

**Charakterisierung der Apolipoprotein J-Genregulation
in Fibroblasten und glatten Gefäßmuskelzellen
durch nekrotische Zellen und Toll-like Rezeptoren**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes-Gutenberg Universität
in Mainz

Markus Baiersdörfer
geboren in Coburg

Mainz 2006

Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg Universität Mainz

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 20. 7. 2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Apolipoprotein J, ein multifunktionelles Glykoprotein	1
1.1.1	Struktur des ApoJ-Gens	1
1.1.2	Struktur und Biosynthese des Apolipoprotein J	2
1.1.3	Expression von Apolipoprotein J	4
1.1.4	Potentielle Funktionen von Apolipoprotein J	8
1.2	Die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLR)	12
1.2.1	Struktur von Toll-like Rezeptoren	12
1.2.2	Expression von Toll-like Rezeptoren	14
1.2.3	Funktion von Toll-like Rezeptoren	16
1.2.4	TLR-vermittelte Signaltransduktion	18
1.2.5	Agonisten von Toll-like Rezeptoren	22
1.2.5.1	Pathogenassoziierte und synthetische TLR-Agonisten	22
1.2.5.2	Endogene TLR-Agonisten	26
1.3	Ziele der Arbeit	29
2	Material und Methoden	31
2.1	Materialien und Laborgeräte	31
2.1.1	Laborgeräte	31
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	31
2.1.3	Chemikalien	32
2.1.4	Proteine, Nukleinsäuren und bioaktive Substanzen	32
2.2	Methoden	33
2.2.1	Zellkultur	33
2.2.1.1	Kultivierung stabiler Zelllinien	33
2.2.1.1.1	Verwendete Zelllinien	33
2.2.1.1.2	Medien und Lösungen	34
2.2.1.1.3	Passagieren von Zellen	35
2.2.1.1.4	Stimulierung von Zellen für Northern-Blot Analysen	36
2.2.1.1.5	Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung)	36
2.2.1.1.6	Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer	37
2.2.1.2	Präparation apoptotischer Rat1-Fibroblasten	37
2.2.1.2.1	Methoden zum Nachweis apoptosespezifischer Merkmale Camptothecin-behandelter Rat1-Fibroblasten	39
2.2.1.2.1.1	Colorimetrischer Nachweis aktivierter Caspase 3	39
2.2.1.2.1.2	Nachweis einer apoptoseabhängigen DNA-Fragmentierung	40
2.2.1.2.1.3	Nachweis von externalisiertem Phosphatidylserin durch Annexin V	42
2.2.1.3	Präparation von konditioniertem Medium Camptothecin-behandelter Rat1-Fibroblasten	43
2.2.1.3.1	Enzymatische Bestimmung der Lactatdehydrogenase (LDH) in konditionierten Medien Camptothecin-behandelter Rat1-Fibroblasten	44
2.2.1.4	Präparation nekrotischer Zellen	45
2.2.1.5	Präparation von Zellextrakt	46
2.2.1.6	Präparation von Zytosol	47
2.2.1.7	Colorimetrische Zellvitalitätsbestimmung mittels MTS-Assay	48
2.2.2	Methoden zur Isolierung ApoJ-induzierender und zytoprotektiver Faktoren	50
2.2.2.1	Ultrafiltration	50
2.2.2.2	Anionenaustauscherchromatographie	50

Inhaltsverzeichnis

2.2.2.3	Affinitätschromatographie	52
2.2.2.4	Gelpermeationschromatographie	53
2.2.2.5	Proteinbestimmung nach Bradford	55
2.2.2.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Lämmli	55
2.2.2.6.1	Kolloidal-Coomassie-Färbung	57
2.2.2.6.2	TCA-Präzipitation von Proteinen	58
2.2.3	RNA-Präparation nach Chomczynski und Sacchi	59
2.2.3.1	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung präparierter Gesamt-RNA	60
2.2.4	Northern-Blot-Analyse	60
2.2.4.1	Denaturierende Agarosegelelektrophorese	60
2.2.4.2	Kapillarblot	62
2.2.4.3	Radioaktive Markierung von cDNA-Sonden	62
2.2.4.4	Hybridisierung	63
2.2.4.5	Hybridisierung mit Rapid Hyb Buffer	64
2.2.4.6	Auswertung und Autoradiographie	65
2.2.4.7	Rehybridisierung der Membran	65
2.2.5	Präparation und Analyse von DNA	66
2.2.5.1	Präparation von Plasmid-DNA	66
2.2.5.1.1	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung präparierter Plasmid-DNA	67
2.2.5.2	Restriktionsverdau rekombinanter Plasmide	67
2.2.5.3	Agarosegelelektrophorese von DNA	69
2.2.5.4	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	69
2.2.5.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	70
2.2.5.5.1	Erststrangsynthese mittels reverser Transkription von RNA	70
2.2.5.5.2	Amplifikation spezifischer cDNA-Moleküle mittels PCR	72
2.2.5.5.2.1	Verwendete Primer	72
2.2.5.5.2.2	Präparative RT-PCR	73
2.2.5.5.2.3	Genexpressionsanalyse mittels analytischer RT-PCR	73
2.2.5.5.2.4	Genregulationsanalyse mittels semiquantitativer RT-PCR	74
2.2.5.5.2.5	Präparative PCR zur Amplifikation der humanen GAPDH-cDNA	75
3	Ergebnisse	76
3.1	Einfluss nekrotischer Zellen auf die ApoJ-mRNA-Expression in vitalen Rat1-Fibroblasten in Gegenwart von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin	76
3.1.1	Die Inkubation mit nekrotischen Zellen induziert in serumunabhängiger Weise die ApoJ-mRNA-Expression in vitalen Rat1-Fibroblasten	77
3.1.2	Die Induktion der ApoJ-mRNA-Expression in vitalen Rat1-Fibroblasten wird durch sedimentierbare und lösliche Faktoren nekrotischer Zellen vermittelt	78
3.1.3	Lösliche Faktoren nekrotischer Zellen besitzen zytoprotektive Wirkung auf serumfrei kultivierte Rat1-Fibroblasten	81
3.1.4	Zusammenfassung	83
3.2.	Charakterisierung und Identifizierung löslicher ApoJ-induzierender und zytoprotektiver Faktoren nekrotischer Zellen	83
3.2.1	Die ApoJ-induzierende und zytoprotektive Wirkung von Zellextrakt auf serumfrei kultivierte Rat1-Fibroblasten ist dosisabhängig	83
3.2.2	Die ApoJ-induzierenden und zytoprotektiven Faktoren sind im Zytosol lebender Zellen lokalisiert	86
3.2.3	Parallele Freisetzung von Lactatdehydrogenase, ApoJ-induzierenden und zytoprotektiven Faktoren aus Camptothecin-behandelten Rat1-Fibroblasten	88
3.2.4	Die ApoJ-induzierende und zytoprotektive Wirkung von Zellextrakten ist spezies- und zelltypunabhängig	91
3.2.5	Die ApoJ-induzierenden und zytoprotektiven Faktoren aus Zellextrakt sind hitzelabil	93

3.2.6	Die zytoprotektiven Faktoren aus Zellextrakt sind trypsinsensitiv	95
3.2.7	Fraktionierung von Zellextrakt mittels Anionenaustauscherchromatographie	97
3.2.8	Fraktionierung von Zellextrakt mittels Gelpermeationschromatographie	100
3.2.9	Partielle Reinigung des zytoprotektiven Proteins aus konditioniertem Medium Camptothecin-behandelter Rat1-Fibroblasten	104
3.2.10	Identifizierung potentiell zytoprotektiver Proteine mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie	111
3.2.11	Einfluss von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin auf die Zellvitalität und einer durch nekrotische Zellen induzierten ApoJ-mRNA-Expression in Rat1-Fibroblasten	115
3.2.11.1	Die zytoprotektive Wirkung von Zellextrakt auf serumfrei kultivierte Rat1-Fibroblasten ist abhängig von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin	115
3.2.11.2	Einfluss von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin auf die durch nekrotische Zellen induzierte ApoJ-mRNA-Expression in Rat1-Fibroblasten	117
3.2.12	Zusammenfassung	121
3.3.	Charakterisierung einer durch nekrotische Zellen induzierten ApoJ-mRNA-Expression in vitalen Zellen in Gegenwart von L-Glutamin	124
3.3.1	Die Induktion der ApoJ-mRNA-Expression in vitalen Rat1-Fibroblasten durch nekrotische Zellen ist dosisabhängig	124
3.3.2	Die Induktion der ApoJ-mRNA-Expression in vitalen Rat1-Fibroblasten wird durch sedimentierbare und lösliche Faktoren nekrotischer Zellen vermittelt	126
3.3.3	Die ApoJ-induzierende Wirkung von Zellextrakten auf vitale Rat1-Fibroblasten ist spezie- und zelltypunabhängig	128
3.3.4	Kinetische Analyse der durch nekrotische Zellen induzierten ApoJ-mRNA-Expression in vitalen Rat1-Fibroblasten	130
3.3.5	Einfluss nekrotischer Zellen auf die ApoJ-mRNA-Expression in glatten Gefäßmuskulzellen (CRL 2018) und embryonalen Dottersackzellen (10A)	133
3.3.6	Differentielle Expression von Toll-like Rezeptoren in Rat1-, CRL2018- und 10A-Zellen	137
3.3.7	Zusammenfassung	139
3.4	Charakterisierung der ApoJ-Regulation durch Toll-like Rezeptoren	140
3.4.1	Einfluss der TLR-spezifischen Agonisten Pam ₃ Cys-Ser-Lys ₄ , Poly(I:C) und LPS auf die ApoJ-mRNA-Expression in CRL2018-Zellen	140
3.4.2	Die ApoJ-mRNA-Expression in CRL2018-Zellen wird spezifisch durch doppelsträngige RNA induziert	142
3.4.3	Additive Wirkung von Pam ₃ Cys-Ser-Lys ₄ und LPS auf die durch Poly(I:C) induzierte ApoJ-mRNA-Expression in CRL2018-Zellen	144
3.4.4	Kinetische Analyse der durch Poly(I:C) induzierten Expression von ApoJ-mRNA in CRL2018-Zellen	146
3.4.5	Einfluss nicht-synthetischer Ribonukleinsäuren auf die ApoJ-mRNA-Expression in CRL2018-Zellen	150
3.4.6	Einfluss verschiedener Nukleasen auf die ApoJ-induzierenden Eigenschaften nekrotischer Zellen	152
3.4.7	Einfluss von Pam ₃ Cys-Ser-Lys ₄ , Poly(I:C) und LPS auf die ApoJ-mRNA-Expression in Rat1-Fibroblasten und 10A-Zellen	154
3.4.8	Einfluss nekrotischer Zellen auf die IFN-β- und IFN-α1-mRNA-Expression in Rat1-Fibroblasten	157
3.4.9	Zusammenfassung und weiterführende Arbeiten	159

