

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

**Detektion des Pro-Nerve Growth Factor (ProNGF) an der Augenoberfläche und
im Tränenapparat im Vergleich mit der maturen Form NGF**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)
vorgelegt der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Johannes Hubertus Peters
geboren am 17.12.1980 in Köln
Betreuer: Prof. Dr. med. Friedrich Paulsen

Gutachter:
Prof. Dr. med. Wolfgang Ballhausen, Halle/Saale
Prof. Dr. med. Gerd Geerling, Düsseldorf
Prof. Dr. med. Friedrich Paulsen, Erlangen
Prof. Dr. med. Harald Renz, Marburg

Öffentliche Verteidigung am 09.07.2012

Für meine Schwester Julia

REFERAT

Der humane Nervenwachstumsfaktor beta (*beta-Nerve Growth Factor-NGF*) gehört zu einer aus sechs neurotrophen Proteinen bestehenden Familie. Im Jahre 1952 wurde er erstmals von Rita Levi-Montalcini in Zusammenarbeit mit Stanley Cohen beschrieben, nachdem er aus Mäusesarkomzellen isoliert worden war.

Neurotrophine, zu denen auch der Brain Derived Neurotrophic Factor, sowie NT-3, NT-4/5, NT-6 und NT-7 zählen, werden Eigenschaften zugesprochen, die Wachstum, Differenzierung und Überleben bestimmter Nervenzellen vermitteln.

Im Gegensatz zum reifen NGF ist seine Vorstufe, ProNGF, posttranslational noch nicht prozessiert. Dieses Pro-Protein soll mit spezifischen Rezeptoren an der Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose) beteiligt sein.

Beide Formen wurden bisher in diversen Geweben, wie Plazenta, Haut oder Kolon nachgewiesen und existieren auf zellulärer Ebene nebeneinander.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Proteinformen von NGF und ProNGF jeweils in Tränendrüse, Konjunktiva, Cornea und ableitenden Tränenwegen, sowie für NGF gesondert in konjunktivalen und cornealen Epithelzelllinien nachzuweisen.

Methoden: Es wird Gewebe von Körperspendern sowie immortalisierte Zellen sowohl auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR, als auch auf Proteinebene mittels Westen-Blot und Immunhistochemie untersucht.

Ergebnisse: NGF ist in allen untersuchten Geweben und in cornealen Epithelzellen der Epithelzellen HCE mindestens mit einer der durchgeführten Methoden, nachweisbar. ProNGF konnte auf Proteinebene in Gewebe von Cornea, Konjunktiva, Tränendrüse und Tränenweg nachgewiesen werden.

Zukünftig gilt es herauszufinden, wie die Konzentrationsverteilung und Regulation der beiden Faktoren in den jeweiligen Geweben ist, um möglicherweise im Rahmen antiinflammatorischer oder apoptotischer Eigenschaften dieser Proteine neue Aussagen treffen zu können.

Hieraus könnte im Hinblick auf Augenerkrankungen, die immunologisch, durch Traumata oder postoperativ entstanden sind, ein therapeutischer Nutzen erwachsen.

Peters, Johannes: Detektion des Pro-Nerve Growth Factor (ProNGF) an der Augenoberfläche und im Tränenapparat im Vergleich mit der maturen Form NGF. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 50 Seiten, 2011

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | Einleitung..... | 1 |
| 1.1. | Anatomie und Physiologie der Augenoberfläche, Tränendrüse und ableitender Tränenwege..... | 1 |
| 1.2. | Neurotrophine..... | 2 |
| 1.3. | Möglicher therapeutischer Einsatz in der Ophthalmologie..... | 4 |
| 2. | Zielstellung | 6 |
| 3. | Material und Methoden..... | 7 |
| 3.1. | Eingesetzte Materialien und Chemikalien | 7 |
| 3.1.1. | Chemikalien..... | 7 |
| 3.1.2. | Gebrauchswaren und Geräte | 9 |
| 3.2. | Sterilisation von Lösungen und Geräten..... | 10 |
| 3.3. | Molekulargewichtstandard | 10 |
| 3.4. | Art und Herkunft des verwendeten Probenmaterials..... | 10 |
| 3.4.1. | Gewebeproben..... | 10 |
| 3.4.2. | Zelllinien | 10 |
| 3.5. | Medien und Kultivierung | 11 |
| 3.6. | RNA-Isolierung | 11 |
| 3.6.1. | Aus Geweben..... | 11 |
| 3.6.2. | Aus Zellen | 13 |
| 3.6.3. | DNase Verdau..... | 13 |
| 3.6.4. | Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren..... | 14 |
| 3.7. | Reverse Transkription | 15 |
| 3.8. | Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 16 |
| 3.8.1. | Agarosegel Elektrophorese | 18 |
| 3.9. | Proteinisolierung..... | 19 |
| 3.9.1. | Aus Zellen | 19 |
| 3.9.2. | Aus Geweben..... | 19 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.10. | Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford..... | 20 |
| 3.11. | SDS-Gelelektrophorese und Western Blot Analyse | 20 |
| 3.12. | Western Blot..... | 22 |
| 3.13. | Immunhistochemie | 23 |
| 3.13.1. | Immunhistochemischer Nachweis eines Epitopes | 24 |
| 4. | Ergebnisse | 26 |
| 4.1. | Nachweis der Wachstumsfaktoren auf RNA-Ebene..... | 26 |
| 4.1.1. | RT-PCR..... | 26 |
| 4.1.2. | RT-PCR: Beta Aktin..... | 26 |
| 4.1.3. | RT-PCR: NGF Zellen..... | 27 |
| 4.1.4. | RT-PCR: NGF Gewebe | 27 |
| 4.2. | Nachweis der Wachstumsfaktoren auf Proteinebene..... | 28 |
| 4.2.1. | Western-Blot..... | 28 |
| 4.2.2. | Western-Blot: NGF Gewebe | 28 |
| 4.2.3. | Western-Blot: ProNGF Gewebe..... | 29 |
| 4.3. | Immunhistochemie | 30 |
| 4.3.1. | Tränendrüse..... | 32 |
| 4.3.2. | Konjunktiva..... | 32 |
| 4.3.3. | Cornea | 32 |
| 4.3.4. | Ableitende Tränenwege..... | 33 |
| 5. | Diskussion..... | 34 |
| 5.1. | Expression von NGF und ProNGF in der Tränendrüse, der Konjunktiva, der Cornea und den ableitenden Tränenwegen..... | 34 |
| 5.2. | Qualitative Unterschiede der Proteinexpression | 37 |
| 5.3. | Topographische Unterschiede der Expression innerhalb der Augenkompimente..... | 37 |
| 5.4. | Vorkommen des Wachstumsfaktors NGF in den Zelllinien, die somit als Forschungsmodell dienen können..... | 38 |

| | |
|-------------------------------|----|
| 5.5. Ausblick..... | 39 |
| 6. Literaturverzeichnis | 41 |
| 7. Thesen | 49 |

Anhang

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

| | |
|-------------------|---|
| Abb. | = Abbildung |
| AK | = Antikörper |
| BDNF | = Brain Derived Neurotrophic Factor |
| Bp | = Basenpaare |
| BSA | = Bovines Serum Albumin |
| C | = Cornea |
| dNTP's | = Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| EDTA | = Ethylendiamino-N,N,N,N-tetraessigsäure |
| °C | = Grad Celsius |
| HCE | = humane corneale Epithelzellen |
| K | = Konjunktiva |
| kDa | = Kilodalton |
| MgCl ² | = Magnesiumchlorid |
| mg | = Miligramm |
| min | = Minuten |
| ml | = Milliliter |
| mRNA | = messenger Ribunukleinsäure |
| µg | = Mikrogramm |
| µl | = Mikroliter |
| µm | = Mikrometer |
| n | = Anzahl |
| NGF | = Nervenwachstumsfaktor |
| NHC | = konjunktivale Epithelzellen |
| NT 3 | = Neurotrophin 3 |
| NT 4/5 | = Neurotrophin 4/5 |
| NT 6 | = Neurotrophin 6 |
| NT 7 | = Neurotrophin 7 |
| NTW | = ableitender Tränenweg |
| o.g. | = oben genannt |
| PBS | = Phosphat buffered saline |
| proNGF | = Precusor Form des Nervenwachstumsfaktors |
| p75NTR | = p75 Neurotrophin Rezeptor |
| RT-PCR | = Reverse Transkriptase Polymerasereaktion |
| sec | = Sekunde |
| TAE | = Trisaminomethan-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure |

| | |
|---------|--|
| TALT | = tear duct-associated lymphoid tissue |
| TBS | = Tris buffered saline |
| TD | = Tränendrüse |
| Tris | = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| Trk A-C | = Tyrosin-Kinase-Rezeptor A-C |
| U | = Units |
| u.a. | = unter anderem |
| U/min | = Umdrehungen pro Minute |
| z.B. | = zum Beispiel |

1. Einleitung

1.1. Anatomie und Physiologie der Augenoberfläche, Tränendrüse und der ableitenden Tränenwege

Die Augenoberfläche des Menschen wird von Konjunktiva und Cornea überzogen. Die Konjunktiva besteht aus mehreren bindegewebigen Blättern und ist von einem mehrschichtigen unverhornten Plattenepithel bedeckt, das Becherzellen enthält. Sie reicht von der Rückseite der Lider (*Conjunctiva palpebrae*) bis auf den vorderen Abschnitt des Augapfels (*Conjunctiva bulbi*) und geht am *Limbus cornea* in die Cornea über. Das Stroma (*Tela subconjunctivae*) besteht aus lockerem Bindegewebe und enthält Immunzellen, Mastzellen und Blutgefäße, die am *Limbus cornea* ein Randschlingennetz bilden. Die Cornea ist etwa 0,5 mm dick und bildet den vorderen Abschluss des Augapfels. Sie besteht aus Epithel, Stroma und Endothel und ist frei von Blutgefäßen. Die Cornea wird außen von einem mehrschichtig unverhornenden Plattenepithel, das der Bowman Membran aufsitzt, begrenzt. Die flachen, oberflächlichen Zellen bilden eine Diffusionsbarriere gegenüber der Tränenflüssigkeit. Von der Basalschicht aus wird das Epithel innerhalb von sieben Tagen erneuert, sodass Epitheldefekte schnell ausheilen. Das Epithel verhindert das Eindringen von Krankheitskeimen und beteiligt sich an der Regulation des Wassergehalts im Corneastroma. Nach innen schließt sich das corneale Stroma, das etwa 90% der Corneadicke ausmacht, an. Es enthält Kollagenfibrillen, Proteoglykane, Wasser und Keratozyten. Das einschichtige Endothel haftet an der Descement-Membran und bedeckt die Hinterfläche. Es bildet eine Diffusionsbarriere gegenüber der mit Kammerwasser gefüllten Vorderkammer und ist durch die Aufrechterhaltung eines osmotischen Gradienten für Wasser in Richtung Vorderkammer wesentlich an der Transparenz der Cornea beteiligt. Das Endothel ist nicht regenerationsfähig, sodass ein Zellverlust beispielsweise durch Entzündungen oder Verletzungen zur Trübung der Cornea führt.

Die Tränendrüse liegt hinter dem temporalen oberen Orbitalrand in der *Fossa lacrimalis*. Die tubuloalveoläre Drüse ist in Läppchen gegliedert und mündet mit etwa zehn Ausführungsgängen in den oberen Fornix (*Fornix superior conjunctivae*). Die Endstückzellen sezernieren isotone Tränenflüssigkeit, Muzine und verschiedene antimikrobielle Stoffe, wie Lysozym, Lactoferrin oder Defensine.

Der trilaminäre Tränenfilm benetzt die Oberfläche der Epithelien und sorgt für die Reinigung, Befeuchtung und Immunabwehr an der Augenoberfläche. Er wird

reflektorisch von der Tränendrüse und kontinuierlich durch die akzessorischen Tränendrüsen, Becherzellen und Meibomdrüsen produziert. Die isotone Tränenflüssigkeit macht den Hauptteil des Tränenfilms aus; sie enthält die oben genannten antimikrobiellen Stoffe und Muzine. Hauptfunktion der Muzine ist die Stabilisierung des Tränenfilms. An der Luft/Wassergrenze befindet sich eine Lipidschicht, die der Verdunstung entgegenwirkt. Eine innere Muzinschicht (membrangebundene Muzine) vermittelt die Haftung des Tränenfilms an der Plasmamembran von Cornea und Konjunktiva.

Die ableitenden Tränenwege des Auges gehören anatomisch zum Tränenapparat und dienen der physiologischen Ableitung „verbrauchter“ Tränenflüssigkeit von der Augenoberfläche über oberes und unteres Tränenpünktchen (Puncta lacrimalia), sowie oberes und unteres Tränenröhrchen (Canaliculi lacrimales) in den Tränensack (Saccus lacrimalis), der seinerseits in den Tränennasengang (Ductus nasolacrimalis) übergeht. In der Nase befeuchtet die Tränenflüssigkeit die Nasenschleimhaut und verdunstet dort teilweise (Paulsen, 2003).

1.2. Neurotrophine

Unter Neurotrophinen wird eine Gruppe von sechs aus 240-260 Aminosäuren bestehenden Proteinen mit hoher Sequenzhomologie zusammengefasst (Qi et al., 2007; Rattenholl et al., 2001), denen eine wichtige Rolle bei der neuronalen Entwicklung und bei biologischen Effekten in nicht-neuronalen Geweben zugeschrieben wird (Bennett et al., 1999; Sariola et al., 2001; Qi et al., 2007). Sie bewirken Überleben, Wachstum und Zelldifferenzierung und können unter bestimmten Umständen gerichteten Zelluntergang (Apoptose) induzieren (Cassaccia-Bonnet et al., 1996; Frade et al., 1996; Wordinger et al., 2000; Ghinelli et al., 2003; Qi et al., 2007; Klimannel et al., 2007).

Außer NGF sind BDNF, NT-3, NT-4/5, NT-6 und NT-7 bekannt (Götz et al., 1994; Lai et al., 1998). Der Brain-Derived-Neurotrophic-Factor (BDNF) soll u.a. im Hippocampus über intrazelluläre Calziumerhöhung eine dauerhafte Transmitterfreisetzung, die Grundlage bei Lern- und Gedächtnisprozessen, bewirken (Shen et al., 1997). Das Neurotrophin 3 (NT-3) wurde nach NGF und BDNF als drittes Neurotrophin charakterisiert (Maisonpierre et al., 1990). Da herausgefunden wurde, dass NT-4 lediglich eine Variante von NT-5 ist, der nicht bei Säugern, sondern nur bei Amphibien identifiziert wurde, hat sich die Schreibweise NT-4/5 etabliert (Ip et al., 1992). Das Neurotrophin 6 (NT-6) wurde zuerst im Knochenfisch Xiphophorus identifiziert, kommt jedoch auch in sympathischen und sensorischen menschlichen Neuronen vor (Götz et al., 2002).

Das siebte bekannte Neurotrophin (NT-7) weist die allen Neurotrophinen gemeinsame biochemische Grundstruktur auf und hat neuritenstimulierende Potenz (On Lai et al., 1998).

