

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer)

**Relaxin und der Relaxin-like Faktor
sowie die Leuzin-reichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren 7 und 8
an der Augenoberfläche und im Tränenapparat**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Ulrike Hampel

geboren am 06.12.1983 in Bernburg

Betreuer: Prof. Dr. med. Friedrich P. Paulsen

Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer

Prof. Dr. med. Udo Klöckner

Prof. Dr. med. Joachim Neumann

PD Dr. med. Thomas Hammer

Datum der Verteidigung: 07.10.2010

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer)

**Relaxin und der Relaxin-like Faktor
sowie die Leuzin-reichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren 7 und 8
an der Augenoberfläche und im Tränenapparat**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Ulrike Hampel

geboren am 06.12.1983 in Bernburg

Betreuer: Prof. Dr. med. Friedrich P. Paulsen

Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer

Prof. Dr. med. Udo Klöckner

Prof. Dr. med. Joachim Neumann

PD Dr. med. Thomas Hammer

Datum der Verteidigung: 07.10.2010

Referat

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll das Vorkommen und die funktionelle Bedeutung der Peptidhormone Relaxin 2 (RLN2) und Relaxin-like Faktor (RLF) sowie der Leuzin-reichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren LGR7 und LGR8 an der Augenoberfläche und im Tränenwegsystem untersucht werden.

Um nähere Erkenntnisse über die mögliche Bedeutung und das Expressionsmuster von RLN2 und RLF sowie der Rezeptoren LGR7 und LGR8 an der Augenoberfläche und im Tränenwegsystem zu gewinnen, wurden Untersuchungen mittels RT-PCR und Immunhistochemie an Tränendrüse, Meibom-Drüse, Konjunktiva, Kornea, primären kornealen Fibroblasten, ableitenden Tränenwegen, sowie an der humanen Sebozytenzelllinie (SZ95), Kornea- (HCE) und Konjunktivaepithelzelllinie (IOBA-NHC) durchgeführt. Mittels eines BrdU-Assays wurde die Proliferation unter RLN2- und RLF-Stimulation geprüft. Außerdem wurde der Einfluss von RLN2 und RLF auf die Migrationsfähigkeit der Epithelzelllinien mit Hilfe eines Scratch-Assays untersucht. Zellkulturexperimente wurden ebenfalls zur Analyse der Regulation von Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und Tissue Inhibitors of MMP (TIMPs) nach RLN2- und RLF-Stimulation mittels der Real-Time PCR durchgeführt.

RLN2- und RLF-mRNA konnte nur vereinzelt an Geweben der Augenoberfläche nachgewiesen werden. Der mRNA-Nachweis von LGR7 und LGR8 gelang in fast allen Geweben. In der Meibom-Drüse und vereinzelt in ableitenden Tränenwegen sowie in den 3 Zelllinien erfolgte die Detektion des LGR7-Proteins. Die Zelllinien exprimieren die Hormone und Rezeptoren auf mRNA-Ebene. RLN2 und RLF steigern die Proliferation und Migration von IOBA-NHC- und HCE-Zellen. Nach Stimulation der SZ95-, HCE- und IOBA-NHC-Zellen mit RLN2 und RLF zeigt sich eine Regulation der MMP- und TIMP-Expression.

Die Ergebnisse der Expressionsuntersuchungen implizieren, dass die Hormone nicht unter physiologischen Bedingungen an der Augenoberfläche gebildet werden, sondern via Blutstrom zur Augenoberfläche transportiert werden. Der endokrine Effekt kann über die Rezeptoren LGR7 und LGR8 erfolgen. Des Weiteren deuten die proliferations- und migrationssteigernden Wirkung sowie der Einfluss auf die MMP- und TIMP-Expression auf eine Bedeutung der Hormone im Rahmen der Wundheilung hin.

Hampel, Ulrike: Relaxin und der Relaxin-like Faktor sowie die Leuzin-reichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren 7 und 8 an der Augenoberfläche und im Tränenapparat. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 69 Seiten, 2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Wundheilung der Augenoberfläche	1
1.2	RLN2 und RLF sowie die Rezeptoren LGR7 und LGR8	2
1.3	Die Funktionen von RLN2 und RLF	3
2	Zielstellung	5
3	Material und Methoden	6
3.1	Material	6
3.1.1	Chemikalien	6
3.1.2	Gebrauchslösungen	9
3.1.3	Gebrauchswaren und Geräte	9
3.2	Methoden	11
3.2.1	Herkunft des Gewebematerials	11
3.2.2	Zellkultur	12
3.2.3	RNA-Isolierung	14
3.2.4	DNase-Verdau	15
3.2.5	Bestimmung der RNA-Konzentration	15
3.2.6	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	16
3.2.7	Polymerase-Kettenreaktion an cDNA (RT-PCR)	16
3.2.8	Real-Time RT-PCR	17
3.2.9	Agarose-Gelelektrophorese	19
3.2.10	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	20
3.2.11	Sequenzierung von DNA	20
3.2.12	Proliferationsassay	20
3.2.13	Migrationsassay	21
3.2.14	Immunhistochemie	22
3.2.15	Statistik	25
4	Ergebnisse	26
4.1	Nachweis der Expression von RLN2, RLF, LGR7 und LGR8	26
4.1.1	Nachweis von Relaxin 2 (RLN2)	27
4.1.2	Nachweis von Relaxin-like Faktor (RLF)	28
4.1.3	Nachweis des Rezeptors LGR7	29
4.1.4	Nachweis des Rezeptors LGR8	31
4.1.5	Alters- und Geschlechtsspezifische Darstellung der mRNA Expression	33

4.2.	Proliferationsverhalten der Zelllinien sowie von primären kornealen Fibroblasten	38
4.2.1	Proliferationsverhalten der Sebozytenzelllinie SZ95	38
4.2.2	Proliferationsverhalten der Konjunktivaepithelzelllinie IOBA-NHC	39
4.2.3	Proliferationsverhalten der Korneaepithelzelllinie HCE	39
4.2.4	Proliferationsverhalten der primären kornealen Fibroblasten	40
4.3	Migrationsverhalten der Epithelzelllinien	42
4.3.1	Migrationsverhalten der Konjunktivaepithelzelllinie IOBA-NHC	42
4.3.2	Migrationsverhalten der Korneaepithelzelllinie HCE	44
4.4	Regulation der MMP- und TIMP-mRNA-Expression	46
4.4.1	Regulation der MMP- und TIMP-Genexpression durch RLN2 und RLF in der Sebozytenzelllinie SZ95	46
4.4.2	Regulation der MMP- und TIMP-Genexpression durch RLN2 und RLF in der Konjunktivaepithelzelllinie IOBA-NHC	49
4.4.3	Regulation der MMP- und TIMP-Genexpression durch RLN2 und RLF in der Korneaepithelzelllinie HCE	51
5	Diskussion	54
5.1	Nachweis von RLN2 und RLF sowie der Rezeptoren LGR7 und LGR8	54
5.2	RLN2 und RLF steigern die Proliferationsfähigkeit der Epithelzelllinien IOBA-NHC und HCE	56
5.3	RLN2 und RLF steigern die Migrationsrate der Epithelzelllinien IOBA-NHC und HCE	57
5.4	Regulation der MMP- und TIMP-mRNA-Expression	57
5.5	Schlussfolgerung	59
5.6	Ausblick	59
6	Zusammenfassung	60
7	Literaturverzeichnis	61
8	Thesen	67

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
as	<i>anti-sense, reverse</i>
AT	ableitende Tränenwege
Aufl.	Auflage
bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2'-deoxy-Uridin
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celcius
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct-Wert	<i>Cycle Threshold</i> , Schwellenwertzyklus
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epithelial growth factor</i> , epithelialer Wachstumsfaktor
F	primäre korneale Fibroblasten
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HCE	humane Korneaepithelzelllinie
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IOBA-NHC	humane Konjunktivaepithelzelllinie
kDa	Kilodalton
Kj	Konjunktiva
Ko	Kornea
LGR7	Leuzin-reicher G-Protein gekoppelter Rezeptor 7
LGR8	Leuzin-reicher G-Protein gekoppelter Rezeptor 8
MD	Meibom-Drüse
mg	Milligramm
MgCl	Magnesiumchlorid

min	Minute
ml	Milliliter
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTP	Mikrotiterplatte
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Versuchsansätze
N	Anzahl der unabhängigen Versuche
ng	Nanogramm
NHC	humane Konjunktivaepithelzelllinie
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
p	<i>probability</i> , Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
rhRLF	rekombinanter humaner Relaxin-like Faktor
rhRLN2	rekombinantes humanes Relaxin 2
RLF	Relaxin-like Faktor, Insulin-like Faktor 3
RLN2	Relaxin 2
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse-Transkription Polymerase-Kettenreaktion
s	<i>sense, forward</i>
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
sec	Sekunde
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler
SZ95	humane Sebozytenzelllinie
TD	Tränendrüse
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase
Tm	Temperatur
TAE	Trisaminomethan-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure
TBS	Trisgepufferte Saline
Vgl.	Vergleiche mit

1. Einleitung

1.1 Wundheilung der Augenoberfläche

Verletzungen der Augenoberfläche sind Alltag in der augenärztlichen Praxis. Durch mechanische Verletzungen (z.B. Fingernägel, Zweige), unsachgemäße Handhabung von Kontaktlinsen, glühende Partikel beim Schleifen oder durch Scheuern eines subtarsal gelegenen Fremdkörpers auf dem Epithel entstehen Epitheldefekte (Erosionen) (Sachsenwegen, 2002). Gefürchtet sind auch Verätzungen, da sie zu den gefährlichsten Augenverletzungen zählen und zur Erblindung führen können (Lang, 2008). Nach Verletzung der Augenoberfläche ist eine effektive Wundheilung von zentraler Bedeutung. Der komplexe Vorgang der Wundheilung setzt sich aus verschiedenen zellulären und extrazellulären Vorgängen zusammen. Dabei ist sie das Resultat einer Vielzahl von regulatorischen biochemischen Prozessen. Zur vereinfachten Darstellung lassen sich die Hauptsequenzen, die zur Gewebereparatur der Hornhaut führen, wie folgt aufteilen. Die Primärantwort führt zur Restitution von physiologischen Barrieren der Augenoberfläche. Die Sekundärantwort dient der Wiederherstellung der Festigkeit und Transparenz der Hornhaut. Die sekundäre Rekonstitution der optischen Funktion des vorderen Augenabschnittes erfolgt durch einen prolongierten Prozess der Remodulierung des Gewebes. Die Qualität und Prognose der Wundheilung wird von der Art und der Ursache der Hornhautläsion wesentlich bestimmt (Rieck *et al.*, 2003).

Die verschiedenen Strukturen der Augenoberfläche, die an der Wundheilung beteiligt sind, lassen sich am Besten in Verbindung mit den 3 Komponenten des Tränenfilms verstehen.

Die äußere Lipidkomponente des Tränenfilms wird von den Meibom-Drüsen gebildet. Dabei handelt es sich um 20 bis 25 spezialisierte Talgdrüsen (pro Lid), die im Tarsus des Augenlids sitzen und mit ihren Ausführungsgängen nahe der Hinterkante des Lidrandes münden. Durch die Lipidkomponente wird eine rasche Verdunstung des Tränenfilms verhindert.

Der Hauptteil des Tränenfilms (wässrige Komponente) ist eine isotone Elektrolytlösung und wird von der Tränendrüse gebildet. Die Tränendrüse ist eine seröse tubuloalveoläre Drüse und liegt unter dem lateralen oberen Rand der Orbita. Darüber hinaus geben die Azinuszellen der Tränendrüse verschiedene antimikrobielle Substanzen z.B. Defensine, Lactoferrin oder Lysozym sowie Immunglobulin A in den

Tränenfilm ab und tragen so zum Schutz vor Keimbeseidlung und Entzündung bei. Zur Stabilisierung des Tränenfilms enthält die Tränenflüssigkeit Muzine.

Zur mukösen Komponente tragen sowohl Kornea (Hornhaut, *Cornea*) als auch Konjunktiva (Bindehaut, *Conjunctiva*) bei. Die Konjunktiva ist eine transparente, gefäßführende Schleimhautschicht. Sie besitzt ein mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel und wird in 3 Abschnitte aufgeteilt. An der Lidinnenseite befindet sich die *Conjunctiva tarsi*, die fest mit dem Tarsus verwachsen ist. Im Bereich des *Fornix conjunctivae* bildet die Bindehaut eine Umschlagfalte und wird als *Conjunctiva fornicis* bezeichnet. Die *Conjunctiva bulbi* bedeckt die Sklera (Lederhaut, *Sclera*), die im vorderen Augenbereich in das Korneaepithel übergeht. Die Kornea besteht aus Epithelschicht, Stroma und Endothel und ist frei von Blutgefäßen (avaskulär). Sie stellt die durchsichtige Scheibe des Augapfels dar.

Durch den Lidschlag wird der Tränenfilm auf der Augenoberfläche verteilt, um eine Austrocknung zu verhindern und damit die Hornhaut transparent zu halten. Der Tränenabfluss erfolgt über die ableitenden Tränenwege in den unteren Nasengang. „Verbrauchte“ Tränenflüssigkeit sammelt sich im nasalen Lidwinkel als Tränensee (*Lacus lacrimalis*) und wird über die Tränenpünktchen am medialen oberen und unteren Lidrand in die mit Plattenepithel ausgekleideten Tränenkanälchen (*Canaliculi lacrimales*) zum Tränensack (*Saccus lacrimalis*) und von dort in den Tränennasengang (*Ductus nasolacrimalis*) geleitet. Für den Tränentransport spielt die *Pars lacrimalis* des *Musculus orbicularis oculi* neben anderen Strukturen eine wichtige Rolle. Tränensack und Tränennasengang sind von einem mehrreihigen Zylinderepithel ausgekleidet (Lüllmann-Rauch, 2006).

1.2 RLN2 und RLF sowie die Rezeptoren LGR7 und LGR8

Das mit Insulin verwandte Peptidhormon Relaxin (RLN) ist seit Jahrzehnten als Schwangerschaftshormon bekannt. Relaxin spielt jedoch nicht nur bei der Fortpflanzung und in der Schwangerschaft eine wichtige Rolle, sondern besitzt vielfältige weitere Fähigkeiten. Beim Menschen sind 3 verschiedene Relaxinpeptide bekannt: RLN1, RLN2 und RLN3. Die verschiedenen Relaxine werden zusammen mit Insulin, den Insulin-ähnlichen Peptiden (*Insulin-like peptides*, INSL) und den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (*Insulin-like growth factors*) zur Insulin-Superfamilie zusammengefasst. Bis jetzt sind 4 Insulin-like Peptide bekannt, darunter der Relaxin-like Faktor (RLF), der auch als Insulin-like Peptid 3 (INSL3) oder Leydig Insulin-like Peptid (Ley-IL) bezeichnet wird. Reifes Relaxin und RLF setzen sich wie Insulin aus

einer A- und einer B-Kette zusammen, die kovalent über 2 Disulfidbrücken verbunden sind. Innerhalb der A-Kette existiert eine intramolekulare Disulfidbrücke. Die Vorstufen Pro-Relaxin und Pro-RLF besitzen zusätzlich ein C-Peptid, das abgespalten wird (Sherwood, 2004; Dschietzig *et al.*, 2006).

RLN2 wird im weiblichen Reproduktionstrakt, darunter Corpus luteum, Endometrium, Dezidua, Plazenta, Trophoblast und in der Brustdrüse sowie in der Prostata exprimiert (Bigazzi *et al.*, 1980; Hudson *et al.*, 1984; Sakbun *et al.*, 1990; Tashima *et al.*, 1994; Essig *et al.*, 1982; Ivell *et al.*, 1989). Die Arbeitsgruppe um Dschietzig konnte die Synthese von RLN1 und RLN2 mRNA im Myokard sowie in arteriellen und venösen Herzgefäßen nachweisen (Dschietzig *et al.*, 2001).

RLF wird in Leydig-Zellen, in Theka-Zellen, im Endometrium, in der Plazenta, Brustdrüse, Prostata und in der Schilddrüse exprimiert (Bamberger *et al.*, 1999; Hombach-Klonisch *et al.*, 2000, 2001, 2003; Ivell *et al.*, 1997; Klonisch *et al.*, 2005).

Zur Signalübermittlung binden RLN2 und RLF an Leuzin-reiche repetitive Sequenzen enthaltende G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (LGR). Nach den Empfehlungen der International Union of Pharmacology LVII von 2006 wird der Rezeptor LGR7 auch als RXFP1 und LGR8 als RXFP2 bezeichnet (Bathgate *et al.*, 2006). Hsu entdeckte 2002, dass die beiden „orphan receptors“ (rezeptorartige Strukturen, für die noch kein Ligand bekannt ist) LGR7 und LGR8 durch humanes Relaxin 2 aktiviert werden (Hsu *et al.*, 2002). Dabei bindet RLN2 an LGR7 und mit geringerer Affinität an LGR8 (Bathgate *et al.*, 2006). RLF hingegen aktiviert LGR8, aber nicht LGR7 (Bathgate *et al.*, 2006).

Bislang liegen keine Untersuchungen zur Expression von RLN2 und RLF sowie den Rezeptoren LGR7 und LGR8 an der Augenoberfläche und den ableitenden Tränenwegen vor.

1.3 Die Funktionen von RLN2 und RLF

Relaxin hat diverse biologische Effekte. So wirkt es unter anderem migrationsfördernd und proliferativ, anti-ischämisch und anti-asthmatisch, hat Einfluss auf den Kollagenumsatz, den Vasotonus, die Plasmaosmolalität, die Angiogenese und die Nierenfunktion (Dschietzig *et al.*, 2006; Sherwood, 2004). Relaxin hat modulierenden Einfluss auf das Bindegewebe durch Induktion von Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und Inhibition von Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinasen (TIMPs). MMPs sind eine Gruppe von Enzymen, die die Extrazellulärmatrix (EZM) degradieren können und

somit den Um- und Abbau von Bindegewebe beeinflussen (Lekgabe *et al.*, 2005; Jeybalan *et al.*, 2003). Natürliche Gegenspieler der MMPs sind die TIMPs. In humanen Fibroblasten des unteren Uterussegments stimuliert RLN2 die mRNA- und Proteinexpression von MMP1, MMP2 und MMP3 und hemmt hingegen die Proteinbildung von TIMP1 (Palejwala *et al.*, 2001). RLN2 induziert in renalen Fibroblasten den extrazellulären Matrixabbau durch Induktion von MMP2 und MMP9 (Heeg *et al.*, 2005).

Unter physiologischen Bedingungen ist die Augenoberfläche ständig einem Um- und Abbauprozess durch MMPs und TIMPs unterlegen. Ebenso spielen die MMPs und TIMPs eine wichtige Rolle bei der Wundheilung durch den Abbau von geschädigtem Gewebe und anschließender Remodulation der Augenoberfläche. Zusätzlich ist für einen raschen Defektschluss die Proliferationsfähigkeit und Migrationsfähigkeit der Epithelien von besonderer Bedeutung.

Eine Grundvoraussetzung für die Gesunderhaltung und intakte Funktion der Tränendrüse und der Gewebe der Augenoberfläche scheint unter anderem eine komplexe Steuerung durch verschiedene Hormone zu sein (Sullivan, 2004). Gerade in der Schwangerschaft ist das Auge besonders vor Entzündungen geschützt. Interessanterweise ist in der Schwangerschaft auch der Serumspiegel von RLN2 erhöht. Falls in der Schwangerschaft RLN2- und RLF-Konzentrationen an der Augenoberfläche erhöht sind, könnte dies eine Erklärung der gestärkten Immunität sein. RLN2 und RLF könnten durch ihre proliferations- und migrationsfördernden Eigenschaften die Wundheilung unterstützen. Auch die Tatsache, dass RLN2 und RLF MMPs und TIMPs beeinflussen, ist spannend in Bezug auf die Mechanismen in der Wundheilung.

Diese Befunde werfen die folgende schematisch skizzierte Arbeitshypothese auf, die es zu überprüfen gilt (Abb. 1).