Inhaltsverzeichnis

4	Diskussion	162
4.1	Einfluss des Glutaminsupplements N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin auf Zellvitalität und ApoJ-Genexpression kultivierter Rat1-Fibroblasten	162
4.1.1	L-Glutamin-enhaltende Dipeptide als stabile Glutaminsupplemente von Zellkulturmedien	163
4.1.2	Beteiligung des Enzyms Acylpeptidhydrolase an der zytoprotektiven und ApoJ-induzierenden Wirkung nekrotischer Zellen	166
4.2.	Regulation der ApoJ-Genexpression durch Toll-like Rezeptoren	170
4.2.1	Einfluss TLR2-, TLR3- und TLR4-vermittelter Signalwege auf die Regulation der ApoJ-Genexpression in CRL2018-Zellen und Rat1-Fibroblasten	172
4.2.2	Potentielle Beteiligung endogener TLR-Agonisten an der Induktion der ApoJ-Genexpression durch nekrotische Zellen	182
4.3	Induktion der ApoJ-Genexpression in geschädigten Geweben	187
4.4	Mögliche Funktionen von ApoJ in geschädigten Geweben	192
5	Zusammenfassung	200
6	Literaturverzeichnis	202
7	Anhang	223
7.1	Abkürzungsverzeichnis	223
7.2	Strukturformeln verwendeter Substanzen	225

1 Einleitung

1.1 Apolipoprotein J, ein multifunktionelles Glykoprotein

Das sekretierte heterodimere Apolipoprotein J (ApoJ) wurde ursprünglich in der Samenflüssigkeit von Widdern nachgewiesen und aufgrund seiner Eigenschaft, die Aggregation von Erythrozyten zu induzieren, als Clusterin bezeichnet (Fritz et al. 1983). Unabhängig voneinander charakterisierten mehrere Arbeitsgruppen aus unterschiedlichen Fachgebieten dieses Protein, was dazu führte, dass ApoJ zunächst unter einer Vielzahl verschiedener Bezeichnungen Eingang in die Literatur fand (Jenne und Tschopp, 1992). In der Ratte wurde es unter anderem als ein von Sertolizellen des Testisgewebes konstitutiv sekretiertes sulfatiertes Glykoprotein (SGP-2, sulfated glycoprotein 2) beschrieben (Collard und Griswold 1987). Die Beobachtung, dass nach Kastration die sich zurückbildende Prostata männlicher Ratten einen stark erhöhten Gehalt an ApoJ-spezifischer mRNA aufweist, führte zu der Bezeichnung TRPM-2 (testosterone-repressed prostatic messenger 2) (Léger et al. 1987, Buttyan et al. 1989). In der Arbeitsgruppe Koch-Brandt wurde das als gp80 bezeichnete Apolipoprotein J als Markerprotein der konstitutiv apikalen Sekretion polarisierter MDCK-Zellen (Madin-Darby canine kidney) identifiziert (Kondor-Koch et al. 1985). Dieses Modellsystem eignete sich für die Untersuchung der Mechanismen der Proteinsortierung in polarisierten Epithelzellen (Urban et al. 1987, Parczyk und Koch-Brandt 1991, Pilarsky und Koch-Brandt 1992, Appel und Koch-Brandt 1994, Wagner et al. 1995, Lösch und Koch-Brandt 1995, Graichen et al. 1996). Die cDNA des als SP-40,40 bezeichneten humanen Homologs des ApoJ wurde 1989 kloniert (Kirszbaum et al. 1989). Eine anschließende funktionelle Charakterisierung zeigte, dass dieses Protein die Eigenschaft besitzt, eine komplementvermittelte Zellyse zu inhibieren, was dazu führte, dass ApoJ zudem unter der Bezeichnung CLI (complement lysis inhibitor) Eingang in die Literatur fand (Jenne und Tschopp 1989). Untersuchungen, die zum Großteil in der Arbeitsgruppe Harmony durchgeführt wurden, zeigten, dass dieses im Serum enthaltene Protein in der Lage ist, an das Apolipoprotein A-I zu binden und mit einer Unterklasse von High-Density-Lipoproteinen (HDL) assoziiert ist, was auf eine potentielle Funktion dieses Proteins im Lipoproteinmetabolismus hindeutet und letztendlich zu seiner Bezeichnung als Apolipoprotein J (ApoJ) führte (de Silva et al. 1990b, de Silva et al. 1990c, Stuart et al. 1992, Jenne et al. 1991).

1.1.1 Struktur des ApoJ-Gens

Das ApoJ-Gen liegt im haploiden humanen Genom in Form einer einzigen Kopie vor, die auf dem Chromosom 8 (8p21-p12) lokalisiert ist. Strukturanalysen des humanen ApoJ-Gens sowie der homologen Gene aus Ratte und Maus zeigen, dass es eine Gesamtgröße von etwa 16 Kilobasen besitzt und in 9 Exons unterteilt ist (Wong et al. 1993, Wong et al. 1994, P. Diel Dissertation). Exon I kodiert hierbei den 5'-untranslatierten Bereich der mRNA, die Exons II-IX den translatierten Bereich der reifen mRNA (Exon II: Signalpeptid, Exon II-V: α -Kette, Exon V-IX: β -Kette) (Abb 1.1.2). Das ebenfalls sequenzierte homologe Gen der Wachtel besitzt hingegen nur 8 Exons (Michel, D. et al.;

1995). Die Exon/Intron-Organisation sowie die relative Lage dieser Elemente zueinander ist in den Spezies Mensch, Maus und Ratte sehr ähnlich. Strukturelle sowie funktionelle Analysen des Promotorbereichs des ApoJ-Gens der Ratte zeigten, dass der 5'-flankierende untranskribierte Bereich dieses Gens neben einer TATAA-Box (relative Position zum Transkriptionsstart: -23) auch potentielle Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1 und SP1 besitzt. Zudem befinden sich weitere potentiell regulatorische Elemente wie beispielsweise AP-2-Bindestellen, GRE-Elemente (glucocorticoid/androgen-responsive element) oder CRE-Elemente (cAMP-responsive element) im Bereich des 1. Introns sowie des 1. Exons. Für eine maximale basale Expression von ApoJ scheint der Promotorbereich von Position -266 bis +54 (relativ zum Transkriptionsstart) notwendig zu sein, wobei 5'-flankierende Genbereiche (bis Position -1298) sowie 3'-flankierende Genbereiche (bis Position +1153) scheinbar regulatorische Elemente enthalten, welche die konstitutive basale Expression des Proteins negativ beeinflussen. Weiterhin weisen die Promotorbereiche des ApoJ-Gens von Mensch und Ratte einen hohen Grad an Homologie auf (Wong et al. 1993, Wong et al. 1994, Rosemblyt und Chen 1994, Rosemblyt et al. 1996). Studien, die unter anderem in der Arbeitsgruppe Koch-Brandt durchgeführt wurden, zeigen die Funktionalität des im Promotorbereich des ApoJ-Gens von Maus und Ratte lokalisierten AP-1-Motivs (Position -73 bis -79) als positiv-regulatorisches Element im Rahmen einer durch TGF- β , EGF (epidermal growth factor) und NGF (nerve growth factor) induzierten Expression des ApoJ-Gens. (Jin und Howe 1997, Gutacker et al. 1999). Als weitere positiv-regulatorische Sequenzen im 5'-untranskribierten Bereich des ApoJ-Gens wurden Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren NF1 (nuclear factor 1) und b-myb sowie ein in Vertebraten konserviertes CLE-Element (Clusterin-Element) beschrieben, das den Transkriptionsfaktor HSF1 (heat-shock factor 1) bindet und scheinbar essentiell für eine durch Hitzeschock induzierte Erhöhung der Transkriptionsrate des ApoJ-Gens ist (Furlong et al. 1996, Cervellera et al. 2000, Michel et al. 1997). Zudem scheint eine Assoziation des Transkriptionsfaktors CBF (core-binding factor) mit Enhancer-Elementen im 5'-untranskribierten Bereich (Position -426 bis -311) des ApoJ-Gens der Ratte notwendig für die hohe Basalexpression dieses Proteins in Sertolizellen zu sein (Lyman et al. 2000).

