

Aus dem Institut für klinische Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Quantifizierung der c-fos Expression im Retinalen
Pigmentepithel

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin
von

Nina Schirin Salomon

aus Siegen

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. O. Strauß

2. Prof. Dr. med. M. Fromm

3. Priv.-Doz. Dr. J. Mankertz

Datum der Disputation: 09.10.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	- 6 -
1.1	Das Retinale Pigmentepithel (RPE)	- 6 -
1.2	Altersbedingte Makuladegeneration (AMD).....	- 8 -
1.2.1	Die Rolle des RPE in der Pathogenese der AMD.....	- 9 -
1.3	Wachstumsfaktoren.....	- 11 -
1.3.1	Wachstumsfaktoren des RPE.....	- 11 -
1.3.2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor	- 13 -
1.3.3	FGF im Retinalen Pigmentepithel.....	- 13 -
1.4	Der FGF-Rezeptor.....	- 15 -
1.4.1	Intrazelluläre Signaltransduktion der FGF-Rezeptoren	- 16 -
1.5	L-Typ Ca^{2+} -Kanäle	- 18 -
1.5.1	L-Typ Ca^{2+} -Kanäle im RPE	- 18 -
1.5.2	Intrazelluläre Signaltransduktion des Ca^{2+} -Kanals	- 19 -
1.6	Transkriptionsfaktoren.....	- 20 -
1.6.1	Transkriptionsfaktor c-fos	- 20 -
1.6.2	Stimulation der c-fos-Expression.....	- 22 -
1.6.3	Funktion der c-fos-Expression.....	- 23 -
1.7	Fragestellung der Arbeit	- 25 -
2	Material	- 26 -
2.1	Chemikalien, Enzyme, Kits.....	- 26 -
2.2	Plasmide, Bakterien, Zelllinien	- 27 -
2.3	Medien und Lösungen.....	- 28 -
2.3.1	Kulturmedien	- 28 -
2.3.2	Lösungen und Puffer	- 29 -
2.4	Primer und Enzyme.....	- 31 -
3	Methoden	- 32 -
3.1	Herstellung einer Zelllinie	- 32 -
3.2	Total-RNA-Isolierung.....	- 32 -
3.3	Denaturierende RNA-Gelelektrophorese.....	- 33 -
3.4	RNA-Konzentrationsbestimmung	- 34 -
3.5	Reverse Transkription (RT).....	- 34 -

3.6	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	- 35 -
3.7	Agarosegelelektrophorese	- 36 -
3.8	Verifizierung der c-fos-RNA.....	- 37 -
3.9	Ligation.....	- 37 -
3.10	Transformation	- 38 -
3.11	Plasmid-Miniprep.....	- 39 -
3.12	Sequenzierung	- 40 -
3.13	Real-Time PCR	- 41 -
3.14	Statistik.....	- 44 -
4	Ergebnisse	- 45 -
4.1	Herstellung der Standardreihe	- 45 -
4.1.1	Ergebnisse der RT-PCR.....	- 45 -
4.1.2	Ergebnisse der Sequenzierung	- 46 -
4.1.3	Herstellung der Standardreihe	- 48 -
4.2	Ergebnisse der LightCycler PCR.....	- 49 -
4.2.1	Stimulation der c-fos-Expression durch bFGF	- 49 -
4.2.2	Hemmung der bFGF-Wirkung durch SU5402	- 50 -
4.2.3	Hemmung der bFGF-Wirkung durch Nifedipin	- 51 -
4.2.4	Stimulation der c-fos-Expression durch BayK8644	- 52 -
4.2.5	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	- 54 -
5	Diskussion.....	- 56 -
5.1	Ergebnisse der Real-Time PCR	- 56 -
5.2	bFGF in RPE-Zellen	- 57 -
5.2.1	Einfluss von bFGF auf die c-fos-Expression	- 57 -
5.3	L-Typ Ca ²⁺ Kanäle in RPE-Zellen.....	- 59 -
5.3.1	Einfluss des Ca ²⁺ -Kanals auf die c-fos-Expression	- 59 -
5.4	Unterschiedliche Wirkungen der beiden FGF Rezeptoren	- 61 -
5.4.1	Signaltransduktionskaskade von bFGF	- 61 -
5.4.2	Einfluss der FGF-Rezeptoren und des L-Typ Ca ²⁺ -Kanals.....	- 63 -
5.5	Pathophysiologie der AMD.....	- 66 -
6	Zusammenfassung	- 69 -
7	Literaturverzeichnis.....	- 70 -
8	Anhang	- 81 -
8.1	Abkürzungen	- 81 -

8.2	Legende	- 83 -
8.3	Veröffentlichung	- 83 -
8.4	Lebenslauf.....	- 84 -
9	Erklärung zur Dissertation	- 85 -
10	Danksagung	- 86 -

1 Einleitung

1.1 Das Retinale Pigmentepithel (RPE)

Die Retina (Netzhaut) wird als innere Schicht des Bulbus auch Tunica nervosa genannt. Die 0,1-0,5 mm dicke, durchsichtige Schicht besteht aus dem außen gelegenen Retinalen Pigmentepithel und dem innen gelegenen neurosensorischen Anteil der Netzhaut. Dieser neurosensorische Bereich wird von den Photorezeptoren, den Bipolar- sowie den Ganglienzellen und den Müller Zellen gebildet, wobei die Photorezeptoren direkt dem Pigmentepithel anliegen und somit im äußeren Bereich der neurosensorischen Retina liegen.

Das Retinale Pigmentepithel, ein einschichtiges, isoprismatisches Epithel, liegt mit der basolateralen Seite der Bruch'schen Membran (Lamina vitrea) an. Es ist für den Wärmeaustausch mit der darunterliegenden Aderhaut (Choroidea) verantwortlich.

Mit den langen apikalen Mikrovilli umschließt es die Außensegmente der Photorezeptoren, welches die enge Interaktion der beiden Epithelien auch anatomisch unterstreicht. Der dazwischen liegende Raum wird Interphotorezeptorraum genannt. Das RPE ist dabei für die Ernährung, die Aufrechterhaltung der Erregbarkeit und die strukturelle Integrität der Photorezeptoren verantwortlich. Zusätzlich absorbiert das RPE kurzwelliges, energiereiches Licht und ist.

Funktionell stellt sich das RPE als transportierendes Epithel, als Glia, als phagozytisches sowie sekretorisches Gewebe dar.

Das RPE transportiert Nährstoffe zu den Photorezeptoren und Abbauprodukte von den Photorezeptoren und sorgt für den Elektrolyt- und Wassertransport zwischen subretinalem Raum und Choroidea (Miller and Steinberg 1977; Bok 1985; Sugawara, Deguchi et al. 1994).

Als funktionelle Gliazelle kann das RPE schnelle Änderungen der Ionenzusammensetzung im subretinalen Raum, die durch Änderung der Photorezeptoraktivität beim Sehprozess entstehen, kompensieren (Steinberg 1985).

Als phagozytische Zelle erneuert das RPE die Photorezeptor-Außensegmente im zirkadianen Rhythmus. Das distale Ende der Außensegmente wird periodisch in den Interphotorezeptorraum abgestoßen und von den Zellen des RPE phagozytiert. Die Bruchstücke, die mehrfach ungesättigte Fettsäuren und Karotenoide in hoher

Konzentration enthalten, werden nach Aufnahme in die RPE-Zellen enzymatisch durch sogenannte Hydrolasen abgebaut und nach Regeneration (Recycling) der Inhaltsstoffe den Photorezeptoren wieder zugeführt oder über die Bruch'sche Membran in die Choriokapillaris entsorgt (Young and Bok 1969; Timmers, Van Groningen-Luyben et al. 1991; Gordon, Rodriguez de Turco et al. 1992).

Das im Zusammenhang dieser Arbeit entscheidende Merkmal ist die sekretorische Funktion dieses Gewebes (Bost, Aotaki-Keen et al. 1992; Steele, Chader et al. 1992; Yoshida, Tanihara et al. 1992; Yoshimura, Kuriyama et al. 1992; Bost, Aotaki-Keen et al. 1994; Shima, Adamis et al. 1995; Wen, Song et al. 1995). Das RPE sezerniert eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, die von großer Bedeutung für Struktur und Funktion retinaler Zellen sind.

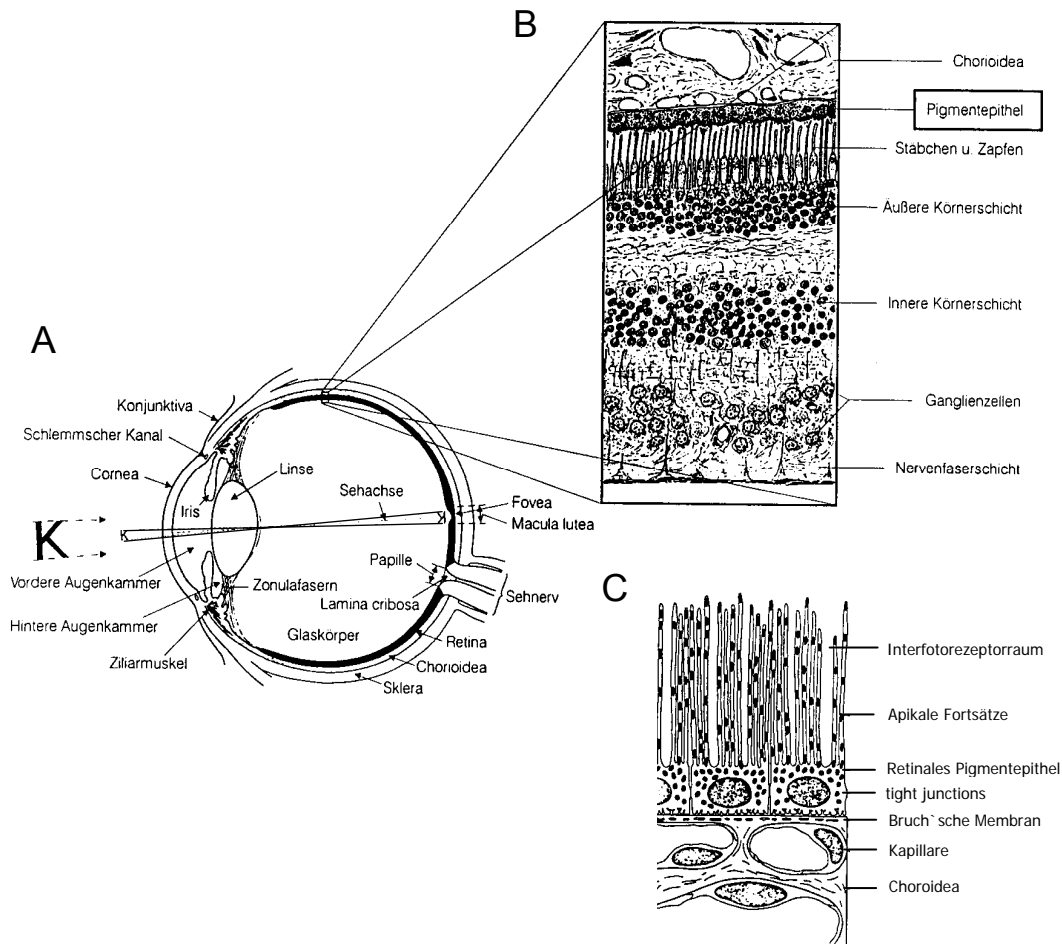


Abb. 1.1. Das Retinale Pigmentepithel
A. Horizontalschnitt durch das menschliche Auge (aus Thews, Mutschler und Vaupel, 1999)
B. Histologische Schichten der Retina (aus Thews, Mutschler und Vaupel, 1999).
C. histologischer Ausschnitt aus dem Retinalen Pigmentepithel mit angrenzender Chorioidea (verändert aus Hughes and Steinberg, 1990).

1.2 Altersbedingte Makuladegeneration (AMD)

Die Altersbedingte Makuladegeneration ist die häufigste Ursache der schweren Visusminderung im höheren Lebensalter in den Industrieländern. Die Krankheit gehört in den Formenkreis der degenerativen Netzhauterkrankungen und ist durch eine progressive Degeneration des Pigmentepithels und der Photorezeptoren der Makula gekennzeichnet.

Es handelt sich bei der AMD um eine multifaktorielle, komplexe, progrediente Erkrankung, die bilateral auftritt. Bei Befall des einen Auges steigt die Inzidenz für die Erkrankung des anderen Auges jährlich um 12% (Kanski 1994). Auf den 99. Jahrestag der DOG 2001 wurde die Prävalenz einer frühen AMD bei Personen über 75 Jahren mit 35% angegeben und die einer späteren AMD betrug etwa 5 bis 8%.

Unterschieden werden eine trockene und eine feuchte Verlaufsform. Im Verlauf der weitaus häufigeren (ca. 85%) trockenen Form kommt es zu einer langsam progredienten Abnahme der Sehschärfe, bei der ein relatives Zentralskotom auffällt. Die für die trockene Form typischen harten, kalzifizierenden Drusen bestehen aus abgelagerten Phospholipiden auf der Bruch'schen Membran und gehen mit einer progredienten Pigmentepitheldegeneration einher.

Die feuchte Form zeichnet sich dem entgegen durch einen rascheren und dramatischeren Krankheitsverlauf aus. Sie kann sich jederzeit aus der trockenen Form entwickeln. Die Klinik ist von plötzlich auftretenden Metamorphosen (Verzehrtsehen) bei gleichzeitiger Abnahme der Sehschärfe geprägt.

Es kommt zu Flüssigkeitsansammlungen unter das Pigmentepithel. Kombiniert mit dieser so genannten Pigmentepithelabhebung treten subretinale, bzw. choroidale Neovaskularisationen auf. Sie stammen von den Chorioendothelzellen und wachsen als fibrovaskuläre Membranen durch die Bruch'sche Membran unter das RPE.

Wenn choroidale Neovaskularisationen durch die Bruch'sche Membran oder das RPE hindurch treten, ist die Blut-Retina-Schranke zusammengebrochen und es kann zu subretinalen Flüssigkeitsansammlungen oder schweren hämorrhagischen Insulten kommen. Hauptkomplikation stellt die plötzliche große subretinale Blutung dar.

Anerkannte Risikofaktoren sind neben dem Alter vor allem die genetische Prädisposition und das Rauchen. Frauen scheinen häufiger betroffen als Männer (Seddon 2000; Klein, Peto et al. 2004; Finger, Fleckenstein et al. 2007; Scholl, Fleckenstein et al. 2007).

Bei Frühstadien der AMD mit Hochrisikomerkmale können prophylaktisch Spurenelemente und Vitamine oral verabreicht werden, was das Risiko eine Spätform zu entwickeln verringert. Die trockene Form ist bislang keiner Therapie zugänglich und sie kann nur rehabilitativ z.B. mit starken Sehhilfen angegangen werden (Finger, Fleckenstein et al. 2007).

Bei der feuchten Form wurde lange vergeblich versucht, mit Laserkoagulation oder photodynamischer Therapie die Entwicklung der Neovaskularisationsmembranen aufzuhalten. Seit wenigen Jahren wird nun bei der feuchten Form über intravitreale Injektion von Ranibizumab (Lucentis®) der fortschreitende Prozess der Neovaskularisationen verlangsamt, in manchen Fällen sogar eine Visusverbesserung erzielt, wie zwei große Phase-III-Studien zeigen konnten (Brown, Kaiser et al. 2006; Rosenfeld, Brown et al. 2006).

Ranibizumab ist ein humanisiertes Fragment eines rekombinanten, monoklonalen Antikörpers, der an den Vacular endothelial growth factor VEGF-A bindet und das Wachstumshormon somit inaktiviert (Mohr-Andra and Mohr 2007).

1.2.1 Die Rolle des RPE in der Pathogenese der AMD

Im frühen Stadium der AMD bilden sich basal laminare Ablagerungen unter dem RPE, die man als „diffuse Drusen“ bezeichnet (Green and Key 1977). Zu diesen histopathologischen Befunden kommen im weiteren Verlauf der Erkrankung sekundäre Veränderungen des RPE hinzu. Es zeigt sich eine deutliche Verschmälerung, die mit Depigmentation, Hypertrophie, Hyperplasie und Atrophie einhergeht (Green and Enger 1993; Bressler, Silva et al. 1994). Dabei erscheinen akkumulierte Pigmentzellen im subretinalen Raum als so genanntes „clumping“.

Des Weiteren entwickeln sich große Drusen, auch weiche Drusen genannt, Akkumulationen von „membranösen Abfall“, submakuläres, disciformes Narbengewebe und choroidale Neovaskularisationsmembranen (CNV) (Algvere and Seregard 2002).

Das RPE scheint in der Pathogenese der AMD eine zentrale Rolle zu spielen. Auf der einen Seite bedingt das RPE wahrscheinlich die Entwicklung der Drusen, deren Pathomechanismus noch nicht ausreichend geklärt ist (Young 1987). Wahrscheinlich ist, dass oxydiertes Lipidmaterial, das bei Phagozytose der Photorezeptoren entsteht,

entweder im subretinalen Raum gelagert und als Drusen bezeichnet oder in den retinalen Pigmentepithelzellen als Lipofuszin gespeichert wird. Sowohl die Akkumulation von intrazellulärem Lipofuszin im RPE als auch Ablagerungen von Lipiden in der Bruch'schen Membran werden mit der Induktion der Drusen in Zusammenhang gebracht (Sheraidah, Steinmetz et al. 1993). Der aufgrund von Ablagerungen entstandene Verlust der Permeabilität der Bruch'schen Membran könnte für eine weitere Ablagerung von Zellfragmenten und Abbauprodukten verantwortlich sein und damit zur retinalen Ablösung führen (Fisher 1987; Bird 1991; Moore, Hussain et al. 1995).

Die Bildung choroidaler Neovaskularisationen charakterisiert die feuchte AMD. Ein gestörtes Gleichgewicht in der Wachstumsfaktorsekretion des RPE scheint maßgeblich an der Bildung der CNV beteiligt zu sein. In immunoreaktiven Experimenten mit Neovaskularisationsmembranen wurde eine stark erhöhte Konzentration der Wachstumsfaktoren Fibroblast growth factor (acid) aFGF and (basic) bFGF sowie VEGF nachgewiesen. Diese Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass diese Wachstumsfaktoren maßgeblich an der Pathogenese intraokulärer Angiogenese beteiligt sind. Hierauf basiert auch das therapeutische Konzept, VEGF bei Patienten mit neovaskulärer AMD pharmakologisch zu neutralisieren (Aiello, Avery et al. 1994; Amin, Puklin et al. 1994).

Neuere Ergebnisse beschreiben sogenannte „susceptibility genes“ Diese sind im Wesentlichen Faktoren des Komplement Systems. Vor allem Polymorphismen des Komplement Faktors H, lokalisiert auf Chromosom 1 (1q31) sind mit einer bis zu 80fach höheren Wahrscheinlichkeit der AMD assoziiert (Edwards, Ritter et al. 2005; Haines, Hauser et al. 2005; Klein, Zeiss et al. 2005). Aber auch Polymorphismen der Faktoren B und C2 sind mit einem höheren Erkrankungsrisiko vergesellschaftet. Dies unterstreicht eine starke inflammatorische Komponente der AMD.

1.3 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind Polypeptide, die von verschiedensten Zellen gebildet werden und diese in ihrem Zellzyklus beeinflussen. Sie stimulieren die Zellen zum Übergang in die sog. Synthesephase, in der die Zellen beginnen Nukleinsäuren zu produzieren. Damit regulieren sie meist als parakrine und endokrine Faktoren Proliferation bzw. Differenzierung und Funktion ihrer Zielzellen. Wachstumsfaktoren werden in sechs Gruppen unterteilt. Zu den vorwiegend mitogen und differenzierend wirkenden Wachstumsfaktoren zählen der Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF), der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF), der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor (IGF), der Blutplättchen Wachstumsfaktor (PDGF) sowie der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF). Der transformierende Wachstumsfaktor- β (TGF- β) hat dem entgegen eine vorwiegend wachstums-inhibierende Wirkung.

Wachstumsfaktoren wirken an ihrer Zielzelle über membranständige Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität, die nach Ligandenbindung an den Tyrosylresten autophosphorylieren und somit eine intrazelluläre Transduktionskaskade induzieren, indem weitere Enzyme durch Phosphorylierung aktiviert werden. Die Folge ist eine Stimulation der Expression von Wachstumsfaktoren und anderen Genen, die regulierend und vor allem stimulierend in den Zellmetabolismus eingreifen. Zahlreiche Onkogene kodieren entweder Wachstumsfaktoren, Rezeptoren oder Transkriptionsfaktoren von Wachstumsfaktoren, deren Überaktivierung zu einem Verlust der Wachstumskontrolle führt und in der Gene zahlreicher Tumore eine bedeutende Rolle spielen.

1.3.1 Wachstumsfaktoren des RPE

Für die Aufrechterhaltung der retinalen Funktion ist die Sekretion von Wachstumsfaktoren im RPE von entscheidender Bedeutung. Ein kompliziertes Gleichgewicht der einzelnen Wachstumsfaktoren scheint die Kommunikation der einzelnen Schichten der Retina zu ermöglichen und die strukturelle Integrität der Retina und der Choriokapillaren aufrechtzuerhalten. Durch seine Sekretion immun-

modulatorisch wirksamer Faktoren ist das RPE auch am Immunprivileg des Auges maßgeblich beteiligt.

So produziert und sezerniert das RPE eine Reihe von Wachstumsfaktoren (Steele, Chader et al. 1992; Tanihara, Inatani et al. 1997; Cao, Tombran-Tink et al. 1999; Witmer, Vrensen et al. 2003), zu denen FGF, der Wachstums-inhibierende TGF- β (Tanihara, Yoshida et al. 1993; Kvant 1994; Matsumoto, Yoshimura et al. 1994; Khaliq, Patel et al. 1995) sowie IGF-I (Martin, Yee et al. 1992; Slomiany and Rosenzweig 2004) und PDGF (Campochiaro, Sugg et al. 1989; Campochiaro, Hackett et al. 1994) zählen. Außerdem sezernieren die RPE-Zellen den „ciliary neurotrophic factor“ (CNTF) (Cao, Wen et al. 1997; Walsh, Valter et al. 2001), „vascular endothelium growth factor“ (VEGF), der in die PDGF-Familie gehört, (Adamis, Shima et al. 1993; Kuroki, Voest et al. 1996; Lopez, Sippy et al. 1996; Lu, Kuroki et al. 1998; Nagineni, Samuel et al. 2003; Witmer, Vrensen et al. 2003), lens epithelium-derived growth factor (LEDGF) (Ahuja, Caffè et al. 2001), „pigment epithelium-derived factor“ (PEDF) (Steele, Chader et al. 1992; Dawson, Volpert et al. 1999; King and Suzuma 2000; Ogata, Wang et al. 2001; Ogata, Wada et al. 2002) und verschiedene Interleukine (Wenkel and Streilein 2000; Streilein, Ma et al. 2002; Ishida, Panjwani et al. 2003).

Im gesunden Auge sezerniert das RPE vor allem PEDF und VEGF. Beide Wachstumsfaktoren werden auf entgegengesetzten Seiten des Pigmentepithels sezerniert. Während PEDF auf der apikalen Seite an den Photorezeptoren wirkt, ist die VEGF-Sekretion auf die basolaterale, chorionkapilläre Seite konzentriert (Blaauwgeers, Holtkamp et al. 1999; Becerra, Fariss et al. 2004).

Auf Schädigung oder Verletzung reagiert das RPE mit Sekretion neuroprotektiver Wachstumsfaktoren, wie CNTF oder bFGF. Nach intensiver Belichtung von Photorezeptoren konnte eine beginnende Apoptose der Zellen beobachtet werden, die im weiteren Verlauf reversibel schien. Die Arbeitsgruppe um Reme erklärt dies mit einer erhöhten Sekretion der neuroprotektiven Wachstumsfaktoren PEDF, CNTF und bFGF (Cao, Wen et al. 1997; Hafezi, Steinbach et al. 1997; Blanco, Lopez-Roca et al. 2000; Grimm, Wenzel et al. 2001).

1.3.2 Fibroblasten-Wachstumsfaktor

Die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren spielen eine bedeutende Rolle für Funktionen verschiedenster Zellen. Sie sind potente Regulatoren der Zelldifferenzierung und Zellproliferation und nehmen eine besondere Rolle in der Aufrechterhaltung der Zellfunktion und bei Wundheilungsprozessen der Zellen ein (Rifkin and Moscatelli 1989; Clarke, Khakee et al. 1993; Yamaguchi and Rossant 1995).

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind sechzehn verschiedene Polypeptide der Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (fibroblast growth factor, FGF) bekannt. Sie werden fortlaufend FGF-1 bis FGF-16 bezeichnet, obwohl FGF-1 und FGF-2 vornehmlich mit acidic and basic FGF (aFGF und bFGF) gleichgesetzt werden und die Prototypen dieser Familie darstellen. Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF) ist der gemein benutzte Begriff für FGF-7, FGF-8 ist auch als „androgen-induced growth factor“ bekannt, sowie FGF-9 gleichbedeutend mit „glial activating factor“ ist.

Vier Mitglieder der FGF-Familie sind Onkogenprodukte FGF-3 (int-2), FGF-4 (hast-1), FGF-5 und FGF-6 (hast-2). Alle Fibroblasten-Wachstumsfaktoren besitzen zwischen 30-70 % homologe Aminosäuresequenzen (Galzie, Kinsella et al. 1997).

