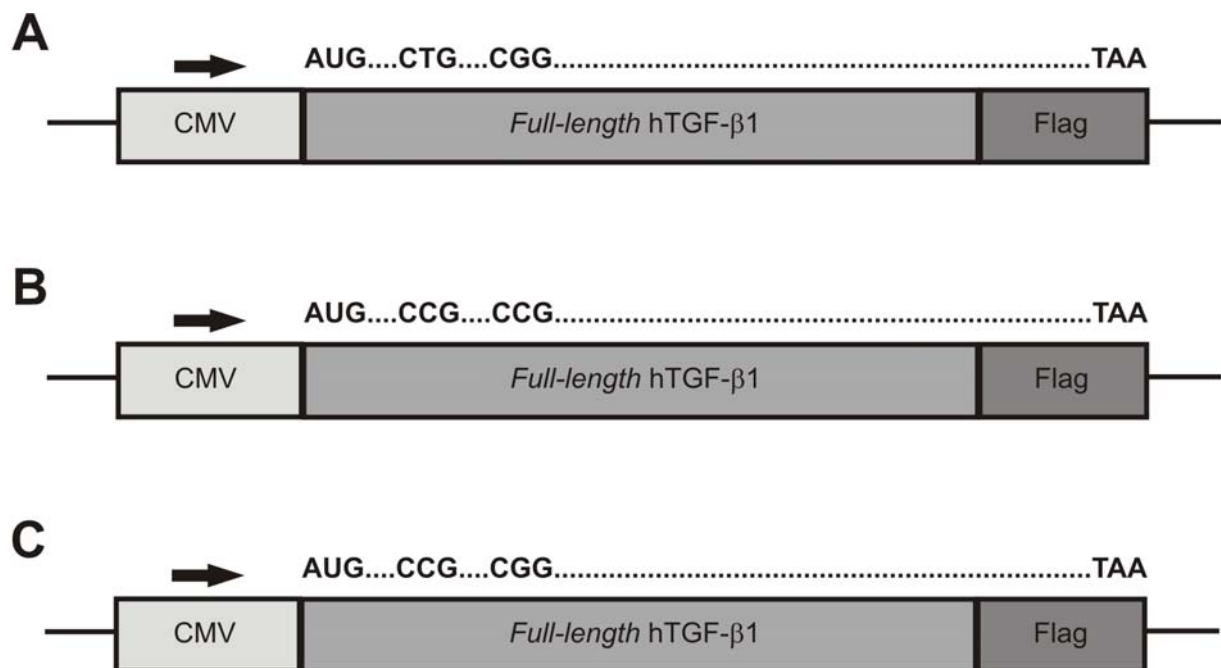


Abb. 42: Darstellung der Genkassetten der drei Expressionsvektoren.

Dem CMV-Promotor des pCMV-Tag4A-full-lengt-hTGF- β 1 Vektors folgte das humane TGF- β 1 Gen. Die kodierende hTGF- β 1 Gensequenz umfasste 390bp. Bei der Klonierung wurde das Stop-Codon des Gens eliminiert und die hTGF- β 1 Gensequenz mit den für das Flag-Oktapeptid kodierenden Nukleinsäuren verbunden.

Die Expressionsvektoren unterschieden sich jeweils in ein bzw. zwei Nukleotiden, die während der Translation zu einem Aminosäureaustausch führten. Die Sequenzen entsprachen den *in vivo* vorkommenden Allelvarianten des humanen TGF- β 1.

A: Wildtyp.

Die hTGF- β 1 Gensequenz entsprach der des Wildtyps. An Position +869 des Gens stand die Nukleinsäure Thymin, an Position +915 die Nukleinsäure Guanin. Codon 10 kodierte für die Aminosäure Leucin und Codon 25 für die Aminosäure Arginin.

B: Mutation in Codon 10 und Codon 25.

An Position +869 des hTGF- β 1 Gens wurde Thymin gegen Cytosin ausgetauscht. Zusätzlich wurde an Position +915 Guanin durch Cytosin ersetzt. Das nach Transkription und Translation entstehende Protein trug an 10. und 25. Stelle ein Prolin.

C: Mutation in Codon 10.

In dieser möglichen Allelvariante stand an Position +869 des Gens ein Cytosin. Daraus resultierte ein Aminosäureaustausch an Position 10. Codon 25 kodierte wie in der Wildtypvariante für Arginin.

Das Fragment des ersten Plasmides kodierte in Codon 10 und Codon 25 des hTGF- β 1 Gens für die Kombination Leucin (CTG) und Arginin (CGG). Der zweite Plasmid trug eine Genkassette, die sowohl in Codon 10 als auch in Codon 25 für Prolin (CCG) kodierte, entsprechend einem Basenpaaraustausch an Position +869 von Thymin durch Cytosin und an Position +915 von Guanin durch Cytosin. Die Codierung des dritten Plasmids entsprach der Sequenz für Prolin (CCG) in Codon 10 und Arginin (CGG) in Codon 25.

Diese Plasmide wurden ebenso wie der pCMV-Tag4A-*full-length*-hTGF- β 1 Vektor mit den Restriktionsenzymen *Pst*I und *Fse*I geschnitten. Die verdauten Proben wurden auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen und die DNA im elektrischen Feld aufgetrennt. Fragmente und linearisierter Vektor wurden aus dem Gel eluiert und die DNA aufgereinigt. Im nächsten Schritt wurden die hTGF- β 1 Genfragmente in den mit *Pst*I und *Fse*I geschnittenen pCMV-Tag4A-*full-length*-hTGF- β 1 Vektor kloniert. Die drei neu synthetisierten zirkulären Plasmide wurden mittels Plasmid-Minipräparation amplifiziert. Um die Insert-Vektor-Übergänge zu kontrollieren, wurde die gewonnene Plasmid-DNA sequenziert. Klone, die keinen Fehler aufwiesen, wurden durch Plasmid-Großpräparation vervielfältigt und die gewonnene DNA in den weiterführenden Zellkulturexperimenten eingesetzt.

5.3 Weiterführende Zellkulturexperimente

5.3.1 Experimente Zellkultur: Allgemeines

Wie in Kapitel 5.2 ausführlich beschrieben, wurde die Funktionalität der hTGF- β 1 Expressionsplasmide durch Western Blot Analysen, Immunfluoresz- bzw. konfokale Mikroskopie bewiesen. Danach musste entschieden werden, welcher dieser Vektoren für weiterführende Zellkulturexperimente eingesetzt werden sollte.

hTGF- β 1-EGFP wurde zwar konfokalmikroskopisch nachweisbar in beiden Zellsystemen exprimiert, konnte aber im Western Blot lediglich in der LX-2 Zelllinie detektiert werden. Damit eignete sich der pCMV-hTGF- β 1-EGFP Vektor nicht für weitere Untersuchungen.

Die beiden pCMV-Tag4A Expressionsvektorvarianten waren in beiden Zelllinien aktiv. Die Sekretionsrate des rekombinanten Proteins konnte durch die zusätzlichen C-terminalen Aminosäuren (CS) im pCMV-Tag4A-*full-length*-hTGF- β 1 Expressionsvektor, die im pCMV-Tag4A-hTGF- β 1 fehlten, nicht gesteigert werden. Es war aber davon auszugehen, dass die Eigenschaften des rekombinanten *full-length* hTGF- β 1-Flag denen des endogenen hTGF- β 1 am nächsten kamen. Aus diesem Grund war der pCMV-Tag4A-*full-length*-hTGF- β 1 Vektor Ausgangspunkt für die weiteren Experimente.

Im Folgenden soll noch einmal die Struktur des rekombinanten Fusionsproteins und der durch den anti-Flag M2 Antikörper nachweisbaren Produkte beschrieben werden:

Das rekombinante *full-length* hTGF- β 1-Flag Protein wurde wie das endogene TGF- β 1 als Prä-Pro-Protein synthetisiert. Dieses setzte sich aus dem N-terminalen Signalpeptid (AS 1-29), LAP (AS 30-278), hTGF- β 1 (AS 279-390) und dem daran gebundenen Flag-Oktapeptid (AS 391-398) zusammen. Während der post-translationalen Modifikation wurde das Signalpeptid durch eine Signalpeptidase abgespalten. Das Pro-hTGF- β 1-Flag umfasste LAP, hTGF- β 1 und C-terminal das fusionierte Flag. Im nächsten Schritt trennte die Pro-Protein-konvertase Furin LAP und hTGF- β 1-Flag, die nicht kovalent verbunden blieben. Unter nicht reduzierenden Bedingungen lagen die Pro-Form und das mature hTGF- β 1-Flag als Dimere vor. Das dimere LAP blieb nach Abspaltung nicht kovalent mit dem dimeren hTGF- β 1-Flag assoziiert.

Nach Dissoziation konnte LAP nicht mehr detektiert werden. Durch Reduktion und anschließende 10-minütige Erwärmung auf 95°C wurden die Disulfidbrücken getrennt. Das Molekulargewicht des monomeren Pro-hTGF- β 1-Flag betrug etwa 50 kDa, das des monomeren maturen TGF- β 1-Flag etwa 13 kDa.

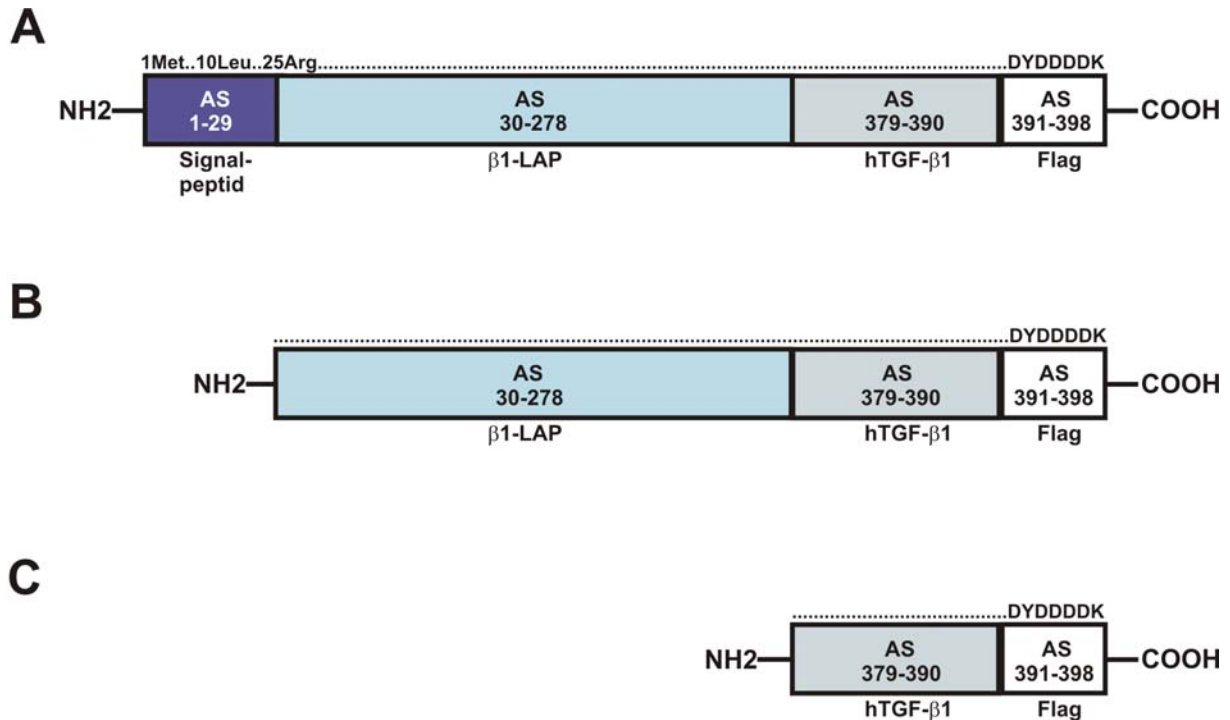


Abb. 43: Darstellung der monomeren detektierbaren hTGF-β1-Flag-Formen im Laufe der post-translationalen Modifikation.

Signalpeptid AS 1-29, LAP AS 30-278, hTGF-β1 AS 279-390, Flag AS 391-398.

A: Prä-Pro-hTGF-β1-Flag.

Prä-Pro-hTGF-β1 umfasst 398 Aminosäuren. Das Protein beginnt N-terminal mit dem Signalpeptid, darauf folgen die Aminosäuresequenzen von LAP, hTGF-β1 und dem fusionierten Flag.

Die Proteine der drei synthetisierten pCMV-Tag4A-*full-length*-hTGF-β1 Konstrukte unterschieden sich in der 10. und/oder 25. Aminosäure des Signalpeptids.

B: Pro-hTGF-β1-Flag.

Pro-hTGF-β1-Flag umfasst 369 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 50 kDa. Das Protein setzt sich zusammen aus LAP, hTGF-β1 und dem fusionierten Flag.

C: hTGF-β1-Flag.

hTGF-β1-Flag umfasst 121 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von etwa 13 kDa. Das Protein besteht nur noch aus der Aminosäuresequenz des murens hTGF-β1 gekoppelt mit dem Flag-Oktapeptid.

Des weiteren mussten geeignete Analyseverfahren ausgewählt und etabliert werden. Die grundlegende Methode zum Nachweis des rekombinanten hTGF-β1 war der Western Blot, der mit anti-Flag M2 als Primärantikörper durchgeführt wurde. Um das in geringer Menge sezernierte Protein sensibler und semiquantitativ nachweisen zu können, wurde ein neuer ELISA etabliert. Für diesen Flag-ELISA wurden eine mit anti-Flag M2 Antikörper beschichtete 96-Well Platten verwendet. Das rekombinante Fusionsprotein wurde über das Flag-Oktapeptid an die Platten gebunden. Nach dem ersten Waschschrift wurden die restlichen Proteine inklusive dem eventuell endogen synthetisierten oder im Medium enthaltenen TGF-β1 entfernt. Als Detektionsantikörper diente ein biotinilierter TGF-β1 Antikörper, der ausschließlich die rekombinanten hTGF-β1-Formen detektieren konnte.

5.3.2 Einflüsse von Furin und LTBP-1 auf die hTGF- β 1 Synthese, Prozessierung und Sekretion

Durch die Ko-Expression von hTGF- β 1-Flag, der Pro-Proteinkonvertase Furin und/oder dem *latent TGF- β binding protein-1* sollte deren Einfluss auf die TGF- β 1 Synthese und Sekretion in CHO und LX-2 Zellen untersucht werden.

Die beiden Zelllinien wurden nach dem in Abschnitt 4.3.6 beschriebenen Protokoll transfiziert. Jeweils eine Zellgruppe der CHO bzw. LX-2 Zellen wurde nicht transfiziert und diente als Negativkontrolle. Eine Zellpopulation wurde mit 1 μ g hTGF- β 1-Flag Expressionsvektor, eine mit 1 μ g hTGF- β 1-Flag Expressionsvektor und 1 μ g Furin Expressionsplasmid, eine mit 1 μ g hTGF- β 1-Flag, 1 μ g Furin und 1 μ g LTBP-1 Expressionsplasmid und eine Zellreihe mit 1 μ g hTGF- β 1-Flag Expressionsvektor und 1 μ g LTBP-1 Expressionsplasmid transfiziert. In Vorversuchen konnte nach Transfektion der LX-2 Zellen ein massiver Zelluntergang beobachtet werden. Je mehr Fugene eingesetzt worden war, desto geringer war die Zelldichte. Aus diesem Grund wurden alle LX-2 Zellen mit insgesamt 3 μ g DNA transfiziert. Die Gruppen, in die nach dem Transfektionsschema weniger DNA eingebracht werden musste, wurden zusätzlich mit dem Blue Script Plasmid als Leervektor transfiziert.

Die Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und 72 Stunden nach Transfektion geerntet. Der Überstand wurde vor weiteren Analysen gefriergetrocknet und das Lyophilisat in Ripa + Complete aufgenommen. Der Proteingehalt von Zelllysaten und Überständen wurde mittels DC-Testung bestimmt. Dieser Schritt war notwendig, um das eingesetzte Volumen der Proben auf Proteingehalt zu normieren und einen Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen.

Mit den Proben der Zelllysate und Überstände wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Die Proben wurden mit 4x SDS-Gelladepuffer und 3-5 μ l DTT versetzt, 10 Minuten auf 95°C erhitzt und auf ein 8-12%iges Bis-Tris-Gel geladen. Neben der Negativkontrolle wurde die Probe der allein mit pCMV-Tag4A-*full-length*-hTGF- β 1 transfizierten Zellen aufgetragen. Es folgte eine Spur der Zellen, die zusätzlich mit dem Furin Konstrukt transfiziert worden waren, eine Spur, der mit hTGF- β 1-Flag, Furin und LTBP-1 ko-transfizierten Zellen, und zuletzt die Spur, der mit hTGF- β 1-Flag und LTBP-1 Plasmid transfizierten Zellen. Zur Bestimmung der Lauffront und zur Abschätzung der Molekulargewichte wurde der Seebule Marker eingesetzt. Nach SDS-Gelelektrophorese wurden die immobilisierten Proteine mittels Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und die Flag-gekoppelten Proteine mit dem anti-Flag M2 Antikörper detektiert. In den Zelllysaten konnte das Pro-hTGF- β 1-Flag-Fusionsprotein, in den Überständen zusätzlich das mature hTGF- β 1-Flag nachgewiesen werden.

Um neben den hTGF- β 1-Flag Proteinen auch die Expression von Furin bzw. LTBP-1 zu beweisen, wurden weitere Western Blot Analysen durchgeführt. Dabei wurde neben dem anti-Flag M2 Antikörper ein Antikörper gegen Furin und ein Antikörper gegen LTBP-1 eingesetzt. Zum Nachweis von Furin wurden die Proben auf ein 8-12%iges Bis-Tris-Gel geladen. Dagegen wurde zur Detektion des hochmolekularen LTBP-1 ein 3-8%iges Tris-Acetat-Gel verwendet.

Zur weiteren Analyse der Einflüsse von Furin und LTBP-1 auf die hTGF- β 1-Konzentration in Zelllysate und Überstand von CHO und LX-2 Zellen wurde der in Abschnitt 4.3.14 beschriebene Flag-ELISA eingesetzt. Jede Probe wurde in Dreifachbestimmung gemessen und die Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt, um sicher zu stellen, dass die Ergebnisse reproduzierbar sind. Da bei dem neu entwickelten ELISA keine Standards zur Verfügung standen, musste mit relativen Werten gearbeitet werden. Von den Absorptionswerten jeder Probe wurde der Mittelwert gebildet. Der Mittelwert der jeweiligen Negativkontrolle wurde von den anderen Werten subtrahiert. Die Probe, der allein mit dem hTGF- β 1-Flag Expressionsplasmid transfizierten Zellen, wurde gleich 1 gesetzt. Zuletzt wurden die Signifikanzen mit dem t-Test berechnet, dabei wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 festgelegt.

5.3.2.1 Ko-Expression von hTGF- β 1, Furin und/oder LTBP-1 in CHO Zellen

Für die Western Blot Analysen der CHO Zelllysate wurden 20-50 μ g Protein jeder Probe eingesetzt. Die Western Blots zeigten eine erhöhte Pro-hTGF- β 1-Flag-Konzentration im Zelllysate der Zellen, die neben dem hTGF- β 1-Flag Expressionskonstrukt auch mit dem Furin und/oder LTBP-1 Expressionsplasmid transfiziert worden waren. Die Pro-hTGF- β 1-Flag-Bande bei einem Molekulargewicht zwischen 44 kDa und 56 kDa war in der einfach transfizierten CHO Zellpopulation schwach ausgeprägt. Der Einfluss von Furin und LTBP-1 auf die Expression von hTGF- β 1-Flag bzw. auf dessen Konzentration im Zelllysate war in den einzelnen Experimenten unterschiedlich. In einigen Versuchen war die Pro-hTGF- β 1-Flag-Konzentration in den Zellen, die nur hTGF- β 1-Flag und LTBP-1 exprimierten, am höchsten und in denen, die zusätzlich allein Furin überexprimierten nahm die Konzentration nur leicht zu. In anderen Experimenten stieg die Konzentration in allen mehrfach transfizierten Zellen stark an, sodass sich kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Proben ergaben. Insgesamt war festzustellen, dass Furin und LTBP-1 den hTGF- β 1-Flag-Gehalt der Zellen beeinflussten.

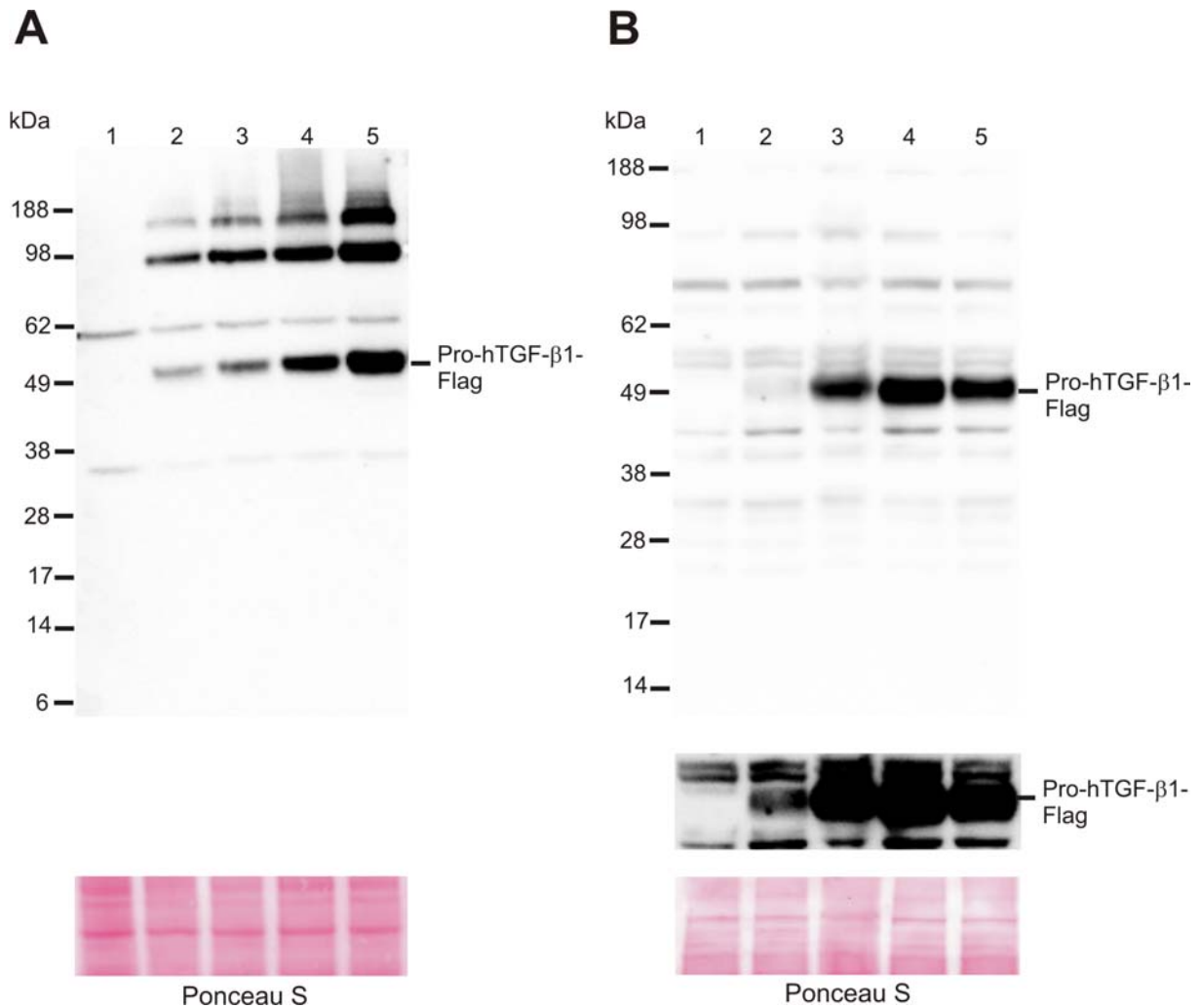


Abb. 44: Western Blot der Zelllysate von CHO Zellen, 8-12%iges Bis-Tris-Gel.

Dargestellt sind zwei Western Blots von CHO Zelllysaten. Aufgetragen wurden 30 µg Protein des Zelllysates von nicht transfizierten, mit hTGF-β1-Flag Expressionsplasmid transfizierten und zusätzlich mit Furin und/oder LTBP-1 Expressionsplasmid transfizierten CHO Zellen. Die Ponceau S Färbungen dienen als Ladekontrolle und bestätigten die gleich aufgetragene Proteinmenge.

Spur 1: Negativkontrolle

Spur 2: Zellen transfiziert mit 1 µg hTGF-β1-Flag Expressionsplasmid

Spur 3: Zellen transfiziert mit 1 µg hTGF-β1-Flag Expressionsplasmid + 1 µg Furin Expressionsplasmid

Spur 4: Zellen transfiziert mit 1 µg hTGF-β1-Flag Expressionsplasmid + 1 µg Furin Expressionsplasmid + 1 µg LTBP-1 Expressionsplasmid

Spur 5: Zellen transfiziert mit 1 µg hTGF-β1-Flag Expressionsplasmid + 1 µg LTBP-1 Expressionsplasmid

A: Die Bande oberhalb der 49 kDa Bande des Markers entspricht dem Pro-hTGF-β1-Flag-Fusionsprotein, welches im Western Blot bei einem Molekulargewicht von 44-56 kDa läuft. Die Negativkontrolle ist für diese Bande leer. Daneben erkennt man einige unspezifische Banden. Auffallend ist die stetige Zunahme der Bandenintensität von Spur 2 bis Spur 5. Die Zelllysateproben der Zellen, die allein hTGF-β1-Flag überexprimierten, zeigen eine verhältnismäßig schwache Proteinbande. In Spur 4 und Spur 5 lässt sich bedeutend mehr rekombinantes hTGF-β1-Flag nachweisen.