Abb.1: Schema zur Arbeitshypothese (↑ - Steigerung)

2 Zielstellung

Ziel der Untersuchungen ist es, das Vorkommen und die Funktion der Peptidhormone Relaxin 2 und Relaxin-like Faktor sowie der Rezeptoren LGR7 und LGR8 an der Augenoberfläche und in den ableitenden Tränenwegen zu analysieren. Aufgrund der Fähigkeit von Relaxin 2, proliferations- und migrationssteigernd zu wirken und Matrixmetalloproteinasen zu stimulieren, könnten die Untersuchungen möglicherweise einige der noch vielen offenen Fragen zu Wundheilungsprozessen an der Augenoberfläche beantworten und neue Therapieoptionen eröffnen. Dazu werden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Qualitative Analyse der Expression der Polypeptidhormone Relaxin 2 (RLN2) und Relaxin-like Faktor (RLF) und deren Rezeptoren LGR7 und LGR8 in humanen Tränendrüsen, Meibom-Drüsen, Konjunktivae, Korneae, primären kornealen Fibroblasten und ableitenden Tränenwegen, sowie in der humanen Sebozytenzelllinie SZ95, der humanen Konjunktivaepithelzelllinie IOBA-NHC und der humanen Korneaepithelzelllinie HCE
- Untersuchung des Proliferationsverhaltens (BrdU-Assay) von primären kornealen Fibroblasten sowie der humanen Sebozyten- (SZ95), Konjunktivaepithel- (IOBA-NHC) und Korneaepithelzelllinie (HCE) nach 24 h Stimulation mit rekombinantem RLN2 und rekombinantem RLF
- Untersuchung des Migrationsverhaltens (Scratch-Assay) der humanen Konjunktivaepithel- (IOBA-NHC) und Korneaepithelzelllinie (HCE) nach 24 h Stimulation mit rekombinantem RLN2 und rekombinantem RLF
- Analyse des Einflusses von rekombinantem RLN2 und rekombinantem RLF auf die Expressionsregulation der Matrix Metalloproteinasen (MMP) sowie der Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinasen (TIMP) in der humanen Sebozyten- (SZ95), Konjunktivaepithel- (IOBA-NHC) und Korneaepithelzelllinie (HCE) nach 6 h und 24 h Stimulation durch Real-Time PCR

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

AEC Substrat Chromogen	Dako North America Inc, Carpinteria, CA, USA
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Aquatex Eindeckmittel	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Avidin/Biotin Blocking Kit	ZYMED Laboratories, Inc., Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Cytochalasin B	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit	Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, USA
dNTPs (10 mM)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Eosin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Epithelial Growth Factor (EGF), recombinant human	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ethanol (99,8%)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland

Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Glyzin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hydrokortison	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Immunglobuline (polyklonales Kaninchen non-immun Serum)	DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Insulin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Kanadabalsam	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
MassRuler DNA Ladder, Low Range	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Medien:	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
DMEM/HAM's F-12 1:1	
Sebomed Basalmedium	
β-Mercaptoethanol	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
MinElute gel Extration Kit	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Mitomycin C	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumazetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumzitat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Normalserum: Ziegenserum	DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
O'GeneRuler DNA Ladder, Ultra Low Range	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Oligo (dT) ₁₈ Primer (100 μM)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Primer	MWG Biotech Human Resources, Ebersberg, Deutschland
2-Propanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Relaxin 2, rekombinant human	Phoenix Pharmaceuticals, Burlingham, CA, USA
Relaxin-like Faktor, rekombinant human	Phoenix Pharmaceuticals, Burlingham, CA, USA
RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/μl)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor (40 U/μl)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
RNeasy® Mini Kit	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RQ1 RNase-Free DNase (1 U/μl)	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Sekundär Antikörper Ziege gegen Kaninchen Ziege gegen Maus	DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Sucrose	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
StreptABComplex/HRP	DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Streptomycin (5000 μg/ml) / Penicillin (5000 U/ml) Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Taq DNA Polymerase (5 U/μl) (inkl. 50 mM MgCl ₂ , Reaktionspuffer)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
TRIzol Reagent	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
0,25% Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
30% Wasserstoffperoxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylencyanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Zitronensäure Monohydrat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

3.1.2 Gebrauchslösungen

Zitrat-Puffer	1,8 mM Zitronensäure Monohydrat, 8,2 mM Natriumzitrat-Dihydrat, pH 6,0
6x Ladepuffer	0,25% Xylencyanol, 40% Sucrose
1x TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat; 1mM EDTA; pH 8
TBS Stammlösung	50,4 mM Tris, 37 mM HCl, pH 7,6
TBS Gebrauchslösung	5 mM Tris, 0,77% Kochsalzlösung, pH 7,3

3.1.3 Gebrauchswaren und Geräte

Absorptionsreader (MTP-Photometer) Spectra II Software	SLT LAB Instruments Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland easyWIN fitting Version E 1.0a
Absaugeinrichtung: Vakuum-Sicherheits-Absaugsystem	HLC BioTech, Bovenden, Deutschland
Analysenwaage BL3100	Satorius AG, Göttingen, Germany
Brutschrank Forma Series II Water Jacketed CO ₂ - Incubator Hepa Class 100	Thermo Electron Corporation, Mariette, USA
Deckgläschen	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Elektrophoresekammer (inkl. Gelschlitten) [horizontal]	Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland
Falkon-Tubes 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Geldokumentationseinrichtung CN-2000 W/UV Software	Vilber Lourmat, Marne-la-Vallee, Frankreich BioCaptMW Version 99.05s for Windows
Heizblock QBD2	Grant Instruments (Cambridge) Ltd, Shepreth, England
8-Kanal-Pipette Biohit mLine	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Kühlzentrifuge Fresco 17 R134A	Thermo Electron Corporation, Osterode, Deutschland

UV-Küvetten mikro	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Mikroskope	
IX70-S8F	Olympus Optical Co., LTD, Japan
Axioskop MC 80	Zeiss, Deutschland
Mikrotom HM 400R	MICROM Laborgeräte GmbH, Walldorf, Deutschland
Multi-Reaktionsgefäße	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
0,65ml; 1,5ml; 2,0ml	
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
PCR Gefäße, 8er Strips	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Pipetten, serologisch 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	
5-200 µl, 100-1000 µl	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
0,5-10 µl	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Pipetus® Standard	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt, Deutschland
Präzisionswaage TE313S	Satorius AG, Göttingen, Germany
Real-Time PCR	MJ Research, INC., Waltham, USA
Cycler: DNA Engine Opticon 2	
CFD – 3220	
Software	Opticon Monitor version 2.02.24
Real-Time PCR Gefäße und Deckel	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Rotor-Stator-Homogenisator	IKA Works, INC., Wilmington, USA
Ultra-Turrax T8	
Schüttlergeräte	
Typ 3006	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
MS2	IKA Works, INC., Wilmington, USA

SpeedVac Genevac SF50	Biometra HLC BioTech, Bovenden, Deutschland
Sterilbank Safe 2010 Lamin Air	Thermo electron corporation Holton, Allerød, Dänemark
Stromversorgungsgerät P25 Powerpack	Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Germany
Super PAP PEN	Immunotech, Marseille, Frankreich
Thermocycler DNA Engine PTC-200	MJ Research, INC., Watertown, USA
Thermoblock TRIO	Biometra, biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland
UV/Visible Spectrophotometer Ultrospec 3300 <i>pro</i>	Amersham Pharmacia Biotech AB SE 751, Uppsala, Schweden
Zellkulturflaschen 50 ml, 25 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschale 60x15 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkultur-Testplatten, 96-Wells	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Herkunft des Gewebematerials

Tränenndrüse, Konjunktiva, Kornea und ableitende Tränenwege stammen von Körperspendern der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und aus der Augenklinik der Christian-Albrechts-Universität Kiel. Eine Genehmigung der Ethikkommission liegt vor. Alle Organe wurden 4-12 Stunden post mortem entnommen. Die Körperspender weisen keine Verletzungen auf und sind frei von Augeninfektionen, nasalen Infektionen, sowie Krankheiten, die die Funktion der Augenoberfläche und des Tränenapparates beeinträchtigt hätten. Nach der Entnahme werden die Gewebeproben für die Paraffineinbettung vorbereitet und in 4%-Paraformaldehyd fixiert oder für molekularbiologische Untersuchungen verwendet und unmittelbar nach Entnahme bei -80°C eingefroren.

3.2.2 Zellkultur

Primäre korneale Fibroblasten

Für die Kultivierung von primären kornealen Fibroblasten werden Skleraringe durch Dr. med. Sadettin Sel (Augenklinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) bereitgestellt. Zunächst wird die Sklera abgetrennt, so dass ein ringförmiges Korneastück übrig bleibt. Anschließend wird dieser Ring in kleine Stücke geschnitten, die dann in Zellkulturflaschen überführt werden. Nach 5 Minuten Wartezeit zum Anhaften der Stücke am Flaschenboden, wird 3 ml Kulturmedium (Tabelle 1) zugesetzt.

Tab. 1 Kulturmedium für primäre korneale Fibroblasten

DMEM/HAM's F-12 1:1
10% FKS
10 ml/l Streptomycin/Penicillin

Zelllinien

HCE (Korneaepithelzelllinie)

Die humane Korneaepithelzelllinie (humane corneal epithelial cell line, HCE) ist eine mit dem rekombinaten SV-40 Adenovirus generierte und immortalisierte Zelllinie. Sie weist charakteristische Eigenschaften von humanen kornealen Epithelzellen auf und wurde freundlicherweise von Kaoru Araki-Sasaki (Tane Memorial Eye Hospital, Osaka, Japan) zur Verfügung gestellt (Araki-Sasaki *et al.*, 1995). Zur Kultivierung von HCE-Zellen wird DMEM/HAM's F-12 1:1 fetales Kälberserum zugesetzt (Tabelle 2).

Tab. 2 Kulturmedium für HCE (Korneaepithelzelllinie)

DMEM/HAM's F-12 1:1
10% FKS

IOBA-NHC (Konjunktivaepithelzelllinie)

Für Untersuchungen an humanem Konjunktivaepithel wird die spontan immortalisierte Epithelzelllinie IOBA-NHC (Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada, Universidad de Valladolid, Spain; normal human conjunctiva) verwendet. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Frau Dr. Yolanda Diebold, IOBA, Universität von

Valladolid, Spanien zur Verfügung gestellt (Diebold *et al.*, 2003). Zur optimalen Kultivierung der Konjunktivaepithelzellen wird DMEM/HAM's F-12 1:1 mit unterschiedlichen Zusätzen (Tabelle 3) angereichert.

Tab. 3 Kulturmedium für IOBA-NHC (Konjunktivaepithelzelllinie)

DMEM/HAM's F-12 1:1
10% FKS
1 µg/ml Insulin
5 µg/ml Hydrokortison
10 ml/l Streptomycin/Penicillin

SZ95 (Sebozytenzelllinie)

Als *in vitro* Modell für Talgdrüsenzellen der Meibom-Drüsen dient die humane immortalisierte Talgdrüsenzelllinie (Sebozytenzelllinie SZ95). Dabei handelt es sich um eine mit dem rekombinaten SV-40 Adenovirus immortalisierte Zelllinie, die freundlicherweise von Prof. Dr. med. Christos Zouboulis (Klinik für Dermatologie, Städtisches Klinikum Dessau) zur Verfügung gestellt wurde (Zouboulis *et al.*, 1999). Entsprechend Herstellerangaben (Biochrom) müssen zur Kultivierung von SZ95 Zellen dem Sebomed Basalmedium weitere Zusätze (Tabelle 4) zugegeben werden.

Tab. 4 Kulturmedium für SZ95 (Sebozytenzelllinie)

Sebomed Basalmedium
10% FKS
10 ml/l Streptomycin/Penicillin
0,1 mg/ml EGF

Kultivierung

Die Kultivierung der Zelllinien und primären Zellen erfolgt nach standardisierten Methoden und Bedingungen. Hierfür werden die adhärennten Zellen als Monolayer in Brutschränken bei 37°C und 5% CO₂ bis zur Konfluenz (100%) kultiviert. Je nach Zelldichte erfolgt der Kulturmediumwechsel zwischen 2 und 4 Tagen.

Passagieren

Nach der Abnahme des Kulturmediums und dem Waschen mit PBS werden die Zellen mit 1 ml einer 0,25%igen Trypsin-EDTA-Lösung für 5 min bei 37°C inkubiert und abgelöst. Das Inaktivieren des Trypsin-EDTA-Gemisches erfolgt durch Zusatz von 1 ml

Kulturmedium. Anschließend wird die Zellsuspension für 5 min bei 1000 rpm/min pelletiert und der Überstand verworfen. In Abhängigkeit von der Größe des Pellets wird es in 1,5 - 3 ml Medium resuspendiert und in verschiedene Kulturflaschen mit Kulturmedium aliquotiert.

Stimulation

Zur RNA-Isolierung (3.3.3) erfolgt die Zellstimulation in Petrischalen. Zur Stimulation werden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, für 2 Stunden in serumfreiem Medium vorinkubiert und anschließend mit den Hormonen stimuliert. Die Zellen werden 6 h oder 24 h mit RLN2 (100 ng/ml, 500 ng/ml) oder RLF (100 ng/ml, 500 ng/ml) inkubiert (vgl. Tabelle 5). Dafür werden die Hormone in Serum-freiem Medium gelöst. Die Kontrolle wird nur mit Serum-freiem Medium kultiviert.

Tab. 5 Stimulation von SZ95-, HCE- und IOBA-NHC-Zellen zur RNA-Isolierung

6 h	Kontrolle (Serum-freies Kulturmedium)	
6 h	RLN2	100 ng/ml
6 h	RLN2	500 ng/ml
6 h	RLF	100 ng/ml
6 h	RLF	500 ng/ml
24 h	Kontrolle (Serum-freies Kulturmedium)	
24 h	RLN2	100 ng/ml
24 h	RLN2	500 ng/ml
24 h	RLF	100 ng/ml
24 h	RLF	500 ng/ml

3.3.3 RNA-Isolierung

RNA-Isolierung aus Gewebe

Zur RNA-Isolierung aus Gewebe wird der RNeasy® Mini Kit der QIAGEN GmbH verwendet. Die Isolierung erfolgt mit einer speziellen Säule.

Nach Zerkleinern und Zermahlen der tiefgefrorenen Gewebeproben (-80°C) in flüssigem Stickstoff in einem Achatmörser werden die Gewebeproben mit 600 µl Lysepuffer, der 6 µl β-Mercaptoethanol enthält, versetzt und mit einem Rotor-Stator-Homogenisator weiter zerkleinert. Die weitere RNA-Isolierung inklusive DNase-Verdau

auf der Säule (RNase-Free DNase Set, QIAGEN GmbH) wird nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

RNA-Isolierung aus Zellen

Nach erfolgter Stimulation wird die RNA aus den Zellen mittels TRIzol nach dem Protokoll des Herstellers Invitrogen isoliert. Die isolierte RNA wird zum Schluss in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

3.2.4 DNase-Verdau

Um Kontaminationen mit genomischer DNA zu vermeiden, wird die RNA-Probe mit RQ1 RNase-Free DNase der Firma Promega verdaut (Tabelle 6):

Tab. 6 Reaktionsansatz DNase-Verdau

2 µl	RQ1 RNase-Free DNase
6 µl	RQ1 RNase-Free DNase 10x Reaktionspuffer
2 µl	RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor

Der Verdau erfolgt bei 37°C für 30 min. Erst die Zugabe von 6 µl RQ1 DNase Stop Solution und eine 10-minütige Inkubation bei 65°C inaktivieren das Enzym. Aus diesem Inkubationsansatz wird die RNA mit 6 µl 3 M Natrium-Azetat-Lösung und 200 µl 2-Propanol für 30 min bei -20°C gefällt und mit 10.000 rpm für 30 min pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet zweimal mit 1 ml 75%igem Ethanol (-20°C) versetzt und zentrifugiert (10.000 rpm, 5 min). Nach erneutem Entfernen des Überstandes trocknet die RNA an der Luft für ca. 10 min und wird schließlich, nachdem sie in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen wurde, bei 70°C für 5 min gelöst.

3.2.5 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration wird in einer 1:100 Verdünnung mit DEPC-Wasser photometrisch bei 260 nm ermittelt. Außer diesem Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren wird auch die Absorption bei 280 nm gemessen, um Aussagen über die RNA-Reinheit treffen zu können. Für sehr reine RNA liegt der Quotient A_{260}/A_{280} zwischen 1,6 und 2,0.

3.2.6 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die cDNA-Synthese wird nach dem empfohlenen Protokoll des Herstellers Fermentas durchgeführt. Generell beruht die Reaktion der Reversen Transkriptase auf der Umschreibung der mRNA in komplementäre DNA (cDNA). Für diese enzymatische Reaktion werden 2 µg DNase verdaute RNA eingesetzt.

3.2.7 Polymerasen-Kettenreaktion an cDNA (RT-PCR)

Die PCR (Saiki *et al.*, 1985) dient zur selektiven Vervielfältigung von bestimmten DNA-Abschnitten. Mit Hilfe von 2 chemisch synthetisierten Oligonukleotiden (Primern), die zu den Randbereichen der zu amplifizierenden Sequenz komplementär sind, wird der Bereich zwischen den Primern durch eine thermostabile Polymerase dupliziert. Durch aufeinanderfolgende Zyklen der Denaturierung der DNA-Stränge, Anlagerung der Primer (Annealing) und DNA-Synthese (Elongation) wird eine exponentielle Vermehrung des gewünschten DNA-Fragments erreicht, da jeder neugebildete Strang als Matrize für die Synthese eines weiteren Stranges genutzt werden kann.

In der vorliegenden Arbeit werden je 2 µg cDNA mit folgendem Reaktionsansatz über 30 Zyklen in einem Thermocycler inkubiert (Tabelle 7):

Tab. 7 Reaktionsansatz RT-PCR

2	µl	cDNA
0,15	µl	Taq-Polymerase
0,5	µl	Primer Mix (je 20 pmol/l sense und antisense Primer)
0,5	µl	10 mM dNTPs
1	µl	50 mM MgCl ₂
2	µl	10× Reaktionspuffer
13,85	µl	RNase-freies Wasser

Die RT-PCR wird mit folgendem Standardprogramm (Tabelle 8) durchgeführt. Die entsprechenden Annealingtemperaturen zu den Genen sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tab. 8 Reaktionsschritte PCR

94°C	3 min	Vordenaturierung	}	30 Zyklen
94°C	45 sec	Denaturierung		
	45 sec	Annealing		
72°C	1 min	Elongation		
72°C	7 min	Elongation		

Die PCR-Produkte werden durch Agarose-Gelelektrophorese (3.2.9) auf ihre Spezifität überprüft.

Die verwendeten Primer mit den entsprechenden Annealingtemperaturen sind in Tabelle 9 aufgeführt

Tab. 9 Übersicht über die verwendeten Primer in der PCR.

Gen	Primersequenz 5' - 3'	Größe [bp]	Tm [°C]	Referenz
RLN2	s: tctgttactactgaaccaattt	485 (Variante 1)	55	*
	as: catggcaacatttattagccaa	585 (Variante 2)		
RLF	s: cagagatgcgtgagaagttgtgc	317	68	*
	as: tcagtagggacagagggtcagc			
LGR7	s: tctgccattaacagtgccttg	114	60	Krusche <i>et al.</i> , 2007
	as: gtatgtgaaaagggtccggcttc			
LGR8	s: tgcacagagagcacagcagaatggctc	240	65	*
	as: ggacagtgcaacccgatgtgaaagacc			
18S-rRNA	s: actcaacacgggaaacctcacc as: cgctccaccaactaagaacgg	111	55	**

* Die Sequenzen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. Thomas Klonisch, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität von Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Kanada zur Verfügung gestellt.

** Die Sequenz wurde von der Arbeitsgruppe Paulsen zur Verfügung gestellt.

3.2.8 Real-Time RT-PCR

Im Gegensatz zur konventionellen PCR, bei der die Endprodukte der Reaktion von Interesse sind, kann man die Amplifikation bei der Real-Time RT-PCR durch den

Einsatz von spezieller Software und PCR-Geräten zeitgleich („Real Time“) verfolgen und quantitative Aussagen über die Templatekonzentrationen treffen.

Der Anstieg der DNA-Menge während der PCR kann durch Interkalierung eines Fluoreszenzfarbstoffs in doppelsträngiger DNA detektiert werden. Je mehr Template vorhanden ist, desto mehr Farbstoff kann interkalieren und desto schneller steigt das Fluoreszenzsignal signifikant gegenüber dem Fluoreszenzhintergrund an. Diesen Zeitpunkt (PCR-Zyklus) bezeichnet man als Ct-Wert (*Cycle Threshold*). Aus den Ct-Werten der verschiedenen Proben lässt sich mit Hilfe einer Standardkurve die Konzentration an spezifischer cDNA ermitteln und damit eine Aussage über die mRNA-Konzentration treffen.

Zur Normalisierung wird die Genexpression des Zielgens auf ein weiteres nicht reguliertes Gen, ein so genanntes „Housekeeping-Gen“ bezogen. In Vorversuchen erwies sich 18S-rRNA, eine Ribosomenuntereinheit, als geeignetes Housekeeping Gen.

In der vorliegenden Arbeit wird die Real-Time PCR mit dem DNA Engine Cycler von MJ Research und dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green durchgeführt. Grundlage für die Standardkurve stellt eine cDNA-Verdünnungsreihe dar. Für die Auswertung wird die Opticon Monitor 2 Software verwendet.

Um zu überprüfen, ob ein spezifisches PCR-Produkt mit den gewählten Primerpaaren generiert wird, werden die Proben nach dem letzten PCR-Zyklus in 0,5°C-Schritten von 60°C bis auf 96°C erhitzt und die Fluoreszenzintensität gemessen. Die erste Ableitung der Intensität ergibt die Schmelzkurve des/der Amplifikats/e. Ist nur ein Produkt vorhanden, so erscheint ein einziger scharfer Peak. Die Größe des amplifizierten Produkts wird mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.2.9) kontrolliert.

In Tabelle 11 ist ein Reaktionsansatz für Real-Time PCR aufgelistet (Tabelle 10):

Tab. 10 Reaktionsansatz Real-Time PCR

7,5 µl	Platinum® SYBR® Green qPCR Super Mix
0,5 µl	10 µM sense-Primer
0,5 µl	10 µM antisense-Primer
10,5 µl	Reinstwasser
<u>1 µl</u>	12,5 ng/µl cDNA
Σ 20 µl	

Im Anschluss wird die cDNA nach folgendem Programm amplifiziert (Tabelle 11):

Tab. 11 Reaktionsschritte Real-Time PCR

50°C	2 min	Aktivierung des Enzyms	
95°C	3 min	Vordenaturierung	
95°C	15 sec	Denaturierung	} 40 Zyklen
	20 sec	Annealing	
72°C	10 sec	Elongation	
76°C	3 sec	Elongation	
60°C-96°C		Schmelzkurve	

Die relative Expression wird über die $\Delta\Delta Ct$ -Methode berechnet (Pfaffl, 2001), wobei das Vorliegen einer Signifikanz mit einem zweiseitigen Fisher t-Test (*p < 0,05; **p < 0,01) überprüft wird.

Die verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tab. 12 Übersicht über die verwendeten Primer in der Real-Time PCR.