1.3.3 FGF im Retinalen Pigmentepithel

Das RPE sezerniert aus der Familie der FGF-Wachstumsfaktoren aFGF, bFGF und FGF-5 (Sternfeld, Robertson et al. 1989; Jacquemin, Halley et al. 1990; Bost, Aotaki-Keen et al. 1992; Connolly, Hjelmeland et al. 1992; Ishigooka, Kitaoka et al. 1993; Kitaoka, Bost et al. 1993; Amin, Puklin et al. 1994; Bost, Aotaki-Keen et al. 1994; Kitaoka, Aotaki-Keen et al. 1994; McLaren, An et al. 1996; Guillonneau, Regnier-Ricard et al. 1997; Dunn, Marmorstein et al. 1998). FGF-5 wird permanent sezerniert und wirkt als autokriner trophischer Faktor auf das RPE (Bost, Aotaki-Keen et al. 1992; Bost, Aotaki-Keen et al. 1994). Da FGF-5 an der basolateralen Seite des RPE sezerniert wird, scheint er eine trophische Wirkung auf die Endothelzellen der Choriokapillaren zu besitzen (Dunn, Marmorstein et al. 1998).

bFGF hat einen trophischen Effekt auf Endothelzellen sowie Photorezeptoren und inhibiert die Apoptose dieser Zellen (Araki, Shimada et al. 1990; Araki, Simada et al. 1990; Faktorovich, Steinberg et al. 1990; Faktorovich, Steinberg et al. 1992; Liu, Ye et al. 1998). Zusätzlich stimuliert bFGF als autokrines Cytokin die Sekretion von aFGF (Guillonneau, Regnier-Ricard et al. 1997).

Die in Folge von bFGF stimulierte Sekretion von aFGF besitzt ebenfalls einen trophischen Effekt auf die Zellen des RPE und die Endothelzellen der Choriokapillaren und inhibiert deren Apoptose.

Im Falle einer Verletzung des RPE oder bei oxidativem Stress der Photorezeptoren kann eine deutlich höhere Sekretion von bFGF nachgewiesen werden (Zhang, Samadani et al. 1993). In diesem Falle führt bFGF zu einer Proliferation der Endothelzellen (Schweigerer, Neufeld et al. 1987).

Im RPE scheint vor allem bFGF eine große Rolle in Heilungsprozessen der retinalen Zellen zu übernehmen. So wurde nach Injektion von bFGF in ein gesundes Augen eine ähnliche Reaktion der Müller-Zellen beobachtet wie nach retinaler Ablösung (Lewis, Erickson et al. 1992). bFGF regeneriert ebenfalls Schäden der Photorezeptoren bei Ratten, die durch starken Lichteinfall entstanden sind (LaVail, Faktorovich et al. 1991; Faktorovich, Steinberg et al. 1992).

Es ist bekannt, dass bFGF eine rasche Phosphorylierung der ERK, eine „mitogen-activated protein kinase (MAPK), bewirkt (Wahlin, Campochiaro et al. 2000; Geller, Lewis et al. 2001). Zellulärer Stress, weitere Wachstumsfaktoren und die MAPK-Signaltransduktions-kaskade stimulieren die de-novo-Expression von „immediate-early-response-genes“, zu deren Hauptvertretern c-fos und c-jun gehören. Beide sind Komponenten des „Aktivator-Proteins“ (AP)-1, ein Regulatorprotein der Genexpression, das in normalen wie pathologischen Prozessen verschiedenster Zellen eine große Rolle spielt (Curran and Franza 1988; Sheng and Greenberg 1990; Yoshida, Muraki et al. 1995). So konnte die Arbeitsgruppe um Reme in Lichtschadenexperimenten an c-fos-Knock-Out-Mäusen im Vergleich zu gesunden Kontrollegruppen-Mäusen zeigen, dass c-fos das im Apoptoseprozess beteiligte Enzym Caspase-1 in RPE-Zellen induziert (Grimm, Wenzel et al. 2000).

Die direkte Stimulierung der c-fos-mRNA-Expression konnte für bFGF bereits nachgewiesen werden (Cao, Li et al. 1998).

1.4 Der FGF-Rezeptor

Die FGF-Rezeptoren gehören wie die Mehrzahl der Wachstumsfaktorrezeptoren in die Gruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren. Dies sind membranständige Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität (Ullrich and Schlessinger 1990; Fantl, Johnson et al. 1993).

Bis heute sind vier FGF-Rezeptoren bekannt (FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4), die jeweils durch separate Gene codiert werden: FGFR-1 (flg- oder fms-like gene, (Pasquale and Singer 1989)), FGFR-2 (bek oder bacterial expressed kinase, (Houssaint, Blanquet et al. 1990)), FGFR-3 (Keegan, Rooke et al. 1993) und FGFR-4 (Partanen, Makela et al. 1991).

Die Bindung des Liganden führt zur Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinase und beeinflusst über intrazelluläre Signalkaskaden die Proliferation und Differenzierung der Zellen und bewirkt Änderungen im Zellmetabolismus (Ullrich and Schlessinger 1990).

Nach bisherigem Kenntnisstand binden einige FGF-Rezeptoren alle FGFs, während andere eine höhere Spezifität aufweisen (Mansukhani, Dell'Era et al. 1992; Fernig and Gallagher 1994).

Die integralen Membranrezeptoren der Wachstumsfaktoren, die strukturell sehr ähnlich aufgebaut sind, bestehen aus einer extrazellulären, einer Membran-durchspannenden und einer intrazellulären Domäne (Klint and Claesson-Welsh 1999). Die extrazelluläre Region besteht spezifisch für den FGF-Rezeptor aus drei Immunglobulin-ähnlichen Schleifen. Die cytosolische Tyrosinkinasedomäne ist allen Wachstumsfaktorrezeptoren gemein und setzt sich aus einer "juxtamembranen" Domäne, der Kinasedomäne und dem C-Terminus zusammen.

Kleine strukturelle Unterschiede sind jedoch auch hier zu finden, so ist die "juxtamembrane" Domäne bei den FGF-Rezeptoren länger als bei den anderen Rezeptortyrosinkinasen, wobei eine funktionelle Bedeutung dieser Besonderheit bisher nicht bekannt ist. Auch die Kinasedomäne weist eine Abweichung zu vielen der anderen Rezeptoren auf. Der hoch konservierte Tyrosinkinasebereich ist durch einen Kinaseinsertionsbereich, bestehend aus 15 Aminosäuren, unterbrochen.

Unterschiede sind auch zwischen den einzelnen FGF-Rezeptoren erkennbar. Die Dichte der phosphorylierbaren Tyrosinreste ist beim FGFR-1 und dem FGFR-2 gleich, nimmt jedoch vom FGFR-3 bis FGFR-4 immer weiter ab. Funktionell scheint das Fehlen der phosphorylierbaren Tyrosinreste im Kinase-Insertionsbereich das mitogene Potential des FGFR-4 im Vergleich zu den anderen FGF-Rezeptoren zu verringern (Mohammadi,

McMahon et al. 1997). Der C-Terminus besteht aus 55-66 Aminosäuren mit unterschiedlicher Sequenz bei den verschiedenen Rezeptoren und enthält phosphorylierbare Tyrosinreste, die bei den verschiedenen Rezeptoren teilweise an identischen Positionen lokalisiert sind.

Im Allgemeinen erfordert die Aktivierung des Tyrosinkinase-Rezeptors einerseits eine katalytische Aktivität des Rezeptors sowie andererseits intrazelluläre Bindungsstellen für Signalproteine. Beides wird durch eine Autophosphorylierung der Tyrosinreste ermöglicht, bedingt durch eine Dimerisierung des Rezeptors.

Die Bindung des spezifischen Liganden an der extrazellulären Domäne bewirkt diese Dimerisierung, die zur Stabilisierung zweier benachbarter intrazellulärer Domänen führt (Heldin 1995). Beide cytoplasmatischen Domänen phosphorylieren sich daraufhin gegenseitig an mehreren Tyrosinresten.

Die Autophosphorylierung hat unterschiedliche Auswirkungen. Sie aktiviert einerseits die katalytische Aktivität des Rezeptors in der so genannten „Activation loop“ der Tyrosinkinase-Domäne und generiert andererseits hoch spezifische Bindungsstellen für intrazelluläre Signalproteine in Zusammenhang mit den umgebenden Aminosäuresequenzen (Songyang, Blechner et al. 1994; Hubbard 1999). Diese Bindungsstellen werden als SH2- und SH3-Domäne (src-Homologie-Region 2) bezeichnet und aktivieren die Signalproteine ebenfalls durch Tyrosin-Phosphorylierung (Anderson, Koch et al. 1990). Eine Enzymaktivierung, Konformationsänderung oder Erhöhung der Verfügbarkeit der Signalproteine sind die Folge, wodurch weitere intrazelluläre Signalkaskaden eingeleitet werden.

1.4.1 Intrazelluläre Signaltransduktion der FGF-Rezeptoren

Der FGFR-1 ist in der Literatur häufig beschrieben und die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade sehr gut untersucht. Nach Ligandenbindung und Dimerisierung des Rezeptors sind Phospholipase C γ , src-Kinasen und MAP-Kinasen (Mitogen-aktivierte Kinasen) an der Liganden-abhängigen Expressionsänderung der Zelle beteiligt.

Am Ende der Transduktionskaskade steht die Expression von so genannten "immediate early genes" (IEG). Diese werden innerhalb von Minuten nach Ligandenbindung

transkribiert und kodieren Transkriptionsfaktoren, die ihrerseits an bestimmte Promoterregionen binden und die Transkription der "late genes" initiieren. Unter "late genes" fasst man unter anderem Hormone, Cytokine, metabolische Enzyme und Neuropeptide zusammen, die vor allem gewebsspezifische Effektorproteine darstellen. Die Liganden-gebundene Dimerisierung des bFGF-Rezeptors führt wie oben beschrieben zur Autophosphorylierung, die einerseits die katalytische Aktivität der Tyrosinkinase-Domäne von src-Subtyp aktiviert und andererseits hoch spezifische Bindungsstellen generiert für die intrazellulären Signalproteine SHC und Grb2, die die Kopplung an das G-Protein Ras vermitteln. Das kleine Adaptermolekül Grb2 bildet einen Komplex mit dem "nukleotide exchange factor SOS" (GEF). Dieser Grb2/Sos-Signalkomplex (Sos-Protein-Guaninnukleotid lösendes Protein) katalysiert den Austausch von GTP gegen GDP am Ras-Protein und führt zur Aktivierung des G-Proteins. Durch die Bindung des aktivierten G-Proteins an der Serin/Threonin Kinase Raf-1 wird eine Kaskade von Phosphorylierungen in Gang gesetzt, die in der Phosphorylierung der ERK, einer MAP-Kinase, mündet. Die aktivierte MAP-Kinase wandert vom Zytosol in den Kern und phosphoryliert den mit dem SRF-assoziierten Transkriptionsfaktor p62 (Elk-1). Damit ist der am „serum response element“ (SRE) gebundene Komplex aktiviert, wodurch die Transkription des c-fos-Gens aktiviert wird (Rosen, Ginty et al. 1995; Klint and Claesson-Welsh 1999).

Trotz der strukturellen Verwandtschaft von FGFR-1 und FGFR-2 sind die intrazellulären Signalkaskaden des FGFR-2 noch kaum bekannt (Friesel and Maciag 1995; Klint and Claesson-Welsh 1999). Lange Zeit wurden gleiche Transduktionswege angenommen, doch es finden sich in der Literatur zahlreiche Hinweise darauf, dass sich die beiden Rezeptoren in der intrazellulären Transduktion und damit auch in ihrer Funktion stark voneinander unterscheiden.

Der FGFR-2 interagiert im Gegensatz zum FGFR-1 mit dem neuroendokrinen Subtyp der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle im RPE. Die Aktivierung erfolgt über eine Tyrosinkinase, die nicht zum src-Subtyp zu zählen ist (Rosenthal, Thieme et al. 2001). Die daraufhin erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration dient als second messenger und führt über Aktivierung der CaM-Kinase zur Phosphorylierung des SRF und damit ebenfalls zur Aktivierung des "serum response element" (SRE) und gesteigerter Transkription des c-fos-Gens.

1.5 L-Typ Ca^{2+} -Kanäle

Ca^{2+} -Kanäle unterteilen sich in zwei Klassen: die so genannten Low-Voltage-Activated (LVA) und High-Voltage-Activated (HVA) Ca^{2+} -Kanäle. LVA-Kanäle zeichnen sich durch eine Öffnung bei niedrigen Potentialen und eine schnelle, spannungsabhängige Inaktivierung aus und werden auch als Ca^{2+} -Kanäle vom T-Typ bezeichnet. Die HVA Ca^{2+} -Kanäle hingegen werden spannungsunabhängig inaktiviert. Es handelt sich überwiegend um Ca^{2+} -Kanäle vom N- und L-Typ. L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle wurden in vielen verschiedenen Zellarten nachgewiesen und werden cAMP-abhängig durch PKA aktiviert (Reuter 1983). L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle sind in sekretorischen Zellen und in Neuronen beschrieben worden, wo sie an der Regulation der Genexpression beteiligt sind und eine entscheidende Rolle für die sekretorische Funktion der Zellen übernehmen (Bean 1989; Milani, Malgaroli et al. 1990).

Der L-Typ- Ca^{2+} -Kanal besteht aus fünf Untereinheiten: der α_1 -, α_2 -, β -, γ - und δ -Untereinheit.

Die α_1 -Untereinheit bildet die Pore und ist für die elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften des Kanals verantwortlich. Es sind vier verschiedene Untereinheiten bekannt, α_{1S} (skeletal), α_{1C} (cardiac), α_{1D} (neuroendocrine) und α_{1F} . Intrazellulär bindet die β -Untereinheit an der hoch konservierten Bindungsstelle der α_1 -Untereinheit. Die β -Untereinheit ist beteiligt an der Regulation der Genexpression der α_1 -Untereinheit und beeinflusst die Öffnungseigenschaften, die Spannungsabhängigkeiten, die Dihydropyridin-Bindung und die Kinetik des Kanals. Die γ - und die δ -Untereinheit befinden sich transmembranär (Catterall 1998).

Spezifische Modulatoren des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals sind Dihydropyridine, wobei Nifedipin, Nitendipin und Nimodipin inhibierend und BayK 8644 aktivierend wirken.

1.5.1 L-Typ Ca^{2+} -Kanäle im RPE

Das RPE exprimiert eine Splicing-Variante der $\text{Ca}_v1.3$ Untereinheit, die bisher in keinem anderen Gewebe nachgewiesen werden konnte (Wimmers, Coeppicus et al. 2004). Die elektrophysiologischen Eigenschaften dieser Variante sind für eine Aktivierung der Kanäle bei niedrigeren Spannungen verantwortlich. Das niedrige Schwellenpotential ist

von entscheidender Bedeutung, da RPE-Zellen normalerweise ein Membranpotential von -30 mV nicht überschreiten (Ueda and Steinberg 1993; Ueda and Steinberg 1995; Rosenthal, Thieme et al. 2001; Mergler and Strauss 2002). Ein weiteres besonderes Merkmal der L-Typ Kanäle im RPE ist, dass die Aktivität durch Tyrosinkinasen reguliert wird (Strauß, Mergler et al. 1997; Strauss, Buss et al. 2000; Rosenthal, Thieme et al. 2001; Mergler and Strauss 2002).

1.5.2 Intrazelluläre Signaltransduktion des Ca²⁺-Kanals

Die Aktivität der L-Typ Ca²⁺-Kanäle wird durch Phosphorylierung reguliert. Die Beteiligung von Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC), Proteintyrosinkinasen (PTK) und Phosphatasen wurde beschrieben (Galizzi, Qar et al. 1987; McDonald, Pelzer et al. 1994; Wiechen, Yue et al. 1995; Sperelakis, Katsube et al. 1996; Wijetunge and Hughes 1996; Strauß, Mergler et al. 1997; Strauss, Buss et al. 2000). Im RPE sind an der Phosphorylierung die PTK vom src-Subtyp (pp60^{c-src}) und die PKC beteiligt. Die PTK ist jedoch abhängig von der PKC in ihrer Wirkung auf den Ca²⁺-Kanal, so dass bei erhöhter PKC-Aktivität die PTK inhibierend wirkt, bei Ruhebedingung aktivierend wirkt (Strauß, Mergler et al. 1997). Es ist bekannt, dass das RPE die α_{1D} -Untereinheit des L-Typ-Ca²⁺-Kanals exprimiert. Immunopräzipitationsexperimente haben gezeigt, dass eine direkte Interaktion zwischen der α_{1D} -Untereinheit und der PTK pp60^{c-src} besteht (Strauss, Buss et al. 2000). Eine weitere direkte Interaktion des L-Typ Rezeptors ist für die cAMP abhängige Proteinkinase (PKA) an der α_{1C} -Untereinheit nachgewiesen (Yoshida, Takahashi et al. 1992; Kameyama, Shearman et al. 1996).

So steht in nicht erregbaren Zellen wie dem RPE die Regulation des Ca²⁺-Einstroms durch Verschiebung der Potentialabhängigkeit im Vordergrund, während in erregbaren Zellen die Funktion der L-Typ Ca²⁺-Kanäle darin besteht, den Ca²⁺-Einstrom bei Depolarisation, also Potentialänderung, zu generieren.

Der durch Phosphorylierung aktivierte L-Typ Kanal lässt Ca²⁺ einströmen und erhöht dadurch die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration, die als „second messenger“ eine Transduktionskaskade über Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaM-Kinase) induziert. Die CaM-Kinase phosphoryliert sowohl den „serum response factor“ (SRF) als auch das „cAMP response element“ (CRE) und induziert damit die c-fos-Expression über

SRE und über CaRe/CRE. Die Ca^{2+} abhängige Phosphorylierung von CREB kann auch zusätzlich durch die CREB-Kinase reguliert werden.

1.6 Transkriptionsfaktoren

1.6.1 Transkriptionsfaktor c-fos

C-fos stellt eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors Activating Protein 1 (AP-1) dar. AP-1 gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die ihre Funktion mittels Dimerisierung ausübt. Die Heterogenität dieser Dimerkompositionen ist sehr vielfältig. AP-1 besteht aus Mitgliedern der Jun, der Fos und der CREB/ATF Familie (Karin, Liu et al. 1997).

Aus der Jun-Familie bilden c-jun, junB, und junD und aus der Fos-Familie c-fos, fosB, fra-1 und fra-2 die Untereinheiten des AP-1 Komplexes (Rossi, Jang et al. 1998). CREB, CREB-2, ATF1 – ATF4, ATF6 und ATFa gehören in die CREB/ATF Familie (Hai and Curran 1991; Chatton, Bocco et al. 1994).

C-jun- und c-fos-Protoonkogene kodieren die Proteine JUN und FOS, die die Hauptvertreter der AP-1 Untereinheiten bilden (Bohmann, Bos et al. 1987; Angel, Allegretto et al. 1988; Chiu, Boyle et al. 1988; Franza, Rauscher et al. 1988; Rauscher, Voulalas et al. 1988). Die Proteine der Protoonkogene bilden äußerst wirksame Heterodimere (jun/fos). JUN ist zusätzlich in der Lage Homodimere (jun/jun) zu bilden, die jedoch instabiler und somit weniger effektiv sind. Die höhere Thermostabilität der Heterodimere scheint die größere AP-1 Aktivität zu erklären und damit potentere Transaktivatoren zu bilden (Smeal, Angel et al. 1989). Im Gegensatz zu c-jun und der CREB/ATF-Familie ist c-fos allein nicht in der Lage Homodimere zu bilden und somit nicht in Abwesenheit anderer AP-1 Komponenten die Transkription zu stimulieren. C-fos kann aber mit jedem beliebigen JUN Protein dimerisieren (Chiu, Boyle et al. 1988; Halazonetis, Georgopoulos et al. 1988; Kouzarides and Ziff 1988; Nakabeppu, Ryder et al. 1988; Sassone-Corsi, Lamph et al. 1988; Smeal, Angel et al. 1989).

jun-Familie	fos-Familie	CREB/ATF-Familie
c-jun	c-fos	ATF2
v-jun	v-fos	ATF3/LRF1
jun-B	fosB	B-ATF
jun-D	fra1	bZIP
	fra2	

Tab.1.6.1 Mitglieder der AP-1-Familien
aus Karin et al. 1997

Die Untereinheiten des AP-1 gehören in die Familie der basic leucine zipper (bZip) Proteine. Sie besitzen gleiche strukturelle Domänen, die ihnen die Dimerisierung und damit die Bindung an AP-1-Bindungsstellen ermöglichen: eine basische (b) Region und eine Leucin Zipper (Zip) Region. Während die basische Region, die sich durch große Anhäufung positiv geladener Reste kennzeichnet, direkt an der DNA-Sequenz bindet, ist die Leucin Zipper Region an der Bildung der Dimerstruktur maßgeblich beteiligt (Kouzarides and Ziff 1988; Vogt and Bos 1990). Der „Leucin Zipper“ bildet eine α -Helix aus, in der jede siebte Aminosäure ein Leucin oder eine andere hydrophobe Aminosäure darstellt. Diese Anordnung bewirkt die Dimerisierung in Form von „coiled-coils“. Daneben können noch weitere hydrophobe Leucinreste und andere Salzbrücken zusätzlich die Dimerbindung stabilisieren (Zerial, Toschi et al. 1989).

Die Dimerisierung der AP-1 Untereinheiten ist die Voraussetzung für die Bindung an spezifischen DNA-Erkennungssequenzen, die man auch als AP-1 Bindungsstellen (AP-1-BS) bezeichnet. Folge ist eine Induktion der Transkription verschiedenster Gene, die in die biologischen Vorgänge der Zelle eingreifen und somit das Zellwachstum, die Differenzierung aber auch Tumorentstehung und Invasionsfähigkeit beeinflussen können (Curran and Franza 1988; Angel and Karin 1991).

Die regulatorische Wirkung des AP-1 Komplexes kann induzierend wie inhibierend sein (Distel, Ro et al. 1987; Franza, Rauscher et al. 1988).

Das c-fos-Gen ist auf dem Chromosom 14 in der Region q21-31 lokalisiert (Barker, Rabin et al. 1984). Das 4kb lange Gen enthält 3 Introns und transkribiert eine 2,2kb große mRNA.

Die Genexpression von c-fos ist in fast allen Geweben stark reguliert, so dass c-fos meist nur in sehr geringem Maße exprimiert wird. Durch einen negativen

Rückkopplungsmechanismus über den c-fos-Promoter (Lucibello, Lowag et al. 1989), vorzeitige Terminierung der Transkription (Lamb, Fernandez et al. 1990) und postranskriptionalem Turnover der RNA (Shyu, Greenberg et al. 1989) wird die Genexpression ohne externe Stimuli auf einem sehr niedrigen Level gehalten. Eine gesteigerte Expression resultiert aus einer Stimulation der Zellen mit Wachstumsfaktoren, Phorbol ester, Cytokinen u.a.

1.6.2 Stimulation der c-fos-Expression

Die Bildung sowie die Stimulierung der AP-1 Dimere sind unterschiedlichsten Einflüssen unterlegen. Spezifische Proteine oder durch Phosphorylierung aktivierte Proteinkomplexe stimulieren und regulieren die Aktivität des AP-1 Komplexes entweder durch Induktion der de-novo-Synthese oder Stimulation der Aktivität vorbestehender AP-1 Dimere (Adcock 1997).

Dabei bildet die Aktivierung des AP-1 Komplexes das Ende komplizierter intrazellulärer Transduktionswege. Mehrere Wachstumsfaktoren, Serum und Phorbol ester wie TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat) stimulieren über membranständige Rezeptoren und aktivierte PKC die c-jun/c-fos Aktivität in hohem Maße. Inhibitoren der PKC können diese Genregulation blockieren (Angel, Imagawa et al. 1987; Imbra and Karin 1987; Brenner, O'Hara et al. 1989).

Die Transkription des c-fos-Gen im RPE wird über zwei voneinander unabhängige DNA-Sequenzen, dem „serum response element“ (SRE) und dem „calcium response element“ (CaRE), in der Promoterregion des Gens induziert und somit reguliert (Rosen, Ginty et al. 1995) (siehe Abbildung 1.6.3.). Das CaRE ist funktionell identisch mit dem „cAMP response element“ (CRE). Das jeweilig spezifische Bindeprotein, welches am Ende der Transduktionskaskade durch Phosphorylierung aktiviert wird, induziert die Transkription des Gens. Das CRE-Bindeprotein (CREB) wird sowohl über zytosolisches Ca^{2+} als auch über die aktivierte CREB-Kinase reguliert.

Das SRE ist an den „serum response factor“ (SRF) gebunden und wird durch Signalkaskaden phosphoryliert, die unter anderem Folge der Ligandenbindung eines FGF-Rezeptors sind.