NGF und ProNGF

NGF ist ein Polypeptid mit pleiotropher Wirkung, das hinsichtlich immunmodulierender Aspekte und seiner Aktivität im Rahmen der Wundheilung z.B. bei cornealen Ulzerationen Beachtung findet (Micera et al., 2005, Lambiase et al., 2007). Anfang der 50er Jahre wurde das Protein aufgrund seiner wachstumsstimulierenden Wirkung auf Neuriten der Dorsalwurzelganglien von Hühnerembryonen in Mäusesarkomzellen entdeckt (Levi-Montalcini R., 1987). Inzwischen konnte NGF nicht nur, wie der Name vermuten lässt, in neuronalem Gewebe nachgewiesen werden, sondern auch in zahlreichen anderen Geweben wie Plazenta, Haarfollikeln, Retina und Cornea (Yardley et al., 2000; Lambiase et al., 2003, 2005, 2007; Qi et al., 2007).

ProNGF ist die Vorläufer- (Precursor-) Form von NGF und liegt genauso wie reifer NGF in der aktiven Form als Homodimer vor (Bothwell and Shooter 1977; Rattenholl et al., 2001a). Diesem Protein werden heute in Verbindung mit Rezeptoren wie p75 und Sortilin apoptoseinduzierende Eigenschaften zugesprochen (Clewes et al., 2008; Nykjaer et al., 2004).

Bekannte Rezeptoren der Neurotrophine sind TrkA, p75NTR und der Sortilin Rezeptor (Nykjaer et al., 2004).

Da NGF und ProNGF auf zellulärer Ebene parallel existieren, jedoch gegensätzliche biologische Wirkungen haben sollen, liegt die Vermutung nahe, dass die Effekte durch unterschiedliche Rezeptoraffinitäten getriggert werden (Kliemann et al., 2001).

Die Expression der Rezeptoren ist in Augengeweben selektiv. So konnte TrkA in humanen Limbus-, Konjunktiva-, Cornea- und Pterygiumpräparaten in der gesamten Schnittebene nachgewiesen werden, bei p75 war dies in der Cornea nicht möglich (Di Girolamo et al., 2008). TrkA ist einer von drei bekannten Trk-Rezeptoren und wird von NGF aktiviert. TrkB und TrkC werden von anderen Neurotrophinen oder auch von NGF (TrkC) selbst aber mit deutlich geringerer Affinität aktiviert (Klein et al., 1991). Die Aktivierung bewirkt Wachstum, Differenzierung und Proliferation von Neuronen. Da TrkA mit einer deutlich höheren Dissoziationskonstante (10^{-11} M) an NGF gebunden wird, bezeichnet man ihn auch als hochaffinen Rezeptor. p75NTR, der keine Tyrosinkinase ist, bindet demgegenüber wesentlich schwächer (10^{-9} M) aber mit ähnlicher Affinität an alle Neurotrophine und wird als niedrig affiner Rezeptor bezeichnet (Friedmann, 2000).

Als Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Familie kann durch p75NTR der programmierte Zelltod induziert werden (Casaccia-Bonofil et al., 1996). Bei gleichzeitiger Bindung von NGF an TrkA und p75NTR konnte jedoch auch ein höheres Zellwachstum von Neuriten beobachtet werden (Bibel et al., 1999). Mit Sortilin ist ein weiterer für die Signaltransduktion von NGF und ProNGF verantwortlicher Rezeptor identifiziert worden (Petersen et al., 1997). Sortilin hat ähnlich wie p75NTR eine höhere Affinität für ProNGF. Versuche deuten darauf hin, dass ein Komplex aus p75NTR und Sortilin für eine Apoptoseinduktion durch ProNGF verantwortlich ist (Nykjaer et al., 2004). Ob Neurotrophin-Proformen stimulierend oder apoptotisch wirken, wird allerdings kontrovers diskutiert (Fahnestock et al., 2004a; Sobottka et al., 2008).

1.3. Möglicher therapeutischer Einsatz in der Ophthalmologie

Beim Krankheitsbild des Trockenen Auges, an dem etwa 10-30% der Bevölkerung in den Industrieländern leiden, handelt es sich laut Definition der Dry Eye Workshop Study Group (DEWS) 2007 um eine „multifaktorielle Erkrankung des Tränensystems und der Augenoberfläche, die zu Unbehaglichkeitsgefühl, Sehstörungen und Tränenfilminstabilität mit möglicher Schädigungen der Augenoberfläche führt. Sie ist mit einer erhöhten Osmolarität des Tränenfilms und einer Entzündung der Augenoberfläche assoziiert“. Infolge der verminderten Benetzung der Augenoberfläche mit Tränenflüssigkeit durch eine eingeschränkte Tränenproduktion oder eine Veränderung der Tränenzusammensetzung kommt es zu verschiedenen Folgeerscheinungen wie Entzündungsreaktionen, adaptiver Immunreaktion (mit T-Zell-Aktivierung), Apoptose und vermehrter bakterieller Besiedlung (DEWS Group, 2007). Diese sind meist individuell multifaktorieller Genese. Als intrinsische Faktoren werden zunehmendes Alter, hormonelle Dysbalance (Androgenmangel) oder lokale/systemische Autoimmunerkrankungen angesehen. Zu den extrinsischen Faktoren zählen Umweltstress, das Tragen von Kontaktlinsen, Medikamenten Nebenwirkungen oder refraktive Operationen (Lemp, 2008; Latkany, 2008). Außer der rein symptomatischen Therapie mit isotonischen rehydrierenden Augentropfen wird versucht, immunmodulatorisch den pathogenetischen Kreis zu durchbrechen, um Ulzerationen als Folge des Trockenen Auges behandeln zu können (Lambiase et al., 2003; Lambiase et al., 1998).

Untersuchungen zeigen, dass NGF die Aktivität von Keratinozyten modulieren (Micera et al., 2006) und sogar therapieresistente corneale Ulzerationen ohne beobachtbare Nebenwirkungen zur Ausheilung bringen kann (Bonini et al., 2000; Lambiase et al., 2003; Lambiase et al., 1998). Ferner wurden durch NGF positive Wirkungen bei der Heilung konjunktivaler Erkrankungen beobachtet (Micera et al., 2005). Hinsichtlich der

Herpeskeratitis soll NGF potentielle antivirale Eigenschaften haben, die mit Virustatika (Acyclovir) vergleichbar sind (Lambiase et al., 2008). Bei ProNGF wird auf neuronaler Ebene an Rezeptorblocker gedacht, um einem Zelluntergang entgegenzusteuern (Harrington et al., 2004; Boutilier et al., 2008). Inwieweit dieser therapeutische Ansatz in der Ophthalmologie möglich ist, bleibt hypothetisch und eröffnet neue Forschungsoptionen.

2. Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit soll mittels verschiedener zellbiologischer Verfahren die Proteinexpression des Wachstumsfaktors NGF und dessen Vorläufer, ProNGF, an Epithelzellen und Geweben der Augenoberfläche und des Tränenapparates dargestellt werden.

Dabei sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Werden NGF und ProNGF in der Tränendrüse, der Konjunktiva, der Cornea und den ableitenden Tränenwegen exprimiert?
2. Gibt es qualitative Unterschiede der Proteinexpression?
3. Gibt es topographische Unterschiede in der Expression der beiden Wachstumsfaktoren innerhalb der Augenkompimente/Wo werden die Faktoren gebildet?
4. Kommt NGF auch in Epithelzelllinien der Augenoberfläche vor, die somit als Forschungsmodell dienen könnten?

3. Material und Methoden

3.1. Eingesetzte Materialien und Chemikalien

3.1.1. Chemikalien

| | |
|--|--|
| Acrylamid Solution | Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz |
| AEC Substratlösung | DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Agarose | Biozym, Oldendorf, Deutschland |
| APS (Ammoniumpersulfat) | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Aquatex | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Avidin/Biotin Blocking Kit | DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Biotinylierte Zweitantikörper | DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Bradford-Reagenz | Bio-RAD Laboratories GmbH |
| Bromphenol Blau | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Chloroform | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| DEPC (Diethylpyrocarbonat) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| dNTP's | Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland |
| EDTA | Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz |
| Ethanol (99,8%) | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland |
| Ethidiumbromid | Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland |
| Entwickler-6 Fixierlösung (GBX Developer & Fixer Twin Pack) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| Fetales Kälberserum (FCS) | Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland |
| Medium: DMEM/HAM's F12 | Biochrom, Berlin, Deutschland |

| | |
|--|--|
| MgCl ₂ | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland |
| β-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| Normalserum | DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Phosphataseinhibitor | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| Proteaseinhibitor | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| Ponceau S | Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland |
| Primärantikörper NGF, ProNGF | Chemicon International |
| RQ1 RNase-Free DNase Kit | Promega, Mannheim, Deutschland |
| Random Hexamers | Applied Biosystems |
| SDS (sodium dodecyl sulfat) | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland |
| Strept ABCComplex/HRP | DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Super Script II RNase H Reverse | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| Taq DNA Polymerase Kit | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylenamin) | Bio-RAD Laboratories GmbH |
| Tris | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland |
| Triton X 100 | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland |
| Trizol Reagent | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| Trypsin-EDTA | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| 30% Wasserstoffperoxid | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland |
| Western Blotting Luminol Reagent | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland |
| Xylol | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland |

3.1.2. Gebrauchswaren und Geräte

| | |
|---|--|
| BSA | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| Kryoröhrchen & Deckeleinsätze | Roth |
| Gelkassetten | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| Hybond-ECL | Amersham Biosciences, NJ, USA |
| Nitrocellulose Membran | Kodak BioMax MS-1 Film |
| Hyperfilm ECL | Amersham Biosciences, NJ, USA |
| Milchpulver | TSI Trade Service Int., Zeven, Deutschland |
| Mikrotom | Microm GmbH Type HM400R |
| PCR-Geräte | PTC – 200 Peltier Thermal Cycler Mastercycler gradient Eppendorf |
| PCR Softlubes | Biozym, Oldendorf, Deutschland |
| Photomikroskop | Fa. Zeiss, Göttingen, Deutschland |
| Pipette 5, 10, 50 ml | Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland |
| Pipettenspitzen, kristall 0,5 – 10 µl | Biozym, Oldendorf, Deutschland |
| Pipettenspitzen, gelb 5 – 100 µl | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland |
| Pipettenspitzen, blau 100 – 1000 µl | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland |
| Röntgenkassette Typ G 24 x 30 cm | Rego, Deutschland |
| Zellkulturflaschen (50 ml, 25 cm ²) | Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland |
| Brutschrank | Forma Series II Water Jacketed Co ₂ - Incubatio Hepa Class 100 |
| SpeedVac | Genevac SF50, Biometra |
| Spektrometer | Ultrospec 3300pro Amersham |
| Sterilbank | Thermo Electron Corporation Holton Lamin Air |
| Zentrifugen | Centrifuge 5415C Eppendorf Biofuge fresco Heraeus |

3.2. Sterilisation von Lösungen und Geräten

Hitzeunempfindliche Lösungen und Gebrauchswaren werden für 30 min bei 120 °C und 10^5 Pascal autoklaviert; hitzeempfindliche Lösungen werden über einem Sterilfilter mit 0,2 µm Porengröße steril gefiltert.

3.3. Molekulargewichtstandard

| | |
|-------------------------|---|
| DNA-Längenstandards | DNA Molecular Weight Marker VIII (0,019 – 1,11 kbp), Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland |
| | MassRuler™ DNA Ladder, Low Range (80 – 1031 bp), Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland |
| Protein-Längenstandards | PageRuler™ Prestained Protein Ladder (11 – 170 kDa), Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland |

3.4. Art und Herkunft des verwendeten Probenmaterials

3.4.1. Gewebeproben

Für histologische, immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen werden Gewebeproben aus Tränendrüse, Konjunktiva, Cornea und ableitenden Tränenwegen von sechs männlichen und acht weiblichen Körperspendern im Alter zwischen 53 und 86 Jahren des Anatomischen Institutes der Martin-Luther-Universität (MLU) Halle-Wittenberg gewonnen. Die Gewebeproben werden bis zur Untersuchung bei –80 °C gelagert oder in Paraffin eingebettet.

3.4.2. Zelllinien

Konjunktivaepithelzelllinie (IOBA-NHC)

Die morphologische und funktionelle Charakterisierung (Diebold et al., 2003) der spontan immortalisierten IOBA (Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada, Universidad de Valladolid, Spain) –NHC (normal human conjunctiva) Zelllinie zeigt, dass die Zelllinie die Konjunktiva des Menschen weitgehend repräsentiert und somit als Model nutzbar ist. Die Zellen besitzen eine hohe Proliferationsrate. Eine

Chromosomenanalyse hat die humane Herkunft der IOBA-NHC-Zelllinie bestätigt. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Y. Diebold zur Verfügung gestellt (Diebold et al., 2003).

Corneaepithelzelllinie HCE

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine immortalisierte humane corneale Epithelzelllinie (HCE). Die Zelllinie wurde aus einer Spenderhornhaut generiert und mit dem Simian Virus 40 (SV40), das das Large T-Antigen enthält, transfiziert und immortalisiert. Die HCE-Zelllinie zeigt mit normalen humanen cornealen Epithelzellen vergleichbare Eigenschaften. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von K. Araki-Sasaki zur Verfügung gestellt (Araki-Sasaki, 2000).

3.5. Medien und Kultivierung

- Medium: DMEM/HAM's F-12 (PAA, Pasching, Austria)
- Zusatz: fetales Kälberserum
- Phosphatgepufferte Saline (PBS)
- 0,25%-ige Trypsin/EDTA-Lösung
- Insulin
- Hydrocortisol

Die Corneaepithelzelllinie (HCE) und die Konjunktivaepithelzelllinie (IOBA-NHC) werden in sterilen Gewebekulturflaschen als Monolayer kultiviert. Das Medium, DMEM/HAM's F12 im Verhältnis 1:1, wird mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) versetzt. Zusätzlich wird das Medium der Konjunktivaepithelzellen mit 1 µg/ml Insulin und 5 µg/ml Hydrocortisol angereichert. Auf weitere Zusätze wie Antibiotika wird verzichtet. Die Zellkulturen wachsen in Begasungsbrutschränken bei 37°C, 5% Kohlendioxid und 18% Sauerstoff. Alle Zellkulturarbeiten werden unter sterilen Bedingungen an einer Arbeitsbank durchgeführt.

3.6. RNA-Isolierung

3.6.1. Aus Geweben

In der vorliegenden Arbeit wird hierzu das RNeasy Mini Kit verwendet. Das Prinzip des Kits bzw. dessen Spezifität beruht darauf, dass in Gegenwart eines chaotrophen Salzes Nukleinsäuren spezifisch an Glasfaser- oder Silica-Oberflächen gebunden werden. Die Bindungsreaktion wird durch die Zerstörung der geordneten Struktur der

Wassermoleküle und ihrer Wechselwirkung mit den gelösten Nukleinsäuren verursacht. Durch eine DNase Verdauungsreaktion direkt auf dem Glasvlies werden Reste von kontaminierender DNA abgebaut. Nach einfachen Waschschritten kann die RNA frei von Begleitsubstanzen in RNase freies Wasser eluiert werden.

