

Christoph Helmer Antoni
Dr. med.

**Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von Interferon-a und Interferon-b
„messenger“-Ribonukleinsäure durch in-situ Hybridisierung unter Verwendung
radioaktiver und nicht-radioaktiver Sonden**

Geboren am 20.05.68 in Bremen
Reifeprüfung am 02.06.87 in Bremen
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1989 bis SS 1996
Physikum am 03.04.91 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heilbronn
Staatsexamen am 06.05.96 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. F. Rösl

Die *in-situ* Hybridisierung (ISH) ist eine moderne Methode der klinischen Diagnostik. Sie ermöglicht mit hoher Präzision die genaue Lokalisation von Nukleinsäuresequenzen in zytologischen Präparaten unter weitgehender Erhaltung der Morphologie von Chromosomen, Zellen und Gewebeschnitten. Bislang wurden zur Detektion von Nukleinsäuren durch die ISH hauptsächlich radioaktive Sonden eingesetzt. Seit einigen Jahren finden ³³P-markierte Radionukleotide Verwendung. Auch nicht-radioaktive Detektionssysteme sind schon länger bekannt, wie z.B. Biotin- und Immunogoldmarkierungen. Die neueste Entwicklung ist die Verwendung Digoxigenin (DIG)-markierter Nukleotide. Die Detektion erfolgt über einen Enzym- oder Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper.

Zielsetzung dieser Arbeit war, die Sensitivität und das Auflösungsvermögen verschiedener Verfahren zum Nachweis von mRNA-Transkripten in zytologischen Präparaten mit Hilfe der ISH zu bearbeiten. Die Untersuchungen sollten am Beispiel der induzierbaren, aber nieder-redundanten mRNA der Zytokine IFN- α 2 und IFN- β in menschlichen Zellen verschiedener Herkunft vorgenommen werden. Unter Zytokinen versteht man Proteine mit Transmitterwirkung, die von lebenden Zellen konstitutiv oder auf einen Reiz hin abgegeben werden. Eine Untergruppe der Zytokine bilden die Interferone (IFN). Aufgrund ihrer immunmodulatorischen und antiproliferativen Wirkung haben sie ihren Einsatz in der modernen Medizin gefunden und sind in den Therapien der chronischen Hepatitis C, sowie der Haarzell-Leukämie, kutaner T-Zell-Lymphome und myeloproliferativer Erkrankungen schon fest etabliert. Im Bereich der Diagnostik kommt dem Nachweis von Zytokinen, wie dem Tumornekrosefaktor, Interleukin-1 und Interleukin-6 eine immer größer werdende Bedeutung zu, da sie an der Pathogenese von Krankheiten des rheumatischen Formenkreises, sowie den Autoimmunkrankheiten entscheidend beteiligt sind.

Im Vordergrund der Untersuchung stand der Vergleich verschiedener Markierungsverfahren für die spezifischen Nukleinsäuren. Neben radioaktiv-markierten Sonden sollten auch DIG-markierte Sonden zum Einsatz kommen. Der abschließende Vergleich der Ergebnisse der ISH bei Verwendung radioaktiv bzw. nicht-radioaktiv markierter Sonden sollte Aufschluß über die potentiellen Einsatzmöglichkeiten nicht-radioaktiver Detektionsverfahren in der medizinischen Diagnostik geben.

Für die Untersuchung wurden Periphere Blutleukozyten (PBL) gesunder Spender, sowie zwei Zelllinien (Namalva-Zellen, MG-63-Zellen) ausgewählt. Die IFN-Induktion wurde mit Sendai-Virus (SV), einem bekannten IFN-Induzenten, durchgeführt. Verglichen wurden im weiteren die Art und Menge der sezernierten Interferone, sowie die Ergebnisse der RNS-Blot-Hybridisierung mit der ISH. Es sollte versucht werden, eine Korrelation zwischen der IFN-Sekretion und der Genexpression auf Einzellzelebene und im Gesamtzellextrakt darzustellen. PBL und Namalva-Zellen sezernierten nach Infektion mit SV große Mengen Interferon in das Medium. Durch Infektion mit 640 Hämagglutinationseinheiten (HAU) SV wurde eine maximale Interferoninduktion erreicht. In den Neutralisationstests mit Antikörpern gegen IFN- α und - β zeigte sich, daß die relativen Anteile beider IFN-Typen in PBL und Namalva-Zellen variierten. So sezernierten SV infizierte Namalva-Zellen zu 75% IFN- α und zu 25% IFN- β , während bei PBL gleiche Anteile von IFN- α und - β nachgewiesen werden konnten. In RNS-Blot Analysen von über sechs Stunden mit SV infizierten PBL und Namalva-Zellen zeigte sich ein deutliches Signal für IFN- α 2 und IFN- β . In Analysen der RNS von MG-63-Zellen, die vier Stunden mit dem synthetischen Polynukleotid poly(D):poly(C) und Cycloheximid superinduziert wurden, konnte ein Signal für IFN- β nachgewiesen werden. Densitometrisch ergab sich ein Verhältnis von IFN- α 2 mRNS zu IFN- β mRNS in Namalva-Zellen von 1,75 : 1, sowie in PBL von 2,3 : 1.