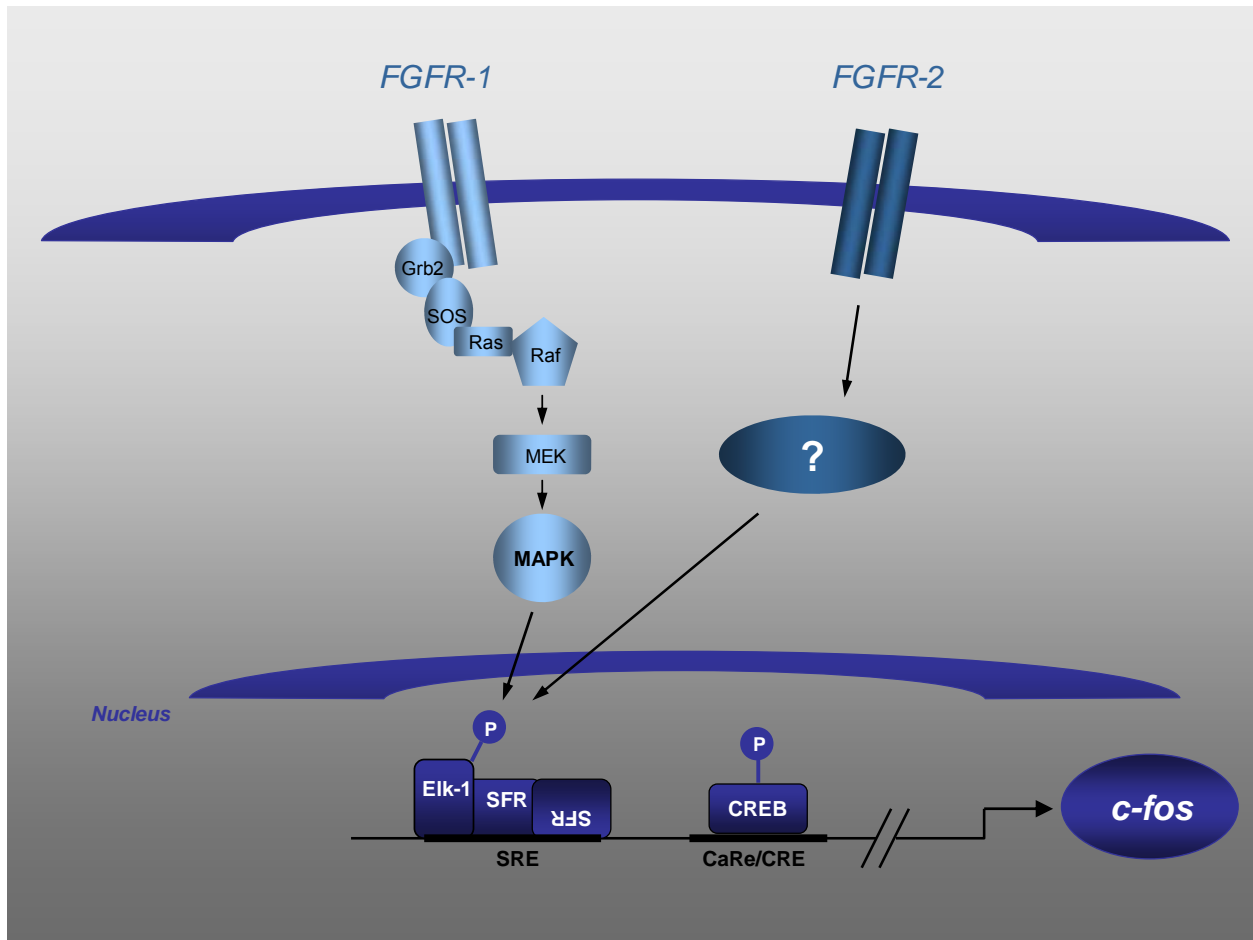


Abb.1.6.3. Regulation der c-fos-Genexpression im RPE (modifiziert nach Janknecht 1995)

1.6.3 Funktion der c-fos-Expression

Das Protoonkogen c-fos gehört zu den gut charakterisierten Transkriptionsfaktoren. In fast allen Geweben ist eine stetige c-fos-Expression in sehr geringem Maße nachweisbar. Als „immediate early gene“ greift es sofort in die Proliferation und Differenzierung ein und beeinflusst die biologischen Vorgänge der Zellen. So ist c-fos an der Regulation der Apoptose (programmierter Zelltod) sowohl induzierend als auch inhibierend beteiligt (Hafezi, Steinbach et al. 1997; Wenzel, Grimm et al. 2000).

Bei der Ossifikation spielt c-fos durch Induktion der Osteogenese, sowie Osteoblasten wie Osteoklastenbildung eine wichtige Rolle (Sandberg, Vuorio et al. 1988; Grigoriadis, Wang et al. 1994). Ebenso spielt der Transkriptionsfaktor eine große regulatorische

Rolle im invasiven Verhalten maligner Tumoren, sowie eine entscheidende Rolle im Zellwachstum per se (Hu, Mueller et al. 1994).

Auch in der Aufrechterhaltung des Schlaf-Wach-Rhythmus scheint c-fos einen entscheidenden Einfluss auszuüben (Pompeiano, Cirelli et al. 1995).

Über die Regulation der c-fos-Expression im RPE ist bisher allerdings wenig bekannt.

1.7 Fragestellung der Arbeit

Das RPE spielt in der Aufrechterhaltung der physiologischen Abläufe der Photorezeptoren eine besondere Rolle und ist somit auch an der Pathogenese vieler Erkrankungen des menschlichen Auges ursächlich beteiligt.

Wachstumsfaktoren wie bFGF sind in vielen degenerativen Erkrankungen der Retina als möglicher Beteiligter beschrieben worden. Welche Rolle das bFGF hier am RPE entfaltet, ist jedoch noch weitestgehend unbekannt. Auch die unterschiedliche Rolle der zwei FGF-Rezeptoren und des Ca^{2+} -Kanals im RPE und deren aktivierte Signalwege ist noch nicht ausreichend geklärt.

In dieser Arbeit dient der Transkriptionsfaktor c-fos aus der Familie der „immediate early genes“ als Marker für die Änderung der Genexpression bei Aktivierung der bFGF-Rezeptoren und der Ca^{2+} -Kanäle.

Ziel der Arbeit ist es, eine quantitative Aussage über die Änderung Genexpression auf der Ebene des transkribierten c-fos zu machen. Zusammenfassend lassen sich folgende Fragen formulieren:

- (1) Induziert die Inkubation mit bFGF die c-fos-Expression in humanen RPE-Zellen?
- (2) Welche Rolle spielen die beiden bFGF-Rezeptoren im RPE und wie unterscheiden sie sich in der Induktion der Expressionsrate von c-fos?
- (3) Hat die Stimulation des L-Typ Ca^{2+} -Kanals mit bFGF einen Einfluss auf die Regulation der c-fos-Expression?
- (4) Induziert die Aktivierung des L-Typ Ca^{2+} -Kanals mit BayK8644 die c-fos-Expression?

Zur Beantwortung dieser Frage wird mit Hilfe der Real-Time-PCR die mRNA (cDNA) kultivierter humaner RPE-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Modulatoren quantifiziert.

2 Material

2.1 Chemikalien, Enzyme, Kits

Applied Biosystems (Perkin Elmer), Foster City, USA:
GeneAmp® RNA PCR: MuLV Reverse Transkriptase,
RNase Inhibitor, Oligo d(T)₁₆, dNTP`s,
10x PCR Buffer II, MgCl₂ Solution
AmpliTaq®-FS-Big-Dye-Terminator-Premix

Boehringer, Mannheim, Deutschland
High Pure PCR Product Purification Kit

Calbiochem, San Diego, USA
SU 5402

Fluka AG, Buchs, Schweiz
RNase-freies bidestilliertes Wasser

Life-Technologies (Gibco-BRL), Gaithersburg, USA
RNA-Ladder,

New England BioLabs®, USA
EcoR I, supplied with 10x NEBuffer EcoR I

Promega, Madison, USA
T4 DNA Ligase, 10x T4 Ligase Puffer

Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I: LightCycler FastStart Enzyme,
FastStart Reaction Mix SYBR Green I, MgCl₂ Solution, RNase-free H₂O

Qiagen, Hilden, Deutschland

Taq PCR Core Kit: Taq DNA Polymerase, 10x PCR Buffer, 5x Q-Solution, dNTP-Mix (10mMeach), MgCl₂-Solution

Qiagen™-System (Plasmidisolierung)

Sigma-RBI, Missouri, USA

S(-)-BAY K 8644, Nifedipin

WAK-Chemie, Bad Soden, Deutschland

Total RNA Isolations-Reagenz: RNAzol-B

2.2 Plasmide, Bakterien, Zelllinien

Zelllinien

ARPE-Zellen der Zelllinie P 19
(ATCC)

Bakterien

E.coli TOP F10

Vektor

pGEM®-T Easy Vector
(3015 bp)

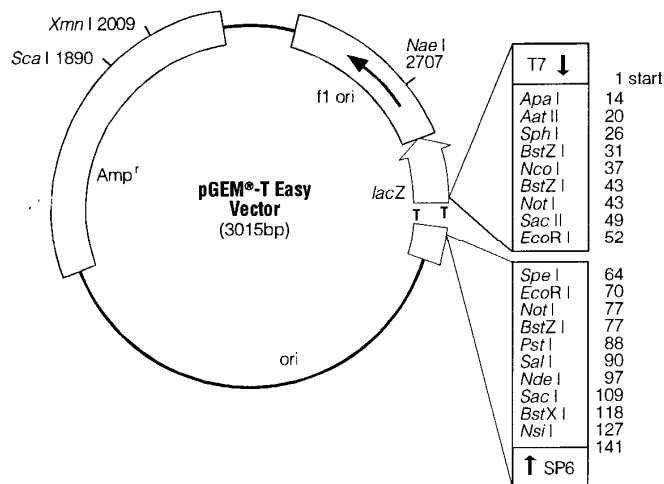


Abb.2.2. pGEM®-T Easy Vector

2.3 Medien und Lösungen

2.3.1 Kulturmedien

D-MEM/Zellkulturmedium

D-MEM/HAM's F12
+ Glutamin (1:1)

50 ml	FCS (Canserva) 10%
5 ml	Penicillin/Streptomycin
250 µl	Insulin-Transferrin-Sodium
5 ml	non essential aminoacids
2,5 ml	Hepes-Puffer (1M)

LB-Medium

10 g	Bacto-Trypton
5 g	Bacto-Hefeextrakt
10 g	Natriumchlorid
ad 1 l	aq. dest.

LB-Agar + Ampicillin

1 l	LB-Medium
15 g	BiTek-Agar
1 ml	Ampicillin (100 mg/ml)

SOB-Medium

20 g	Bacto-Trypton
5 g	Bacto-Hefeextrakt
10 ml	Natriumchlorid (1M)
2,5 ml	Kaliumchlorid (1M)
10 ml	Magnesiumchlorid (1M)
10 ml	Magnesiumsulfat (1M)
ad 1 l	aq. dest.

SOC-Medium

100 ml	SOB-Medium (ohne SO ₄)
2 ml	1 M Glukose

2.3.2 Lösungen und Puffer

PBS-Puffer	140 mM	NaCl
	2 mM	KCl
	10 mM	Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O
	2 mM	KH ₂ PO ₄
10x PCR-Puffer	500 mM	KCl
(High Fidelity PCR-Puffer/ GeneAmp PCR-Puffer II)	100 mM	Tris-Hcl, pH 8,3
3x RNA-Probenpuffer	20 %	(v/v) 5x MOPS
	6 %	(v/v) 37% Formaldehyd
	50 %	(v/v) Formamid
	0,25 %	(w/v) Bromphenolblau
	5 µg/ml	Ethidiumbromid
10x T4-DNA-Ligasepuffer	200 mM	Tris-Cl (pH 7,6)
	50 mM	MgCl ₂
	50 mM	Dithiothreitol
	500 µg/ml	BSA (optional)
	5 mM	ATP
X-Gal	20 mg	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galctosid
	in 1 ml	Dimethylformamid (DMF)
IPTG-Lösung	1 g	Isoprpylthio-β-galactosid
	ad. 5 ml	aq. dest.

Qiagen™-System
(Plasmidisolierung):

EB	10 mM	Tris-HCl, pH 8,5
P1	50 mM 10 mM 100 µg/ml	Tris-HCl, pH 8,0 EDTA RNase A
P2	200 mM 1 %	NaOH SDS
P3	3 M	Kaliumacetat
QBT	50 mM 750 mM 15 % 0,15 %	MOPS, pH 7,0 NaCl Ethanol Triton X-100
QC	50 mM 1 M 15 %	MOPS, pH 7,0 NaCl Ethanol
QF	10 mM 1,25 M 15 %	Tris-HCl, pH 8,0 NaCl Ethanol

3 Methoden

3.1 Herstellung einer Zelllinie

Reagenzien

- D-MEM-Kulturmedium
- Trypsin
- EDTA

In allen vorliegenden Versuchen wurden ARPE-Zellen der Zelllinie P19 (ATCC) verwendet. Diese werden im Brutschrank bei 37°C und bei 5 % CO₂ (in Luft) im D-MEM-Kulturmedium inkubiert.

Sie wurden einmal wöchentlich nach der Trypsin EDTA-Methode passagiert und zweimal die Woche mit frischem D-MEM-Medium versorgt.

3.2 Total-RNA-Isolierung

Reagenzien

- PBS-Lösung
- RNAzol
- Chloroform
- Isopropanol
- Ethanol (70 %)
- Fluka-Wasser

Bei der Isolierung der RNA wurde nach dreimaligem Waschen mit PBS-Lösung die Lyse des Zellpellets mit je 2 ml RNAzol B, einer Mischung aus Phenol, Isothiocyanat und einem lipophilen blauen Farbstoff, durchgeführt und in je zwei Tubes überführt. Der Farbstoff diente zur besseren Unterscheidung der wässrigen und der organischen Phase in der Präparation.

Nach Zugabe von 0,2 Vol. Chloroform wurden die Proben stark gevortext, 10 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (14.000 xg, 20 min, 4°C, Zentrifuge Z233 MK-2, Hermle). Die obere (wässrige) Phase wurde abgenommen und in neue Tubes überführt; die Interphase und die untere (phenolische) Phase wurden verworfen. Die obere Phase wurde mit 1 Vol. eiskaltem Isopropanol vermischt und die RNA 30 min bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation (14.000 xg, 15 min, 4°C) wurde das Pellet in eiskaltem 75%igen Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und die Pellets beider Tubes in 30 µl RNase-freiem Wasser (Fluka) resuspendiert.

Quantifizierung und Qualitätskontrolle der extrahierten Total-RNA erfolgten fotometrisch sowie gelelektrophoretisch. Um die Reinheit der isolierten RNA zu beurteilen (kontaminationsgefahr mit der aus der Interphase stammenden Proteine), wurde der Quotient OD_{260}/OD_{280} berechnet; dieser sollte mindestens 1,5 betragen; er lag stets zwischen 1,5 und 2,3. Die gelelektrophoretische Darstellung der RNA auf einem 1,5%igen Agarosegel zeigte, dass keine Degeneration stattgefunden hatte.

3.3 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

Reagenzien

- Agarose
- 1x MOPS
- Formaldehyd
- 3 x RNA-Probenpuffer

Die entsprechende Menge Agarose für ein 1,2%iges Gel wurde in 1 x MOPS durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlung auf ca. 60°C wurde 2 Vol.-% Formaldehyd zugegeben. Die Lösung wurde in einen Gelschlitten gegossen, in welchen ein Gelkamm eingesetzt war. Nach dem Abkühlen und Erhärten wurde der Kamm gezogen und das Gel mitsamt des Schlittens in eine Gelkammer überführt, in welche als Laufpuffer soviel 1 x MOPS gegeben wurde, dass das Gel vollständig bedeckt war. Die RNA-Proben wurden mit ½ Vol. Denaturierungspuffer aufgenommen, für 15 min bei 65°C inkubiert, für 5 min auf Eis abgekühlt und in die Geltasche pipettiert. Nach 30 min mit 60 V wurde der Gellauf mit 75 V weitere 60 min bis zur gewünschten Laufstrecke durchgeführt. Das

sich in die Tertiärstruktur der Nukleinsäuren interkalierende Ethidiumbromid (Bestandteil des 1 x Laufpuffers) ermöglicht die Visualisierung der RNA bei 312 nm mit einem UV-Transilluminator. Zur Dokumentation wurde eine Sofortbildkamera verwendet.

3.4 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Quantifizierung erfolgte spektralfotometrisch (Gene Quant II, RNA/DNA-Calculator, Pharmacia Biotech). Die zu quantifizierende Nukleinsäure wurde mit Fluka-Wasser verdünnt (10 µl/ml) und in einer Küvette gegen das als Nullwert eingestellte Wasser vermessen. Die Absorptionsmessung bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, diente der eigentlichen Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren. Indem ein Spektrum von 300 – 220 nm abgefahren wurde, konnte auch die Reinheit der Nukleinsäurelösung ermittelt werden. Durch Vergleich mit der Absorption bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, ließ sich die diesbezügliche Verunreinigung erkennen. Der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} sollte mindestens 1,5 betragen.

3.5 Reverse Transkription (RT)

Reagenzien

- GeneAMP® RNA-PCR:
- MuLV-Reverse Transkriptase (50 U/µl)
- RNase-Inhibitor (20 U/µl)
- Oligo d(T)₁₆-Primer (50 µl)
- dNTP-Mix (2,5 mM each)
- 10 x PCR Buffer II
- MgCl₂ Solution (25 mM)
- Fluka-Wasser

1 µg RNA wird mit 33 µl Master Mix versetzt, bestehend aus 1 µl MuLV Reverse Transkriptase, 2 µl RNase Inhibitor, 2 µl Oligo d(T)₁₆-Primer, 16 µl dNTP's, 4 µl 10 x PCR Buffer II und 8 µl MgCl₂ Solution. Die Lösung wird mit Fluka-Wasser auf 30 µl aufgefüllt. Im Thermocycler GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) wird der Ansatz zuerst für 15 min bei 22°C (Raumtemperatur), für 15 min bei 45°C und für 5 min bei 99°C inkubiert und anschließend für 5 min bei 5°C abgeschreckt.

3.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Reagenzien

- Taq PCR Core Kit (Qiagen)
 - Taq-Polymerase
 - dNTP-Mix (2,5 mM each)
 - MgCl₂ Solution
 - 10 x PCR Buffer II
- 5'-Primer
- 3'-Primer
- Fluka-Wasser

3 (1-5) µl RT-Produkt wurden mit 10 µl 10x PCR-Puffer II, 20 µl 25 mM MgCl₂, 16 µl dNTP-Mix, jeweils 4,0 µl beider Primer sowie 0,5 µl Taq-Polymerase versetzt und mit aqua dest auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt.

Als Negativkontrollen dienten PCR-Ansätze ohne RT-Produkt zum Ausschluss einer Kontamination mit Template.

Das Amplifikationsstandardprogramm war:

5	min	95	°C	30 Zyklen
20	sec	95	°C	
30	sec	62	°C	
30	sec	72	°C	
7	min	72	°C	
		4	°C	

Als Thermocycler wurde das GeneAmp PCR-System 2400 (Perkin Elmer) verwendet.

Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch dargestellt. Die Spezifität des Amplifikats wurde mittels Sequenzierung verifiziert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Primer (c-fos human) verwendet:

upper primer + 5'-CGAGATTGCCAACCTGCTGAA-3'

lower primer - 5'-CACTGGGCCTGGATGATGC-3'

3.7 Agarosegelelektrophorese

Reagenzien

- Agarose
- 1x TAE
 - Tris-Base
 - Eisessig
 - EDTA
 - ad l aq. dest.
- Ethidiumbromid
- 10 x DNA-Probenpuffer

Die Agarose wurde in einer Konzentration zwischen 0,5% und 2% in 1 x TAE durch Kochen gelöst und in einen Gelschlitten gegossen, in dem ein Kamm eingesetzt war. Nach Abkühlung und Erhärten wurde der Kamm gezogen und das Gel mitsamt dem Schlitten in eine Gelkammer eingesetzt, in welcher als Laufpuffer ebenfalls 1 x TAE gegeben wurde, so dass das Gel vollständig bedeckt war. Die mit dem DNA-Puffer versetzten Proben wurden in die Geltaschen pipettiert. Als Marker wurde λ -Hind und eine 100 bp-Leiter verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 70 V bis zur gewünschten Laufstrecke. Das sich in die Tertiärstruktur der Nukleinsäuren interkalierende Ethidiumbromid ermöglicht die Visualisierung der DNA bei 312 nm mit einem UV-Transilluminator. Zur Dokumentation wurde eine Kamera verwendet.

3.8 Verifizierung der c-fos-RNA

Nach Auswertung eines weiteren DNA-Agarosegels konnte man die ungefähre Größe der DNA-Moleküle abschätzen. Die Größe des Amplifikats lieferte jedoch noch keinen Beweis, dass es sich tatsächlich um c-fos DNA handelte.

Zur Verifizierung dieser Behauptung wurde eine Sequenzierung der DNA angeschlossen. Das Resultat dieser Methode war eine vollständige Sequenzanalyse einer der beiden DNA-Stränge.

Dazu wurde die DNA in ein Plasmid ligiert, dieses in einen *E. coli*-Stamm transformiert und so unbegrenzt autonom repliziert.

3.9 Ligation

Reagenzien

- pGEM®-T Easy Vektor
- 10 x T4 Ligase Puffer
- T4 DNA Ligase

Die nun zu klonierenden Inserts aus den vorausgegangenen PCR-Produkten wurden aufgereinigt mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Boehringer) und nochmalig zur Bestimmung des Verhältnisses zwischen DNA und Vektor im Ligationsansatz auf einem 1,5%-igen Agarosegel aufgetragen.

Die Intensität der Bande ergab im Vergleich zu den Marker-Banden eine ungefähre Schätzung der Größe der Nukleinsäuremoleküle und somit im Ligationsansatz das Verhältnis von 1 µl PCR-DNA zu 3 µl pGEM®-T Easy Vektor (3015 bp). Zusätzlich wurden 5 µl 10 x T4 Ligase Puffer und 1 µl T4 DNA Ligase pipettiert und mit aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Es wurde über Nacht bei 14°C inkubiert und direkt oder nach Zwischenlagerung bei -20°C zur Transformation eingesetzt.

3.10 Transformation

Reagenzien

- Bakterienkulturen *E. coli* Top F10
- SOC-Medium
- LB-Agar (s.u.)
- Ampicillin (100 mg/ml)
- IPTG
- X-Gal

Der LB-Agar wurde hergestellt, indem der BiTek-Agar durch Autoklavieren im LB-Medium gelöst wird. Das Ampicillin wurde nach Abkühlung des LB-Agars auf ca. 40°C zugegeben, um eine Inaktivierung des Antibiotikums zu vermeiden.

Zu den auf Eis aufgetauten *E. coli*-Kulturen (50 µl pro Greiner-Tube) wurden 2 µl des zu transformierenden Plasmids (aus dem Ligationsprodukt) pipettiert, vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz für 30 sek im 42°C warmen Wasserbad erhitzt sofort für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die Bakterien im Schüttelinkubator für 1 h bei einer Schüttelfrequenz von 225 rpm und bei einer Temperatur von 37°C inkubiert und anschließend auf der LB-Agarplatte + Ampicillin ausplattiert. Damit möglichst nur transformierte Bakterien

Kolonien bilden, wurde in Abhängigkeit von den Eigenschaften des Plasmids eine Selektion über die Ampicillinresistenz sowie über die Blau-Weiß-Selektion durchgeführt. Für die Selektion über das Blau-Weiß-Screening wurden dem LB-Agar 5 µl/ml IPTG sowie 4 µl/ml X-Gal beigefügt. Die Beschichtung der Agarplatte mit IPTG induziert in transformierten Zellen die β -Galactosidase. Enthält ein Plasmid kein Insert, besitzt es also eine unveränderte Multiple-Cloning-Site, kann es β -Galactosidase produzieren, welches X-Gal verstoffwechselt. Dies hat eine Blau-Färbung der Kolonie zur Folge. Durch den Einbau des Inserts wird die Sequenz in der lacZ-Region zerstört, die für die Funktionsfähigkeit der β -Galactosidase unumgänglich ist und die Kolonie bleibt weiß. Die angeimpften Agarplatten wurden über Nacht bei einer Temperatur von 37°C inkubiert.

Weiß abgrenzbare Klone wurden gepickt und zur Durchführung von Mini-Plasmid-Präparationen und zum Anlegen von Glycerolstocks in 4ml Ampicillin-haltigem LB-Medium hochgezüchtet.

Dazu wurde die Bakterienkultur wiederum über Nacht bei einer Temperatur von 37°C und einer Schüttelfrequenz von 225 rpm inkubiert.

3.11 Plasmid-Miniprep

Reagenzien

- QiagenTM-System (Plasmidisolierung)
- Isopropanol
- Ethanol (70 %)

Um die DNA sequenzieren zu können, mußte das Plasmid wieder isoliert werden und der Reinheitsgrad der DNA optimal sein. In Abhängigkeit der benötigten Menge zur Weiterverarbeitung wurde ein Mini-, Midi-, Maxi-, oder sogar Megaprep gemacht.