1.1.2 Struktur und Biosynthese des Apolipoprotein J

Nach paralleler Klonierung und Sequenzierung der ApoJ-cDNA verschiedener Spezies (Mensch, Maus, Ratte, Hund) wurde die Primärstruktur des Proteins aufgeklärt sowie dessen Biosynthese untersucht (Urban et al. 1987, Hartmann et al. 1991, de Silva et al. 1990a, de Silva et al. 1990c, Burkey et al. 1991). ApoJ ist ein sekretiertes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 75-80kDa, dessen Primärstruktur über die Speziesgrenzen hinweg stark konserviert ist. Unter Säugern ist die Aminosäuresequenz des ApoJ zu 70-80% identisch. Nach Transkription des ApoJ-Gens und Prozessierung der Vorläufer-mRNA entsteht eine reife mRNA von etwa 2kb Länge, die von Ribosomen translatiert wird, welche mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums assoziiert sind. Das synthetisierte Polypeptid besteht aus 449 Aminosäuren und besitzt im N-terminalen Bereich ein Signalpeptid (Aminosäure 1-22), welches die Translokation des entstehenden Polypep-

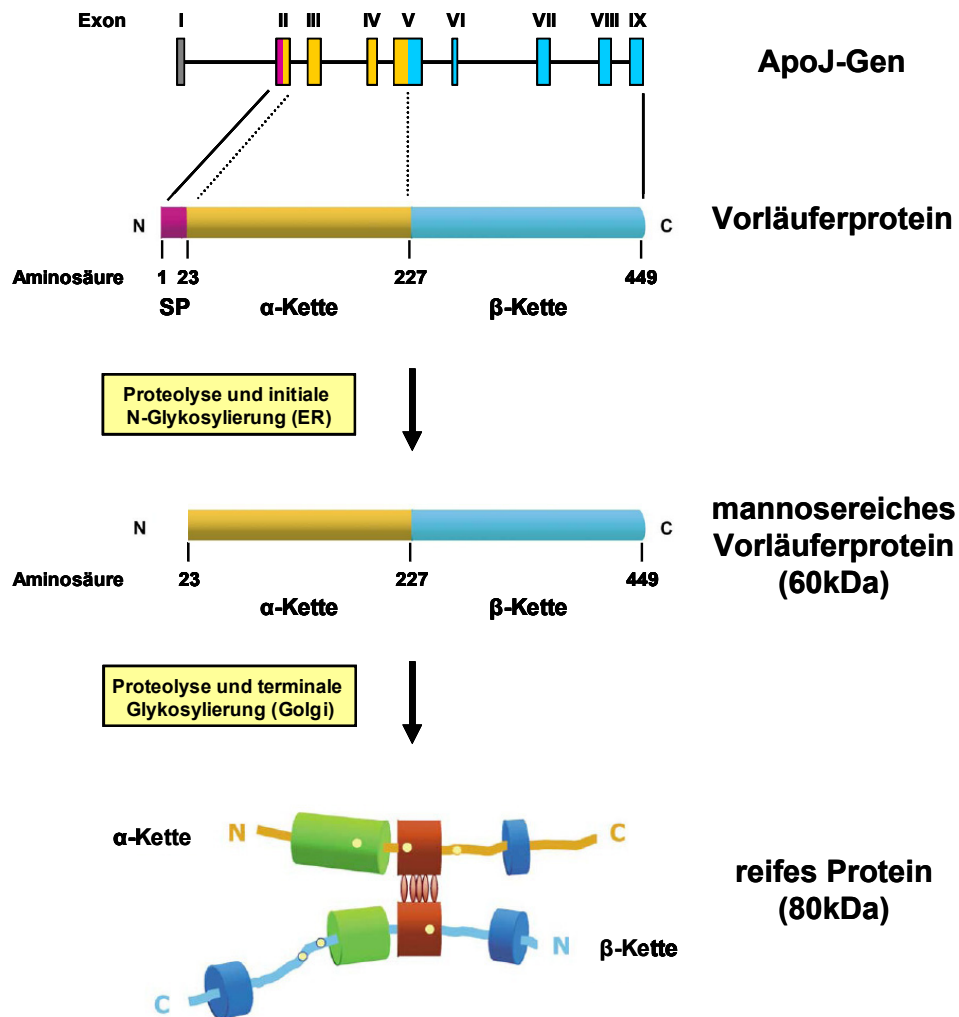


Abbildung 1.1.2: Biosynthese und Struktur von humanem ApoJ: Nach Transkription des ApoJ-Gens, welches aus 9 Exons zusammengesetzt ist, wird die entstehende mRNA in ein Vorläuferprotein translatiert, das aus 449 Aminosäuren besteht, ein N-terminales Signalpeptid (SP) enthält und während der Synthese in das endoplasmatische Retikulum (ER) transloziert. Das nach proteolytischer Abspaltung des Signalpeptids (Aminosäuren 1-22) und initialer N-Glykosylierung entstehende mannosereiche Vorläuferprotein (60kDa) wird anschließend in den Golgi-Komplex transportiert und unterliegt hier einer terminalen Glykosylierung. Durch Proteolyse der Peptidbindung zwischen den Aminosäuren 227 und 228 wird das Vorläuferprotein zudem in die beiden Untereinheiten (α -Kette, β -Kette) gespalten, die antiparallel angeordnet und durch 5 Disulfidbrücken (rote Ellipsen) zwischen den beiden cysteinreichen Domänen (rot) kovalent miteinander verknüpft sind. Das reife Protein wird schließlich als heterodimeres 80kDa Glykoprotein sekretiert. Weiterhin sind die Domänen dargestellt, die potentiell coiled-coil α -Helices (grün) sowie amphipathische α -Helices (blau) ausbilden. Die gelben Punkte markieren die jeweils auf beiden Untereinheiten vorhandenen drei N-Glykosylierungsstellen. (N: Aminoterminus, C: Carboxyterminus) (nach Jones und Jomary 2002)

tids in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums vermittelt. Nach proteolytischer Abspaltung des Signalpeptids sowie einer initialen N-Glykosylierung entsteht ein mannosereiches Vorläuferprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 60kDa. Nach Transport in den Golgi-Komplex erfolgt die terminale Glykosylierung sowie die proteolytische Spaltung der Peptidbindung zwischen den Aminosäuren 227 und 228. Die beiden entstehenden Untereinheiten werden als α -Kette bzw. β -Kette bezeichnet. Die α -Kette, welche von den Aminosäuren 23-227 gebildet wird, besitzt nach Glykosylierung ein Molekulargewicht von etwa 35kDa. Das Molekulargewicht der glykosylierten β -

Einleitung

Kette (Aminosäure 228-449) hingegen beträgt etwa 45kDa. Beide Untereinheiten sind antiparallel angeordnet und durch 5 Disulfidbrücken kovalent miteinander verknüpft. Die hieran beteiligten Cysteinreste sind gleichermaßen auf α - und β -Kette verteilt und jeweils in der zentralen Domäne beider Untereinheiten lokalisiert. Das reife Protein, dessen Molekulargewicht von 75-80kDa sich zu etwa 30% auf den Oligosaccharidanteil zurückführen lässt, wird schließlich als Heterodimer sekretiert. Beide Untereinheiten des reifen Proteins besitzen jeweils eine Domäne, die potentiell coiled-coil α -Helices ausbildet. Weiterhin sind im C-terminalen Bereich der α -Kette sowie im C-terminalen und N-terminalen Bereich der β -Kette Domänen enthalten, die potentiell amphipathische α -Helices ausbilden (Abb. 1.1.2). Darüber hinaus wurden eine mögliche dinukleotid- sowie eine heparinbindende Domäne beschrieben (Tsuruta et al. 1990, Pankhurst et al. 1998).

Einige Studien weisen darauf hin, dass neben der dominanten sekretierten Form des ApoJ (80kDa) auch intrazelluläre Isoformen dieses Proteins existieren. Es gibt Hinweise darauf, dass diese Isoformen von geringen Mengen einer alternativ gespleißten mRNA abstammen, welche gegenüber der dominanten mRNA-Form (2kb) um das Exon II (125bp), welches die für das Signalpeptid kodierende Nukleotidsequenz enthält, verkürzt ist. Unter Verwendung eines im 5'-Bereich des Exon III lokalisierten alternativen Startcodons werden scheinbar geringe Mengen eines zytoplasmatischen Vorläuferproteins (49kDa) synthetisiert, das weder einer N-Glykosylierung unterliegt noch proteolytisch in α - und β -Kette gespalten wird. Werden Zellen hohen Dosen ionisierender Strahlung ausgesetzt, scheint dieses Vorläuferprotein posttranslationell modifiziert und in reifer Form (55kDa) in den Nukleus zu translozieren. Bei diesem Vorgang scheinen im C-terminalen Bereich sowie in der N-terminalen coiled-coil-Domäne des Proteins enthaltene potentielle nukleäre Lokalisationssignale eine Rolle zu spielen. Gegenüber der dominanten sekretierten 80kDa Form des ApoJ, welche zytoprotektive Eigenschaften aufweist, besitzt diese unterrepräsentierte nukleäre Isoform zytotoxische Wirkung (Yang et al. 2000, Leskov et al. 2003).

1.1.3 Expression von Apolipoprotein J

ApoJ ist Bestandteil nahezu aller Körperflüssigkeiten und ist unter anderem im Urin, dem Samen, der Muttermilch, der zerebrospinalen Flüssigkeit sowie dem Plasma vorhanden (Jenne und Tschopp 1989, Watts et al. 1990, de Silva et al. 1990c, O'Bryan et al 1990). Das in einer Konzentration von etwa 50-150 μ g/ml im Serum vorliegende ApoJ ist zum Teil an das Apolipoprotein A-I gebunden sowie mit einer Unterklasse von HDL-Lipoproteinen assoziiert (Choi et al. 1990, Jenne et al. 1991, de Silva et al. 1990b, de Silva et al. 1990c, Stuart et al. 1992). Zudem ist ApoJ Bestandteil aller in der zerebrospinalen Flüssigkeit vorkommender Lipoproteinklassen (Koch et al. 2001). Mittels Northern-Blot durchgeführte Expressionsanalysen zeigten, dass ApoJ unter physiologischen Bedingungen in vielen verschiedenen Geweben der Maus konstitutiv exprimiert wird, wobei Gehirn, Ovarien, Testes, Leber, Magen sowie die Nebenniere relativ hohe Mengen an ApoJ-spezifischer mRNA enthalten. Ein geringeres Expressionsniveau weisen Niere, Herz, Milz, Lunge, Uterus, Prostata, Knochen und Thymus auf. T-Lymphozyten hingegen exprimieren kein ApoJ (de Silva et al. 1990a, French et al. 1993, Jordan-Starck et al. 1994). Nähere Untersuchungen mit Hilfe von *in situ*-

Hybridisierungen zeigten weiterhin, dass ApoJ in vielen Organen ein heterogenes Expressionsmuster aufweist und nur von bestimmten Zelltypen exprimiert wird. So ist beispielsweise im Herz die konstitutive Expression dieses Proteins auf das Atrium beschränkt. Im ventrikulären Myokard hingegen ist unter physiologischen Bedingungen keine ApoJ-mRNA nachweisbar (Aronow et al. 1993, Swertfeger et al. 1996). Im Gehirn wird ApoJ ausschließlich von Astrozyten sowie einigen Neuronen bestimmter Gehirnbereiche, nicht jedoch von Mikrogliazellen exprimiert (Pasinetti et al. 1994). Zudem ist in vielen Organen ein hohes konstitutives Expressionsniveau oft auf Epithelien, wie z.B. den Epithelzellen der distalen Nierentubuli oder den Sertolizellen der Testes, beschränkt (Aronow et al. 1993).