B: Die Pro-hTGF-β1-Flag-Proteinbande liegt auch in diesem Blot etwa auf Höhe der 49 kDa Bande des Seebblue Markers. Die Negativkontrolle ist für diese Bande leer. Die Bande in Spur 2 ist schwach ausgeprägt und nur bei langer Belichtung (kleine Abbildung) deutlich zu erkennen. Die ko-transfizierten Zellen zeigen eine deutlich stärkere Expression des rekombinanten hTGF-β1-Flag.

Von den Proteinen der Überstände wurden im Western Blot zwischen 80 und 150µg eingesetzt. Die Western Blots der Überstände zeigten analog zu denen der Zelllysate einen Einfluss von Furin bzw. LTBP-1 auf die hTGF-β1-Flag-Konzentration des untersuchten Materials.

Im Überstand konnte eine Zunahme des Signals sowohl des Pro-hTGF-β1-Flag als auch des muren hTGF-β1-Flag-Monomers beobachtet werden. In den Proben der Furin über-exprimierenden CHO Zellen konnte eine gesteigerte Spaltung des Pro-hTGF-β1-Flag in LAP und hTGF-β1-Flag nachgewiesen werden. Die Pro-hTGF-β1-Flag-Bande setzte sich in den anderen Proben aus zwei Proteinbanden mit leicht unterschiedlichen Molekulargewichten zusammen. Wurde die Pro-Proteinkonvertase Furin überexprimiert, verschwand die höher-molekulare Bande. In den Zellen, die hTGF-β1-Flag und LTBP-1 überexprimierten, zeigte sich eine starke Zunahme der Pro-hTGF-β1-Flag-Konzentration im Überstand. Auch die Konzentration des muren hTGF-β1-Flag konnte durch Ko-Expression gesteigert werden. In welcher Probe die Konzentration am stärksten anstieg, konnte in den Experimenten variieren. In manchen Versuchen war die hTGF-β1-Flag-Konzentration des Überstandes in den nur mit dem LTBP-1 Expressionsplasmid ko-transfizierten Zellen am höchsten. In anderen Experimenten zeigten dagegen die Western Blots der Überstände der dreifach transfizierten Zellen die stärksten Proteinbanden.

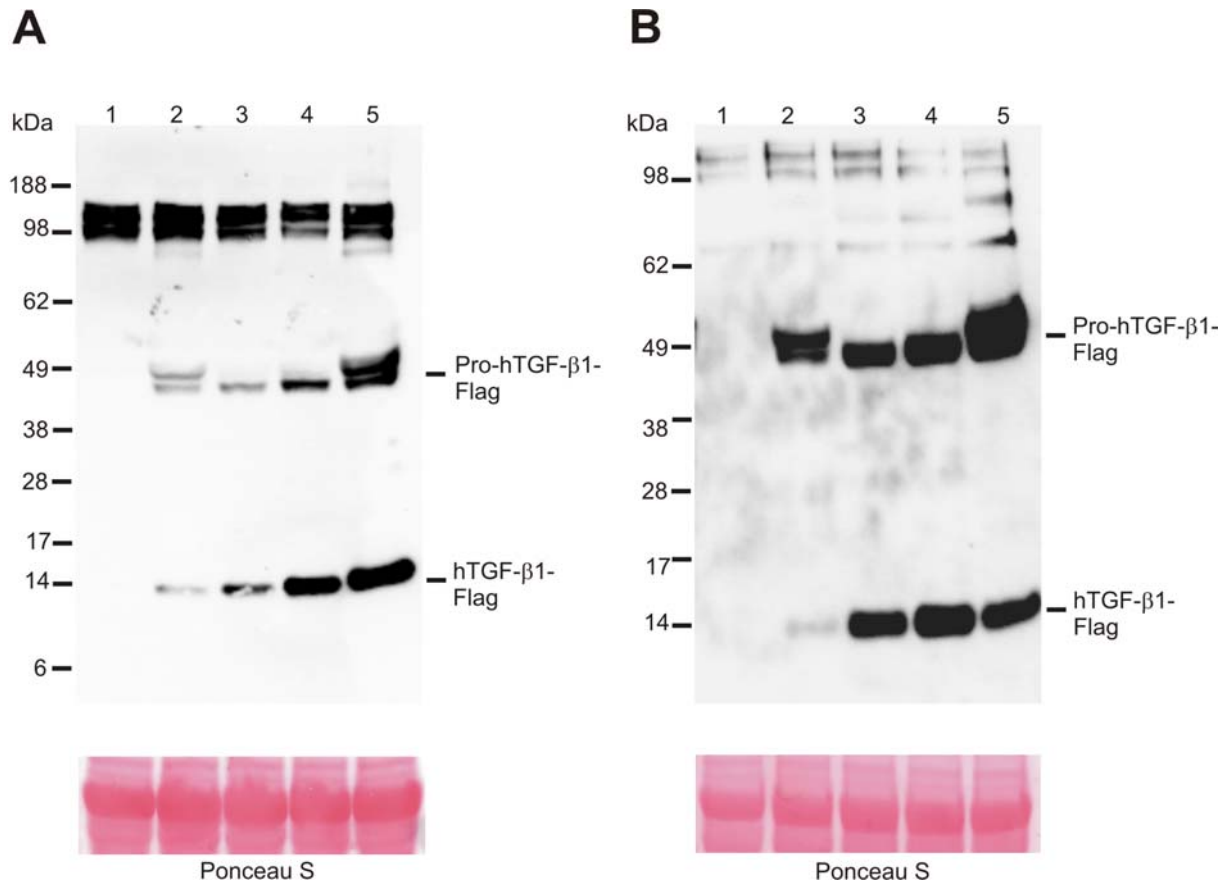


Abb. 45: Western Blot der Überstände von CHO Zellen, 8-12%iges Bis-Tris-Gel.

Dargestellt sind zwei Western Blots. Aufgetragen wurden die Überstände von nicht transfizierten, mit hTGF-β1-Flag Expressionsplasmid transfizierten und zusätzlich mit Furin und/oder LTBP-1 Expressionsplasmid transfizierten CHO Zellen. Die Proben wurden durch 5µl DTT reduziert. Die Ponceau S Färbungen dienen als Ladekontrolle und bestätigten die gleich aufgetragene Proteinmenge.

Spur 1: Negativkontrolle

Spur 2: Zellen transfiziert mit 1µg hTGF-β1-Flag Expressionsplasmid

Spur 3: Zellen transfiziert mit 1µg hTGF-β1-Flag Expressionsplasmid + 1µg Furin Expressionsplasmid

Spur 4: Zellen transfiziert mit 1µg hTGF-β1-Flag Expressionsplasmid + 1µg Furin Expressionsplasmid + 1µg LTBP-1 Expressionsplasmid

Spur 5: Zellen transfiziert mit 1µg hTGF-β1-Flag Expressionsplasmid + 1µg LTBP-1 Expressionsplasmid.

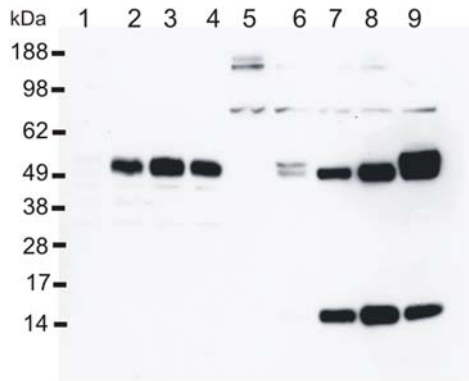
Die Banden um 49 kDa entsprechen dem monomeren Pro-hTGF-β1-Flag, die zwischen 12 kDa und 14 kDa kennzeichnen das monomere mature hTGF-β1-Flag. Die Negativkontrollen zeigen diese Banden nicht.

A: Aufgetragen wurden je 80µg Protein der Überstände. Die Pro-hTGF-β1-Flag-Bande setzt sich in Spur 2 und Spur 5 aus zwei Banden zusammen, die höher molekulare Bande fehlt in den Spuren 3 und 4, entsprechend den Proben der Furin exprimierenden Zellen. Die Intensität dieser Banden nimmt von Spur 2 bis Spur 5 zu. Auch die hTGF-β1-Flag-Konzentration steigt von Spur 2 bis Spur 5 an.

B: Aufgetragen wurden 100µg Protein der Überstände. Die Pro-hTGF-β1-Flag-Bande setzt sich in Spur 2 und Spur 5 aus zwei Banden zusammen, die höher molekulare Bande fehlt in den Spuren 3 und 4, entsprechend den Proben der Furin exprimierenden Zellen. Die Intensität sowohl der Pro-hTGF-β1-Flag als auch der hTGF-β1-Flag-Bande ist in den Spuren 3-5 deutlich höher als in Spur 2.

Zudem wurden die Expressionen von Furin und LTBP-1 mittels Western Blot überprüft. Mit dem gegen Furin gerichteten Antikörper konnte im Zelllysate der mit Furin Konstrukt kointransfizierten Zellen die hauptsächlich im trans-Golgi Netzwerk lokalisierte Proteinase nachgewiesen werden. Im Überstand zeigten sich keine Banden.

Die Konzentration von LTBP-1 in Zelllysaten und Überständen reichte nicht aus, um dieses Protein detektieren zu können. Spezifische Banden waren in keiner Probe zu erkennen. Allerdings konnte in Vorexperimenten gezeigt werden, dass LTBP-1 in anderen Zellsystemen wie COS und HEK Zellen exprimiert wird. Aufgrund dieser Ergebnisse und dem deutlichen Einfluss der Ko-Expression auf das hTGF- β 1-Flag-Signal im Western Blot, war auch von einer Funktion des LTBP-1-Expressionplasmids in CHO Zellen auszugehen.

A

A: Western Blot, 8-12%iges Bis-Tris-Gel, anti-Flag Antikörper.

Aufgetragen wurden 30µg Protein der Zelllysate (Spur 1 bis Spur 4) und 100µg Protein der Überstände (Spur 5 bis Spur 9) reduziert durch 5µl DTT.

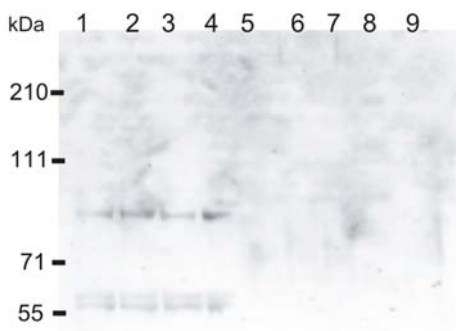
Bei einem Molekulargewicht von 44-49 kDa zeigt sich die Pro-hTGF- β 1-Flag Banden. Zwischen 12-14 kDa ist das hTGF- β 1-Flag zu erkennen.

B

B: Western Blot, 8-12%iges Bis-Tris-Gel, anti-Furin Antikörper.

Aufgetragen wurden 30µg Protein der Zelllysate (Spur 1 bis Spur 4) und 100µg Protein der Überstände (Spur 5 bis Spur 9) reduziert durch 5µl DTT.

In Spur 2 und Spur 3 ist die Bande der überexprimierten Pro-Proteinconvertase Furin nachzuweisen. In den Proben der Überstände sind keine Banden zu erkennen.

C

C: Western Blot, 3-8%iges Tris-Acetat-Gel, anti-LTBP-1 Antikörper.

Aufgetragen wurden 50µg Protein der Zelllysate (Spur 1 bis Spur 4) und 300µg Protein der Überstände (Spur 5 bis Spur 9) reduziert durch 5µl DTT.

Die Proben der mit LTBP-1 Expressionskonstrukt transfizierten Zellen zeigen keine LTBP-1 Bande, die bei einem Molekulargewicht von etwa 121 kDa zu erwarten wäre.

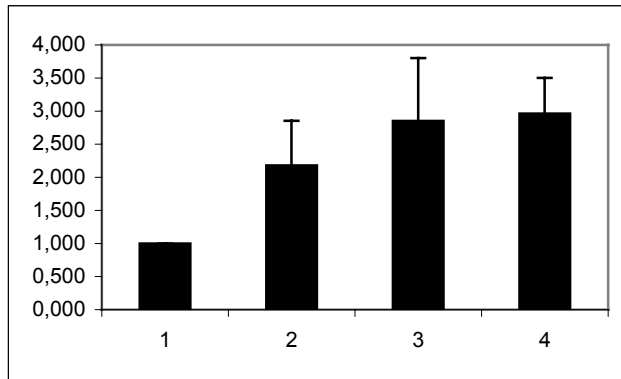
Abb. 46: Western Blots mit anti-Flag (A), anti-Furin (B) bzw. anti-LTBP-1 (C) Primärantikörper. Spur 1-4: Zelllysate, Spur 5-9: Überstand.

Spur 5: neg. Kontrolle, Spur 1+6: transfiziert mit hTGF- β 1-Flag Vektor, Spur 2+7: transfiziert mit hTGF- β 1-Flag + Furin Vektor, Spur 3+8: transfiziert mit hTGF- β 1-Flag + Furin + LTBP-1 Vektor, Spur 4+9: transfiziert mit hTGF- β 1-Flag + LTBP-1 Vektor.

Bei den ELISA Analysen wurden bei den Zelllysaten 100µg Protein pro Well und bei den Überständen 200µg Protein pro Well eingesetzt.

Die zusätzliche Furin Expression führte in den ELISA Analysen der Zelllysate durchschnittlich zu einem $2,18 \pm 0,67$ -fachen Anstieg der Absorptionswerte. Im t-Test berechnete sich eine tendenzielle Signifikanz bei einem p-Wert von 0,0686. Die Ko-Expression von hTGF-β1-Flag und LTBP-1 ergab mit einem Anstieg auf das $2,96 \pm 0,54$ -fache signifikant höhere Absorptionswerte mit $p=0,0068$. Wenn Furin und LTBP-1 ko-exprimiert wurden, beeinflusste diese Kombination die Konzentration von hTGF-β1-Flag im Zelllysate um das $2,85 \pm 0,95$ -fache. Bei einem p-Wert von 0,051 ergab sich ein tendenziell signifikanter Anstieg der bei 450nm gemessenen Absorption.

Die Analyse der Überstände ergab einen tendenziell signifikanten Einfluss der zusätzlichen Furin Expression mit einem p-Wert von 0,0686 um das $1,59 \pm 0,338$ -fache. Die dreifach transfizierten Zellen zeigten, verglichen mit den allein mit hTGF-β1-Flag Expressionsplasmid transfizierten CHO Zellen, signifikant höhere Absorptionen ($p=0,0214$) bei einem durchschnittlichen Anstieg um das $2,37 \pm 0,27$ -fache. Der Einfluss der Überexpression von LTBP-1 zusammen mit hTGF-β1-Flag führte zu einem signifikanten Anstieg der relativen Absorptionswerte mit $p=0,0015$. Das entsprach einer Erhöhung der gemessenen Absorption um das $2,49 \pm 0,27$ -fache.



A: ELISA Ergebniss des Zelllysates.

Y-Achse: relative Werte

X-Achse: Proben

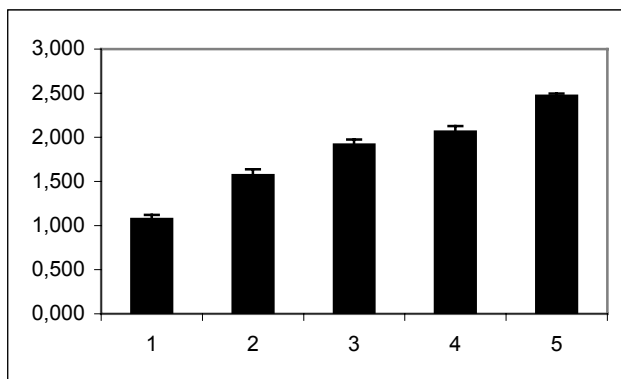
1: Expression von hTGF- β 1-Flag, Wert gleich eins gesetzt

2: Expression von hTGF- β 1-Flag + Furin

3: Expression von hTGF- β 1-Flag, Furin + LTBP-1

4: Expression von hTGF- β 1-Flag + LTBP-1

Die zusätzliche Expression von Furin und/oder LTBP-1 führt zu einer Erhöhung der Absorption hier als rel. Werte angegeben.



B: Beispiel 1

ELISA Ergebniss des Zelllysates.

Y-Achse: Absorption bei 450nm

X-Achse: Proben

1: Negativkontrolle

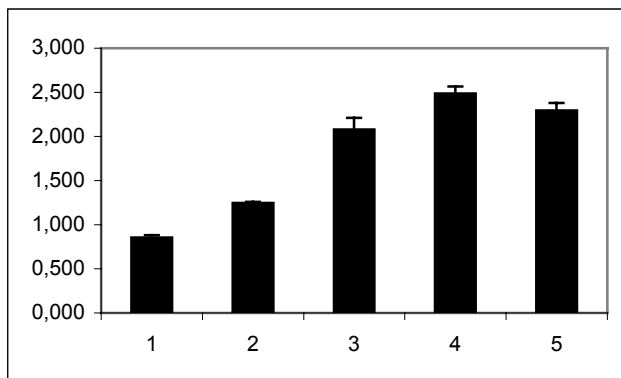
2: Expression von hTGF- β 1-Flag

3: Expression von hTGF- β 1-Flag + Furin

4: Expression von hTGF- β 1-Flag, Furin + LTBP-1

5: Expression von hTGF- β 1-Flag + LTBP-1

Die Absorption steigt bei Ko-Expression des hTGF- β 1-Flag mit Furin bzw. LTBP-1.



C: Beispiel 2

ELISA Ergebniss des Zelllysates.

Y-Achse: Absorption bei 450nm

X-Achse: Proben

1: Negativkontrolle

2: Expression von hTGF- β 1-Flag

3: Expression von hTGF- β 1-Flag + Furin

4: Expression von hTGF- β 1-Flag, Furin + LTBP-1

5: Expression von hTGF- β 1-Flag + LTBP-1

Die Absorption steigt bei Ko-Expression des hTGF- β 1-Flag mit Furin bzw. LTBP-1.

Abb. 47: ELISA Zelllysate.

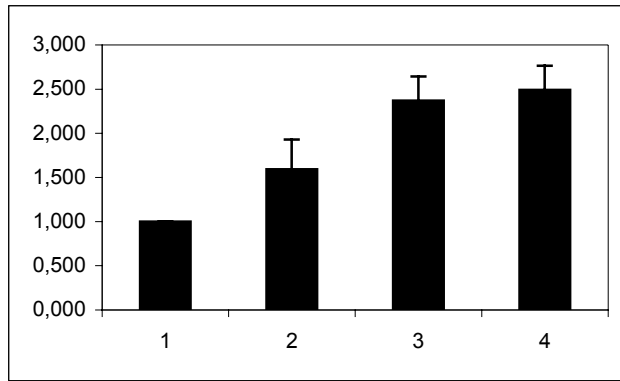
Dargestellt sind Ergebnis der ELISA Analysen.

A: Ergebnis nach dreimaliger Durchführung der Experimente.

Bei jedem Versuch wurde der Mittelwert der Negativkontrolle von den anderen Mittelwerten subtrahiert. Der Mittelwert, der allein mit dem hTGF- β 1-Flag Expressionsplasmid transfizierten Probe, wurde gleich 1 gesetzt. Mittelwert und Standardabweichung wurden berechnet.

B+C: Beispiele für ELISA Analysen.

Auf der Y-Achse sind keine relativen Werte, sondern die absoluten Absorptionswerte bei 450nm angegeben. Die beiden Beispiele zeigen, dass die Absorption in unterschiedlicher Ausprägung beeinflusst wurde, was im Gesamtergebnis der ELISA Analysen zu großen Standardabweichungen führte.



A: ELISA Ergebniss des Überstandes.

Y-Achse: relative Werte

X-Achse: Proben

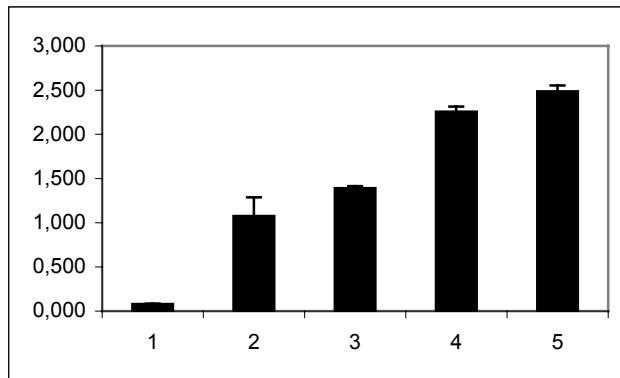
1: Expression von hTGF- β 1-Flag, Wert gleich eins gesetzt

2: Expression von hTGF- β 1-Flag + Furin

3: Expression von hTGF- β 1-flag, Furin + LTBP-1

4: Expression von hTGF- β 1-Flag + LTBP-1

Die zusätzliche Expression von Furin und/oder LTBP-1 führt zu einer Erhöhung der Absorption, hier als rel. Werte angegeben.



B: Beispiel 1

ELISA Ergebniss des Überstandes.

Y-Achse: Absorption bei 450nm

X-Achse: Proben

1: Negativkontrolle

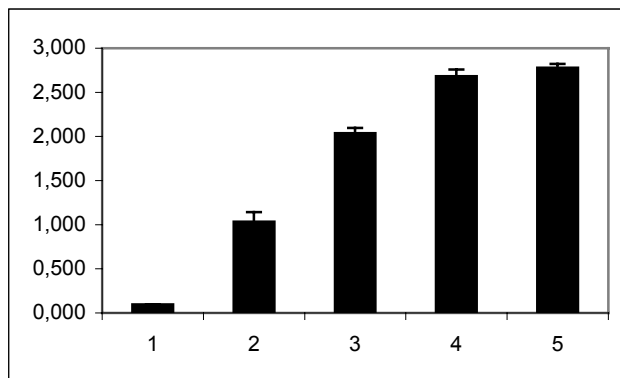
2: Expression von hTGF- β 1-Flag

3: Expression von hTGF- β 1-Flag + Furin

4: Expression von hTGF- β 1-Flag, Furin + LTBP-1

5: Expression von hTGF- β 1-Flag + LTBP-1

Die Absorption steigt bei Ko-Expression des hTGF- β 1 mit Furin bzw. LTBP-1.



C: Beispiel 2

ELISA Ergebniss des Überstandes.

Y-Achse: Absorption bei 450nm

X-Achse: Proben

1: Negativkontrolle

2: Expression von hTGF- β 1-Flag

3: Expression von hTGF- β 1-Flag + Furin

4: Expression von hTGF- β 1-Flag, Furin + LTBP-1

5: Expression von hTGF- β 1-Flag + LTBP-1

Die Absorption steigt bei Ko-Expression des hTGF- β 1 mit Furin bzw. LTBP-1.

Abb. 48: ELISA Überstände.

Dargestellt sind Ergebnis der ELISA Analysen.

A: Ergebnis nach dreimaliger Durchführung der Experimente.

Bei jedem Versuch wurde der Mittelwert der Negativkontrolle von den anderen Mittelwerten subtrahiert. Der Mittelwert, der allein mit dem hTGF- β 1-Flag Expressionsplasmid transfizierten Probe, wurde gleich 1 gesetzt. Mittelwert und Standardabweichung wurden berechnet.

B+C: Beispiele für ELISA Analysen.

Auf der Y-Achse sind keine relativen Werte, sondern die absoluten Absorptionswerte bei 450nm angegeben.

5.3.2.2 Ko-Expression von hTGF- β 1, Furin und/oder LTBP-1 in LX-2 Zellen

Von den Zelllysaten jeder Probe der LX-2 Zellkulturen wurden in den Western Blot Analysen 10-20 μ g Protein eingesetzt.

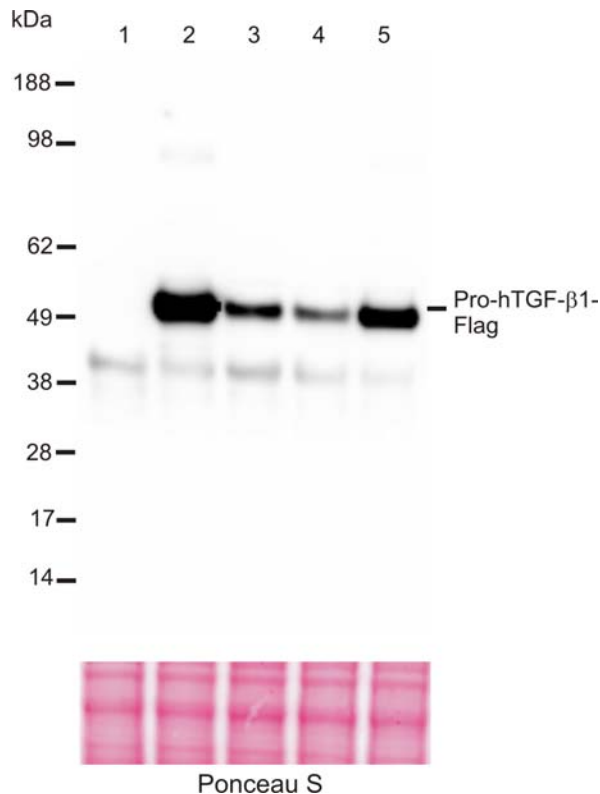


Abb. 49: Western Blot der Zelllysate von LX-2 Zellen, 8-12%iges Bis-Tris-Gel.