Für die Sequenzierung reicht eine geringe Menge <20 µg DNA, so dass hier die Methode der Minipräparation angewandt wurde. 1,5 ml der Bakteriensuspension wurden durch Zentrifugation (1 min bei 5000 rpm, RT, Zentrifuge Z233 MK-2, Hermle) sedimentiert. Das Bakteriensediment wird mit einem RNase-Puffer (P1) resuspendiert und die Bakterien mit einem zweiten Puffer (P2) lysiert. Nach Zugabe eines

Neutralisations-Puffers (P3) wurde der Ansatz 15 min bei >13000 rpm und 22°C zentrifugiert. Dabei wurden Proteine, Zelltrümmer und bakterielle genomische DNA sedimentiert. Im Überstand befand sich die Plasmid-DNA, die mit Isopropanol und Ethanol gewaschen und ausgefällt und in 50µl Fluka-Wasser resuspendiert wurde.

3.12 Sequenzierung

Mit Hilfe der von Sanger entwickelten enzymatischen Methode, auch Kettenabbruch-Synthese genannt, kann die Nukleotidsequenz eines DNA-Moleküls bestimmt werden.

Nach Trennung der doppelsträngigen DNA-Struktur wird ausgehend von einem Primer, der mit dem bekannten 3'-Ende der Matrize basepaaren kann, und mit Hilfe einer DNA-Polymerase ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert.

Neben den vier Desoxyribonukleotid-Triphosphaten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sind in dem Ansatz nach Sanger zusätzlich modifizierte Formen der vier Nukleotide, Didesoxyribonukleotid-Triphosphate (ddNTP) enthalten, die sich durch die fehlende 3'-Hydroxy-Gruppe auszeichnen und damit keine Phosphodiesterbindung zum nächsten Kettenglied ausbilden können. Das Resultat ist ein Stopp der Synthese und unterschiedlich große klonierte Restriktionsfragmente.

Durch die Festlegung des Anfangspunktes durch den zugegebenen Primer spiegelt die Länge der Synthesefragmente in dem Reaktionsansatz die relative Position der jeweiligen Nukleinbasenorte im Molekül wieder. Werden die ddNTP zusätzlich mit einer bestimmten Farbe für jeden der vier Nukleinbasen fluoreszenzmarkiert, können sie anschließend durch die jeweilige Fluoreszenzfarbe ihrer Didesoxy-Enden zugeordnet werden und die Sequenz des Matrizenstranges abgeleitet werden.

Reagenzien

- EcoRI
- EcoRI-Puffer
- AmpliTaq-FS-Big-Dye-Terminator-Premix (Perkin Elmer)
- Gem Rev-Primer
- T7-Short-Primer
- TSR

Zur doppelten Kontrolle wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt, wobei die Plasmidinserts mit EcoRI herausgeschnitten wurden. In 5 µl Transformationsansatz wird 1 µl EcoRI-Enzym und 1 µl EcoRI-Puffer pipettiert, mit Fluka-Wasser auf 10 µl aufgefüllt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Fragmente in einem 0,7%-igen Agarosegel sichtbar gemacht und mit einer ungeschnittenen mitgelaufenen Negativkontrolle verglichen.

Für den Sequenzierungsansatz wurden 4 µl Ampli-Taq-FS-Big-Dye-Terminator-Premix, 1 µl Primer (ein Ansatz mit Gem Rev und ein zweiter mit T7-Short), DNA (entweder 10-50 ng PCR-DNA-Produkt oder 250-1000 ng Plasmid-DNA) und aqua dest. (Reaktionsvolumen 15 µl) zusammen pipettiert. Das Amplifikationsprogramm war: nach einer einmaligen Inkubation bei 96°C für 5 min 25 Zyklen: 10 sec 96 °C, 5 sec 55°C, 4 min 60°C. Als Thermocycler wurde das GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) verwendet.

Der Ansatz wurde in Centriflex-Tubes (Perkin Elmer) gereinigt, indem zweimal 2 min bei 750 xg und RT zentrifugiert wurde und das Eluat anschließend in den Sequencer Vials in der Speed Vac 10 min getrocknet wurde. Das Eluat wurde in 20 µl TSR resuspendiert, verschlossen 3 min bei 96°C denaturiert und 5 min auf Eis abgekühlt. Die automatische Sequenzierung wurde im ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) durchgeführt.

3.13 Real-Time PCR

Die Real-Time-quantitative-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion beruht, zusätzlich aber die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht.

Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während jedes einzelnen PCR-Zyklus durchgeführt. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, so dass am Ende eines Laufes, der aus mehreren Zyklen besteht, anhand der erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen werden kann. Nur in der exponentiellen Phase der PCR, die nur wenige Zyklen dauert, kann eine korrekte Quantifizierung erfolgen.

Die Real-Time-PCR besitzt gute interne Überprüfungsmodi, wie den „slope“ und die Schmelzkurve, an denen man Methodenfehler weitestgehend ausschließen kann.

Die Schmelzkurve im Anschluss der Quantifizierung sicherte die übereinstimmende DNA-Größe aller Proben.

Die quantitative Aussage wurde im Vergleich zu einer externen Standardreihe getroffen. Diese besteht aus einer Verdünnungsreihe mit bekannter Kopienanzahl. In dieser Arbeit wurde eine Standardreihe mit 5 Ansätzen verwandt, die aus 10^7 bis 10^3 Kopien pro μl bestand.

Herstellung der Standardreihe

Eine weiße Kultur wurde in 4 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium angezchtet, die Plasmide mit der Miniprep-Methode isoliert und nach Kontrolle in der Gelelektrophorese in der Real-time-PCR amplifiziert.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde der GeneQuant II, RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech) benutzt.

Die daraus zu errechnende Kopienanzahl pro μl

$1 \mu\text{g}/1000 \text{ bp DNA} = 9,1 \times 10^{11} \text{ Kopien}$

Plasmid einschließlich Insert = 3317 bp

ermöglichte die Herstellung einer Verdünnungsreihe mit bekannter Kopienanzahl.

- LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I

Zur Vorbereitung wurde das LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I-Gemisch hergestellt, indem 60 μl des LightCycler-FastStart Reaction MixSYBR Green I in die LightCycler-FastStart Enzym-Lösung pipettiert, ein einige Male invertiert und bei 4°C für höchstens 1 Woche lichtgeschützt gelagert wurden.

Der LightCycler Ansatz bestand aus 2 μl des LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I, jeweils 1 μl der schon in der PCR verwendeten Primer, 2,4 μl MgCl_2 (4 mM) und wurde mit 7,6 μl steriles PCR-grade- H_2O auf ein Gesamtvolumen von 14 μl aufgefüllt. Nach Pipettieren der Stammlösung in die LightCycler-Glaskapillare wurde

6 µl des cDNA-Templates aus der RT-Reaktion zugefügt. Abschließend werden die Ansätze für 20 sec bei 2500 rpm (Zentrifuge Z233 MK-2, Hermle) zentrifugiert und in den Rotor des LightCycler-Geräts gesetzt.

Das Standardprotokoll des LightCyclers war wie folgt:

8	min	95°C	45 Zyklen
10	sek	95°C	
15	sek	62°C	
30	sek	72°C	
		bis 95°C	

Im Gegensatz dazu wurde bei der Standardreihe nur 2 µl des DNA-Templates zugefügt und der Unterschied mit dem sterilen PCR-grade- H₂O ausgeglichen.

2 µl DNA-Template ist die angegebene Menge im Standardprotokoll der Firma Roche, doch es zeigte sich in unserem Falle, dass etwas mehr des RT-Ansatzes gebraucht wurde, um eine vergleichbare Menge Template im LightCycler-Lauf zu erhalten.

Mit Hilfe der Fluoreszenzbildung zugegebener Substanzen, wenn sie sich in die doppelsträngige DNA interkalieren, konnte die Menge der Kopienanzahl im Vergleich bestimmt werden. Der rechnerische Vergleich mit Mengenergebnissen der Standardreihe, die vorher angegeben wurden, ergab die Kopienanzahl der einzelnen Ansätze. Sie wurden graphisch dargestellt, indem die Fluoreszenzwerte gegen die Zyklus-Anzahlen aufgetragen wurden.

Als Spezifitätskontrolle wurden die Ansätze nach beenden der Amplifizierungszyklen bis 95°C erhitzt, so dass die DNA-Stränge zerfallen. Je nach Größe und Mengenverhältnisse der einzelnen Basen ergab sich für jeden DNA-Strang eine typische Schmelztemperatur, die durch einen spontanen Anstieg und direkt folgenden Abfall der Fluoreszenz begleitet wurde und graphisch dargestellt einen guten Vergleich erlaubte.

3.14 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde ein Student's *t*-test durchgeführt (% versus Kontrolle = 100 %). In die Auswertung gingen die Mittelwerte der 3-fach-Bestimmungen einer Versuchreihe ein. Die n-Zahl der Experimente ergibt sich aus der Zahl der 3-fach-Bestimmungen, die wiederum aus Doppelwerten ermittelt wurden. Die quantitativen Angaben erfolgten als Mittelwert mit Standardfehler ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). Ein signifikantes Ergebnis wurde als $p < 0,05$ (*) festgelegt. Hochsignifikant waren die Ergebnisse mit p-Werten $< 0,01$ (**)

Alle Experimente wurden mit separaten Zellkulturen durchgeführt.

4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war, eine quantitative Aussage über die Regulation der c-fos-Expression im RPE treffen zu können. Mit Hilfe einer Real-time-PCR mit externem Standard wurde ein charakteristisches Segment der c-fos-kodierenden Nukleinsäure quantifiziert. Die 302 bp große Sequenz ist intronübergreifend und charakteristisch für die gesamte Nukleinsäure. Das Primerpaar (Metabion®) war in vorausgegangenen Arbeiten für diese Sequenz herausgearbeitet worden (siehe auch Kapitel 2.4).

4.1 Herstellung der Standardreihe

4.1.1 Ergebnisse der RT-PCR

Bei der quantitativen PCR wurde ein externer Standard verwandt. Dieser bestand aus einer Standardreihe, die aus einem definierten Ansatz verschiedener c-fos-enthaltender Plasmide bestand und somit eine bekannte, genau festgelegte Kopienanzahl aufwies. Dazu wurde nach Isolierung der mRNA aus konfluent gewachsenen ARPE-Zellen eine RT-PCR mit oben genannten Primern angeschlossen, mit der die c-fos-Sequenz umgeschrieben und amplifiziert wurde. Das Ergebnis wurde mit Hilfe der Gelelektrophorese überprüft. Die c-fos-Nukleinsäuren mit einer bekannten Basenpaargröße von 302 bp wurden in Bezug zum 100 bp-Marker interpretiert und sowohl als Kontrolle der zu erwartenden Nukleinsäurengröße, als auch zur Auswahl der weiteren Probe verwendet.

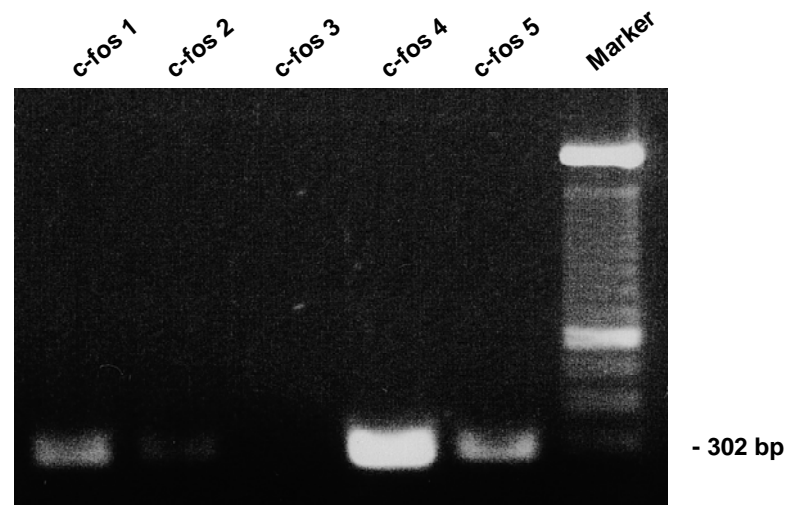


Abb. 4.1.1. Ergebnis der RT-PCR nach Isolierung der gesamt c-fos-RNA aus RPE-Zellen mit oben genannten Primern.
Marker: 100 bp

Das gezeigte Agarose-Gelelektrophorese-Bild lässt vor allem die Bande c-fos 4 besonders deutlich erscheinen, so dass diese Probe für das weitere Procedere ausgewählt wurde.

4.1.2 Ergebnisse der Sequenzierung

Die in der ausgewählten Probe enthaltenen Nukleinsäuren wurde in den pGem®-T Easy-Vektor ligiert und anschließend in *E. coli* Bakterien Top F10 transformiert. Die darauf folgende Sequenzierung erbrachte den Beweis, dass es sich um das ausgewählte c-fos-Segment handelte, die zur Herstellung der Standardreihe verwendet werden konnte.

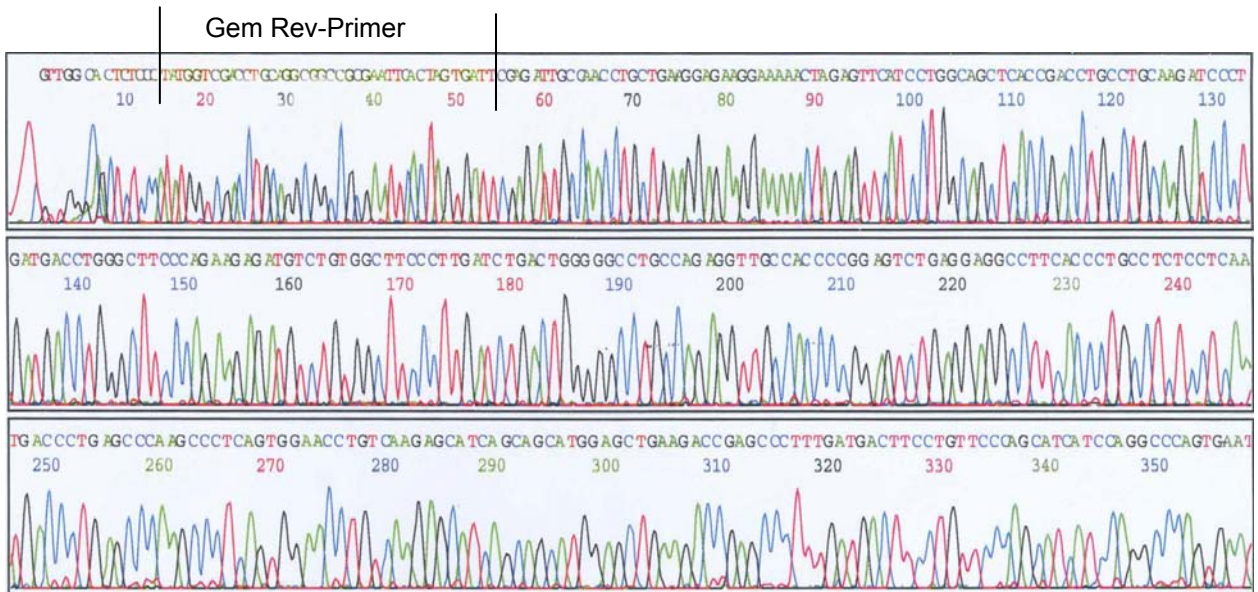


Abb. 4.1.2. Ergebnis der Sequenzierung des charakteristischen Anteils der c-fos Sequenz (302 bp) (mit oben genanntem Primer von 5' zu 3')

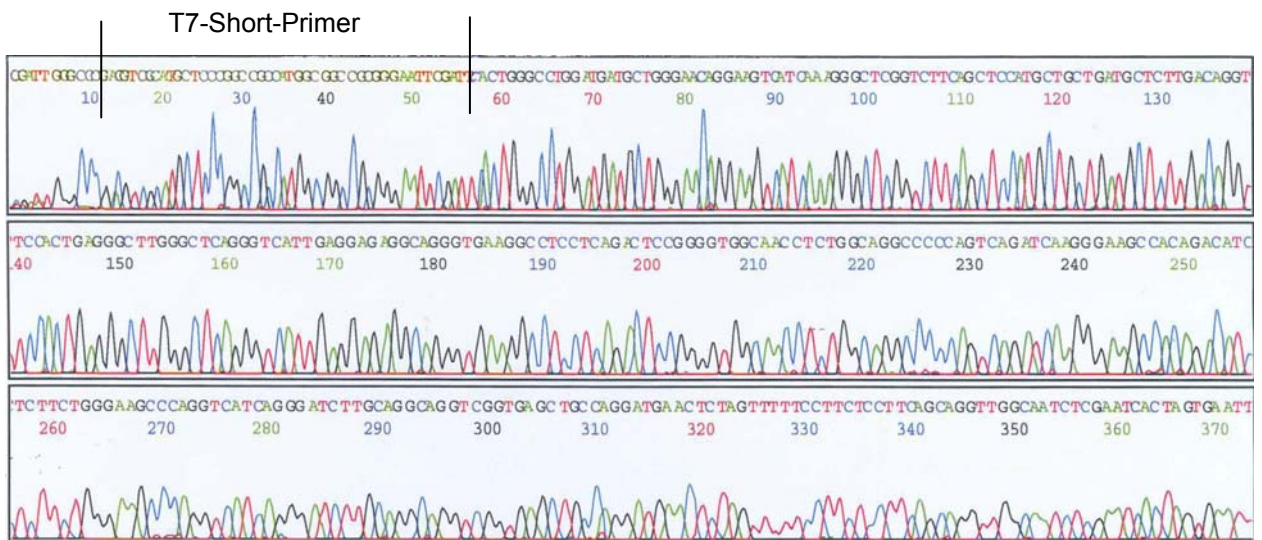


Abb. 4.1.2. Ergebnis der Sequenzierung des charakteristischen Anteils der c-fos Sequenz (302 bp) (mit oben genanntem Primer von 3' zu 5')

Zur sicheren Aufbewahrung wurden die kultivierten Bakterienstämme als Glycerolstocks eingefroren und bei -80°C gelagert.

4.1.3 Herstellung der Standardreihe

Nach Verifizierung des c-fos-Segments wurde eine Bakterienkolonie, die auf einer Ampicillin-Agarplatte angepflanzt und über Nacht bei 37°C inkubiert wurde, mit LB50-Nährmedium einschließlich $100\mu\text{g/ml}$ Ampicillin ebenfalls über Nacht bei 37°C und 200 rpm gezüchtet. Die anschließende Miniprep isolierte die Plasmid-DNA und eine Real-Time-PCR amplifizierte daraus die gewünschte c-fos-Sequenz. Eine folgende Gelelektrophorese diente als Kontrolle. Nach Konzentrationsbestimmung der DNA wurde der Gehalt an c-fos-Kopien der Probe mit der Voraussetzung ermittelt, dass $1\mu\text{g}/100\text{ bp}$ DNA einer Kopienanzahl von $9,1 \times 10^{11}$ entspricht. Das beschriebene c-fos-Fragment mit 302 bp und der pGEM-T Easy-Vektor mit 3015 bp (ges.: 3317 bp) ergaben somit,

dass die	$9,1 \times 10^{11}$ Kopien	in 3,317 μg DNA
und damit	$2,74 \times 10^{11}$ Kopien	in 1 μg

enthalten sind.

Mit der auf dieser Grundlage errechneten Verdünnung wurde eine Standardreihe hergestellt, die in 10er-Potenz-Schritten von 10^7 bis 10^3 Kopien verlief.

Es schloss sich ein erster LightCycler-Lauf an, der die Standardreihe amplifizierte und überprüfte.

4.2 Ergebnisse der LightCycler PCR

4.2.1 Stimulation der c-fos-Expression durch bFGF

Untersucht wurde die Genexpression von c-fos nach Stimulation der Zellen mit dem Wachstumsfaktor bFGF.

Sechs Zellkulturschalen konfluierend gewachsener humaner ARPE-Zellen wurden über Nacht bei 37°C mit D-MEM-Zellkultumedium ohne fötales Kälberserum (foetal-calf serum FCS) inkubiert, um einen maximalen bFGF-Effekt zu erreichen. Am folgenden Tag wurden die Zellen für eine Stunde mit bFGF in einer Konzentration von 10 ng/ml in D-MEM-Medium ohne FCS inkubiert. Anschließend wurde die gesamte RNA der unstimulierten Referenzzellen und der mit bFGF inkubierten Zellen isoliert und eine RT-Reaktion angeschlossen.

Um genau 1 µg gesamte RNA für die Reverse Transkription zur Verfügung zu stellen, wurde die isolierte RNA spektralphotometrisch quantifiziert und die entsprechende Menge des Isolats sowie der Master Mix (siehe Methoden 3.5) mit Fluka Wasser auf 30 µg aufgefüllt.

In der anschließenden RT-PCR wurden dementsprechend drei Proben Gesamt-RNA bFGF-stimulierter Zellen und drei weitere Referenzproben Gesamt-RNA nicht stimulierter Zellen mit im Master Mix enthaltenem Oligo d(T)₁₆-Primer transkribiert.

Im darauf folgenden Schritt wurden die drei Proben transkribierter Gesamt-RNA bFGF-stimulierter Zellen sowie drei Referenzproben je in doppeltem Ansatz amplifiziert. Die Quantifizierung erfolgte im Bezug zur externen Standardreihe, die im gleichen Ansatz mitgeführt wurde.

Die statistische Auswertung belegte einen deutlichen signifikanten Anstieg der c-fos-Kopienzahl bFGF-stimulierter Zellen gegenüber Zellen der Referenzproben, welche als 100 % angesehen wurde. Die Kopienzahl der bFGF inkubierten Zellen wurde in ein prozentuales Verhältnis dazu gestellt. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung ergab sich eine signifikante Erhöhung der c-fos-Kopienanzahl von über 400 % (siehe Abb.4.2.1.).

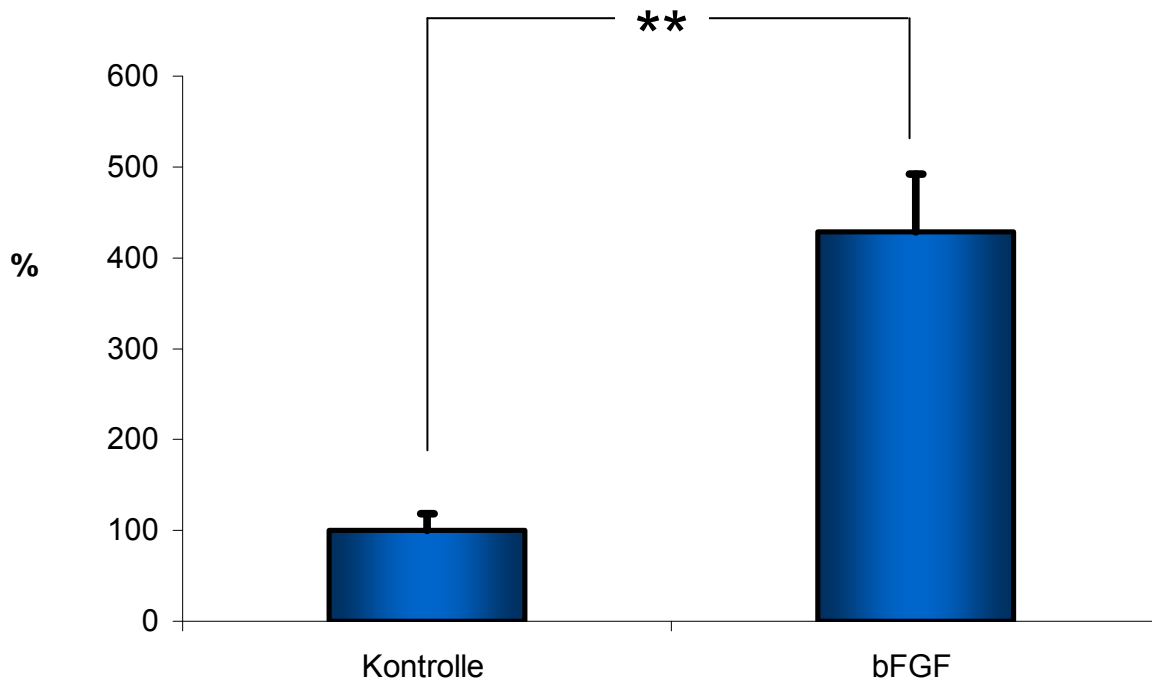


Abb.4.2.1. Stimulation der c-fos Expression
Darstellung der Genexpression in Zellen mit bFGF-Inkubation (10 ng/ml) gegenüber Zellen der Referenzproben ($p < 0,01$)

4.2.2 Hemmung der bFGF-Wirkung durch SU5402

Untersucht wurde weiterhin die Genexpression von c-fos nach Stimulation der Zellen mit dem Wachstumsfaktor bFGF und gleichzeitiger Inkubation mit dem selektiven FGFR-1 Blocker SU5402.

Mehrere Zellkulturschalen konfluent gewachsener, humaner ARPE-Zellen wurden über Nacht bei 37°C mit D-MEM-Zellkulturmedium ohne FCS inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Hälfte der Zellkulturschalen für eine Stunde mit bFGF in einer Konzentration von 10 ng/ml stimuliert bei Zugabe von SU5402 in einer Konzentration von 10^{-5} M. Die mRNA dieser Zellen, sowie mit bFGF stimulierter und unstimulierter Zellen wurde in derselben Versuchsreihe isoliert und eine RT-Reaktion angeschlossen. Die anschließende Real-Time-PCR zeigte einen deutlichen Anstieg der c-fos-Kopienanzahl in den bFGF stimulierten Proben um 218 %. Die zusätzliche Inkubation mit SU5402 ergab einen Abfall der Kopienanzahl auf 103 %. Die absolute Kopienanzahl der

Referenzsubstanzen ist gleich 100 % gesetzt worden. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung ergab sich eine Hemmung der bFGF-stimulierten c-fos-Expression (siehe Abb.4.2.2.).