Gen	Primersequenz 5' - 3'	Größe [bp]	Tm [°C]	Referenz
MMP2	s: ggctctcctgacattgacctt as: ggctcgtataccgcatcaatc	241	55	Li <i>et al.</i> , 2007
MMP9	s: gggcttagatcattcctcagtg as: gccattcacgtcgtccttat	94	55	Struckmann <i>et al.</i> , 2008
MMP13	s: agacccaaccctaaacatccaaaaac as: taaaaacagctccgcatcaacct	155	58	**
TIMP1	s: actccacaggtcccacaac as: agccacgaaactgcaggttag	96	55	Struckmann <i>et al.</i> , 2008
TIMP2	s: gagcctgaaccacaggtacca as: aggagatgtagcacgggatca	77	60	**
18S- rRNA	s: actcaacacgggaaacctcacc as: cgctccaccaactaagaacgg	111	55	**

** Die Sequenzen wurden von der Arbeitsgruppe Paulsen zur Verfügung gestellt.

3.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung der Gele wird die Agarose in 1x TAE Puffer aufgekocht. Nach Abkühlen auf etwa 50°C wird Ethidiumbromid zugesetzt. Ethidiumbromid interkaliert in

doppelsträngige Nukleinsäuren und sendet ein Fluoreszenzsignal aus, wenn es durch UV-Licht angeregt wird. Auf diese Weise gelingt es, die DNA-Fragmente sichtbar zu machen.

Die Proben werden für die Elektrophorese mit 6x Ladebuffer versetzt und in 1,2 - 3% Agarosegelen bei einer konstanten Spannung von 80 V für 35 min entsprechend ihrer Größe aufgetrennt.

3.2.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Trennung spezifischer DNA-Einzelfragmente von anderen Fragmenten, Salzen und/oder anderen Verunreinigungen, die in späteren Reaktionen (z.B. Sequenzierung, Ligation usw.) störend wirken können, erfolgt über die Methode der DNA-Elution mit Hilfe des MinElute Gel Extraction Kit von Qiagen.

3.2.11 Sequenzierung von DNA

Das DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit wird zur Sequenzierung von PCR-Produkten verwendet. Die gelelektrophoretische Analyse der Sequenzierung erfolgt auf einem ABI-Sequencer 733 der Firma Applied Biosystems im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Medizinischen Fakultät Halle.

3.2.12 Proliferationsassay

In zellbiologischen Untersuchungen ist die Bestimmung der Lebensfähigkeit und der zellulären Proliferation oft von großem Interesse. In diesem Zusammenhang wird in der vorliegenden Arbeit der 5-Bromo-2'-deoxy-Uridine Labeling and Detection Kit III der Roche Diagnostics GmbH verwendet. Hierbei beruht der Nachweis der Proliferation darauf, dass proliferierende Zellen das Basenalogon 5-Bromo-2'-deoxy-Uridin (BrdU) anstelle der Base Thymidin in ihre DNA einbauen. Ein enzymgekoppelter monoklonaler Antikörper bindet an das eingebaute BrdU und ermöglicht nach Zugabe des Substrats eine enzymatische Reaktion. Es entsteht ein farbiges Produkt, dessen Absorption gemessen wird und ein direktes Maß an inkorporiertem BrdU darstellt.

Für den Proliferationsassay, der nach den Angaben der Firma Roche durchgeführt wird, werden die Zellen in 96-Well Mikrotiterplatten (MTP) für 24 h bei 37°C kultiviert

und anschließend 2 h mit Serum-freiem Medium inkubiert. Dann erfolgt die Stimulation von SZ95-, IOBA-NHC- und HCE-Zellen sowie primären kornealen Fibroblasten mit RLN2 (100 ng/ml, 500 ng/ml) oder RLF (100 ng/ml, 500 mg/ml) für 24 h. Eine Kontrolle wird jeweils nur mit Serum-freiem Kulturmedium versetzt.

Die Markierung der Zellen erfolgt mit 10 μ M BrdU Lösung in Serum-freiem Medium für 18 h. Nach Fixierung der Zellen mit einer sauren Alkohollösung und einem partiellen Verdau von zellulärer DNA mit Hilfe von Nukleasen, wird das Basenalogon in der neusynthetisierten DNA mit dem Peroxidase-markierten anti-BrdU-Antikörper gebunden und das Substrat zu einem grünen Reaktionsprodukt umgesetzt.

Die Messung der Absorption erfolgt 15 min nach Substratzugabe bei 405 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 492 nm in einem MTP-Absorptionsreader.

Absorptionswerte von unbehandelten Kontrollen werden gleich 100% gesetzt.

3.2.13 Migrationsassay

Die Migrationsfähigkeit spielt gerade bei der Wundheilung eine große Rolle. Ein *in-vitro* Modell der Wundorganisation stellt das Scratch-Assay dar. Dazu wird in einen konfluenten Zellrasen eine Furche gekratzt. Die Zellen wandern in die entstandene Lücke und schließen sie. Der Fortschritt des Furchenverschlusses wird dokumentiert und ausgemessen.

Die Zellen werden auf Deckgläschen kultiviert bis sie konfluent sind. Nach zweistündiger Inkubation mit Serum-freiem Medium werden mit einer 100 μ l Pipettenspitze je Deckgläschen 3 Furchen in den Zellrasen gezogen. Anschließend wird mehrmals mit PBS gewaschen um Zelltrümmer und abgelöste Zellen zu entfernen und der vorbereitete Stimulationsansatz (siehe Tabelle 13) zugesetzt. Als Vergleich werden 2 Deckgläschen sofort nach dem Waschen gefärbt. Die stimulierten Zellen werden 24 h im Brutschrank inkubiert. Um festzustellen, ob die möglichen beobachteten Effekte auf Migration oder Proliferation zurückzuführen sind, werden entsprechende Inhibitoren verwendet. Außer den Hormonen werden entweder der Proliferationsinhibitor Mitomycin C oder der Migrationsinhibitor Cytochalasin B zugegeben. Weiterhin dient der epidermale Wachstumsfaktor EGF als Positivkontrolle. DMSO, das als Lösungsmittel für Cytochalasin B dient, wird als Kontrolle mitgeführt.

Tab 13 Stimulation von IOBA-NHC- und HCE-Zellen für den Migrationsassay

0 h	Kontrolle (SfM)		
24 h	Kontrolle (SfM)		
24 h	RLN2 100 ng/ml		
24 h	RLN2 100 ng/ml	+	Mitomycin C 5 µg/ml
24 h	RLN2 100 ng/ml	+	Cytochalasin B 5 µM
24 h	RLF 100 ng/ml		
24 h	RLF 100 ng/ml	+	Mitomycin C 5 µg/ml
24 h	RLF 100 ng/ml	+	Cytochalasin B 5 µM
24 h	EGF 30 ng/ml		
24 h	DMSO		

Nach 24 h werden die Zellen 5 min mit TBS gewaschen und anschließend 5 min mit 4% Paraformaldehyd/Phosphatpuffer fixiert. Das Paraformaldehyd wird mit TBS und Seradest abgespült. Anschließend werden die Zellen, wie in Tabelle 14 dargestellt, gefärbt und zum Schluss mit Kanadabalsam verschlossen.

Tab. 14 Reaktionsschritte der Hämatoxylin/Eosin-Färbung von Zellen

20 min	Färben in Hämatoxylin (nach MAYER, Merck) Waschen in Seradest
30 min	Bläuen in Seradest
35 sec	Färben in 2%iger alkalischer Eosin-Lösung
jeweils 15 sec	Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol 60%, 70%, 80%, 96%, Propanol)
2 x 3 min	Inkubation in Xylol

Die digitale Dokumentation erfolgt mit einem Photomikroskop von Zeiss.

3.2.14 Immunhistochemie

Paraffin-Gewebenschnitte

Zuerst werden die zu untersuchenden Gewebe in Paraffin eingebettet. Das Schneiden der Gewebe-Paraffinblöcke erfolgt mit einem Mikrotom. Es werden Schnitte von 7 µm Schnittdicke angefertigt.

Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Zum Färben mit Hämatoxylin/Eosin werden die Gewebeschnitte durch die in Tabelle 15 dargestellte Färbereihe geführt.

Tab. 15 Reaktionsschritte Hämatoxylin/Eosin-Färbung von Geweben

2 x 10 min	Deparaffinierung in Xylol
jeweils 5 min	Rehydrieren in einer absteigenden Alkoholreihe (Propanol; Ethanol 2 x 96%, 80%, 70%, 60%) Waschen in Seradest
20 min	Färben in Hämatoxylin (nach MAYER, Merck) Waschen in Seradest
30 min	Bläuen in Seradest
35 sec	Färben in 2%iger alkalischer Eosin-Lösung
jeweils 15 sec	Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol 60%, 70%, 80%, 96%; Propanol)
2 x 10 min	Inkubation in Xylol

Anschließend werden die gefärbten Gewebeschnitte mit einem Deckgläschen mit Hilfe von Kanadabalsam verschlossen.

Immunhistochemie (ABC-Methode)

Zur Darstellung der Verteilung zellulärer Proteine in Geweben wird die Immunhistochemie durchgeführt.

Vorbereitung für Paraffinschnitte

Zuerst werden die Präparate entparaffiniert, da in den folgenden Schritten im wässrigen Milieu gearbeitet wird. Dafür werden zunächst die zu untersuchenden Schnitte über Nacht bei 60°C inkubiert. Anschließend erfolgt das Herauslösen des Paraffins durch Inkubation von 2 mal 10 min in Xylol und anschließenden Bädern von jeweils 5 min in einer absteigenden Alkoholreihe von Propanol über Ethanol (96%-60%) bis in Seradest.

Antikörperanfärbung von Geweben

Zunächst wird zur Neutralisierung der Erythrozyten 30 min in 3%igem Wasserstoffperoxid bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Mikrowellenbehandlung dient der Epitopendemaskierung. Dazu werden die Schnitte in

10 mM Zitratpuffer (pH 6) gestellt und darin bei 600 W 15 min gekocht. Danach folgt eine Abkühlphase von 20 min und ein Waschschrift in TBS. Um die Bindung zu unspezifischen Eiweißen zu blockieren, wird nun 20 min mit einem Ziegennormalserum entsprechend dem Wirtstier des Sekundärantikörpers inkubiert. Nach Abklopfen des Normalserums wird mit dem Avidin/Biotin Blocking Kit behandelt. Es folgt erneutes Spülen mit TBS. Die Gewebeschnitte werden über Nacht bei 4°C in der angegebenen Verdünnungen des Primärantikörpers (Tabelle 16) inkubiert. Als Negativkontrolle wird anstelle des Primärantikörpers ein polyklonales Kaninchen non-immun Serum verwendet.

Tab. 16 Angaben zum LGR/-Antikörper

Antikörper	Klonalität	Code	Donor	Verdünnung	Hersteller
LGR7	polyklonal	SP4284P	Kaninchen	1:200	Acris

Am folgenden Tag werden die Objektträger mit PBS gespült und mit dem Sekundärantikörper (Ziege anti-Kaninchen Immunglobulin G Verdünnung 1:300, Ziege anti-Maus Immunglobulin G Verdünnung 1:200) versetzt, welcher die Brücke zum Avidin-Biotin-Komplex bildet, die wiederum die Anlagerung des Indikatorfarbstoffs Amino-Ethyl-Carbazol (AEC) erlaubt. Nach Zugabe des Brückenantikörpers wird für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit TBS gewaschen. Als nächster Schritt wird die Strept ABComplex/HRP Lösung aufgetragen und erneut für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgt die Färbung mit dem AEC-Farbstoff, der an den Avidin-Biotin-Komplex bindet. Nun wird für 30 sec bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Seradest gespült. Als letzter Schritt folgt die Gegenfärbung mit Hämatoxylin (1:4 in Seradest verdünnt) für 3 min, um eine Kontraststeigerung zu erreichen, und schlussendlich die Eindeckung der Objektträger mit Aquatex. Die digitale Dokumentation erfolgt mit einem Photomikroskop von Zeiss.

Antikörperanfärbung von Zellen

Die Zellen werden auf Deckgläschen kultiviert. Ist die gewünschte Konfluenz erreicht, werden die Zellen 5 min mit TBS gewaschen. Danach erfolgt die Fixierung in 4% Paraformaldehyd/Phosphatpuffer. Anschließend wird mit TBS gespült und 30 min mit 1% Glycin inkubiert. Wieder wird mit TBS gewaschen. Nun wird weiter nach dem Protokoll für die Antikörperanfärbung von Geweben ab dem Schritt der 20 minütigen Inkubation mit Normalserum verfahren.

3.2.15 Statistik

Dargestellt werden Mittelwerte aus gleichen Inkubationsansätzen mit Standardabweichung. Das Vorliegen einer Signifikanz wird über einen 2-seitigen Fisher t-Test ermittelt. Liegt die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% ($p < 0,05$), ist der Unterschied zur unbehandelten Kontrolle signifikant (*). Liegt die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 1% ($p < 0,01$), ist der Unterschied zur unbehandelten Kontrolle signifikant (**). Ist die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 0,1% ($p < 0.001$), ist der Unterschied zur behandelten Kontrolle signifikant (***)

4 Ergebnisse

Zuerst werden Analysen zur Detektion der Hormone RLN2 (Relaxin 2) und RLF (Relaxin-like Faktor) sowie der Rezeptoren LGR7 und LGR8 durchgeführt. Im Anschluss folgen verschiedene Untersuchungen, um mögliche Funktionen der Hormone an der Augenoberfläche zu charakterisieren.

4.1. Nachweis der Expression von RLN2, RLF, LGR7 und LGR8

Der Nachweis der Gentranskription von RLN2 und RLF sowie der Rezeptoren LGR7 und LGR8 wird mittels Reverse-Transkriptase PCR an verschiedenen Geweben von Körperspendern und an Zelllinien durchgeführt. Bei einem Abgleich der Sequenzdaten mit bereits bekannten Gensequenzen aus der Datenbank von NCBI (National Center for Biotechnology Information) erfolgt eine Zuordnung der jeweiligen Amplifikate zu RLN2 Transkriptvariante 1, RLN2 Transkriptvariante 2, RLF, LGR7 und LGR8. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die verwendeten Primer die gewünschten Genstücke amplifizieren. Die Integrität der verwendeten cDNA wird durch eine zusätzliche 18S-rRNA PCR überprüft. Die anschließende Proteindetektion erfolgt immunhistochemisch mit Hilfe spezifischer Antikörper.

4.1.1 Nachweis von Relaxin 2 (RLN2)

Abbildung 2 zeigt die Amplifikationsprodukte von RLN2 der untersuchten Gewebe und Zelllinien.

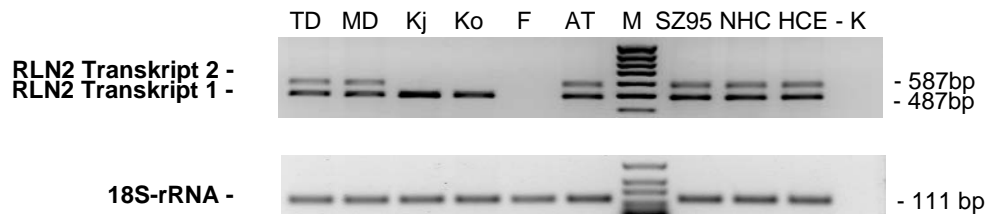


Abb. 2 Expression von RLN2 Transkriptvariante 1 (487 bp) und Transkriptvariante 2 (587 bp) in den Geweben der Augenoberfläche, den ableitenden Tränenwegen und den Zelllinien SZ95, IOBA-NHC und HCE. TD – Tränendrüse, MD – Meibom-Drüse, Kj – Konjunktiva, Ko – Kornea, F – primäre korneale Fibroblasten, AT – ableitende Tränenwege, M – Marker, SZ95 – humane Sebozytenzelllinie, NHC – humane Konjunktivazelllinie, HCE – humane Korneaepithelzelllinie, -K – Negativkontrolle ohne cDNA-Zugabe.

Für RLN2 (Abbildung 2, Tabelle 17) werden beide Transkriptionsvarianten in nur einer der 11 untersuchten Tränendrüsen nachgewiesen. Ebenso zeigen 3 von 5 Meibom-Drüsen und eine von 4 ableitenden Tränenwegen die Expression von beiden RLN2-Varianten. In einer von 7 Konjunktiva- und 5 von 17 Korneagewebeproben werden jeweils die Transkriptvariante 1 (487bp) detektiert, jedoch nicht die Transkriptvariante 2 (587bp). Die primär kultivierten kornealen Fibroblasten zeigen keine Expression. Die IOBA-NHC-, HCE- und SZ95-Zelllinie exprimieren sowohl Transkriptionsvariante 1, als auch Variante 2.

Tab. 17 Anzahl der untersuchten Proben, davon positive und negative Nachweise von RLN2 sowie prozentuale Darstellung.

	Tränendrüse	Meibom- Drüse	Konjunktiva	Kornea	Ableitender Tränenweg
n	11	5	7	17	4
Positiv	1	3	1	5	1
Negativ	10	2	6	12	3
Positiv [%]	9	60	14	29	25

4.1.2 Nachweis von Relaxin-like Faktor (RLF)

Abbildung 4 zeigt die Amplifikationsprodukte von RLF in untersuchten Geweben und Zelllinien.

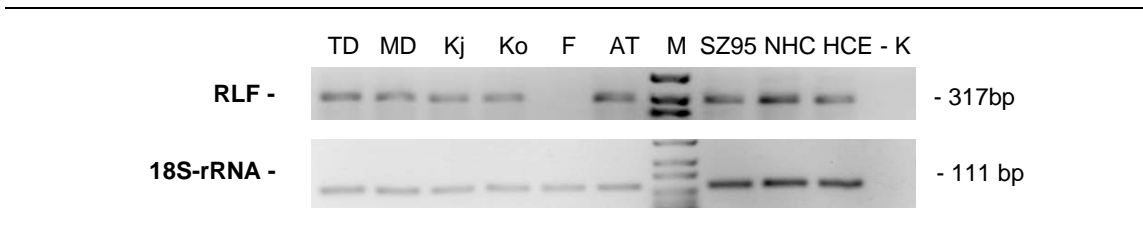


Abb. 4 Expression von RLF (317 bp) in den Geweben der Augenoberfläche, den ableitenden Tränenwegen und den Zelllinien SZ95, NHC und HCE. Exemplarische Darstellung eines Amplifikationsprodukts im Ethidiumbromid-angefärbten Agarosegel (2 %ig) pro Gewebe und Zelllinie. TD – Tränendrüse, MD – Meibom-Drüse, Kj – Konjunktiva, Ko – Kornea, F – primäre korneale Fibroblasten, AT – ableitende Tränenwege, M – Marker, SZ95 – humane Sebozytenzelllinie, NHC – humane Konjunktivaepithelzelllinie, HCE – humane Korneaepithelzelllinie, -K – Negativkontrolle ohne cDNA-Zugabe.

Amplifikationsprodukte für RLF (Abbildung 4, Tabelle 18) treten in der zu erwartenden Größe nur bei einer von 5 Tränendrüsen und bei einer von 5 Meibom Drüsen auf. Ein positiver Nachweis von RLF gelang in einer von 5 untersuchten Konjunktiva-, 3 von 11 Korneaepithelien und 2 von 4 ableitenden Tränenwegen. Primäre korneale Fibroblasten exprimieren kein RLF. In allen untersuchten Zelllinien wird RLF auf mRNA-Ebene gebildet.

Tab. 18 Anzahl der untersuchten Proben, davon positive und negative Nachweise von RLF sowie prozentuale Darstellung.

	Tränendrüse	Meibom- Drüse	Konjunktiva	Kornea	Ableitender Tränenweg
n	5	5	5	11	4
Positiv	1	1	1	3	2
Negativ	4	4	5	8	2
Positiv [%]	20	20	20	27	50

4.1.3 Nachweis des Rezeptors LGR7

Abbildung 5 zeigt die Amplifikationsprodukte des Rezeptors LGR7 der untersuchten Gewebe und Zelllinien.

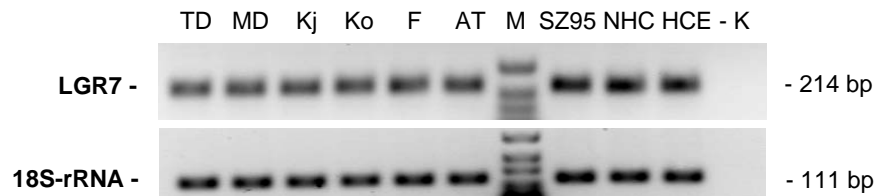


Abb.5 Expression des Rezeptors LGR7 in den Geweben der Augenoberfläche, den ableitenden Tränenwegen und den Zelllinien SZ95, NHC und HCE. Exemplarische Darstellung eines Amplifikationsprodukts im Ethidiumbromid-angefärbten Agarosegel (2 %ig) pro Gewebe und Zelllinie. TD – Tränendrüse, MD – Meibom-Drüse, Kj – Konjunktiva, Ko – Kornea, F – primäre korneale Fibroblasten, AT – ableitende Tränenwege, M – Marker, SZ95 – humane Sebozytenzelllinie, NHC – humane Konjunktivaepithelzelllinie, HCE – humane Korneaepithelzelllinie, -K – Negativkontrolle ohne cDNA-Zugabe.

Der Rezeptor LGR7 (Abbildung 5, Tabelle 19) wird in 2 von 10 untersuchten Tränendrüsen, 3 von 5 Meibom Drüsen, 4 von 6 Konjunktivae, 4 von 10 Korneae und 3 von 4 ableitenden Tränenwegen transkribiert. Ebenso zeigen primäre korneale Fibroblasten ein entsprechendes Amplifikationsprodukt bei 214 bp. Außerdem ist in allen 3 Zelllinien (IOBA-NHC, HCE und SZ95) der Rezeptor LGR7 auf mRNA-Ebene nachweisbar.

Tab. 19 Anzahl der untersuchten Proben, davon positive und negative Nachweise von LGR7 sowie prozentuale Darstellung.