Die bei -80°C gelagerten Gewebeproben werden für den Gewebeaufschluss mit einem Mörser und Pistill direkt in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermahlen. Das Gewebepulver wird in ein RNase-freies, mit Flüssigstickstoff gekühltes 2-ml-Mikrozentrifugenröhrchen überführt und mit 600 μl stark denaturierendem guanidiniumisothiocyanathaltigem Lysepuffer (QIAGEN, RLT-Buffer; Mat.No.1015762) und 6 μl 14,3M β -Mercaptoethanol (SIGMA, M-3148) versetzt, um RNasen zu inaktivieren, die in allen Geweben vorkommen und innerhalb weniger Minuten große Mengen RNA degradieren können (Bekman et al., 1986). Dabei sollte die Ausgangsmenge der zerkleinerten Probe maximal 30 mg betragen, damit später die Bindungskapazität der Säulen (100 μg RNA) und die Lysekapazität des Puffers nicht überschritten werden. Von zellarmen Geweben dagegen, wie zum Beispiel Cornea, müssen für die Isolierung mindestens 100 mg Gewebe eingesetzt werden, um eine ausreichende RNA-Ausbeute zu erzielen. Mit einem Rotor-Stator-Homogenisator werden die Gewebeproben weiter aufgeschlossen und dabei zugleich in Lysepuffer homogenisiert. Eine unvollständige Homogenisation beeinträchtigt die Bindung der RNA an die RNeasy Membran und damit die RNA-Ausbeute.

Das Homogenat wird anschließend für 3 min bei 13000 U/min und 20°C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues 1,5 ml Tube überführt und mit 70%igem Ethanol auf das doppelte Volumen aufgefüllt, um die Bindungseigenschaften der RNA zu erhöhen. Das Gemisch wird in ein Mikroreaktionsgefäß mit einer Silikagelmembran (QIAGEN) gegeben und anschließend bei 10000 U/min für 15 sec zentrifugiert. In den folgenden Schritten wird die RNA mit zwei verschiedenen Puffern von Verunreinigungen freigewaschen. Hierzu werden zunächst 350 μl RW1-Puffer (QIAGEN WashBuffer; Mat.No.1015763) auf die Silikagelmembran gegeben und für 15 sec bei 10000U/min zentrifugiert. Der Puffer wird in einem 2 ml Sammelgefäß (QIAGEN collection tube) aufgefangen und verworfen. Es folgt der DNase Verdau, für den jeweils 10 μl Dnase I und 70 μl DNase-Puffer eingesetzt werden. Der Ansatz wird 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut mit 350 μl RW1-Puffer für 15 sec bei 10000 U/min zentrifugiert. Anschließend werden in zwei sich wiederholenden Schritten jeweils 500 μl RPE-Puffer (QIAGEN Wash Buffer; Mat.No.1018013) auf die Membran pipettiert, erst 15 Sekunden, dann 2 min bei 10000 U/min zentrifugiert, Puffer und Sammelgefäß danach verworfen. Abschließend wird die an die Silikagelmembran gebundene RNA mit 2 x 30 μl RNase freiem Wasser in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß

(SARSTEDT; No.72.690) eluiert. Bei -80°C kann die RNA für mehrere Wochen gelagert werden. Durch diese Prozedur werden in erster Linie RNA-Moleküle isoliert, die größer als 200 Nukleotide sind. Kleine Nukleotide, wie 5,8S RNA, 5S RNA oder tRNA bindet die Silikagelmembran nicht quantitativ.

3.6.2. Aus Zellen

Um RNA aus Zellen der Zellkultur zu extrahieren, wird 1 ml Trizol pro Petrischale direkt auf die Zellen gegeben, nachdem das Kultur- bzw. Stimulationsmedium entfernt wurde. Die Zellen werden durch das Trizol vom Schalenboden gelöst und können nun aus der Schale pipettiert werden. Das Gemisch wird bei -80°C eingefroren.

Nach dem Auftauen werden 200 μl Chloroform hinzugegeben, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und 15 min bei 10000 U/min zentrifugiert. Nach der Phasentrennung durch die Zentrifugation wird die wässrige Phase zur Fällung der RNA mit Isopropanol (-20°C) 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 min bei 10000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das entstandene Pellet zweimal mit kaltem 70%-igen Ethanol gewaschen. Das Pellet wird anschließend in einer SpeedVac unter Vakuum bei Raumtemperatur getrocknet und in 30 μl DEPC-Wasser bei 70°C gelöst. Die Konzentrationsmessung erfolgt photometrisch (siehe 3.10.)

3.6.3. DNase Verdau

Da es bei der RNA-Isolierung von Zellen immer zu einer Kontamination mit geringen DNA-Mengen kommt, wird ein zusätzlicher DNA-Verdau mit DNase I durchgeführt (30 min bei 37°C). Aufgrund der hohen Sensitivität der Polymerasenkettenreaktion können kleinste Mengen DNA drastische Auswirkungen auf die Befunde haben. Aus diesem Grund muss man sichergehen, dass das RNA-Eluat absolut DNA-frei ist. Die verwendete DNase darf keine RNA-abbauende Aktivität besitzen, um die RNA nicht in Mitleidenschaft zu ziehen. 7 μg RNA werden nach der Isolierung und anschließender Konzentrationsbestimmung für den DNA-Verdau eingesetzt.

Folgender Ansatz wird verwendet:

| | Volumen |
|---|-------------|
| RNase-freier DNase 10 x Reaktionspuffer | 2 µl |
| RNase-freie DNase 1 U/µg | 7 µl |
| RNA-Lösung aus Extraktion | x µl |
| Nuklease-freies Wasser | 11 µl –x µl |
| Gesamtvolumen | 20 µl |

Der Reaktionsansatz wird bei 37°C für 30 min inkubiert. Um die Reaktion zu unterbrechen werden nachfolgend 2 µl DNase-Stop-Lösung dazugegeben und 10 min bei 65°C inkubiert. Nach dem Verdau erfolgt nochmals eine photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung (siehe 3.10.)

3.6.4. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der RNA im Eluat kann durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}) in einem Spektrophotometer (Ultrospec 3300 pro, Amersham Bioscience) bestimmt werden. Aufgrund der Spektralcharakteristika ihrer Basen, die ein Absorptionsmaximum bei 260 nm zeigen, absorbieren Nukleinsäuren Licht zwischen einer Wellenlänge von 250-270 nm. Bei Verdünnung der RNA in Wasser entspricht eine OD_{260} von 1 einer Konzentration von 42,1 µg/ml Gesamt-RNA (Sambrook et al., 1989). Durch folgende Gleichung lässt sich die RNA-Konzentration der eingesetzten Proben errechnen:

$$\text{RNA-Konzentration (µg/ml)} = OD_{260} \times 42,1 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Vor der Messung wird das RNA-Eluat mit DEPC-Wasser 1:100 verdünnt und das Spektrophotometer mit 100 µl DEPC-Wasser auf Null geeicht. Der Quotient OD_{260} / OD_{280} erlaubt einen Rückschluss auf die Reinheit der isolierten RNA hinsichtlich möglicher Kontamination durch UV-absorbierende Stoffe wie zum Beispiel Proteinen. Allerdings ist der Quotient OD_{260} / OD_{280} stark vom pH-Wert abhängig. Ein niedriger pH-Wert resultiert in einem zu niedrigen Messergebnis für OD_{260} / OD_{280} und reduziert zudem die Sensitivität gegenüber Protein-Verunreinigungen. Für sehr reine RNA gilt dann:

$$OD_{260} / OD_{280} = 1,9 - 2,1$$

Die Qualität der isolierten Gesamt-RNA kann anhand einer Agarosegel-Elektrophorese nachvollzogen werden, bei der die Banden der 28S und 18S ribosomalen RNA (rRNA) nach erfolgter Ethidiumbromid-Inkubation bei 5,0 und 1,9 Kilobasen (kb) begutachtet werden können. Die jeweiligen Banden der rRNA sollten scharf begrenzt in dem Agarosegel erscheinen.

3.7. Reverse Transkription

Der reversen Transkription (Kogan et al., 1987) liegt eine Umschreibung von RNA in komplementäre DNA mit anschließender PCR zugrunde. Die mRNA liegt in den Zellen in nur sehr geringer Kopienzahl vor. Eine Möglichkeit, bestimmte Sequenzen in dem RNA-Gemisch nachzuweisen, ist die selektive Amplifikation dieser Sequenzen. Dazu muß die mRNA zunächst durch ein virales Enzym, die reverse Transkriptase (RT) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden (Kawasaki, 1989). Das Enzym benötigt als Startpunkt ein kurzes Stück doppelsträngiger Nukleinsäure. Man setzt daher p(dT)-Oligomere als Primer ein, die mit den Poly-A-Enden der mRNA hybridisieren und so den Startpunkt für die Transkription liefern. Für die Erststrangsynthese werden 2 µg RNA aus dem DNase Verdau eingesetzt und der Superscript™ II-RT-Kit von Invitrogen (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) nach folgendem Standardprotokoll verwendet:

Ansatz 1:

| | Volumen |
|---------------------------|--------------|
| 2 µg RNA aus DNase Verdau | x µl |
| Primer OligoT | 1 µl |
| DEPC-.Wasser | 11 µl – x µl |
| Gesamtvolumen | 12 µl |

Der Reaktionsansatz wird 10 Minuten bei 70°C inkubiert, um die RNA zu denaturieren. Im Anschluss daran werden die Reaktionsgefäße für eine Minute auf Eis abgekühlt. Danach werden je 8 µl des Mastermixes zu jedem Ansatz hinzugegeben.

Mastermix:

| | Volumen |
|-----------------------|---------|
| 5 x Puffer | 4 µl |
| 0,1 M DTT | 2 µl |
| 10 mM dNTP's | 1 µl |
| Reverse Transkriptase | 1 µl |
| Gesamtvolumen | 8 µl |

Der Ansatz wird für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Abschließend wird der Ansatz mit 20 µl DEPC-Wasser aufgefüllt, sodass eine Endkonzentration von 1µg/ml entsteht.

3.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR) erlaubt es, in vitro eine enorme Anzahl von Kopien einer spezifischen DNA-Sequenz zu produzieren (Saiki et al., 1985; Mullis and Faloona, 1987). Dazu nutzt man bestimmte Eigenschaften der DNA-Replikation. Eine DNA-Polymerase erzeugt aus dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphate) Kopien von Teilen der vorgelegten cDNA. Die von der Polymerase als Matrize benötigte Einzelstrang-DNA erzeugt man durch Erhitzen doppelsträngiger DNA fast bis zum Siedepunkt. Für den Start der DNA-Synthese braucht die Polymerase jedoch ein kurzes Stück doppelsträngige DNA. Durch Zugabe eines Paares verschiedener Oligonukleotidprimer, die sich komplementär an beiden Enden der gesuchten Sequenz anlagern, können Start- und Endpunkt der DNA-Synthese festgelegt werden. So erhält man als Produkt einen ganz speziellen, von den Bindungsstellen der Primer flankierten DNA-Strang. Jeder der so neusynthetisierten Stränge enthält wiederum Primer-Bindungsstellen und kann bei einer erneuten Polymerisation wie der Altstrang als Matrize dienen. Die Zunahme der Kopienzahl des Fragments erfolgt daher nicht linear, sondern exponentiell. Durch mehrfache Wiederholung eines Temperaturzyklusses in einem Thermocycler werden die Reaktionsschritte (1) Trennung der Doppelstränge (Denaturierung, 94°C), (2) Anlagerung der Primer (Annealing, 50-60°C) und (3) Elongation (72°C) so oft durchlaufen, bis das gewünschte Fragment in ausreichender Kopienzahl vorliegt. Nach n Reaktionszyklen enthält das Reaktionsgemisch ein theoretisches Maximum von 2^n doppelsträngigen DNA-Molekülen, die Kopien der Sequenz zwischen den Primern darstellen (Watson et al., 1992). Die Anzahl der Reaktionszyklen wird üblicherweise

zwischen 25 und 40 gewählt, je nach Menge der Ausgangs-cDNA. Ein Erhöhen der Zykluszahl ergibt nicht notwendigerweise eine größere Menge an PCR-Produkt, sondern kann zur Bildung von unspezifischen Produkten führen. Die PCR ist so sensitiv, dass sich selbst einzelne Moleküle zu nachweisbaren Mengen amplifizieren lassen.

In der vorliegenden Arbeit werden je 1 µg cDNA mit folgendem Reaktionsansatz inkubiert:

| | Volumen |
|-----------------------------------|----------|
| cDNA | 2 µl |
| Primer Mix | 0,6 µl |
| 10 mM dNDP's | 0,6 µl |
| 10 x Buffer (-MgCl ₂) | 3 µl |
| 50 mM MgCl ₂ | 0,9 µl |
| RNase-freies Wasser | 22,72 µl |
| Taq-Polymerase | 0,18 µl |
| Gesamtvolumen | 30 µl |

Es wird ein PCR-Programm mit 40 Reaktionszyklen angewendet, die einzelnen Reaktionsschritte werden wie folgt festgelegt:

| | Schritt | Temperatur | Zeit |
|---|-------------------------|------------------|--------|
| 1 | Vordenaturierung | 94 °C | 3 min |
| 2 | Denaturierung | 94 °C | 30 sec |
| 3 | Annealing | primerspezifisch | 30 sec |
| 4 | Elongation | 72 °C | 45 sec |
| | 40 Zyklen Schritt 2 – 4 | | |
| 5 | Elongation | 72 °C | 10 min |

Die Annealing-Temperatur wird nach Angaben von Baldino et al. (1989) errechnet und beträgt für die Primer für NGF 61 °C. Als Negativkontrolle wird die cDNA im Reaktionsansatz durch Wasser ersetzt. Die PCR-Produkte werden durch die Agarosegel-Elektrophorese identifiziert.

Für die RT-PCR werden folgende Primer verwendet:

| <u>Primer</u> | | <u>Sequenz</u> | <u>Produktl.</u> |
|---|--------------------------------|--|------------------|
| NGF β Ta: 61°C | Sense Tm: 53,9°C | 5'-ATA AGA CCA CCG CCA CAG AC- 3' | 298 bp |
| NGF β Ta: 61°C | Antisense Tm: 54,6°C | 5'-GCA GGT CAG GCT CTT CTC AC- 3' | 298 bp |
| | | | |

3.8.1. Agarosegel-Elektrophorese

Im Anschluss an die RT-PCR wird die amplifizierte DNA elektrophoretisch aufgetrennt. Nukleinsäuren haben aufgrund der negativen Nettoladung ihrer Phosphatgruppen die Fähigkeit in einem elektrischen Feld zur Anode zu wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit durch die Maschen-Struktur des Agarosegels ist von der Größe und Form der Nukleinsäuren abhängig. Dazu wird ein 2%iges Agarosegel verwendet. 2g Agarose werden in 100 ml 1xTAE-Puffer durch wiederholtes Erhitzen in der Mikrowelle vollständig gelöst und mit Ethidiumbromid versetzt. Mit Hilfe eines Gelschlittens und einer Gießkammer wird unter Verwendung eines Kammes ein Gel mit Taschen gegossen. Sobald die Agarose erstarrt ist, wird das Gel in eine Elektrophoresekammer gegeben und Elektrophoresepuffer (1xTAE-Puffer) zugegeben, bis das Gel knapp bedeckt ist. Damit die DNA in dem Elektrophoresepuffer nicht aufschwimmt, werden die Impfschlitze mit einem Gemisch aus 10 μ l DNA und 1 μ l Ladepuffer beschickt. Zusätzlich wird eine Geltasche mit einem Größenmarker (*100 bp DNA Ladder, Promega, WI, USA*) beschickt, um nach der Elektrophorese die spezifischen DNA-Banden identifizieren zu können. Anschließend wird eine Spannung von 80 - 120 Volt bei 180 mA angelegt. Der im Ladepuffer enthaltene niedermolekulare Farbstoff Bromphenol Blau dient als Farbmarker, um den Verlauf der Elektrophorese beurteilen zu können. Ist die DNA ausreichend weit im Gel gelaufen, werden die nun voneinander getrennten DNA-Fragmente im Gel durch Fluoreszenz bei 366nm auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und mit Hilfe der Herolab E.A.S.Y 429K Photo-Dokumentationsanlage digital abgespeichert und ausgedruckt (Sony Digital Graphic

Printer UP-D890). Die im Ergebnisteil dargestellten Abbildungen sind einzelne, repräsentative Auswertungen von PCR-Reaktionen. Nur PCR-Resultate, die in der Wiederholung identische Expressionsmuster aufweisen, werden im Ergebnisteil berücksichtigt.