Dargestellt ist ein Western Blot von Zelllysaten nicht transfizierter, mit hTGF- β 1-Flag Expressionsplasmid transfizierter und zusätzlich mit Furin und/oder LTBP-1 Expressionsplasmid transfizierter LX-2 Zellen. Aufgetragen wurden 15 μ g Protein. Die Ponceau S Färbung diente als Ladekontrolle und bestätigte die gleich aufgetragene Proteinmenge.

Spur 1: Negativkontrolle

Spur 2: Zellen transfiziert mit 1 μ g hTGF- β 1-Flag Expressionsplasmid

Spur 3: Zellen transfiziert mit 1 μ g hTGF- β 1-Flag Expressionsplasmid + 1 μ g Furin Expressionsplasmid

Spur 4: Zellen transfiziert mit 1 μ g hTGF- β 1-Flag Expressionsplasmid + 1 μ g Furin Expressionsplasmid + 1 μ g LTBP-1 Expressionsplasmid

Spur 5: Zellen transfiziert mit 1 μ g hTGF- β 1-Flag Expressionsplasmid + 1 μ g LTBP-1 Expressionsplasmid

Die Bande oberhalb der 49 kDa Bande des Markers entspricht dem Pro-hTGF- β 1-Flag-Fusionsprotein, welches im Western Blot bei einem Molekulargewicht von 44-56 kDa lief. Die Negativkontrolle ist für diese Bande leer. Daneben ist in Negativkontrolle und Proben eine unspezifische Bande zu erkennen.

Die Pro-hTGF- β 1-Flag-Bande in Spur 2 ist im Vergleich zu den Spuren 3-5 in Dicke und Farbtintensität am stärksten. In Spur 3 und Spur 4 stellt sich die Proteinbande weitaus schmaler und heller dar, wobei sie in Spur 4 die geringste Intensität aufweist. Die Pro-hTGF- β 1-Flag-Bande in Spur 5 ist schwächer als die der Spur 2, aber stärker als die der Spuren 3 und 4.

Die Western Blot Analysen ergaben eine niedrigere Pro-hTGF- β 1-Flag-Konzentration im Zelllysate der Zellen, die neben dem hTGF- β 1-Flag Expressionskonstrukt auch mit dem Furin und/oder LTBP-1 Expressionsplasmid transfiziert worden waren. Die Pro-hTGF- β 1-Flag-

Bande bei einem Molekulargewicht zwischen 44 kDa und 56 kDa zeigte in der nur einfach transfizierten LX-2 Zellpopulation die stärkste Intensität und Dicke. Das Maß des Einflusses von Furin und LTBP-1 auf die Expression von hTGF- β 1-Flag bzw. auf dessen Konzentration im Zelllysate war unterschiedlich. Dabei war die Pro-hTGF- β 1-Flag Konzentration in den Zelllysaten der Zellen, die nur hTGF- β 1-Flag und LTBP-1 exprimierten, am höchsten und in den Zellen, die alle drei Proteine überexprimierten, am niedrigsten. In allen Versuchen beeinflussten Furin und LTBP-1 den hTGF- β 1-Flag-Gehalt der Zellen. Anders als bei den CHO Zellen senkte die Ko-Expression in der LX-2 Zelllinie die intrazelluläre Konzentration des rekombinanten hTGF- β 1-Flag.

Von den Proteinen der Überstände wurden im Western Blot zwischen 80 μ g und 100 μ g eingesetzt. Die Western Blots der Überstände zeigten eine Suppression der muren hTGF- β 1-Flag-Konzentration durch zusätzliche Transfektion mit dem Furin und/oder LTBP-1 Expressionsplasmid. In einigen Western Blots nahm die hTGF- β 1-Flag-Konzentration in allen drei Proben stark ab. In anderen Western Blots war deutlicher zu erkennen, dass die detektierbare Menge an hTGF- β 1-Flag in den Proben, die zusätzlich LTBP-1 aber nicht Furin exprimierenden Zellen, am wenigsten abnahm. In den Überständen der mit dem hTGF- β 1-Flag, dem Furin und dem LTBP-1 Expressionsplasmid transfizierten Zellen, war das Signal im Western Blot am geringsten. Auffallend war, dass die Pro-hTGF- β 1-Flag-Bande in den Zellen, die Furin exprimierten, fehlte.

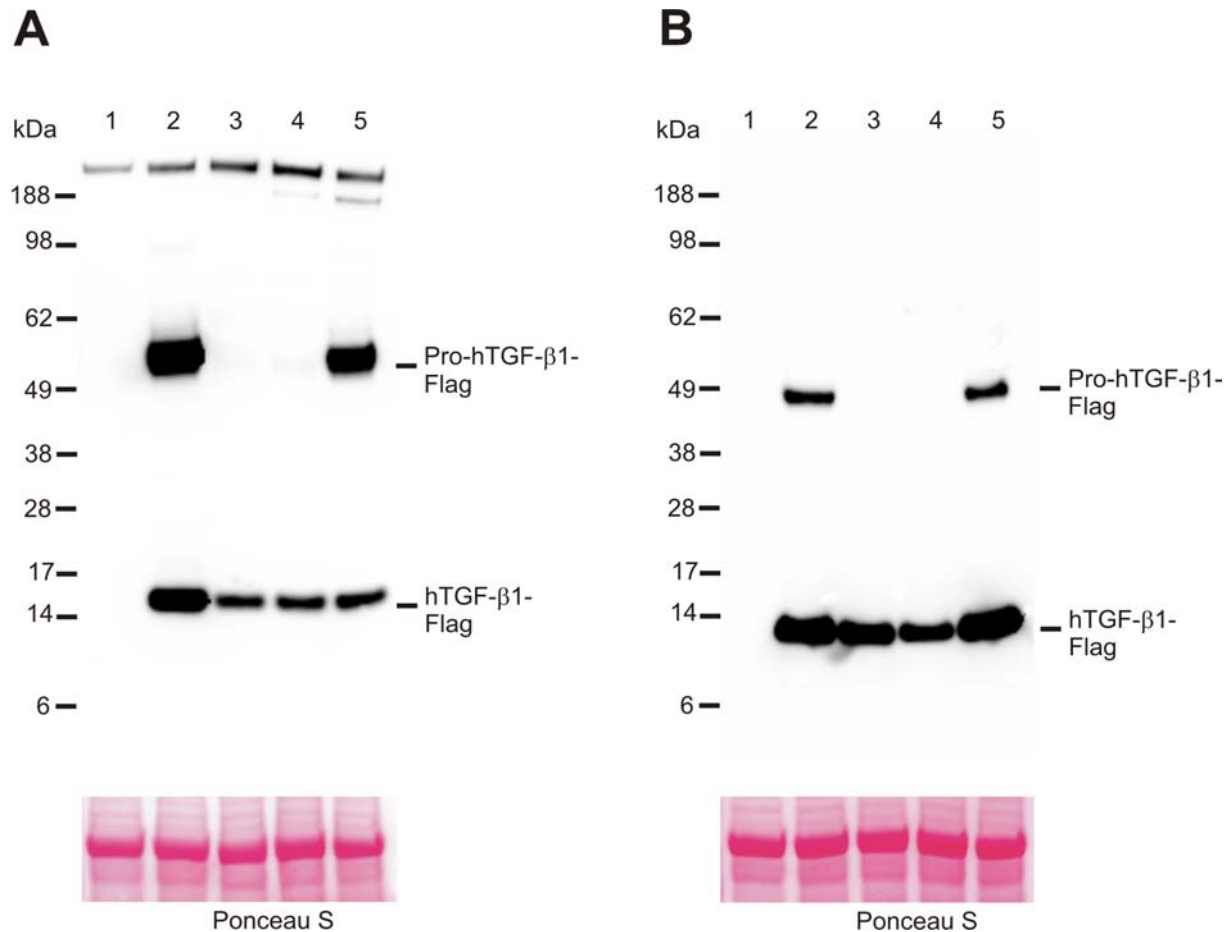


Abb. 50: Western Blot der Überstände von LX-2 Zellen, 8-12%iges Bis-Tris-Gel.

Dargestellt sind zwei Western Blots von LX-2 Zellüberständen. Aufgetragen wurde jeweils eine Probe nicht transfizierter, mit hTGF-β1-Flag Expressionsplasmid transfizierter und zusätzlich mit Furin und/oder LTBP-1 Expressionsplasmid transfizierter LX-2 Zellen. Die Proben wurden durch 5 µl DTT reduziert. Die Ponceau S Färbung dient als Ladekontrolle und bestätigt die gleich aufgetragene Proteinmenge.

Spur 1: Negativkontrolle

Spur 2: Zellen transfiziert mit 1 µg hTGF-β1-Flag Expressionsplasmid

Spur 3: Zellen transfiziert mit 1 µg hTGF-β1-Flag Expressionsplasmid + 1 µg Furin Expressionsplasmid

Spur 4: Zellen transfiziert mit 1 µg hTGF-β1-Flag Expressionsplasmid + 1 µg Furin Expressionsplasmid + 1 µg LTBP-1 Expressionsplasmid

Spur 5: Zellen transfiziert mit 1 µg hTGF-β1-Flag Expressionsplasmid + 1 µg LTBP-1 Expressionsplasmid

Die Banden um 49 kDa entsprechen dem monomeren Pro-hTGF-β1-Flag, die zwischen 12 kDa und 14 kDa kennzeichnen das monomere mature hTGF-β1-Flag. Die Negativkontrollen sind leer für diese Proteine.

A: Aufgetragen wurden je 50 µg Protein der Überstände. Die Pro-hTGF-β1-Flag-Bande ist nur in den Spuren 2 und 5 in etwa gleicher Intensität (in Spur 2 ein wenig stärker als in Spur 5) zu erkennen. Die Bande des maturated monomeren hTGF-β1-Flag verliert in den Spuren 3-5 an Intensität und Dicke. In Spur 2 ist diese am kräftigsten, gefolgt von Spur 5. Die Spuren 3 und 4 zeigen bei 12-14 kDa eine etwa gleich starke Bande, die schwächer ist als die in Spur 5 und viel schwächer als die in Spur 2.

B: Aufgetragen wurden 80 µg Protein der Überstände. Die Pro-hTGF-β1-Flag-Bande fehlt in den Spuren 3 und 4, d.h. in den Proben der Furin überexprimierenden Zellen. Die Bande des maturated hTGF-β1-Flag zeigt die stärkste Intensität in Spur 2 und Spur 5. In Spur 3 und 4 ist diese Bande nur schwach ausgeprägt, wobei Intensität und Dicke in Spur 4 am geringsten sind.

Der Nachweis von Furin und LTBP-1 erfolgte ebenfalls durch Western Blot Analysen.

Mit dem gegen Furin gerichteten Antikörper konnte im Zelllysate der mit dem Furin Konstrukt ko-transfizierten Zellen die Protease nachgewiesen werden. Auch im Überstand konnte das Protein detektiert werden.

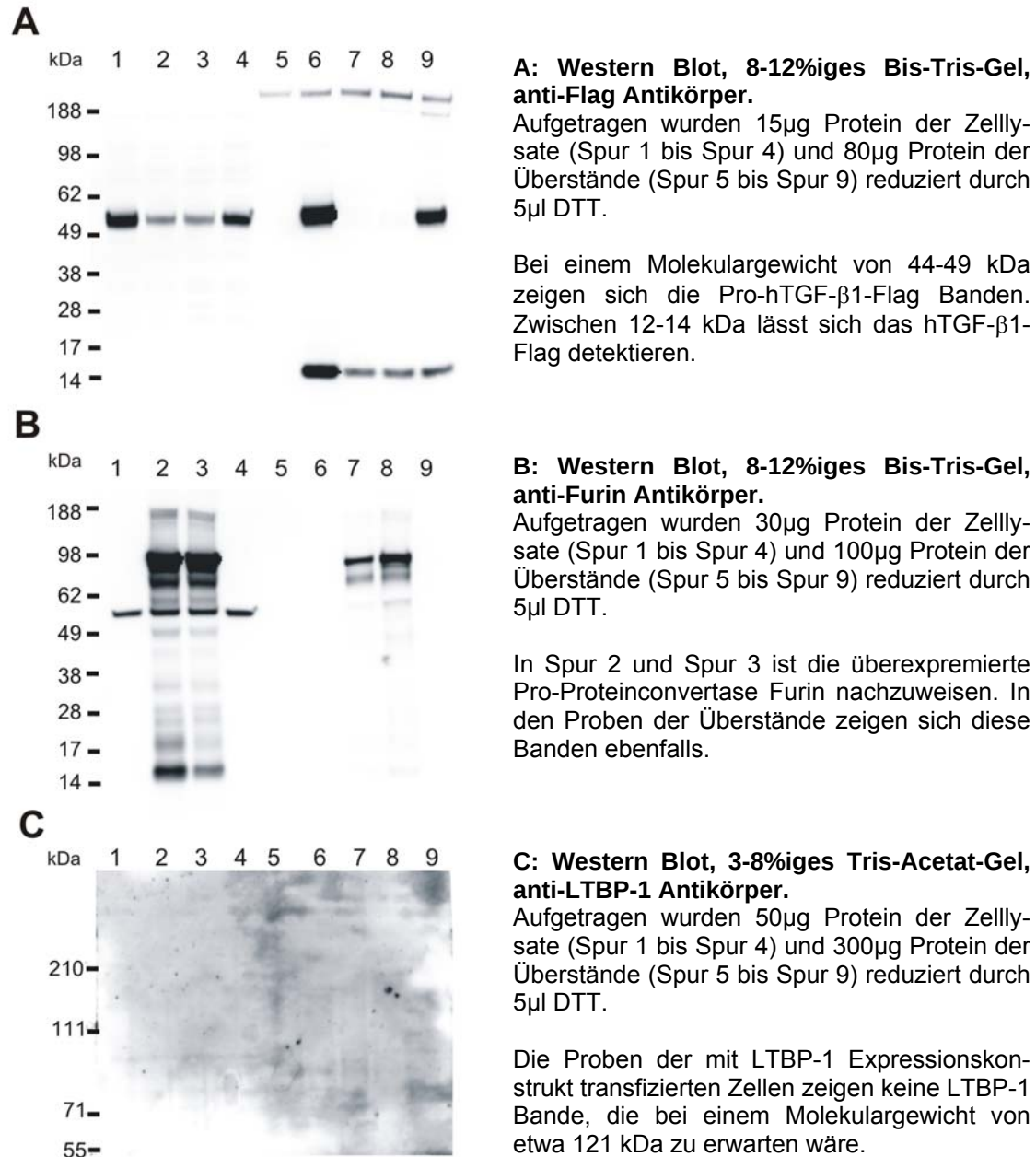


Abb. 51: Western Blots mit anti-Flag (A), anti-Furin (B) bzw. anti-LTBP-1 (C) Primärantikörper.

Spur 1-4: Zelllysate, Spur 5-9: Überstand.

Spur 5: neg Kontrolle, Spur 1+6: transfiziert mit hTGF-β1-Flag Vektor, Spur 2+7: transfiziert mit hTGF-β1-Flag + Furin Vektor, Spur 3+8: transfiziert mit hTGF-β1-Flag + Furin + LTBP-1 Vektor, Spur 4+9: transfiziert mit hTGF-β1-Flag + LTBP-1 Vektor.

Die Konzentration von LTBP-1 in Zelllysaten und Überständen reichte nicht aus um dieses Protein zu detektieren. Spezifische Banden waren in keiner Probe zu erkennen. Da die LTBP-1 Expression wie bereits beschrieben in Vorexperimenten in anderen Zellsystemen

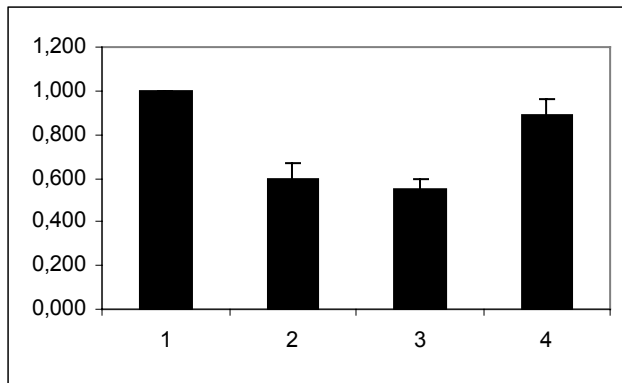
wie COS und HEK Zellen nachgewiesen werden konnte und zudem kein deutlicher Einfluss der Ko-Transfektion auf das hTGF- β 1-Flag-Signal im Western Blot zu erkennen war, war auch von einer Funktion des LTBP-1-Expressionplasmid in LX-2 Zellen auszugehen.

Bei den ELISA Analysen wurden bei den Zelllysaten 50 μ g Protein pro Well und bei den Überständen 100 μ g Protein pro Well eingesetzt.

Die ELISA Analysen der Zelllysate bestätigten die Ergebnisse der Western Blots. Durch die zusätzliche Expression von Furin und/oder LTBP-1 sank die bei 450nm gemessene Absorption. Die niedrigsten Werte ergaben sich bei den Proben der hTGF- β 1-Flag, Furin und LTBP-1 exprimierenden Zellen, die Absorption sank auf das 0,6 $\pm$ 0,07-fache. Dieser Unterschied war statistisch signifikant mit einem p-Wert von 0,0002. Die Werte, der mit dem hTGF- β 1-Flag und dem Furin Expressionsplasmid ko-transfizierten Zellen, waren signifikant niedriger als die, der allein mit dem hTGF- β 1-Flag Expressionsplasmid transfizierten LX-2 Zellen mit p=0,0012. Die Absorption war um das 0,55 $\pm$ 0,05-fache niedriger. Bei den zusätzlich allein mit LTBP-1 ko-transfizierten Zellen zeigte sich ein Abfall der Absorption auf das 0,9 $\pm$ 0,07-fache mit einer tendenziellen Signifikanz (p= 0,0921).

Bei den ELISA Analysen der Überstände ergaben sich für den Einfluss von Furin alleine, Furin und LTBP-1 zusammen und LTBP-1 alleine signifikante Werte. Die Ko-Expression von hTGF- β 1-Flag und Furin führte zu signifikant niedrigeren Absorptionswerten mit p=0,0024. Sie sanken dabei auf das 0,5 $\pm$ 0,1-fache. Auch die zusätzliche Transfektion mit dem Furin und dem LTBP-1 Expressionsplasmid führte zu einem signifikanten Abfall der Werte (p=0,0003) auf das 0,41 $\pm$ 0,07-fache verglichen mit den Ergebnissen der nur mit dem hTGF- β 1-Flag-Expressionsplasmid transfizierten Zellen. Die Überexpression von hTGF- β 1-Flag und LTBP-1 senkte die im ELISA gemessene Absorption signifikant auf das 0,78 $\pm$ 0,02-fach bei einem p-Wert von 0,0001.

Die ELISA Analysen des Überstandes bestätigten demnach die Ergebnisse der Western Blots. Die Ko-Expression von hTGF- β 1-Flag zusammen mit Furin und/oder LTBP-1 führte im Überstand zu signifikant niedrigeren hTGF- β 1-Flag-Konzentrationen. In diesem Punkt unterschieden sich die Resultate der LX-2 und CHO Zellsysteme.



A: ELISA Ergebniss des Zelllysates.

Y-Achse: relative Werte

X-Achse: Proben

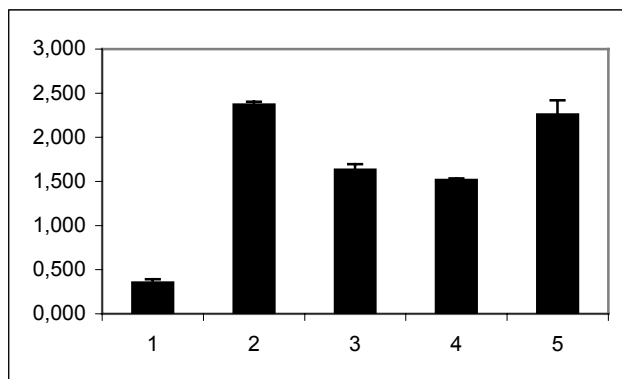
1: Expression von hTGF- β 1-Flag, Wert gleich eins gesetzt

2: Expression von hTGF- β 1-Flag und Furin

3: Expression von hTGF- β 1-Flag, Furin + LTBP-1

4: Expression von hTGF- β 1-Flag + LTBP-1

Die zusätzliche Expression von Furin und/oder LTBP-1 führte zu einer Senkung der Absorption, hier als rel. Werte angegeben.



B: Beispiel 1

ELISA Ergebniss des Zelllysates.

Y-Achse: Absorption bei 450nm

X-Achse: Proben

1: Negativkontrolle

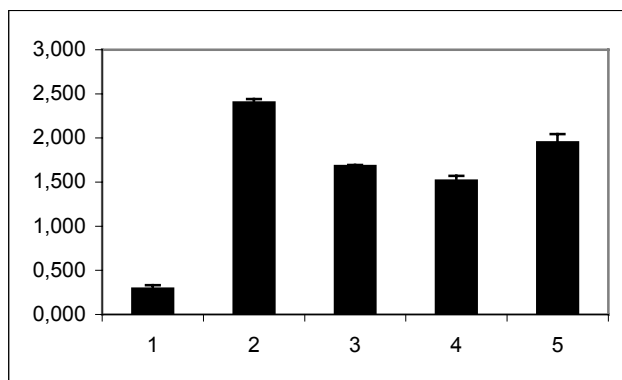
2: Expression von hTGF- β 1-Flag

3: Expression von hTGF- β 1-Flag + Furin

4: Expression von hTGF- β 1-Flag, Furin + LTBP-1

5: Expression von hTGF- β 1-Flag + LTBP-1

Die Absorption sinkt bei Ko-Expression des hTGF- β 1-Flag mit Furin bzw. LTBP-1.



C: Beispiel 2

ELISA Ergebniss des Zelllysates.

Y-Achse: Absorption bei 450nm

X-Achse: Proben

1: Negativkontrolle

2: Expression von hTGF- β 1-Flag

3: Expression von hTGF- β 1-Flag + Furin

4: Expression von hTGF- β 1-Flag, Furin + LTBP-1

5: Expression von hTGF- β 1-Flag + LTBP-1

Die Absorption sinkt bei Ko-Expression des hTGF- β 1-Flag mit Furin bzw. LTBP-1.

Abb. 52: ELISA Zelllysate.

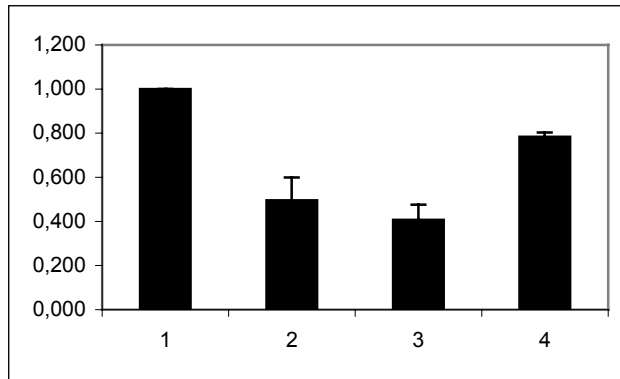
Dargestellt sind Ergebnis der ELISA Analysen.

A: Ergebnis nach dreimaliger Durchführung der Experimente.

Bei jedem Versuch wurde der Mittelwert der Negativkontrolle von den anderen Mittelwerten subtrahiert. Der Mittelwert, der allein mit dem hTGF- β 1-Flag Expressionsplasmid transfizierten Probe, wurde gleich 1 gesetzt. Mittelwert und Standardabweichung wurden berechnet.

B+C: Beispiele für ELISA Analysen.

Auf der Y-Achse sind keine relativen Werte, sondern die absoluten Absorptionswerte bei 450nm angegeben. Die beiden Beispiele zeigen, dass die Absorption der Probe 5 in unterschiedlicher Ausprägung beeinflusst wurde.



A: ELISA Ergebniss des Überstandes.

Y-Achse: relative Werte

X-Achse: Proben

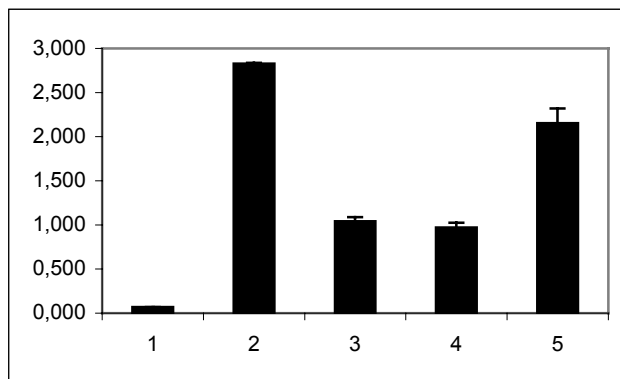
1: Expression von hTGF- β 1-Flag 1, Wert gleich eins gesetzt

2: Expression von hTGF- β 1-Flag + Furin

3: Expression von hTGF- β 1-Flag, Furin + LTBP-1

4: Expression von hTGF- β 1-Flag + LTBP-1

Die zusätzliche Expression von Furin und/oder LTBP-1 führte zu einer Senkung der Absorption, hier als rel. Werte angegeben.



B: Beispiel 1

ELISA Ergebniss des Überstandes.