	Tränendrüse	Meibom- Drüse	Konjunktiva	Kornea	Ableitender Tränenweg
n	10	5	6	10	4
Positiv	2	3	4	4	3
Negativ	2	2	2	6	1
Positiv [%]	20	60	67	40	75

Der Proteinnachweis des Rezeptors LGR7 erfolgt mittels Immunhistochemie mit einem polyklonalen Antikörper der Firma Acris. Abbildung 6 zeigt die immunhistochemische Lokalisation des Rezeptors in den untersuchten Geweben.

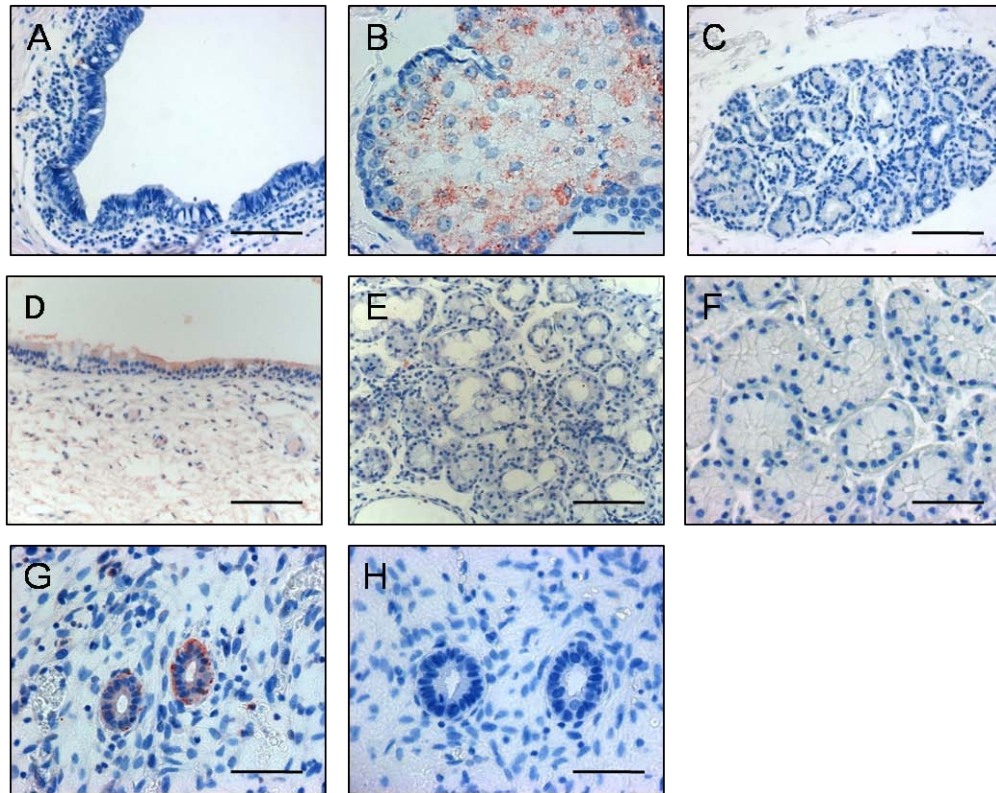


Abb. 6 Immunhistochemischer Nachweis des Rezeptors LGR7 mit einem polyklonalen Antikörper der Firma Acris an Paraffinschnitten der Konjunktiva (A), Meibom-Drüse (B), einer akzessorischen Tränendrüse (C), Epithel (D) und subepithelialen Drüsen der ableitenden Tränenwege (E) und Tränendrüse (F). LGR7 ist als rotes Reaktionsprodukt erkennbar. Endometriumschleimhaut des Uterus dient als Positivkontrolle (G). Die Negativkontrolle wurde mit einem IgG Serum behandelt und zeigt keine rote Färbung. Der Balken entspricht in Bild A, C, D, E 25 μm ; in Bild B, F, G, H 50 μm .

Der Proteinnachweis des Rezeptors LGR7 ist in keiner der 10 untersuchten Konjunktivae und Tränendrüsen nachweisbar und kommt auch nicht in den Drüsen der ableitenden Tränenwege vor. Im Epithel der ableitenden Tränenwege ist sporadisch eine Rotfärbung vor allem apikal sichtbar. Im Gegensatz dazu werden mit dem verwendeten Antikörper gegen LGR7 granuläre Strukturen im Zytoplasma aller 10 untersuchten Meibom-Drüsenzellen positiv markiert.

Die immunhistochemische Detektion des LGR7 Rezeptors in den Zelllinien erfolgte ebenfalls mit dem polyklonalen Antikörper der Firma Acris und ist in Abbildung 7 dargestellt.

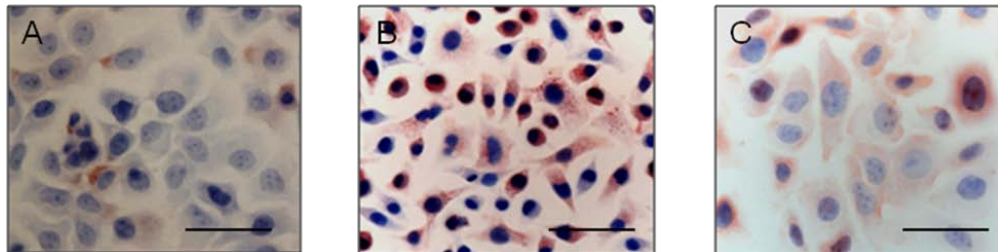


Abb. 7 Immunhistochemischer Nachweis von LGR7 mit einem polyklonalen Antikörper der Firma Acris an Zellen der humanen Sebozytenzelllinie (A), Konjunktivaepithel- (B) und Korneaepithelzelllinie (C). Die Negativkontrolle wurde mit einem IgG Serum behandelt und zeigt kein rotes Reaktionsprodukt. Der Balken entspricht in Bild A und C 15 µm und in Bild B 30 µm.

Der Proteinnachweis des Rezeptors LGR7 gelingt in allen 3 untersuchten Zelllinien (SZ95, IOBA-NHC und HCE). Vor allem in Zellen der Konjunktivaepithelzelllinie sind granuläre Strukturen im Zytoplasma markiert.

4.1.4 Nachweis des Rezeptors LGR8

Abbildung 8 zeigt die Amplifikationsprodukte des Rezeptors LGR8 der untersuchten Gewebe und Zelllinien.

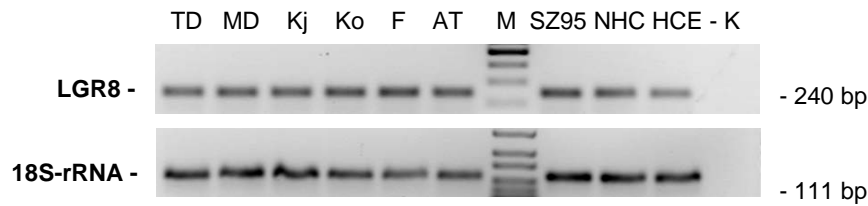


Abb. 8 Expression des Rezeptors LGR8 in den Geweben der Augenoberfläche, den ableitenden Tränenwegen und den Zelllinien SZ95, NHC und HCE. Exemplarische Darstellung eines Amplifikationsprodukts im Ethidiumbromid-angefärbten Agarosegel (2 %ig) pro Gewebe und Zelllinie. D – Tränendrüse, MD – Meibom-Drüse, Kj – Konjunktiva, Ko – Kornea, F – primäre korneale Fibroblasten, AT – ableitende Tränenwege, M – Marker, SZ95 – humane Sebozytenzelllinie, NHC – humane Konjunktivaepithelzelllinie, HCE – humane Korneaepithelzelllinie, -K – Negativkontrolle ohne cDNA-Zugabe

Der Rezeptor LGR8 (Abbildung 8, Tabelle 20) wird auf mRNA-Ebene in 8 von 11 Tränendrüsen, in allen untersuchten Meibom-Drüsen (n=5), in 3 von 6 Konjunktivae und 9 von 14 Korneae sowie in 3 von 4 ableitenden Tränenwegen und in primären kornealen Fibroblasten detektiert. Ebenfalls wird LGR8 in allen 3 Zelllinien (SZ95, IOBA-NHC und HCE) auf mRNA-Ebene exprimiert.

Tab. 20 Anzahl der untersuchten Proben, davon positive und negative Nachweise von LGR8 sowie prozentuale Darstellung.

	Tränendrüse	Meibom- Drüse	Konjunktiva	Kornea	Ableitender Tränenweg
n	11	5	6	14	4
Positiv	8	5	3	9	3
Negativ	3	0	3	5	1
Positiv [%]	73	100	50	64	75

Zur Proteindetektion des Rezeptors LGR8 stehen keine geeigneten Antikörper zur Verfügung.

4.1.5 Alters- und Geschlechtsspezifische Darstellung der mRNA-Expression

RLN2 und RLF kann jeweils in einer weiblichen Tränendrüse nachgewiesen werden (siehe Tabelle 21). Für die Rezeptoren LGR7 und LGR8 ist keine geschlechts- und altersspezifische Verteilung zu erkennen.

Tab. 21 Daten der Körperspender und Ergebnisse der konventionellen RT-PCR an Tränendrüsenengewebe (M – männlich, W – weiblich, + – positiver Nachweis, - – kein Nachweis, n – Anzahl)

Geschlecht	Alter [Jahre]	RLN2	RLF	LGR7	LGR8
M	73	-		+	-
M	82	-	-	-	+
M	83	-		-	+
M	92	-		-	-
W	67	-	-	-	+
W	70	-	-	-	+
W	72	-		-	+
W	78	-	-	-	+
W	80	+	+	-	+
W	82	-		+	+
W	83	-			-
n		11	5	10	11
Positiv		1	1	2	8
Negativ		10	4	8	3
Positiv [%]		9	20	20	73

Die Meibom-Drüse eines 85-jährigen Körperspenders zeigt eine positive RNA-Expression von RLN2 und LGR8 (vgl. Tabelle 22). Im Gegensatz dazu war kein Nachweis von RLF und LGR7 möglich. Bei den 4 Meibom Drüsen weiblicher Spenderinnen erfolgte die Detektion der Hormone und Rezeptoren altersunabhängig.

Tab. 22 Daten der Körperspender und Ergebnisse der konventionellen RT-PCR an Meibom-Drüsengewebe (M – männlich, W – weiblich, + – positiver Nachweis, - – kein Nachweis, n – Anzahl)

Geschlecht	Alter [Jahre]	RLN2	RLF	LGR7	LGR8
M	85	+	-	-	+
W	75	-	-	+	+
W	76	+	+	-	+
W	78	+	-	+	+
W	89	-	-	+	+
n		5	5	5	5
Positiv		3	1	3	5
Negativ		2	4	2	0
Positiv [%]		60	20	60	100

Wie in Tabelle 23 dargestellt, ist die RLN2- und RLF- Expression in Konjunktivagewebe nur bei einer 80jährigen Patientin nachweisbar. Der Rezeptor LGR7 ist in der Konjunktiva von weiblichen und männlichen Spendern detektierbar. Im Gegensatz dazu zeigt nur Konjunktivagewebe von weiblichen Spendern eine LGR8-mRNA-Expression.

Tab. 23 Daten der Körperspender und Ergebnisse der konventionellen RT-PCR an Konjunktivagewebe (M – männlich, W – weiblich, + – positiver Nachweis, - – kein Nachweis, n – Anzahl)

Geschlecht	Alter [Jahre]	RLN2	RLF	LGR7	LGR8
M	76	-	-	+	-
M	78	-			
M	83	-	-	-	-
W	64	-	-	+	-
W	73			+	
W	77	-		-	
W	80	+	+		+
W	83	-	-		+
W	92			+	+
	n	7	5	6	6
	Positiv	1	1	4	3
	Negativ	6	4	2	3
	Positiv [%]	14	20	67	50

Bis auf eine Gewebeprobe sind alle Korneae von weiblichen Spendern (siehe Tabelle 24). Die männliche Gewebeprobe zeigt eine Expression des LGR8 Rezeptors, jedoch ist ein Nachweis von RLN2 nicht möglich. Die weiblichen Gewebeproben zeigen sowohl Hormon- als auch Rezeptorexpression unabhängig vom Alter der Spenderinnen oder der Pathologie der Korneae.

Tab. 24 Daten der Körperspender/Patienten und Ergebnisse der konventionellen RT-PCR an Korneagewebe (M – männlich, W – weiblich, + – positiver Nachweis, - – kein Nachweis, n – Anzahl)

Geschlecht	Alter [Jahre]	Bemerkung	RLN2	RLF	LGR7	LGR8
W	53	bullöse Keratopathie	+	+	+	+
W	64	bullöse Keratopathie	-	-	-	-
W	83	bullöse Keratopathie	-	-	-	-
W	54	Pseudophakie	-	+	+	+
W	61	39w44	+	-	-	-
W	64	Pseudophakie	-	-	-	-
W	67	Pseudophakie	-	-	-	+
M	11	Trauma	-	-	+	+
W	25	Trauma	-	-	-	-
W	64	Körperspenderin	-	-	-	-
W	64	Körperspenderin	+	-	-	+
W	71	Körperspenderin	-	-	-	+
W	73	Körperspenderin	-	-	-	-
W	80	Körperspenderin	+	-	-	+
W	80	Körperspenderin	+	-	-	-
W	81	Körperspenderin	-	-	+	-
W	82	Körperspenderin	-	-	-	+
W	92	Körperspenderin	-	+	-	+
n			17	11	10	14
Positiv			5	3	4	9
Negativ			12	8	6	5
Positiv [%]			29	27	40	64

Es stehen nur Gewebeproben aus den ableitenden Tränenwegen von Frauen zur Verfügung. Die Expression von RLN2 und RLF sowie der Rezeptoren LGR7 und LGR8 ist nicht altersgebunden (Tabelle 25).

Tab. 25 Daten der Körperspender und Ergebnisse der konventionellen RT-PCR an ableitenden Tränenwegen (M – männlich, W – weiblich, + – positiver Nachweis, - – kein Nachweis, n – Anzahl)

Geschlecht	Alter [Jahre]	RLN2	RLF	LGR7	LGR8
W	64	-	+	-	-
W	80	+	+	+	+
W	82	-	-	+	+
W	92	-	-	+	+
	n	4	4	4	4
	Positiv	1	2	3	3
	Negativ	3	2	1	1
	Positiv [%]	25	50	75	75

An die beschriebenen deskriptiven Untersuchungen werden funktionelle Analysen angeschlossen. Hierzu werden die humane Sebozyten- (SZ95), Korneaepithel- (HCE) und Konjunktivaepithelzelllinie (IOBA-NHC) als Modelle eingesetzt.

4.2 Proliferationsverhalten der Zelllinien sowie von primären kornealen Fibroblasten

Um grundlegende funktionelle Eigenschaften von RLN2 und RLF auf die 3 Zelllinien zu untersuchen, wird zunächst die Proliferationsfähigkeit behandelter Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen mit einem BrdU-Assay überprüft.

4.2.1 Proliferationsverhalten der Sebozytenzelllinie SZ95

In Abbildung 9 ist die Proliferationsfähigkeit der Sebozytenzelllinie SZ95 dargestellt. Stimulation von SZ95-Zellen mit 100 ng/ml RLN2 ergibt keine signifikante Änderung der Proliferationsrate. Tendenziell wird jedoch eine leichte Zunahme der DNA-Synthese beobachtet.

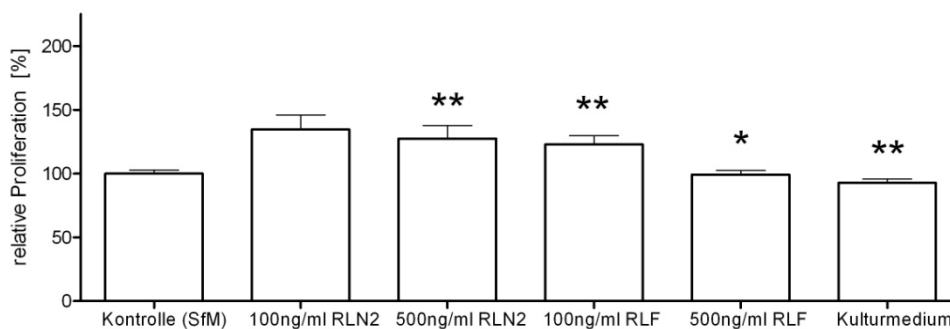


Abb. 9 Einfluss verschiedener RLN2- und RLF-Konzentrationen (100 ng/ml, 500 ng/ml) auf die Proliferationsfähigkeit von SZ95-Zellen nach 24 h Stimulationsdauer. Die Ergebnisse (MW \pm SD) aus 3 unabhängigen Versuchen (N=3) mit je 3 Versuchsansätze (n=3) werden gegen die Kontrolle mit Serum-freiem Kulturmedium (100%) normalisiert und der signifikante Unterschied auf die Kontrolle mit Serum-freiem Kulturmedium bezogen (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Das Kulturmedium wird wie in Tabelle 4 beschrieben verwendet.

Bei der Inkubation von SZ95-Zellen mit 500 ng/ml RLN2 und 100 ng/ml RLF für 24 h steigt die DNA-Synthese signifikant auf 130% gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Im Gegensatz dazu ist bei einer Konzentration von 500 ng/ml RLF kein Unterschied zur Kontrolle mit Serum-freiem Kulturmedium zu beobachten. SZ95 proliferieren bei SeboMed Basalmedium etwa im selben Umfang wie mit FKS-haltigem Kulturmedium (siehe Tabelle 4).

4.2.2 Proliferationsverhalten der Konjunktivaepithelzelllinie IOBA-NHC

Alle Inkubationsansätze, die mit RLN2 oder RLF stimuliert werden, weisen nach 24 h eine signifikant gesteigerte DNA-Syntheserate auf (vgl. Abbildung 10).

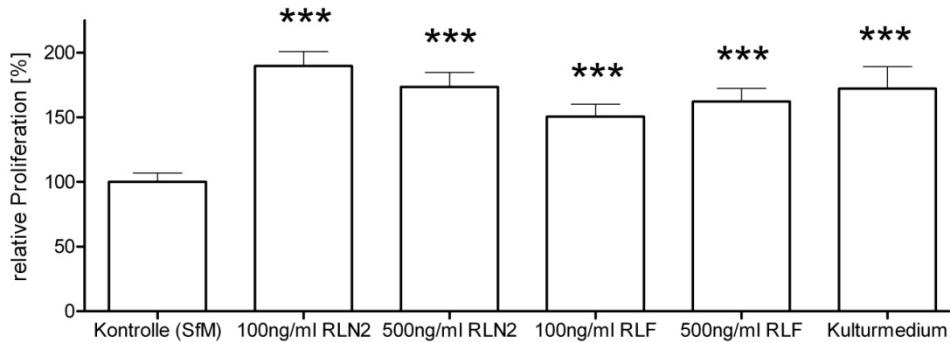


Abb. 10 Einfluss verschiedener RLN2- und RLF-Konzentrationen (100 ng/ml, 500 ng/ml) auf die Proliferationsfähigkeit von IOBA-NHC-Zellen nach 24 h Stimulationsdauer. Die Ergebnisse (MW \pm SD) aus 3 unabhängigen Versuchen (N=3) mit je 3 Versuchsansätze (n=3) werden gegen die Kontrolle mit Serum-freiem Kulturmedium (100%) normalisiert und der signifikante Unterschied auf die Kontrolle mit Serum-freiem Kulturmedium bezogen (***) $p < 0,001$). Das Kulturmedium wird wie in Tabelle 3 beschrieben verwendet.

Die stärkste Steigung der Proliferationsrate ist bei Stimulation mit 100 ng/ml RLN2 auf rund 190% im Vergleich zur Kontrolle sichtbar. Die relative Proliferation beträgt bei 500 ng/ml RLN2 180%. Wird mit 100 ng/ml RLF inkubiert, nimmt die Proliferation um 60% zu und steigt bei 500 ng/ml RLF um 70%. Damit liegt die Proliferationsrate mit Kulturmedium (Tabelle 3) im gleichen Bereich wie die Proliferationsrate bei Stimulation mit RLN2 oder RLF.

4.2.3 Proliferationsverhalten der Korneaepithelzelllinie HCE

Die Proliferations-eigenschaften der humanen Korneaepithelzelllinie HCE sind im folgenden Diagramm (Abbildung 11) dargestellt.

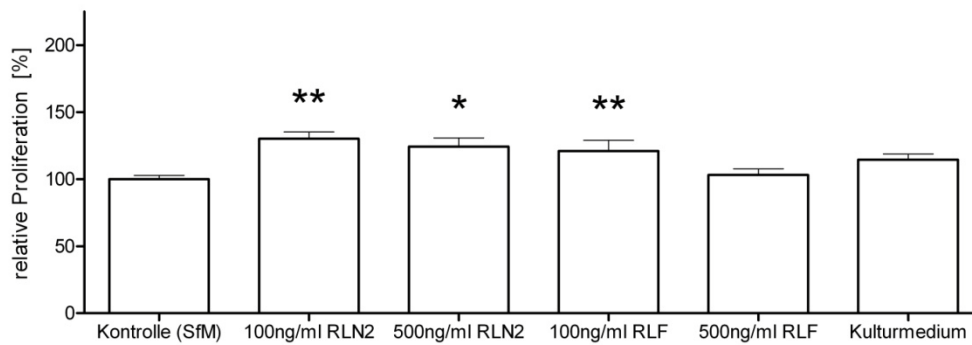


Abb. 11 Einfluss verschiedener RLN2- und RLF-Konzentrationen (100 ng/ml, 500 ng/ml) auf die Proliferationsfähigkeit von HCE-Zellen nach 24 h Stimulationsdauer. Die Ergebnisse (MW \pm SD) aus 3 unabhängigen Versuchen (N=3) mit je 3 Versuchsansätze (n=3) werden gegen die Kontrolle mit Serum-freiem Kulturmedium (100%) normalisiert und der signifikante Unterschied auf die Kontrolle mit Serum-freiem Kulturmedium bezogen (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Das Kulturmedium wird wie in Tabelle 2 beschrieben verwendet.