3.9. Proteinisolierung

Die intrazellulären Zytosol- und Kernproteine müssen zuvor aus den zu untersuchenden Zellen und Geweben isoliert werden, um sie später für die Western Blot Analyse einsetzen zu können.

3.9.1. Aus Zellen

Zu Beginn werden die Zellen mit Hilfe von Trypsin von den Kulturflaschenböden abgelöst, in PBS aufgenommen und 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, das entstandene Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und erneut für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wird das Pellet in frisch zubereiteten Zellysepuffer (150 µl Triton-Puffer + Proteaseninhibitor 2 µl / 1 ml Triton) lysiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Lösung erneut 5 min bei 130000 rpm zentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen Proteine werden in ein neues Eppendorf Tube überführt und deren Konzentration mittels Bradford-Methode (siehe 3.10.) bestimmt.

3.9.2. Aus Gewebe

Die Gewebeproben werden für den Gewebeaufschluss mit einem Mörser und Pistill direkt in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermahlen. Das Gewebepulver wird bis zur 200 µl Markierung eines 2 ml Eppendorf Tube gefüllt, mit 300 µl Ripa-Puffer versetzt und mit einem Rotor-Stator-Homogenisator aufgeschlossen und dabei zugleich in dem Lysepuffer homogenisiert. Anschließend wird Phosphataseninhibitor (1 ml/100 ml) und Proteaseninhibitor (2 µl/1 ml) hinzugefügt. Dieses Gemisch wird 30 min auf Eis inkubiert und im Anschluss daran für 30 min mit 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Die im Überstand gewonnenen Proteine werden in ein 1,5 ml Eppendorf Tube überführt und die Proteinkonzentration mit Hilfe der Bradford-Methode (siehe 3.10.) gemessen.

3.10. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1979) ist eine der gebräuchlichsten kolorimetrischen Methoden. Sie beruht auf der Stabilisierung des Farbstoffs Coomasie Brilliant Blue G-250 durch ionische Wechselwirkungen mit den kationischen Aminogruppen der Proteine im sauren Milieu. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm und verursacht in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration eine intensive Blaufärbung. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung.

Die Proteinbestimmung wird mit Hilfe des Protein Assay Kits von Bio-Rad bestehend aus Farbstoff, Ethanol und Phosphorsäure durchgeführt. In einer Einmal-Küvette wird 1 µl der zu bestimmenden Proteinlösung mit 200 µl des Bradford-Reagenz versetzt und mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt. Die Proteinkonzentration der Proben wird durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Spektrophotometer (Ultrospec 3300 pro, Amersham Bioscience) bestimmt. Mit Hilfe einer Standard-Proteineichkurve die vorher mit dem im Kit enthaltenen Rinderserumalbuminstandard erstellt wurde, wird der Umrechnungsfaktor der optischen Dichte zu µg Gesamtprotein errechnet (0,0781) und damit der Proteingehalt (µg/µl) bestimmt. 800 µl destilliertes Wasser und 200 µl Bradford-Reagenz in einer Einmal-Küvette dienen als Leerwert. Die isolierten und gemessenen Proteine werden anschließend bei -80°C gelagert. Mit der Bestimmung der Proteinkonzentration wird gewährleistet, dass bei späteren Analysen gleiche Proteinmengen eingesetzt werden.

3.11. SDS-Gelelektrophorese und Western Blot Analyse

Zur Analyse von Proteingemischen werden die Proteine nach der Laemmli-Methode (1972) unter denaturierenden Bedingungen in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Natrium Dodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz und besteht aus einer aliphatischen Kette von 12 C-Atomen mit einer hydrophilen Sulfatgruppe. Diese Kette lagert sich entlang der Aminosäurenkette der Proteine an und bildet einen SDS-Proteinkomplex, dessen Oberfläche nach außen gerichtete, negative Sulfatgruppen aufweist. Somit wird die Eigenladung des Proteins im Vergleich zur negativen Gesamtladung des SDS-Proteinkomplexes vernachlässigbar. Alle Proteine sind damit über ein konstantes Ladung/ Massen -Verhältnis vergleichbar und die Mobilität des Proteins ist somit proportional zum Molekulargewicht.

Das Polyacrylamid-Gesamtgel setzt sich aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammen, deren Konzentration entsprechend der zu erwartenden Proteingröße variiert werden kann. In den vorliegenden Versuchen werden Gele mit einer Acrylamidkonzentration von 10 % verwendet. Dadurch ist es möglich, eine Auftrennung von Proteinen zu erreichen, deren Molekulargewicht zwischen 10 und 60 kDa liegt.

Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

| Bestandteil | 10% Trenngel | 4% Sammelgel |
|----------------------|--------------|--------------|
| Acrylamid (30%) | 3,32 ml | 1 ml |
| Sol. 2 | 2,5 ml | - |
| Sol. 3 | - | 2,5 ml |
| Destilliertes Wasser | 4,18 ml | 6,5 ml |
| TEMED | 20 µl | 20 µl |
| APS 10% | 100 µl | 100 µl |

Zu Beginn wird das 10 %-ige Trenngel in eine Vertikalgelkammer gegossen und mit gesättigtem Butanol bedeckt, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach vollständiger Polymerisation des Gels wird das Butanol restlos entfernt und das Sammelgel aufgegossen, in das zur Ausbildung von Probenaschen ein Kamm eingesetzt wird. Im Anschluss an die Polymerisation des Sammelgels wird das fertige Gel in die Elektrophoresekammer gespannt, die mit Elektrophoreselaufpuffer 1 x SDS-Page-Puffer gefüllt wird und der Kamm entfernt. Abschließend werden 30-40 µg der Proteine mit 15 µl Probenpuffer aufgetragen, nachdem die Proben für 5 min bei 90 °C denaturiert und 9000 rpm kurz an zentrifugiert worden sind. In die erste Tasche werden 5 µl des Molekulargewichtstandards pipettiert (5 µl SeeBlue Plus 2) und in die verbleibenden leeren Taschen werden 10 µl des Probenpuffers gefüllt, um einen gleichmäßigen Lauf zu gewährleisten. Die elektrophoretische Trennung erfolgt bei 125 V für 90 min.

3.12. Western Blot

Bei der Western Blot Analyse werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus einem Polyacrylamid-Trenngel zum späteren immunologischen Nachweis mittels Sandwich-Verfahren auf eine geeignete Membran transferiert. Dazu wird das SDS-Gel luftblasenfrei auf eine Nitrocellulosemembran gelegt, die zuvor 15 min in Transferpuffer äquilibriert wurde. Es folgen sowohl zur Anode als auch zur Kathode hin zwei Lagen

mit Transferpuffer angefeuchtetes Filterpapier und zwei bis drei Lagen Schwämme. Alle vier Sandwichkomponenten (SDS-Gel, Filterpapier, Nitrocellulosemembran, Schwamm) werden auf Gelgröße zugeschnitten und zwischen Anode und Kathode gepresst.

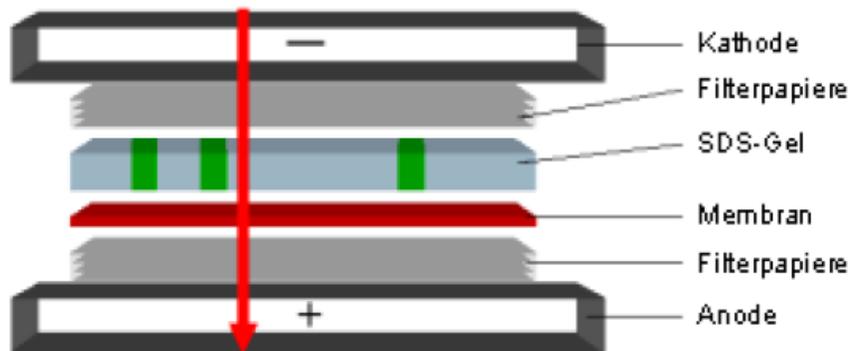


Abb. 1: Schematische Zeichnung eines Western Blot Aufbaus

Anschließend erfolgt der Elektrotransfer (Blot) der Proteine für 90 min bei 25 V und 125 mA. Die Effizienz des Western Blot Transfers wird durch Anfärben der Membran mit dem reversiblen Farbstoff Ponceau S kontrolliert. Dazu wird die Membran für fünf Minuten in der Ponceau S Farblösung geschwenkt und anschließend mit Wasser entfärbt. Hierbei werden die Proteinbanden sichtbar. Der nachfolgende immunologische Nachweis wird durch die Färbung nicht beeinflusst.

Zu Beginn der Antikörperreaktion erfolgt für eine Stunde die Inkubation der Membran mit 5%igem Milchpulver in TBS-T für NGF und ProNGF, um alle unspezifischen Proteinbindungsstellen zu blockieren. Danach wird die Membran mit der primären Antikörperlösung über Nacht bei 4°C in verschließbaren 50 ml Polypropylenzentrifugenröhrchen auf einem Kippröller inkubiert. Am nächsten Tag wird die Membran dreimal für 15 min mit TBS-T gespült, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wird die Membran mit dem sekundären Antikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Um den störenden Hintergrund zu entfernen werden mehrere Waschstufen mit TBS-T und TBS angeschlossen. Alle weiteren Schritte zur Sichtbarmachung der Proteine werden mit Hilfe der Enhanced Chemoluminescence (ECL) Methode durchgeführt. Dazu wird die Membran 5 min mit jeweils 2 ml ECL-1 und ECL-2- Gemisch inkubiert. Die am Sekundärantikörper haftende Meerrettich-Peroxidase oxidiert unter alkalischen Bedingungen in Gegenwart von Wasserstoffperoxid das zyklische Diacylhydrazid Luminol. Dadurch befindet sich das Luminol kurzzeitig in einem angeregten Zustand. Dieser Zustand wird unter

Emission von Lichtquanten wieder verlassen. Phenole verstärken die Reaktion um das 1000-fache und verlängern sie darüber hinaus noch. Die Chemolumineszenz auf dem Blot wird in der Dunkelkammer durch das Auflegen eines Röntgenfilms und die damit verbundene Schwärzung lokalisiert. Die Dauer des Auflegens (Belichtungszeit) richtet sich nach der Menge des zu detektierenden Proteins oder der Qualität der Antikörpersysteme und variiert zwischen 5 und 60 Minuten.

3.13. Immunhistochemie

Es werden Gewebeproben (14x gesunde Tränendrüse, 14x gesunde Konjunktiva, 14x gesunde Cornea, 14x gesunder Tränenweg) mittels Immunhistochemie untersucht. Dazu werden die Präparate wie folgt aufbereitet:

- Fixierung der Gewebeproben in 4% Paraformaldehyd für 24 Stunden
- Auswaschen der Fixierlösung (24 Stunden fließend wässern)
- Entwässern mit Xylol in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% -100%)
- Einbettung in Paraplast

Mit dem Grundschlittenmikrotom der Fa. Leitz werden Paraffinschnitte von 7µm Schnittstärke angefertigt und auf HistoBond Adhesion Micro Slides (Marienfeld, Germany) aufgebracht. Für jede Probe wird eine Negativkontrolle durchgeführt, die statt des Primärantikörpers mit TBS-Puffer inkubiert wird.

Als Positivkontrollen dienen Hautschnitte an Merkelzellen im Stratum papillare in denen bereits der Nachweis beider Wachstumsfaktoren erfolgte (Hermes et al., 2001).

Für die immunhistochemischen Untersuchungen werden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Primärantikörper verwendet.

| Antikörper | Klonalität | Code | Donor | Verdünnung | Hersteller |
|--------------------|------------|--------|--------|------------|------------|
| Anti- NGF- β | Polyklonal | AB1526 | Rabbit | 1: 500 | Chemicon |
| Anti-ProNGF | Polyklonal | AB9040 | Rabbit | 1: 250 | Chemicon |

3.13.1. Immunhistochemischer Nachweis eines Epitopes

Zur Darstellung der Existenz und der Verteilung zellulärer Protein in Geweben wird die Immunhistochemie angewandt. Am ersten Tag werden die Objektträger mit den Gewebeschnitten mit Datum, Gewebeart und der Antikörperverdünnung beschriftet. Anschließend werden sie in Küvetteneinsätze sortiert und über Nacht bei 60°C in den Wärmeschrank gestellt, um das Herauslösen des Paraffins zu erleichtern. Am nächsten Tag werden die Paraffinschnitte in Xylol entparaffiniert und in der absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Endogene Peroxidasen werden mit 3%igem Wasserstoffperoxid geblockt. Die Schnitte werden zur Darstellung der Wachstumsfaktoren NGF und ProNGF zur Epitopdemaskierung in der Mikrowelle nach dem Verfahren von Cattoretti (1993) vorbehandelt. Hierzu werden die Schnitte in eine mit Natriumcitratpuffer (pH 6,0) gefüllte Plastikschale gestellt und für ca. 10 min in der Mikrowelle gekocht. Nach 5 min wird der Vorgang kurz unterbrochen, um den bereits verdampften Natriumcitratpuffer zu ersetzen. Danach lässt man die Schnitte 20 min abkühlen und spült sie abschließen dreimal mit TBS-Puffer.