In allen untersuchten Zelltypen war nach der viralen IFN-Induktion ein stark heterogenes Signal in der ISH zu beobachten, was auf stark unterschiedliche IFN-mRNS Expression auf Einzellzelebene schließen läßt. Die Frequenzanalysen für IFN- α 2 mRNS ergaben bei PBL einen Anteil von 5,9% positive Zellen. Für IFN- β mRNS lagen die Werte bei 7,1% für DIG-, bzw. bei 6,4% für ^{33}P -markierte Proben. Bei den Namalva Zellen zeigten sich deutliche Unterschiede im Vergleich der Markierungen. So lagen die Frequenzen positiver Zellen für IFN- α 2 mRNS zwischen 3,2% bei ^{32}P und acht Tagen Exposition, bei 5,8% für ^{33}P -markierten Proben. Für IFN- β mRNS betragen sie für DIG 2,3% und für ^{33}P 4,6%. Bei der Hybridisierung mit einem Gemisch beider Sonden (IFN- α 2 und - β) konnte an Hand von DIG-markierten Sonden gezeigt werden, daß die Frequenz der mit beiden Sonden positiven Zellen nicht signifikant größer war als bei Verwendung einer IFN- β - oder einer IFN- α 2-Sonde allein. Daraus wurde der Schluß gezogen, daß 80% der positiven Zellen beide Interferone produzieren. Das zeigt darüberhinaus, daß die Produzenten von IFN- α 2 und IFN- β beide der gleichen Population entstammen müssen. Auf Grund von morphologischen Kriterien konnten die positiven Zellen den Monozyten zugeordnet werden. In den manuellen Auszählungen des Differentialblutbildes des Donors betrug der prozentuale Anteil von Monozyten 5,4%, in einer maschinellen Auswertung 6,1%.

Im statistischen Vergleich der Ergebnisse wurde deutlich, daß die Markierungsmethoden bei dem Nachweis von IFN- α 2 mRNS in PBL ähnliche Ergebnisse lieferten. Hingegen erbrachte die DIG-Markierung bei dem Nachweis von IFN- β mRNS eine höhere Frequenz positiver Zellen. Bei Namalva Zellen fand sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Methoden. Die radioaktiv-markierten Sonden ergaben deutlich höhere Frequenzen für beide IFN-mRNS-Spezies. Dies kann daraus resultieren, daß Präparate mit Namalva Zellen gegenüber jeder Art der Behandlung sehr empfindlich reagierten. So verlangt die Methode der DIG-Markierung

mehrere längere Wasch- und Inkubationsschritte, die der Morphologie der Zellen deutlich mehr schaden als die kürzere Behandlung in den Experimenten mit radioaktiv-markierten Sonden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß DIG-markierte Sonden vergleichbare Resultate zu radioaktiv-markierten Sonden liefern. Eingeschränkt wird dies durch die schlechtere Auswertbarkeit. Sie resultiert aus der subjektiven Empfindung der Stärke der Färbung der positiven Zellen. So lassen sich mit DIG-markierten Sonden qualitative Aussagen gut, quantitative Aussagen hingegen nur bedingt treffen. Andererseits bieten DIG-markierte Sonden eine schnellere Alternative zu den durch die längere Expositionszeit zeitlich aufwendigeren Methoden mit radioaktiv-markierten Sonden. Auch in zytologischen Präparaten adhärenter Zellen (MG-63) zeigen die DIG-markierten Sonden gute Resultate, so daß eine Anwendung in Gewebeschnitten zu gute Ergebnisse führen kann. Das eröffnet neue Perspektiven, die einen breiteren Einsatz der *in-situ* Hybridisierung insbesondere in der Routinediagnostik ermöglichen.

Aufgrund seiner exzellenten Auflösung und des geringen Hintergrundsignals ist ^{33}P ein für die *in-situ* Hybridisierung sehr gut geeignetes Radioisotop. Es bietet deshalb für die Grundlagenforschung hervorragende Bedingungen.