Während der Embryogenese unterliegt die Expression dieses Proteins einer organspezifischen Regulation. In der Maus lässt sich die Expression von ApoJ-mRNA ab einem Entwicklungsstadium von 12,5 Tagen in der Leber, den Testes, der Lunge sowie den Augen nachweisen. Nach 16,5 Tagen ist eine Expression ApoJ-spezifischer mRNA auch in den sich entwickelnden Nieren, dem Gehirn und der Haut detektierbar. Im Verlauf der Organentwicklung ist die stärkste Expression oft auf differenzierende und proliferierende Epithelien, wie beispielsweise den Epithelien der Nierentubuli oder der Bronchien, beschränkt. Während im weiteren Verlauf der Embryogenese das Expressionsniveau von ApoJ in den meisten Organen konstant bleibt, weist das Lungengewebe eine transiente Expression dieses Proteins auf. Nach 16,5 Tagen nimmt der ApoJ-mRNA-Gehalt der Bronchien sukzessive ab, was dazu führt, dass Lungen 18,5 Tage alter Embryonen sowie adulter Mäuse ApoJ nur in vergleichsweise geringen Mengen exprimieren (French et al. 1993). Eine ähnliche Regulation der ApoJ-Expression lässt sich während der Embryogenese im Pankreas der Ratte beobachten. Während im Pankreasgewebe 19 Tage alter Föten ApoJ-spezifische mRNA in relativ großen Mengen vorhanden ist, nimmt das Expressionsniveau dieses Proteins postnatal ab. Im Pankreas adulter Tiere ist unter physiologischen Bedingungen eine Expression von ApoJ-mRNA schließlich nicht mehr detektierbar (Calvo et al. 1998).

In einer Vielzahl verschiedener Gewebe ist ein stark erhöhtes Expressionsniveau von ApoJ mit pathophysiologischen Prozessen assoziiert. Ursprünglich wurde angenommen, dass ApoJ von apoptotischen Zellen exprimiert wird und eine Funktion im Rahmen apoptotischer Mechanismen besitzt. Später stellte sich jedoch heraus, dass ApoJ kein aktiver Bestandteil apoptotischer Mechanismen ist und eine Erhöhung der ApoJ-Genaktivität nicht in apoptotischen Zellen stattfindet, sondern vielmehr auf die vitalen Zellen des umliegenden Gewebes beschränkt ist (Pilarsky et al. 1993, French et al. 1992, French et al. 1994a, French et al. 1994b).

Ein erhöhter Gehalt an ApoJ-spezifischer mRNA wurde unter anderem in den Gehirnen von Patienten mit Morbus Alzheimer beschrieben (May et al. 1990, Lidstrom et al. 1998). ApoJ kolokalisiert hierbei mit amyloiden Plaques, ist in der zerebrospinalen Flüssigkeit mit der löslichen Form des β -Amyloid-Peptids (A β) assoziiert und ist am rezeptorvermittelten Transport von ApoJ/ β -Amyloid-Peptid-Komplexen über die Blut-Hirn-Schranke beteiligt (McGeer et al. 1992, Choi-Miura et al. 1992, Ghiso et al. 1993, Zlokovic et al. 1996, Calero et al. 2000). Untersuchungen an einem Tiermodell ApoJ-defizienter Mäuse zeigten, dass dieses Protein *in vivo* die extrazelluläre

Einleitung

Aggregation von β -Amyloid-Peptiden beeinflusst und zu einer Anhäufung fibrillärer A β -Ablagerungen führt und somit die neurotoxischen Eigenschaften amyloider Plaques erhöht (DeMattos et al. 2002). Eine erhöhte ApoJ-Expression ist auch mit verschiedenen Formen übertragbarer spongiformer Enzephalopathien (transmissible spongiform encephalopathy, TSE) assoziiert. Ein erhöhter Gehalt an ApoJ-spezifischer mRNA wurde postmortal im zerebralen Kortex und dem Cerebellum von Patienten mit einer Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung beschrieben. ApoJ ist hierbei in den Plaques lokalisiert und mit Aggregaten der proteaseresistenten Form des Prion-Proteins komplexiert (Freixes et al. 2004). Eine vermehrte Expression von ApoJ-mRNA wurde zudem in mehreren Tiermodellen von BSE (bovine spongiform encephalopathy) und Scrapie beschrieben, wobei nahezu ausschließlich reaktive Astrozyten dieses Protein in erhöhtem Maße synthetisieren (Duguid et al 1989, Sasaki et al. 2002, Brown et al. 2004). Eine von Kempster et al. veröffentlichte Studie zeigt in diesem Zusammenhang an einem BSE-Modell unter Verwendung ApoJ-defizienter Mäuse, dass dieses Protein *in vivo*, ähnlich wie bei Morbus Alzheimer, die Bildung von Plaques fördert, indem es die extrazelluläre Aggregation des Prion-Proteins positiv beeinflusst und somit die Pathogenese beschleunigt (Kempster et al. 2004). Eine Induktion der ApoJ-Genexpression wurde zudem im Rahmen weiterer neurodegenerativer Erkrankungen wie multipler Sklerose, AIDS Enzephalitis, Epilepsie, Retinitis Pigmentosa sowie verschiedener akuter Neuropathien beschrieben (Wu et al 1993, Jones et al. 1992, Danik et al. 1991, Polihronis et al 1993). Eine mechanische Verletzung von neuronalem Gewebe wie Rückenmark, optischem Nerv und Gehirn hat ebenso eine Induktion der ApoJ-Synthese zur Folge wie eine durch Hypoxie induzierte Schädigung des Gehirns in unterschiedlichsten Modellen zerebraler Ischämie. Die sekretierte 80kDa-Form dieses Proteins ist hierbei oft mit abgestorbenen bzw. sterbenden Neuronen assoziiert, wobei sich die lokale Synthese von ApoJ in erster Linie auf reaktive Astrozyten beschränkt (Bonnard et al. 1997, Klimaschewski et al. 2001, Ohlsson et al. 2003, Bellander et al. 2001, Gwon et al. 2004, May et al. 1992, Wiessner et al. 1993, Kida et al. 1995, Walton et al. 1996, Yamashita et al. 1996, Van Beek et al. 2000, Wehrli et al. 2001, Wiggins et al. 2003). Wie im Tiermodell gezeigt werden konnte, ist die Anzahl sterbender Zellen als Folge einer permanenten fokalen zerebralen Ischämie im geschädigten Gehirnbereich transgener Mäuse reduziert, welche konstitutiv humanes ApoJ exprimieren. Dies zeigt, dass ApoJ *in vivo* im Rahmen einer durch Hypoxie induzierten zerebralen Verletzung neuroprotektive Eigenschaften besitzt (Wehrli et al. 2001).

In Myozyten des ventrikulären Herzmuskels ist unter physiologischen Bedingungen keine Expression von ApoJ nachweisbar. Im Tiermodell konnte jedoch gezeigt werden, dass die ApoJ-Genexpression dieser Zellen im Rahmen einer autoimmunen oder viralen Myokarditis sowie als Folge einer lokalen Ischämie induziert wird. Hierbei ist eine vermehrte Synthese von ApoJ-mRNA vor allem im peripheren Infarktbereich sowie im Bereich entzündlicher Läsionen zu finden (Swertfeger et al. 1996, Silkensen et al. 1998, McLaughlin et al. 2000). Ein erhöhter Gehalt an ApoJ wurde auch in myokardialen Läsionen von Patienten beschrieben, die einem Herzinfarkt erlagen (Väkevä et al. 1993). In diesem Zusammenhang konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass in ApoJ-defizienten Mäusen die im Rahmen einer autoimmunen Myokarditis auftretenden inflammatorischen Läsionen

sowie die hiermit zusammenhängenden Gewebeschäden deutlich stärker ausgeprägt sind als in Wildtypmäusen. Dies zeigt deutlich, dass ApoJ in entzündeten Geweben antiinflammatorische bzw. zellschützende Eigenschaften besitzt (McLaughlin et al. 2000). ApoJ wird auch vermehrt in atherosklerotischen Plaques gefunden, wobei scheinbar eine lokale Synthese durch glatte Gefäßmuskelzellen der Intima und Media zusätzlich zu dem aus dem Serum stammenden ApoJ die Konzentration dieses Proteins in entsprechenden Läsionen erhöht (Jordan-Starck et al. 1994, Ishikawa et al. 1998). Darüber hinaus lässt sich die ApoJ-Genexpression glatter Gefäßmuskelzellen durch eine mechanische Verletzung der Aorta (Ballondilatation) induzieren (Miyata et al. 2001).

In Ratten ist eine erhöhte Expression dieses Proteins in der nach Kastration degenerierenden Prostata zu beobachten (Léger et al. 1987, Buttyan et al. 1989). Im Pankreas wurde eine Induktion der ApoJ-Genexpression als Folge einer durch Streptozotizin induzierten Schädigung der β -Zellen sowie im Verlauf einer akuten sowie chronischen Pankreatitis beschrieben (Park et al. 1999, Calvo et al. 1998, Xie et al. 2001). Ebenso resultiert eine chemische Induktion nekrotischer Gewebeschäden in der Leber in einer lokalen Expression ApoJ-spezifischer mRNA (Bursch et al. 1995). Eine Schädigung der Niere durch Cisplatin und Glycerin, durch unilaterale Obstruktion des Harnleiters, als Folge einer induzierten Entzündungsreaktion (Nephritis) sowie einer transienten Ischämie führt vor allem in Tubulusepithelzellen zu einer vermehrten Expression dieses Proteins (Nath et al. 1994, Sawczuk et al. 1989, Silkensen et al. 1997, Yamada et al. 2001, Rosenberg und Paller 1991, Correa-Rotter et al. 1992, Witzgall et al. 1994, Yoshida et al. 2002). Weiterhin wurde eine erhöhte ApoJ-Genexpression auch in transplantierten Nieren und der Leber beschrieben. Hierbei scheint eine Induktion der ApoJ-Genexpression vor allem während der akuten Phase der Abstoßungsreaktion zu erfolgen (Dvergsten et al. 1994, Chiang et al. 2000).