Zur Verhinderung einer übermäßig starken, unspezifischen Hintergrundfärbung werden die Schnitte mit Normalserum entsprechend dem Donor des Sekundärantikörpers geblockt. Nach 20 min wird das Serum abgeklopft und die Gewebeschnitte anschließend mit dem Avidin/Biotin Blocking Kit behandelt. Nach dem Spülen mit TBS-Puffer wird der Primärantikörper entsprechend den Angaben der Hersteller mit TBS-Puffer verdünnt, auf die Schnitte aufgebracht und bei 4°C über Nacht inkubiert. Am dritten Tag folgt erneutes Spülen in TBS-Puffer und die Inkubation der Schnitte mit dem entsprechenden biotinylierten Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Als Sekundärantikörper wurde ein Dako Swine anti Rabbit Antibody in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Nach abgelaufener Inkubationszeit mit dem Sekundärantikörper werden alle Schnitte dreimal 5 Minuten in TBS-Puffer gespült. Es folgt eine weitere Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Strept-Avidin-Biotin-Komplex für 30 min. Nach abschließendem Spülen in TBS-Puffer werden die Schnitte mit einem AEC

Chromogen inkubiert. Hieraus resultiert bei Vorhandensein des Antigens ein rotes Reaktionsprodukt. Diese Färbemethode basiert auf folgender Grundlage: Streptavidin und Avidin (Hühnereiweiß) zeigen eine hohe Affinität für Biotin und reagieren mit dem zuvor eingesetzten biotinylierten Sekundärantikörper, sodass ein Komplex entsteht. Die Enzymaktivität der Peroxydase wird genutzt, um ein geeignetes Substrat in einen Farbstoff zu überführen. In der vorliegenden Arbeit wird 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) verwendet. AEC bildet unter Oxidation ein rotes Endprodukt, das alkohollöslich ist. Die Färbezeit richtet sich nach der gewünschten Intensität der rötlichen Färbung des Gewebeschnitts und schwankt zwischen einer halben Stunde und fünf Minuten. Nachdem eine rötliche Färbung sichtbar wird, werden die Schnitte auf eine gesonderte Ablage abgetropft und in destilliertes Wasser überführt. Abschließend werden alle Präparate für 30 Sekunden mit Hämalaun nach Meyer gegengefärbt, erneut mit destilliertem Wasser gespült und mit Aquatex eingedeckt. Die digitale Dokumentation erfolgt mit dem Photomikroskop der Fa. Zeiss. AEC ist empfindlich gegenüber fortschreitender Oxidation und starker Lichteinwirkung, so dass die Lagerung der Schnitte im Dunkeln erfolgen muss.

4. Ergebnisse

4.1. Nachweis der Wachstumsfaktoren auf RNA-Ebene

4.1.1 RT-PCR

Die Untersuchungen dienen dem Nachweis der Expression von NGF verschiedener Gewebe der Augenoberfläche und des Tränenapparates sowie in humanen Augenoberflächenzelllinien. Im Folgenden wird nach der Kontrollaufnahme mit β -Aktin ein Beispiel einer Gelfotographie der Zell- und dann der Gewebeproben gezeigt.

4.1.2. RT – PCR: β -Aktin

Das als interne Kontrolle verwendete Housekeeping gene β -Aktin zeigt, dass die Reaktion funktioniert.

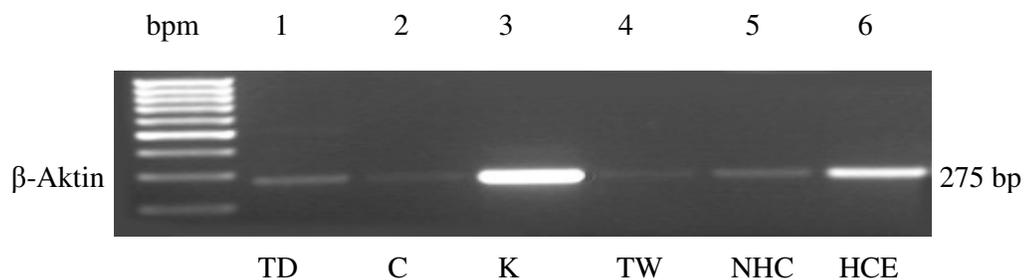


Abb.2 Expression von β -Aktin in Geweben und Zelllinien.

TD – Tränendrüse (Reihe 1), **C** – Cornea (Reihe 2), **K** – Konjunktiva (Reihe 3), **TW** – ableitende Tränenwege (Reihe 4), **NHC** humane Konjunktiva-epithelzelllinie (IOBA-NHC – spontan immortalisiert, Reihe 5); **HCE** humane corneale Epithelzelllinie (mit SV40 transfiziert, Reihe 6); **bp** – Basenpaare, **bpm** – Basenpaarmarker.

4.1.3. RT-PCR: NGF Zellen

NGF lässt sich in beiden Zelllinien, sowohl in der Corneaepithelzelllinie (HCE) als auch in der Bindehautzelllinie (IOBA-NHC) und in allen Geweben (Tränendrüse, ableitende Tränenwege, Konjunktiva und Cornea) nachweisen (Abb. 3 und 4).

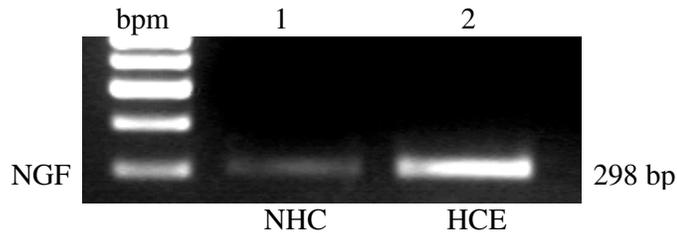


Abb.3 Expression von **NGF** in Zelllinien.

Nachweis von NGF in der humanen Konjunktivaepithelzelllinie – **NHC** (IOBA-NHC – spontan immortalisiert), Reihe 1; Nachweis von NGF in der humanen cornealen Epithelzelllinie – **HCE** (mit SV40 transfiziert), Reihe 2; **bp** – Basenpaare; **bpm** – Basenpaarmarker.

4.1.4. RT-PCR: NGF Gewebe

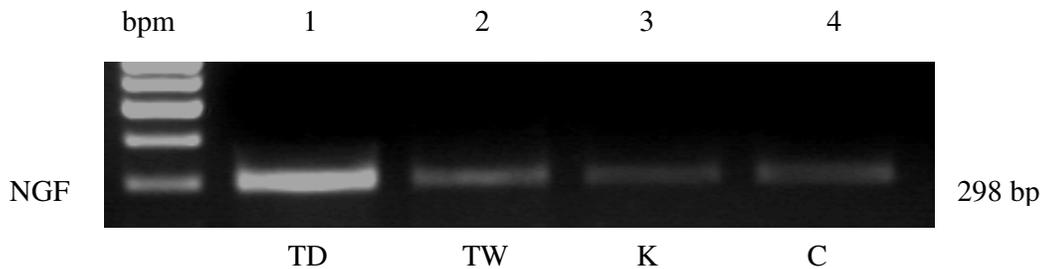


Abb.4 Expression von **NGF** in Geweben.

Nachweis von NGF in: Tränendrüse - **TD**, Reihe 1; ableitenden Tränenwegen - **TW**, Reihe 2; Konjunktiva – **K**, Reihe 3; Cornea - **C**, Reihe 4; **bp** – Basenpaare; **bpm** - Basenpaarmarker; Die Produktlänge beträgt 298 Basenpaare.

4.2. Nachweis der Wachstumsfaktoren auf Proteinebene

4.2.1. Western Blot

Die Expressionsstudie lässt sich auf Proteinebene mittels Western Blot bei allen Konjunktiva-, Tränendrüsen- und ableitenden Tränenwegspräparaten für NGF bestätigen. In den untersuchten Corneaprobe ist mit dem Blottingverfahren kein Nachweis von NGF und ProNGF erbringbar. Parallel werden für beide Proteine Positivkontrollen von gesunder Haut mitgeführt, die einen positiven NGF-/ProNGF-Nachweis verifizieren.

4.2.2. Western Blot: NGF Gewebe

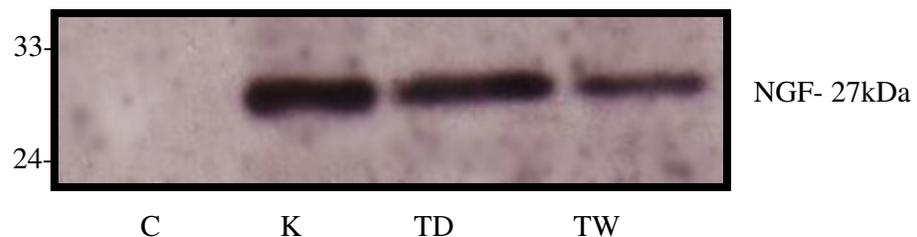


Abb.5 Western Blot Analyse von **NGF** in Geweben

Kein Nachweis von NGF in Cornea – **C**, Reihe 1; Nachweis von NGF in Konjunktiva – **K**, Reihe 2; Tränendrüse – **TD**, Reihe 3; und ableitenden Tränenwegen – **TW**, Reihe 4.

AK-Verdünnung: 1:250, Marker von 33kDa bis 24kDa

Auf Proteinebene lässt sich NGF bei 27 kDa mittels Western Blot nach 30 min. Belichtungszeit im Gewebe von Konjunktiva, Tränendrüse und ableitenden Tränenwegen nachweisen, nicht jedoch in Corneaprobe (Abb.5).

4.2.3. Western Blot: ProNGF Gewebe

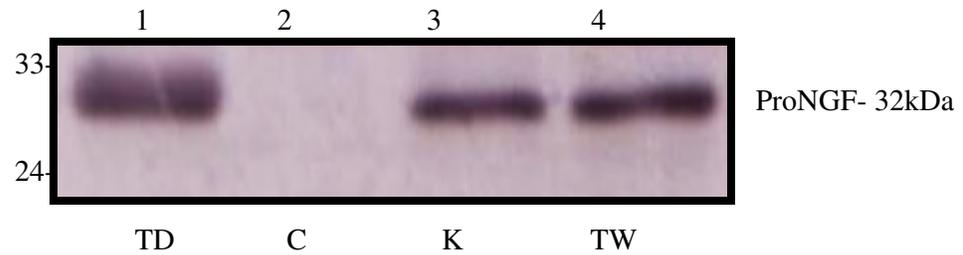


Abb.6 Western Blot Analyse von **ProNGF** in Geweben

Nachweis von ProNGF in Tränendrüse – **TD**, Reihe 1; Konjunktiva – **K**, Reihe 3; ableitenden Tränenwegen – **TW**, Reihe 4; kein Nachweis von ProNGF in der Cornea – **C**, Reihe 2.

AK-Verdünnung: 1:500, Marker von 33kDa bis 24 kDa

ProNGF lässt sich mittels Western Blot in Gewebeproben aus Tränendrüse, Bindehaut und ableitende Tränenwegen bei 32 kDa nach 30 min. Belichtungszeit aktivieren. Der Nachweis für Hornhautgewebe fällt negativ aus (Abb. 6).

4.3. Immunhistochemie

Mittels Immunhistochemie werden nach der Avidin-Biotin-Methode Gewebeproben gesunder Tränendrüsen, Konjunktiven, Corneae und ableitender Tränenwege untersucht.

Im Folgenden wird jeweils beispielhaft eine lichtmikroskopische Aufnahme pro Gewebe und Wachstumsfaktor gezeigt.

Der immunhistochemische Nachweis von NGF und ProNGF in den verschiedenen Geweben zeigt sich am roten Reaktionsprodukt.

Die folgende Tabelle gibt auf beide Wachstumsfaktoren bezogen eine Übersicht des Nachweises positiver Reaktionsprodukte zur Anzahl aller Präparate in den unterschiedlichen Geweben wieder.

Tab. 1: Übersicht der Untersuchten Präparate für NGF und ProNGF für die Anzahl der Gewebeproben mit positivem Reaktionsprodukt.

| <i>Präparat</i> | <i>NGF positiv</i> | <i>ProNGF positiv</i> |
|----------------------------|--------------------|-----------------------|
| Tränendrüse n=14 | 0/14 | 0/14 |
| Konjunktiva n=14 | 10/14 | 14/14 |
| Cornea n=14 | 0/14 | 0/14 |
| Limbusendothel n=14 | 14/14 | 14/14 |
| Ableitende Tränenwege n=14 | 11/14 | 14/14 |

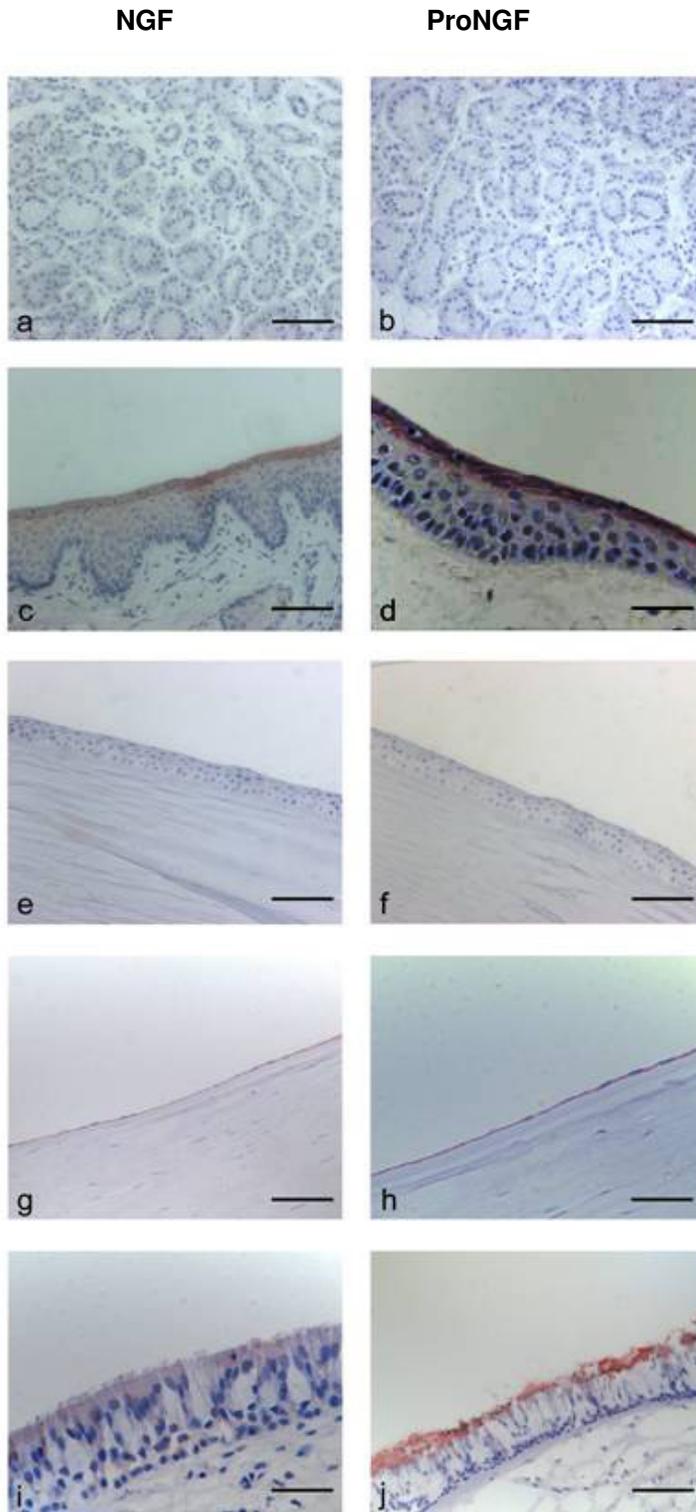


Abb.7

Immunhistochemischer Nachweis von NGF und ProNGF in der Tränendrüse, Konjunktiva, Cornea und den ableitenden Tränenwegen an Paraffin-schnitten. NGF und ProNGF sind jeweils an dem roten Reaktionsprodukt erkennbar. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun.

a Tränendrüse in 20-facher Vergrößerung ohne Nachweis von NGF.

b Tränendrüse in 20-facher Vergrößerung ohne Nachweis von ProNGF.

c Konjunktiva in 20-facher Vergrößerung mit NGF-Nachweis in Epithelzellen.

d Konjunktiva in 40-facher Vergrößerung mit positivem Nachweis von ProNGF in superfiziellen Epithelzellen.

e Cornea (Epithel und Struma) in 20-facher Vergrößerung ohne Nachweis von NGF.

f Cornea (Epithel und Struma) in 20-facher Vergrößerung ohne Nachweis von ProNGF in Epithel und Matrix.

g Corneaendothel (Limbus) in 20-facher Vergrößerung mit Nachweis von NGF im Endothelbereich.

h Corneaendothel im Limbus-bereich 20-fach vergrößert mit positivem Nachweis von ProNGF.

i Ableitender Tränenweg in 40-facher Vergrößerung mit positivem Nachweis von NGF in den Epithelzellen.

j Ableitender Tränenweg 20-fach vergrößert mit Nachweis von ProNGF in den Becherzellen und epithelaufgelagertem Reaktionsprodukt. Der Balken in **a, b, c, e, f, g, h** und **j** entspricht 61.9µm; in **d** und **i** 39,3µm.