Y-Achse: Absorption bei 450nm

X-Achse: Proben

1: Negativkontrolle

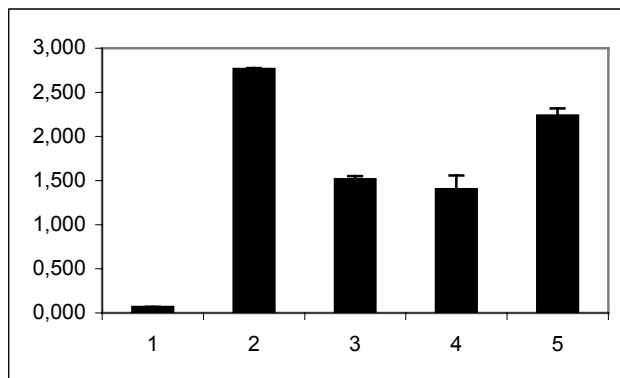
2: Expression von hTGF- β 1-Flag

3: Expression von hTGF- β 1-Flag + Furin

4: Expression von hTGF- β 1-Flag, Furin + LTBP-1

5: Expression von hTGF- β 1-Flag + LTBP-1

Die Absorption sinkt bei Ko-Expression des hTGF- β 1 mit Furin bzw. LTBP-1.



C: Beispiel 2

ELISA Ergebniss des Überstandes.

Y-Achse: Absorption bei 450nm

X-Achse: Proben

1: Negativkontrolle

2: Expression von hTGF- β 1-Flag

3: Expression von hTGF- β 1-Flag + Furin

4: Expression von hTGF- β 1-Flag, Furin + LTBP-1

5: Expression von hTGF- β 1-Flag + LTBP-1

Die Absorption sinkt bei Ko-Expression des hTGF- β 1-Flag mit Furin bzw. LTBP-1.

Abb. 53: ELISA Überstände.

Dargestellt sind Ergebnis der ELISA Analysen.

A: Ergebnis nach dreimaliger Durchführung der Experimente.

Bei jedem Versuch wurde der Mittelwert der Negativkontrolle von den anderen Mittelwerten subtrahiert. Der Mittelwert, der allein mit dem hTGF- β 1-Flag Expressionsplasmid transfizierten Probe, wurde gleich 1 gesetzt. Mittelwert und Standardabweichung wurden berechnet.

B+C: Beispiele für ELISA Analysen.

Auf der Y-Achse sind keine relativen Werte, sondern die absoluten Absorptionswerte bei 450nm angegeben. Die beiden Beispiele zeigen, dass die Absorption in unterschiedlicher Ausprägung beeinflusst wurde.

5.3.3 Einflüsse der hTGF- β 1 Signalsequenzpolymorphismen auf die hTGF- β 1 Synthese und Sekretion

Um die Auswirkung der Polymorphismen in der Signalsequenz des hTGF- β 1 Gens auf die hTGF- β 1 Synthese und Sekretion analysieren zu können, wurden wie in Abschnitt 5.2.5 beschrieben Expressionsplasmide der drei in der Bevölkerung vorkommenden Allele kloniert. CHO und LX-2 Zellen wurden mit diesen Plasmiden transfiziert und Western Blots und ELISAs durchgeführt.

Die Zellen wurden bei hoher Zelldichte mit 2 μ g DNA transfiziert. Ein Mediumwechsel mit Herabsetzen der FKS-Konzentration auf 0,2% erfolgte nach 24 Stunden. Am dritten Tag nach Transfektion wurden die Zellen geerntet. Dabei wurde der Überstand abgezogen und in ein 1,5 μ l Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS mit Ripa + Complete lysiert und mit Zellschabern von den Platten gelöst. Der Überstand musste vor den weiteren Experimenten gefriergetrocknet werden. Das Lyophilisat wurde in Ripa + Complete gelöst. Mittels DC-Testung wurde die Proteinkonzentration der Proben von Zelllysaten und Überständen bestimmt.

Als erstes Experiment zur Analyse der Auswirkung der Polymorphismen in Codon 10 und Codon 25 auf die hTGF- β 1 Synthese und Sekretion wurden Western Blots mit den Proben der Zelllysate und Überstände durchgeführt. Die Proben wurden durch Zugabe von 3-5 μ l DTT reduziert und mit 2-4%igem SDS-Gelladepuffer versetzt auf ein 8-12%iges Bis-Tris-Gel geladen. Zur Bestimmung von Lauffront und Molekulargewichten wurden 10 μ l des Seebblue Marker eingesetzt. In einer Spur wurde die Negativkontrolle nicht transfizierter Zellen auf das Gel geladen. Daneben wurden die drei Proben, der mit den verschiedenen Expressionsplasmiden transfizierten Zellen, aufgetragen. Nach Gelelektrophorese und anschließendem Western Blot konnten die gesuchten immobilisierten hTGF- β 1-Flag-Formen durch den gegen Flag gerichteten Primärantikörper sichtbar gemacht werden.

Zur weiteren Analyse wurden ELISAs durchgeführt. Um sicher zu gehen, dass die Ergebnisse reproduzierbar sind, wurde jede Probe in Dreifachbestimmung gemessen und die Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt. Bei dem neu entwickelten ELISA standen keine Standards zur Verfügung, deshalb musste mit relativen Werten gearbeitet werden. Von den Absorptionswerten jeder Probe wurde der Mittelwert gebildet. Der Mittelwert der jeweiligen Negativkontrolle wurde von den anderen Werten subtrahiert. Die Probe, der allein mit dem Wildtypexpressionsplasmid transfizierten Zellen, wurde gleich 1 gesetzt. Zuletzt wurden mit dem t-Test die Signifikanzen berechnet, dabei wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 festgelegt.

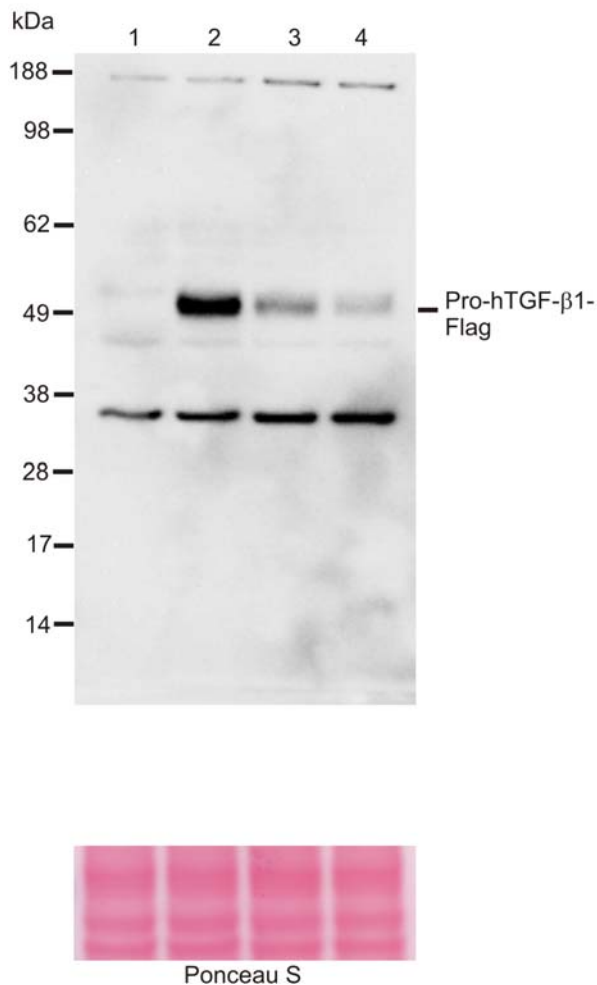
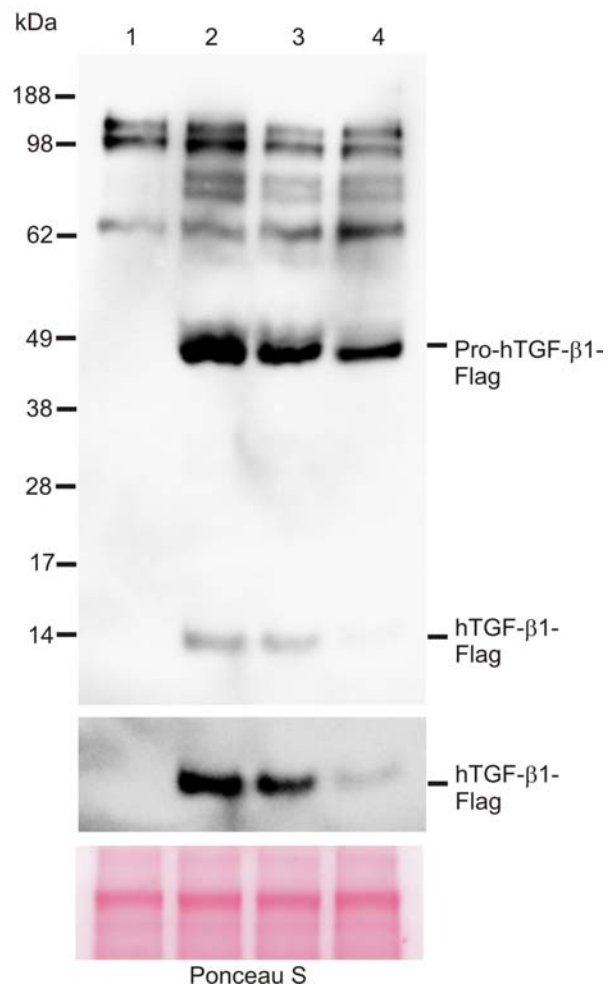
5.3.3.1 Einflüsse der Polymorphismen in CHO Zellen

Bei den Western Blot Analysen wurden zwischen 20µg und 30µg Protein der CHO Zelllysate bzw. 80µg bis 150µg Protein der CHO Zellüberstände eingesetzt.

Die Western Blots der Zelllysate zeigten eine Intensitätsabnahme des Signals im Western Blot durch die Polymorphismen gegenüber dem hTGF-β1-Flag Wildtypallel. Die Pro-hTGF-β1-Flag-Bande lag bei einem Molekulargewicht zwischen 44 kDa und 56 kDa. Diese Bande war in den Western Blots aller drei Plasmide nachweisbar. Die Negativkontrolle zeigte diese Bande nicht.

In den Proben der Zellen, die mit dem Plasmid transfiziert worden waren, der in Codon 10 und Codon 25 für Prolin kodierte, war die Pro-hTGF-β1-Flag-Bande schwächer als in den Proben der Zellen, die mit dem Plasmid transfiziert worden waren, der in Codon 10 für Leucin und Codon 25 für Arginin kodierte. Die nachweisbare Konzentration von Pro-hTGF-β1-Flag im Zelllysate der Zellen, die hTGF-β1-Flag synthetisierten, das an Position 10 die Aminosäure Prolin trug, nahm, verglichen mit den Proben der Zellen, welche die Wildtypform exprimierten, ebenfalls ab. Ein Nukleotidaustausch an Position +869 des hTGF-β1 Gens von Thymin durch Cytosin senkte in allen Experimenten die hTGF-β1-Flag Expression der CHO Zellen. Ebenso führte ein Nukleotidaustausch an Position +869 und +915 des Gens von Thymin bzw. Guanin durch Cytosin zu einer verminderten Synthese des rekombinanten Proteins.

Analog zu den Ergebnissen der Zelllysate-Western Blots nahm die nachweisbare Konzentration von Pro-hTGF-β1-Flag im Überstand der Zellen, die in Codon 10 bzw. in Codon 10 und Codon 25 des hTGF-β1 Gens für die Aminosäure Prolin kodierten, gegenüber den Zellen, die für die Wildtypform kodierten, ab. Die Intensität und Dicke der Bande des maturen hTGF-β1-Flag bei einem Molekulargewicht von etwa 13 kDa wurde durch die Polymorphismen in gleicher Weise beeinflusst. Die nachweisbare Konzentration des wildtyp hTGF-β1-Flags war am höchsten. Durch einen Nukleotidaustausch an Position +869 von Thymin durch Cytosin bzw. an Position +915 von Guanin durch Cytosin sank die hTGF-β1-Flag-Menge im Überstand.

A: Zelllysate**B: Überstände****Abb. 54: Western Blots CHO Zellen, 8-12%iges Bis-Tris-Gel.**

Spur 1: Negativkontrolle

Spur 2: Lysat bzw. Überstand der Zellen, die mit dem Wildtypplasmid transfiziert worden waren. Exprimiertes hTGF- β 1-Flag trug im Signalpeptid an Position 10 die Aminosäure Leucin und an Position 25 die Aminosäure Arginin.

Spur 3: Lysat bzw. Überstand der Zellen, die mit dem Plasmid, der in Codon 10 und Codon 25 des hTGF- β 1 Gens für die Aminosäure Prolin kodierte, transfiziert worden waren.

Spur 4: Lysat bzw. Überstand der Zellen, die mit dem Plasmid, der in Codon 10 für die Aminosäure Prolin und in Codon 25 für die Aminosäure Arginin kodierte, transfiziert worden waren.

A: Western Blot der Zelllysate.

Eingesetzt wurden 30 μ g Protein der Zelllysate. Die Proben wurden durch 3 μ l DTT reduziert und mit SDS-Gelladepuffer versetzt aufgetragen.

Die Pro-hTGF- β 1-Flag-Bande liegt bei einem Molekulargewicht zwischen 50 kDa und 56 kDa. In der Negativkontrolle lässt sich dieses Protein nicht nachweisen. Spur 2 zeigt die dickste und dichteste Proteinbande. In den Spuren 3 und 4 stellt sich die Bande weitaus schwächer dar.

B: Western Blot der Überstände.

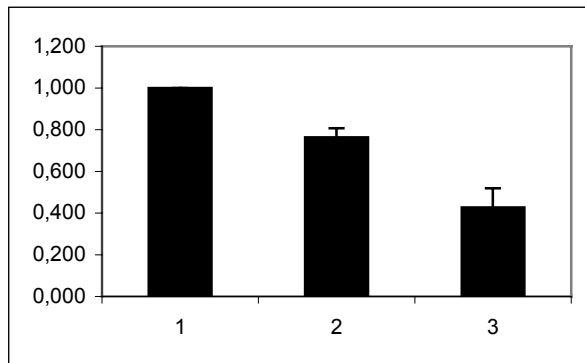
Eingesetzt wurden 100 μ g Protein der Überstände. Die Proben wurden durch 3 μ l DTT reduziert und mit SDS-Gelladepuffer versetzt aufgetragen.

Die Pro-hTGF- β 1-Flag-Bande zeigt von Spur 1 bis Spur 4 dieselben Veränderungen wie in Abb. 54A. Die Bande des matten hTGF- β 1-Flag bei 12-14 kDa ist in Spur 2 am kräftigsten. Ihre Intensität nimmt von Spur 2 bis Spur 4 ab. Die Negativkontrolle (Spur 1) zeigt bei diesem Molekulargewicht keine Bande.

Bei den ELISA Analysen wurden 100µg Protein der Zelllysate und 200µg Protein der Überstände eingesetzt und der ELISA wie in Abschnitt 4.3.14 beschrieben durchgeführt.

Die ELISA Analysen bestätigten die Ergebnisse der Western Blots.

A: Zelllysate



B: Überstände

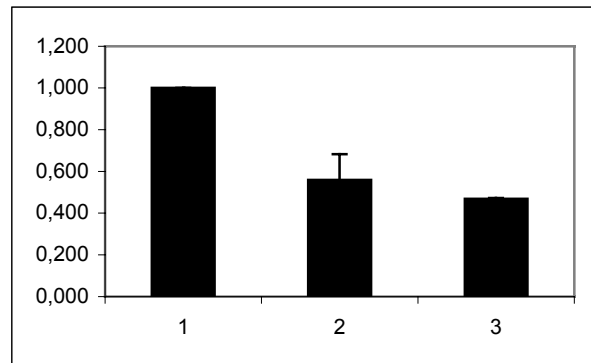


Abb. 55: ELISA Analysen TGF-β1 Polymorphismen, CHO Zellen.

Ergebnisse nach dreimaliger Durchführung der Experimente. Bei jedem Versuch wurde der Mittelwert der Negativkontrolle von den anderen Mittelwerten subtrahiert. Der Mittelwert, der allein mit dem hTGF-β1-Flag Expressionsplasmid transfizierten Proben, wurde gleich 1 gesetzt. Mittelwert und Standardabweichung wurden berechnet.

Y-Achse: relative Werte

X-Achse: Proben

A: Zelllysate.

1: Lysat der Zellen, die mit dem Wildtypplasmid transfiziert worden waren.

Exprimiertes hTGF-β1-Flag trug im Signalpeptid an Position 10 die Aminosäure Leucin und an Position 25 die Aminosäure Arginin.

2: Lysat der Zellen, die mit dem Plasmid, der in Codon 10 und Codon 25 des hTGF-β1 Gens für die Aminosäure Prolin kodierte, transfiziert worden waren.

3: Lysat der Zellen, die mit dem Plasmid, der in Codon 10 für die Aminosäure Prolin und in Codon 25 für die Aminosäure Arginin kodierte, transfiziert worden waren.

Die Absorptionswerte der Proben 2 und 3 sind signifikant niedriger als die der Probe 1. Probe 3 zeigt niedrigere Absorptionswerte als Probe 2.

B: Überstände.

1: Lysat der Zellen, die mit dem Wildtypplasmid transfiziert worden waren. Exprimiertes hTGF-β1-Flag trug im Signalpeptid an Position 10 die Aminosäure Leucin und an Position 25 die Aminosäure Arginin.

2: Lysat der Zellen, die mit dem Plasmid, der in Codon 10 und Codon 25 des TGF-β1 Gens für die Aminosäure Prolin kodiert, transfiziert worden waren.

3: Lysat der Zellen, die mit dem Plasmid, der in Codon 10 für die Aminosäure Prolin und in Codon 25 für die Aminosäure Arginin kodiert, transfiziert worden waren.

Die Absorptionswerte der Proben 2 und 3 waren signifikant niedriger als die der Probe 1. Probe 3 zeigte niedrigere Absorptionswerte als Probe 2.

Die Absorptionswerte der Zelllysate der Zellen, die rekombinantes hTGF-β1-Flag synthetisierten, das an Aminosäureposition 10 bzw. an den Aminosäurepositionen 10 und 25 ein Prolin aufwies, waren signifikant niedriger. Durch den Nukleotidaustausch an Position +869 und +915 sank die Absorption durchschnittlich auf das $0,76 \pm 0,04$ -fache. Dieses Ergebnis war signifikant mit einem p-Wert von 0,0015. Kodierte des hTGF-β1 Gen des Expressionsplasmids allein in Codon 10 für die Aminosäure Prolin, war der Einfluss auf die

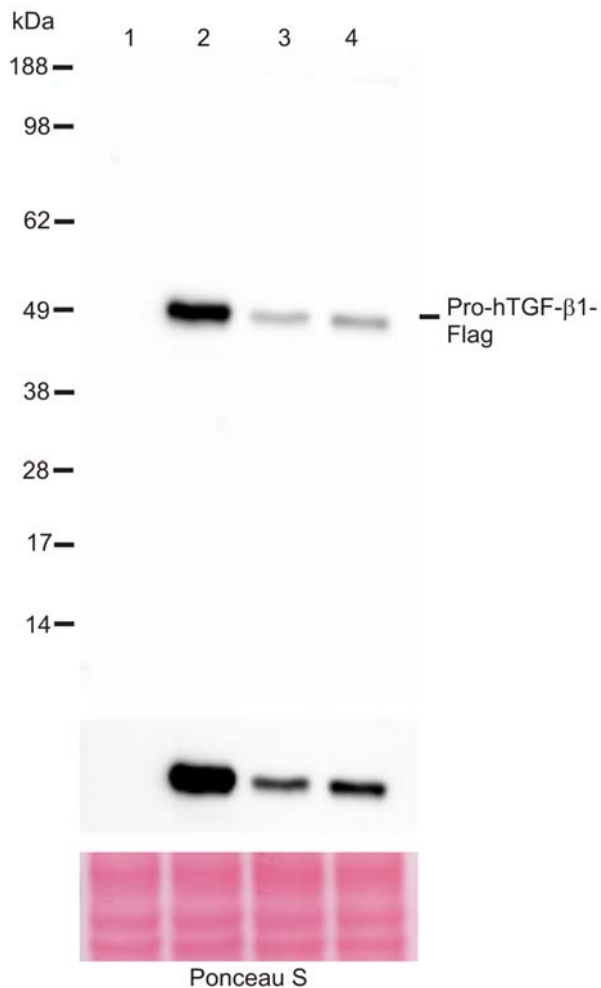
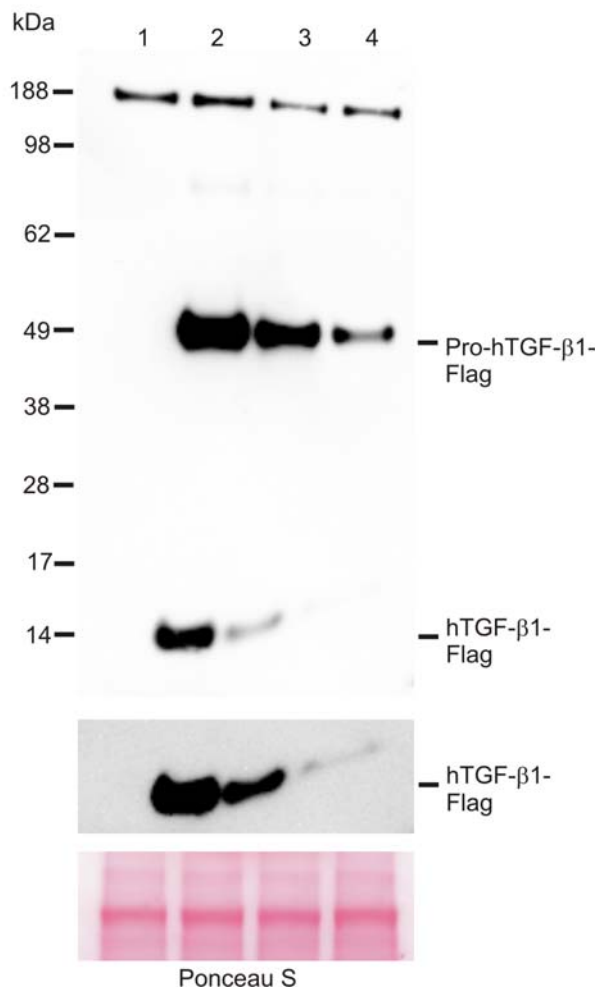
Absorption ebenfalls signifikant mit $p=0,001$. In diesem Fall führte der Nukleotidaustausch zu einer Erniedrigung der Absorption auf das $0,43\pm 0,09$ -fache. Der isolierte Nukleotidaustausch an Position +869 führte zu signifikant niedrigeren Absorptionswerten als der Nukleotidaustausch an Position +869 und Position +915 ($p=0,0096$).

Auch die ELISA Analysen der Proben des Überstandes zeigten, dass ein Nukleotidaustausch an Position +869 bzw. an Position +869 und +915 die Absorptionswerte signifikant senkte. Wies das rekombinante hTGF- β 1-Flag an Position +869 und Position +915 des hTGF- β 1 Gens das Nukleotid Cytosin auf, sanken die gemessenen Absorptionswerte auf das $0,56\pm 0,12$ -fache. Der Einfluss der Polymorphismen war signifikant mit $p=0,0049$. Ein Nukleotidaustausch an Position +869 erniedrigte die bei 450nm gemessene Absorption signifikant auf das $0,47\pm 0,003$ -fach bei einem p-Wert von $<0,0001$. Der alleinige Nukleotidaustausch in Codon 10 führte zu tendenziell signifikant niedrigeren Absorptionswerten als der Nukleotidaustausch in Codon 10 und Codon 25 ($p=0,31$).

5.3.3.2 Einflüsse der Polymorphismen in LX-2 Zellen

Bei den Western Blot Analysen der LX-2 Zellproben wurden zwischen 10 μ g und 20 μ g Protein der Zelllysate bzw. 80 μ g bis 100 μ g Protein der Überstände eingesetzt.

Die Western Blots der Zelllysate zeigten wie die der CHO Zellen eine Intensitätsabnahme des Pro-hTGF- β 1-Flag-Signals durch die Polymorphismen gegenüber dem Wildtypallel. In den Proben der Zellen, die mit dem Plasmid transfiziert worden waren, der an Position +869 und Position +915 das Nukleotid Cytosin trug, war die Pro-hTGF- β 1-Flag-Bande schwächer als in den Proben der Zellen, die mit dem Plasmid transfiziert worden waren, der in Codon 10 für Leucin und Codon 25 für Arginin kodierte. Die nachweisbare Konzentration von Pro-hTGF- β 1-Flag im Zelllysate der Zellen, die hTGF- β 1-Flag synthetisierten, das an Position 10 die Aminosäure Prolin trug, nahm verglichen mit den Proben der Zellen, welche die Wildtypform exprimierten, ebenfalls ab. Ein Nukleotidaustausch an Position +869 senkte in allen Experimenten die hTGF- β 1-Flag Expression der LX-2 Zellen. Ebenso führte ein Nukleotidaustausch an Position +869 und +915 des hTGF- β 1 Gens zu einer verminderten Expression des rekombinanten Proteins.