Eine erhöhte Expression von ApoJ wurde auch in einer Vielzahl verschiedener Tumoren beschrieben. Unter anderem weisen Karzinome der Gebärmutter, der Brustdrüsen, der Prostata, der Harnblase, des Pankreas, der Leber sowie der Ovarien ein hohes Expressionsniveau dieses Proteins auf (Rosenberg und Silkensen 1995, Redondo et al. 2000, Steinberg et al. 1997, Kang et al. 2004, Miyake et al. 2002, Xie et al. 2002, Hough et al. 2000). Zudem ist ApoJ auch in Karzinomen sowie Klarzelltumoren der Niere, humanen Gliomen, murinen und humanen intestinalen Neoplasien sowie bestimmten Lymphomen überexprimiert (Dvergsten et al. 1994, Parczyk et al. 1994, Danik et al. 1991, Chen et al. 2003, Wellmann et al. 2000).

Zusammenfassend zeigt sich, dass ApoJ in einer Vielzahl verschiedener Organe, insbesondere von Epithelien, konstitutiv exprimiert wird und unter pathophysiologischen Bedingungen in nahezu allen Geweben induziert werden kann. Die molekularen Mechanismen, die der Regulation der ApoJ-Genexpression in degenerierenden Geweben zugrunde liegen, sind jedoch weitestgehend unklar. Eine Vielzahl *in vitro* kultivierter Zellen weisen ein stark erhöhtes ApoJ-Expressionsniveau auf, wenn diese zellulärem Stress ausgesetzt sind. Bislang konnte gezeigt werden, dass eine Bestrahlung mit ultraviolettem Licht (UVA, UVB), ionisierende Strahlung, erhöhte Temperaturen (Hitzeschock), oxidativer Stress (Wasserstoffperoxid, Superoxidanion, tert-Butylhydroperoxid), die Inkubation mit zytotoxischen Substanzen wie Cisplatin, Ceramid, Staurosporin und Cycloheximid sowie Scherkräfte

die zelluläre Expression dieses Proteins induzieren (Viard et al. 1999, Calvo et al. 1998, Dumont et al. 2000, Fripiat et al. 2001, Debacq-Chainiaux et al. 2005, Michel et al. 1997, Criswell et al. 2005, Yamanaka et al. 2005a, Kalka et al. 2000, Lee et al. 2002, Chung et al. 2004, Urbich et al. 2000, Clark und Griswold 1997). Dies deutet darauf hin, dass in degenerierenden Geweben entstehende reaktive Sauerstoffverbindungen oder zytotoxische Substanzen an einer lokalen Induktion der ApoJ-Genexpression beteiligt sein könnten. Weiterhin wäre denkbar, dass inflammatorische Mediatoren zu einer verstärkten Expression dieses Proteins in entzündeten Geweben beitragen. Wie bereits beschrieben wurde, induziert die Inkubation mit TNF- α , IL-1 β , IL-6 oder Lipopolysaccharid (LPS) *in vitro* eine vermehrte Expression von ApoJ in kultivierten Fibroblasten, Endothelzellen, Hepatozyten, Gliazellen und Astrozyten (Kyprianou et al. 1991, Zwain et al. 1994, Berge et al. 1997, LaDu et al. 2000, Van Lenten et al. 2001a, Li et al. 2002, Saura et al. 2003, Patel et al. 2004). Darüber hinaus führt die systemische Verabreichung von TNF- α , IL-1 β und LPS in verschiedenen Geweben des Hamsters zu einer vermehrten Expression dieses Proteins (Hardardottir et al. 1994, Hardardottir et al. 1997). Arbeiten unserer Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass in verletzten Geweben auch Bestandteile absterbender bzw. abgestorbener Zellen eine erhöhte ApoJ-Genexpression umliegender vitaler Zellen induzieren. So zeigten Untersuchungen *in vitro*, dass eine Inkubation mit nekrotischem Zellmaterial zu einem Anstieg des ApoJ-mRNA-Gehaltes in kultivierter Fibroblastenzelllinien führt (Bach et al. 2001). Unklar ist in diesem Fall jedoch, welche Mechanismen die ApoJ-induzierende Wirkung nekrotischer Zellen vermitteln. Da abhängig von den Kulturbedingungen eine Inkubation mit phosphatidylserin- und phosphatidsäurehaltigen Liposomen und Lysophosphatidsäure ebenfalls eine Akkumulation von ApoJ-mRNA in embryonalen Fibroblasten der Zelllinie Rat1 induziert, liegt die Vermutung nahe, dass in Membranfragmenten nekrotischer Zellen enthaltene Phospholipide an der Regulation der ApoJ-Genexpression beteiligt sind (Bach et al. 2001, M. Baiersdörfer Diplomarbeit).

1.1.4 Potentielle Funktionen von Apolipoprotein J

Apolipoprotein J ist als multifunktionelles Glykoprotein mit zytoprotektiven, antiapoptotischen, antiinflammatorischen sowie antioxidativen Eigenschaften beschrieben. Bislang konnte eine klar definierte physiologische Funktion dieses Proteins jedoch nicht identifiziert werden.

Eine Reihe unabhängiger Studien zeigt, dass ApoJ *in vitro* die Fähigkeit besitzt, einer durch zellulären Stress induzierten Initiation apoptotischer Prozesse entgegenzuwirken. Durch Transfektion mit ApoJ-spezifischen Antisense-cDNA-Konstrukten sowie ApoJ-spezifischen siRNAs konnte an verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden, dass eine verminderte Expression dieses Proteins die zellschädigende Wirkung toxischer Substanzen wie Cisplatin, Doxorubicin und Wasserstoffperoxid sowie eines Hitzeschocks und ionisierender Strahlung verstärkt (Viard et al. 1999, Trougakos et al. 2004, Lee et al. 2002, Chung et al. 2004, Yamanaka et al. 2005a). Eine Überexpression von ApoJ in humanen Fibroblasten führt hingegen zu einer verminderten Apoptoserate dieser Zellen bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht (UVB) sowie bei Inkubation mit Wasserstoffperoxid, tert-Butylhydroperoxid und Ethanol (Dumont et al. 2002, Debacq-Chainiaux et

al. 2005). Zudem konnte gezeigt werden, dass extrazelluläres ApoJ einem durch oxidativen Stress induzierten Zelltod *in vitro* kultivierter Nierentubulusepithelzellen (LLC-PK1) entgegenwirkt (Schwochau et al. 1998). Weiterhin wurde beschrieben, dass extrazelluläres ApoJ in dosisabhängiger Weise humane Prostatakarzinomazellen (PC3, LNCaP) sowie murine Fibroblasten (L929) vor der zytotoxischen Wirkung von TNF- α schützt (Sensibar et al. 1995, Sintich et al. 1999, Humphreys et al. 1997). Die molekularen Mechanismen, die unter den beschriebenen Bedingungen die zytoprotektiven Eigenschaften von ApoJ vermitteln, sind bislang nicht bekannt.

Da ApoJ unter physiologischen Bedingungen vor allem in vielen Epithelien eine hohe konstitutive Expression aufweist und während der Embryogenese insbesondere von differenzierenden Epithelien exprimiert wird, lässt vermuten, dass dieses Protein eine Funktion im Rahmen epithelialer Differenzierungsprozesse besitzt und zugleich eine schützende Wirkung auf terminal differenzierte Epithelzellen ausübt, die potentiell zellschädigenden Körperflüssigkeiten (Magensäure, Harn) ausgesetzt sind. Die Assoziation von ApoJ mit HDL-Lipoproteinen im Serum und der zerebrospinalen Flüssigkeit könnte weiterhin auf eine Funktion im Lipoproteinmetabolismus hindeuten. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass extrazelluläres ApoJ, ähnlich wie das Apolipoprotein A-I, in der Lage ist, zu Schaumzellen differenzierten Makrophagen überschüssiges Cholesterin zu entziehen, was eine potentielle Funktion von ApoJ im reversen Cholesterintransport vermuten lässt (Gelissen et al. 1998).

Nach Generierung ApoJ-defizienter Mäuse durch zielgerichtete Inaktivierung des ApoJ-Gens (*apoJ*^{-/-} Mäuse) war es möglich, physiologische Funktionen dieses Proteins am Tiermodell zu untersuchen. Es zeigte sich, dass die Embryogenese dieser transgenen Mäuse normal verläuft und adulte Tiere unter physiologischen Bedingungen keinen signifikanten Phänotyp aufweisen, was darauf hindeutet, dass ApoJ keine essentielle Funktion in der Embryonalentwicklung sowie dem Lipoproteinmetabolismus besitzt (McLaughlin et al. 2000). Weiterführende Untersuchungen an diesem Tiermodell zeigten jedoch, dass dieses Protein in der Lage ist, die Pathogenese gewebedegenerativer Erkrankungen zu beeinflussen. Im Vergleich zum Wildtyp weisen ApoJ-defiziente Mäuse in einem Modell einer autoimmunen Myokarditis deutlich stärkere Gewebeschäden des Herzmuskels auf, was auf eine stärkere Extension inflammatorischer Läsionen zurückzuführen ist. Zudem verläuft nach Rückgang der akuten Entzündungsreaktion die Regeneration des geschädigten Myokards in Abwesenheit von ApoJ unvollständig, was zu einer Herzmuskelinsuffizienz ApoJ-defizienter Mäuse als Spätfolge einer Myokarditis führt (McLaughlin et al. 2000). Dies zeigt, dass ApoJ eine Funktion in der Limitierung der Gewebeschädigung im Rahmen lokaler Entzündungsreaktionen sowie in geweberegenerativen Prozessen besitzt. In zwei unterschiedlichen Modellen neurodegenerativer Erkrankungen weisen ApoJ-defiziente Mäuse hingegen eine weniger stark ausgeprägte Pathogenese auf. Es konnte gezeigt werden, dass ApoJ-defiziente Mäuse in einem Modell der Alzheimer Erkrankung weniger starke neuritische Dystrophien aufweisen als entsprechende Wildtypmäuse. Das lässt sich darauf zurückführen, dass ApoJ die extrazelluläre Aggregation des β -Amyloid-Peptids beeinflusst und zu einer Anhäufung fibrillärer A β -Ablagerungen führt und somit die neurotoxischen Eigenschaften amyloider Plaques erhöht