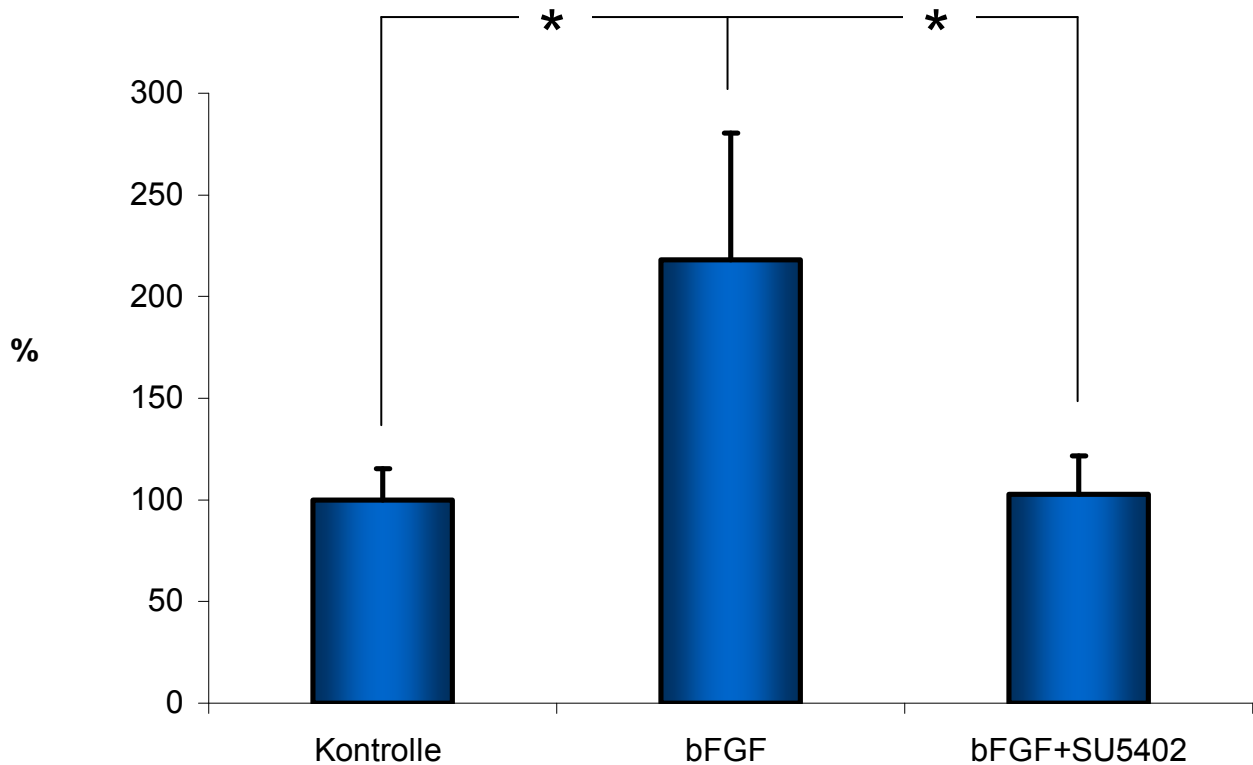


Abb.4.2.2. Hemmung der c-fos Expression

Darstellung der Genexpression mit bFGF-Inkubation und mit gleichzeitiger bFGF- (10 ng/ml) und SU5402-Inkubation (10^{-5} M) gegenüber Zellen der Referenzproben ($p < 0,05$)

4.2.3 Hemmung der bFGF-Wirkung durch Nifedipin

In weiteren Experimenten wurde die Genexpression von c-fos nach Stimulation der Zellen mit dem Wachstumsfaktor bFGF und Inkubation mit dem L-Typ Ca^{2+} -Kanal Blocker Nifedipin untersucht.

Mehrere Zellkulturschalen konfluent gewachsener, humaner ARPE-Zellen wurden über Nacht bei 37°C mit D-MEM-Zellkulturmedium ohne FCS inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Hälfte der Zellkulturschalen für eine Stunde mit bFGF in einer Konzentration von 10 ng/ml stimuliert bei Zugabe von Nifedipin in einer Konzentration von 10^{-5} M. Die

mRNA dieser Zellen, sowie mit bFGF stimulierter und unstimulierter Zellen wurde in derselben Versuchsreihe isoliert und eine RT-Reaktion angeschlossen. Die anschließende Real-Time-PCR zeigte einen deutlichen Anstieg der c-fos-Kopienanzahl in den bFGF stimulierten Proben um 1044 %. Die zusätzliche Inkubation mit Nifedipin ergab einen Abfall der Kopienanzahl auf 749 %. Die absolute Kopienanzahl der Referenzsubstanzen ist gleich 100 % gesetzt. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung ergab sich keine signifikante Hemmung der bFGF-stimulierten c-fos-Expression durch Nifedipin (siehe Abb. 4.2.3.).

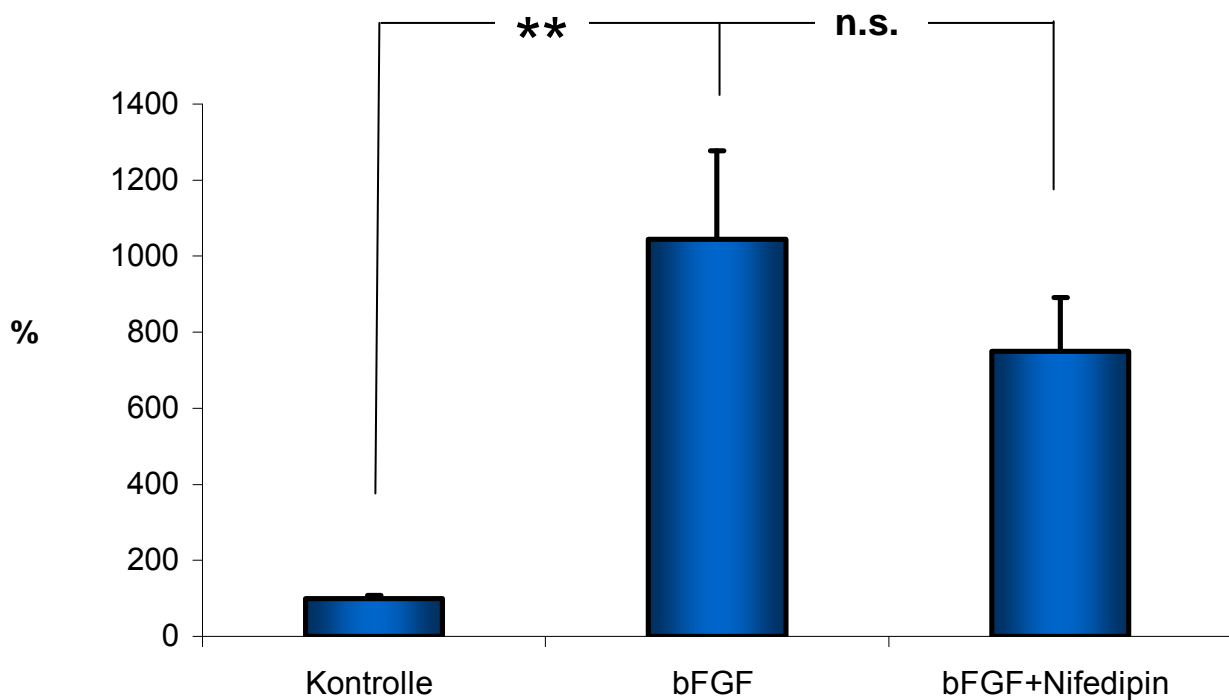


Abb.4.2.3. Hemmung der c-fos Expression
Darstellung der Genexpression mit bFGF-Inkubation (10 ng/ml) und mit gleichzeitiger bFGF- (10 ng/ml) und Nifedipin-Inkubation (10^{-5} M) gegenüber Zellen der Referenzproben

4.2.4 Stimulation der c-fos-Expression durch BayK8644

Die Genexpression von c-fos wurde in einer neuen Versuchsreihe nach Stimulation der Zellen mit dem direkten Ca^{2+} -Kanal Öffner BayK8644 untersucht.

Mehrere Zellkulturschalen konfluent gewachsener, humaner ARPE-Zellen wurden über Nacht bei 37°C mit D-MEM-Zellkulturnährmedium ohne FCS inkubiert, um einen

maximalen BayK8644-Effekt zu erreichen. Am folgenden Tag wurden die Zellen für eine Stunde mit BayK8644 in einer Konzentration von 10^{-5} M in D-MEM-Medium ohne FCS inkubiert. Anschließend wurde die mRNA der unstimulierten Referenzzellen und der mit BayK8644 inkubierten Zellen isoliert und eine RT-Reaktion angeschlossen. Die anschließende Real-Time-PCR zeigte einen deutlichen Anstieg der c-fos-Kopienanzahl in den mit BayK8644 stimulierten Zellen. In der grafischen Darstellung ist die absolute Kopienanzahl der Referenzsubstanzen gleich 100 % gesetzt worden, so dass sich eine Steigerung der c-fos-Kopienanzahl von über 625 % gezeigt hat. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung ergab sich eine deutliche Erhöhung der c-fos-Kopienanzahl in den Proben der Zellen, die mit BayK8644 inkubiert wurden (siehe Abb.4.2.4.).

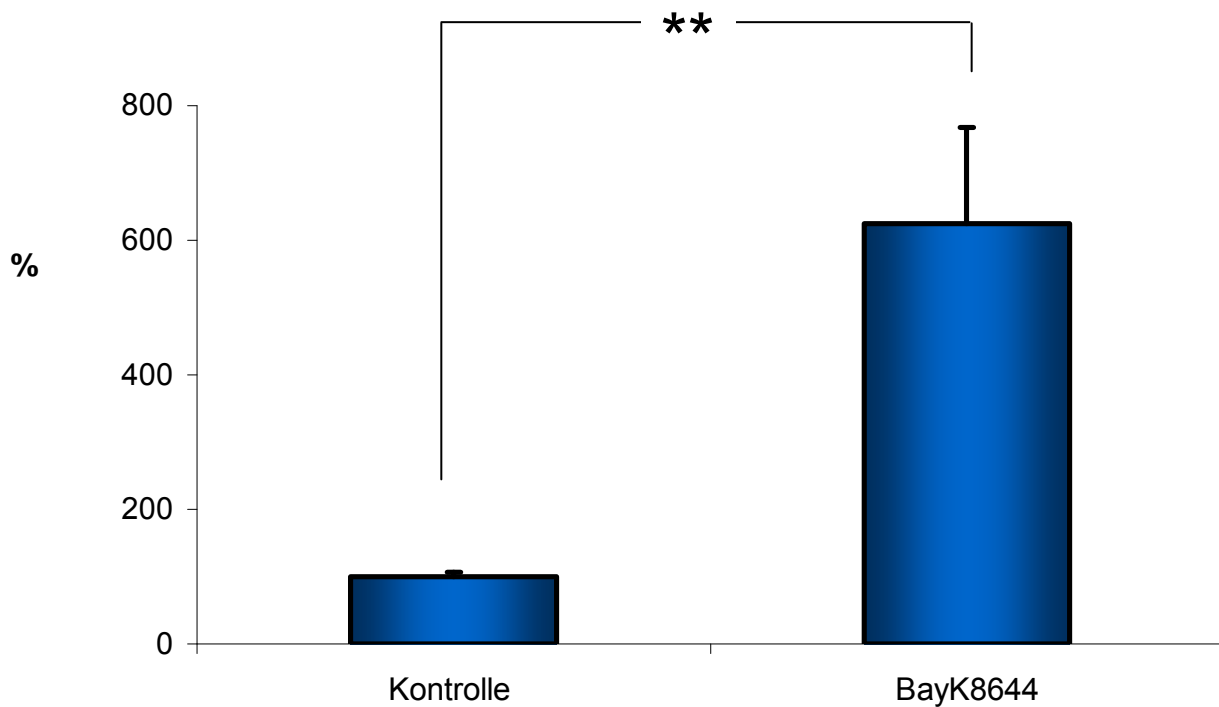


Abb.4.2.4. Stimulation der c-fos Expression [%]
Darstellung der Genexpression in Zellen mit BayK8644-Inkubation (10^{-5} M) gegenüber Zellen der Referenzproben ($p < 0,01$)

4.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend lässt sich ein statistisch signifikanter Anstieg der c-fos-RNA nach Inkubation der Zellen mit bFGF oder BayK8644-Inkubation aufzeigen. Fasst man alle Versuche zusammen und vergleicht die absoluten Zahlenwerte miteinander, ergeben sich ebenfalls signifikante Ergebnisse.

In Abbildung 4.2.5.1. wird grafisch verdeutlicht, dass bFGF (10 ng/ml) eine ungefähr fünffache c-fos-Expressionsrate bewirkt ($p < 0,01$).

Der direkte Ca^{2+} -Kanal Öffner BayK8644 (10^{-5} M) hat einen vergleichbar großen Effekt auf die Expressionsrate des Immediate early genes c-fos ($p < 0,01$).

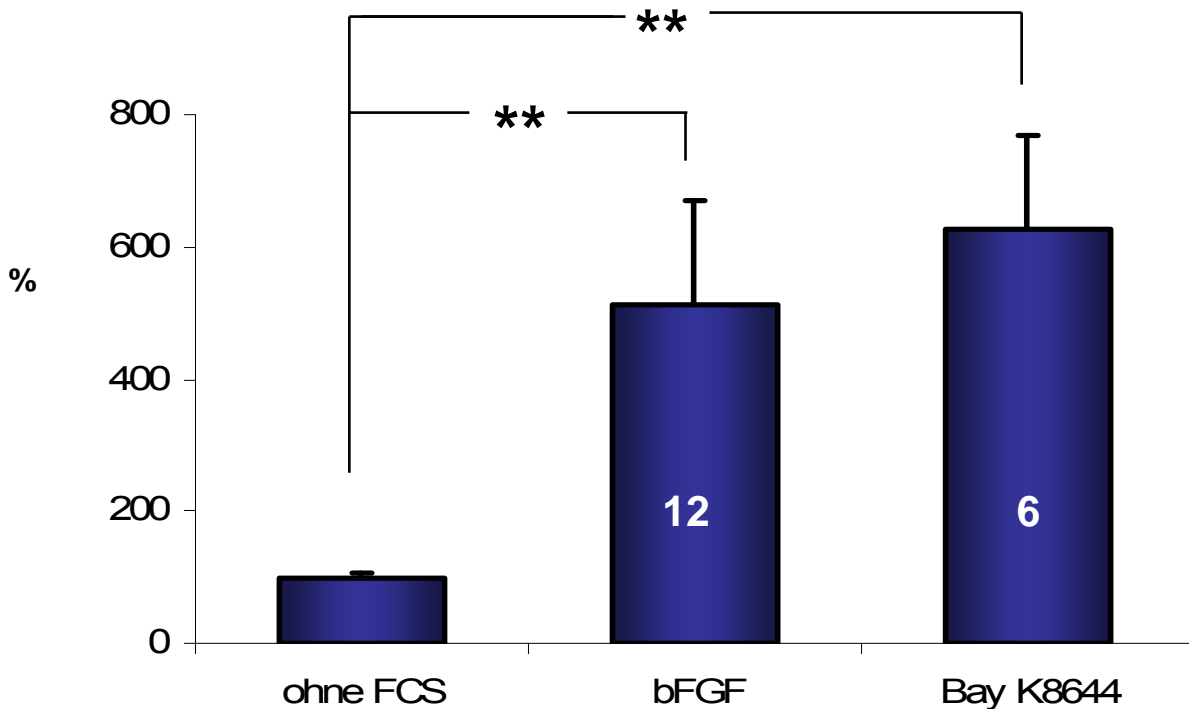


Abb.4.2.5.1. Stimulation der c-fos Expression versus Kontrolle [%]
Darstellung der Genexpression in Zellen mit bFGF- (10 ng/ml) sowie BayK-Inkubation (10^{-5} M) gegenüber Zellen der Referenzproben

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten überdies zeigen, dass der induzierende Effekt des bFGF über die FGF-Rezeptoren FGFR-1 und FGFR-2 sowie den L-Typ Ca^{2+} -Kanal im Gegensatz dazu Unterschiede aufweist.

Die Blockierung des FGFR-1 mit SU5402 (10^{-5} M) inhibiert weitestgehend den induzierenden Effekt des Wachstumsfaktors bFGF ($p < 0,05$). Wohingegen Nifedipin als Ca^{2+} -Kanal-Blocker (10^{-5} M) keinen Einfluss auf die Expressionsrate des c-fos-Proteins ausübt (Abb. 4.2.5.2.).

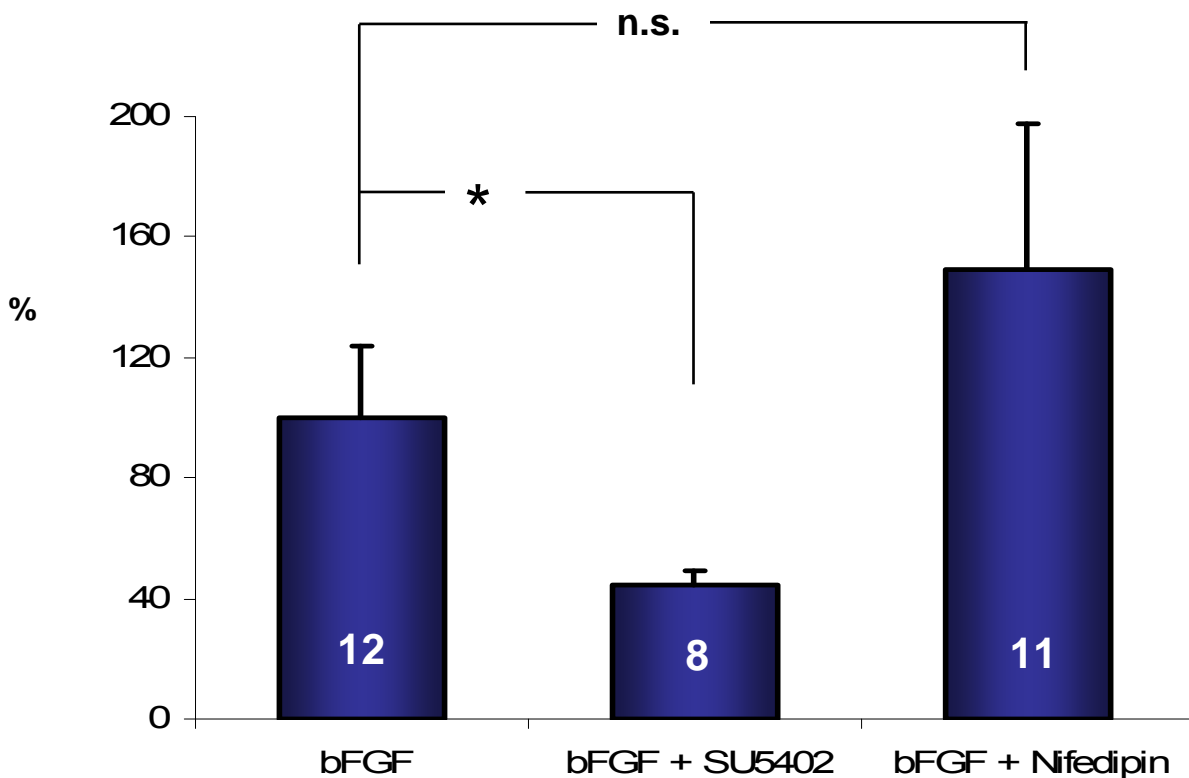


Abb.4.2.5.2. bFGF-induzierte c-fos Expression [%]

5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war eine Aussage über die bFGF-abhängige Regulation der c-fos-Expressionsrate in humanen RPE-Zellen treffen zu können.

Zur Klärung dieser Fragestellungen wurden molekularbiologische Untersuchungsmethoden angewandt, die den Einfluss von bFGF und Ca^{2+} auf die Genexpression von c-fos qualitativ und quantitativ belegen sollten.

Es ist bekannt, dass bFGF über FGFR-1 und FGFR-2, die beide im RPE exprimiert werden, wirken kann. Ferner konnte gezeigt werden, dass bFGF über FGFR-2 den L-Typ Ca^{2+} -Kanal aktiviert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bFGF die c-fos-Expression über FGFR-1 stimuliert, die Aktivierung des Ca^{2+} -Kanals über FGFR-2 jedoch keinen Einfluss auf die c-fos-Expression besitzt. Eine direkte Aktivierung des Ca^{2+} -Kanals dem entgegen stimuliert ebenfalls die c-fos-Genexpression.

5.1 Ergebnisse der Real-Time PCR

Als quantitative Methode wurde die LightCycler-PCR verwendet, da sie eine gut etablierte und weit verbreitete Methode ist.

Zur Sicherung der Vergleichbarkeit wurde stets mit einer Probenanzahl von $n=3$ pro Ansatz über mindestens 3 Ansätze gearbeitet. Aus einer Zellreihe wurden jeweils drei Zellkulturschalen als Referenzproben und drei weitere nach Inkubation z.B. mit bFGF weiter bearbeitet. Anschließend wurde aus allen Proben in denselben Arbeitsschritten die RNA isoliert, die RT-Reaktion sowie die LightCycler-PCR durchgeführt. Die Methoden wurden unter denselben Bedingungen und mit denselben Substanzen in demselben Arbeitsschritt nebeneinander durchgeführt. Zusätzlich wurden nach der RT-Reaktion pro Probe zwei PCR-Läufe parallel durchgeführt, so dass sich nachher ein Mittelwert ergab, der Grundlage der statistischen Auswertung war.

Die Arbeitsgänge, von der Inkubation der Zellen bis zur PCR, wurden einzeln ausgewertet und verglichen. Es wurden in der Primärauswertung keine Ergebnisse von Arbeitsgängen verglichen, die an zwei unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurden.

Dies war nicht möglich, da sich die basale Genexpression von c-fos der Referenzsubstanzen von einem Arbeitsgang zum anderen wesentlich unterschieden. Es zeigten sich Unterschiede, die zum Teil bei 10ner-Potenzen lagen. Eine mögliche Erklärung dafür kann das variierende Alter der Zellreihen sein. Auch unterschiedliche Zellstadien, in denen sich die Zellen zum Zeitpunkt der mRNA-Gewinnung befanden, könnten einen ausschlaggebenden Faktor bilden. Eine variierende Effektivität der RNA-Isolation könnte eine zusätzliche Rolle spielen.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die konfluent gewachsenen Zellen jeweils am dritten Tag nach Passagierung zur RNA-Isolierung genutzt.

5.2 bFGF in RPE-Zellen

5.2.1 Einfluss von bFGF auf die c-fos-Expression

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Inkubation retinaler Zellen mit bFGF eine signifikant vermehrte Menge c-fos-RNA in der Real-time PCR nachweisbar ist.

Das bedeutet, dass der Wachstumsfaktor bFGF im Retinalen Pigmentepithel direkten Einfluss auf die c-fos Expression ausübt und diese induziert.

Aus der Literatur ist bekannt, dass das RPE aus der Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren aFGF, bFGF und FGF-5 sezerniert. bFGF scheint dabei eine besondere Stellung einzunehmen. Der basische Wachstumsfaktor hat einen trophischen Effekt auf Endothelzellen sowie Photorezeptoren und inhibiert die Apoptose dieser Zellen (Araki, Shimada et al. 1990; Araki, Simada et al. 1990; Faktorovich, Steinberg et al. 1990; Faktorovich, Steinberg et al. 1992; Liu, Ye et al. 1998). Zusätzlich stimuliert bFGF als autokrines Cytokin die Sekretion von aFGF (Guillonneau, Regnier-Ricard et al. 1997).

In der Literatur ist der mitogene Effekt des Wachstumsfaktors häufig beschrieben worden. bFGF induziert die Proliferation von humanen retinalen Gliazellen (Puro and Mano 1991).

Bei Verletzungen der RPE-Zellen oder oxidativem Stress der Photorezeptoren kann eine deutlich höhere Sekretion von bFGF nachgewiesen werden (Zhang, Samadani et al. 1993). In diesem Falle führt bFGF zu einer Proliferation der Endothelzellen

(Schweigerer, Neufeld et al. 1987). So ist auch in Neovaskularisationsmembranen bei Patienten mit AMD eine erhöhte Konzentration von bFGF nachweisbar (Amin, Puklin et al. 1994). Diese Beobachtungen lassen sich mit den Ergebnissen unserer Untersuchungen mit einer erhöhten c-fos-Expression und folglich anzunehmenden gesteigerten Einfluss auf Wachstum und Proliferation der Zellen erklären.

Ähnliche Beobachtungen machte man an Fibroblasten (Zhu, Herembert et al. 1994) und an glatten Muskelzellen (Stepien, Gogusev et al. 1998). Übereinstimmend fand sich auch in diesen Zellen eine induzierte Expression von c-fos, c-myc und c-jun.