Stimulation von HCE-Zellen mit 100 ng/ml RLN2, 500 ng/ml RLN2 und 100 ng/ml RLF führt zu einer signifikanten Erhöhung der Proliferationsrate um etwa 20%. Ebenso proliferieren HCE-Zellen, die mit HCE-Kulturmedium (Tabelle 2) kultiviert werden, um etwa 20%. Im Vergleich dazu zeigen HCE-Zellen nach Stimulation mit 500 ng/ml RLF keinen signifikanten Anstieg der Proliferationsrate.

4.2.4 Proliferationsverhalten der primären kornealen Fibroblasten

Das Proliferationsverhalten von primären kornealen Fibroblasten wird durch RLN2 und RLF nicht signifikant beeinflusst (siehe Abbildung 12). Die Proliferation der Fibroblasten steigt bei Verwendung von Kulturmedium (Tabelle 1) im Vergleich zu Serum-freiem Kulturmedium.

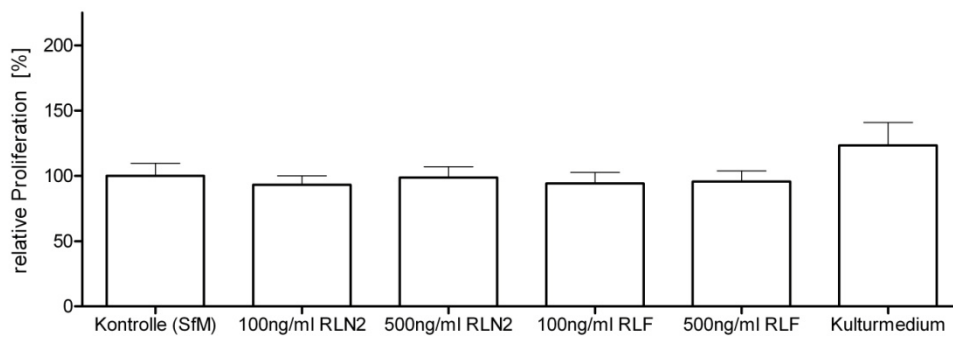


Abb. 12 Einfluss verschiedener RLN2- und RLF-Konzentrationen (100 ng/ml, 500 ng/ml) auf die Proliferationsfähigkeit von primären kornealen Fibroblasten nach 24 h Stimulationsdauer. Die Ergebnisse (MW \pm SD) aus 3 unabhängigen Versuchen (N=3) mit je 3 Versuchsansätze (n=3) werden gegen die Kontrolle mit Serum-freiem Kulturmedium (100%) normalisiert und der signifikante Unterschied auf die Kontrolle mit Serum-freiem Kulturmedium bezogen. Das Kulturmedium wird wie in Tabelle 1 beschrieben verwendet.

Neben dem Proliferationsverhalten der Zelllinien und primärer kornealer Fibroblasten wird das Migrationsverhalten der Konjunktiva- (IOBA-NHC-Zellen) und Korneaepithelzelllinie (HCE-Zellen) studiert.

4.3 Migrationsverhalten der Epithelzelllinien

Das Migrationsverhalten der humanen Konjunktiva- (IOBA-NHC) und Korneaepithelzelllinie (HCE) wird mittels Scratch-Assays untersucht.

4.3.1 Migrationsverhalten der Konjunktivaepithelzelllinie IOBA-NHC

Im Rahmen einer 24 h Inkubation mit 100 ng/ml RLN2 zeigen IOBA-NHC-Zellen keine signifikant höhere Migration ($p < 0,01$) als Zellen, die mit Serum-freien Medium stimuliert werden (siehe Abbildung 13E). Ferner wird untersucht, ob möglicher Effekt auf die Migration oder die Proliferation oder auf beides zurückzuführen ist. Wenn IOBA-NHC-Zellen mit 100 ng/ml RLN2 und 5 μ g/ml Mitomycin C, einem Proliferationsinhibitor, stimuliert werden, kann die Schließungsrate im Scratch-Assay deutlich gesenkt werden. Bei Stimulation mit 100 ng/ml RLN2 und 5 μ M Cytochalasin B, einem Migrationsinhibitor, lässt sich die Migration ebenfalls signifikant unterdrücken. Für EGF wird ein starker migrationsfördernder Effekt beschrieben. IOBA-NHC-Zellen, die mit 30 ng/ml EGF stimuliert werden, zeigen eine signifikant erhöhte Schließungsrate. Dabei liegt die Migrationrate von IOBA-NHC-Zellen, die mit EGF inkubiert werden auf gleichem Niveau wie nach Stimulation mit 100 ng/ml RLN2.

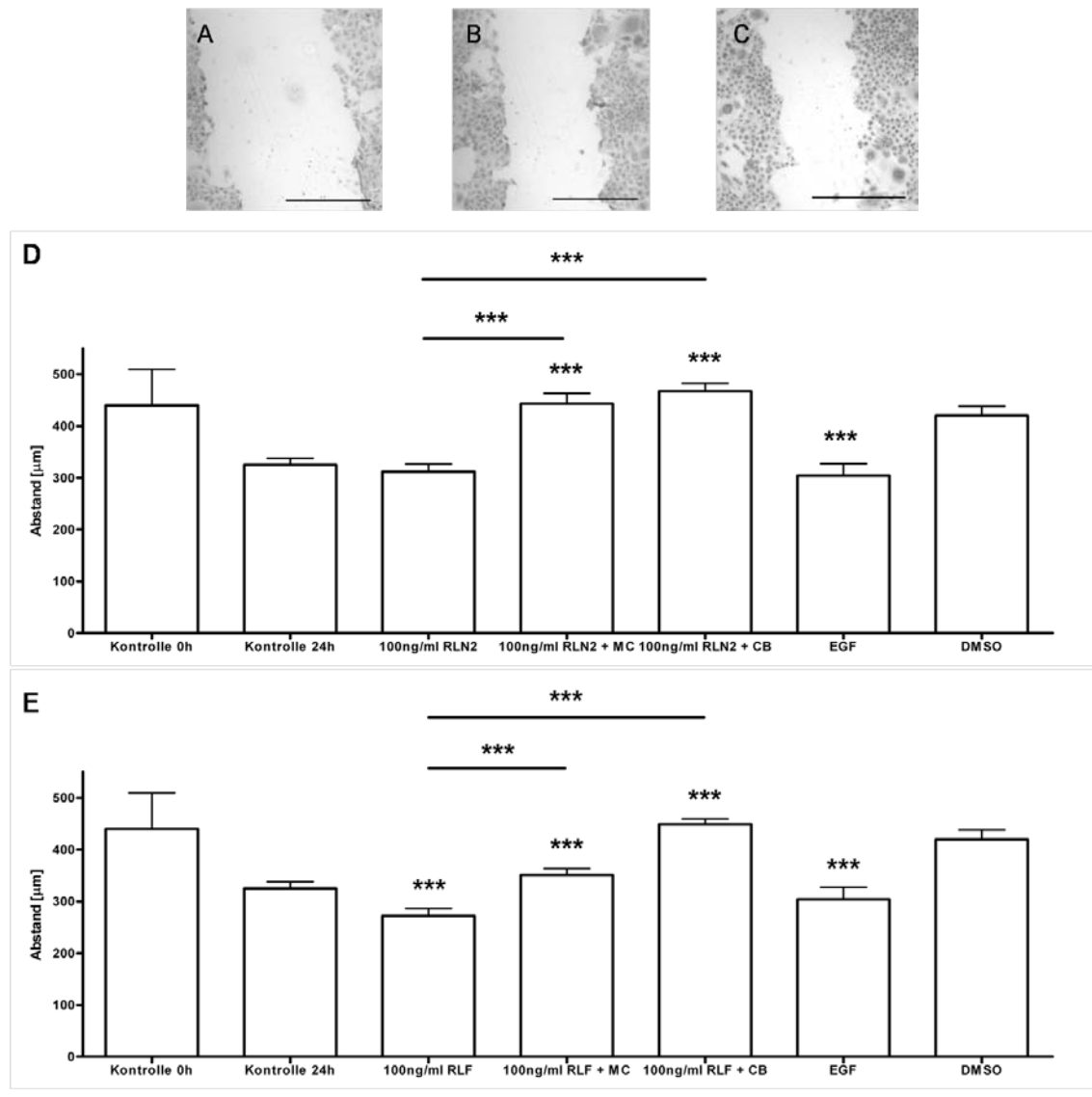


Abb. 13 Der Einfluss von RLN2 und RLF auf das Migrationsverhalten von IOBA-NHC-Zellen. A Kontrolle, 0 h; B Zellen wurden 24 h mit 100 ng/ml RLN2 stimuliert; C Zellen wurden 24 h mit 100 ng/ml RLF inkubiert; Darstellung der mittleren Migrationsrate \pm SEM von IOBA-NHC-Zellen nach Stimulation mit RLN2 (D) und RLF (E) im Vergleich zur 24 h Kontrolle mit Serum-freiem Kulturmedium. Der Balken entspricht in Bild A, B und C 300 μ m. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; N=2)

IOBA-NHC-Zellen, die 24 h mit 100 ng/ml RLF stimuliert werden, zeigen eine signifikant höhere Migration ($p < 0,001$) als Zellen, die mit Serum-freiem Medium inkubiert werden (vgl. Abbildung 13F). Nach Inkubation mit 100 ng/ml RLF und 5 μ g/ml des Proliferationsinhibitor Mitomycin C weisen IOBA-NHC-Zellen eine viel geringere Schließungsrate der Scratch-Furche auf. Wird mit 100 ng/ml RLF und 5 μ M

Cytochalasin B, einem Migrationsinhibitor, stimuliert, wird die Migrationsrate deutlich reduziert. Die Migrationsrate von IOBA-NHC-Zellen nach Stimulation mit 30 ng/ml EGF ähnelt dem Migrationsverhalten der Zellen, die mit 100 ng/ml RLF inkubiert werden.

4.3.2 Migrationsverhalten der Korneaepithelzelllinie HCE

HCE-Zellen, die 24 h mit 100 ng/ml RLN2 stimuliert werden, zeigen eine signifikant höhere Migration ($p < 0,001$) als Zellen, die mit Serum-freiem Medium inkubiert werden (Abbildung 14E). Um diesen Effekt der Proliferation, der Migration oder einem Synergismus aus Proliferation und Migration zu zuordnen, werden der Proliferationsinhibitor Mitomycin C und der Migrationsinhibitor Cytochalasin B verwendet. Werden HCE-Zellen mit 100 ng/ml RLN2 und 5 µg/ml Mitomycin stimuliert, kommt es zu einer Verzögerung der Schließung der Scratch-Furche. Bei Stimulation mit 100 ng/ml RLN2 und 5 µM Cytochalasin B, wird die Migration ebenfalls signifikant unterdrückt. Die Migrationsrate von HCE-Zellen nach Stimulation mit 30 ng/ml EGF ähnelt dem Migrationsverhalten der Zellen, die mit 100 ng/ml RLN2 inkubiert werden.

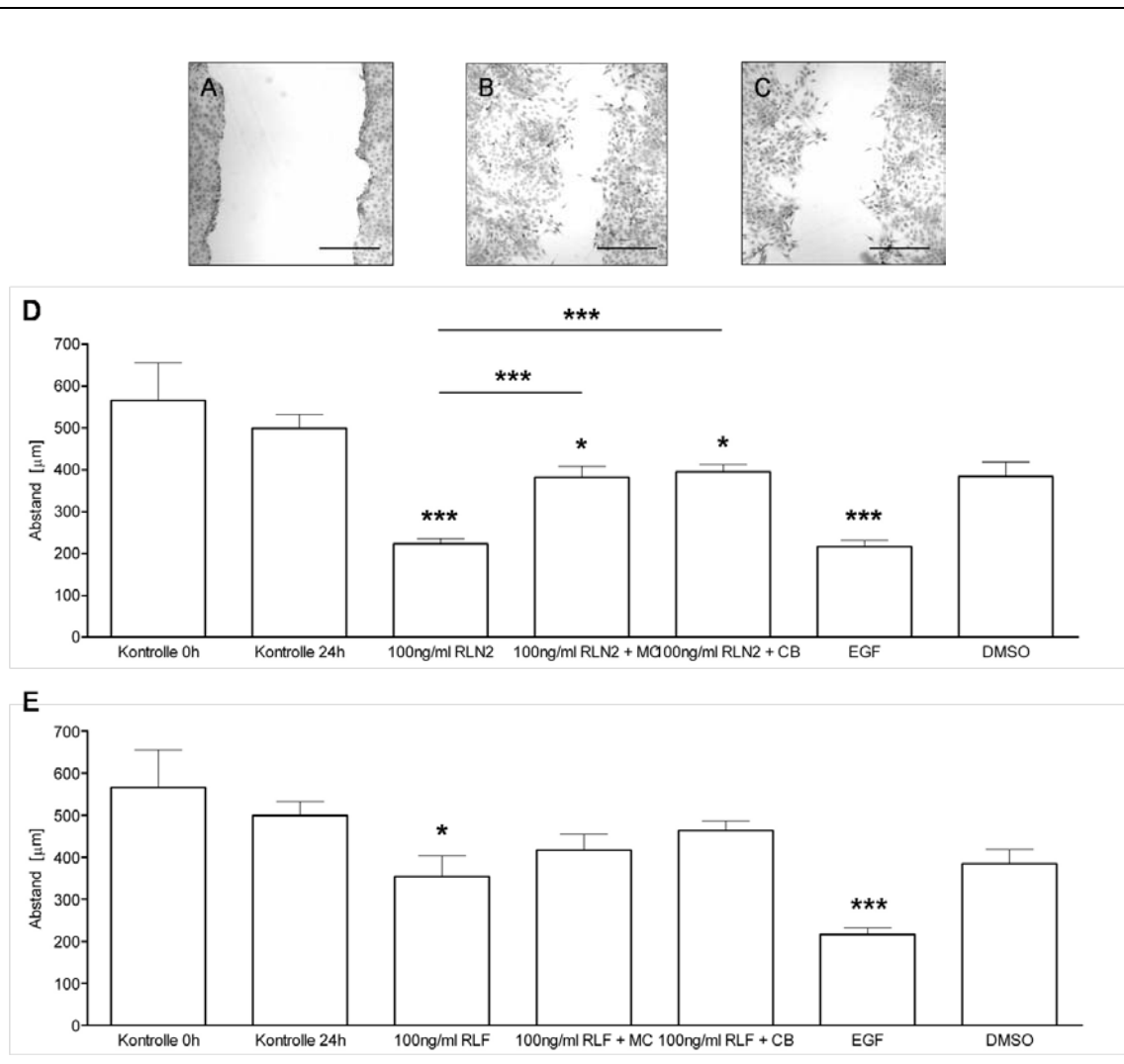


Abb. 14 Der Einfluss von RLN2 und RLF auf das Migrationsverhalten von HCE-Zellen. A Kontrolle, 0 h; B Zellen wurden 24 h mit 100 ng/ml RLN2 stimuliert; C Zellen wurden 24 h mit 100 ng/ml RLF inkubiert; Darstellung der mittleren Migrationsrate \pm SEM von HCE-Zellen nach Stimulation mit RLN2 (D) und RLF (E) im Vergleich zur 24 h Kontrolle mit Serum-freiem Kulturmedium. Der Balken entspricht in Bild A, B und C 300 μm . (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; N=2)

Nach 24 h Inkubation mit 100 ng/ml RLF zeigen HCE-Zellen eine signifikant höhere Migration ($p < 0,05$) als Zellen, die mit Serum-freiem Medium stimuliert werden (siehe Abbildung 14F). Nach Inkubation mit 100 ng/ml RLF und 5 $\mu\text{g/ml}$ Mitomycin C weisen HCE-Zellen eine geringere Schließungsrate auf. Wird mit 100 ng/ml RLF und 5 μM Cytochalasin B stimuliert, lässt sich die Migration deutlich unterdrücken. Die Migrationsrate von HCE-Zellen nach Stimulation mit 30 ng/ml EGF ähnelt dem Migrationsverhalten der Zellen, die mit 100 ng/ml RLF inkubiert werden.

Abschließend wird der Einfluss der Hormone RLN2 und RLF auf die Expression von Matrix Metalloproteinasen (MMP) und deren Inhibitoren (TIMP - Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinasen) untersucht.

4.4 Regulation der MMP- und TIMP-mRNA-Expression

MMP und TIMP werden durch verschiedene Stimulanzen reguliert. In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss der Hormone RLN2 und RLF auf die Regulation der MMP- und TIMP-Expression in der humanen Sebozytenzelllinie (SZ95), in kultivierten konjunktivalen (IOBA-NHC) und kornealen (HCE) Epithelzelllinien mit Hilfe der Real-Time PCR untersucht. Die Normalisierung erfolgte gegen 18S-rRNA-Genexpression.

4.4.1 Regulation der MMP- und TIMP-Genexpression durch RLN2 und RLF in der Sebozytenzelllinie SZ95

Die in Abbildung 15A dargestellten Stimulationsexperimente der humanen Sebozytenzelllinie (SZ95) mit RLN2 und RLF zeigen, dass nur 500 ng/ml RLN2 und 500 ng/ml RLF nach 24 h eine signifikante Erhöhung der relativen MMP2-mRNA-Expression bewirken. RLN2 (100 ng/ml, 500 ng/ml) und RLF (100 ng/ml, 500 ng/ml) haben nach 6h keinen signifikanten Effekt auf die relative MMP2-Expression. Auch 100 ng/ml RLN2 und 100 ng/ml RLF haben nach 24h keinen signifikanten regulatorischen Effekt auf die relative MMP2-Expression.

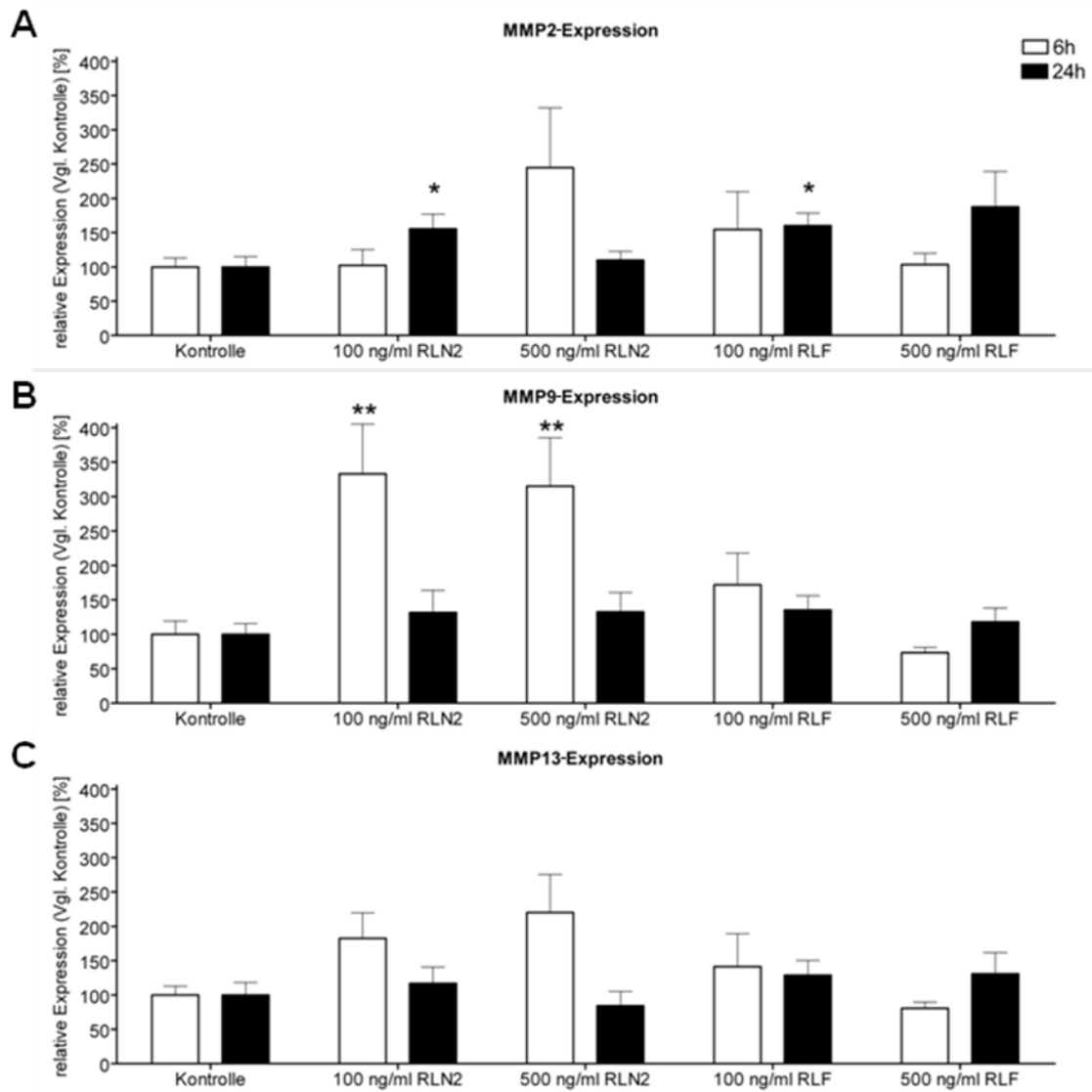


Abb. 15 Relative mRNA-Expression von MMP2 (A), MMP9 (B) und MMP13 (C) nach 6 h und 24 h Stimulationsdauer im Vergleich zur Kontrolle mit Serum-freiem Kulturmedium. Zellen der humanen Sebozytenzelllinie (SZ95) wurden mit 100 ng/ml RLN2, 500 ng/ml RLN2, 100 ng/ml RLF und 500 ng/ml RLF stimuliert. (MW \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; N=3, n=3)

Die Analyse der MMP9-mRNA-Expression (Abbildung 15B) zeigt eine um 300% signifikante Erhöhung nach 6 stündiger Stimulation mit 100 ng/ml und 500 ng/ml RLN2. Dieser Effekt ist nach 24 h aufgehoben, da die MMP9-Expression nicht mehr signifikant erhöht ist. RLF hat keinen signifikanten Effekt auf die relative MMP9-mRNA-Expression.