Einleitung

(DeMattos et al. 2002). Weiterhin scheint in einem Mausmodell einer bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) die Komplexierung von ApoJ mit Aggregaten der proteaseresistenten Form des Prion-Proteins der Grund für eine, im Vergleich zu ApoJ-defizienten Mäusen, beschleunigte Pathogenese im Wildtyp zu sein (Kempster et al. 2004). An dem Modell einer permanenten fokalen zerebralen Ischämie konnte hingegen gezeigt werden, dass transgene Mäuse, die konstitutiv humanes ApoJ exprimieren, im Vergleich zu Wildtyp- sowie ApoJ-defizienten Mäusen eine deutlich verringerte Anzahl absterbender Zellen in dem geschädigten Gehirnbereich aufweisen. Dies zeigt, dass ApoJ *in vivo* im Rahmen einer durch Hypoxie induzierten zerebralen Entzündungsreaktion neuroprotektive Eigenschaften besitzt (Wehrli et al. 2001). Eine weitere Studie beschreibt, dass ApoJ-defiziente Mäuse mit zunehmendem Alter eine progressive Glomerulopathie entwickeln. Diese Erkrankung ist durch eine Anhäufung von Immunkomplexen, bestehend aus Immunglobulinen (IgG, IgM, IgA) und Proteinen des Komplementsystems (C1q, C3, C9), im Bindegewebe der Nierenglomeruli gekennzeichnet, was zu einer Schädigung dieser Glomeruli führt. Wildtypmäuse hingegen weisen keine solchen Ablagerungen von Immunkomplexen und als Folge hiervon keine Nierenschädigungen auf (Rosenberg et al 2002). Zusammenfassend deuten die in dieser Studie veröffentlichten Daten darauf hin, dass ApoJ an der Entsorgung von Immunkomplexen beteiligt sein könnte.

Die molekularen Mechanismen, welche den *in vivo* beschriebenen Eigenschaften von ApoJ zugrunde liegen, sind bislang nicht bekannt. Eine Reihe postulierter Funktionen dieses Proteins, welche auf *in vitro* Untersuchungen basieren, könnten hierfür mögliche Erklärungsansätze liefern. Vieler dieser potentiellen Funktionen scheinen auf die Eigenschaft von ApoJ zurückzuführen sein, über amphipathische α -Helices mit einer Vielzahl verschiedener hydrophober Moleküle zu interagieren (Wilson und Easterbrook-Smith, 2000).

Es konnte gezeigt werden, dass ApoJ in der Lage ist, einer komplementvermittelten Hämolyse entgegenzuwirken, indem es die Ausbildung des membranangreifenden Komplexes (MAC) auf Zelloberflächen verhindert. Diese Inhibierung erfolgt auf Ebene der terminalen Komplementkomponenten, wobei zum einen die Bindung von ApoJ an die Proteinkomplexe C5b-8 und C5b-9 eine Anlagerung und Polymerisierung weiterer C9-Moleküle und somit die Entstehung des porenbildenden Komplexes verhindert. Zum anderen inhibiert die Bindung von ApoJ an den Proteinkomplex C5b-7 dessen Anlagerung an zelluläre Plasmamembranen, was dazu führt, dass der entstehende Proteinkomplex (sC5b-9) in Lösung verbleibt (Murphy et al. 1989b, Jenne und Tschopp 1989, Tschopp et al. 1993, McDonald und Nelsestuen 1997). Weiterhin bindet ApoJ eine Reihe verschiedener Immunglobuline, insbesondere aggregiertes IgG (Wilson und Easterbrook-Smith 1992). Aufgrund dieser Eigenschaften könnte ApoJ somit unter pathophysiologischen Bedingungen einer komplementvermittelten Lyse vitaler Zellen entgegenwirken. Unterstützt wird diese Hypothese zum einen dadurch, dass ApoJ im Rahmen einer Glomerulonephritis sowie eines myokardialen Infarkts mit Immunkomplexen assoziiert, Bestandteil des löslichen membranangreifenden Komplementkomplexes ist sowie mit terminalen Komplementkomponenten auf der Plasmamembran beschädigter Zellen kolokalisiert (Murphy et al. 1988, Murphy et al. 1989a, Väkevä et al. 1993). Zum

anderen konnte in einem Modell der Heymann Nephritis an isolierten Nieren der Ratte gezeigt werden, dass, verglichen mit normalem Serum, eine Perfusion mit ApoJ-defizientem Serum zu einer vermehrten Ablagerung von Komplementkomponenten im Bereich der Glomeruli führt, was parallel mit einer gesteigerten Proteinurie sowie einer stärkeren Schädigung der Glomeruli einhergeht (Saunders et al. 1994).

Weiterhin könnte eine Inhibierung der Protease MT6-MMP/MMP-25 durch ApoJ die zytoprotektiven Eigenschaften dieses Proteins im Rahmen gewebedegenerativer Prozesse erklären. MT6-MMP/MMP-25 ist ein membranständiges glykosylphosphatidylinositol- (GPI-) verankertes Mitglied der Matrix-Metalloproteinase-Familie, das nahezu ausschließlich von neutrophilen Granulozyten exprimiert wird und als Folge einer Aktivierung dieser Zellen in löslicher Form in das extrazelluläre Milieu freigesetzt wird. Dieses Enzym ist vor allem am Abbau extrazellulärer Matrixproteine beteiligt und scheint eine wichtige Rolle bei der Migration neutrophiler Granulozyten zu Entzündungsherden zu spielen. In inflammatorischen Läsionen jedoch, wo eine Akkumulation dieser Zellen stattfindet, könnte eine erhöhte Konzentration dieses Enzyms zur Entstehung lokaler Gewebeschäden beitragen. Dass ApoJ die Eigenschaft besitzt, an diese Protease zu binden und die entstehenden stabilen Proteinkomplexe katalytisch inaktiv sind, könnte auf eine potentielle Funktion von ApoJ in der lokalen Regulation der enzymatischen Aktivität von MT6-MMP/MMP-25 im Bereich entzündlicher Läsionen hindeuten (Matsuda et al. 2003).

Eine andere Funktion von ApoJ könnte in der Inhibierung einer NF- κ B-abhängigen Genexpression liegen. Mit Hilfe NF- κ B-abhängiger Reporterplasmide konnte gezeigt werden, dass aus ApoJ-defizienten Mäusen stammende primäre Fibroblasten ein deutlich erhöhtes Niveau an konstitutiv aktivem NF- κ B aufweisen. Durch rekombinante Expression von ApoJ war es möglich, die basale NF- κ B-Aktivität zu reduzieren, einer durch TNF- α und Doxorubicin induzierten Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors entgegenzuwirken und eine durch TNF- α -induzierte NF- κ B-abhängige Genexpression zu inhibieren (Santilli et al. 2003). Ob hierbei die intrazelluläre oder die sekretierte extrazelluläre Isoform von ApoJ die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors beeinflusst, ist unklar. Aufgrund der zentralen Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B in inflammatorischen Prozessen sowie der Aktivierung von Immunzellen könnte eine Inhibierung der NF- κ B-Aktivität durch ApoJ einer übermäßigen Aktivierung lokaler Immunreaktionen entgegenwirken und auf diese Weise eine übermäßige Schädigung von intaktem Gewebe verhindern.

Weiterhin wurde ApoJ als extrazelluläres Chaperon beschrieben. Studien der Arbeitsgruppe Wilson zeigen, dass ApoJ ähnliche Eigenschaften wie kleine intrazelluläre Hitzeschockproteine aufweist. Es ist in der Lage, hydrophobe Domänen in partiell denaturierten Proteinen zu binden und mit diesen stabile lösliche hochmolekulare Komplexe zu bilden. Zum einen verhindert ApoJ somit die Präzipitation dieser denaturierten Proteine und zum anderen stabilisiert es diese in einem Stadium, das eine ATP-abhängige Rückfaltung in die native Konformation ermöglicht. (Humphreys et al. 1999, Poon et al. 2000, Wilson und Easterbrook-Smith, 2000, Poon et al. 2002a, Poon et al. 2002b). In seiner potentiellen Funktion als Chaperon könnte ApoJ somit in verletzten Geweben beispielsweise

der extrazellulären Aggregation aus nekrotischen Zellen freigesetzter denaturierender Proteine entgegenwirken.

Bereits veröffentlichte sowie aktuelle Daten unserer Gruppe zeigen in diesem Zusammenhang, dass in Gegenwart von ApoJ bei einer Reihe verschiedener *in vitro* kultivierter Zelllinien eine vermehrte LRP- und Megalin-abhängige Endozytose von extrazellulären partiell denaturierten zytosolischen Proteinen und Fragmenten nekrotischer Zellen zu beobachten ist. Zudem verstärkt nekrotisches Zellmaterial in ähnlicher Weise die rezeptorvermittelte Endozytose von ApoJ (Bartl et al. 2001, O. Bergner unveröffentlicht). Dies deutet darauf hin, dass ApoJ nach Bindung an denaturierte Proteine und Membranfragmente nekrotischer Zellen deren Endozytose durch ApoJ-bindende Rezeptoren aus der LDL-Rezeptorfamilie (LRP, Megalin) vermittelt und auf diese Weise die Entsorgung von nekrotischem Zellmaterial durch Gewebezellen fördert.

Zusammenfassend könnten die schützende Wirkung vor toxischen Einflüssen reaktiver Sauerstoffstoffverbindungen und inflammatorischer Zytokine, die Inhibierung einer komplementvermittelten Zellyse, die Inhibierung einer NF- κ B-abhängigen Genexpression im Rahmen inflammatorischer Prozesse, eine potentielle Funktion als Proteaseinhibitor sowie eine Beteiligung an der Entsorgung von Immunkomplexen und nekrotischem Zellmaterial die *in vivo* beschriebenen antiinflammatorischen und zytoprotektiven Eigenschaften von ApoJ in degenerierenden Geweben erklären. Die Fähigkeit von ApoJ, mit dem β -Amyloid-Peptid und dem Prion-Protein zu interagieren sowie deren extrazelluläre Aggregation und neurotoxische Eigenschaften zu modulieren, führt im Verlauf der Alzheimererkrankung und spongiformer Enzephalopathien hingegen zu einer Beschleunigung neurodegenerativer Prozesse.