4.3.1. Tränendrüse

Der immunhistochemische Nachweis von NGF und ProNGF gelingt mittels Avidin-Biotin-Methode an keiner der 14 untersuchten Gewebeproben der Tränendrüse. Auch im Bereich der Ausführungsgänge ist kein rotes Reaktionsprodukt bei allen 14 untersuchten serösen Drüsen erkennbar (Abb. 7 a/b).

4.3.2. Konjunktiva

Mittels Avidin-Biotin-Methode gelingt der immunhistochemische Nachweis an Gewebeproben der Konjunktiva jeweils für NGF und ProNGF (Abb.7 c/d).

In Abb.7 c lässt sich NGF als rotes Reaktionsprodukt im Zytoplasma der Epithelzellen darstellen. Dies wurde bei 10 der 14 Präparate beobachtet. ProNGF wird besonders in den oberen Schichten des mehrschichtigen Plattenepithels bei allen untersuchten Präparaten detektiert. Dies ist ebenso an dem roten Reaktionsprodukt zu erkennbar (Abb. 7 d).

Die Gegenfärbung erfolgt mit Hämalaun, das in beiden Abbildungen an den blau-violett angefärbten Zellkernen zu sehen ist.

4.3.3. Cornea

Corneaepithel:

Im Corneaepithel wird insgesamt kein immunhistochemischer Nachweis von NGF und ProNGF mittels Avidin-Biotin-Methode erbracht. Sowohl Corneaepithel, als auch Bowman Membran und Stroma weisen keine Antikörperreaktion auf. Die Zellkerne sind nach Gegenfärbung mit Hämalaun blau-violett angefärbt (Abb. 7 e/f).

Corneaendothel (Limbusregion):

Im Gegensatz zum Corneaepithel aus der zentralen Cornearegion kommt es bei allen untersuchten Präparaten im Corneaendothel im Limbusbereich mittels Avidin-Biotin-Methode zu einer positiven Reaktion für NGF und ProNGF (Abb. 7 g/h).

Auf Abb. 7 g ist in der Matrix des Limbusendothels das rote Reaktionsprodukt des Wachstumsfaktors NGF dargestellt.

Das Reaktionsprodukt für ProNGF ist ebenso im Bereich des hinteren Cornealepithels zu sehen (Abb. 7 h).

Die einzelnen Zellkerne sind durch die Gegenfärbung mit Hämalaun blau-violett angefärbt.

4.3.4 Ableitende Tränenwege

Der immunhistochemische Nachweis von NGF und ProNGF mittels Avidin-Biotin-Methode gelingt in allen untersuchten Präparaten der ableitenden Tränenwege (Abb.7 i/j).

In Abb. 7 i wird das rote Reaktionsprodukt für NGF an den Ausführungsgängen der Becherzellen und der Matrix des mehrreihigen hochprismatischen Epithels dargestellt.

Den positiven Nachweis für ProNGF zeigt das rote Reaktionsprodukt im Bereich der Ausführungsgänge, der Matrix und der Becherzellen. Die intensiv rotgefärbten Auflagerungen sind Artefakte des Farbstoffes, die der Oberfläche der Epithelzellen angelagert sind (Abb. 7 j).

Die Zellkerne sind, wie bei den vorherigen Abbildungen, durch die Hämalaungegenfärbung blau-violett angefärbt.

5. Diskussion

5.1. Expression von NGF und ProNGF in der Tränendrüse, der Konjunktiva, der Cornea und den ableitenden Tränenwegen

Das strukturell unter den Neurotrophinen am besten beschriebene NGF ist ein Glykoprotein aus je 118 Aminosäuren pro Monomer, bestehend aus drei Untereinheiten $\alpha 2$, β , $\gamma 2$ (130 kDa) dessen Gene auf dem kurzen Arm von Chromosom1 liegen. β -NGF ist für die biologische Aktivität von NGF zuständig, γ -NGF ist eine hochspezifische Protease, welche die Pro-Form in das mature NGF prozessiert; α -NGF erscheint inaktiv (Sofroniew et al., 2001; Micera et al., 2007). Inzwischen konnte NGF nicht nur, wie der Name vermuten lässt, in neuronalem Gewebe nachgewiesen werden, sondern auch in zahlreichen anderen Geweben wie Plazenta, Retina, Cornea oder Haarfollikeln (Yardley et al., 2000; Lambiase et al., 2003; Lambiase et al., 2005; Lambiase et al., 2007; Qi et al., 2007). Gerade NGF, dessen biologische Aktivität sich nachgewiesenermaßen nicht nur auf das periphere und zentrale Nervensystem beschränkt, steht schon länger im Fokus der Wissenschaft (Lambiase et al., 2007; Lambiase et al., 2008; Micera et al., 2005; Micera et al., 2007). Das pleiotroph wirkende Protein findet hinsichtlich immunmodulierender Aspekte und seiner Aktivität im Rahmen der Wundheilung, insbesondere an der Augenoberfläche z.B. bei cornealen Ulzerationen, Beachtung (Micera et al., 2005; Lambiase et al., 2007). Seine wachstumsinduzierenden Eigenschaften eröffnen die Möglichkeit, erkrankte Augenoberflächen zu heilen oder den Heilungsprozess zu beschleunigen (Lambiase et al., 2008).

Die später entdeckte Vorform, ProNGF, liegt genauso wie reifer NGF in der aktiven Form als ein Homodimer vor (Bothwell and Shooter, 1977; Rattenholl et al., 2001a). Mit einer Länge von 113 Aminosäuren ist das Protein fast genauso groß wie das reife NGF-Monomer (Rattenholl, 2001).

Die Tatsache, dass ProNGF in Neuronen bei an Morbus Alzheimer erkrankten Patienten akkumuliert, lässt den Schluss zu, dass es sich nicht nur um ein Vorläuferprotein handelt, sondern um einen Faktor mit eigenen biologischen Funktionen (Fahnestock et al., 2001; Podlesniy et al., 2006).

ProNGF wird im Gegensatz zu seinem maturen Neurotrophin NGF rezeptorassoziiert eine zytodegenerative Wirkung zugesprochen (Nykjaer et al., 2004). Diese Tatsache steht mit einer höheren Affinität zu den Rezeptoren p75NTR (Lee et al., 2001; Harrington et al., 2004) und Sortilin (Nykjaer et al., 2003; Peterson et al., 1997) in Zusammenhang.

Auf mRNA-Ebene wurde in der vorliegenden Arbeit für NGF mittels RT-PCR der Nachweis in allen untersuchten Geweben erbracht. Diese Tatsache verdeutlicht, dass die sensitive Methode der RT-PCR die Analyse von sehr wenig mRNA in kleinen Gewebeproben zulässt (Nguyen et al., 1997). Für ProNGF konnte im PCR-Verfahren kein Nachweis angestellt werden, da aufgrund der großen Sequenzhomologie beider Proteine spezifische Primer nicht zu generieren waren (Qi et al., 2007; Rattenholl et al., 2001).

Der fehlende immunhistochemische Nachweis beider Proteine in den Gewebeproben der Tränendrüse lässt sich möglicherweise durch den schnellen postmortalen Untergang dieses empfindlichen Gewebes erklären (Obata, 2006). Kritisch betrachtet muss aber auch an einen methodischen Fehler gedacht werden, zumal der Nachweis im Western Blot und in RT-PCR für NGF und für ProNGF im Blottingverfahren erbracht werden konnte und die Proteine somit abgelesen werden. Zudem muss an eine Altersabhängigkeit und nicht bekannte Komorbiditäten der Spender gedacht werden. Ghinelli et al. (2003) haben zudem einen positiven Nachweis für NGF auf RNA- und Proteinebene in Tränendrüsen von Ratten erbracht. Ausserdem gelang die Quantifizierung von NGF in humaner Tränenflüssigkeit (Vessaluoma et al., 2000; Park et al., 2008).

Im Bindehautgewebe wurde mit allen dargestellten Methoden, in der Immunhistochemie in 10 von 14 Geweben, der Nachweis für NGF erbracht. Dieses Ergebnis stimmt mit den Arbeiten von Micera et al. (2005) und Qi et al. (2007) überein, die ebenfalls NGF in der Konjunktiva nachweisen konnten. Für ProNGF gelang der Nachweis mit allen angewandten Methoden uneingeschränkt. Mit den gleichen Methoden gelang dies bisher nur in der Retina von Nagern (Lebrun-Julien et al. 2010). Auf Proteinebene ließ sich immunhistochemisch in der vorliegenden Untersuchung im Corneaepithel aus dem Zentrum der Cornea keine Expression beider Wachstumsfaktoren nachweisen. Auch im Western Blot war mit den polyklonalen Antikörpern kein Nachweis beider Faktoren in den angegebenen Bandengrößen möglich. Im Rahmen dieser Erkenntnisse könnte von Interesse sein, dass Neurotrophine in multiplen Molekulargewichten vorkommen können. In den vorliegenden Geweben von Cornea und Limbus sind sie als Vorformen, als reife Formen, als Dimere und als glykolisierte Formen gegenwärtig (Qi et al., 2007). Der fehlende Nachweis im Corneaepithel des Zentrums der Cornea mittels Blotting-Verfahren könnte sich also mit der gegenwärtigen Proteinform der Wachstumsfaktoren in den Untersuchungspräparaten aber auch mit der relativ geringen Zelldichte dieses bradytrophen Gewebes erklären lassen, sodass die geringe Proteinkonzentration mit

den weniger sensitiven Methoden der Immunhistochemie oder des Blottings nicht dargestellt werden konnte.

Die Endothelzellen der Cornea exprimieren, wie immunhistochemisch gezeigt, beide Neurotrophine. Dieser Befund wird hinsichtlich NGF mit der Arbeit von Qi et al. (2007) verifiziert und wirft gleichzeitig die Frage nach der funktionellen Bedeutung dieser Proteine auf. Qi et al. (2007) schließen bei der topographischen Spezifität der Wachstumsfaktoren nicht aus, bestimmte Neurotrophine in Zukunft als Basalzellmarker im Limbusbereich zu benutzen, um corneale Epithelstammzellen zu charakterisieren.

NGF lässt sich in den ableitenden Tränenwegen mit allen drei angewandten Methoden nachweisen. Für ProNGF wird der Nachweis genauso mittels Immunoblot und Immunhistochemie erbracht.

Dieses deutliche Vorkommen könnte den Schluss einer hohen Aktivität bzw. Interaktion der Neurotrophine in jener Region zulassen. Bekannt ist, dass dem ableitenden Tränenweg außer der rein funktionellen Tränenableitung auch immunologische Bedeutung zukommt. Durch die anatomische Struktur der ableitenden Tränenwege, verbunden mit stark verzweigten, den Tränensack und den Tränennasengang umgebende Gefäßplexus sind durch Oberflächenvergrößerung, verlangsamten Abfluss und kurze Austauschwege günstige Bedingungen für ein komplexes Feedbacksystem geschaffen. Auf der Grundlage des MALT (mucosa associated lymphoid tissue) entstand so das TALT (tear duct associated lymphoid tissue). Das TALT weist zytomorphologische und immunologische Strukturen auf, die vergleichbar mit jenen im Gastrointestinaltrakt sind. Abwehrmechanismen des TALT sind durch antimikrobielle Peptide, Immunglobuline (IgA) und immunkompetente Zellen wie Makrophagen und Lymphozyten repräsentiert. Aufsteigende Infektionen der Nase oder absteigende Infektionen vom Auge führen zu Schwellungen der Mukosa, zur Neuordnung des Bindegewebes mit resultierender erhöhter Permeabilität, reaktiver Hyperämie und Temperaturerhöhung sowie zum vorübergehenden Verschluss der Tränenpassage. Diese pathophysiologischen Reaktionen könnten über einen Feedbackmechanismus aufgrund einer verminderten Resorption von Tränenflüssigkeitsbestandteilen unter diesen entzündlichen Konditionen eine reduzierte Tränenproduktion und damit die Basis des Trockenen Auges zur Folge haben. Eine fehlgeleitete Stimulierung des TALT könnte zu abweichendem Abwehrverhalten an der Augenoberfläche und damit zur autoimmunologischen Genese des Trockenen Auges führen (Paulsen, 2000; Paulsen, 2003; Paulsen et al., 2008).

Andererseits könnten aber auch die ableitenden Tränenwege genau wie konjunktivale Areale als antigenpräsentierende Oberfläche verstanden werden, die über den Blutkreislauf mit homöostatischen Vorgängen an der Augenoberfläche in Verbindung

stehen. Neurotrophine könnten auf ähnlichem Weg wie verschiedenste Antigene nach Zelluntergang mit erhöhter zygotischer Ausschüttung und/oder gesteigerter Expression direkt oder indirekt Steuerungsfunktionen in Richtung Regeneration oder auch Apoptose übernehmen. Versuche an dermalem Gewebe konnten in diesem Zusammenhang eine Hochregulation von Neurotrophinen durch pro-inflammatorische Zytokine, die bei Entzündungsvorgängen freigesetzt werden, zeigen (Bläsing et al., 2005). Dermale Zytokininjektionen mit Interleukin-1 β (IL-1 β), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interferon- γ (INF- γ) steigerten das Vorkommen von NGF, BDNF, NT-3, NT-4 und deren Rezeptoren Trk-A, Trk-B, Trk-C inklusive p75^{NTR} *in situ* (Bläsing et al., 2005). Umgekehrt wurde auch schon nachgewiesen, dass ProNGF eine gesteigerte TNF- α -Expression in Rattenretina induziert (Lebrun-Julien et al. 2010). Die Rezeptoren Trk-A, Trk-B und Trk-C wurden bereits in Corneaepithel und Stroma nachgewiesen (Qi et al., 2007; Girolamo et al., 2008). Somit sind die oben genannten Ergebnisse der gesteigerten dermalen Proteinexpression auf ihre Übertragbarkeit an Geweben und Zellen der Augenoberfläche und der ableitenden Tränenwege zu untersuchen.