A: Zelllysate**B: Überstände****Abb. 56: Western Blots LX-2 Zellen, 8-12%iges Bis-Tris-Gel.**

Spur 1: Negativkontrolle

Spur 2: Lysat bzw. Überstand der Zellen, die mit dem Wildtypplasmid transfiziert worden waren. Exprimiertes hTGF-β1-Flag trug im Signalpeptid an Position 10 die Aminosäure Leucin und an Position 25 die Aminosäure Arginin.

Spur 3: Lysat bzw. Überstand der Zellen, die mit dem Plasmid, der in Codon 10 und Codon 25 des hTGF-β1 Gens für die Aminosäure Prolin kodierte, transfiziert worden waren.

Spur 4: Lysat bzw. Überstand der Zellen, die mit dem Plasmid, der in Codon 10 für die Aminosäure Prolin und in Codon 25 für die Aminosäure Arginin kodierte, transfiziert worden waren.

A: Western Blot der Zelllysate.

Eingesetzt wurden 30 µg Protein der Zelllysate. Die Proben wurden durch 3 µl DTT reduziert und mit SDS-Gelladepuffer versetzt aufgetragen.

Die Pro-hTGF-β1-Flag-Bande liegt bei einem Molekulargewicht zwischen 50 kDa und 56 kDa. In der Negativkontrolle lässt sich dieses Protein nicht nachweisen. Spur 2 zeigt die dickste und dichteste Proteinbande. In den Spuren 3 und 4 stellt sich die Bande weitaus schwächer dar.

B: Western Blot der Überstände.

Eingesetzt wurden 100 µg Protein der Übersände. Die Proben wurden durch 3 µl DTT reduziert und mit SDS-Gelladepuffer versetzt aufgetragen.

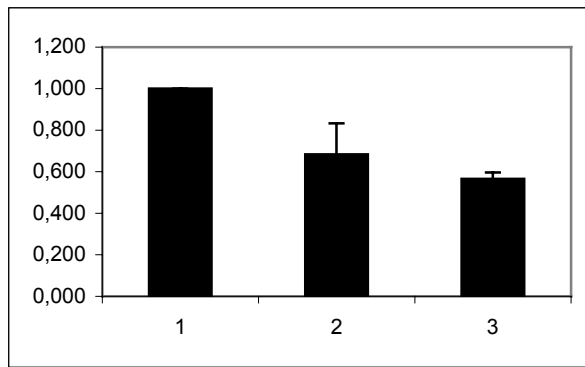
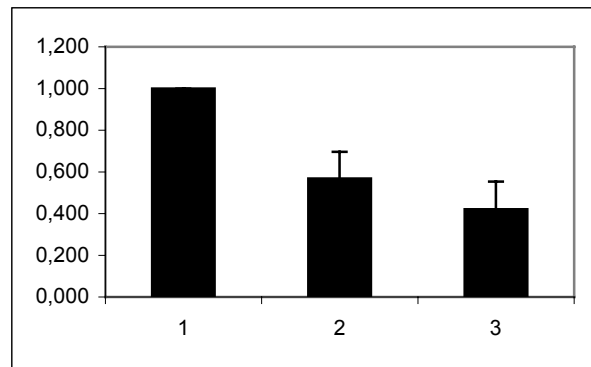
Die Pro-hTGF-β1-Flag-Bande zeigt von Spur 1 bis Spur 4 dieselben Veränderungen wie in Abb. 56A. Die Bande des matten hTGF-β1-Flag bei 12-14 kDa ist ebenfalls in Spur 2 am kräftigsten und deren Intensität nimmt von Spur 2 bis Spur 4 ab. Die Negativkontrolle (Spur 1) zeigt keine Bande.

Die Western Blots der Überstände zeigten im Vergleich ebenfalls eine Konzentrationsabnahme von Pro-hTGF- β 1-Flag in den Überständen der LX-2 Zellen, die in Codon 10 bzw. in Codon 10 und Codon 25 des hTGF- β 1 Gens für die Aminosäure Prolin kodierten, gegenüber den Zellen, welche die Wildtypform synthetisierten. Die Intensität und Dicke der Bande des maturen hTGF- β 1-Flag bei einem Molekulargewicht von 12-14 kDa wurde ebenfalls durch die Polymorphismen herabgesetzt. Die nachweisbare Konzentration des wildtyp hTGF- β 1-Flags war am höchsten. Durch einen Nukleotidaustausch an Position +869 oder einen Nukleotidaustausch sowohl an Position +869 als auch an Position +915 sank die hTGF- β 1-Flag-Menge des Überstandes.

Zur weiteren Analyse wurden ELISAs durchgeführt. Dabei wurden 50 μ g Protein der Zelllysate und 100 μ g Protein der Überstände eingesetzt und der ELISA wie in Abschnitt 4.3.14 beschrieben durchgeführt.

Die ELISA Analysen führten zum gleichen Ergebnis wie die Western Blots. Die Absorptionswerte der Zelllysate der Zellen, die rekombinantes hTGF- β 1-Flag synthetisierten, das an Aminosäureposition 10 bzw. an den Aminosäurepositionen 10 und 25 ein Prolin aufwies, waren signifikant niedriger. Durch den Nukleotidaustausch in Codon 10 und Codon 25 sank die Absorption durchschnittlich auf das $0,68 \pm 0,15$ -fache. Dieses Ergebnis war signifikant mit einem p-Wert von 0,0407. Kodierte des hTGF- β 1 Gen des Expressionsplasmids nur in Codon 10 für die Aminosäure Prolin, war der Einfluss auf die Absorption ebenfalls signifikant mit $p < 0,0001$. In diesem Fall führte der Nukleotidaustausch zu einer Erniedrigung der Absorption auf das $0,57 \pm 0,03$ -fache. Der alleinige Nukleotidaustausch in Codon 10 führte zu tendenziell signifikant niedrigeren Absorptionswerten als ein Nukleotidaustausch in Codon 10 und Codon 25 ($p = 0,34$).

Auch die ELISA Analysen der Proben des Überstandes zeigten, dass ein Nukleotidaustausch in Codon 10 bzw. in Codon 10 und Codon 25 die Absorptionswerte signifikant senkte. Wies das rekombinante hTGF- β 1-Flag an Position 10 und Position 25 die Aminosäure Prolin auf, sanken die gemessenen Absorptionswerte auf das $0,57 \pm 0,13$ -fache. Der Einfluss der Polymorphismen war signifikant mit $p = 0,0088$. Ein Nukleotidaustausch an Position +869 des hTGF- β 1 Gens erniedrigte die bei 450nm gemessene Absorption signifikant auf das $0,42 \pm 0,13$ -fach bei einem p-Wert von 0,0036. Der alleinige Nukleotidaustausch in Codon 10 führte zu tendenziell signifikant niedrigeren Absorptionswerten, als der Nukleotidaustausch in Codon 10 und Codon 25 ($p = 0,32$).

A: Zelllysate**B: Überstände****Abb. 57: ELISA Analysen TGF- β 1 Polymorphismen, LX-2 Zellen.**

Ergebnisse nach dreimaliger Durchführung der Experimente. Bei jedem Versuch wurde der Mittelwert der Negativkontrolle von den anderen Mittelwerten subtrahiert. Der Mittelwert, der allein mit dem hTGF- β 1-Flag Expressionsplasmid transfizierten Probe, wurde gleich 1 gesetzt. Mittelwert und Standardabweichung wurden berechnet.

Y-Achse: relative Werte

X-Achse: Proben

A: Zelllysate.

- 1: Lysat der Zellen, die mit dem Wildtypplasmid transfiziert worden waren. Exprimiertes hTGF- β 1-Flag trug im Signalpeptid an Position 10 die Aminosäure Leucin und an Position 25 die Aminosäure Arginin.
- 2: Lysat der Zellen, die mit dem Plasmid, der in Codon 10 und Codon 25 des TGF- β 1 Gens für die Aminosäure Prolin kodierte, transfiziert worden waren.
- 3: Lysat der Zellen, die mit dem Plasmid, der in Codon 10 für die Aminosäure Prolin und in Codon 25 für die Aminosäure Arginin kodierte, transfiziert worden waren.

Die Absorptionswerte der Proben 2 und 3 sind signifikant niedriger als die der Probe 1. Probe 3 zeigt niedrigere Absorptionswerte als Probe 2.

B: Überstände.

- 1: Lysat der Zellen, die mit dem Wildtypplasmid transfiziert worden waren. Exprimiertes hTGF- β 1-Flag trug im Signalpeptid an Position 10 die Aminosäure Leucin und an Position 25 die Aminosäure Arginin.
- 2: Lysat der Zellen, die mit dem Plasmid, der in Codon 10 und Codon 25 des TGF- β 1 Gens für die Aminosäure Prolin kodierte, transfiziert worden waren.
- 3: Lysat der Zellen, die mit dem Plasmid, der in Codon 10 für die Aminosäure Prolin und in Codon 25 für die Aminosäure Arginin kodierte, transfiziert worden waren.

Die Absorptionswerte der Proben 2 und 3 sind signifikant niedriger als die der Probe 1. Probe 3 zeigt niedrigere Absorptionswerte als Probe 2.

6. Diskussion

6.1 *In vivo* Experiment

Die Hepatitis C induzierte Leberfibrose ist charakterisiert durch eine sehr variable Krankheitsprogression. Sie zeigt im Durchschnitt einen langsam progredienten Verlauf mit Entwicklung einer Zirrhose in einem Zeitraum von etwa 20 bis 30 Jahren. Bei einem Drittel der Patienten entsteht dagegen bereits innerhalb von 10 bis 20 Jahren nach Infektion eine irreversible Leberschädigung („*rapid fibrosers*“), während bei anderen die Krankheit stagniert und sich eine Zirrhose gar nicht oder erst nach mehr als 50 Jahren ausbildet („*slow fibrosers*“) [24,67]. Deshalb ist es von großer Bedeutung Faktoren zu identifizieren, welche die Fibroseentwicklung und -progression beeinflussen, um besonders gefährdete Patienten schnell einer geeigneten Therapie zuführen zu können.

Das Zytokin TGF- β 1 spielt eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der Leberfibrose im Rahmen chronisch entzündlicher Lebererkrankungen. TGF- β 1 fördert die Fibroseentwicklung durch Aktivierung von Hepatischen Sternzellen zu kontraktilem bindegewebsproduzierenden Myofibroblasten und stimuliert diese zur exzessiven Matrixproduktion. Außerdem hemmt es den Matrixabbau durch die Suppression der Synthese von Matrixmetalloproteinasen und Steigerung der Expression ihrer Inhibitoren [18,26,30]. Die vielfältigen Funktionen von TGF- β 1 bei der Ausbildung der Leberfibrose legen nahe, dass interindividuelle Unterschiede in Expression, Sekretion, Aktivierung oder biologischer Aktivität, Faktoren der zeitlich sehr variable Krankheitsprogredienz sein können.

Im ersten Teil meiner Analysen wurde der Einfluss von Genpolymorphismen des humanen *Transforming Growth Factor- β 1* auf die Leberfibrose in einer 430 Patienten mit chronischer Virushepatitis umfassenden Fallstudie untersucht.

6.1.1 Design humaner Assoziationsstudien

Es wird vermutet, dass die großen interindividuellen Unterschiede im Verlauf vieler Erkrankungen, wie der hepatischen Fibrose, genetisch mitbedingt sind. Aus diesem Grunde werden immer mehr Genotyp-Phänotyp Populationsstudien durchgeführt, deren Ergebnisse helfen sollen, Prognosescores für die untersuchten Erkrankungen zu etablieren. Da solche Analysen sehr störanfällig sind und bis jetzt viele widersprüchliche Ergebnisse erbracht haben, stellten verschiedene Autoren Richtlinien für ein optimales Studiendesign auf.

Österreicher *et al.* forderten in ihrem 2007 über genetische Analysen im Rahmen von Lebererkrankungen erschienenen Artikel, dass die untersuchten Gene eine biologisch plausible Rolle spielen und die Kandidatengene deshalb nach bekannter pathophysiologischer Funktion des kodierten Proteins ausgewählt werden sollten. Die Polymorphismen sollten

eine nachgewiesene funktionelle Auswirkung, z.B. auf die Transkription, die RNA-Stabilität oder die Aminosäuresequenz, haben [144]. Wasmuth *et al.* verlangten dagegen 2003 Genom übergreifende Untersuchungen und die Einbeziehung von Genloci, die bis dato noch in keinem Zusammenhang mit der Leberfibrose gesehen worden waren. Auf jeden Fall sollte nicht nur eine isolierte Mutation in einem Gen, sondern mehrere Polymorphismen des Gens mit eventueller Identifikation von Haplotypstrukturen, betrachtet werden [145]. Beide Autorengruppen wünschten für eine gute Studie die Ergänzung durch *in vitro* Untersuchungen.

Für die vorliegende Arbeit wurden vier Polymorphismen des TGF- β 1 Gens untersucht: ein Polymorphismus in der Promotorregion an Position -509 (C zu T), zwei in der Signalsequenz an Stelle +869 (T zu C) und +915 (G zu C) sowie eine Nukleotidsubstitution im Bereich des maturen Proteins an Position +1632 (C zu T). Die drei *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) im kodierenden Bereich führen während der Translation zu einem Aminosäureaustausch. Wie die beiden Autorengruppen fordern, wurde im Anschluss an die Genotyp-Phänotyp Analyse die funktionelle Auswirkung der beiden Signalsequenzpolymorphismen auf die Zytokinsynthese und -sekretion in Zellkulturexperimenten analysiert. Eine Korrelation der Polymorphismen untereinander wurde ebenfalls überprüft.

In der Literatur wird außerdem darauf hingewiesen, dass die Fallzahl bei genetischen Populationsstudien möglichst groß sein sollte, um eine hinreichende statistische Aussagekraft zu gewährleisten. Zu kleine Kollektive erhöhen die Gefahr für falsch positive Ergebnisse und führten oft zu einer fehlenden Reproduzierbarkeit in größeren Studien. Zudem wird kritisiert, dass die untersuchten Patienten meist aus nur einem Institut oder Universitätsklinikum stammen. Bei der statistischen Analyse der durch chronische Hepatitis C induzierten Leberfibrose sollten im optimalen Fall „*slow fibrosers*“ mit „*rapid fibrosers*“ verglichen werden [144, 145, 114]. Da die Festlegung des Krankheitsbeginns z.B. die Hepatitis C Virusinfektion oft unmöglich ist, hielten es Österreicher *et al.* auch für hinreichend, Patienten mit „milder Fibrose“ denen mit „schwerer Fibrose“ gegenüberzustellen. Ein Vergleich zwischen gesunden Probanden und Patienten mit Leberfibrose sollte vermieden werden [144].

Zu Beginn meiner Experimente wurde die genomische DNA aus Leberbiopsaten von 430 Patienten isoliert und die Polymorphismen wurden mittels LightCycler Analysen bestimmt. Von den 430 Patienten waren 396 isoliert Hepatitis C infiziert. Das 396 Patienten umfassende Gesamtkollektiv setzte sich aus 161 Patienten der Hep-Net Bank und 235 Patienten des Pathologischen Instituts der Universitätsklinik Köln zusammen. Entzündungs- und Fibroseggrad (*Grading* und *Staging*) wurden histologisch nach dem Score von Desmet *et al.* bestimmt und die Patienten in die Gruppen „leichte Entzündung“ / „schwere Entzündung“ sowie „milde Fibrose“ / „schwere Fibrose“ eingeteilt. Nach Bestimmung des Genotyps wurde der Einfluss der Polymorphismen auf *Grading* und *Staging* untersucht. Zusätzlich wurden die

Allelfrequenzen berechnet und anschließend die Allelfrequenzen der Subgruppen „milde Fibrose“ und „schwere Fibrose“ verglichen.

Sowohl von Österreicher *et al.* als auch von Bataller *et al.* wurde eine zuverlässige Analyse-methode und das Mitführen einer negativen und einer positiven Kontrolle gefordert [144,114]. In meiner Arbeit wurde sowohl das für die Analyse des Promotorpolymorphismus neu etablierte LightCycler-Programm als auch die optimierten Programme für die anderen drei SNPs durch Sequenzierung validiert und die geforderten Kontrollen mitgeführt.

Störgrößen wie Alkoholkonsum, Hormonstatus, Komedikationen oder andere Gen-Umwelt-Interaktionen konnten nicht berücksichtigt werden. Bei der Interpretation der Ergebnisse musste von einer Gleichverteilung dieser Parameter ausgegangen. Trotzdem muss bei kritischer Beurteilung berücksichtigt werden, dass die Assoziation der Polymorphismen mit einer anderen unbekannten Variablen, die für den beobachteten Effekt verantwortlich ist („*linkage disequilibrium*“), nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann.

6.1.2 Auswirkungen von hTGF- β 1 Polymorphismen auf Entzündungs- und Fibrosegrad der Hepatitis C induzierten Leberfibrose

In meiner Fallstudie wurden ein Polymorphismus in der Promotorregion des humanen TGF- β 1 Gens an Position –509 sowie drei Polymorphismen in der kodierenden Sequenz untersucht. Die Polymorphismen des kodierenden Genabschnittes führen bei der Translation zu einem Aminosäureaustausch in Codon 10 von Leucin zu Prolin, in Codon 25 von Arginin zu Prolin und in Codon 263 von Threonin zu Isoleucin.

Die multiple logistische Regression des Risikofaktors Polymorphismus an Position –509 und den Zielparametern *Grading* und *Staging* ergab keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Art des Polymorphismus und der entzündlichen Aktivität oder dem Fibrosegrad. Zu dem gleichen Ergebnis kamen Oliver *et al.* 2005 bei der Analyse der Ausprägung alkoholischer Leberschädigungen von 165 Patienten mit chronischem Alkoholabusus [146] und Gewaltig *et al.* 2002 bei der Untersuchung von 48 Patienten mit Hepatitis C induzierter Leberfibrose [147].

Beim Vergleich der Allelfrequenzen, den die oben genannten Arbeitsgruppen nicht durchgeführt haben, ergab sich in dieser Studie ein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit schwerer Fibrose und den Patienten mit milder Fibrose sowie dem Gesamtkollektiv (Hep-Net Kollektiv + „Kölner Kollektiv“). Das C-Allel hatte bei der Gruppe mit schwerer Fibrose einen Anteil von 0,759 und das T-Allel einen Anteil von 0,241. Dagegen lag die Frequenz des C-Allels der Gruppe „milde Fibrose“ bei 0,668 und die des T-Allels bei 0,332. Dieser Unterschied war statistisch signifikant mit $p=0,019$. Die Gegenüberstellung der Patienten mit schwerer Fibrose und dem Gesamtkollektiv zeigte ebenfalls ein signifikant häufigeres Auftreten des C-Allels ($p=0,019$) und ein signifikant selteneres Auftreten des T-

Allels ($p=0,019$) bei der Gruppe „schwere Fibrose“. Hervorzuheben ist, dass die Allelverteilungen des Gesamtkollektivs (C/T: 0,69/0,31), des Hep-Net Kollektivs (C/T: 0,69/0,31) und des „Kölner Kollektivs“ (C/T: 0,70/0,30) identisch waren. Das T-Allel war folglich mit der Ausprägung einer milden Fibrose assoziiert.

Drumm *et al.* machten bei der Untersuchung von Lungenschäden, die durch Zystische Fibrose hervorgerufen worden waren, eine entgegengesetzte Beobachtung. Das T-Allel war mit schwererer Lungenerkrankung assoziiert [148]. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Pathophysiologien von Leberfibrose und Lungenerkrankungen nicht uneingeschränkt miteinander verglichen werden können. Es ist durchaus vorstellbar, dass derselbe Polymorphismus in der Leber protektiv und in der Lunge krankheitsfördernd wirkt.

Die Signalsequenzpolymorphismen an Position +869 und +915 sind die meist untersuchten TGF- β 1 Polymorphismen. Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse sind aber insgesamt sehr uneinheitlich.

Die hier durchgeführte Fallstudie ergab einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Art des Polymorphismus in Codon 10 und dem Fibroseggrad mit $p=0,0183$. In der Gruppe „schwere Fibrose“ war der Heterozygotenanteil höher als in der Gruppe „milde Fibrose“. Ein Einfluss auf die Allelfrequenzen konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Feststellung, dass Leu/Pro-Patienten durchschnittlich eine schwerere Fibrose aufweisen als Leu/Leu-Patienten, machten auch Wang *et al.* 2005 [143] und Gewaltig *et al.* 2002 [147]. Fünf weitere Arbeitsgruppen konnten keine signifikante Assoziation nachweisen [133,146, 149-151]. Anzumerken ist aber, dass unterschiedliche Ätiologien und variable ethnische Gruppen untersucht wurden. So analysierten Oliver *et al.* alkoholisch bedingte Leberschäden [146], Österreicher *et al.* Hämochromatosepatienten [149] und Suzuki *et al.* japanische Hepatitis C infizierte Probanden [150]. Das Kollektiv von Bathgate *et al.* setzte sich aus Patienten mit verschiedenen Fibrose verursachenden Lebererkrankungen wie PBC, ALD, PSC, Virusinfektionen, Autoimmunhepatitiden und akutem Leberversagen zusammen [151]. Außerdem unterschieden sich die histologischen *Staging*-Systeme. Suzuki *et al.* verwendeten z.B. die *New Inuyama Classification* [150], Powell *et al.* den Score nach Scheuer *et al.* [133] und Bathgate *et al.* beurteilten nicht die Histologie, sondern teilten die Patienten klinisch nach dem Child Score ein [151].

Die Assoziation zwischen dem Aminosäureaustausch in Codon 10 und der entzündlichen Aktivität war nicht signifikant mit $p=0,0583$.

Für den SNP an Position +915 konnte in dieser Arbeit kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Art des Polymorphismus und dem *Grading* oder *Staging* nachgewiesen werden. Auch die Allelfrequenzen der Gruppen „schwere Fibrose“ und „milde Fibrose“ waren gleich. Der Anteil der Arg/Pro-Patienten lag bei den Patienten mit schwerer Fibrose zwar bei 17,20% gegenüber 13,91% bei den Patienten mit milder Fibrose, dieser

Unterschied erreichte aber nicht das Signifikanzniveau von 0,025 nach Bonferroni-Adjustierung.

Bis jetzt wurden vier Studien veröffentlicht, die keinen Einfluss des Codon 25 Polymorphismus nachweisen konnten [146,150,151,152], vier Studien, bei denen der Aminosäureaustausch mit einer schwereren Fibrose assoziiert war [147,143,149,142] und eine Studie, die von einer protektiven Funktion des Prolin-Allels berichtete [133]. Beim Vergleich der Studien muss aber erneut darauf hingewiesen werden, dass unterschiedliche Krankheiten, andere ethnische Gruppen und zum Teil kleinere Kollektive mit abweichenden *Scoring*-Systemen untersucht wurden.

Der Polymorphismus des Codons 263 mit einem Aminosäureaustausch von Threonin zu Isoleucin zeigte keine statistisch signifikanten Auswirkungen auf die entzündliche Aktivität oder den Fibrosegrad. Außerdem ergab sich kein Unterschied in den Allelfrequenzen der Gruppen „schwere Fibrose“ und „milde Fibrose“. Bis jetzt wurde auch keine Fallstudie veröffentlicht, die einen Einfluss des SNP an Position +1632 auf *Grading* oder *Staging* der Leberfibrose nachweisen konnte [147,143].

Der beschriebene Einfluss des Geschlechtes auf den Fibrosegrad konnte erneut bewiesen werden. Die multiple logistische Regression ergab einen Wert von $p=0,0030$. Dagegen hatte das Geschlecht keine Auswirkung auf die entzündliche Aktivität.

Des Weiteren wurden mittels des exakten Fischer-Tests die Kopplungen der einzelnen Polymorphismen untersucht. Es ergab sich eine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem Promotorpolymorphismus und dem SNPs in Codon 10 und Codon 263. Ein Cytosin an Position –509 wurde häufiger mit Leucin als mit Prolin in Codon 10 vererbt. Außerdem kodierte ein Patient, der an 25. Stelle der TGF- β 1 Aminosäuresequenz ein Prolin trug, in Codon 10 ebenfalls für Prolin. Die Kombinationen Arg25Pro und Leu10Leu bzw. Pro25Pro und Leu10Pro oder Leu10Leu traten nicht auf. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einem bestimmten Haplotyp und dem *Grading* oder *Staging* konnte nicht nachgewiesen werden. Es ist zu vermuten, dass für diese Untersuchungen größere Fallzahlen notwendig sind.

6.2 *In vitro* Experimente

Im zweiten Teil meiner Arbeit wurden in Zellkulturexperimenten die Einflüsse der *subtilisin/kexin-like* Serin-Endoprotease Furin sowie des TGF- β 1 Bindungsproteins LTBP-1 auf die hTGF- β 1 Synthese, Prozessierung und Sekretion untersucht. Außerdem wurden zur Ergänzung der oben diskutierten Fallstudie die Auswirkungen der hTGF- β 1 Polymorphismen im Bereich der Signalsequenz *in vitro* analysiert.

Für diese Experimente wurden hTGF- β 1 Expressionskonstrukte kloniert, welche das humane TGF- β 1 Gen unter die Kontrolle des konstitutiv aktiven CMV-Promotors stellten und das rekombinante Protein mit EGFP bzw. Flag-Tag fusionierten. Durch die gezielte Überexpression von hTGF- β 1 konnten Einflüsse anderer genetischer Faktoren ausgeschlossen werden. Die C-terminal gekoppelten Oligopeptide EGFP und Flag ermöglichten den selektiven Nachweis des rekombinanten Proteins unabhängig von endogen synthetisiertem oder im Medium enthaltenem TGF- β 1.