RLN2 und RLF haben keinen signifikanten Einfluss auf die MMP13-mRNA-Expression weder nach 6 h noch nach 24 h Stimulation (Abbildung 15C).

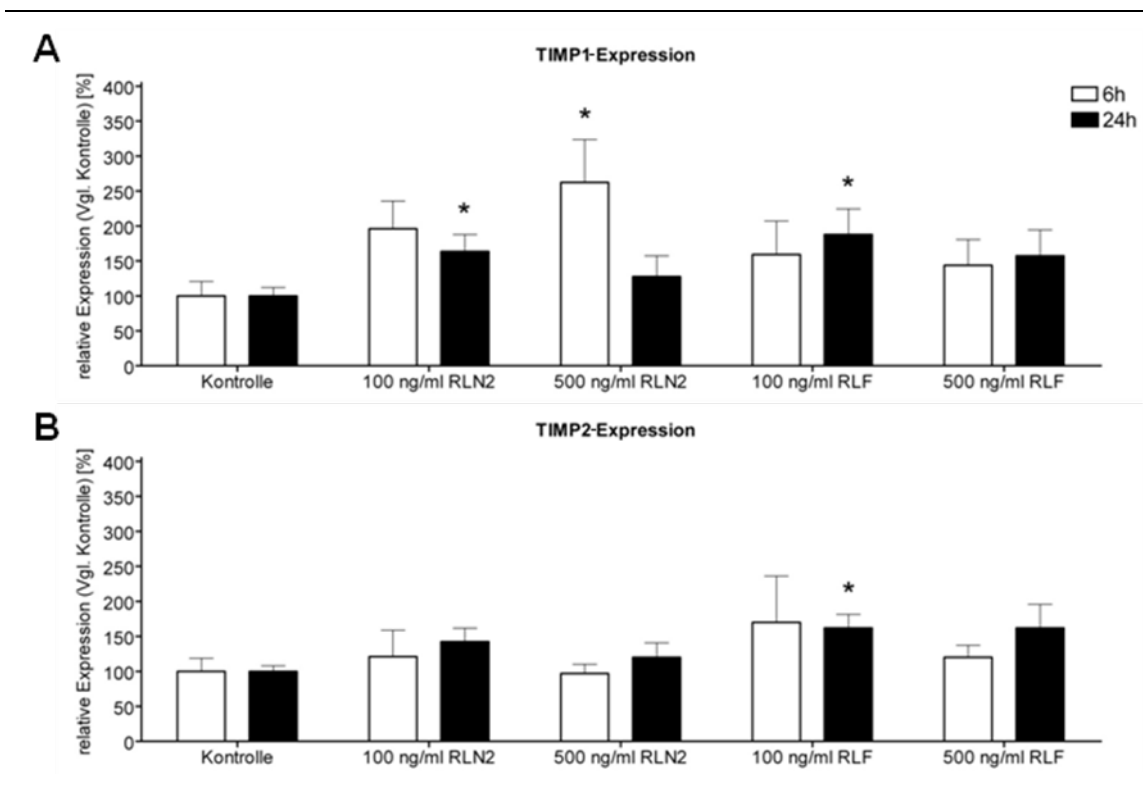


Abb. 16 Relative mRNA-Expression von TIMP1 (A) und TIMP2 (B) nach 6 h und 24 h Stimulationsdauer im Vergleich zur Kontrolle mit Serum-freiem Kulturmedium. Zellen der humanen Sebozytenzelllinie (SZ95) wurden mit 100 ng/ml RLN2, 500 ng/ml RLN2, 100 ng/ml RLF und 500 ng/ml RLF stimuliert. (MW \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; N=3, n=3)

Die TIMP1-Expression steigt erst nach 24 h Stimulation mit 100 ng/ml RLN2 signifikant auf 160% an verglichen mit der Serum-freien Kontrolle (siehe Abbildung 16A). Wird die höhere Stimulationskonzentration von 500 ng/ml RLN2 eingesetzt, zeigt sich ein gegenteiliger Effekt. Eine signifikante Erhöhung der TIMP1-mRNA-Expression auf 260% ist schon nach 6 h sichtbar, danach scheint die Rate wieder abzufallen. Ebenfalls erhöht sich bei der Behandlung mit 100 ng/ml RLF erst nach 24 h die TIMP1-mRNA-Expression signifikant auf etwa 190%. Die höhere Konzentration hat keinen signifikanten Einfluss auf die TIMP1-Expression.

Die Untersuchungen zu TIMP2 ergeben nur eine signifikante Erhöhung auf 160%, wenn 24 h mit 100 ng/ml RLF stimuliert wird (vgl. Abbildung 16B). Andere eingesetzte Konzentrationen und Stimulationszeiten haben keinen signifikanten Einfluss auf die TIMP2-mRNA-Expression.

4.4.2 Regulation der MMP- und TIMP-Genexpression durch RLN2 und RLF in der Konjunktivaepithelzelllinie IOBA-NHC

Die Real-Time Untersuchungen zur MMP2-Expression ergeben eine signifikante Steigerung auf etwa 170% nach 24 h Stimulation mit 100 ng/ml RLN2, zeigen jedoch nach 6 h Inkubationsdauer mit 100 ng/ml RLN2 keinen signifikanten Einfluss (Abbildung 17A).

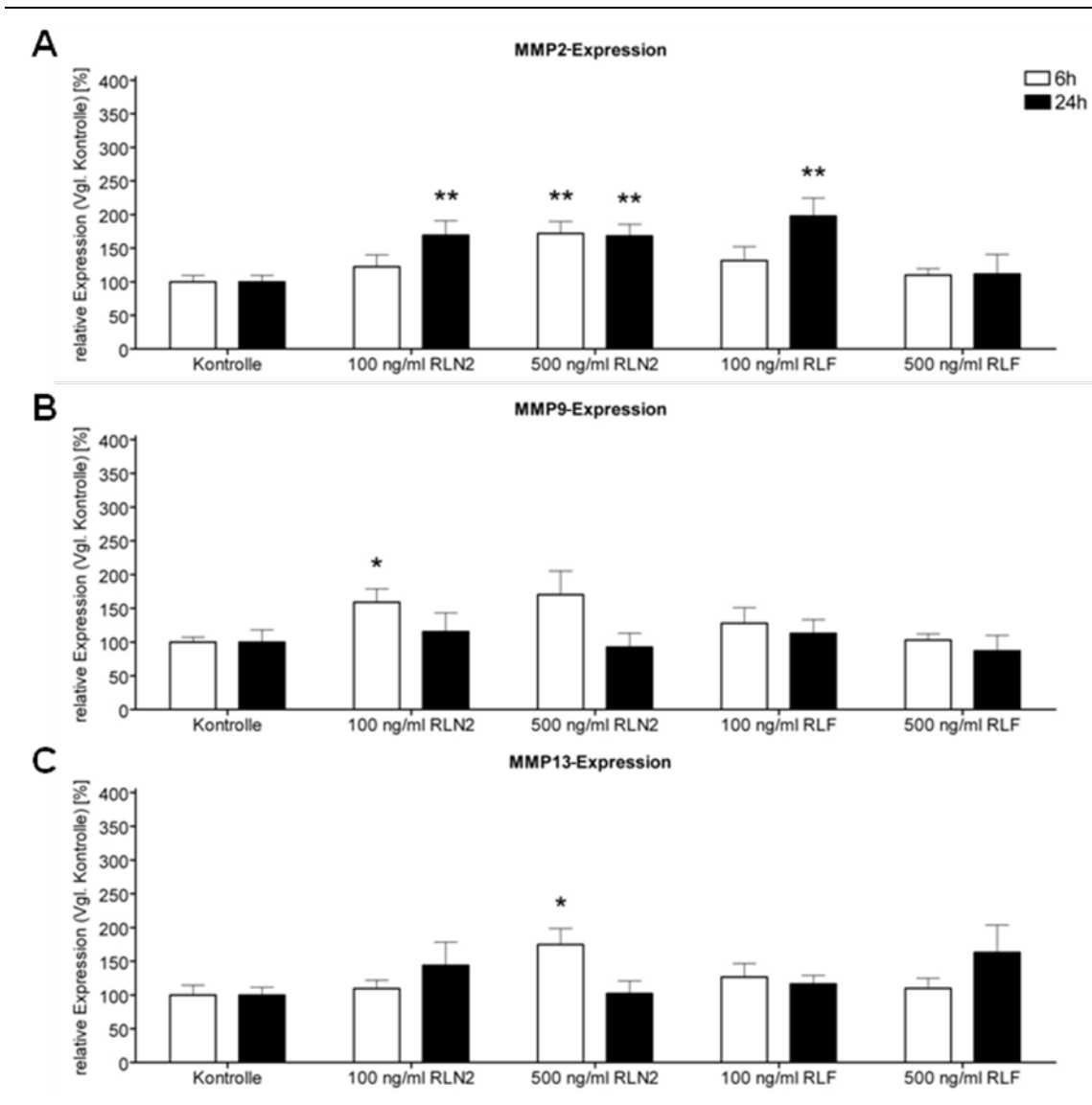


Abb. 17 Relative mRNA-Expression von MMP2 (A), MMP9 (B) und MMP13 (C) nach 6 h und 24 h Stimulationsdauer im Vergleich zur Kontrolle mit Serum-freiem Kulturmedium. Zellen der humanen Konjunktivaepithelzelllinie (IOBA-NHC) wurden mit 100 ng/ml RLN2, 500 ng/ml RLN2, 100 ng/ml RLF und 500 ng/ml RLF stimuliert. (MW \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; N=3, n=3)

Wird 6 h oder 24 h mit 500 ng/ml RLN2 stimuliert, steigt die MMP2-mRNA-Expression auf etwa 170% des Kontrollniveaus an. Die Stimulationsansätze mit RLF detektierten nur nach 24-stündiger Inkubation mit 100 ng/ml RLF eine signifikante Erhöhung der MMP2-Expression auf rund 200%.

Wie in Abbildung 17B dargestellt, wird die MMP9-mRNA-Expression nur durch Stimulation mit 100 ng/ml RLN2 über 6 h signifikant auf 160% gesteigert.

Nur 500 ng/ml RLN2 für 6 h erhöht die MMP13-mRNA-Expression auf rund 175%, nicht jedoch die weiteren Stimulationsansätze mit RLN2 und RLF (Abbildung 17C).

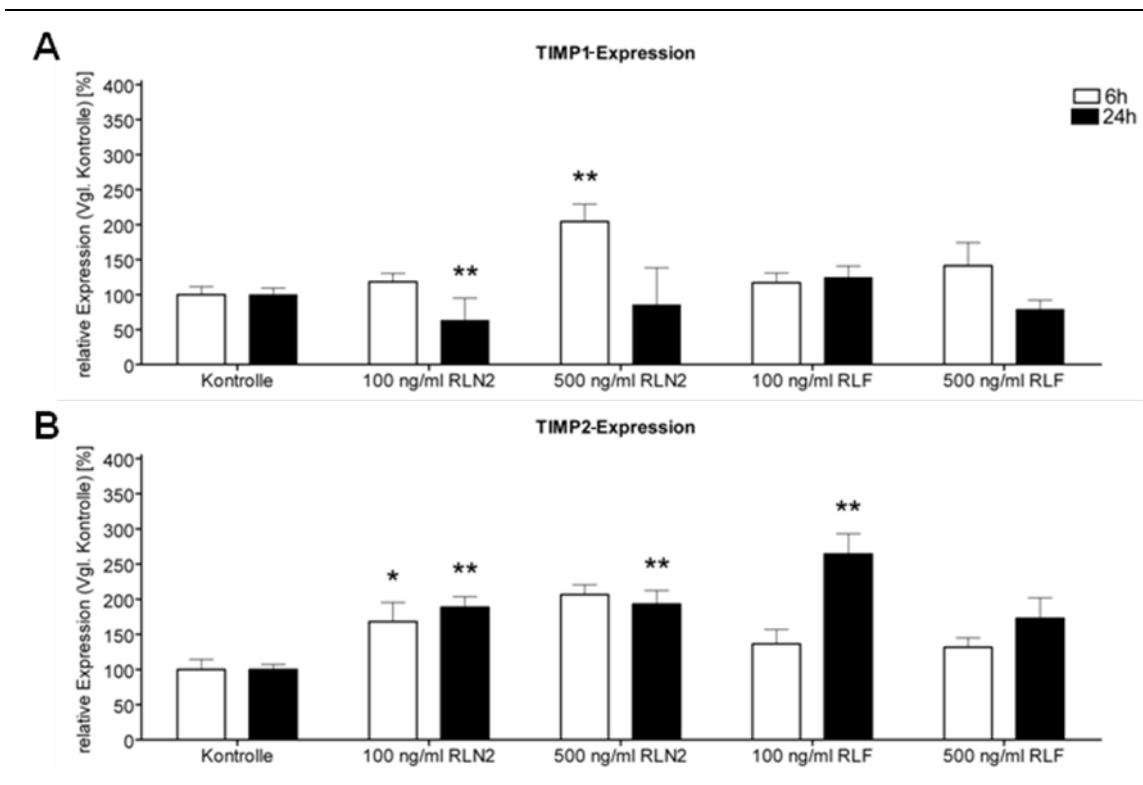


Abb. 18 Relative mRNA-Expression von TIMP1 (A) und TIMP2 (B) nach 6 h und 24 h Stimulationsdauer im Vergleich zur Kontrolle mit Serum-freiem Kulturmedium. Zellen der humanen Konjunktivaepithelzelllinie (IOBA-NHC) wurden mit 100 ng/ml RLN2, 500 ng/ml RLN2, 100 ng/ml RLF und 500 ng/ml RLF stimuliert. (MW \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; N=3, n=3)

Werden Konjunktivaepithelzellen 24 Stunden mit 100 ng/ml RLN2 inkubiert, sinkt die TIMP1-mRNA-Expression auf 60% im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 18A). Keinen Effekt hat die Stimulation mit 100 ng/ml RLN2 für 6 h. Wenn die Konzentration auf 500 ng/ml RLN2 erhöht wird, zeigt sich nach 6 h eine signifikante Steigerung der

Genexpression auf 200%. Eine längere Stimulationsdauer hat keinen signifikanten Effekt ebenso wie die Inkubation mit RLF.

Die TIMP2-mRNA-Expression steigt signifikant nach 6 h Stimulation mit 100 ng/ml bereits auf 170% und erhöht sich weiter auf 190% nach 24 h (siehe Abbildung 18B). Dieser Effekt wird auch mit 500 ng/ml RLN2 über 24 h erzielt, nicht aber bereits nach 6 h. Stimulation mit 100 ng/ml RLF für 24 h steigert die TIMP2-mRNA-Expression auf rund 260%. Im Gegensatz dazu haben 100 ng/ml RLF für 6 h und 500 ng/ml RLF (6 h und 24 h) keinen signifikanten Einfluss auf die TIMP2-mRNA-Expression.

4.4.3 Regulation der MMP- und TIMP-Genexpression durch RLN2 und RLF in der Korneaepithelzelllinie HCE

Untersuchungen an der Korneaepithelzelllinie zur MMP2-mRNA-Expression ergeben keinen signifikanten Einfluss, wenn für 6 h stimuliert wird (Abbildung 19A). Erst nach 24 h kommt es zu einer signifikanten Erhöhung der MMP2-Expression. So steigt die Expression nach Inkubation mit 100 ng/ml RLN2 um 160% und wird noch weiter auf 185% durch Stimulation mit 500 ng/ml RLN2 gesteigert. Sowohl 100 ng/ml als auch 500 ng/ml RLF führen zu einem signifikanten Anstieg der MMP2-mRNA-Expression auf rund 170% im Vergleich zur Kontrolle.

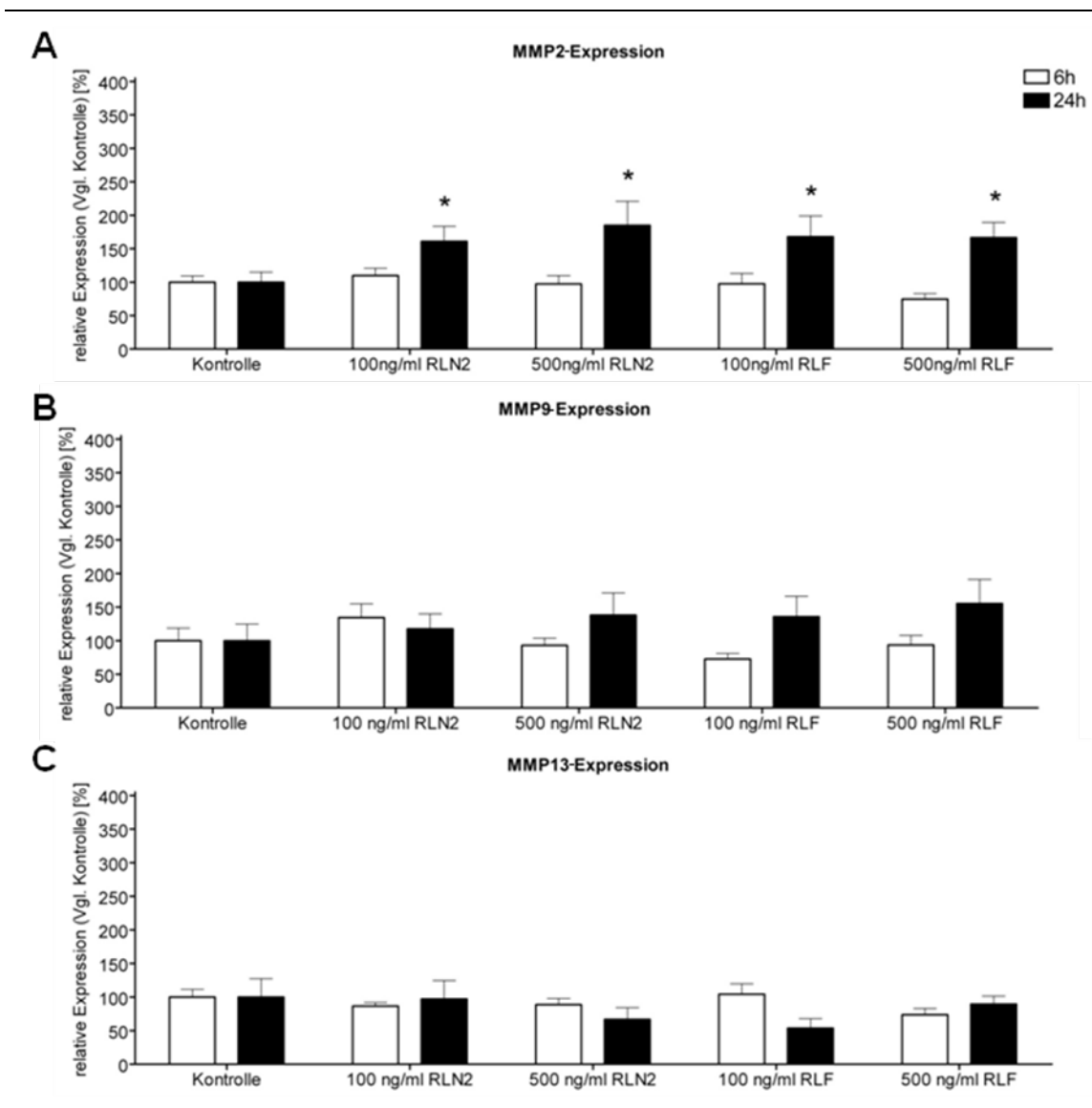


Abb. 19 Relative mRNA-Expression von MMP2 (A), MMP9 (B) und MMP13 (C) nach 6 h und 24 h Stimulationsdauer im Vergleich zur Kontrolle mit Serum-freiem Kulturmedium. Zellen der humanen Korneaepithelzelllinie (HCE) wurden mit 100 ng/ml RLN2, 500 ng/ml RLN2, 100 ng/ml RLF und 500 ng/ml RLF stimuliert. (MW \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; N=3, n=3)

Die Stimulationsexperimente mit RLN2 und RLF zur Analyse der MMP9- und MMP13-mRNA-Expression führen zu keinem signifikanten Ergebnis (Abbildung 19B, C).

Die TIMP1-mRNA-Expression wird vor allem nach 24 h erhöht und zeigt nur nach Stimulation mit 100 ng/ml RLN2 für 6 h eine signifikante Steigerung um 70% (Abbildung 20A). Wird die Inkubationsdauer mit 100 ng/ml RLN2 auf 24 h ausgedehnt, ist eine Steigerung um 95% erkennbar. Wenn die Konzentration auf 500 ng/ml RLN2

für 24 h erhöht wird, beträgt der Anstieg 70%. Werden die Korneaepithelzellen für 24 h mit RLF versetzt, kommt es zu einer Zunahme der TIMP1-mRNA-Expression auf 170% bei 100 ng/ml RLF und auf 150% bei 500 ng/ml RLF.