Im RPE bindet bFGF an FGFR-1 und induziert über den skizzierten Pathway die Genexpression von c-fos. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das eingangs beschriebene Schema für retinale Zellen um den wirksamen Stimulus bFGF ergänzt werden kann.

bFGF stimuliert nach Bindung an den FGFR-1 über die MAP-Kinase die Promoterregion SRE und induziert die c-fos-Genexpression (siehe Abb. 5.2.1.).

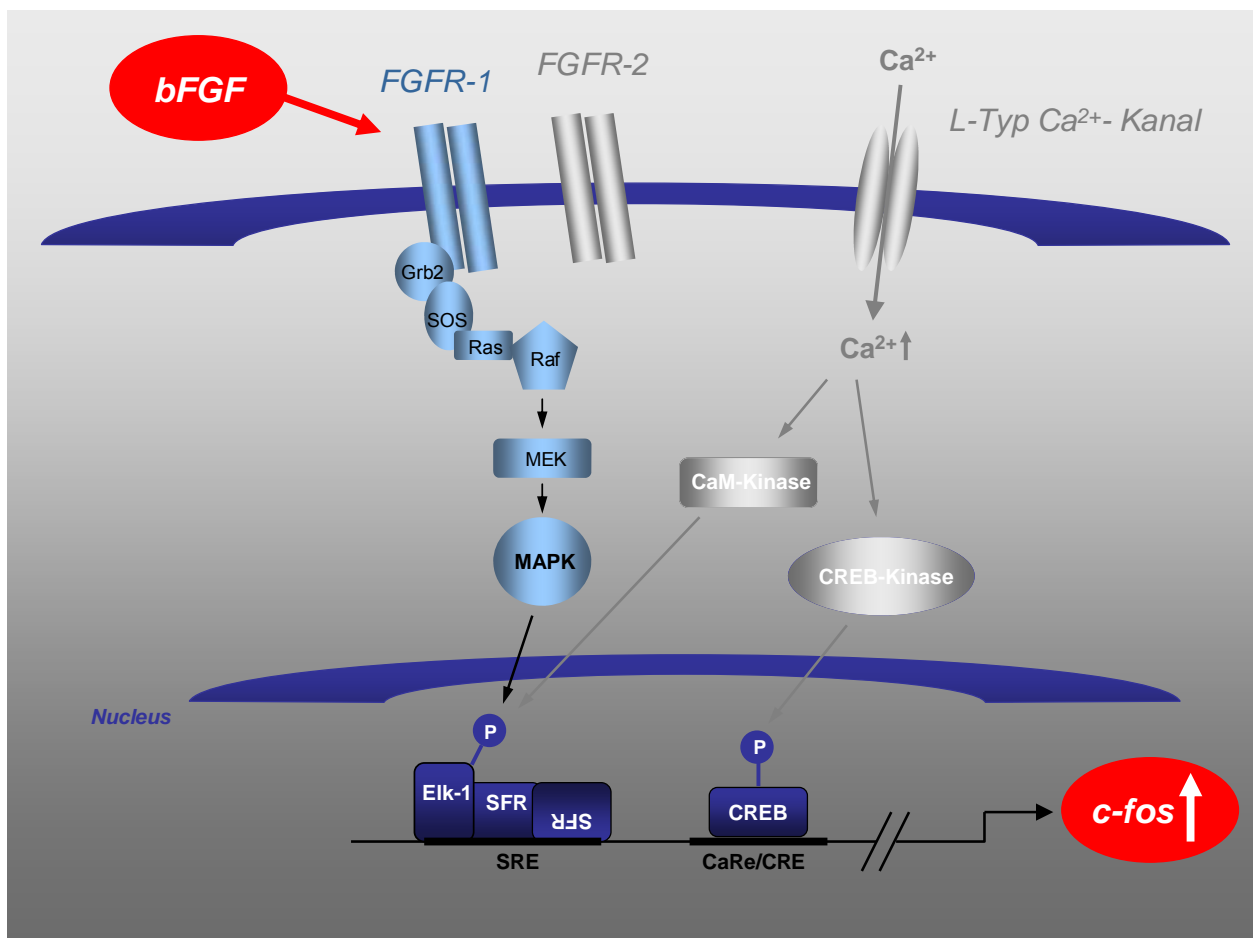


Abb.5.2.1. Einfluss von bFGF auf die c-fos Expression sowohl über FGFR-1 (modifiziert nach Janknecht, 1995)

5.3 L-Typ Ca^{2+} Kanäle in RPE-Zellen

5.3.1 Einfluss des Ca^{2+} -Kanals auf die c-fos-Expression

In den vorliegenden Untersuchungen konnte in kultivierten humanen RPE-Zellen nach Inkubation mit BayK8644, einem direkter Öffner der Ca^{2+} -Kanäle, signifikant vermehrt c-fos-mRNA in der quantitativen PCR nachgewiesen werden.

BayK8644 ist ein hoch spezifischer L-Typ Kanal Öffner. Dies beweist einen direkten induzierenden Effekt der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle auf die Genexpression des Transkriptionsfaktors c-fos in nicht erregbaren Zellen des RPE.

In erregbaren Zellen wie z.B. Neuronen konnte dieser ursächliche Zusammenhang zwischen einer Aktivierung der Ca^{2+} -Kanäle und einer Steigerung der c-fos-Expression ebenfalls aufgezeigt werden (Murphy, Worley et al. 1991; Premkumar, Mishra et al. 2000).

Die L-Typ Ca^{2+} -Kanäle gehören in die Gruppe der high-voltage-activated (HVA) Ca^{2+} -Kanäle. In erregbaren Zellen sind die Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ für die Generierung des Ca^{2+} -Einstroms bei Depolarisation der Zelle verantwortlich. Dies gilt vor allem für Herzmuskelzellen und Neurone.

Bei den nicht erregbaren Zellen hingegen ist die zytosolische Phosphorylierung des Kanals für die Generierung des Ca^{2+} -Einstroms von besonderer Bedeutung. An der Modulation der Kanalaktivität sind Proteinkinase A, Proteinkinase C, Protein-Tyrosinkinasen und Phosphatasen beteiligt (Galizzi, Qar et al. 1987; McDonald, Pelzer et al. 1994; Wiechen, Yue et al. 1995; Sperelakis, Katsube et al. 1996; Wijetunge and Hughes 1996; Strauß, Mergler et al. 1997; Strauss, Buss et al. 2000). Andere Autoren haben gezeigt, dass direkte Agonisten der potentialabhängigen L-Typ Ca^{2+} -Kanäle einen Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle generieren, ohne dass die Zelle dabei depolarisiert wird (Dessy and Godfraind 1996; Gaur, Yamaguchi et al. 1996). Diese Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration scheint jedoch, wie diese Arbeit zeigen konnte, direkten induzierenden Einfluss auf die Genexpression der nicht erregbaren Zellen des RPE auszuüben. Bildlich kann dieser Zusammenhang in das vorliegende Schema folgendermaßen eingefügt werden (siehe Abb. 5.3.1.).

Die L-Typ Ca^{2+} -Kanäle im RPE werden hauptsächlich von der zytosolischen PTK vom src-Subtyp (pp60^{c-src}) und der PKC reguliert (Strauß, Mergler et al. 1997; Mergler, Steinhausen et al. 1998). Dabei bestimmt die Aktivität der PKC, ob die src-

Tyrosinkinase aktivierend oder inhibierend auf den Kanal wirkt (Strauß, Mergler et al. 1997; Strauss, Buss et al. 2000).

Rosenthal et al konnten ferner in RPE-Zellen eine direkte Interaktion des bFGF-Rezeptors FGFR-2 mit der $\alpha 1D$ -Untereinheit des Ca^{2+} -Kanals nachweisen. Die $\alpha 1D$ -Untereinheit wird durch die Rezeptor-Tyrosinkinase des FGFR-2 phosphoryliert (Rosenthal, Thieme et al. 2001).

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit resultiert die Schlussfolgerung, dass die L-Typ Ca^{2+} -Kanäle in den RPE-Zellen nach Aktivierung über eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die CREB-Kinase aktivieren und damit die c-fos Expression stimulieren.

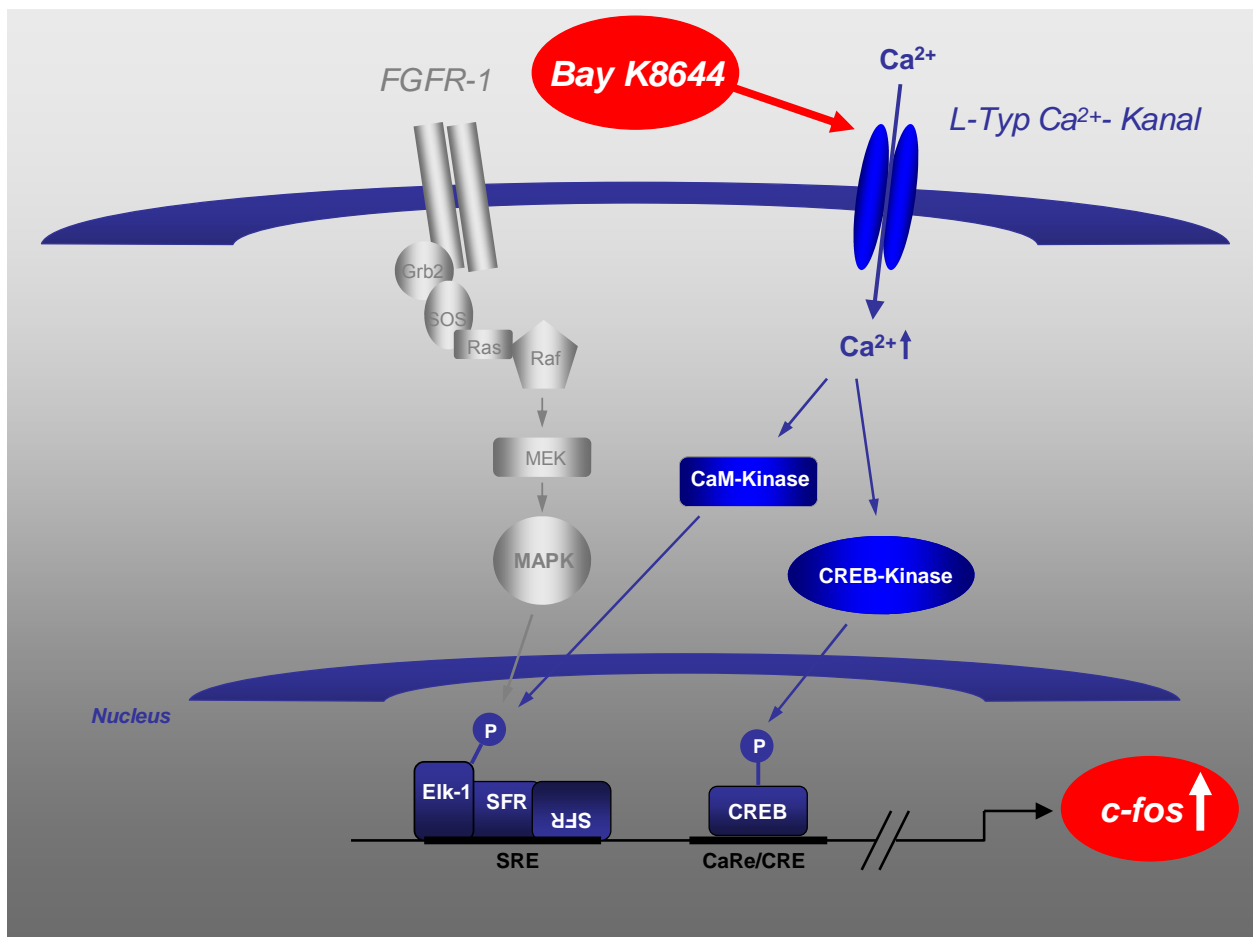


Abb.5.3.1. Einfluss des L-Typ Ca^{2+} -Kanals auf die Genexpression (modifiziert nach Janknecht, 1995)

5.4 Unterschiedliche Wirkungen der beiden FGF Rezeptoren

Da sich in der Literatur zahlreiche Hinweise darauf ergeben, dass FGFR-1 und FGFR-2 unterschiedliche Wirkungen besitzen, stellte sich die Frage, ob sich die Rezeptoren auch in der Beeinflussbarkeit der Genexpression unterscheiden.

Bei Inkubation der humanen RPE-Zellen mit bFGF und dem selektiven FGFR-1-Blocker SU5402 zeigte sich eine deutliche Verminderung der bFGF-induzierten c-fos-Expression. So scheint der schon recht gut untersuchte Transduktionsweg des FGFR-1 einen direkten Einfluss auf die Expressionsrate der „immediate early genes“ auszuüben. Bemerkenswert ist, dass der ebenfalls durch die bFGF-Inkubation aktivierte FGFR-2 die Hemmung des FGFR-1 durch SU5402 nicht ausgleichen kann. Diese Arbeit lieferte einen entscheidenden Hinweis auf die führende Rolle des FGFR-1 im Hinblick auf die Änderung der Genexpression.

5.4.1 Signaltransduktionskaskade von bFGF

Die von bFGF induzierte Signaltransduktionskaskade ist gut untersucht. Das RPE produziert aus der Familie der FGF-Rezeptoren die beiden Rezeptoren: FGFR-1 und FGFR-2 (Matsushima, Ogata et al. 1996; Tanihara, Inatani et al. 1997; Rosenthal, Thieme et al. 2001). Die funktionelle Bedeutung zwei unterschiedlicher Rezeptoren für bFGF ist allerdings noch unklar.

Die in der Literatur aufgeführten Untersuchungen zur FGF-induzierten Signaltransduktion sind am FGFR-1 durchgeführt worden, so dass diese Signalkaskade weitestgehend bekannt ist.

FGFR-1 aktiviert durch Dimerisierung und darauf folgender Autophosphorylierung intrazelluläre Transduktionskaden mit Phospholipase C γ , src-Kinasen, MAP-Kinasen (mitogen-aktivierte-Protein-Kinasen) sowie dem Grb2/SOS-Signalkomplex (Klint and Claesson-Welsh 1999). Die src-Kinase spielt dabei eine wichtige Rolle (Zhan, Plourde et al. 1994) (siehe Abbildung 5.2.1.).

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von FGFR1 und FGFR2 wurde diese Kaskade lange Zeit auch für den FGFR-2 angenommen, doch ist dies für die Signalübertragung des FGFR-2 nie geprüft worden.

Rosenthal et al (2001) beschrieben für den FGFR-2 eine spezifische Interaktion mit Ca^{2+} -Kanälen vom L-Typ im RPE, die für den FGFR-1 nicht nachweisbar war. bFGF stimuliert über FGFR-2 direkt die $\alpha 1\text{D}$ -Subunit des L-Typ Ca^{2+} - Kanals und führt über Öffnung des Kanals zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Diese fungiert als Second Messenger und leitet eine Signaltransduktionskaskade ein. Elektrophysiologische Untersuchungen ergaben eine Tyrosinkinase-abhängige bFGF-induzierte Aktivitätssteigerung der L-Typ-Kanäle. Versuche mit Ratten-RPE-Zellen haben gezeigt, dass nach Inkubation mit einem unspezifischen Tyrosin-Kinase-Blocker (Lavendustin A) der bFGF-Effekt auf den L-Typ-Kanal geblockt werden kann, nicht aber nach Inkubation mit dem spezifischen src-Kinase-Inhibitor (Herbimycin A), der in der Signalkaskade des FGFR-1 eine bedeutende Rolle spielt (Rosenthal, Thieme et al. 2001). Auch die Hemmung der Rezeptortyrosinkinase des FGFR-1 durch den spezifischen Inhibitor SU5402 (Mohammadi, McMahon et al. 1997; Rosenthal, Thieme et al. 2001) konnte den bFGF-Effekt auf den L-Typ Kanal nicht beeinflussen. Demnach ist der FGFR-1 nicht an dem bFGF-Effekt auf den L-Typ Ca^{2+} -Kanal beteiligt und eine direkte Interaktion ist weitestgehend auszuschließen, welches die fehlende Co-Immunopräzipitation zwischen FGFR-1 und dem L-Typ Kanal auch physikalisch unterstreicht (Rosenthal, Thieme et al. 2001). Weitere Versuche deuteten allerdings auf eine stabilisierende Wirkung des FGFR-1 auf den FGFR-2 hin. Eine mögliche Erklärung könnten Heterodimerisierungen sein, die schon früher in der Literatur für die FGF-Rezeptoren beschrieben wurden (Bellot, Crumley et al. 1991). Der FGFR-2 jedoch, wie sich auch in dieser Arbeit gezeigt hat, scheint tyrosinkinaseabhängig einen direkten Einfluss auf die L-Typ Kanäle auszuüben.

Zusammenfassend haben die vorliegenden Untersuchungen gezeigt, dass die c-fos-Expression in RPE Zellen über den FGFR-1 und die sich anschließende Signaltransduktionskaskade direkt reguliert wird. Die oben beschriebene Kaskade des FGFR-1 ist für viele Rezeptor-Tyrosinkinasen beschrieben worden, doch konnte sie bis jetzt nicht für den FGFR-2 bestätigt werden (Friesel and Maciag 1995; Klint and Claesson-Welsh 1999).

In dieser Arbeit konnten die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die Stimulierung der c-fos-Expression über FGFR-1 nicht jedoch über den FGFR-2 vermittelt wird.

Der expressionsstimulierende Effekt des bFGF konnte für den FGFR-2 ausgeschlossen werden.

5.4.2 Einfluss der FGF-Rezeptoren und des L-Typ Ca^{2+} -Kanals

In den vorliegenden Experimenten zeigt sich eine vermehrte c-fos-Expression nach Inkubation der humanen RPE-Zellen sowohl mit bFGF als auch mit dem Ca^{2+} -Kanal-Agonist BayK8644.

Die in erweiterten Versuchsprotokollen durchgeführte zusätzliche Inkubation mit dem FGFR-1 selektiven Blocker SU5402 hob den bFGF-induzierten Anstieg nachweisbarer c-fos-RNA wieder auf. Der in diesem Versuch nicht inhibierte FGFR-2 konnte diesen Effekt weder über eine direkte Interaktion mit dem L-Typ Ca^{2+} -Kanal noch über eine mögliche eigene Signalkaskade nach Stimulation durch bFGF kompensieren.

Dies lässt auf die übergeordnete Rolle des durch FGFR-1 induzierten Transduktionsweges schließen. Die induzierte c-fos-Expression wird durch bFGF über den FGFR-1 vermittelt.

Untermauert wird die These der führenden Rolle des FGFR-1-vermittelten expressionssteigernden Effekts auch mit den vorliegenden Ergebnissen, die zeigen, dass nach Inkubation der Zellen mit dem L-Typ Kanal Blocker Nifedipin, der bFGF-induzierte Effekt der c-fos Expressionssteigerung nicht beeinflusst werden konnte.

Eine Hemmung der durch FGFR-2 vermittelten Interaktion mit den Ca^{2+} -Kanälen und damit parallelen Induktion der c-fos-Expression hatte keinen signifikant inhibierenden Effekt auf die Genexpression.

Das lässt darauf schließen, dass bFGF als Ligand des FGFR-2 die Genexpression nicht beeinflussen kann (Abb. 5.4.2.). Eine mögliche stabilisierende Wirkung des FGFR-2 auf die regulierende Wirkung des FGFR-1 ist dabei jedoch nicht auszuschließen.

In der Literatur ist schon häufig darauf hingewiesen worden, dass der mitogene Effekt des Wachstumsfaktors bFGF mit den L-Typ Ca^{2+} -Kanälen des RPE in Zusammenhang steht. Rosenthal et al haben diese Interaktion auf elektrophysiologischer Ebene aufzeigen können (Rosenthal, Thieme et al. 2001).

Zusätzlich gibt es mehrere Hinweise auf den funktionellen Zusammenhang des bFGF und der Ca^{2+} -Kanäle. So wurde an humanen retinalen Müller-Zellen gezeigt, dass die bFGF-induzierte Proliferation mit dem L-Typ Kanal Blocker Nifedipin gehemmt werden konnte (Puro and Mano 1991). An Fibroblasten war der mitogene Effekt von bFGF ebenfalls durch Nifedipin hemmbar. Der L-Typ Kanal Agonist BayK8644 hob diese Hemmung der bFGF-induzierten Proliferation wieder auf (Zhu, Herembert et al. 1994). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigten Stepien et al (1998) mittels

semiquantitativer RT-PCR eine bFGF-induzierte Expression der Transkriptionsfaktoren c-fos, c-myc und c-jun in glatten Gefäßmuskelzellen. Durch den L-Typ Kanal Blocker Amlodipin konnte dieser Effekt ebenfalls reduziert werden (Stepien, Gogusev et al. 1998).

Ein weiterer Hinweis für einen funktionellen Zusammenhang von bFGF und L-Typ Ca^{2+} -Kanälen liefert die Tatsache, dass nach Inkubation der Zellen mit bFGF die Expression der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle, die unter anderem zu den „late genes“ gezählt werden, erhöht werden kann, wie es in anderen Geweben gezeigt worden ist. (Rane and Pollock 1994; Shitaka, Matsuki et al. 1996; Katsuki, Shitaka et al. 1998).

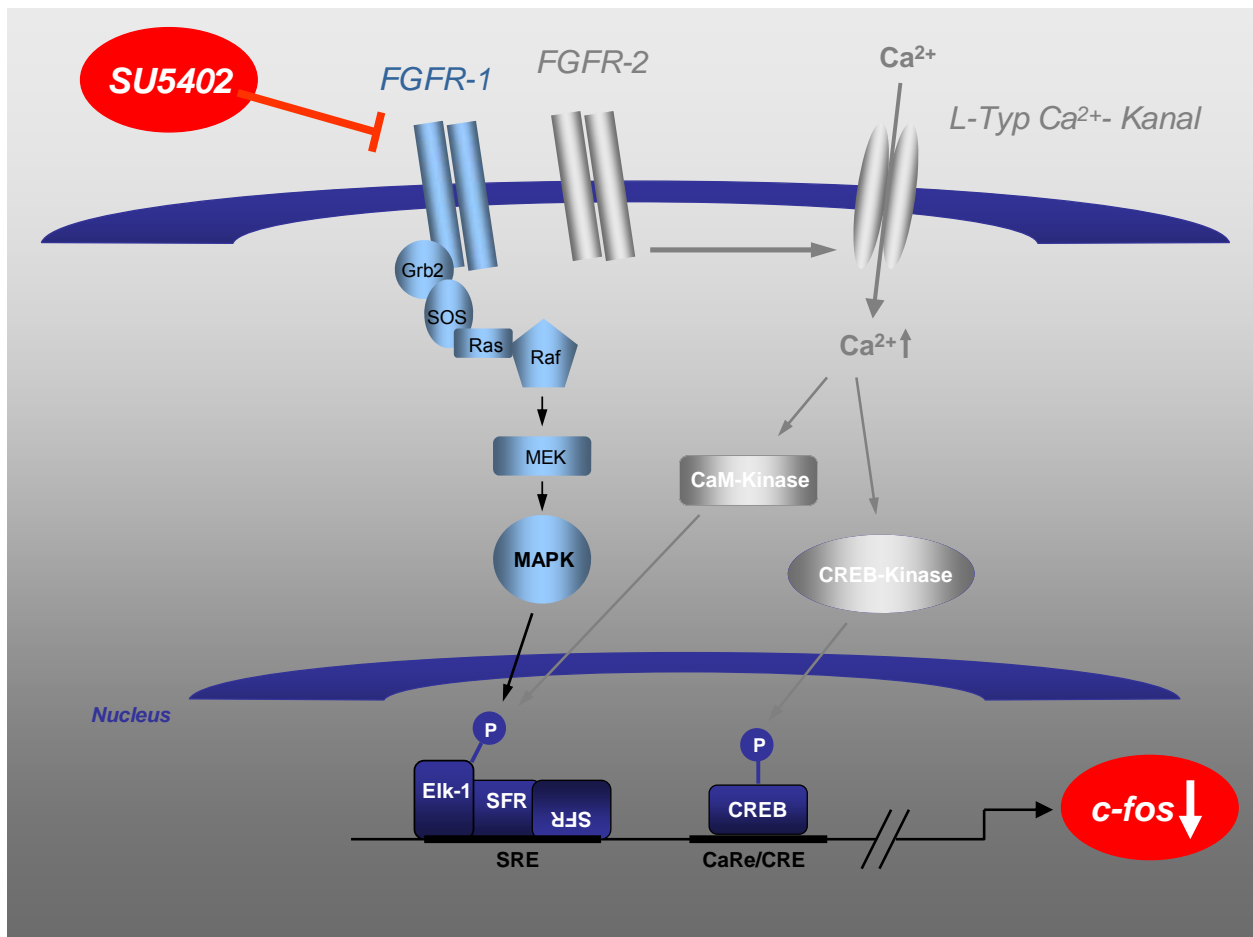


Abb.5.4.2. Interaktion der beiden bFGF-Rezeptoren (FGFR-1 und FGFR-2) und der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle bei der Regulation der Genexpression (modifiziert nach Janknecht, 1995)

Aus der Aktivierung der Ca^{2+} -Kanäle resultiert eine Änderung der Genexpression der Zellen. Diese wird über zwei unterschiedliche intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden reguliert. Die Aktivierung der Ca^{2+} -Kanäle führt direkt zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, die die Genexpression der "immediate early genes" reguliert. Der zweite Signalweg führt gleichfalls zur Änderung der Genexpression unter Beteiligung der Ras-Proteine und der Mitogen-aktivierten-Proteinkinase (Map-Kinase). An fötalen hippocampalen Neuronen konnte eine bFGF-abhängige Steigerung der Expression der L-Typ-Kanäle gezeigt werden, die mit dem Ras-Inaktivator N-Acetyl-S-Farnesyl-1-Cystein hemmbar war (Katsuki, Shitaka et al. 1998). Dies könnte auf eine Ras-abhängige Interaktion des FGFR-2 mit den Ca^{2+} -Kanälen oder eine eigene Kaskade des FGFR-2 hindeuten, der mit Beteiligung der Ras-Proteine einen Einfluß auf die Expression der Ca^{2+} -Kanäle ausübt.