1.2. Die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLR)

1.2.1 Struktur von Toll-like Rezeptoren

Die Entdeckung der Toll-like Rezeptorfamilie begann mit der Identifizierung des Toll-Proteins, das während der Embryogenese von *Drosophila* eine essentielle Rolle in der dorsoventralen Polarisierung spielt und in adulten Tieren als Bestandteil des angeborenen Immunsystems für eine effektive Abwehr von Pilzinfektionen notwendig ist (Hashimoto et al. 1988, Lemaitre et al. 1996). Bislang konnten in Säugern 11 Proteine identifiziert werden, die aufgrund ihrer Homologie zu dem in *Drosophila* exprimierten Toll-Protein als Toll-ähnliche Rezeptoren bzw. Toll-like Rezeptoren (TLR) bezeichnet werden. Diese evolutionär konservierten Rezeptoren stellen integrale Membranglykoproteine des Typs I dar und besitzen ein Molekulargewicht von etwa 90-120 kDa. Toll-like Rezeptoren werden mit der Familie der Interleukin-1-Rezeptoren (IL-1R) zur TLR/IL-1R-Superfamilie zusammengefasst. Grund hierfür ist ein in den zytoplasmatischen Regionen beider Rezeptorfamilien vorkommender konservierter Bereich von etwa 200 Aminosäuren, der als Toll/IL-1R- (TIR-) Domäne bezeichnet wird (Slack et al. 2000, Dunne und O'Neill 2003). Diese TIR-Domänen enthalten drei Bereiche mit hochkonservierten Aminosäuresequenzen, die als Box 1, Box

2 und Box 3 bezeichnet werden und die nach Rezeptoraktivierung essentiell sind für eine Interaktion dieser Rezeptordomäne mit zytoplasmatischen Adaptorproteinen und einer damit einhergehenden Signaltransduktion. In ihrer extrazellulären Domäne unterscheiden sich Toll-like Rezeptoren und IL-1-Rezeptoren hingegen deutlich voneinander (Abb. 1.2.1). Während sich die extrazelluläre Domäne letzterer Rezeptorfamilie aus drei immunglobulinähnlichen Domänen zusammensetzt, besteht diese bei Toll-like Rezeptoren aus 19-25 Kopien tandemartig angeordneter leucinreicher Motive (LRRs, leucine-rich repeats). Jeder dieser sich wiederholenden Bereiche ist aus 24-29 Aminosäuren aufgebaut und enthält die Leucin-reiche Sequenz XLXXLX_{LXX} sowie eine weitere konservierte Sequenz XX_HXXX_HX₄FXXLX, wobei X beliebige Aminosäuren und X_H hydrophobe Aminosäuren darstellen (Bell et al. 2003). Die extrazellulären LRR-Domänen aller Toll-like Rezeptoren bilden eine hufeisenförmige Struktur aus, wobei vermutlich die konkave Oberfläche direkt an der Erkennung spezifischer TLR-Agonisten beteiligt ist (Akira und Takeda 2004).

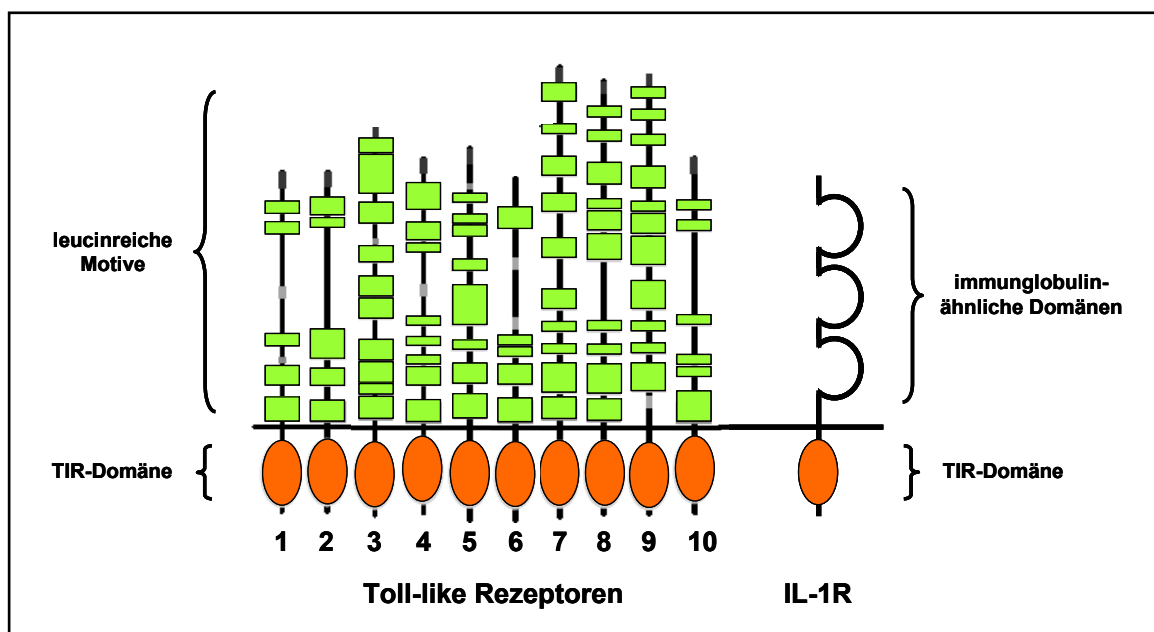


Abbildung 1.2.1: Struktur von Toll-like Rezeptoren: Toll-like Rezeptoren besitzen wie nahezu alle Mitglieder der IL-1-Rezeptorfamilie (IL-1R) in ihrem zytoplasmatischen Bereich eine konservierte homologe Domäne, die als Toll/IL-1R- (TIR-) Domäne (rote Ovale) bezeichnet wird. Die extrazellulären Domänen beider Rezeptorfamilien unterscheiden sich jedoch. Bei IL-1-Rezeptoren besteht diese aus meist drei immunglobulinähnlichen Domänen, während sich die extrazellulären Domänen von Toll-like Rezeptoren aus 19-25 Kopien tandemartig angeordneter leucinreicher Motive zusammensetzen (grüne Rechtecke) (nach Beutler 2004).

Aufgrund der Aminosäuresequenzen sowie ihrer Genstruktur werden die einzelnen humanen Toll-like Rezeptoren in mehrere Unterfamilien unterteilt. So werden TLR1, TLR2, TLR6 und TLR10 der TLR2-Unterfamilie, TLR7, TLR8 und TLR9 der TLR9-Unterfamilie zugeordnet. Die Toll-like Rezeptoren TLR3, TLR4 sowie TLR5 sind jeweils die einzigen Vertreter ihrer entsprechenden Unterfamilie (Takeda et al. 2003). Weiterhin ist zu erwähnen, dass sich einzelne Toll-like Rezeptoren hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation unterscheiden. Während TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 zelloberflächenständige Rezeptoren darstellen, sind TLR3, TLR7, TLR8, und TLR9 nahezu

ausschließlich in Membranen intrazellulärer Kompartimente wie dem endoplasmatischen Retikulum, Endosomen und Lysosomen lokalisiert (Heil et al. 2003, Matsumoto et al. 2003, Ahmad-Nejad et al. 2002, Latz et al. 2004, Nishiya und DeFranco 2004). Eine Aktivierung letzterer erfolgt in endosomalen/lysosomalen Kompartimenten und erfordert eine endosomale Ansäuerung (Heil et al. 2004, Diebold et al. 2004, Lund et al. 2004, Ahmad-Nejad et al. 2002, Funami et al. 2004). Es wird vermutet, dass für eine effiziente Aktivierung der Toll-like Rezeptoren TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9, die an der Erkennung verschiedener Nukleinsäurestrukturen beteiligt sind, eine vorausgehende Endozytose bzw. Phagozytose entsprechender Agonisten notwendig ist (Takeda und Akira 2005).

1.2.2 Expression von Toll-like Rezeptoren

Untersuchungen der Expression humaner Toll-like Rezeptoren mittels Northern-Blot und quantitativer RT-PCR zeigten, dass in nahezu allen analysierten Geweben Transkripte verschiedener Mitglieder dieser Rezeptorfamilie detektierbar sind. Hierbei weisen einzelne Organe ein unterschiedliches Repertoire an Toll-like Rezeptoren auf, wobei TLR3 und TLR5 ein deutlich breiteres Expressionsmuster als die übrigen Vertreter der TLR-Familie besitzen und in vergleichsweise hohen Mengen in Niere, Lunge, Pankreas, Ovarium, Testes sowie der Plazenta exprimiert werden. Im Allgemeinen zeigt sich, dass das höchste Expressionsniveau der einzelnen Mitglieder dieser Rezeptorfamilie besonders in immunologisch bedeutsamen Geweben wie der Milz oder Leukozyten sowie Epithelien der Lunge oder des Gastrointestinaltraktes zu finden ist, was auf eine zentrale Funktion dieser Rezeptoren in der Immunabwehr von Pathogenen zurückzuführen ist (Rock et al. 1998, Zarembler und Godowski 2002). Dies spiegelt sich auch in der Expression individueller Toll-like Rezeptoren in verschiedenen Zelltypen wider (Tab. 1.2.2). Viele Immunzellen, insbesondere Zellen des angeborenen nicht-adaptiven Immunsystems wie Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen, Mastzellen und Mikrogliazellen, exprimieren ein breites Spektrum an unterschiedlichen TLRs (Muzio et al. 2000, Hornung et al. 2002, Anders et al. 2004, Hopkins und Sriskandan 2005, Iwasaki und Medzhitov 2004, Hayashi et al. 2003, Schmidt et al. 2004, Sivori et al. 2004, Applequist et al. 2002, Matsushima et al. 2004, Nagase et al. 2003, Olson und Miller 2004, Gelman et al. 2004, Caramalho et al. 2003, Lund et al. 2004).