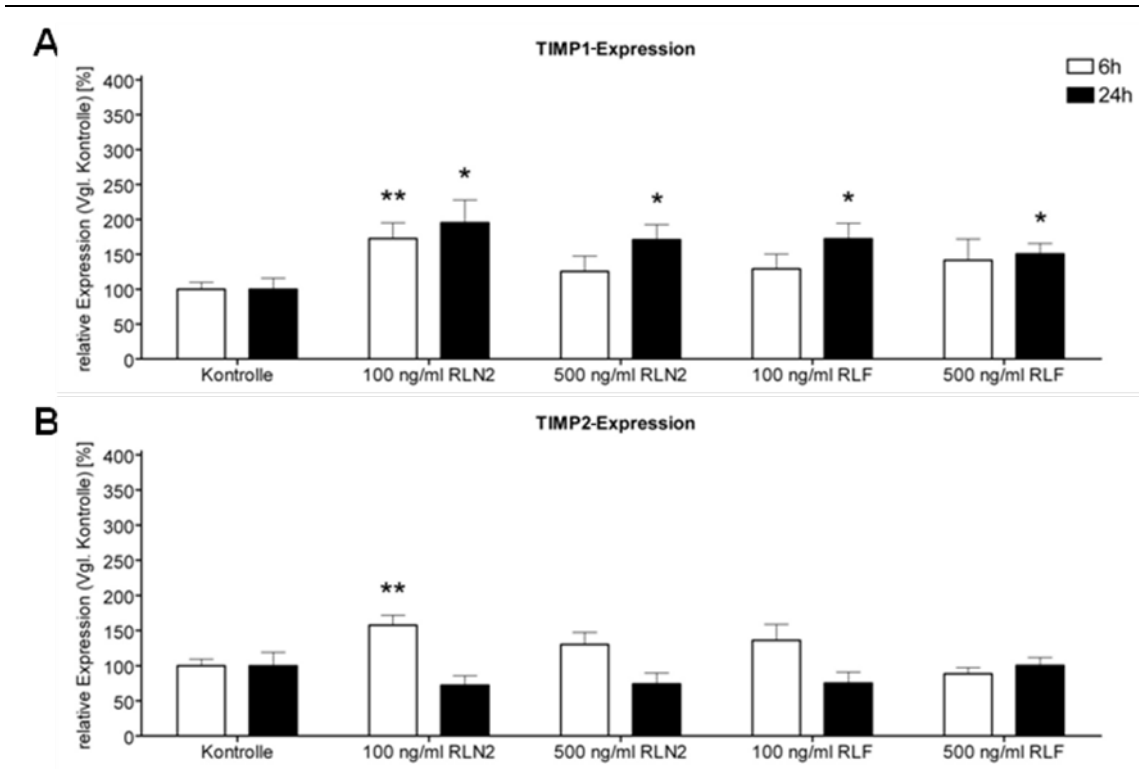


Abb. 20 Relative mRNA-Expression von TIMP1 (A) und TIMP2 (B) nach 6 h und 24 h Stimulationsdauer im Vergleich zur Kontrolle mit Serum-freiem Kulturmedium. Zellen der humanen Korneaepithelzelllinie (HCE) wurden mit 100 ng/ml RLN2, 500 ng/ml RLN2, 100 ng/ml RLF und 500 ng/ml RLF stimuliert. (MW \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; N=3, n=3)

Die TIMP2-mRNA-Expression (vgl. 20B) steigt nur nach Stimulation mit 100 ng/ml RLN2 für 6 h signifikant an. Die weiteren Untersuchungsansätze zeigen keinen signifikanten Einfluss auf die TIMP2-mRNA-Expression von Korneaepithelzellen.

5 Diskussion

5.1 Nachweis von RLN2 und RLF sowie der Rezeptoren LGR7 und LGR8

Aus unterschiedlichen Studien ist bekannt, dass Hormone die Physiologie der Augenoberfläche beeinflussen (Sullivan, 2004). Bislang liegen keine Beschreibungen zu den Hormonen RLN2 und RLF und deren Rezeptoren LGR7 und LGR8 an der Augenoberfläche und den ableitenden Tränenwege vor. Deshalb wurde zunächst mit der Untersuchung der Expression der Hormone und deren Rezeptoren an der Augenoberfläche und den ableitenden Tränenwegen begonnen. Der Nachweis des Hormons RLN2 mittels konventioneller RT-PCR zeigt nur vereinzelt eine Expression auf mRNA-Ebene. Dabei schwankt der Nachweis von 9 % positives Vorkommen in der Tränendrüse bis 60 % positiver Nachweis in der Meibom-Drüse. Bei den primären kornealen Fibroblasten war kein mRNA-Expressionsnachweis möglich. Die Transkriptvarianten 1 und 2 können in allen positiven Tränendrüsen, Meibom-Drüsen und ableitenden Tränenwegen detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigen alle positiven Konjunktivae und Korneae nur die Transkriptvariante 1. Bisher ist bekannt, dass die Prostata beide Transkriptvarianten exprimiert (Gunnarsen *et al.*, 1996). Alternatives Splicing führt zur Inkorporation eines zusätzlichen 101 bp langen Exons in der C-Peptidregion. Dadurch entsteht ein Stopcodon in der C-Kette, sodass das Relaxin-Peptid nur aus einer B-Kette besteht. Die Funktion der Transkriptvariante 1 ist unbekannt (Gunnarsen *et al.*, 1996). Zu den Patienten liegen nur wenige Daten vor. Eine altersspezifische Expression ist nicht erkennbar. Jedoch ist auffällig, dass alle positiv getesteten Gewebe von weiblichen Spendern stammen. Allerdings kommt nur eine Minderheit der untersuchten Gewebe von männlichen Personen und somit ist eine Aussage zur Geschlechtsverteilung nur bedingt möglich. Eventuell liegt in den Geweben der Augenoberfläche und der ableitenden Tränenwegen, die RLN2 exprimieren, eine krankhafte Veränderung vor. Hinweise auf ein abweichendes Expressionsmuster in normalen, hyperplastischen oder neoplastischen Geweben konnte die Gruppe um Hombach-Klonisch geben. Sie konnte eine Expression von RLN2 in Schilddrüsenkarzinomen, jedoch nicht in normalem beziehungsweise hyperplastischem Schilddrüsenengewebe nachweisen (Hombach-Klonisch *et al.*, 2006). In neoplastischen Brustdrüsengeweben sind Transkripte beider Relaxin-Isoformen gegenüber den Normalgeweben deutlich vermehrt (Tashima *et al.*, 1994). Brustkrebspatientinnen zeigen erhöhte Relaxin-Serumspiegel (Binder *et al.*, 2004). Da RLN2 auf mRNA-Ebene sporadisch nachweisbar ist, muss eine Bildung des Hormons

an anderer Stelle im Organismus und ein Transport über den Blutweg an die Augenoberfläche in Betracht gezogen werden. Dafür spricht, dass Insulin, das strukturelle Ähnlichkeit mit RLN2 besitzt, ebenfalls über den Blutweg an die Augenoberfläche transportiert wird und in die Tränenflüssigkeit sekretiert wird (Rocha *et al.*, 2002). Auch ist von Relaxin bekannt, dass es im Serum zirkuliert (Bryant, 1972; Steinetz *et al.*, 2005) und in Körperflüssigkeiten abgegeben werden kann. Bei Frauen konnte RLN2 im Kollostrum, in der Flüssigkeit von Zysten bei Mammadysplasie und im Plasma einer Patientin mit großem Fibroadenom der Mamma nachgewiesen werden (Nardi, 1983). Mit Hilfe eines Enzymimmunoassays konnten RLN2-Konzentrationen im Urin gemessen werden (Heringlake *et al.*, 2004; Steinetz *et al.*, 2005). RLN2 könnte wie Insulin eine endokrine Wirkung besitzen.

Der gleiche Mechanismus ist auch für das Hormon RLF denkbar. Auch hier war der mRNA-Nachweis in der vorliegenden Arbeit nur sporadisch möglich. RLF konnte in normalem Schilddrüsengewebe nicht nachgewiesen werden, jedoch in hyperplastischen und neoplastischen Schilddrüsengewebe (Hombach-Klonisch *et al.*, 2003). Weiterhin zeigte die Gruppe um Hombach-Klonisch, dass RLF sowohl in normalen, also auch in neoplastischem Brustdrüsenepithel exprimiert wird. Interessanterweise ist immunoreaktives RLF in neoplastischen Epithelzellen duktaler und lobulärer Mammakarzinome verstärkt nachweisbar (Hombach-Klonisch *et al.*, 2000). Die RLF-Expression scheint in der humanen Brustdrüse stark posttranskriptionell modifiziert zu werden, da im Vergleich zu normalem Brustdrüsenepithel RLF-mRNA-Expression in Epithelien duktaler und lobulärer Mammakarzinome reduziert ist, jedoch der immunologische Nachweis von RLF-Protein in diesen neoplastischen Epithelien eine vermehrte RLF-Proteinproduktion zeigt (Hombach-Klonisch *et al.*, 2000). RLF könnte auch an der Augenoberfläche dieser posttranskriptionellen Modifikation unterliegen.

In den Zelllinien konnte die mRNA-Expression beider Hormone gezeigt werden. Damit stehen geeignete Modelle für *in vitro* Untersuchungen zur Verfügung.

Die Detektion des LGR7 Rezeptors in 20 % der untersuchten Tränendrüsen, 60 % der Meibom-Drüsen, in 67 % der Konjunktivae und 40 % der Korneae sowie 100 % der primären kornealen Fibroblasten und 75 % der ableitenden Tränenwege spricht für eine konstitutive Expression des Rezeptors an der Augenoberfläche. Da RLN2 als einziger Ligand für den Rezeptor LGR7 bekannt ist (Sherwood, 2004), scheint das Hormon einen Einfluss auf Gewebe der Augenoberfläche zu haben. Eine differenzielle Expression des LGR7 Rezeptors in Bezug auf Alter und Geschlecht ist nicht ersichtlich. Der Proteinnachweis an Gewebeschnitten mittels Immunhistochemie gelang nur in den Meibom-Drüsen und in wenigen der untersuchten ableitenden Tränenwegen. Die

Detektion könnte durch Epitopenmaskierungen erklärt werden. In den Zelllinien HCE, IOBA-NHC und SZ95 war ein Nachweis möglich, so dass diese Zelllinien für *in vitro* Untersuchungen geeignet scheinen.

Die Ergebnisse zum Nachweis des Rezeptors LGR8 belegen eine ebenfalls konstitutive Expression in der Tränendrüse (73%), der Meibom-Drüse (100%), der Konjunktiva (50%) und Kornea (64%), den primären kornealen Fibroblasten (100%) sowie in den ableitenden Tränenwegen (75%). Aufgrund der limitierten Heterogenität der Stichprobe ist eine Abhängigkeit der Rezeptorexpression vom Alter beziehungsweise Geschlecht nicht möglich. Bereits bekannt ist die Expression des LGR8 Rezeptors im weiblichen und männlichen Reproduktionstrakt, im Gehirn, in der Schilddrüse, in der Niere und in der Muskulatur (Bathgate *et al.*, 2006). Die Liganden RLF und RLN2 könnten durch diesen Rezeptor ihren Einfluss auf die Augenoberfläche ausüben.

Die Befunde zur differenziellen Expression Relaxin-artiger Peptide in den Geweben der Augenoberfläche und der ableitenden Tränenwegen gaben den Anlass, die zelluläre Wirkung der beiden Peptide in der humanen Sebozytenzelllinie (SZ95), Konjunktiva- (IOBA-NHC) und Korneaepithelzelllinie (HCE) und deren Bedeutung an der Augenoberfläche zu untersuchen. Auf die Ergebnisse dieser Untersuchungen zur Rolle Relaxin-artiger Peptide wird in den folgenden Teilen dieser Arbeit eingegangen.

5.2 RLN2 und RLF steigern die Proliferationsfähigkeit der Epithelzelllinien IOBA-NHC und HCE

Die Hormone RLN2 und RLF erhöhen die Proliferationsrate von SZ95-, IOBA-NHC- und HCE-Zellen. Eine dosisabhängige Steigerung der Proliferation ist bei der Stimulation von IOBA-NHC-Zellen mit RLF zu beobachten. RLF sorgt durch die Proliferationssteigerung der Zellen des Gubernaculum testis für den Descensus des Hodens im Mausmodell (Kumagai *et al.*, 2002). Ebenso proliferieren humane Osteoblasten dosisabhängig, wenn sie mit RLF stimuliert werden (Ferlin *et al.*, 2008). Amnionepithelzellen proliferieren unter 5-tägiger RLN2-Inkubation signifikant (Millar *et al.*, 2003).

RLN2 und RLF haben keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von primären kornealen Fibroblasten. Samuel *et al.* berichten, dass RLN2 auf die Proliferation von kardialen Fibroblasten auch keinen signifikanten Einfluss zeigt (Samuel *et al.*, 2004). Ähnliches wird von der PC-3 Prostata-Karzinomzelllinie berichtet, bei der RLF ebenso keinen Effekt auf die Proliferation hat (Klonisch *et al.*, 2005).

Zusammenfassend ist die Steigerung der Proliferationsrate gerade in Epithelien im Rahmen der Wundheilung von Bedeutung. So könnte der proliferative Effekt auf Kornea- und Konjunktivaepithelzelllinien im Hinblick auf den Ersatz geschädigter Zellen an der Augenoberfläche interessant sein.

5.3 RLN2 und RLF steigern die Migrationsrate der Epithelzelllinien IOBA-NHC und HCE

Einige Autoren berichten, dass RLN2 und RLF die Motilität steigern. Im Bericht von Wyatt *et al.* erhöht RLN2 die Schlussrate von bronchialen Epithelzellen in einem Wundschlussmodell (Wyatt *et al.*, 2002). Der migrationsfördernde Effekt wird vor allem bei Karzinomen beobachtet. RLN2 steigert signifikant die Motilität von humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinien (Hombach-Klonisch *et al.*, 2006). Die Motilität von PC-3 Prostata-Karzinomzellen wird durch RLF konzentrationsabhängig erhöht (Klonisch *et al.*, 2005). Auch die Motilität der HCE- und IOBA-NHC-Zellen wird durch RLN2 und RLF signifikant gesteigert. Der beobachtete Mechanismus macht RLN2 und RLF für die Wundheilung an der Augenoberfläche interessant.

5.4 Regulation der MMP- und TIMP-mRNA-Expression

Relaxin hat modulierenden Einfluss auf das Bindegewebe unter anderem durch Induktion von Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und Inhibition von Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinasen (TIMPs). MMPs sind eine Gruppe von Enzyme, die das extrazelluläre Gewebe degradieren können und somit den Um- und Abbau von Bindegewebe beeinflussen. Natürliche Gegenspieler der MMPs sind die TIMPs. In humanen dermalen Fibroblasten stimuliert Relaxin die MMP1 mRNA- und Proteinexpression, verringert die TIMP Expression sowie die Kollagensekretion (Unemori *et al.*, 1990). Unemori und Kollegen konnten für humane Lungenfibroblasten eine erhöhte Expression von MMP1 durch RLN2 zeigen (Unemori *et al.*, 1996). In humanen Fibroblasten des unteren Uterussegments stimuliert RLN2 die mRNA- und Proteinexpression von MMP1, MMP2 und MMP3 und hemmt hingegen die Proteinbildung von TIMP1 (Palejwala *et al.*, 2001). RLN2 induziert in renalen Fibroblasten den extrazellulären Matrixabbau durch Induktion von MMP2 und MMP9 (Heeg *et al.*, 2006). Relaxin ist in der Lage Leberfibrose bei Ratten durch verringerte

Kollagensynthese und erniedrigte TIMP1- und TIMP2-Expression abzuschwächen (Williams *et al.*, 2001).

Eine wichtige Rolle spielen diese Proteinasen auch an der Augenoberfläche bei der Wundheilung, der Erkrankung des Trockenen Auges und kornealer Neovaskularisation sowie der Entstehung von Hornhautulzera, Pterygium und Chalazion (Kim *et al.*, 2004). MMP2 wird in normalen Korneae von Ratten exprimiert und wird während der Wundheilung heraufreguliert. Deshalb wird für MMP2 eine wichtige Rolle im Turnover von extrazellulärer Matrix und im Umbau von normaler und verletzter Kornea diskutiert (Ye *et al.*, 2000). Laut dem Bericht von Azar und Kollegen scheint MMP2 in der späteren Phase der Wundheilung eine Rolle zu spielen (Azar *et al.*, 1996). RLN2 und RLF erhöhen im Wesentlichen nach 24 h die MMP2-mRNA-Produktion von SZ95-, IOBA-NHC- und HCE-Zellen. Damit ist an eine physiologische Unterstützung der Wundheilung vor allem in der späteren Phase durch RLN2 und RLF zu denken.

Im Gegensatz dazu wird MMP9 nur in basalen Zellreihen des Korneaepithels von verletzten Korneae beobachtet. Hier ist zu beachten, dass die Expression 6 h nach der Verletzung detektiert werden kann und einen Spitzenwert am 1.-3. Tag erreicht, jedoch ab Tag 7 die Detektion nicht mehr möglich ist. Daraus wird für MMP9 eine vorrangige Rolle in der Epithelisation nach Korneaverletzungen abgeleitet (Ye *et al.*, 2000). Die MMP9-mRNA-Expression der Korneaepithelzelllinie wird durch RLN2 und RLF nicht beeinflusst. In IOBA-NHC-Zellen ist eine signifikante Steigerung der MMP9-Expression nur nach 6 h 100 ng/ml RLN2 zu verzeichnen. Jedoch erhöht die Stimulation mit RLN2 die MMP9-Expression nach 6 h in der Sebozytenzelllinie. Diese könnten MMP9 an die Tränenflüssigkeit abgeben und somit könnte MMP9 an der Augenoberfläche verteilt werden. Damit wäre eine lokale Wirkung an der beschädigten Kornea möglich.

Ye und Kollegen diskutieren, dass MMP13 an der Reepithelisation der verletzten Kornea beteiligt ist, da es nur in verletzten Korneae während der Wundheilung detektiert werden kann (Ye *et al.*, 2000). Höhere RLN2-Konzentrationen führen bei IOBA-NHC-Zellen zum Anstieg der MMP13-mRNA-Expression nach 6 h. Insgesamt scheinen RLN2 und RLF jedoch kaum Einfluss auf die MMP13-Expression von SZ95-, HCE- und IOBA-NHC-Zellen zu haben. Dies korrespondiert mit Untersuchungen an Kupffer-Sternzellen der Leber, bei denen RLN2 ebenfalls nicht die MMP13-mRNA-Konzentration ändert (Williams, 2000).

TIMP1 inhibiert MMP9, indem es MMP9 mit hoher Affinität bindet (Woessner, 1994). RLN2 und RLF steigern die TIMP1-mRNA-Expression vor allem nach 24 h. Durch die verzögerte Expression von TIMP1, kann TIMP1 den Effekt von MMP9 in der späteren Phase der Wundheilung abschwächen. Da für MMP9 eine wichtige Rolle in der

Epithelisation in der frühen Phase der Wundheilung zugesprochen wird (Ye *et al.*, 2000), könnte TIMP1 eine überschießende Epithelisation verhindern.

Durch eine hohe Affinität zu MMP2 inhibiert TIMP2 MMP2 (Woessner, 1994). Die TIMP2-Expression wird durch RLN2 und RLF insbesondere bei IOBA-NHC-Zellen nach 24 h gesteigert. Zum selben Zeitpunkt ist auch die MMP2-Expression erhöht. Da MMP2 konstitutiv exprimiert wird (Ye *et al.*, 1998), ist ebenfalls eine konstitutive Expression von TIMP2 vorstellbar. So kann der Um- und Abbau der extrazellulären Matrix differentiell gesteuert werden.

5.5 Schlussfolgerung

Durch die Zusammenfassung der Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass RLN2 und RLF durch ihre proliferations- und migrationssteigernden Wirkungen, sowie durch die Beeinflussung von MMP- und TIMP-Genexpression einen positiven Effekt auf die Wundheilung zu haben scheinen. Dafür spricht auch, dass in der Schwangerschaft das Auge besonders immuntolerant ist und beispielsweise autoimmune Erkrankungen abgeschwächt sind. Denn vor allem in der Schwangerschaft liegen höhere RLN2-Spiegel vor (Sherwood, 2004). Möglicherweise unterstützt RLN2 dieses Phänomen.

5.6 Ausblick

Zunächst müssen weitere Untersuchungen zur Rezeptoraktivierung durch RLN2 und RLF an der Augenoberfläche und Toxizitätsanalysen der Hormone an Zellen der Augenoberfläche durchgeführt werden. Die erbrachten Ergebnisse stellen nur ein Anfang dar und müssten in größerem Umfang quantifiziert werden. Die Gruppe um Dschietzig zeigte, dass RLN2 an den Glukokortikoidrezeptor binden kann (Dschietzig *et al.*, 2005). Gerade im Hinblick auf die Wundheilung ist es interessant herauszufinden, ob RLN2 auch an der Augenoberfläche ein Ligand der Glukokortikoidrezeptoren ist. Falls RLN2 als Therapeutikum im Rahmen der Wundheilung in Betracht kommt, müssen Wundheilungsmodelle an Tieren angestrebt werden. Kortisonhaltige Augentropfen werden bei vielen Entzündungen der Augenoberfläche verordnet. Wenn RLN2 ebenfalls den Glukokortikoidrezeptor aktiviert, ist es möglich, RLN2 den kortisonhaltigen Augentropfen zuzusetzen oder Kortison durch RLN2 zu ersetzen.

6 Zusammenfassung

Die Augenoberfläche unterliegt dem Einfluss verschiedener Hormone. Zur Funktion der Hormone Relaxin 2 (RLN2) und Relaxin-like Faktor (RLF) sowie der Rezeptoren LGR (leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor) 7 und LGR8 liegen bislang keine Untersuchungen an der Augenoberfläche und den ableitenden Tränenwegen vor. Deshalb wird in der vorliegenden Arbeit zunächst mit der Expressionsanalyse zu RLN2 und RLF und den Rezeptoren LGR7 und LGR8 begonnen. Anschließend erfolgen Untersuchungen zum Proliferations- und Migrationsverhalten der humanen Sebozyten- (SZ95), Kornea- (HCE) und Konjunktivaepithelzelllinien (IOBA-NHC) sowie zur Expression von Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und Tissue Inhibitors of MMP (TIMPs) in den Zelllinien.