5.2. Qualitative Unterschiede der Proteinexpression

Mittels RT-PCR Analyse wurde in allen untersuchten Gewebeproben der Nachweis von NGF erbracht. Hinsichtlich des Nachweises von NGF im Cornea- und Konjunktivagewebe wird diese Aussage durch die Arbeit von Qi et al. (2007) bestätigt. Nguyen et al. wiesen 1997 NGF in der Tränendrüse nach. Der Nachweis von NGF in den ableitenden Tränenwegen wird erstmals in der vorliegenden Arbeit erbracht.

ProNGF wurde bisher vor allem in neuronalen Geweben und neuronalen Zellkulturen detektiert (Sobottka et al., 2008; Podlesny et al., 2006). Im Zuge der in der vorliegenden Arbeit auf Proteinebene untersuchten Gewebe ist der ProNGF-Nachweis neu und wurde bisher noch nicht von anderen Arbeitsgruppen bestätigt.

5.3. Topographische Unterschiede der Expression innerhalb der Augenkompimente

Der in der vorliegenden Arbeit auf Proteinebene fehlende Nachweis von NGF und ProNGF in Epithel aus dem Zentrum der Cornea untermauert die Ergebnisse von Qi et al. (2007). In dessen Arbeit wurde mittels Western Blot sowie immunhistochemisch NGF im Gegensatz zu anderen untersuchten Neurotrophinen wie BDNF, NT3 und NT4, die ubiquitär in der Cornea präsent sind, nur in basalen humanen Limbusendothelzellen nachgewiesen.

Obwohl NGF im cornealen Stroma nicht nachweisbar war, bleibt seine Rolle in Bezug auf Wundheilung, epitheliale Regeneration und Homöostase der Augenoberfläche interessant, da drei seiner Rezeptoren (TrkA [Girolamo et al., 2008] TrkB und TrkC [Qi et al., 2007]) alle im Epithel und im Stroma nachweisbar sind. Es ist also eine epithelial-mesenchymale Interaktion mit Auswirkung auf die Augenoberfläche vermutbar (Qi et al., 2007).

Der Rezeptor p75NTR wird allerdings nur selektiv von den Basalzellen der Konjunktiva und des Limbus exprimiert und war nicht im Corneaepithel aus dem Zentrum der Cornea nachweisbar (Girolamo Di et al., 2008; Qi et al., 2007). Daher werden biologische Effekte auch auf eine selektive Expression zurückgeführt (Girolamo Di et al., 2008).

Die im Rahmen der Einleitung erwähnten zytodegenerativen Auswirkungen im Sinne einer Apoptose durch die Bindung von ProNGF an p75NTR lässt analog die Überlegung einer Interaktion dieses Precursor-Proteins mit den jeweiligen Rezeptoren zu (Lee et al., 2001; Harrington et al., 2004). Aus diesem Grund könnte zukünftig untersucht werden, ob es bei Patienten, die an verschiedensten Augenerkrankungen leiden, wie z.B. Trockenem Auge, zu einer veränderten Rezeptorexpression insbesondere im Hinblick auf p75NTR hin zu suprabasalen Schichten der Cornea kommt.

Ein weiterer interessanter Rezeptor in Verbindung mit ProNGF ist der Neurotensin Rezeptor NTS3 (Sortilin). Diese Verbindung wurde bislang nur an Nervengewebe untersucht und muss noch auf die Augenoberfläche übertragen werden.

ProNGF hat im Zusammenhang mit der Bindung an p75 und Sortilin neurotoxische Eigenschaften. Da die Konzentration von ProNGF genau wie Sortilin in alternden zentralen und peripheren Neuronen steigt, wird ein Zusammenhang mit der altersbezogenen Hirnatrophie und Degeneration gesehen und angenommen, zukünftig dem ProNGF-induzierten Zelltod durch Sortilinrezeptorblockade entgegenwirken zu können (Al-Shawi et al., 2007; Clewes O et al., 2008).

5.4. Vorkommen des Wachstumsfaktors NGF in Zelllinien, die somit als Forschungsmodell dienen könnten

In den untersuchten Konjunktivaepithelzelllinien (IOBA-NHC) und Corneaepithelzelllinien (HCE) war NGF in der mRNA-Analyse detektierbar. Dieser Nachweis konnte auch trotz Zusatz eines Cortisonderivates im Nährmedium der Konjunktivaepithelzelllinie erbracht werden, das dem Nährmedium der Corneaepithelzelllinie nicht zugefügt wurde. Es wurde nämlich nachgewiesen, dass

sich der topische Einsatz von 0,1% Prednisolon supprimierend auf die NGF-Produktion in der Tränenflüssigkeit von Siccapatienten auswirkt (Lee et al., 2006). Aufgrund der mehrfach erfolgten Reproduzierbarkeit dieses Ergebnisses ist ein methodischer Fehler im hochsensitiven Verfahren der mRNA-Analyse auszuschließen. Die Expression von NGF lässt eine autokrine und eine parakrine Wirkung der Proteine auf die Augenoberfläche vermuten. Ein interessanter Ansatz könnte im Rahmen der Zellkultivierung sein, ob beispielsweise der Zusatz der Protease γ -NGF, die ProNGF in das mature NGF spaltet, zu gesteigerter Zellproliferation oder verminderter Apoptose führen könnte.

Der Nutzen der Zelllinien als zukünftiges Modell für die Augenoberfläche kann als besonders hoch eingestuft werden, um *in vitro* weitere Erkenntnisse zur Wirkungsweise und Interaktion der Wachstumsfaktoren zu gewinnen. Der in Corneagewebe ubiquitär erbrachte Nachweis der spezifischen NGF-Rezeptoren, TrkA, TrkB und TrkC lässt Effekte dieses Neurotrophins vermuten (Girolamo et al., 2008; Qi et al., 2007). Für den bisher ausschließlich in konjunktivalen Arealen selektiv nachgewiesenen p75-Rezeptor des ProNGF gelten ähnliche Bedingungen. Durch provozierte Rezeptorexpression, -applikation oder -blockade könnten sich so Therapieansätze für ophthalmologische Erkrankungen eröffnen.

5.5. Ausblick

Das Trockene Auge (Keratokonjunktivitis sicca) ist eine multifaktorielle Erkrankung der Augenoberfläche mit Symptomen wie Fremdkörpergefühl, Sehbeeinträchtigung und instabilem Tränenfilm. Dies kann letztlich zu schweren Schädigungen der Augenoberfläche mit Hornhauttrübung bis hin zur cornealen Erblindung führen. Bisher existieren hauptsächlich symptomatische Tränenersatztherapien, die chronisch angewendet Langzeitschäden reduzieren sollen. Zudem zeigt eine Prävalenz von 4,91 Millionen Amerikanern über 50 Jahren, die über ein Trockenes Auge in unterschiedlicher Abstufung klagen, die nicht zuletzt sozioökonomische Relevanz neuartiger Therapien.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse sollten durch weitere Forschungsvorhaben ergänzt werden, um die Komplexität der durch NGF und ProNGF vermittelten Effekte an der Augenoberfläche weiter aufzuklären. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang, den direkten Einfluss von NGF oder ProNGF *in vitro* unter bestimmten Bedingungen, beispielsweise Hypoxie, zu analysieren. Diese Möglichkeit wurde schon mit Neurotrophinen bei neuronalen Defekten ischämischer Genese untersucht (Abe, 2000) und könnte den Trophismus der Augenoberfläche störende

Faktoren, wie z.B. das Tragen von Kontaktlinsen simulieren. Im Tierversuch konnte bei Hunden mit Trockenem Auge nachgewiesen werden, dass durch die topische Anwendung von NGF die Tränenproduktion und die Dichte an konjunktivalen Becherzellen zunimmt (Coassi et al., 2005). Bei Ratten wurde ebenso ein Regulationseinfluss auf die Sekretion der konjunktivalen Becherzellen gezeigt (Rios et al., 2007). Lee et al. wiesen eine erhöhte NGF-Konzentration in Tränenflüssigkeit bei Patienten nach, die am Trockenen Auge erkrankt waren (Lee et al., 2006).

Das gesamte therapeutische Spektrum von Neurotrophinen im Rahmen neurologischer, neuropatischer, immunologischer, autoimmunologischer und ophthalmologischer Erkrankungen lässt sich bisher nur erahnen.

Lambiase et al. (2008) fanden beispielsweise im Jahr 2008 im Tierversuch an Herpes simplex Virus infizierten Kaninchen heraus, dass NGF antivirale Eigenschaften besitzt. NGF soll sogar eine ähnliche therapeutische Potenz besitzen wie das gängig eingesetzte Virostatikum Acyclovir, ohne jedoch dessen unerwünschte Nebenwirkungen aufzuweisen (Lambiase et al., 2008).

Im Rahmen der Therapie des Trockenen Auges ist zu hoffen, dass außer symptomatischen Therapieoptionen mit beispielsweise isotonischen, rehydrierenden Augentropfen nunmehr auch immunmodulatorisch versucht wird, den pathogenetischen Kreislauf zu durchbrechen, um diese Erkrankung und deren Folgen zu behandeln.

Es bleibt weiterer Forschung überlassen, ob zukünftig NGF appliziert wird (Bonini et al., 2000; Lambiase et al., 2003; Lambiase et al., 1998) oder durch das Stören der Bindung zwischen apoptotischem Liganden (ProNGF) und Rezeptor (p75NTR) Zellverlust verhindert werden kann (Harrington et al., 2004; Boutilier et al., 2008). Daraus könnten sich zukünftig Therapiemöglichkeiten hinsichtlich Erkrankungen der Augenoberfläche oder anderer, z.B. keratogener Erkrankungen, ableiten lassen (Micera et al., 2006). Weiterhin wird jedoch kontrovers diskutiert, ob Neurotrophin-Proformen proliferierend oder apoptotisch wirken (Fahnenstock et al., 2004a; Sobottka et al., 2008).

Die gewonnenen Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit dienen als Grundlage zum Verständnis der Wirkung der Neurotrophine NGF und ProNGF an der Augenoberfläche.

6. Literaturverzeichnis

Abe K: Therapeutic potential of neurotrophic factors and neuronal stem cells against ischemic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2000; **20**: 1393-1408.

Al-Shawi R, Hafner A, Chun S, Raza S, Crutcher K, Thrasivoulou C, Simons P, Cowen T: ProNGF, Sortilin, and age-related neurodegeneration. *N.Y. Acad. Sci.* 2007; **1119**: 208-215.

Araki-Sasaki K, Aizawa S, Hiramoto M, Nakamura M, Iwase O, Nakata K, Sasaki Y, Mano T, Handa H, Tano Y: Substance P-induced cadherin expression and its signal transduction in a cloned human corneal epithelial cell line. *J. Cell. Physiol.* 2000; **182**: 189-195.

Bekman E M, Denisenko M F, Grigor'ev M, Arion V: Autolytic degradation of RNA; the effect of various factors on the dynamics of the process. *Mol. Biol. (Mosk)* 1986; **20**: 527-535.

Bennett J L, Zeiler S R, Jones K R: Patterned expression of BDNF and NT-3 in the retina and anterior segment of the developing mammalian eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1999; **40**: 2996-3005.

Bibel M, Hoppe E, Barde Y A: Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptor Trk and p75NTR. *EMBO J.* 1999; **18**: 616-622.

Bläsing H, Hendrix S, Paus R: Pro-inflammatory cytokines upregulate the skin immunoreactivity for NGF, NT-3, NT-4 and their receptor, p75NTR in vivo: a preliminary report. *Arch. Dermatol. Res.* 2005; **296**: 580-584.

Bonini S, Lambiase A, Rama P, Caprioglio G, Aloe L: Topical treatment with nerve growth factor for neurotrophic keratitis. *Ophthalmology* 2000; **107**: 1347-1351.

Bothwell M A, Shooter E M: Dissociation equilibrium constant of beta nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 1977; **252**: 8532-8536.

Boutillier J, Ceni C, Pagdala P C, Forgie A, Neet K E, Barker P A: Proneurotrophins require endocytosis and intracellular proteolysis to induce TrkA activation. *J. Biol. Chem.* 2008; **19**: 12709-12716.

Bradshaw R A, Blundell T L, Lapatto R, McDonald N Q, and Murray-Rust J: Nerve growth factor revisited. *Trends Biochem. Sci.* 1993; **18**: 48-52.

Cassaccia-Bonnetil et al. 1996, Casaccia-Bonnetil P, Carter B D, Dobrowsky R T, Chao M V: Death of Oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* 1996; **383**: 716-719.

Clewes O, Fahey M S, Tyler S J, Watson J J, Seok H, Catania C, Cho K, Dawbarn D, Allen S J: Human ProNGF: Biological Effects and binding Profiles at TrkA, p75(NTR) and sortilin. *J. Neurochem.* 2008; **107**: 1124-1135.

Coassin M, Lambiase A, Costa N, De Gregorio A, Sgrulletta R, Sacchetti M, Aloe L, Bonini: Efficacy of topical nerve growth factor treatment in dogs affected by dry eye. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2005; **243**: 151-155.

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

Dry Eye Workshop Study (DEWS) Group. Research in Dry Eye: report of the research subcommittee of the international dry eye workshop (2007). *Ocul. Surf.* 2007; **5**: 1-194.

Fahnestock M, Michalski B, Xu B, Coughlin M D: The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimers disease. *Mol. Cell. Neurosci.* 2001; **18**: 210-220.

Fahnestock M, Yu G, Coughlin M D: ProNGF: a neurotrophic or an apoptotic molecule? *Prog. Brain Res.* 2004a; **146**: 107-110.

Frade J M, Rodriguez-Tebar A, Barde Y A: Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* 1996; **383**: 166-168.

Friedman W J: Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *J. Neurosci.* 2000; **20**: 6340-6346.

Girolamo Di N, Sarris M, Chiu J, Cheema H, Coroneo MT, Wakefield D: Localisation of the low affinity nerve growth factor receptor p75 in human limbal epithelial cells. *J. Cell Mol. Med.* 2008; **12**: 2799-2811.

Ghinelli E, Johansson J, Rios J D, Chen L-L, Zoukhri D, Hodges R R, Dartt D A: Presence and localization of neurotrophin receptors in rat lacrimal gland. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003; **44**, No. 8, 3352-3357.

Gong N, Pleyer U, Vogt K, Anegon I, Flügel A, Volk H-D, Ritter T: Local Overexpression of nerve growth factor in rat corneal transplants improves allograft survival. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007; **8**, No.3, 1043-1052.

Götz R, Köster R, Winkler C, Raulf F, Lottspeich F, Scharl M, Thoenen H: Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* 1994; **372**, 266-269.

Harrington A W, Leiner B, Blechschmitt C, Arevalo J C, Lee R, Mörl K, Meyer M, Hempstead B L, Yoon S O, Giehl K M: Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004; Vol. **101**: 6226- 6230.

Hermes B, Welker P, Feldmann-Bödderker I, Krüger-Krasagakes S, Hartmann K, Zuberbier T: Expression of mast cell growth modulating and chemotactic factors and their receptors in human cutaneous scars. *J. Invest. Dermatol.* 2001; **116**: 387-393.