Es hat sich häufig gezeigt, dass bFGF zu unterschiedlichen Veränderungen in Zellfunktionen und Zelldifferenzierungen geführt hat (Ishigooka, Kitaoka et al. 1993; Guillonneau, Regnier-Ricard et al. 1997). Im RPE kann bFGF auf der einen Seite zur gesteigerten VEGF Sekretion führen und auf der anderen Seite zur veränderten Genexpression führen. Die These zweier unterschiedlicher intrazellulärer Signalkaskaden der bFGF-Rezeptoren FGFR-1 und FGFR-2 könnte diese Unterschiede erklären.

Zusammenfassend steigert bFGF im Retinalen Pigmentepithel die c-fos Expression über den FGFR-1 und nicht über den FGFR-2. Auch eine direkte Öffnung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle führt zu einer Steigerung der c-fos Expression. Eine Hemmung der Ca^{2+} -Kanäle durch Nifedipin kann den bFGF-induzierten Effekt nicht beeinflussen, doch zeigt eine Hemmung des FGFR-1 eine effiziente Downregulation der c-fos Expression. Dies deutet auf die übergeordnete Rolle des FGFR-1, wohingegen FGFR-2 direkt die Ca^{2+} -Kanäle beeinflusst und somit die sekretorische Aktivität des RPE reguliert, wie zum Beispiel die Stimulation der VEGF-Sekretion (Rosenthal, Thieme et al. 2001; Rosenthal, Malek et al. 2005).

5.5 Pathophysiologie der AMD

Die Interaktion der makularen Photorezeptoren und des Retinalen Pigmentepithels ist von grundlegender Bedeutung für den Visus des Menschen.

Neben den vielen Funktionen der Interaktion mit den Photorezeptoren, produziert dafür das gesunde RPE vor allem PEDF und VEGF. Die beiden Wachstumsfaktoren werden in zwei verschiedene Richtungen sezerniert. PEDF wird auf die apikale Seite des RPE sezerniert in Richtung der Photorezeptoren. Der neuroprotektive Faktor PEDF schützt die Neurone gegen glutamat-induzierte oder hypoxie-bedingte Apoptose (Steele, Chader et al. 1992; Cao, Tombran-Tink et al. 2001; Ogata, Wang et al. 2001). Zusätzlich wirkt PEDF als antiangiogener Faktor, der die Proliferation der Endothelzellen inhibiert und die Endothelien der Choriokapillaren stabilisiert (Dawson, Volpert et al. 1999; King and Suzuma 2000; Ogata, Wada et al. 2002). Der angiogene Faktor VEGF hingegen wird auf die basolaterale Seite sezerniert (Blaauwgeers, Holtkamp et al. 1999). In gesundem Zustand hat das RPE auf diese Weise einen positiven Einfluss auf die stark vaskularisierten, fenestrierten Choriokapillaren auf der basalen Seite, wohingegen die apikale Seite avaskulär bleibt.

In der Pathogenese der AMD kann es durch Stimulation angiogener Faktoren zur Bildung chorioidaler Neovaskularisationen (CNV) im subretinalen Raum kommen (Campochiaro 2000; Ambati, Ambati et al. 2003; Das and McGuire 2003). Obwohl die Pathophysiologie der CNV noch nicht ausreichend geklärt ist, gibt es Hinweise darauf, dass Hypoxie, Zelladhäsionsverluste der RPE-Zellen und inflammatorische Prozesse auslösende Zustände darstellen. Wenn die chorioidalen Neovaskularisationsmembranen durch die Bruch'sche Membran oder das RPE hindurch treten, bricht die Blut-Retina-Schranke zusammen und es kann zu subretinalen Flüssigkeitsansammlungen oder schweren hämorrhagischen Komplikationen führen.

Die Angiogenese in der AMD umfasst verschiedene Prozesse. Nach Auflösung der Extrazellulärmatrix mittels Proteolyse führen Proliferation und Migration der Endothelzellen in der Angiogenese zur Röhrenbildung der neuen Gefäße. In der CNV fehlt charakteristischerweise die letzte Phase der Gefäßreifung. Daher ist die Gefahr der Blutung gegeben, was die schlimmste Komplikation der AMD darstellt.

Für jede Phase der Angiogenese sind mehrere unterschiedliche Wachstumsfaktoren verantwortlich. Für die Phase der Proliferation und des Übergangs aus der Phase der Extrazellulärmatrix sind hauptsächlich VEGF und bFGF als mitogene Induktoren

kennzeichnende Faktoren (Aiello, Avery et al. 1994; Amin, Puklin et al. 1994; D' Amore 1994; Simorre-Pinatel, Guerrin et al. 1994; Shima, Adamis et al. 1995; Ishibashi, Hata et al. 1997; Kliffen, Sharma et al. 1997; Spilsbury, Garrett et al. 2000; Ambati, Ambati et al. 2003; Eyetech. and Group. 2003; Witmer, Vrensen et al. 2003).

Analysen des Gewebes chirurgisch entfernter Neovaskularisationsmembranen ergaben eine erhöhte Konzentration von VEGF, TGF- β und bFGF und eine hohe Dichte beider FGF-Rezeptoren, FGFR-1 und FGFR-2, besonders in den RPE-Zellen (Amin, Puklin et al. 1994; Reddy, Zamora et al. 1995; Lopez, Sippy et al. 1996; Campochiaro 2000).

Vor allem VEGF wird in der Anfangsphase der Erkrankung für die Induktion der Angiogenese verantwortlich gemacht (Kliffen, Sharma et al. 1997; Spilsbury, Garrett et al. 2000). RPE-Zellen von Patienten mit neovaskulärer AMD sezernieren wesentlich mehr VEGF als RPE-Zellen gesunder Augen (Strauss, Heimann et al. 2003). Die vermehrte Sekretion war auf intrazelluläre Signale zurückzuführen, die durch eine erhöhte Aktivität von L-Typ Ca^{2+} -Kanäle vermittelt wurden (Strauss, Heimann et al. 2003 210) (Rosenthal, Heimann et al. 2007). Es sind mehrere extrazelluläre Stimuli der VEGF-Sekretion bekannt, vor allem bFGF stimuliert sowohl die L-Typ Kanäle als auch die VEGF Sekretion (Rosenthal, Thieme et al. 2001; Strauss, Heimann et al. 2003). Vor allem die Ergebnisse dieser Arbeit haben den induzierenden Effekt von bFGF über die L-Typ Ca^{2+} -Kanäle eindeutig nachgewiesen.

Im Hinblick auf die vorliegenden Ergebnisse wird die direkte Steigerung der Genexpression von bFGF in den RPE-Zellen vor allem über den FGFR-1 vermittelt, wohingegen FGFR-2 vor allem über die Stimulation der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle eine Steigerung der sekretorischen Funktion der RPE-Zellen induziert.

Das bedeutet, dass beide bFGF-Rezeptoren synergistisch wirken. In der Pathogenese der AMD nimmt bFGF damit wahrscheinlich sowohl über Stimulation der Genexpression der immediate-early genes als auch über Aktivierung der VEGF-Sekretion eine wichtige ursächliche Stellung ein.

Diese Schlussfolgerung wird durch weitere Hinweise in der Literatur gestützt. Eine Überproduktion von VEGF aus RPE-Zellen allein ist nicht in der Lage ohne Schäden oder Verletzungen der Zellen CNV auszulösen. Nur in der Kombination mit vorliegenden Zellschäden führt VEGF zur Bildung von Neovaskularisationsmembranen (Oshima, Oshima et al. 2004).

Reaktiv auf Verletzungen der Zellen oder auf oxidativen Stress der Photorezeptoren wird vor allem bFGF vermehrt exprimiert (Zhang, Samadani et al. 1993; Wen, Song et

al. 1995; Yamamoto, Ogata et al. 1996; Cao, Wen et al. 1997; Blanco, Lopez-Roca et al. 2000; Yamada, Yamada et al. 2000; Yamada, Yamada et al. 2001) und führt ebenfalls nur in Kombination mit der Verletzung zur Proliferation der Endothelzellen und somit zur CNV. Da der Sekretionsmechanismus des bFGF noch nicht ausreichend bekannt ist, wird angenommen, dass bFGF durch die Schädigung der Zellen freigesetzt wird. bFGF hat kein Signalpeptid und kann nicht in sekretorische Vesikel verpackt werden (Schweigerer, Neufeld et al. 1987; Yamada, Yamada et al. 2000).

Als autokriner Faktor führt VEGF zusätzlich zu einer erhöhten Expression des FGFR-1, der damit die Sensitivität der RPE-Zellen auf bFGF steigert (Guerrin, Scotet et al. 1997). Zusammenfassend lässt sich bFGF als Verbindungsglied zwischen Verletzung der RPE-Zellen und der VEGF-abhängigen Induktion choroidaler Neovaskularisationsmembranen diskutieren. Durch seine Präsenz in CNV Geweben stellt bFGF einen wichtigen Faktor in der pathophysiologischen Kette der AMD dar. Durch seine Fähigkeit in RPE Zellen die VEGF Sekretion zu steigern, scheint bFGF maßgeblich an der Störung des Gleichgewichts der Wachstumsfaktor-Sekretion der RPE-Zellen beteiligt zu sein. Möglicherweise sind diese Erkenntnisse neben der VEGF-AK-Therapie mit Ranibizumab nützlich bei der Entwicklung neuer Strategien zur Prävention der CNV.

6 Zusammenfassung

Die Sekretion von Wachstumsfaktoren durch die Retina und das RPE ist von großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der retinalen Funktionen im gesunden Auge. Störungen der Wachstumsfaktorsekretion sind an der Pathogenese zahlreicher retinaler proliferativer Erkrankungen beteiligt. Daher sind Erkenntnisse über die durch Wachstumsfaktoren ausgelösten zellulären Ereignisse von großer Bedeutung für die Ätiologie dieser Erkrankungen.

Der Wachstumsfaktor bFGF spielt eine besondere Rolle in der Entwicklung neovaskulärer Membranen, die neben verschiedenen Erkrankungen vor allem in der Pathogenese der AMD zu schwerwiegenden Komplikationen führen können.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von bFGF über die beiden FGF-Rezeptoren, FGF-1 und FGFR-2, auf den Transkriptionsfaktor c-fos in kultivierten humanen RPE-Zellen untersucht. Die Ergebnisse der Arbeit lassen einen genaueren Aufschluss über die unterschiedlichen Transduktionswege beider Rezeptoren zu.

Das Proto-Onkogen c-fos greift in unterschiedlichste Zellfunktionen ein und kann die Differenzierung und Proliferation der Zellen beeinflussen.

In den vorliegenden Untersuchungen konnten folgende Erkenntnisse gewonnen werden.

- (1) bFGF stimuliert über den bFGF-Rezeptor FGFR-1 direkt die Expression des Transkriptionsfaktors c-fos.
- (2) Hauptsächlich vermittelt der FGF-Rezeptor-1 den c-fos induzierenden Effekt des Wachstumsfaktors bFGF.
- (3) Die Interaktion des FGFR-2 mit den L-Typ Ca^{2+} -Kanälen spielt bei der Induktion der Genexpression keine Rolle.
- (4) Aktivierte L-Typ Ca^{2+} -Kanäle stimulieren ebenfalls die c-fos Expression über Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration.

7 Literaturverzeichnis

- Adamis, A. P., D. T. Shima, et al. (1993). "Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells." Biochem Biophys Res Commun **193**(2): 631-8.
- Adcock, I. M. (1997). "Transcription factors as activators of gene transcription: AP-1 and NF-kappa B." Monaldi Arch Chest Dis **52**(2): 178-86.
- Ahuja, P., A. R. Caffè, et al. (2001). "Lens epithelium-derived growth factor (LEDGF) delays photoreceptor degeneration in explants of rd/rd mouse retina." Neuroreport **12**(13): 2951-5.
- Aiello, L. P., R. L. Avery, et al. (1994). "Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders [see comments]." N Engl J Med **331**(22): 1480-7.
- Algere, P. V. and S. Seregard (2002). "Age-related maculopathy: pathogenetic features and new treatment modalities." Acta Ophthalmol Scand **80**(2): 136-43.
- Ambati, J., B. K. Ambati, et al. (2003). "Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies." Surv Ophthalmol **48**(3): 257-93.
- Amin, R., J. E. Puklin, et al. (1994). "Growth factor localization in choroidal neovascular membranes of age-related macular degeneration." Investigative Ophthalmology and Visual Science **35**(8): 3178-88.
- Anderson, D., C. A. Koch, et al. (1990). "Binding of SH2 domains of phospholipase C gamma 1, GAP, and Src to activated growth factor receptors." Science **250**(4983): 979-82.
- Angel, P., E. A. Allegretto, et al. (1988). "Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1." Nature **332**(6160): 166-71.
- Angel, P., M. Imagawa, et al. (1987). "Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor." Cell **49**(6): 729-39.
- Angel, P. and M. Karin (1991). "The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation." Biochim Biophys Acta **1072**(2-3): 129-57.
- Araki, S., Y. Shimada, et al. (1990). "Apoptosis of vascular endothelial cells by fibroblast growth factor deprivation [published erratum appears in Biochem Biophys Res Commun 1990 Jun 29;169(3):1248]." Biochem Biophys Res Commun **168**(3): 1194-200.
- Araki, S., Y. Simada, et al. (1990). "Role of protein kinase C in the inhibition by fibroblast growth factor of apoptosis in serum-depleted endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **172**(3): 1081-5.
- Barker, P. E., M. Rabin, et al. (1984). "Human c-fos oncogene mapped within chromosomal region 14q21----q31." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(18): 5826-30.
- Bean, B. P. (1989). "Classes of calcium channels in vertebrate cells." Annu Rev Physiol **51**: 367-84.
- Becerra, S. P., R. N. Fariss, et al. (2004). "Pigment epithelium-derived factor in the monkey retinal pigment epithelium and interphotoreceptor matrix: apical secretion and distribution." Exp Eye Res **78**(2): 223-34.
- Bellot, F., G. Crumley, et al. (1991). "Ligand-induced transphosphorylation between different FGF receptors." Embo J **10**(10): 2849-54.
- Bird, A. C. (1991). "Doyné Lecture. Pathogenesis of retinal pigment epithelial detachment in the elderly; the relevance of Bruch's membrane change." Eye **5**(Pt 1): 1-12.

- Blaauwgeers, H. G., G. M. Holtkamp, et al. (1999). "Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation." Am J Pathol **155**(2): 421-8.
- Blanco, R. E., A. Lopez-Roca, et al. (2000). "Basic fibroblast growth factor applied to the optic nerve after injury increases long-term cell survival in the frog retina." J Comp Neurol **423**(4): 646-58.
- Bohmann, D., T. J. Bos, et al. (1987). "Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1." Science **238**(4832): 1386-92.
- Bok, D. (1985). "Retinal photoreceptor-pigment epithelium interactions." Investigative Ophthalmology and Visual Science **26**: 1659-1694.
- Bost, L. M., A. E. Aotaki-Keen, et al. (1992). "Coexpression of FGF-5 and bFGF by the retinal pigment epithelium in vitro." Experimental Eye Research **55**: 727-734.
- Bost, L. M., A. E. Aotaki-Keen, et al. (1994). "Cellular adhesion regulates bFGF gene expression in human retinal pigment epithelial cells." Experimental Eye Research **58**: 545-552.
- Brenner, D. A., M. O'Hara, et al. (1989). "Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor-alpha." Nature **337**(6208): 661-3.
- Bressler, N. M., J. C. Silva, et al. (1994). "Clinicopathologic correlation of drusen and retinal pigment epithelial abnormalities in age-related macular degeneration." Retina **14**(2): 130-42.
- Brown, D. M., P. K. Kaiser, et al. (2006). "Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration." N Engl J Med **355**(14): 1432-44.
- Campochiaro, P. A. (2000). "Retinal and choroidal neovascularization." J Cell Physiol **184**(3): 301-10.
- Campochiaro, P. A., S. F. Hackett, et al. (1994). "Platelet-derived growth factor is an autocrine growth stimulator in retinal pigmented epithelial cells." J Cell Sci **107** (Pt 9): 2459-69.
- Campochiaro, P. A., R. Sugg, et al. (1989). "Retinal pigment epithelial cells produce PDGF-like proteins and secrete them into their media." Exp Eye Res **49**(2): 217-27.
- Cao, W., F. Li, et al. (1998). "Induction of c-fos and c-jun mRNA expression by basic fibroblast growth factor in cultured rat Muller cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **39**(3): 565-73.
- Cao, W., J. Tombran-Tink, et al. (1999). "Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death." J Neurosci Res **57**(6): 789-800.
- Cao, W., J. Tombran-Tink, et al. (2001). "In vivo protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor." Invest Ophthalmol Vis Sci **42**(7): 1646-52.
- Cao, W., R. Wen, et al. (1997). "Mechanical injury increases bFGF and CNTF mRNA expression in the mouse retina." Exp Eye Res **65**(2): 241-8.
- Catterall, W. A. (1998). "Structure and function of neuronal Ca²⁺ channels and their role in neurotransmitter release." Cell Calcium **24**(5-6): 307-23.
- Chatton, B., J. L. Bocco, et al. (1994). "Jun and Fos heterodimerize with ATFa, a member of the ATF/CREB family and modulate its transcriptional activity." Oncogene **9**(2): 375-85.
- Chiu, R., W. J. Boyle, et al. (1988). "The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes." Cell **54**(4): 541-52.

- Clarke, M. S., R. Khakee, et al. (1993). "Loss of cytoplasmic basic fibroblast growth factor from physiologically wounded myofibers of normal and dystrophic muscle." J Cell Sci **106**(Pt 1): 121-33.
- Connolly, S. E., L. M. Hjelmeland, et al. (1992). "Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in mature and developing retinas of normal and RCS rats." Current Eye Research **11**: 1005-1017.
- Curran, T. and B. R. Franza, Jr. (1988). "Fos and Jun: the AP-1 connection." Cell **55**(3): 395-7.
- D' Amore, P. A. (1994). "Mechanisms of retinal and choroidal neovascularization." Invest Ophthalmol Vis Sci **35**(12): 3974-9.
- Das, A. and P. G. McGuire (2003). "Retinal and choroidal angiogenesis: pathophysiology and strategies for inhibition." Prog Retin Eye Res **22**(6): 721-48.
- Dawson, D. W., O. V. Volpert, et al. (1999). "Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis." Science **285**(5425): 245-8.
- Dessy, C. and T. Godfraind (1996). "The effect of L-type calcium channel modulators on the mobilization of intracellular calcium stores in guinea-pig intestinal smooth muscle." Br J Pharmacol **119**(1): 142-8.
- Distel, R. J., H. S. Ro, et al. (1987). "Nucleoprotein complexes that regulate gene expression in adipocyte differentiation: direct participation of c-fos." Cell **49**(6): 835-44.
- Dunn, K. C., A. D. Marmorstein, et al. (1998). "Use of the ARPE-19 cell line as a model of RPE polarity: basolateral secretion of FGF5." Invest Ophthalmol Vis Sci **39**(13): 2744-9.
- Edwards, A. O., R. Ritter, 3rd, et al. (2005). "Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration." Science **308**(5720): 421-4.
- Eyetech. and S. a. Group. (2003). "Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: phase II study results." Ophthalmology **110**: 979-986.
- Faktorovich, E. G., R. H. Steinberg, et al. (1990). "Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor." Nature **347**: 83-86.
- Faktorovich, E. G., R. H. Steinberg, et al. (1992). "Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat." Journal of Neuroscience **12**: 3554-3567.
- Fantl, W. J., D. E. Johnson, et al. (1993). "Signalling by receptor tyrosine kinases." Annu Rev Biochem **62**: 453-81.
- Fernig, D. G. and J. T. Gallagher (1994). "Fibroblast growth factors and their receptors: an information network controlling tissue growth, morphogenesis and repair." Prog Growth Factor Res **5**(4): 353-77.
- Finger, R. P., M. Fleckenstein, et al. (2007). "[Therapeutic anti-VEGF in ophthalmology: physiopathology and treatment of age-related macular degeneration]." Pharm Unserer Zeit **36**(6): 424-30.
- Fisher, R. F. (1987). "The influence of age on some ocular basement membranes." Eye **1**(Pt 2): 184-9.
- Franza, B. R., Jr., F. J. Rauscher, 3rd, et al. (1988). "The Fos complex and Fos-related antigens recognize sequence elements that contain AP-1 binding sites." Science **239**(4844): 1150-3.
- Friesel, R. E. and T. Maciag (1995). "Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction." FASEB Journal **9**(10): 919-25.

- Galizzi, J. P., J. Qar, et al. (1987). "Regulation of calcium channels in aortic muscle cells by protein kinase C activators (diacylglycerol and phorbol esters) and by peptides (vasopressin and bombesin) that stimulate phosphoinositide breakdown." Journal of Biological Chemistry **262**(15): 6947-6950.
- Galzie, Z., A. R. Kinsella, et al. (1997). "Fibroblast growth factors and their receptors." Biochem Cell Biol **75**(6): 669-85.
- Gaur, S., H. Yamaguchi, et al. (1996). "Growth hormone increases calcium uptake in rat fat cells by a mechanism dependent on protein kinase C." Am J Physiol **270**(5 Pt 1): C1485-92.
- Geller, S. F., G. P. Lewis, et al. (2001). "FGFR1, signaling, and AP-1 expression after retinal detachment: reactive Muller and RPE cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **42**(6): 1363-9.
- Gordon, W. C., E. B. Rodriguez de Turco, et al. (1992). "Retinal pigment epithelial cells play a central role in the conservation of docosahexanoic acid by photoreceptor cells after shedding and phagocytosis." Current Eye Research **11**: 73-83.
- Green, W. R. and C. Enger (1993). "Age-related macular degeneration histopathologic studies. The 1992 Lorenz E. Zimmerman Lecture." Ophthalmology **100**(10): 1519-35.
- Green, W. R. and S. N. Key, 3rd (1977). "Senile macular degeneration: a histopathologic study." Trans Am Ophthalmol Soc **75**: 180-254.
- Grigoriadis, A. E., Z. Q. Wang, et al. (1994). "c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling." Science **266**(5184): 443-8.
- Grimm, C., A. Wenzel, et al. (2000). "Gene expression in the mouse retina: the effect of damaging light." Mol Vis **6**: 252-60.
- Grimm, C., A. Wenzel, et al. (2001). "Rhodopsin-mediated blue-light damage to the rat retina: effect of photoreversal of bleaching." Invest Ophthalmol Vis Sci **42**(2): 497-505.
- Guerrin, M., E. Scotet, et al. (1997). "Overexpression of vascular endothelial growth factor induces cell transformation in cooperation with fibroblast growth factor 2." Oncogene **14**(4): 463-71.
- Guillonneau, X., F. Regnier-Ricard, et al. (1997). "FGF2-stimulated release of endogenous FGF1 is associated with reduced apoptosis in retinal pigmented epithelial cells." Exp. Cell Res. **233**(1): 198-206.
- Hafezi, F., J. P. Steinbach, et al. (1997). "The absence of c-fos prevents light-induced apoptotic cell death of photoreceptors in retinal degeneration in vivo." Nat Med **3**(3): 346-9.
- Hai, T. and T. Curran (1991). "Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(9): 3720-4.
- Haines, J. L., M. A. Hauser, et al. (2005). "Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration." Science **308**(5720): 419-21.
- Halazonetis, T. D., K. Georgopoulos, et al. (1988). "c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities." Cell **55**(5): 917-24.
- Heldin, C. H. (1995). "Dimerization of cell surface receptors in signal transduction." Cell **80**(2): 213-23.
- Houssaint, E., P. R. Blanquet, et al. (1990). "Related fibroblast growth factor receptor genes exist in the human genome." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(20): 8180-4.