Die verwendeten Zelllinien wurden gezielt ausgewählt. Zum einen wurden *Chinese hamster ovary cells* (CHO Zellen) eingesetzt. Mit dieser Zelllinie führten schon Gentry *et al.* 1987 die ersten TGF- β 1 Überexpressionsversuche durch, sodass auf eine ausführliche Hintergrundliteratur zurückgegriffen werden konnte [62]. LX-2 Zellen gleichen immortalisierten humanen Hepatischen Sternzellen. Sie wurden zur Simulation von in der Leber ablaufenden Prozessen verwendet.

6.2.1 Vektorsynthese und hTGF- β 1 Expression und Sekretion in der Zellkultur

Die ersten Experimente mit rekombinant hergestelltem TGF- β 1 in CHO Zellen veröffentlichten Gentry *et al.* 1987. Sie klonierten Schimpansen TGF- β 1, das sich nur durch 6 Aminosäuren von der humanen Form unterscheidet, und Maus Dihydrofolatreduktase in einen pSV2 Vektor. Diesen Plasmid brachten sie in CHO Zellen ein und selektierten erfolgreich transfizierte Zellen durch Zugabe von Methotrexat [62]. In ihrem 1988 erschienenen Artikel beschrieben sie die im Western Blot detektierbaren TGF- β 1-Proteine. Unter reduzierenden Bedingungen zeigte sich eine Bande bei 44-56 kDa, eine Bande bei 30-42 kDa und eine Bande bei 14 kDa. Die 44-56 kDa Bande entsprach nach ihren Erkenntnissen dem nicht prozessierten Pro-TGF- β 1 (AS 30-390). Die anderen beiden detektierten Proteine identifizierten sie als Produkte der Endoproteolyse des Vorläuferproteins. Die N-terminale Pro-Region (AS 30-278) bildete die 30-42 kDa Bande und das C-terminale TGF- β 1 (AS 279-390) konnte bei 14 kDa nachgewiesen werden [66].

In den folgenden Jahren wurden immer mehr Artikel über rekombinantes TGF- β 1 veröffentlicht. Die mit CHO Zellen arbeitenden Gruppen detektierten in den nicht reduzierten Überständen meist nur eine Proteinbande zwischen 95 kDa und 120 kDa. Nach Reduktion

konnten sie das Vorläuferprotein bei etwa 50 kDa, die Pro-Region (β 1-LAP) bei etwa 40 kDa und das mature TGF- β 1 bei 12,5 kDa nachweisen [67,68,153-155].

Zu Beginn des zweiten Teils meiner Forschungsarbeit wurden Experimente mit dem pCMV-hTGF- β 1-EGFP Expressionsplasmid durchgeführt. Das C-terminal mit hTGF- β 1 fusionierte EGFP ermöglichte die fluoreszenz- und konfokalmikroskopische Darstellung der intrazellulären Proteinlokalisierung. Deshalb war das pCMV-hTGF- β 1-EGFP Konstrukt ein geeignetes Instrument, um den Syntheseweg des rekombinanten hTGF- β 1 zu verfolgen. Außerdem wurden Western Blot Analysen mit einem gegen GFP gerichteten Antikörper durchgeführt.

In den CHO Zellen war weder in der Fluoreszenzmikroskopie noch in den Western Blots der Zelllysate und Überstände eine Proteinexpression nachweisbar. Dagegen fluoreszierten erfolgreich transfizierte LX-2 Zellen im ultravioletten Licht grün. In den Western Blots der LX-2 Zelllysate konnte in den nicht reduzierten Proben das dimere hochmolekulare Vorläuferprotein detektiert werden. Eine spezifische Bande bei 85 kDa, dem erwarteten Molekulargewicht des dimeren hTGF- β 1-EGFP-Fusionsproteins, war nicht nachweisbar. Die reduzierten Zelllysatproben zeigten eine Bande bei etwa 80 kDa, diese repräsentierte das monomäre Pro-hTGF- β 1-EGFP. Mittels SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot konnte in den nicht reduzierten Proben der Überstände ebenfalls das Vorläuferprotein nachgewiesen werden. Eine Detektion des dimeren hTGF- β 1-EGFP gelang nicht. In den reduzierten Überständen zeigten sich drei spezifische Proteinbanden: Pro-hTGF- β 1-EGFP bei etwa 80 kDa, hTGF- β 1-EGFP bei etwa 43 kDa und eine dezente EGFP-Bande bei 30 kDa. Der Nachweis des hTGF- β 1-EGFP allein im Überstand und nicht im Zelllysate ließ darauf schließen, dass Pro-hTGF- β 1-EGFP hauptsächlich während oder kurz nach der Sekretion in Pro-Region und matures hTGF- β 1 gespalten wird.

Durch die konfokale Mikroskopie konnte festgestellt werden, dass das Expressionskonstrukt nicht nur in LX-2 Zellen, sondern auch in CHO Zellen aktiv war. Der fehlende Nachweis in den vorgeschalteten Experimenten war wahrscheinlich auf eine zu geringe Transfektionseffizienz zurückzuführen. Das rekombinante Protein konzentrierte sich in dichten Vesikeln im Zytosol der Zellen. Diese Lokalisation ließ vermuten, dass auch das rekombinant hergestellte hTGF- β 1 seinen Weg, wie alle sekretorischen Proteine, über das raue endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Komplex zur Zellmembran nimmt, um dort durch Exozytose in den extrazellulären Raum abgegeben zu werden.

Im nächsten Schritt wurden Expressionskonstrukte kloniert, die das humane TGF- β 1 mit dem Flag-Oktapeptid fusionierten. In dem ersten Plasmid fehlten die letzten beiden für Aminosäuren kodierenden Sequenzen. Die Sekretionsrate war gering, sodass im Überstand ein

Proteinnachweis ohne Aufkonzentration der Proteine durch TCA-Fällung nicht möglich war. Der pCMV-Tag4A-*full-length*-hTGF- β 1 Expressionsplasmid ermöglichte die Synthese des vollständigen 390 Aminosäuren umfassenden Proteins. Die erhoffte Steigerung der Sekretionsrate blieb aber aus. Deshalb musste vor allen weiteren Versuchen die Proteinkonzentration des Mediums durch TCA-Fällung oder Lyophilisation erhöht werden.

Die Western Blot Analysen zeigten eine Expression der Konstrukte sowohl in CHO als auch in LX-2 Zellen. In den nicht reduzierten Zelllysaten ließ sich das Vorläuferprotein bei einem Molekulargewicht von etwa 100 kDa nachweisen. Bei dem *full-length* Konstrukt stellte sich außerdem eine Bande bei 50 kDa dar, die vermutlich dem nicht durch Disulfidbrücken verbundenen Vorläuferprotein entsprach. Nach Zugabe von DTT zeigte sich in allen Proben allein eine 50 kDa Bande. Im Zelllysate war das mature hTGF- β 1-Flag nicht nachweisbar.

Schon Miyazono *et al.* berichteten 1991, dass sie intrazellulär kein matures TGF- β 1 nachweisen konnten, und vermuteten, dass die TGF- β 1 Prozessierung intrazellulär sehr ineffizient abläuft [72].

Die unbehandelten Überstände zeigten im Western Blot eine breite Bande zwischen 90 und 120 kDa, die das glykosylierte dimere hTGF- β 1-Flag-Vorläuferprotein kennzeichnete. Unter reduzierenden Bedingungen verschwand diese Bande. Dafür erschien die Pro-hTGF- β 1-Flag-Bande bei etwa 50 kDa und die Bande des muren hTGF- β 1-Flag bei etwa 13 kDa. Die Bande des monomeren Pro-hTGF- β 1-Flag setzte sich bei den Western Blots der CHO Zellüberstände aus zwei Banden zusammen.

Insgesamt stimmten die Ergebnisse, d.h. die detektierbaren Proteine und ihre Molekulargewichte, mit den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen überein. Die Pro-Region β 1-LAP konnte bei den Experimenten nicht detektiert werden, weil die verwendeten Antikörper gegen die C-terminal fusionierten Oligopeptide EGFP bzw. Flag-Tag gerichtet waren, welche nach Endoproteolyse vom β 1-LAP abgespalten wurden.

6.2.2 Einflüsse von Furin und LTBP-1 auf die hTGF- β 1 Synthese, Prozessierung und Sekretion

Die Ko-Expression von hTGF- β 1-Flag mit Furin und/oder LTBP-1 sollte zum einen die Menge des vollständig prozessierten hTGF- β 1 erhöhen und zum anderen weitere Erkenntnisse über die Rolle dieser Proteine bei der hTGF- β 1 Synthese, Prozessierung und Sekretion bringen.

Wie Experimente mit löslichen TGF- β 1 Rezeptoren zeigen, kann die Suppression von biologisch aktivem hTGF- β 1 den Fibroseprozess hemmen [41,42]. Folglich sind prinzipiell alle an der hTGF- β 1 Synthese beteiligten Proteine mögliche Angriffspunkte in der Therapie fibrosierender Erkrankungen.

Gentry *et al.* schlossen 1988 aus ihren Ergebnissen, dass CHO Zellen die Proteasen, welche für die korrekte TGF- β 1 Prozessierung notwendig sind, exprimieren, stellten aber auch fest, dass ein Teil der Pro-Region über Disulfidbrücken mit dem TGF- β 1 verbunden bleibt. Sie vermuteten, dass Cys-33 der Pro-Region eine Disulfidbrücke mit einem Cysteinrest des maturen Proteins ausbildet. Sie machten die hohe Menge sezernierten Proteins für das unphysiologische *cross-linking* verantwortlich [66]. Im selben Jahr machten Miyazono *et al.* die Beobachtung, dass von humanen Thrombozyten synthetisiertes TGF- β 1 an ein hochmolekulares Protein gebunden vorliegt. Sie stellten fest, dass die TGF- β 1 Pro-Region nach Proteolyse nicht kovalent mit TGF- β 1 verbunden bleibt und über eine Disulfidbrücke mit einem 126-160 kDa schweren Bindungsprotein verknüpft wird [61]. Kanzaki *et al.* stellten 1990 die Hypothese auf, dass dieses TGF- β 1 Bindungsprotein an der proteolytischen Prozessierung von TGF- β 1 beteiligt ist [156]. Bei Experimenten mit HEL Zellen beobachteten Miyazono *et al.* wie Gentry *et al.* 1988, dass ein Teil des TGF- β 1 ungespalten sezerniert wird. Sie stellten fest, dass Pro-TGF- β 1 in Abwesenheit des Bindungsproteins LTBP-1 in unprozessierter Form länger in der Zelle nachzuweisen ist und langsamer sezerniert wird, als an LTBP-1 gebundenes TGF- β 1. Die Experimente ergaben, dass ungebundenes TGF- β 1 in den cis-Golgi Zisternen zurückbleibt und der Transport von dort auch in andere Zellorganellen oder zum Abbau in Lysosomen erfolgen kann. Außerdem zeigten sie, dass sich die unphysiologische Disulfidbrücke nur ohne LTBP-1 bildet. Sie vermuteten, dass Cys-33 in Anwesenheit von LTBP-1 über Disulfidbrücken mit diesem verknüpft wird. Erfolgt diese Reaktion nicht, kann Cys-33 eine kovalente Bindung mit einem Cysteinrest des TGF- β 1 ausbilden. Daraus schlossen sie, dass LTBP-1 eine große Rolle bei intrazellulärem Transport, Prozessierung und Sekretion von TGF- β 1 spielt [601,66]. Zou *et al.* generierten 2004 ein TGF- β 1 Konstrukt, bei dem Cys-33 durch Serin substituiert wurde, und erhöhten die Expressionsrate durch Austausch der *leader sequence* durch die von Ratten Albumin. Auf diese Weise konnten sie in CHO und COS Zellen große Mengen biologisch aktiven TGF- β 1 herstellen und folgerten, dass LTBP keinen Einfluss auf TGF- β 1 Faltung und Sekretion hat [154]. Allerdings war die unphysiologische Ausbildung der Disulfidbrücke wegen der Cys-33 Substitution und damit die Produktion von hauptsächlich biologisch inaktiven TGF- β 1 nicht möglich. Drews *et al.* konnten 2007 zeigen, dass die Ko-Expression von hTGF- β 1 und Furin zu einem Anstieg der hTGF- β 1-Konzentration im Medium führt [157].

Dubois *et al.* stellten 1995 fest, dass Furin defiziente LoVo Zellen TGF- β 1 nicht prozessieren können. Im Überstand war nur das Pro-TGF- β 1 nachzuweisen. Bei Ko-Expression von TGF- β 1 und Furin verschwand die 55 kDa Bande des Vorläuferproteins und die 44 kDa Bande des β 1-LAP und die 12,5 kDa Bande des TGF- β 1 Monomers erschienen [67]. Ayoubi

et al. konnten 1996 zeigen, dass CHO Zellen, welche die *subtilisin/kexin-like* Serin-Endoprotease Furin stabil überexprimieren, voll biologisch aktives TGF- β 1 produzieren können [153]. Dubois *et al.* bewiesen 2001, dass Furin das wichtigste TGF- β 1 *Converting Enzyme* darstellt [68].

Bei der Interpretation der dieser Arbeit zugrundeliegenden Zellkulturexperimente müssen die Ergebnisse der Western Blot und ELISA Analysen zusammen betrachtet werden. Die Western Blots zeigen welche hTGF- β 1-Flag-Proteine in Zelllysaten und Überständen detektiert werden können. Bei Ko-Expression von hTGF- β 1-Flag mit Furin und/oder LTBP-1 konnte beurteilt werden, ob sich die Vorläuferproteinkonzentration und/oder die Menge des matures hTGF- β 1-Flag verändert. Im ELISA konnte nicht zwischen Pro-hTGF- β 1-Flag und hTGF- β 1-Flag differenziert werden. Weil der Flag-ELISA für diese Experimente neu etabliert wurde, ist außerdem nicht bekannt, ob dieser beide Proteine in gleicher Gewichtung detektiert oder ob die hTGF- β 1-Flag-Konzentration die Absorption mehr oder weniger beeinflusst als die Konzentration des Pro-Proteins.

Die Ko-Expression von hTGF- β 1-Flag, Furin und/oder LTBP-1 in CHO Zellen steigerte sowohl die hTGF- β 1-Flag-Konzentration im Zelllysate als auch im Überstand. Dies konnte durch Western Blot Analysen festgestellt und durch den Flag-ELISA bewiesen werden. Außerdem zeigten die zusätzlich mit Furin transfizierten Zellen im Western Blot der Überstände den selektiven Verlust einer der Pro-hTGF- β 1-Flag-Banden. Dabei verschwand der höhermolekulare Anteil der Doppelbanden. Warum das Vorläuferprotein als Doppelbande imponierte und warum nur ein Teil durch enzymatische Proteolyse mittels Furin gespalten werden konnte, bleibt unklar. Bei Furin Ko-Expression war die Abnahme der hTGF- β 1-Flag-Vorläuferproteinkonzentration und die simultane Zunahme des muren hTGF- β 1-Flag erwarten worden. Die Steigerung der Syntheserate hingegen war überraschend.

Weil LTBP-1 eine Aufgabe bei Transport, Prozessierung und Sekretion von TGF- β 1 zugesprochen wird, hätte man bei LTBP-1 und hTGF- β 1-Flag Ko-Expression vermutet, dass der Anteil des unprozessierten Proteins im Überstand abnimmt und/oder dass die Sekretionsrate bei gleichzeitiger Abnahme der intrazellulären hTGF- β 1-Flag-Konzentrationen steigt. In den Experimenten konnte aber keine vermehrte Sekretion nachgewiesen werden. Die gesteigerte extrazelluläre hTGF- β 1-Flag-Konzentration schien vielmehr Folge der signifikant erhöhten intrazellulären Konzentration zu sein.

In der Literatur ist ein Einfluss von Furin und LTBP-1 auf die hTGF- β 1 Genexpression beschrieben. Eine Modulation auf Genebene war in diesem Fall aber nicht möglich, weil das hTGF- β 1 Gen dieses Expressionsplasmids unter der Kontrolle des CMV-Promotors stand,

der konstitutiv aktiv war. Eine Stabilisierung der mRNA ist ebenfalls unwahrscheinlich, weil Furin und LTBP-1 nicht im Zytosol, sondern überwiegend in Zellorganellen lokalisiert sind. Folglich müssen Furin und LTBP-1 ko- oder post-translationale Abschnitte des hTGF- β 1 Syntheseweges beeinflussen. Miyazono *et al.* beschrieben 1992, dass nicht an LTBP-1 gebundenes TGF- β 1 in den cis-Golgi Zisternen zurückbleibt und von dort zum Abbau in Lysosomen transportiert werden kann [74]. Folglich wäre also möglich, dass LTBP-1 die Proteinstruktur stabilisiert und die Degradierung verhindert.

Überraschend war, dass die Einflüsse von Furin und LTBP-1 in beiden Zellsystemen unterschiedlich waren. In Western Blot und ELISA Analysen der LX-2 Zellproben konnte keine Zunahme der hTGF- β 1-Flag Synthese und Sekretion nachgewiesen werden. Statt dessen wurde eine Abnahme sowohl der intrazellulär als auch der extrazellulär detektierbaren hTGF- β 1-Flag-Proteinmenge beobachtet. Dabei schien ebenfalls der Syntheseweg und nicht die Sekretion moduliert zu werden. Die Konzentration im Überstand nahm bei allen Versuchen simultan zu der intrazellulären Konzentration ab. Dabei variierte die prozentuale Senkung der Synthese der einzelnen Proben. In manchen Versuchen war die Konzentration in allen ko-transfizierten Proben gleichermaßen supprimiert, in anderen nahm die messbare Menge am meisten in der dreifach transfizierten Probe, weniger in der Furin ko-exprimierenden und fast gar nicht in der zusätzlich LTBP-1 überexprimierenden Probe ab. Die mit Furin Konstrukt ko-transfizierten Zellen zeigten wie erwartet ein vollständiges Verschinden der Pro-hTGF- β 1-Flag-Bande in den Western Blots der Überstände. Diese Beobachtung unterstreicht die Rolle von Furin als hTGF- β 1 *Converting Enzyme*.

Auf welcher Ebene Furin und LTBP-1 ihre noch unbekannte modulierende Wirkung auf die hTGF- β 1 Syntheserate entfalten und warum die hTGF- β 1-Konzentration in einer Zelllinie steigt und in einer anderen abnimmt, sollte Gegenstand weiterführender Experimente sein.

6.2.3 Einflüsse der hTGF- β 1 Signalsequenzpolymorphismen auf die hTGF- β 1 Synthese und Sekretion

Verschiedenste Fallstudien haben wie in Abschnitt 6.1.2 beschrieben einen Einfluss der SNPs in der Signalsequenz des humanen TGF- β 1 Gens auf die Leberfibroseprogression nachweisen können. *In vivo* spielen beim interindividuell variablen Krankheitsverlauf allerdings zusätzlich viele andere Faktoren eine Rolle. Das Zusammenspiel mehrerer Gene, Gen-Umweltinteraktionen und Störfaktoren wie Lebenswandel, Medikation und Komorbiditäten müssen berücksichtigt werden, können aber in die statistische Auswertung nicht vollständig einbezogen werden. Auch das „*linkage disequilibrium*“ als mögliche Fehlerquelle

muss in Betracht gezogen werden. Deshalb können die Ergebnisse von Populationsstudien nicht ohne Kritik auf den klinischen Alltag übertragen werden.

Die *in vitro* Experimente sollten Aufschluss über die Auswirkungen der SNPs an Position +869 und +915 des hTGF- β 1 Gens im Bereich der Signalsequenz geben. In der Zellkultur konnten Einflüsse anderer Gene ausgeschlossen und die Umweltfaktoren durch konstante Kulturbedingungen normiert werden.

Die drei *in vivo* vorkommenden Haplotypen der hTGF- β 1 Signalsequenz (10Leu/25Arg, 10Pro/25Pro, 10Pro/25Arg) wurden in den pCMV-Tag4A-*full-length*-hTGF- β 1 Expressionsvektor kloniert. CHO und LX-2 Zellen wurden mit 2 μ g dieser Plasmide transfiziert und 48 Stunden kultiviert. Die Transfektion erfolgte bei hoher Zelldichte. 24 Stunden nach Transfektion wurde die FKS-Konzentration des Mediums auf 0,2% herabgesetzt. Anschließend Western Blot und ELISA Analysen ergaben eine Abnahme der messbaren hTGF- β 1-Flag-Konzentration sowohl in den Zelllysaten als auch in den Überständen. Im ELISA zeigte sich eine statistisch signifikante Abnahme der bei 450nm bestimmten Absorption durch die Polymorphismen. Dabei führte die simultane Nukleotidsubstitution in Codon 10 und Codon 25 zu einer Reduktion der Absorption auf das 0,76 $\pm$ 0,004-fache bei den Zelllysaten der CHO Zellen und auf das 0,68 $\pm$ 0,15-fache bei den Zelllysaten der LX-2 Zellen. Diese Differenzen waren signifikant mit $p=0,0015$ bzw. $p=0,0407$. Der 10Pro/25Arg Genotyp senkte die Absorption der Proben der Zelllysate bei den CHO auf das 0,43 $\pm$ 0,09-fache und bei den LX-2 Zellen auf das 0,57 $\pm$ 0,003-fache. Es ergab sich eine Signifikanz von $p=0,001$ bzw. $p<0,0001$. Bei den ELISA Analysen der Überstände zeigte der 10Pro/25Pro Genotyp im Falle der CHO Zellen das 0,56 $\pm$ 0,12-fache der Absorption des 10Leu/25Arg Genotyps mit $p=0,0049$. Bei den LX-2 Zellen führte die Nukleotidsubstitution in Codon 10 und Codon 25 zur Senkung der Absorption auf das 0,57 $\pm$ 0,13-fache mit $p=0,0088$. Der Genotyp 10Pro/25Arg reduzierte die gemessenen Werte auf das 0,47 $\pm$ 0,003-fache bei CHO und auf das 0,42 $\pm$ 0,13-fache bei LX-2 Zellen mit $p<0,0001$ bzw. $p=0,0036$. Insgesamt senkte die alleinige Nukleotidsubstitution an Position +869 die Absorption der Zelllysate und Überstände beider Zelllinien tendenziell mehr als ein Austausch an Position +869 und Position +915.

Es muss darauf hingewiesen werden, dass die Auswirkungen der SNPs bei den hier durchgeführten Experimenten streng von den Kulturbedingungen abhängig waren. Eine Transfektion bei sehr hoher Zelldichte und die Reduktion der FKS-Konzentration nach 24 Stunden führten zu einem reproduzierbaren Abfall der hTGF- β 1-Flag-Konzentrationen durch die SNPs.

Awad *et al.* kamen bei Experimenten mit humanen Lymphozyten ebenfalls zu dem Ergebnis, dass *in vitro* zur TGF- β 1 Synthese stimulierte Lymphozyten mit dem Genotyp Arg25Arg mehr

hTGF- β 1 sezernieren als die mit dem Genotyp Arg25Pro. Die im Medium gemessene hTGF- β 1-Konzentration war bei Lymphozyten mit homozygotem Genotyp signifikant höher als bei heterozygotem Genotyp. Danach wurde der Arg25Arg Genotyp als „*high producer*“ und der Arg25Pro Genotyp als „*low producer*“ bezeichnet [158]. Gewaltig *et al.* stellten fest, dass die in Thrombozyten-freiem Serum gemessene hTGF- β 1-Konzentration bei Arg25Arg-Patienten signifikant höher ist als die bei Arg25Pro-Patienten. Sie fanden außerdem, dass die hTGF- β 1 Serumkonzentration bei Leu10Leu-Patienten höher ist als die bei Pro10Pro-Patienten. Dieser Unterschied erreichte allerdings keine statistische Signifikanz [147]. Dunning *et al.* machten bei der Transfektion von HeLa Zellen mit TGF- β 1 Kontrukten, die in Codon 10 entweder für Leucin oder für Prolin kodierten, die Beobachtung, dass 10Pro mit einer erhöhten TGF- β 1 Sekretionsrate assoziiert ist [159]. Allerdings analysierten Dunning *et al.* nicht den Polymorphismus an Stelle +915 des TGF- β 1 Gens.

Die zitierten Arbeitsgruppen untersuchten allein die sezernierte TGF- β 1 Menge. In den von mir durchgeführten Experimenten wurden zusätzlich die intrazellulären hTGF- β 1 Konzentrationen verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass nicht die Sekretion, sondern die Syntheserate moduliert wird. Die SNPs in Position +869 und +915 führen zu einer Suppression der hTGF- β 1 Synthese.

Die beiden Polymorphismen liegen im Bereich der Signalsequenz, welche für den Transport des sekretorischen Proteins in das raue endoplasmatische Retikulum (rER) verantwortlich ist. Verlässt das Signalpeptid das Ribosom, wird es von einem Signalerkennungspartikel gebunden. Die Proteinbiosynthese wird unterbrochen bis der Erkennungspartikel über einen Rezeptor an die Membran des rER andockt und Signalpeptid mit Ribosom an das Translocon abgibt. Nach Translokation in das Lumen wird das Signalpeptid durch eine Signalpeptidase abgespalten.

Die SNPs könnten theoretisch auf RNA und/oder auf DNA Ebenen wirken:

Wie Abb. 58 zeigt, könnten die Nukleotidsubstitutionen an Stelle +869 von Thymin zu Cytosin und an Position +915 von Guanin zu Cytosin die mRNA Faltung verändern. Eine neue mRNA Struktur könnte die Transkription sowie die Stabilität oder die Translationsrate beeinflussen.