Ip N Y, Ibáñez C F, Nye S H, McClain J, Jones P F, Gies D R, Belluscio L, Le Beau M M, Espinosa R, Squinto S P, Persson H, Yancopoulos G D: Mammalian neurotrophin-4 structure, chromosomal localization, tissue distribution and receptor specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992; **89**: 3060-3064.

Klein R, Nanduri V, Jing S A, Lamballe F, Tapley P, Bryant S, Cordon-Cardo C, Jones K R, Reichardt L F, Barbacid M: The trkB tyrosin protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 1991; **66**: 395-403.

Kliemann M, Golbik R, Rudolph R, Schwarz E, Lillie H: The pro-peptide of proNGF: Structure formation and intramolecular association with NGF. *Protein Sci.* 2007; **16**: 411-419.

Kogan S C, Doherty M, Gitschier J: An improved method for parenteral diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* 1987; **317**: 985-990.

Lai K O, Fu W Y, Ip F C, Ip N Y: Cloning and expression of novel neurotrophin NT-7. *Mol. Cell. Neurosci.* 1998; **11**: 64-76.

Lambiase A, Bonini S, Manni L, Ghinelli E, Tirassa P, Rama P, Aloe L: Intraocular production and release of nerve growth factor after iridectomy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002; **43**: 2334-2340.

Lambiase A, Coassini M, Costa N, Lauretti P, Micera A, Ghinelli E, Aloe L, Rama, Bonini S.: Topical treatment with nerve growth factor in an animal model of herpetic keratitis. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2008; **246**: 121-127.

Lambiase A, Manni L, Rama P, Bonini S: Clinical application of nerve growth factor on human corneal ulcer. *Arch. Ital. Biol.* 2003; **141**: 141-148.

Lambiase A, Merlo D, Mollinari C, Bonini P, Rinaldi A M, Amato De M, Micera A, Coassin M, Rama P, Bonini S, Garaci E: Molecular basis for keratokonus: Lack of TrkA expression and its transcriptional repression by Sp 3. *PNAS.* 2005; **102**: 16795-16800.

Lambiase A, Rama P, Bonini S, Caprioglio G, Aloe L: Topical treatment with nerve growth factor of corneal neurotrophic ulcers. *N. Eng. J. Med.* 1998; **338**: 1174-1180.

Latkany R.: Dry eyes: etiology and management. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 2008; **19**: 287-291.

Lebrun-Julien F, Bertrand M J, De Backer O, Stellwagen D, Morales C R, Di Polo A, Barker P A: ProNGF induces TNF α -dependent death of retinal ganglion cells through a p 75 non-cell- autonomous signalling pathway. *PNAS 2010*; **107**: 3817-3822.

Lee H K, Ryu L H, Seo K Y, Hong S, Kim H C, Kim E K: Topical 0,1% prednisolone lowers nerve growth factor expression in keratokconjunctivitis sicca patients. *Ophthalmology* 2006; **113**: 189-205.

Lee R, Kermani P, Teng K K, Hempstead B L: Regulation of cell survival by secreted pro neurotrophins. *Science* 2001; **294**: 1945-1948.

Lemp MA: Advances in Understanding and Managing Dry Eye Disease. *J Cataract Refractive Surg.* 2008; **146**: 350-356.

Levi-Montalcini R: The nerve growth factor thirty –five years later. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 1987; **23**: 227-238.

Maisonpierre P, Belluscio L, Squinto S, Ip N, Furth M, Lindsay R, Yancopoulos G: Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* 1999; **247**: 1446-1451.

Micera A, Lambiase A, Stampachiacchiere B, Bonini St, Bonini S, Levi-Schaffer F: Nerve growth factor an tissue repair remodeling: trkA-NGF and p75-NTR, two receptors one fate. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2007; **18**: 245-256.

Micera A, Lambiase A, Puxeddu I, Aloe L, Stampachiacchiere B, Levi-Schaffer F, Bonini S, Bonini S: Nerve growth factor effekt on human primary fibroblastic-keratocytes: Possible mechanismen during corneal healing. *Exp. Eye Res.* 2006; **83**: 747-757.

Micera A, Puxeddu I, Lambiase A, Antonelli A, Bonini St., Bonini S, Aloe L, Peer J, Levi-Schaffer F: The pro-fibrogenetic effect of nerve growth factor on conjuntival fibroblasts is mediated by transforming growth factor-beta. *Clin. Exp. Allergy* 2005; **35**: 650-656.

Mullis K B, Falona F A: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987; **155**: 335-350

Nguyen D H, Beuermann R W, Thompson H W, Loreto Di D A: Growth factor and neurotrophic factor mRNA in human lacrimal gland. *Cornea* 1997; **16**: 192-199.

Nykjaer A, Lee R, Teng K K, Jansen P, Madsen P, Nielson M S, Jacobsen C, Kliemannel M, Schwarz E, Willnow T E, Hempstead B L, Petersen C M: Sortilin is essential for pro NGF-induced neuronal cell death. *Nature* 2004; **424**: 843-848.

Obata H: Anatomy and histopathology of the human lacrimal gland. *Cornea* 2006; **25**: 82-89.

On Lai K, Yu Fu W, Ip F, Ip N: Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp. *Mol. Cell. Neurosci.* 1998; **11**: 64-76.

Park K S, Kim S S, Kim J C, Kim H C, Im Y S, Ahn C W, Lee H K: Serum and tear levels of nerve growth factor in diabetic retinopathy patients. *Am. J. Ophthalmol.* 2008; **145**: 432-437.

Paulsen F, Thale A, Schaudig U: Nasolacrimal ducts and the dry eye. *Der Ophthalmologe* 2002; **99**: 788.

Paulsen F: The human nasolacrimal ducts. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* 2003; **170**: 1-106.

Paulsen F: Anatomie and physiology of efferent tear ducts. *Ophthalmologe* 2008; **105**: 339-345.

Paulsen F P, Thale A B, Hallmann U J, Schaudig U and Tillmann B N: The cavernous body of the human efferent tear ducts: Function in tear outflow mechanism. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000; **41**: 965-970.

Petersen C M, Nielsen M S, Nykjaer A, Jacobsen L, Tommerup N, Rasmussen H H, Roigaard H, Gliemann J, Madsen P, Moestrup S K: Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 1997; **272**: 3599-3605.

Podlesniy P, Kichev A, Pedraza C, Saurat J, Encinas M, Perez B, Ferrer I, Espinet C: ProNGF from Alzheimer's disease and normal human brain displays distinctive abilities to induce processing and nuclear translocation of intracellular domain of p75NTR and apoptosis. *Am. J. Pathol.* 2006; **169**: 119-131.

Qi H, Chuang E Y, Yoon K C, Paiva de C S, Shine H D, Jones D B, Pflugfelder S C, Li D-Q : Patterned expression of neurotrophic factors and receptors in human limbal and corneal regions. *Molecular Vision* 2007; **13**: 1934-1941.

Rattenholl A, Ruoppolo M, Flagiello A, Monti M, Vinci F, Marino G, Lilie H, Schwarz E, Rudolph R: Pro-sequence assisted folding and disulfide bond formation of human nerve growth factor. *J. Mol. Biol.* 2001; **305**: 523-533.

Raychaudhuri S P, Sanyal M, Weltman H, Kundu-Raychaundhuri S: K252a, a high-affinity nerve growth factor receptor blocker, improves psoriasis: An in vivo study using the severe combined immunodeficient mouse-human skin model. *J. Invest. Dermatol.* 2004; **122**: 812-819.

Rios J D, Ghinelli E, Gu J, Hodges R R, Dartt D A: Role of neurotrophins and neurotrophin receptors in rat conjunctival cell secretion and proliferation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007; **48**: 1543-1551.

Saiki R K, Scharf S, Faloona F, Mullis K B, Horn G T, Ehrlich H A, Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; **230**: 1350-1354.

Sambrook J, Gething M J: Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* 1989; **342**: 224-225.

Sariola H: The neurotrophic factor in non-neuronal tissues. *Cell. Mol. Life Sci.* 2001; **58**: 1061-1066.

Shen L, Figurov A, Lu B: Recent progress in studies of neurotrophic factors and their clinical implications. *J. Mol. Med.* 1997; **75**: 637-644.

Sobottka B, Reinhardt D, Brockhaus M, Jacobsen H, Metzger F: ProNGF inhibits NGF-mediated TrkA activation in PC12 cells. *J. Neurochem.* 2008; **107**: 1294-1303.

Sofroniew M V, Howe C L, Mobley W C: Nerve growth factor signaling neuroprotection and neural repair. *Annu. Rev. Neurosci.* 2001; **24**: 1217-1281.

Srinivasan B, Roque C H, Hempstead B L, Ubaidi Al- M R, Roque R S: Microglia-derived pronerve growth factor promotes photoreceptor cell death via neurotrophin receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; **279**: 41839-41845.

Touhami A, Grueterich M, Scheffer C, Tseng G: The role of NGF signaling in human limbal epithelium expanded by amniotic membrane culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002; **43**: 987-994.

Vessaluoma M, Müller L, Gallar J, Lambiase A, Moilanen J, Hack T, Belmonte C, Tervo T: Effects of oleoresin capsicum pepper spray on human corneal morphology and sensitivity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000; **41**: 2138-2147.

Wordinger R J, Lambert W, Agarwal R, Talanti M, Clark A F: Human trabecular meshwork cells secrete neurotrophins and express neurotrophin receptor (Trk). *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000; **41**: 3833-3841.

Yardley G, Relf B, Lakshmanan J, Reinshagen M, Moore G P: Expression of nerve growth factor mRNA and its transplantation products in the anagen hair follicle. *Exp. Dermatol.* 2000; **9**: 283-289.

7. Thesen

1. NGF kommt in vielen Geweben des menschlichen Körpers vor. Auch an der Augenoberfläche und im Tränenwegsystem ist NGF nachweisbar. NGF hat diverse biologische Eigenschaften, besonders wichtig sind die proliferativen Funktionen des Polypeptids.
2. ProNGF ist bisher in neuronalen Geweben des menschlichen Körpers nachgewiesen worden. An der Augenoberfläche und im Tränensystem lässt sich ProNGF ebenfalls nachweisen. Zu den biologischen Eigenschaften von ProNGF gehört die Apoptose.
3. NGF und ProNGF kommt an der Augenoberfläche, genau wie anderen Neurotrophinen, eine immunmodulatorische Bedeutung zu.
4. Klinische Relevanz könnten NGF und ProNGF auf Grund der vielfältigen Wirkungen und Interaktionen mit dem Immunsystem in der Behandlung von Keratitiden und Konjunktivitiden erlangen. Eine potentielle Bedeutung im Rahmen des Sicca-Syndroms ist ebenfalls wahrscheinlich, da auch das Trockene Auge mit einer erhöhten Vulnerabilität der Augenoberflächenepithelien assoziiert ist.
5. NGF und ProNGF lassen sich nicht in Corneaepithel und Stroma der zentralen Region, wohl aber in Endothelzellen der Limbusregion nachweisen.
6. Durch das Vorkommen verschiedener biologischer/chemischer Formen lassen sich mittels Western Blot Verfahren verschiedene Banden je nach Prozessierungsstatus in den Geweben nachweisen.
7. Innerhalb der ableitenden Tränenwege besteht die Möglichkeit, dass Neurotrophine, ähnlich wie Zytokine im TALT (tear duct-associated lymphoid tissue), regulierende Funktionen im Zusammenspiel mit der Blutzirkulation des äußeren Auges übernehmen.

8. Im Rahmen der untersuchten Zelllinien konnte für NGF der Nachweis in der HCE-Zelllinie (human cornea epithelial cells) und der IOBA-NHC-Zelllinie (normal human conjunctival epithelial cells) erbracht werden.
9. Beide Zelllinien eignen sich zukünftig als Modell, um den Einfluss von NGF, insbesondere mit Ausstattung entsprechender Rezeptoren, auf der Augenoberfläche zu analysieren.
10. Therapeutisch lässt sich in der Ophthalmologie durch die bereits schon durchgeführte Applikation von NGF und/oder Rezeptorblockade von ProNGF ein Fortschritt erreichen.
11. Zukünftig bedarf es weiterer, in dieser Arbeit nicht durchgeführter, qualitativer Untersuchungen von Wachstumsfaktoren und der Rezeptor-expression, auch an pathologischen Geweben, um biologische Effekte erklären zu können.

ANHANG

CURRICULUM VITAE

Persönliche Angaben

- Geburtsdatum: 17. Dezember 1980
- Geburtsort: Köln, Deutschland
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Familienstand: unverheiratet
- Kinder: Constantin
- Eltern: Konrad Peters
Jutta Peters
- Geschwister: Julia Peters, verstorben 2005
Christoph Peters

Ausbildung

- ab 03/2010 **St. Antonius Krankenhaus, Köln**, Assistenzarzt, Innere Medizin; Prof. Dr. med. F. M. Baer
- 01/2009-01/2010 **Universitätshautklinik-Bochum**, Assistenzarzt, Prof. Dr. med. P. Altmeyer
- 06/2008 **Staatsexamen, Humanmedizin**
- 10/2007-02/2008 **Diakoniekrankenhaus Halle**
Praktisches Jahr, Chirurgie; Chefarzt Dr. med. Walter Lindemann-Sperfeld
- 06/2007-10/2007 **Zürcher Höhenklinik Davos, Schweiz**
Praktisches Jahr, Innere Medizin; Chefarzt Dr. med. Peter Risi
- 02/2007-06/2007 **Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg**
Praktisches Jahr, Dermatologie; Chefarzt Professor Dr. med. W.Ch. Marsch
- 07/2005 **Beginn der vorliegenden Promotion**
- 10/2001-01/2007 **Studium der Humanmedizin** an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 08/2000-07/2001 **Zivildienst** auf der Städtischen Feuer- und Rettungswache Bergheim mit Ausbildung zum Rettungshelfer
- 09/1991-06/2000 **Sylverberg-Gymnasium Bedburg**
- 09/1987-06/1991 **Grundschule Elsdorf-Esch**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Halle an der Saale, November 2011

Hiermit erkläre ich, dass nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens von mir eingereicht wurde.

Halle an der Saale, November 2011

DANKSAGUNG

Mein besonders herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Friedrich Paulsen für die Überlassung des Themas, das sorgfältige Heranführen an die Problematik, seine geduldige Hilfe bei der Durchführung und insbesondere für die Betreuung während der Erstellung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Frau Dr. rer. nat. Kristin Jäger, die mir bei auftretenden Problemen hilfreich zur Seite stand.

Mein bester Dank gilt ebenso Frau Michaela Risch für die Einführung in das PCR- und Blotting-Verfahren und Frau Ute Beyer für die aufmunternde Hilfestellung bei der Anfertigung der immunhistochemischen Präparate. Insbesondere möchte ich Frau Susann Möchter für die Aufarbeitung meiner PCR-Ergebnisse danken.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie danken, die mich nicht nur während meiner akademischen Ausbildung und bei der Erstellung dieser Arbeit, liebevoll und unermüdlich unterstützt und aufgemuntert hat.