Nur in einzelnen Proben kann die mRNA von RLN2 und RLF in Geweben der Augenoberfläche nachgewiesen werden. Der mRNA-Nachweis von LGR7 und LGR8 gelingt in untersuchten Geweben und in der Sebozyten-, Korneaepithel- und Konjunktivaepithelzelllinie. LGR7-Protein kommt in der Meibom-Drüse und in einzelnen Proben der ableitenden Tränenwege sowie in den 3 Zelllinien vor. RLN2 und RLF steigern die Proliferations- und Migrationsraten von IOBA-NHC- und HCE-Zellen. SZ95-, HCE- und IOBA-NHC-Zellen zeigen eine Regulation der MMP- und TIMP-Expression nach Stimulation mit RLN2 und RLF.

RLN2 und RLF werden unter physiologischen Bedingungen nicht an der Augenoberfläche und den ableitenden Tränenwegen gebildet. Eine Produktion in anderen Geweben mit anschließendem Transport über den Blutstrom zur Augenoberfläche muss in Betracht gezogen werden. RLN2 und RLF könnten über die Rezeptoren LGR7 und LGR8 ihre Wirkung auf die Augenoberfläche ausüben. Die endokrinen Effekte bestehen in einer signifikanten Steigerung der Proliferation und Migration von Epithelzelllinien der Konjunktiva und der Kornea. Die Beeinflussung der MMP- und TIMP-Genexpression durch RLN2 und RLF untermauert die Hypothese, dass die beiden Hormone die Wundheilung nach Schädigung der Augenoberfläche fördern.

7 Literaturverzeichnis

Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, Hayashi K, Watanabe H, Tano Y, Handa H (1995) An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:614–621

Azar D T, Hahn T W, Jain S, Yeh Y C, Stetler-Stevensen W G (1996) Matrix metalloproteinases are expressed during wound healing after excimer laser keratectomy. *Cornea* 15:18-24

Bamberger A M, Ivell R, Balvers M, Kelp B, Bamberger C M, Riethdorf L, Loning T (1999) Relaxin-like factor (RLF): a new specific marker for Leydig cells in the ovary. *Int J Gynecol Pathol* 18:163-168

Bathgate R A, Ivell R, Sanborn B M, Sherwood O D, Summers R J (2006) International Union of Pharmacology LVII: recommendations for the nomenclature of receptors for relaxin family peptides. *Pharmacol Rev* 58:7-31

Bigazzi M, Nardi E, Bruni P, Petrucci F (1980) Relaxin in human decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 51:939–941

Binder C, Simon A, Binder L, Hagemann T, Schulz M, Emons G, Trumper L, Einspanier A (2004) Elevated concentrations of serum relaxin are associated with metastatic disease in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 87:157-166

Bryant G B (1972) The detection of relaxin in porcine, ovine and human plasma by radioimmunoassay. *J Endocrinol* 91:1113-1117

Diebold Y, Calonge M, Enriquez de Salamanca A, Callejo S, Corrales RM, Sáez V, Siemasko K F, Stern M E (2003) Characterization of a spontaneously immortalized cell line (IOBA-NHC) from normal human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:4263–4274

Dschietzig T, Richter C, Bartsch C, Laule M, Armbruster F P, Baumann G, Stangl K (2001) The pregnancy hormone relaxin is a player in human heart failure. *Faseb J* 15:2187-2195

Dschietzig T, Bartsch C, Greinwald M, Baumann G, Stangl K (2005) The pregnancy hormone relaxin binds to and activates the human glucocorticoid receptor. *Ann N Y Acad Sci* 1041:256-271

Dschietzig T, Bartsch C, Baumann G, Stangl K (2006) Relaxin-a pleiotropic hormone and its emerging role for experimental and clinical therapeutics. *Pharmacol Ther* 112:38-56

Essig M, Schoenfeld C, D'Eletto R T, Amelar R, Steinetz B G, O'Byrne E M, Weiss G (1982) Relaxin in human seminal plasma. *Ann N Y Acad Sci* 380:224–230

Ferlin A, Pepe A, Giancesello L, Garolla A, Feng S, Giannini S, Zaccolo M, Faccioli A, Morello R, Agoulnik A I, Foresta C (2008) Mutations in the insulin-like factor 3 receptor are associated with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 23:683-693

Gunnarsen J M, Fu P, Roche P J, Tregear GW (1996) Expression of human relaxin genes: characterization of a novel alternatively-spliced human relaxin mRNA species. *Mol Cell Endocrinol* 118:85–94

Heeg M H, Koziolk M J, Vasko R, Schaefer L, Sharma K, Muller G A, Strutz F (2005) The antifibrotic effects of relaxin in human renal fibroblasts are mediated in part by inhibition of the Smad2 pathway. *Kidney Int* 68:96-109

Heringlake M, Heide C, Bahlmann L, Eichler W, Pagel H, Schmucker P, Wergeland R, Armbruster F P, Klaus S (2004) Effects of tilting and volume loading on plasma levels and urinary excretion of relaxin, NT-pro-ANP, and NT-pro-BNP in male volunteers. *J Appl Physiol* 97:173-179

Hombach-Klonisch S, Buchmann J, Sarun S, Fischer B, Klonisch T (2000) Relaxin-like factor (RLF) is differentially expressed in the normal and neoplastic human mammary gland. *Cancer* 89:2161-2168

Hombach-Klonisch S, Seeger S, Tscheudschilsuren G, Buchmann J, Huppertz B, Seliger G, Fischer B, Klonisch T (2001) Cellular localization of human relaxin-like factor in the cyclic endometrium and placenta. *Mol Hum Reprod* 7:349-356

Hombach-Klonisch S, Hoang-Vu C, Kehlen A, Hinze R, Holzhausen H J, Weber E, Fischer B, Dralle H, Klonisch T (2003) INSL-3 is expressed in human hyperplastic and neoplastic thyrocytes. *Int J Oncol* 22:993-1001

Hombach-Klonisch S, Bialek J, Trojanowicz B, Weber E, Holzhausen H J, Silvertown J D, Summerlee A J, Dralle H, Hoang-Vu C, Klonisch T (2006) Relaxin enhances the oncogenic potential of human thyroid carcinoma cells. *Am J Pathol* 169:617-32

Hudson P, John M, Crawford R, Haralambidis J, Scanlon D, Gorman J, Tregear G, Shine J, Niall H (1984) Relaxin gene expression in human ovaries and the predicted structure of a human preprorelaxin by analysis of cDNA clones. *EMBO J* 3:2333-2339

Hsu S Y, Nakabayashi K, Nishi S, Kumagai J, Kudo M, Sherwood O D, Hsueh A J (2002) Activation of orphan receptors by the hormone relaxin. *Science* 295:671-674

Ivell R, Hunt N, Khan-Dawood F, Dawood M Y (1989) Expression of the human relaxin gene in the corpus luteum of the menstrual cycle and in the prostate. *Mol Cell Endocrinol.* 66:251-255

Ivell R, Balvers M, Domagalski R, Ungefroren H, Hunt N, Schulze W (1997) Relaxin-like factor: a highly specific and constitutive new marker for Leydig cells in the human testis. *Mol Hum Reprod* 3:459-466

Jeyabalan A, Novak J, Danielson L A, Kerchner L J, Opett S L, Conrad K P (2003) Essential role for vascular gelatinase activity in relaxin-induced renal vasodilation, hyperfiltration, and reduced myogenic reactivity of small arteries. *Circ Res* 93:1249-1257

Kim H S, Shang T, Chen Z, Pflugfelder S C, Li D Q (2004) TGF-beta1 stimulates production of gelatinase (MMP-9), collagenases (MMP-1, -13) and stromelysins (MMP-3, -10, -11) by human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* 79:263-274

Klonisch T, Muller-Huesmann H, Riedel M, Kehlen A, Bialek J, Radestock Y, Holzhausen H J, Steger K, Ludwig M, Weidner W, Hoang-Vu C, Hombach-Klonisch S (2005) INSL3 in the benign hyperplastic and neoplastic human prostate gland. *Int J Oncol* 27:307-15

Kumagai J, Hsu S Y, Matsumi H, Roh J S, Fu P, Wade J D, Bathgate R A, Hsueh A J (2002) INSL3/Leydig insulin-like peptide activates the LGR8 receptor important in testis descent. *J Biol Chem* 277:31283-31286

Krusche C A, Kroll T, Beier H M, Classen-Linke I (2007) Expression of leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors in the human cyclic endometrium. *Fertil Steril* 87:1428-1437

Lang G K: *Augenheilkunde*. 4. Aufl. Thieme, Stuttgart, 2008, 19-21, 53-56, 71-72, 121-124

Lekgabe E D, Kiriazis H, Zhao C, Xu Q, Moore X L, Su Y, Bathgate R A, Du X J, Samuel C S (2005) Relaxin reverses cardiac and renal fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 46:412-418

Li Q Q, Wang W J, Xu G P, Cao X X, Xu J D, Chen Q, Tang F, Xu Z D (2007) [CD147 and matrix metallo-proteinase (MMP) 2 and MMP9 expression in multidrug resistant breast cancer cells treated with P-glycoprotein substrate drugs]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 36:247-252

Lüllmann-Rauch: *Histologie*. 2. Aufl. Thieme, Stuttgart, 2006, 566-592

Millar L K, Reiny R, Yamamoto S Y, Okazaki K, Webster L, Bryant-Greenwood G D (2003) Relaxin causes proliferation of human amniotic epithelium by stimulation of insulin-like growth factor-II. *Am J Obstet Gynecol* 188:234-241

Nardi E B M, Agrimonti F, Dogliotti L, Massi G B, Ferrari A M, Ciardetti P, DeLuca V, Angeli A Relaxin and fibrotic disease of the mammary gland. In: Bigazzi M, Greenwood F C, Gasparri F (ed): *Biology of relaxin and its role in the human*. Excerpta Medica, Amsterdam, 1983

Palejwala S, Stein D E, Weiss G, Monia B P, Tortoriello D, Goldsmith L T (2001) Relaxin positively regulates matrix metalloproteinase expression in human lower uterine segment fibroblasts using a tyrosine kinase signaling pathway. *Endocrinology* 142:3405-3413

Pfaffl M W (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45

Rieck P W, Sherif Z, Hartmann C, Pleyer U (2003) Wundheilung der Hornhaut Teil I: Biologische Grundlagen und ihre klinische Relevanz. *Ophthalmologie* 100:749-770

Rocha E M, Cunha D A, Carneiro E M, Boschero A C, Saad M J, Velloso L A (2002) Identification of insulin in the tear film and insulin receptor and IGF-1 receptor on the human ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:963-967

Sachsenweger M: *Duale Reihe: Augenheilkunde*. 2. Aufl. Thieme, Stuttgart, 2002, 12-14, 38-40, 73-75, 100-102

Sakbun V, Ali S M, Greenwood F C, Bryant-Greenwood G D (1990) Human relaxin in the amnion, chorion, decidua parietalis, basal plate, and placental trophoblast by immunocytochemistry and northern analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 70:508–514

Samuel C S, Unemori E N, Mookerjee I, Bathgate R A, Layfield S L, Mak J, Tregear G W, Du X J (2004) Relaxin modulates cardiac fibroblast proliferation, differentiation, and collagen production and reverses cardiac fibrosis in vivo. *Endocrinology* 145:4125-4133

Sherwood O D (2004) Relaxin's physiological roles and other diverse actions. *Endocr Rev* 25:205-234

Steinetz B G, Brown J L, Roth T L, Czekala N (2005) Relaxin concentrations in serum and urine of endangered species: correlations with physiologic events and use as a marker of pregnancy. *Ann N Y Acad Sci* 1041:367-378 Review

Struckmann K, Mertz K, Steu S, Storz M, Staller P, Krek W, Schraml P, Moch H (2008) pVHL co-ordinately regulates CXCR4/CXCL12 and MMP2/MMP9 expression in human clear-cell renal cell carcinoma. *J Pathol* 214:464-471

Sullivan D A (2004) Tearful relationships? Sex, hormones, the lacrimal gland, and aqueous-deficient dry eye. *Ocul Surf* 2:92-123

Tashima L S, Mazoujian G, Bryant-Greenwood G D (1994) Human relaxins in normal, benign and neoplastic breast tissue. *J Mol Endocrinol* 12:351-364

Unemori E N, Amento E P (1990) Relaxin modulates synthesis and secretion of procollagenase and collagen by human dermal fibroblasts. *J Biol Chem* 265:10681-10685

Unemori E N, Pickford L B, Salles A L, Piercy C E, Grove B H, Erikson M E, Amento E P (1996) Relaxin induces an extracellular matrix-degrading phenotype in human lung fibroblasts in vitro and inhibits lung fibrosis in a murine model in vivo. *J Clin Invest* 98:2739-2745

Williams E J, Benyon R C, Trim N, Hadwin R, Grove B H, Arthur M J, Unemori E N, Iredale J P (2001) Relaxin inhibits effective collagen deposition by cultured hepatic stellate cells and decreases rat liver fibrosis in vivo. *Gut* 49:577-583

Woessner J F, Jr. (1994) The family of matrix metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci* 732:11-21

Wyatt T A, Sisson J H, Forget M A, Bennett R G, Hamel F G, Spurzem J R (2002) Relaxin stimulates bronchial epithelial cell PKA activation, migration, and ciliary beating. *Exp Biol Med (Maywood)* 227:1047-1053

Ye H Q, Azar D T (1998) Expression of gelatinases A and B, and TIMPs 1 and 2 during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:913-921

Ye H Q, Maeda M, Yu F S, Azar D T (2000) Differential expression of MT1-MMP (MMP-14) and collagenase III (MMP-13) genes in normal and wounded rat corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:2894-2899

Zouboulis C C, Seltsmann H, Neitzel H, Orfanos C E (1999) Establishment and characterization of an immortalized human sebaceous gland cell line (SZ95). *J Invest Dermatol* 113:1011-20

8 Thesen

1. Relaxin 2 (RLN2) wird in verschiedenen Geweben des Reproduktionstrakts und im Herz gebildet. Das Peptidhormon besitzt vielfältige Eigenschaften. Es kann proliferativ und migrationsfördernd wirken. Die Beeinflussung von Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und Tissue Inhibitors of MMP (TIMPs) ist bekannt.
2. Der Relaxin-like Faktor (RLF) wird ebenfalls in Geweben des Reproduktionstrakts gebildet. Für dieses Hormon ist eine Einflussnahme am Descensus testis beschrieben. RLF kann die Proliferation und Migration fördern und die MMP- und TIMP-Expression beeinflussen.
3. MMPs sind eine Gruppe von Enzyme, die das extrazelluläre Gewebe degradieren können und somit den Um- und Abbau von Bindegewebe beeinflussen. Natürliche Gegenspieler der MMPs sind die TIMPs.
4. RLN2 und RLF werden unter physiologischen Bedingungen nicht an der Augenoberfläche gebildet.
5. Das Expressionsmuster lässt auf eine endokrine Wirkung der Hormone schließen. Dabei kommt eine Bildung der Hormone an einer anderen Stelle im Körper und Transport via Blutstrom an die Augenoberfläche sowie eine Sekretion in den Tränenfilm in Betracht.
6. Die Wirkung der Hormone RLN2 und RLF kann an der Augenoberfläche und den ableitenden Tränenwegen über die Rezeptoren LGR7 und LGR8 vermittelt werden.
7. Die Sebozyten-, Korneaepithel- und Konjunktivaepithelzelllinien exprimieren RLN2 und RLF sowie die Rezeptoren LGR7 und LGR8. Sie dienen als Modell zu weiterführenden Untersuchungen der Bedeutung der Hormone an der Augenoberfläche.
8. Die Augenoberfläche unterliegt dem Einfluss verschiedener Hormone. In der Schwangerschaft ist die Augenoberfläche besonders gegen Entzündungen geschützt.

9. Erosionen sind Epitheldefekte, die durch die Wundheilung wieder verschlossen werden können. Die Wundheilung läuft in verschiedenen Stadien ab.
10. Im Rahmen von Entzündungen an der Augenoberfläche und bei der Wundheilung spielen Um- und Abbauprozesse vermittelt durch MMPs und TIMPs eine Rolle.
11. Die Proliferations- und Migrationsfähigkeit von Konjunktiva- und Korneaepithelzellen ist bei der Wundheilung von besonderer Bedeutung um einen raschen Defektschluss zu ermöglichen.
12. RLN2 und RLF fördern die Migration und Proliferation der Konjunktiva- und Korneaepithelzelllinie und können damit unterstützend auf die Wundheilung wirken.
13. MMP2 scheint in der späten Phase die Wundheilung zu fördern. Die MMP2-mRNA-Produktion von SZ95-, IOBA-NHC- und HCE-Zellen ist im Wesentlichen nach 24 h Stimulation mit RLN2 und RLF erhöht.
14. Hingegen ist MMP9 vor allem an der frühen Phase der Wundheilung beteiligt. RLN2 und RLF haben vorrangig Einfluss auf die MMP9-Expression der Sebozytenzelllinie nach 6 h.
15. Die Analyse zu Untersuchungen der MMP13-mRNA-Expression durch RLN2 und RLF Stimulation ergaben keinen signifikanten Einfluss.
16. TIMP1 inhibiert MMP9, indem es MMP9 mit hoher Affinität bindet. RLN2 und RLF steigern die TIMP1-mRNA-Expression vor allem nach 24 h. So könnte TIMP1 eine überschießende Epithelisation verhindern.
17. Durch eine hohe Affinität zu MMP2, inhibiert TIMP2 MMP2. Die MMP2- und TIMP2-Expression wird durch RLN2 und RLF besonders bei IOBA-NHC-Zellen zum selben Zeitpunkt (24 h) erhöht. Denkbar ist, dass der Um- und Abbau der extrazellulären Matrix auf diese Weise differentiell gesteuert werden kann.
18. Mit dieser Arbeit gelang eine Erstbeschreibung der Expression der Hormone RLN2 und RLF sowie der Rezeptoren LGR7 und LGR8 an der Augenoberfläche und den ableitenden Tränenwegen.

19. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass RLN2 und RLF möglicherweise im Rahmen der Wundheilung und bei Schädigung der Augenoberfläche infolge von Entzündungen eine Rolle spielen.

Lebenslauf

Familienname	Hampel
Vorname	Ulrike
Geburtsdatum	06.12.1983
Geburtsort	Bernburg
Geschlecht	weiblich
Wohnsitz und Korrespondenzanschrift	Viktor-Scheffel-Str. 5 06114 Halle (Saale)
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1990 - 1991	Oberschule Juri Gagarin in Bernburg
1991 - 1994	Grundschule Zepziger Weg in Bernburg
1994 - 2003	Herrmann Hellriegel Gymnasium in Bernburg

Hochschulstudium

2003	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2005	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2006	Beginn der vorliegenden Dissertation

Forschungspreise

2007	Sicca-Forschungsförderpreis des Ressorts Trockenes Auge im Bundesverband der Augenärzte Deutschlands
------	--

Wissenschaftlicher Werdegang

- 2007 5. International Conference on the Tear Film & Ocular Surface,
Taormina, Italien
Posterpräsentation mit dem Titel „Relaxin, Relaxin-like factor and Relaxin-like receptors LGR7 and LGR8 at the ocular surface“
- 2007 24. Annual Workshop der Anatomischen Gesellschaft,
Würzburg, Deutschland
Posterpräsentation mit dem Titel „Relaxin, Relaxin-like Faktor und die Relaxin Rezeptoren LGR7 und LGR8 an der Augenoberfläche“
- 2007 Ulrike Hampel. Relaxin und Insulin-like Factor 3 – Hormone an der Augenoberfläche. Augenspiegel 2007;12: 22-23.
- 2008 9. Congress of the International Society of Dacryology and Dry Eye,
Istanbul, Türkei
Posterpräsentation mit dem Titel „Ocular surface detection of Relaxin 2, Relaxin-like Factor and Relaxin-like Receptors LGR7 and LGR8“
- 2009 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO),
Fort Lauderdale, Florida, USA
Posterpräsentation mit dem Titel „The Role of Relaxin2 and Relaxin-Like Factor at the Ocular Surface“
- 2009 Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft,
Leipzig, Deutschland
Posterpräsentation mit dem Titel „The Role of Relaxin2 and Relaxin-Like Factor at the Ocular Surface“
- 2010 Hampel U, Klonisch T, Paulsen F: Relaxin 2 and insulin-like factor 3 promote wound healing at the ocular surface. Endocrinology (eingereicht)

Halle, den 01.03.2010

Selbstständigkeitserklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von mir ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter der Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten in Anspruch genommen habe.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Erklärung über Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich keinerlei frühere Promotionsversuche unternommen habe und an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist.

Halle, den 01.03.2010

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät bei Prof. Dr. med. Friedrich Paulsen angefertigt.

Prof. Paulsen gilt mein ganz besonderer Dank für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die vielen Diskussionen und das stete Interesse an meiner Arbeit sowie die Möglichkeiten an Kongressen teilzunehmen.

Frau Susann Möschter und Frau Ute Beyer bin ich sehr dankbar für die Anleitung, Betreuung und hilfreichen Ratschläge während der Durchführung meiner Untersuchungen.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Paulsen danke ich für die zahlreichen Ratschläge, entgegengebrachten Unterstützung und dem hervorragendem Arbeitsklima.

Herrn Prof. Dr. med. Thomas Klonisch, Department of Human Anatomy and Cell Science, University of Manitoba, Winnipeg, Kanada, sei herzlich für die Überlassung der Primersequenzen und den vielen hilfreichen Ratschlägen gedankt.

Dem Labor für Experimentelle Chirurgie und Onkologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danke ich für die Bereitstellung der Positivkontrollen.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern und meinen Freunden für die Geduld und Unterstützung danken, die mir stets entgegengebracht wurden.