Zudem führen die Polymorphismen zu einem Aminosäureaustausch während der Translation. An 10. Stelle wird statt Leucin Prolin und an 25. Stelle statt Arginin Prolin eingebaut. Das hTGF- β 1 Signalpeptid setzt sich aus einer polaren C-terminalen Region, einer zentralen hydrophoben Domäne und einem positiven N-terminalen Abschnitt zusammen. Ein Aminosäureaustausch könnte zu einer Störung der Sekundär- und Tertiärstruktur des Peptids führen.

Der SNP in Codon 10 führt zur Substitution des hydrophoben Leucins durch das kleinere, neutrale Prolin. Dieser Austausch könnte die zentrale α -Helix-Struktur zerstören und den Transport durch die Membran des rauen endoplasmatischen Retikulums behindern.

Die 25. Aminosäure liegt am C-Terminus der Signalsequenz. Die große, basische Aminosäure Arginin wird durch das kleine, apolare Prolin ersetzt, was einen direkten Einfluss auf die Schnittstelle zwischen der 29. und 30. Aminosäure haben könnte.

Insgesamt könnten die Aminosäuresubstitutionen die Wechselwirkung zwischen Signal-erkennungspartikel und Signalpeptid, den Transport zum rER, die Interaktion mit dem Translocon, die Translokation in des rER oder die proteolytische Abspaltung des Signalpeptids beeinflussen.

An welcher Stelle die Polymorphismen eingreifen und warum die Kulturbedingungen eine große Rolle spielen, muss in weiterführenden Experimenten analysiert werden. So müsste z.B. überprüft werden, ob die intrazelluläre mRNA-Konzentration durch die Nucleotidsubstitutionen beeinflusst wird.

6.3 Schlussfolgerung

In meinen Experimenten wurde der Einfluss von hTGF- β 1 Polymorphismen auf die Fibroseprogression *in vivo* und auf die hTGF- β 1 Synthese und Sekretion *in vitro* untersucht.

Außerdem wurden die Rollen von Furin und LTBP-1 bei der hTGF- β 1 Synthese, Prozessierung und Sekretion analysiert.

Die Fallstudie ergab eine Assoziation zwischen dem Promotorpolymorphismus und dem Fibrosegrad sowie einen Einfluss der Art des Polymorphismus in Codon 10 auf die Fibroseprogression. Das T-Allel des TGF- β 1-Promotors zeigte eine höhere Frequenz bei den Patienten mit milder Fibrose. Patienten mit dem Genotyp Leu10Pro wiesen durchschnittlich eine schwerere Fibrose auf als Homozygote. Daneben konnten Kopplungen der einzelnen Polymorphismen festgestellt werden.

Ein in der Literatur beschriebener Einfluss des SNP in Codon 25 konnte nicht bewiesen werden. Durch die strenge Kopplung der beiden Polymorphismen ist allerdings schwer zu entscheiden, ob die in Fallkontrollstudien für den SNP in Codon 25 beschriebenen Beobachtungen eigentlich den Einfluss des Polymorphismus in Codon 10 widerspiegeln, oder ob beide Polymorphismen Auswirkungen haben und das Ergebnis der vorliegenden Studie falsch negativ ausfällt.

Der Polymorphismus an Position –509 könnte durch Modifikation der Transkription wirken. Allerdings konnte die Auswirkung dieser Nukleotidsubstitution in den weiterführenden Experimenten nicht untersucht werden, weil in den verwendeten Expressionsplasmiden der hTGF- β 1-Promotor durch den CMV-Promotor ersetzt wurde.

Die Einflüsse der Signalsequenzpolymorphismen wurden in den Zellkulturexperimenten analysiert. Sowohl der 10Pro/25Arg Genotyp als auch der 10Pro/25Pro Genotyp zeigten eine signifikant niedrigere hTGF- β 1 Synthese und Sekretion als der 10Leu/25Arg Genotyp. Es konnte nicht sicher differenziert werden, ob allein die Nukleotidsubstitution an Position +869 für die verminderte hTGF- β 1 Synthese verantwortlich ist, oder ob auch die Nukleotidsubstitution an Position +915 die Syntheserate modifiziert. Auffallend war, dass Zellen mit dem 10Pro/25Arg Genotyp tendenziell niedrigere intrazelluläre und extrazelluläre hTGF- β 1-Konzentrationen aufwiesen als die mit dem 10Pro/25Pro Genotyp.

Weil TGF- β 1 neben PDGF den wichtigsten pro-fibrogenen Mediator in der Entwicklung von Organfibrosen darstellt, wäre nach den Ergebnissen der *in vitro* Experimente zu erwarten gewesen, dass Patienten, die in Codon 25 und/oder Codon 10 für Prolin kodieren, eine mildere Fibrose aufweisen. Statt dessen konnte für die Art des Polymorphismus in Codon 25 kein signifikanter Einfluss auf das Fibrorestadium nachgewiesen werden und die Heterozygotenhäufigkeit in Codon 10 war in der Gruppe „schwere Fibrose“ höher als in der Gruppe

„milde Fibrose“. Da in den Zellkulturexperimenten leider keine Heterozygotie simuliert werden konnte, ist nicht bekannt, welchen Einfluss die Kombination beider Allele auf die hTGF- β 1 Synthese hat.

Warum eine niedrigere TGF- β 1 Syntheserate keinen protektiven Effekt hat, könnte vielfältige Ursachen haben. Zum einen stimmt die sezernierte TGF- β 1 Menge nicht unbedingt mit der des biologisch aktiven Zytokins überein, zum anderen könnte ein Organismus, der an niedrigere basale TGF- β 1 Spiegel adaptiert ist, empfindlicher auf einen pathologischen Konzentrationsanstieg reagieren. Da die beobachteten Ergebnisse außerdem von den Kulturbedingungen abhängig waren, könnten die SNPs in einzelnen Geweben und unter physiologischen und pathologischen Verhältnissen unterschiedliche intrazelluläre Auswirkungen haben. Die Effekte der Polymorphismen könnten durch die TGF- β 1 Syntheserate, den Zellzyklus, das Nährstoff- und Sauerstoffangebot sowie verschiedenste Stressoren moduliert werden. Diese Komplexität könnte die sehr variablen Ergebnissen der publizierten Populationsstudien erklären.

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss der Endoprotease Furin und des TGF- β 1 Bindungsproteins LTBP-1 auf die hTGF- β 1 Synthese, Prozessierung und Sekretion untersucht. Die Ergebnisse legen nahe, dass Furin und LTBP-1 in CHO und LX-2 Zellen unterschiedliche Funktionen übernehmen.

Die Rolle von Furin als hTGF- β 1 *Converting Enzyme* konnte in beiden Zelllinien bestätigt werden. Die Menge des unprozessierten Vorläuferproteins nahm bei Furin Ko-Expression sowohl in CHO als auch in LX-2 Zellen signifikant ab. Das von CHO Zellen sezernierte Pro-hTGF- β 1-Flag konnte aber nur zu einem Teil umgesetzt werden. Welche molekularen Ursachen dem zugrunde liegen, bleibt unklar. Dagegen gaben LX-2 Zellen bei Furin Überexpression ausschließlich matures hTGF- β 1-Flag ins Medium ab. Die Endoprotease konnte in keiner der beiden Zelllinien intrazellulär Pro-hTGF- β 1-Flag umsetzen. Es ist zu vermuten, dass β 1-LAP erst während oder unmittelbar nach Sekretion vom maturen Protein abgespalten wird. Zudem führte die Furin Ko-Expression in CHO Zellen zur Steigerung und in LX-2 Zellen zur Suppression der hTGF- β 1-Flag Synthese. Der Mechanismus ist noch unbekannt.

Auch die LTBP-1 Überexpression erhöhte die hTGF- β 1-Flag Synthese der CHO Zellen und hemmte die hTGF- β 1 Synthese der LX-2 Zellen. Demnach beeinflusst LTBP-1 nicht nur die hTGF- β 1 Sekretion, sondern auch die Effektivität der intrazellulären Proteinsynthese.

Furin und LTBP-1 nehmen vermutlich ko- oder post-translational, z.B. durch Änderung der Proteinstabilität oder durch Modifikation des Proteinabbaus, Einfluss auf die hTGF- β 1 Synthese.

Insgesamt konnte dargelegt werden, dass sowohl Furin als auch LTBP-1 noch unbekannte modulierende Effekte auf Synthese, Prozessierung und Sekretion dieses multifunktionalen Zytokins haben. Zudem konnte gezeigt werden, dass sie in verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Wirkungen entfalten. Deshalb ist zu vermuten, dass eine therapeutische Beeinflussung dieses Systems in einzelnen Organen abweichende Konsequenzen hätte. Auf welche Weise sie die intrazelluläre hTGF- β 1-Konzentration in CHO Zellen erhöhen und in LX-2 Zellen senken, bedarf weiterer Analysen.

In der vorliegenden Arbeit konnte zudem aufgezeigt werden, dass der pCMV-Tag4A-*full-length*-hTGF- β 1 Expressionsplasmid ein gutes und hilfreiches Instrument zur Untersuchung verschiedenster Einflüsse auf die hTGF- β 1 Synthese, Prozessierung und Sekretion darstellt. Mit der hier durchgeführten Klonierung konnte die Grundlage für viele weitere Experimente gelegt werden, die unter anderem zur Klärung der physiologischen Funktion von hTGF- β 1 Genpolymorphismen beitragen werden.

7. Literaturverzeichnis

1. Böcker, Denk, Heitz. Pathologie; Urban & Fischer, 3. Auflage, 2004.
2. Welch. Sobotta Lehrbuch der Histologie; Urban & Fischer, 1. Auflage, 2003.
3. Herold. Innere Medizin; G. Herold, 2007.
4. Bataller, R., Brenner, DA. Liver Fibrosis. J. Clin. Invest. 2005;116(2):209-218
5. Renz-Polster, Krautzig, Braun. Innere Basislehrbuch; Urban & Fischer, 3. Auflage, 2006
6. Ramadori, G., Saile, B. Portal tract fibrogenesis in the liver. Lab. Invest. 2004; 84(2):153-159
7. Forbes, SJ., Russo, FP., Rey, V., Burra, P., Rugge, M., Wright, NA., Alison, MR. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. Gastroenterology. 2004;127(4):955-963
8. Ishii, G., Sangai, T., Sugiyama, K., Ito, T., Hasebe, T., Endoh, Y., Magae, J., Ochiai, A. In vivo characterization of bone marrow-derived fibroblasts recruited into fibrotic lesions. Stem Cells. 2005;23(5):699-706.
9. Zavadil, J., Bottinger, EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. Oncogene. 2005;24(37):5764-5774.
10. Gressner, AM. Perisinusoidal lipocytes and fibrogenesis. Gut. 1994;35(10):1341-1343.
11. Hendriks, HF., Verhoofstad, WA., Brouwer, A., de Leeuw, AM., Knook, DL. Perisinusoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver. Exp. Cell Res. 1985;160(1):139-150.
12. Housset, C., Rockey, DC., Bissell, DM. Endothelin receptors in rat liver: lipocytes as a contractile target of endothelin 1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993;90(20):9266-9270.
13. Clemens, MG., Zhang, JX. Regulation of sinusoidal perfusion: *in vivo* methodology and control by endothelins. Semin. Liver Dis. 1999;19(4):383-396.
14. Kmiec, Z. Cooperation of liver cells in health and disease. Adv. Anat. Embryol. Cell Biol. 2001;161:III-XIII,1-152.
15. Vinas, O., Bataller, R., Sancho-Bru, P., Gines, P., Berenguer, C., Enrich, C., Nicolas, JM., Ercilla, G., Gallert, T., Vives, J., Arroyo, V., Rodes, J. Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. Hepatology. 2003;38(4):919-929.
16. Winau, F., Hegasy, G., Weiskirchen, R., Weber, S., Cassan, C., Sieling, PA., Modlin, RL., Liblau, RS., Gressner, AM., Kaufmann, SH. Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. Immunity. 2007;26(1):118-130.
17. Reeves, HL., Friedman, SL. Activation of hepatic stellate cells – a key issue in liver fibrosis. Front Biosci. 2002;7:d808-826.

18. Gressner, AM, Weiskirchen, R., Breitkopf, K., Dooley, S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci.* 2002;7:d793-807.
19. Bonner, JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15(4):255-273.
20. Campbell, JS., Hughes, SD., Gilbertson, DG, Palmer, TE., Holdren, MS., Haran, AC., Odell, MM., Bauer, RL., Ren, HP., Haugen, HS., Yen, MM., Fauston, N. Platelet-derived growth factor C induces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005;102(9):3389-3394.
21. Poli, G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol. Aspects Med.* 2000;21(3):49-98.
22. Parola, M., Robino, G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J. Hepatol.* 2001;35(2):297-306.
23. Casini, A., Galli, G., Salzano, R., Ceni, E., Franceschelli, F., Rotella, CM., Surrenti, C. Acetaldehyde induces c-fos and c-jun proto-oncogenes in fat-storing cell cultures through protein kinase C activation. *Alcohol Alcohol.* 1994;29(3):303-314.
24. Greenwel, P., Dominguez-Rosales, JA., Mavin, G., Rivas-Estilla, AM., Rojkind, M. Hydrogen peroxide: a link between acetaldehyde-elicited alpha1(I) collagen gene up-regulation and oxidative stress in mouse hepatic stellate cells. *Hepatology.* 2000;31(1):109-117.
25. Ikeda, H., Yatomi, Y., Yanase, M., Satoh, H., Maekawa, H., Ogata, I., Ozaki, Y., Takuwa, Y., Monchida, S., Fujiwara, K. Biological activities of novel lipid mediator sphingosine 1-phosphate in rat hepatic stellate cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2000;279(2):G304-310.
26. Bissell, DM., Roulot, D., George, J. Transforming growth factor beta and the liver. *Hepatology.* 2001;34(5):857-867.
27. Bissell, DM., Wang, SS., Jamagin, WR, Roll, FJ. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J. Clin. Invest.* 1995;9(1):447-455.
28. Kane, CJ., Hebda, PA., Mansbridge, JN., Hanawalt, PC. Direct evidence for spatial and temporal regulation of transforming growth factor beta1 expression during cutaneous wound healing. *J. Cell Physiol.* 1991;149(1):157-173.
29. Wahl, SM., Hunt, DA., Wakefield, LM., McCartney-Francis, N., Wahl, LM., Roberts, AB., Sporn, MB. Transforming growth factor beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987;84(16):5788-5792.
30. Branton, MH., Kopp, JB. TGF-beta and fibrosis. *Microbes Infect.* 1999;1(15):1359-65.
31. Leask, A., Denton, CP., Abraham, DJ. Insights into the molecular mechanism of chronic fibrosis: the role of connective tissue growth factor in scleroderma. *J. Invest. Dermatol.* 2004;123(1):1-6.
32. De Bleser, PJ., Xu, G., Rombouts, K., Rogiers, V., Geerts, A. Glutathione levels discriminate between oxidative stress and transforming growth factor-beta signaling in activated rat hepatic stellate cells. *J. Biol. Chem.* 1999;274(48):33881-33887.

33. Bauer, M., Schuppan, D. TGFbeta1 in liver fibrosis: time to change paradigms? *FEBS Lett.* 2001;502(1-2):1-3.
34. Erhardt, A., Lorke, J., Vogt, C., Poremba, C., Willers, R., Sagir, A., Haussinger, D. Transient elastography for diagnosing liver cirrhosis. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2006;19(7):2765-2769.
35. Kettaneh, A., Marcellin, P., Douvin, C., Poupon, R., Zion, M., Beaugrand, M., de Ledinghen, V. Features associated with success rate and performance of FibroScan measurments for the diagnosis of cirrhoses in HCV patients : a prospective study of 935 patients. *J. Hepatol.* 2007;46(4):628-634.
36. Gressner, AM., Weiskirchen, R. The tightrope of therateutic suppression of active transforming growth factor-beta: high enough to fall deeply? *J. Hepatol.* 2003; 39(5):856-859.
37. Arias, M. Lahme, B., Van de Leur, E., Gressner, AM., Weiskirchen, R. Adenoviral delivery of an antisense RNA complementary to the 3' coding sequence of transforming growth factor-beta-1 inhibits fibrogenic activities of hepatic stellate cells. *Cell Growth Differ.* 2002;13(6):165-173.
38. Kondou, H., Mushiake, S., Etani, Y., Miyoshi, Y., Michigami, T., Ozono, K. A blocking peptide for transforming growth factor-beta1 activation prevents hepatic fibrosis in vivo. *J. Hepatol.* 2003;39(5):742-748.
39. Okuno, M., Akita, K., Moriwaki, H., Kawada, N., Ikeda, K., Kaneda, K., Suzuki, Y., Kojima, S. Prevention of rat hepatic fibrosis by the protease inhibitor, camostat mesilate, via reduced generation of active TGF-beta. *Gastroenterology.* 2001; 121(7):1784-1800.
40. Schüftan, GG., Bachem, MG. Alpha2-macroglobulin reduces paracrine- and autocrine-stimulated matrix synthesis of cultued rat hepatic stellate cell. *Eur. J. Clin. Invest.* 1999;29(6):519-528.
41. George, J., Roulot, D., George, J. In vivo inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor beta type II receptor: a potential new therapy for hepatic fibrosis. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999;96(22):12819-12824.
42. Ueno, H., Sakamoto, T., Nakamura, T., Astuchi, N., Takeshita, A., Shimizu, K., Ohashi, H. A soluble transforming growth factor beta receptor expressed in muscle prevents liver fibrogenesis and dysfuction in rats. *Hum. Gene Ther.* 2000;11(1):33-42.
43. Border, WA., Okuda, S., Lanquino, LR., Sporn, MB., Ruoslahti, E. Supression of experimental glomerulonephtitis by antiserum against transforming growth factor beta 1. *Nature.* 1999;346(6282):371-374.
44. Dooley, S., Hamazavi, J., Breitkopf, K., Wiercinska, E., Said, HM., Lorenzen, J., Ten Dijke, P., Gressner, AM. *Gastroenterology.* 2003;126(1):178-191.
45. Schirmacher, P. Fleig, WE., Dienes, HP. Biopsy diagnosis of chronic hepatitis – results of an evidence-based consensus conference of the German Society of Pathology (DGP), the German Society for Digestive and Metabolic Diseases (DGVS), and the Network of Competence for Hepatitis (HepNet). *Z. Gastroenterol.* 2004; 42:175-185.

46. Dienstag, JL. The role of liver biopsy in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2002; 36(5Suppl1):S142-160.
47. Gebo, KA., Herlong, HF., Torbenson, MS., Jenckes, MW., Chander, G., Ghanem, KG., El-Kamary, SS., Sulkowski, M., Bass, EB. Role of liver biopsy in management of chronic hepatitis C: a systematic review. *Hepatology*. 2002;36(5Suppl1):161-172.
48. Desmet, VJ., Gerber, M., Hoofnagle, JH., Manns, M., Scheuer, PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology*. 1994;19(6):1523-1420.
49. Schuppan, D., Krebs, A., Bauer, M., Hahn, EG. Hepatitis C and liver fibrosis. *Cell Death Differ*. 2003;(10Suppl1):S59-67.
50. Moriya, K., Nakagawa, K., Shintani, Y., Fujie, H., Miyoshi, H., Tsutsumi, T., Miyazawa, T., Ishibashi, K., Horie, T., Imai, K., Todoroki, T., Kimura, S. Koike, K. Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res*. 2001;61(11):4365-4370.
51. Gong, G., Waris, G., Tanveer, R., Siddiqui, A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001;98(17):9599-9604.
52. Folgori, A., Capone, S., Ruggeri, L., Meola, A., Sporeno, E., Ercole, BB., Pezzanera, M., Tafi, R., Arcuri, M., Fattori, E., Lahm, A., Luzzago, A., Vitelli, A., Colloca, S., Cortese, R., Nicosia, A. A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Gastroenterology*. 2006;12(2):190-197.
53. Löffler, Petrides. *Biochemie und Pathobiochemie*; Springer, 7. Auflage, 2003.
54. McCartney-Francis, NL., Frazier-Jessen, M., Wahl, SM. TGF-beta: a balancing act. *Int. Rev. Immunol*. 1998;16(5-6):553-580.
55. Janssens, K., Ten Dijke, P., Janssens, S., van Hul, W. Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr. Rev*. 2005;26(6):743-774.
56. Massague, J. The transforming growth factor-beta family. *Annu. Rev. Cell Biol*. 1990;6:579-641.
57. Clark, DA., Coker, R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 1998;30(3):293-298.
58. Derynck, R., Rhee, L., Chen, EY., Van Tilburg, A. Intron-Exon structure of the transforming growth factor-beta precursor gene. *Nucleic. Acids. Res*. 1987;15(7): 3188-3189.
59. Kim, SJ., Glick, A., Sporn, MB., Roberts, AB. Characterisation of the promotor region of the human transforming growth factor-beta1 gene. *J. Biol. Chem*. 1989;264(1):402-408.
60. Kim, SJ., Jeang, KT., Glick, AB., Sporn, MB, Roberts, AB. Promotor sequences of the human transforming growth factor-beta1 gene responsive to transforming growth factor-beta1 autoinduction. *J. Biol. Chem*. 1989;264(12):7041-7045.
61. Miyazono, K., Hellman, U., Wernstedt, C., Heldin, CH. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta1. Purification from human platelets and structural characterization. *J. Biol. Chem*. 1988;263(13):6407-6415.

62. Gentry, LE., Webb, NR., Lim, GJ., Brunner, AM., Ranchalis, JE., Twardzik, DR., Lioubin, MN., Marquardt, H., Purchio, AF. Type 1 transforming growth factor beta: amplified expression and secretion of mature and precursor polypeptides in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell Biol.* 1987;7(10):3418-3427.
63. Brunner, AM., Marquardt, H., Malacko, AR., Lioubin, MN., Purchio, AF. Site-directed mutagenesis of cysteine residues in the pro region of the transforming growth factor beta 1 precursor. Expression and characterization of mutant proteins. *J. Biol. Chem.* 1989;264(23):13760-13764.
64. Gombotz, WR., Pankey, SC., Bouchard, LS., Phan, DH., MacKenzie, AP. Stability, characterization, formulation, and delivery system development for transforming growth factor-beta1. *Pharm. Biotechnol.* 1996;9:219-245.
65. Rothman, JE., Katz, FN., Lodish, HF. Glycosylation of a membrane protein is restricted to the growing polypeptide chain but is not necessary for insertion as a transmembrane protein. *Cell.* 1978;15(4):1467-1474.
66. Gentry, LE., Lioubin, MN., Purchio, AF., Marquardt, H. Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide. *Mol. Cell Biol.* 1988;8(10):4162-4168.
67. Dubois, CM., Laprise, MH., Blanchette, F., Gentry, LE., Leduc, R. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J. Biol. Chem.* 1995; 270(18):10618-10624.
68. Dubois, CM., Blanchette, F., Laprise, MH., Leduc, R., Grondin, F., Seidah, NG. Evidence that furin is an authentic transforming growth factor-beta1-converting enzyme. *Am. J. Pathol.* 2001;158(1):305-316.
69. Jones, BG., Thomas, L., Molloy, SS., Thulin, CD., Fry, MD., Walsh, KA., Thomas, G. Intracellular trafficking of furin is modulated by the phosphorylation state of a casein kinase II site in its cytoplasmic tail. *EMBO J.* 1995;14(23):5869-5883.
70. Gray, AM., Mason, AJ. Requirement for activin A and transforming growth factor-beta 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science.* 1990;247(4948):1338-1340.
71. Saharinen, J., Taipale, J., Keski-Oja, J. Association of the small latent transforming growth factor-beta with an eight cysteine repeat of its binding protein LTBP-1. *EMBO J.* 1996;15(2):245-253.
72. Miyazono, K., Olofsson, A., Colosetti, P., Heldin, CH. A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *EMBO J.* 1991;10(5):1091-1101.
73. Nunes, I., Gleizes, PE., Metz, CN., Rifkin, DB. Latent transforming growth factor-beta binding protein domains involved in activation and transglutaminase-dependent cross-linking of latent transforming growth factor-beta. *J. Cell Biol.* 1997;137(5):1161-1173.
74. Miyazono, K., Thyberg, J., Heldin, CH. Retention of the transforming growth factor-beta 1 precursor in the Golgi complex in a latent endoglycosidase H-sensitive form. *J. Biol. Chem.* 1992;267(8):5668-5675.
75. Annes, JP., Munger, JS., Rifkin, DB. Making sense of latent TGF-beta activation. *J. Cell Sci.* 2003;117(2):217-224.