- Hu, E., E. Mueller, et al. (1994). "Targeted disruption of the c-fos gene demonstrates c-fos-dependent and -independent pathways for gene expression stimulated by growth factors or oncogenes." Embo J **13**(13): 3094-103.
- Hubbard, S. R. (1999). "Structural analysis of receptor tyrosine kinases." Prog Biophys Mol Biol **71**(3-4): 343-58.
- Imbra, R. J. and M. Karin (1987). "Metallothionein gene expression is regulated by serum factors and activators of protein kinase C." Mol Cell Biol **7**(4): 1358-63.
- Ishibashi, T., Y. Hata, et al. (1997). "Expression of vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularization." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **235**(3): 159-67.
- Ishida, K., N. Panjwani, et al. (2003). "Participation of pigment epithelium in ocular immune privilege. 3. Epithelia cultured from iris, ciliary body, and retina suppress T-cell activation by partially non-overlapping mechanisms." Ocul Immunol Inflamm **11**(2): 91-105.
- Ishigooka, H., T. Kitaoka, et al. (1993). "Developmental expression of bFGF in the bovine retina." Investigative Ophthalmology and Visual Science **34**(9): 2813-23.
- Jacquemin, E., C. Halley, et al. (1990). "Localization of acidic fibroblast growth factor (aFGF) mRNA in mouse and bovine retina by in situ hybridization." Neurosci Lett **116**(1-2): 23-8.
- Janknecht, R. (1995). "Regulation of the c-fos promoter." Immunobiology **193**(2-4): 137-42.
- Kameyama, A., M. S. Shearman, et al. (1996). "Cyclic AMP-dependent protein kinase but not protein kinase C regulates the cardiac Ca²⁺ channel through phosphorylation of its alpha 1 subunit." J Biochem (Tokyo) **120**(1): 170-6.
- Kanski, J. J. (1994). "Clinical Ophthalmology." **3. Edition.**
- Karin, M., Z. Liu, et al. (1997). "AP-1 function and regulation." Curr Opin Cell Biol **9**(2): 240-6.
- Katsuki, H., Y. Shitaka, et al. (1998). "A potential role of Ras-mediated signal transduction for the enhancement of depolarization-induced Ca²⁺ responses in hippocampal neurons by basic fibroblast growth factor." Brain Res Dev Brain Res **111**(2): 169-76.
- Keegan, K., L. Rooke, et al. (1993). "The fibroblast growth factor receptor 3 gene (FGFR3) is assigned to human chromosome 4." Cytogenet Cell Genet **62**(2-3): 172-5.
- Khaliq, A., B. Patel, et al. (1995). "Oxygen modulates production of bFGF and TGF-beta by retinal cells in vitro." Exp Eye Res **60**(4): 415-23.
- King, G. L. and K. Suzuma (2000). "Pigment-epithelium-derived factor--a key coordinator of retinal neuronal and vascular functions." N Engl J Med **342**(5): 349-51.
- Kitaoka, T., A. E. Aotaki-Keen, et al. (1994). "Distribution of FGF-5 in the rhesus macaque retina [published erratum appears in Invest Ophthalmol 1995 May;36(6):976]." Invest Ophthalmol Vis Sci **35**(8): 3189-98.
- Kitaoka, T., L. M. Bost, et al. (1993). "Increasing cell density down-regulates the expression of acidic FGF by human RPE cells in vitro." Curr Eye Res **12**(11): 993-9.
- Klein, R., T. Peto, et al. (2004). "The epidemiology of age-related macular degeneration." Am J Ophthalmol **137**(3): 486-95.
- Klein, R. J., C. Zeiss, et al. (2005). "Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration." Science **308**(5720): 385-9.

- Kliffen, M., H. S. Sharma, et al. (1997). "Increased expression of angiogenic growth factors in age-related maculopathy." Br J Ophthalmol **81**(2): 154-62.
- Klint, P. and L. Claesson-Welsh (1999). "Signal transduction by fibroblast growth factor receptors." Front Biosci **4**: D165-77.
- Kouzarides, T. and E. Ziff (1988). "The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction." Nature **336**(6200): 646-51.
- Kuroki, M., E. E. Voest, et al. (1996). "Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo." J Clin Invest **98**(7): 1667-75.
- Kvanta, A. (1994). "Expression and secretion of transforming growth factor-beta in transformed and nontransformed retinal pigment epithelial cells." Ophthalmic Res **26**(6): 361-7.
- Lamb, N. J., A. Fernandez, et al. (1990). "Demonstration in living cells of an intragenic negative regulatory element within the rodent c-fos gene." Cell **61**(3): 485-96.
- LaVail, M. M., E. G. Faktorovich, et al. (1991). "Basic fibroblast growth factor protects photoreceptors from light-induced degeneration in albino rats." Ann N Y Acad Sci **638**: 341-7.
- Lewis, G. P., P. A. Erickson, et al. (1992). "Basic fibroblast growth factor: a potential regulator of proliferation and intermediate filament expression in the retina." J Neurosci **12**(10): 3968-78.
- Liu, X., X. Ye, et al. (1998). "Regulatory effects of soluble growth factors on choriocapillaris endothelial growth and survival." Ophthalmic Research **30**(5): 302-13.
- Lopez, P. F., B. D. Sippy, et al. (1996). "Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes." Invest Ophthalmol Vis Sci **37**(5): 855-68.
- Lu, M., M. Kuroki, et al. (1998). "Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression." J Clin Invest **101**(6): 1219-24.
- Lucibello, F. C., C. Lowag, et al. (1989). "trans-repression of the mouse c-fos promoter: a novel mechanism of Fos-mediated trans-regulation." Cell **59**(6): 999-1007.
- Mansukhani, A., P. Dell'Era, et al. (1992). "Characterization of the murine BEK fibroblast growth factor (FGF) receptor: activation by three members of the FGF family and requirement for heparin." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(8): 3305-9.
- Martin, D. M., D. Yee, et al. (1992). "Gene expression of the insulin-like growth factors and their receptors in human neuroblastoma cell lines." Brain Res Mol Brain Res **15**(3-4): 241-6.
- Matsumoto, M., N. Yoshimura, et al. (1994). "Increased production of transforming growth factor-beta 2 from cultured human retinal pigment epithelial cells by photocoagulation." Invest Ophthalmol Vis Sci **35**(13): 4245-52.
- Matsushima, M., N. Ogata, et al. (1996). "FGF receptor 1 expression in experimental choroidal neovascularization." Jpn J Ophthalmol **40**(3): 329-38.
- McDonald, T. F., S. Pelzer, et al. (1994). "Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells." Physiol Rev **74**(2): 365-507.
- McLaren, M. J., W. An, et al. (1996). "Analysis of basic fibroblast growth factor in rats with inherited retinal degeneration." FEBS Letters **387**: 63-70.
- Mergler, S., K. Steinhausen, et al. (1998). "Altered regulation of L-type channels by protein kinase C and protein tyrosine kinases as a pathophysiologic effect in retinal degeneration." FASEB J. **12**: 1125-1134.

- Mergler, S. and O. Strauss (2002). "Stimulation of L-type Ca(2+) channels by increase of intracellular InsP3 in rat retinal pigment epithelial cells." Exp Eye Res **74**(1): 29-40.
- Milani, D., A. Malgaroli, et al. (1990). "Ca²⁺ channels and intracellular Ca²⁺ stores in neuronal and neuroendocrine cells." Cell Calcium **11**(2-3): 191-9.
- Miller, S. S. and R. H. Steinberg (1977). "Active transport of ions across frog retinal pigment epithelium." Experimental Eye Research **25**: 235-248.
- Mohammadi, M., G. McMahon, et al. (1997). "Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors." Science **276**(5314): 955-60.
- Mohr-Andra, M. and K. Mohr (2007). "[Angiogenesis inhibitors for vision loss. Ranibizumab for macular degeneration]." Pharm Unserer Zeit **36**(6): 437-40.
- Moore, D. J., A. A. Hussain, et al. (1995). "Age-related variation in the hydraulic conductivity of Bruch's membrane." Invest Ophthalmol Vis Sci **36**(7): 1290-7.
- Murphy, T. H., P. F. Worley, et al. (1991). "L-type voltage-sensitive calcium channels mediate synaptic activation of immediate early genes." Neuron **7**(4): 625-35.
- Nagineeni, C. N., W. Samuel, et al. (2003). "Transforming growth factor-beta induces expression of vascular endothelial growth factor in human retinal pigment epithelial cells: involvement of mitogen-activated protein kinases." J Cell Physiol **197**(3): 453-62.
- Nakabeppu, Y., K. Ryder, et al. (1988). "DNA binding activities of three murine Jun proteins: stimulation by Fos." Cell **55**(5): 907-15.
- Ogata, N., M. Wada, et al. (2002). "Expression of pigment epithelium-derived factor in normal adult rat eye and experimental choroidal neovascularization." Invest Ophthalmol Vis Sci **43**(4): 1168-75.
- Ogata, N., L. Wang, et al. (2001). "Pigment epithelium derived factor as a neuroprotective agent against ischemic retinal injury." Curr Eye Res **22**(4): 245-52.
- Oshima, Y., S. Oshima, et al. (2004). "Increased expression of VEGF in retinal pigmented epithelial cells is not sufficient to cause choroidal neovascularization." J Cell Physiol **201**(3): 393-400.
- Partanen, J., T. P. Makela, et al. (1991). "FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern." Embo J **10**(6): 1347-54.
- Pasquale, E. B. and S. J. Singer (1989). "Identification of a developmentally regulated protein-tyrosine kinase by using anti-phosphotyrosine antibodies to screen a cDNA expression library." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(14): 5449-53.
- Pompeiano, M., C. Cirelli, et al. (1995). "c-Fos expression during wakefulness and sleep." Neurophysiol Clin **25**(6): 329-41.
- Premkumar, D. R., R. R. Mishra, et al. (2000). "L-type Ca(2+) channel activation regulates induction of c-fos transcription by hypoxia." Journal of Applied Physiology **88**(5): 1898-906.
- Puro, D. G. and T. Mano (1991). "Modulation of calcium channels in human retinal glial cells by basic fibroblast growth factor: a possible role in retinal pathobiology." Journal of Neuroscience **11**(6): 1873-80.
- Rane, S. G. and J. D. Pollock (1994). "Fibroblast growth factor-induced increases in calcium currents in the PC12 pheochromocytoma cell line are tyrosine phosphorylation dependent." J Neurosci Res **38**(5): 590-8.
- Rauscher, F. J., 3rd, P. J. Voulalas, et al. (1988). "Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro." Genes Dev **2**(12B): 1687-99.

- Reddy, V. M., R. L. Zamora, et al. (1995). "Distribution of growth factors in subfoveal neovascular membranes in age-related macular degeneration and presumed ocular histoplasmosis syndrome." Am J Ophthalmol **120**(3): 291-301.
- Reuter, H. (1983). "Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs." Nature **301**(5901): 569-74.
- Rifkin, D. B. and D. Moscatelli (1989). "Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor." J Cell Biol **109**(1): 1-6.
- Rosen, L. B., D. D. Ginty, et al. (1995). "Calcium regulation of gene expression." Advance in Second Messenger Phosphoprotein Research **30**: 225-53.
- Rosenfeld, P. J., D. M. Brown, et al. (2006). "Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration." N Engl J Med **355**(14): 1419-31.
- Rosenthal, R., H. Heimann, et al. (2007). "Ca²⁺ channels in retinal pigment epithelial cells regulate vascular endothelial growth factor secretion rates in health and disease." Mol Vis **13**: 443-56.
- Rosenthal, R., G. Malek, et al. (2005). "The fibroblast growth factor receptors, FGFR-1 and FGFR-2, mediate two independent signalling pathways in human retinal pigment epithelial cells." Biochem Biophys Res Commun **337**(1): 241-7.
- Rosenthal, R., H. Thieme, et al. (2001). "Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in brain neurons and retinal pigment epithelial cells act via stimulation of neuroendocrine L-type channels (Ca_v1.3)." FASEB Journal **15**: 970-977.
- Rossi, A., S. I. Jang, et al. (1998). "Effect of AP1 transcription factors on the regulation of transcription in normal human epidermal keratinocytes." J Invest Dermatol **110**(1): 34-40.
- Sandberg, M., T. Vuorio, et al. (1988). "Enhanced expression of TGF-beta and c-fos mRNAs in the growth plates of developing human long bones." Development **102**(3): 461-70.
- Sassone-Corsi, P., W. W. Lamph, et al. (1988). "fos-associated cellular p39 is related to nuclear transcription factor AP-1." Cell **54**(4): 553-60.
- Scholl, H. P., M. Fleckenstein, et al. (2007). "An update on the genetics of age-related macular degeneration." Mol Vis **13**: 196-205.
- Schweigerer, L., G. Neufeld, et al. (1987). "Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth." Nature **325**(6101): 257-9.
- Seddon, J. (2000). "Epidemiology of age-related macular degeneration." In Albert DM, Jakobiec FA, Azar DT, Gragoudas, ES (eds): Principles and Practise of Ophthalmology, 2nd edition. Philadelphia, London, Toronto, W.B. Saunders Company: 521-531.
- Sheng, M. and M. E. Greenberg (1990). "The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system." Neuron **4**(4): 477-85.
- Sheraidah, G., R. Steinmetz, et al. (1993). "Correlation between lipids extracted from Bruch's membrane and age." Ophthalmology **100**(1): 47-51.
- Shima, D. T., A. P. Adamis, et al. (1995). "Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the mitogen." Molecular Medicine **1**: 182-193.
- Shitaka, Y., N. Matsuki, et al. (1996). "Basic fibroblast growth factor increases functional L-type Ca²⁺ channels in fetal rat hippocampal neurons: implications for neurite morphogenesis in vitro." J Neurosci **16**(20): 6476-89.
- Shyu, A. B., M. E. Greenberg, et al. (1989). "The c-fos transcript is targeted for rapid decay by two distinct mRNA degradation pathways." Genes Dev **3**(1): 60-72.

- Simorre-Pinatel, V., M. Guerrin, et al. (1994). "Vasculotropin-VEGF stimulates retinal capillary endothelial cells through an autocrine pathway." Invest Ophthalmol Vis Sci **35**(9): 3393-400.
- Slomiany, M. G. and S. A. Rosenzweig (2004). "IGF-1-induced VEGF and IGFBP-3 secretion correlates with increased HIF-1 alpha expression and activity in retinal pigment epithelial cell line D407." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(8): 2838-47.
- Smeal, T., P. Angel, et al. (1989). "Different requirements for formation of Jun: Jun and Jun: Fos complexes." Genes Dev **3**(12B): 2091-100.
- Songyang, Z., S. Blechner, et al. (1994). "Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases." Curr Biol **4**(11): 973-82.
- Sperelakis, N., Y. Katsube, et al. (1996). "Regulation of the slow Ca⁺⁺ channels of myocardial cells." Mol Cell Biochem **163-164**: 85-98.
- Spilsbury, K., K. L. Garrett, et al. (2000). "Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinal pigment epithelium leads to the development of choroidal neovascularization." Am J Pathol **157**(1): 135-44.
- Steele, F. R., G. J. Chader, et al. (1992). "Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**: 1526-1530.
- Steinberg, R. H. (1985). "Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina." Documenta Ophthalmologica **60**: 327-346.
- Stepien, O., J. Gogusev, et al. (1998). "Amlodipine inhibition of serum-, thrombin-, or fibroblast growth factor-induced vascular smooth-muscle cell proliferation." J Cardiovasc Pharmacol **31**(5): 786-93.
- Sternfeld, M. D., J. E. Robertson, et al. (1989). "Cultured human retinal pigment epithelial cells express basic fibroblast growth factor and its receptor." Curr Eye Res **8**(10): 1029-37.
- Strauss, O., F. Buss, et al. (2000). "Activation of neuroendocrine L-type channels (alpha1D subunits) in retinal pigment epithelial cells and brain neurons by pp60^{c-src}." Biochemical and Biophysical Research Communications **270**(3): 806-10.
- Strauss, O., H. Heimann, et al. (2003). "Activation of L-type Ca²⁺ channels is necessary for growth factor-dependent stimulation of VEGF secretion by RPE cells." Invest Ophthalmol Vis Sci e-abstract **44**: 3926.
- Strauß, O., S. Mergler, et al. (1997). "Regulation of L-type calcium channels by tyrosine kinase and protein kinase C in cultured rat and human retinal pigment epithelial cells." FASEB J **11**: 859-867.
- Streilein, J. W., N. Ma, et al. (2002). "Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants." Vision Res **42**(4): 487-95.
- Sugasawa, K., J. Deguchi, et al. (1994). "Immunocytochemical analyses of distributions of Na,K-ATPase and Glut1, insulin and transferrin receptors in the developing retinal pigment epithelial cells." Cell Structure and Function **19**: 21-28.
- Tanihara, H., M. Inatani, et al. (1997). "Growth factors and their receptors in the retina and pigment epithelium." Progress in Retinal and Eye Research **16**: 271-301.
- Tanihara, H., M. Yoshida, et al. (1993). "Identification of transforming growth factor-beta expressed in cultured human retinal pigment epithelial cells." Investigative Ophthalmology and Visual Science **34**(2): 413-9.
- Timmers, A. M., D. A. Van Groningen-Luyben, et al. (1991). "Uptake and isomerization of all-trans retinal by isolated bovine retinal pigment epithelial cells: further clues to the visual cycle." Experimental Eye Research **52**: 129-138.

- Ueda, Y. and R. H. Steinberg (1993). "Voltage-operated calcium channels in fresh and cultured rat retinal pigment epithelial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **34**(12): 3408-18.
- Ueda, Y. and R. H. Steinberg (1995). "Dihydropyridine-sensitive calcium currents in freshly isolated human and monkey retinal pigment epithelial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **36**(2): 373-80.
- Ullrich, A. and J. Schlessinger (1990). "Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity." Cell **61**(2): 203-12.
- Vogt, P. K. and T. J. Bos (1990). "jun: oncogene and transcription factor." Adv Cancer Res **55**: 1-35.
- Wahlin, K. J., P. A. Campochiaro, et al. (2000). "Neurotrophic factors cause activation of intracellular signaling pathways in Muller cells and other cells of the inner retina, but not photoreceptors." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(3): 927-36.
- Walsh, N., K. Valter, et al. (2001). "Cellular and subcellular patterns of expression of bFGF and CNTF in the normal and light stressed adult rat retina." Exp Eye Res **72**(5): 495-501.
- Wen, R., Y. Song, et al. (1995). "Injury-induced upregulation of bFGF and CNTF mRNAs in the rat retina." Journal of Neuroscience **15**: 7377-7385.
- Wenkel, H. and J. W. Streilein (2000). "Evidence that retinal pigment epithelium functions as an immune-privileged tissue." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(11): 3467-73.
- Wenzel, A., C. Grimm, et al. (2000). "c-fos controls the "private pathway" of light-induced apoptosis of retinal photoreceptors." J Neurosci **20**(1): 81-8.
- Wiechen, K., D. T. Yue, et al. (1995). "Two distinct functional effects of protein phosphatase inhibitors on guinea-pig cardiac L-type Ca²⁺ channels." J Physiol **484 (Pt 3)**: 583-92.
- Wijetunge, S. and A. D. Hughes (1996). "Activation of endogenous c-Src or a related tyrosine kinase by intracellular (pY)EEI peptide increases voltage-operated calcium channel currents in rabbit ear artery cells." FEBS Letters **399**: 63-66.
- Wimmers, S., L. Coeppicus, et al. (2004). "Cloning and molecular characterization of L-type Ca²⁺ channels in the retinal pigment epithelium." Invest Ophthalmol Vis Sci e-abstract **45**: 3688.
- Witmer, A. N., G. F. Vrensen, et al. (2003). "Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease." Prog Retin Eye Res **22**(1): 1-29.
- Yamada, H., E. Yamada, et al. (2001). "Fibroblast growth factor-2 decreases hyperoxia-induced photoreceptor cell death in mice." Am J Pathol **159**(3): 1113-20.
- Yamada, H., E. Yamada, et al. (2000). "Cell injury unmasks a latent proangiogenic phenotype in mice with increased expression of FGF2 in the retina." J Cell Physiol **185**(1): 135-42.
- Yamaguchi, T. P. and J. Rossant (1995). "Fibroblast growth factors in mammalian development." Curr Opin Genet Dev **5**(4): 485-91.
- Yamamoto, C., N. Ogata, et al. (1996). "Immunolocalization of basic fibroblast growth factor during wound repair in rat retina after laser photocoagulation." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **234**(11): 695-702.
- Yoshida, A., M. Takahashi, et al. (1992). "Cyclic AMP-dependent phosphorylation and regulation of the cardiac dihydropyridine-sensitive Ca channel." FEBS Lett **309**(3): 343-9.
- Yoshida, K., Y. Muraki, et al. (1995). "C-fos gene expression in rat retinal cells after focal retinal injury." Invest Ophthalmol Vis Sci **36**(1): 251-4.

- Yoshida, M., H. Tanihara, et al. (1992). "Platelet-derived growth factor gene expression in cultured human retinal pigment epithelial cells." Biochemical and Biophysical Research Communications **189**: 66-71.
- Yoshimura, N., S. Kuriyama, et al. (1992). "Growth factor dependent phosphorylation of membrane proteins in cultured human retinal pigment epithelial cells." Current Eye Research **11**: 997-1004.
- Young, R. W. (1987). "Pathophysiology of age-related macular degeneration." Surv Ophthalmol **31**(5): 291-306.
- Young, R. W. and D. Bok (1969). "Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process." Journal of Cellular Biochemistry **42**: 392-403.
- Zerial, M., L. Toschi, et al. (1989). "The product of a novel growth factor activated gene, fos B, interacts with JUN proteins enhancing their DNA binding activity." Embo J **8**(3): 805-13.
- Zhan, X., C. Plourde, et al. (1994). "Association of fibroblast growth factor receptor-1 with c-Src correlates with association between c-Src and cortactin." J Biol Chem **269**(32): 20221-4.
- Zhang, N. L., E. E. Samadani, et al. (1993). "Mitogenesis and retinal pigment epithelial cell antigen expression in the rat after krypton laser photocoagulation." Invest Ophthalmol Vis Sci **34**(8): 2412-24.
- Zhu, D. L., T. Herembert, et al. (1994). "Involvement of calcium channels in fibroblast growth factor-induced activation of arterial cells in spontaneously hypertensive rats." Journal of Cardiovascular Pharmacology **23**(3): 395-400.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

aFGF	saurer Fibroblasten Wachstumsfaktor (acid fibroblast growth factor)
AMD	altersbedingte Makulardegeneration
AP-1	Aktivator-Protein-1
bFGF	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (basic fibroblast growth factor)
bp	Basenpaare
Ca ²⁺	Calcium (zweifach positiv geladen)
CaM-Kinase	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase
cAMP	cyclic Adenosin-Mono-Phosphat
CaRe/CRE	calcium response element
CNTF	ciliary neurotrophic factor
CNV	choroidale Neovaskularisation
cDNA	komplementäre DNA
CRE	cAMP response element
CREB	CRE-Bindeprotein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DOG	Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft
EDF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ERK	extracelullar signal regulated kinases
FCS	fetales Kälberserum
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FGFR	FGF-Rezeptor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	nucleotide exchange factor SOS
GTP	Guanosintriphosphat
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor
hMTIIA	humanes Metallothioneingen IIA
IEG	immediate early genes

IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
Il-2	Interleukin-2
KGF	Keratinocyten-Wachstumsfaktor
LEDGF	lens epithelium-derived growth factor
MAPK	mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MCP-1	monocytes chemoattractant protein-1
MEK	MAPK-Kinase-Kinase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mM	millimolar
MMP-1	Metalloproteinasen-1
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
PCR	Polymease-Kettenreaktion
PEDF	pigment epithelium-derived factor
PDGF	Blutplättchen Wachstumsfaktor
PKC	Proteinkinase C
PTK	Protein-Tyrosinkinase
RNA	Ribonukleinsäure
RPE	Retinales Pigmentepithel
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkription
SH2	src-Homologie-Region 2
SRE	serum response element
SRF	serum response factor
TGF-β	transformierender Wachstumsfaktor beta
TPA	12-O-tetradecanoyl-phobol-13-acetat
VEGF	vascular endothelien growth factor

8.2 Legende

*	$p < 0,05$
**	$p < 0,01$
n.s.	nicht signifikant

8.3 Veröffentlichung

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht im Paper:

„The fibroblast growth factor receptors, FGFR-1 and FGFR-2, mediate two independent signalling pathways in human retinal pigment epithelial cells“

Rita Rosenthal, Goldis Malek, Nina Salomon, Moritz Peill-Meininghaus, Linn Coeppicus, Hendrik Wohlleben, Soenke Wimmers, Catherine Bowes Rickman, Olaf Strauss

„Biochemical and biophysical research communication“ 2005 November 11; 337(1):241-7.

Die Ergebnisse sind entstanden in enger Zusammenarbeit der Klinik für Augenheilkunde und des Instituts für Klinische Physiologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin sowie des Department of Ophthalmology and Department of Cell Biology Duke University Medical Center Durhan, NC, USA.

8.4 Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

Erklärung zur Dissertation

„Ich, Nina Schirin Salomon, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Quantifizierung der c-fos Expression im Retinalen Pigmentepithel“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 20.04.2009

(Nina Salomon)

9 Danksagung

Diese Arbeit habe ich im Institut für Klinische Physiologie der Charité, Campus Benjamin Franklin durchgeführt.

Ich bedanke mich vor allem bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Olaf Strauß, der mich immer mit Rat und Tat begleitet hat. Ebenso danke ich herzlich Dr. Rita Rosenthal, die mir als Vorbild und mit viel Tatkraft zur Seite stand.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Wiederholt und Prof. Dr. Fromm sowie dem gesamten Team der klinischen Physiologie für die produktive Zusammenarbeit und die gute Arbeitsatmosphäre.

Nicht zuletzt danke ich meinen Kollegen Marianne Boxberger, Ingrid Lichtenstein, Anja Fromm, Dr. Bernd Hillenbrand, Dr. Rüdiger Zorn, Dr. Moritz Peill-Meininghaus, Dr. Hendrik Wohlleben, Dr. Pawel Fidzinski für die gute Zusammenarbeit und die heiteren Momente.