76. Grenard, P., Bresson-Hadni, S., El Alaoui, S., Chevallier, M., Vuitton, DA., Ricard-Blum, S. Transglutaminase-mediated cross-linking is involved in the stabilization of extracellular matrix in human liver fibrosis. *J. Hepatol.* 2001;35(3):367-375.
77. Olofsson, A., Ichijo, H., Moren, A., Ten Dijke, P., Miyazono, K., Heldin, CH. Efficient association of an amino-terminally extended form of human transforming growth factor-beta binding protein with the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 1995; 270(52):31304-31307.
78. Unsöld, C., Hyytiäinen, M., Brickner-Tuderman, L., Keski-Oja, J. Latent TGF-beta binding protein LTBP-1 contains three potential extracellular matrix interacting domains. *J. Cell Sci.* 2001;115(1):187-197.
79. Taipale, J., Koli, K., Keski-Oja, J. Release of transforming growth factor-beta 1 from the pericellular matrix of cultured fibroblasts and fibrosarcoma cells by plasmin and thrombin. *J. Biol. Chem.* 1992;267(35):25378-25384.
80. Godar, S., Horejsi, V., Weidle, UH., Binder, BR., Mansmann, C., Stockinger, H. M6P/IGFII-receptor complexes urokinase receptor and plasminogen for activation of transforming growth factor-beta1. *Eur. J. Immunol.* 1999;29(3):1004-1013.
81. Ohata, M., Lin, M., Satre, M., Tsukamoto, H. Diminished retinoic acid signaling in hepatic stellate cells in cholestatic liver fibrosis. *Am. J. Physiol.* 1997;272(3Pt1):G589-596.
82. Koli, K., Saharinen, J., Hyytiäinen, M., Penttinen, C., Keski-Oja, J. Latency, activation, and binding proteins of TGF-beta. *Microsc. Res. Tech.* 2001;52(4):354-362.
83. Wakefield, L., Kim, SJ., Glick, A., Winokur, T., Colletta, A., Sporn, M. Regulation of transforming growth factor-beta subtypes by members of the steroid hormone superfamily. *J. Cell Sci. Suppl.* 1990;13:140-149.
84. Feng, XH., Derynck, R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2005;21:659-693.
85. Lebrin, F., Deckers, M., Bertolino, P., Ten Dijke, P. TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc. Res.* 2005;65(3):599-608.
86. Cheifetz, S., Bellon, T., Cales, C., Vera, S., Bernabeu, C., Massague, J., Letarte, M. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1992;267(27):19027-19030.
87. Lopez-Casillas, F., Wrana, JL., Massague, J. Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell.* 1993;73(7):1147-1464.
88. Gressner, AM., Weiskirchen, R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J. Cell Mol. Med.* 2006;10(1):76-99.
89. Piek, E., Heldin, CH., Ten Dijke, P. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J.* 1999;13(15):2105-2125.
90. Shi, Y., Massague, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003;113(6):685-700.

91. Ten Dijke, P., Hill, CS. New insights into TGF-beta-Smad signaling. *Trends. Biochem. Sci.* 2004;29(5):265-273.
92. Zhang, F., Laiho, M. On and Off: proteasome and TGF-beta signaling. *Exp. Cell Res.* 2003;291(2):275-281.
93. Izzi, L., Attisano, L. Regulation of the TGFbeta signaling pathway by ubiquitin-mediated degradation. *Oncogene.* 2004;23(11):2071-2078.
94. Leask, A., Abraham, DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* 2004;18(7):816-827.
95. Schüftan, GG., Bachem, MG. α 2-macroglobulin reduces paracrine- and autocrine-stimulated matrix synthesis of cultured rat hepatic stellate cells. *Eur. J. Clin. Invest.* 1999;29(6):519-528.
96. Costacurta, A., Priante, G., D'Angelo, A., Chieco-Bianchi, L., Cantaro, S. Decortin transfection in human mesangial cells downregulates genes playing a role in the progression of fibrosis. *J. Clin. Lab. Anal.* 2002;16(4):178-186.
97. Border, WA., Noble, NA., Yamamoto, T., Harper, JR., Yamaguchi, Y., Pierschbacher, MD., Ruoslahti, E. Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature.* 1992;360(6402):361-364.
98. Marra, F., Bonewald, LF., Park-Snyder, S., Park, IS., Woodruff, KA., Abboud, HE. Characterization and regulation of the latent transforming growth factor-beta complex secreted by vascular pericytes. *J. Cell Physiol.* 1996;166(3):537-546.
99. Wakefield, LM., Smith, DM., Flanders, KC., Sporn, MB. Latent transforming growth factor-beta from human platelets. A high molecular weight complex containing precursor sequences. *J. Biol. Chem.* 1988;263(16):7646-7654.
100. Philip, A., O'Connor-McCourt, MD. Interaction of transforming growth factor-beta 1 with α 2-macroglobulin. Role in transforming growth factor-beta 1 clearance. *J. Biol. Chem.* 1991;266(33):22290-22296.
101. Coffey, RJ. Jr., Kost, LJ., Lyons, RM., Mozes, HL., LaRusso, NF. Hepatic processing of transforming growth factor beta in the rat. Uptake, metabolism, and biliary excretion. *J. Clin. Invest.* 1987;80(3):750-757.
102. Shull, MM., Ormsby, I., Kier, AB., Pawlowski, S., Diebold, RJ., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature.* 1992;359(6397):693-699.
103. Kulkarni, AB., Huh, CG., Becker, D., Geiser, A., Lyght, M., Flanders, KC., Roberts, AB., Sporn, MB., Ward, JM., Karlsson, S. Transforming growth factor beta 1 null mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993;90(2):770-774.
104. Border, WA., Noble, NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 1994;331(19):1296-1302.
105. Kopp, JB., Factor, VM., Mozes, M., Nagy, P., Sanderson, N., Böttinger, EP., Klotman, PE., Thorgeirsson, SS. Transgenic mice with increased plasma levels of TGF-beta1 develop progressive renal disease. *Lab. Invest.* 1996;74(6):991-1003.

106. Sanderson, N., Factor, V., Nagy, P., Kopp, J., Kondaiah, P., Wakefield, L., Roberts, AB., Sporn, MB., Thorgeirsson, SS. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995;92(7):2572-2576.
107. Blobbe, GC., Schiemann, WP., Lodish, HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N. Engl. J. Med.* 2000;342(18):1360-1368.
108. Ivanovic, V., Melman, A., Davis-Joseph, B., Valcic, M., Geliebter, J. Elevated plasma levels of TGF-beta 1 in patients with invasive Prostate cancer. *Nat. Med.* 1995; 1(4):282-284.
109. Shim, KS., Kim, KH., Han, WS., Park, EB. Elevated serum levels of transforming growth factor-beta1 in patients with colorectal carcinoma: its association with tumor progression and its significant decrease after curative surgical resection. *Cancer.* 1999;85(3):554-561.
110. Nakamura, M., Katano, M., Kuwahara, A., Fujimoto, K., Miyazaki, K., Morisaki, T., Mori, M. Transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) is preoperative prognostic indicator in advanced gastric carcinoma. *Br. J. Cancer.* 1998;78(10):1383-1388.
111. Tsai, JF., Jeng, JE., Chuang, LY., Yang, ML., Ho, MS., Chang, WY., Hsieh, MY., Lin, ZY., Tsai, JH. Elevated urinary transforming growth factor-beta 1 level as a tumour marker and predictor of poor survival in cirrhotic hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer.* 1997;76(2):244-250.
112. Li, C., Wilson, PB., Levine, E., Barber, J., Stewart, AL., Kumar, S. TGF-beta1 levels in pre-treatment plasma identify breast cancer patients at risk of developing post-radiotherapy fibrosis. *Int. J. Cancer.* 1999;84(2):155-159.
113. Bataller, R., Brenner, DA. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. *Semin. Liver Dis.* 2001; 21(3):437-451.
114. Bataller, R., North, KE., Brenner, DA. Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal. *Hepatology.* 2003;37(3):493-503.
115. Tsukamoto, H., Lu, SC. Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury *FASEB J.* 2001;15(8):1345-1359.
116. Yamauchi, M., Maezawa, Y., Mizuhara, Y., Ohata, M., Hirakawa, J., Nakajima, H., Toda, G. Polymorphisms in alcohol metabolizing enzyme genes and alcoholic cirrhosis in Japanese patients: a multivariate analysis. *Hepatology.* 1995;22(1):1137-1153.
117. Monzoni, A., Masutti, F., Saccoccio, G., Bellentani, S., Tiribelli, C., Giacca, M. Genetic determinants of ethanol-induced liver damage. *Mol. Med.* 2001;7(4):255-262. Erratum in: *Mol. Med.* 2001;7(12):861.
118. Day, CP., Bashir, R., James, OF., Bassendine, MF., Crabb, DW., Thomasson, HR., Li, TK., Edenberg, HJ. Investigation of the role of polymorphisms at the alcohol and aldehyde dehydrogenase loci in genetic predisposition to alcohol-related end-organ damage. *Hepatology.* 1991;14(5):798-801. Erratum in: *Hepatology.* 1992;15(4):750
119. Okamoto, K., Murawaki, Y., Yuasa And, I., Kawasaki, H. Effect of ALDH2 and CYP2E1 gene polymorphisms on drinking behavior and alcoholic liver disease in Japanese male workers. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2001;25(6 Suppl):19S-23S.

120. Grove, J., Daly, AK., Bassendine, MF., Day, CP. Association of a tumor necrosis factor promoter polymorphism with susceptibility to alcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1997;26(1):114-148.
121. Järveläinen, HA., Orpana, A., Perola, M., Savolainen, VT., Karhunen, PJ., Lindros, KO. Promoter polymorphism of the CD14 endotoxin receptor gene as a risk factor for alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2001;33(5):1158-1163.
122. Agarwal, K., Jones, DE., Bassendine, MF. Genetic susceptibility to primary biliary cirrhosis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol*. 1999 Jun;11(6):603-606.
123. Corpechot, C., Benlian, P., Barbu, V., Chazouilleres, O., Poupon, R. Apolipoprotein E polymorphism, a marker of disease severity in primary biliary cirrhosis? *J. Hepatol*. 2001;35(3):324-328.
124. Akuta, N., Chayama, K., Suzuki, F., Someya, T., Kobayashi, M., Tsubota, A., Suzuki, Y., Saitoh, S., Arase, Y., Ikeda, K., Kumada, H. Risk factors of hepatitis C virus-related liver cirrhosis in young adults: positive family history of liver disease and transporter associated with antigen processing 2(TAP2)*0201 Allele. *J. Med. Virol*. 2001;64(2):109-117.
125. Agarwal, K., Jones, DE., Daly, AK., James, OF., Vaidya, B., Pearce, S., Bassendine, MF. CTLA-4 gene polymorphism confers susceptibility of primary biliary cirrhosis. *J. Hepatol*. 2000;32(4):538-541.
126. Sasaki, K., Tsutsumi, A., Wakamiya, N., Ohtani, K., Suzuki, Y., Watanabe, Y., Nakayama, N., Koike, T. Mannose-binding lectin polymorphisms in patients with hepatitis C virus infection. *Scand. J. Gastroenterol*. 2000;35(9):960-965.
127. Yee, LJ., Tang, J., Gibson, AW., Kimberly, R., Van Leeuwen, DJ., Kaslow, RA. Interleukin 10 polymorphisms as predictors of sustained response in antiviral therapy for chronic hepatitis C infection. *Hepatology*. 2001;33(3):708-712.
128. Hijikata, M., Ohta, Y., Mishiro, S. Identification of a single nucleotide polymorphism in the MxA gene promoter (G/T at nt -88) correlated with the response of hepatitis C patients to interferon. *Intervirology*. 2000;43(2):125-128.
129. Wasmuth, HE., Werth, A., Müller, T., Berg, T., Dietrich, CG., Geier, A., Gartung, C., Lorenzen, J., Matern, S., Lammert, F. Haplotype-tagging RANTES gene variants influence response to antiviral therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2004;40(2):327-334
130. Grove, J, Daly, AK., Bassendine, MF., Gilvarry, E., Day, CP. IL-10 promotor region polymorphisms and susceptibility to advanced alcoholic liver disease. *Gut*. 2000; 46(4):540-545.
131. Takamatsu, M., Yamauchi, M., Maezawa, Y., Saito, S., Maeyama, S., Uchikoshi, T. Genetic polymorphisms of interleukin-1beta in association with the development of alcoholic liver disease in Japanese patients. *Am. J. Gastroenterol*. 2000;95:1315-1321.
132. Donaldson, P., Agarwal, K., Craggs, A., Craig, W., James, O., Jones, D. HLA and interleukin 1 gene polymorphisms in primary biliary cirrhosis. *J. Hepatol*. 1999; 30:232-236.

133. Powell, EE., Edwards-Smith, CJ., Hay, JL., Clouston, AD., Crawford, DH., Shorthouse, C., Purdie, DM., Jonsson, JR. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2000;31(4):828-833.
134. Donaldson, PT., Czaja, AJ. Gender effects and synergisms with histocompatibility leukocytes antigens in type 1 autoimmune hepatitis. *Am. J. Gastroenterol.* 2002; 97:2051-2057.
135. Kuzushita, N., Hayashi, N., Moribe, T., Katayama, K., Kanto, T., Nakatani, S., Kaneshige, T., Tatsumi, T., Ito, A., Mochizuki, K., Sasaki, Y., Kasahara, A., Hori, M. Influence of HLA haplotypes on the clinical courses of individuals infected with hepatitis C virus. *Hepatology*. 1998;27(1):240-244.
136. Jones, DE., Watt, FE., Grove, J., Newton, JL., Daly, AK., Gregory, WL., Day, CP., James, OF., Bassendine, MF. Tumor necrosis factor- α promoter polymorphisms in primary biliary cirrhosis. *J. Hepatol.* 1999;30(2):232-236.
137. Yee, LJ., Tang, J., Herrera, J., Kaslow, RA., van Leeuwen, DJ. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection. *Genes Immun.* 2000;1(6):386-390.
138. Järveläinen, HA., Orpana, A., Perola, M., Savolainen, VT., Karhunen, PJ., Lindros, KO. Promoter polymorphism of the CD14 endotoxin receptor gene as a risk factor for alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2001;33(5):1158-1163.
139. Stewart, S., Jones, D., Day, CP. Alcoholic liver disease: new insights into mechanisms and preventative strategies. *Trends Mol. Med.* 2001;7(9):408-413.
140. Cambien, F., Ricard, S., Troesch, A., Mallet, C., Generenaz, L., Arveiler, D., Luc, G., Ruidavets, JB., Poirier, O. Polymorphisms of the TGF- β 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. *Hypertension*. 1996;28(5):881-887.
141. Langdahl, BL., Knudsen, JY., Jensen, HK., Gregerson, N., Eriksen, EF. A sequence variation: 713-8delC in the transforming growth factor- β 1 gene has higher prevalence in osteoporotic women than in normal women and is associated with very low bone mass in osteoporotic women and increased bone turnover in both osteoporotic and normal women. *Bone*. 1997;20(3):289-294.
142. Tag, CG., Mengsteab, S., Hellerbrand, C., Lammert, F., Gressner, AM., Weiskirchen, R. Analysis of the transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) codon 25 gene polymorphism by LightCycler-analysis in patients with chronic hepatitis C infection. *Cytokine*. 2003;24(5):173-181.
143. Wang, H., Mengsteab, S., Tag, CG., Gao, CF., Hellerbrand, C., Lammert, F., Gressner, AM., Weiskirchen, R. Transforming growth factor- β 1 gene polymorphisms are associated with progression of liver fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection. *World J. Gastroenterol.* 2005;11(13):1929-1936.
144. Österreicher, CH., Stickel, F., Brenner, DA. Genomics of liver fibrosis and cirrhosis. *Semin. Liver Dis.* 2007;27(1):28-43.
145. Wasmuth, HE., Lammert, F., Matern, S. Genetic risk factors for hepatic fibrosis in chronic liver diseases. *Med. Klin. (Munich)*. 2003;98(12):754-762.
146. Oliver, J., Agundez, JA., Morales, S., Fernandez-Arquero, M., Fernandez-Gutierrez, B., de la Concha, EG., Diaz-Rubio, M., Martin, J., Ladero, JM. Polymorphisms in the

- transforming growth factor-beta gene (TGF-beta) and the risk of advanced alcoholic liver disease. *Liver Int.* 2005;25(5):935-939.
147. Gewaltig, J., Mangasser-Stephan, K., Gartung, C., Biesterfeld, S., Gressner, AM. Association of polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene with the rate of progression of HCV-induced liver fibrosis. *Clin. Chim. Acta.* 2002;316(1-2):83-94.
 148. Drumm, ML., Konstan, MW., Schluchter, MD., Handler, A., Pace, R., Zou, F., Zariwala, M., Fargo, D., Xu, A., Dunn, JM., Darrah, RJ., Dorfman, R., Sandford, AJ., Corey, M., Zielenski, J., Durie, P., Goddard, K., Yankaskas, JR., Wright, FA., Knowles, MR. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 2005;353(14):1463-1473.
 149. Österreicher, CH, Datz, C., Stickel, F., Hellerbrand, C., Penz, M., Hofer, H., Wrba, F., Penner, E., Schuppan, D., Ferenci, P. TGF-beta1 codon 25 gene polymorphism is associated with cirrhosis in patients with hereditary hemochromatosis. *Cytokine.* 2005;31(2):145-149.
 150. Suzuki, S., Tanaka, Y., Orito, E., Sugauchi, F., Hasegawa, I., Sakurai, M., Fujiwara, K., Ohno, T., Ueda, R., Mizokam, M. Transforming growth factor-beta-1 genetic polymorphism in Japanese patients with chronic hepatitis C virus infection. *J. Gastroenterol.Hepatol.* 2003;18(10):1151-1114.
 151. Bathgate, AJ., Pravica, V., Perrey, C., Hayes, PC., Hutchinson, IV. Polymorphisms in tumor necrosis factor alpha, interleukin-10 and transforming growth factor beta1 genes and end-stage liver disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2000;12(12):1339-1343.
 152. Abbas, Z., Moatter, T., Hussainy, A., Jafri, W. Effect of cytokine gene polymorphism on histological activity index, viral load and response to treatment in patients with chronic hepatitis C genotype 3. *World J. Gastroenterol.* 2005;11(42):6656-6661.
 153. Ayoubi, TA., Meulemans, SM., Roebroek, AJ., Van de Ven, WJ. Production of recombinant proteins in Chinese ovary cells overexpressing the subtilisin-like proprotein converting enzyme furin. *Mol. Biol. Rep.* 1996;23(2):87-95.
 154. Zou, Z., Sun, PD. Overexpression of human transforming growth factor-beta1 using a recombinant CHO cell expression system. *Protein Expr. Purif.* 2004;37(2):265-272.
 155. Olofsson, A., Hellman, U., Ten Dijke, P., Grimsby, S., Ichijo, H., Moren, A., Miyazono, K., Heldin, CH. Latent transforming growth factor-beta complex in Chinese hamster ovary cells contains the multifunctional cystein-rich fibroblast growth factor receptor, also termed E-selectin-ligand or MG-160. *Biochem. J.* 1997;324(2):427-434.
 156. Kanzaki, T., Olofsson, A., Moren, A., Wernstedt, C., Hellman, U., Miyazono, K., Claesson-Welsh, L., Heldin, CH. TGF-beta1 binding protein: a component of the large latent complex of TGF-beta1 with multiple repeat sequences. *Cell.* 1990;61(6):1051-1061.
 157. Drews, F., Knöbel, S., Moser, M., Muhlack, KG., Mohren, S., Stoll, C., Bosio, A., Gressner, AM., Weiskirchen, R. Disruption of the latent transforming growth factor-beta binding protein-1 gene causes alteration in facial structure and influences TGF-beta bioavailability. *BBA Mol. Cell Res.* 2008;1783:34-48.

158. Awad, MR., El-Gamel, A., Hasleton, P., Turner, DM., Sinnott, PJ., Hutchinson, IV. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene : association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation*. 1998;66(8):1014-1020.
159. Dunning, AM., Ellis, PD., McBride, S., Kirschenlohr, HL., Healey, CS., Kemp, PR., Luben, RN., Chang-Claude, J., Mannermaa, A., Kataja, V., Pharoah, PD, Easton, DF., Ponder, BA., Metcalfe, JC. A transforming growth factorbeta1 signal peptide variant increases secretio in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. *Cancer Res*. 2003;63(10):2610-2615.

8. Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Prof. h.c. (RCH) Axel M. Gressner danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Universitätsklinik Aachen anzufertigen. Er hat mir damit die Chance gegeben, einen Einblick in laborexperimentelles Arbeiten zu gewinnen und mir wissenschaftliches Denken anzueignen.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. Ralf Weiskirchen möchte ich mich herzlich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Auswahl des Themas sowie die freundliche Anleitung und Betreuung bedanken. Seine immer neuen Ideen, seine konstruktive Kritik und sein Interesse an meiner Arbeit haben mein Projekt in besonderer Weise optimiert und vorangetrieben. Neben seinen vielen anderen Aufgaben hat er immer Zeit für meine Fragen und für Diskussionen gefunden und nicht gezögert aktiv im Labor zu helfen.

Im Besonderen danke ich Frau Senait Wieske, Frau Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. Wanda V. Vreden und Herrn Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. Olaf Scherner, ohne deren Unterstützung ich oft verzweifelt und meine Arbeit so nicht möglich gewesen wäre. Für jedes meiner Probleme haben sie versucht eine Lösung zu finden, waren jederzeit bereit meine Ergebnisse zu besprechen und mir neue Anregungen zu geben. Für die Abende, Wochenenden und Feiertage haben sie mir immer Einlass ins Labor ermöglicht und sind selbstlos eingesprungen, wenn ich Hilfe brauchte. Zudem hat ihre freundliche Gesellschaft die meist langen und anstrengenden Arbeitstage angenehm gestaltet.

Frau Senait Wieske möchte ich außerdem für die geduldige und freundliche Einführung in die laborexperimentelle Arbeit und die aktive Unterstützung bei den LightCycler Analysen danken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Sabine Weiskirchen für die Unterstützung bei der Laborarbeit, die freundlichen Ratschläge und die Hilfe bei Bestellungen und vielem mehr bedanken.

Frau Ute Haas danke ich für die Anleitung zur Durchführung von Western Blots. Zusammen mit Frau Sabine Weiskirchen hat sie mir gezeigt, wie ich saubere und vorzeigbare Western Blots herstelle.

Frau Carmen G. Tag danke ich für die Beratung bei der Arbeit mit dem LightCycler.

Bei Herrn Eddy Van de Leur möchte mich für die Unterstützung in der Zellkultur bedanken. Auch Frau Sibille Sauer-Lehnen danke ich für die Hilfe in der Zellkultur und ihre immer fröhliche Gesellschaft.

Frau Lidia Tihaa und Herrn Dipl.-Biol. Michael Bomble danke ich für die Hilfe bei der Anfertigung der Immunfluoreszenzaufnahmen.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. Falko Drews möchte ich mich für die Zusammenarbeit bei den LTBP-1 Experimenten bedanken.

Zudem danke ich Frau Dr. rer. nat. Dr. med. Dipl.-Biol. Erawan Borkham-Kamphorst, Herrn Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. Jens Hermann, Herrn Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. Steffen Meurer, Frau PD Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. Lucia Wickert, Frau Carina Conrad und Frau Birgit Lahme für die kompetente Beratung und Unterstützung. Jeder hat mir auf seine Weise geholfen, meine Arbeit möglichst gut zu bewältigen.

Bei Herrn Dipl.-Stat. Sven Stanzel aus dem Institut für Medizinische Statistik der Universitätsklinik Aachen bedanke ich mich für die freundliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner LightCycler Ergebnisse.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. Gerhard Müller-Newen aus dem Institut für Biochemie der RWTH-Aachen danke ich für die Hilfe bei der Konfokalmikroskopie.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Hans P. Dienes, Frau Dr. med. Margarete Odenthal und Frau Elisabeth Haskamp aus dem Institut für Pathologie der Universitätsklinik Köln danke ich für die erfolgreiche Kooperation bei der Fallstudie. Ich schulde ihnen Dank für die Einführung in ihre Arbeitsmethoden, die freundliche Hilfe bei der DNA-Isolation und die Auswahl und Zusendung der Patientenproben.

9. Erklärung zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zugrunde liegenden Originaldaten in dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der RWTH-Aachen hinterlegt sind.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Simone Mohren
Geburtsdatum/-ort: 10.08.1982 in Mönchengladbach

Schulbildung:

1989-1993	Janusz-Korcak-Grundschule Otzenrath
1993-2002	Gymnasium Odenkirchen
2002	Allgemeine Hochschulreife

Studium:

10/2002 bis 12/2008	Studium der Humanmedizin an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
08/2004	Ärztliche Vorprüfung/Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03-04/2005	Famulatur in der Poliklinik der Inneren Medizin am Universitätsklinikum Aachen
08-09/2005	Famulatur in der Klinik für Inneren Medizin am Luisenhospital, Aachen
03-04/2006	Famulatur im Perinatalzentrum des AK Altona, Hamburg
07-08/2006	Famulatur im Epilepsie-Zentrum Bethel inkl. Kinderklinik Kidron, Bielefeld
08/2007 bis 12/2007	1. Tertial des Praktischen Jahres, Klinik für Innere Medizin, Bethlehem Krankenhaus, Solberg
12/2007 bis 03/2008	2. Tertial des Praktischen Jahres, Klinik für Viszeralchirurgie, Inselspital Bern
04/2008 bis 07/2008	3. Tertial des Praktischen Jahres, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Bethlehem Krankenhaus, Stolberg
11/2008	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktische Tätigkeiten während des Studiums:

11/2003 bis 02/2004	Arbeit als studentische Hilfskraft im Fachbereich Anatomie der RWTH-Aachen
04/2005 bis 07/2007	Tätigkeit als Hilfwissenschaftlerin zur Studentenbetreuung und -anleitung im Praktikum der Klinischen Chemie der RWTH-Aachen

Promotion:

10/2004 bis 07/2007	Experimentelle Arbeit an meiner Dissertation am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der RWTH-Aachen unter der Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. Ralf Weiskirchen und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Prof. h.c. (RCH) Axel M. Gressner
07/2008	Eröffnung des Promotionsverfahrens
12/2008	mündliche Prüfung