Toll-like Rezeptoren werden jedoch auch von vielen Zelltypen exprimiert, die nicht dem Immunsystem zugeordnet werden (Tab. 1.2.2). So konnte die Expression verschiedener TLRs unter anderem in Epithelzellen der Nierentubuli, der Lunge, des Darms sowie endometrialen Epithelzellen, Keratinozyten, Endothelzellen, Hepatozyten, Astrozyten, Fibroblasten, glatten Gefäßmuskelzellen und Kardiomyozyten nachgewiesen werden (Matsumura et al. 2000, Tsuboi et al. 2002, Bsibsi et al. 2002, Bowman et al. 2003, Carpentier et al. 2005, Farina et al. 2005, Jimenez et al. 2005, Faure et al. 2000, Edfeldt et al. 2002, Frantz et al. 2001, Kumagai et al. 2005, Kurt-Jones et al. 2004, Kollisch et al. 2005, Gewirtz et al. 2001, Maaser et al. 2004, Wen et al. 2004, Young et al. 2004, Schaefer et al. 2004, Pedersen et al. 2005, Rudd et al. 2005, Hasan et al. 2005, Guillot et al. 2005).

	Immunzellen	Gewebezellen
TLR1	Monozyten, Makrophagen myeloide dendritische Zellen neutrophile+eosinophile Granulozyten Mastzellen Mikrogliazellen B- und T-Lymphozyten	Tubulusepithelzellen der Niere Keratinocyten endometriale Epithelzellen Fibroblasten
TLR2	Monozyten, Makrophagen myeloide dendritische Zellen neutrophile Granulozyten natürliche Killerzellen Mastzellen Mikrogliazellen B- und T-Lymphozyten	Tubulusepithelzellen der Niere Epithelzellen der Lunge und des Darms Keratinocyten endometriale Epithelzellen Hepatozyten β-Zellen des Pankreas glatte Gefäßmuskelzellen, Kardiomyozyten Fibroblasten, Astrozyten
TLR3	myeloide dendritische Zellen neutrophile Granulozyten natürliche Killerzellen Mastzellen Mikrogliazellen B- und T-Lymphozyten	Tubulusepithelzellen der Niere Epithelzellen der Lunge und des Darms Keratinocyten endometriale Epithelzellen β-Zellen des Pankreas Kardiomyozyten Fibroblasten, Astrozyten
TLR4	Monozyten, Makrophagen myeloide dendritische Zellen neutrophile+eosinophile Granulozyten Mastzellen Mikrogliazellen B- und T-Lymphozyten	Tubulusepithelzellen der Niere Epithelzellen des Darms endometriale Epithelzellen Hepatozyten β-Zellen des Pankreas Endothelzellen glatte Gefäßmuskelzellen, Kardiomyozyten Fibroblasten, Astrozyten
TLR5	Monozyten, Makrophagen myeloide dendritische Zellen natürliche Killerzellen Mikrogliazellen T-Lymphozyten	Epithelzellen des Darms Keratinocyten endometriale Epithelzellen Endothelzellen Fibroblasten, Astrozyten
TLR6	Monozyten, Makrophagen myeloide dendritische Zellen neutrophile Granulozyten natürliche Killerzellen Mastzellen Mikrogliazellen B- und T-Lymphozyten	Tubulusepithelzellen der Niere endometriale Epithelzellen Kardiomyozyten Fibroblasten
TLR7	Monozyten, Makrophagen plasmazytoide dendritische Zellen neutrophile+eosinophile Granulozyten Mastzellen Mikrogliazellen B- und T-Lymphozyten	Fibroblasten
TLR8	Monozyten, Makrophagen natürliche Killerzellen Mastzellen, Mikrogliazellen T-Lymphozyten	Fibroblasten
TLR9	plasmazytoide dendritische Zellen neutrophile+eosinophile Granulozyten natürliche Killerzellen Mikrogliazellen B-Lymphozyten	Keratinocyten Epithelzellen des Darms endometriale Epithelzellen β-Zellen des Pankreas Fibroblasten, Astrozyten
TLR10	plasmazytoide dendritische Zellen eosinophile Granulozyten B-Lymphozyten	
TLR11		Epithelzellen der Harnblase

Tabelle 1.2.2: TLR-Expressionsmuster verschiedener Zelltypen

1.2.3 Funktion von Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren werden der Gruppe der Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors, PRRs) zugeordnet, die sich aus einer Reihe strukturell unterschiedlicher Proteine zusammensetzt und welcher neben TLRs unter anderem auch der Mannoserezeptor, verschiedene Scavengerrezeptoren, der fMLP-Rezeptor (N-formyl-Met-Leu-Phe-Rezeptor), das mannanbindende Lektin sowie die intrazellulären NOD- (nucleotide-binding oligomerisation domain) Proteine angehören. Diese Proteine erkennen konservierte Strukturen infektiöser Mikroorganismen und Viren (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) und spielen eine wichtige Rolle in der frühen Phase der Immunabwehr. Die einzelnen Mitglieder der Toll-like Rezeptorfamilie, die durch eine Reihe strukturell verschiedener pathogenassoziierter Komponenten wie beispielsweise bakterielle Lipoproteine, Lipopolysaccharide oder Nukleinsäuren (s. 1.2.4) aktiviert werden, fungieren hierbei als Signaltransduktionsrezeptoren und spielen eine zentrale Rolle in der Aktivierung von Effektorfunktionen im Rahmen der angeborenen Immunabwehr sowie in der Initiation einer nachfolgenden adaptiven Immunantwort (Janeway und Medzhitov 2002, Beutler und Rietschel 2003, Takeda et al. 2003, Athman und Philpott 2004, Takeda und Akira 2005, Hopkins und Sriskandan 2005). In Immunzellen und Zellen peripherer Gewebe induzieren TLR-vermittelte Signalwege die Genexpression proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, u.a) sowie die Expression der antiviralen Typ I Interferone IFN- α und IFN- β und damit einhergehend die Expression vieler Interferon-induzierbarer Gene. Weiterhin führt die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren zu einer vermehrten Expression von Chemokinen wie IL-8, MCP-1, -2, -3, -4 (monocyte chemoattractant proteins), MIP-1 α , -1 β , -2 (macrophage inflammatory proteins) und GRO α (growth-related oncogene α) sowie zu einer veränderten Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und Immunzellen, was schließlich die Einwanderung von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen in die infizierten Gewebe ermöglicht (Nagase et al. 2003, Maaser et al. 2004). Toll-like Rezeptoren vermitteln zudem die Aktivierung von Immunzellen, insbesondere von Zellen des angeborenen Immunsystems, und damit einhergehend deren Effektorfunktionen wie beispielsweise eine vermehrte Phagozytose bei Makrophagen, dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten, eine Freisetzung reaktiver Sauerstoffverbindungen (Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid) durch Induktion einer respiratorischen Entladung neutrophiler und eosinophiler Granulozyten sowie eine Erhöhung der zytotoxischen Eigenschaften natürlicher Killerzellen (Blander und Medzhitov 2004, Doyle et al. 2004, Hayashi et al. 2003, Nagase et al. 2003, Schmidt et al. 2004, Sivori et al. 2004). Weiterhin führt die Aktivierung bestimmter Toll-like Rezeptoren in Makrophagen zur Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) und somit zur Produktion von antibakteriellem Stickstoffmonoxid, zu einer vermehrten Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) in Makrophagen, Fibroblasten und Epithelzellen sowie zu einer Expression des antibakteriellen Peptids β -Defensin 2 im Darm- und Lungenepithel (Gao et al. 1998, Toshchakov et al. 2002, Kyburz et al. 2003, Warner et al. 2004, Gebbia et al. 2004, Hertz et al. 2003, Wang et al. 2003, Vora et al. 2004). Alle diese

Vorgänge sind Teil einer angeborenen, nicht-adaptiven Immunantwort und dienen zur raschen Eindämmung und Beseitigung bakterieller und viraler Infektionen.

Toll-like Rezeptoren sind zudem auch maßgeblich an der Initiation einer nachfolgenden adaptiven Immunantwort beteiligt. Eine zentrale Rolle spielt hierbei die durch Pathogene induzierte TLR-vermittelte Aktivierung professioneller antigenpräsentierender Zellen, insbesondere dendritischer Zellen, in peripheren Geweben. Dies hat zur Folge, dass in diesen Zellen die Expression unterschiedlicher Zytokine (IL-12, IL-6, IFN- α , IFN- β , IL-10) und kostimulatorischer Signalmoleküle (CD80, CD86, CD40) induziert wird sowie die Expression von MHC Klasse I und Klasse II Moleküle erhöht wird. Während ihrer Reifung zu professionellen antigenpräsentierenden Zellen migrieren dendritische Zellen aus den peripheren Geweben in sekundäre lymphatische Organe, wie z.B. den Lymphknoten, wo sie schließlich naive antigenspezifische T-Lymphozyten aktivieren. Nach klonaler Expansion und Differenzierung zu bewaffneten T-Effektorzellen vermitteln diese schließlich als T-Helferzellen (T_H1, T_H2) oder zytotoxische T-Lymphozyten die adaptive Immunabwehr (Iwasaki und Medzhitov 2004, Pasare und Medzhitov 2004). Das Repertoire an Toll-like Rezeptoren, das im Rahmen einer Infektion in dendritischen Zellen aktiviert wird, hat zudem Einfluss auf die Polarisation der induzierten adaptiven Immunantwort. Während Agonisten der Toll-like Rezeptoren TLR4, TLR5 und TLR9 eine T_H1-Antwort induzieren, scheint eine Aktivierung von TLR2 eine T_H2-Antwort zu fördern. Eine kombinierte Aktivierung mehrerer verschiedener TLRs induziert bei dendritischen Zellen jedoch in erster Linie einen T_H1-polarisierenden Phänotyp (Agrawal et al. 2003, Re et al. 2001, Redecke et al. 2004, Hoebe et al. 2004, Napolitani et al. 2005). TLR3 und TLR9-vermittelte Signalwege scheinen zudem die Effizienz zu erhöhen, mit der dendritische Zellen virale Antigene kreuzpräsentieren, was schließlich die Aktivierung antigenspezifischer CD8⁺ zytotoxischer T-Lymphozyten fördert (Schwarz et al. 2003, Schulz et al. 2005). Neben dieser indirekten und durch dendritische Zellen vermittelten Modulation der adaptiven Immunantwort beeinflussen Toll-like Rezeptoren auch in direkter Weise die Funktion von Zellen des adaptiven Immunsystems. So induzieren TLR9-spezifische Agonisten die Genexpression von IL-6, IL-10, IL-12, MHC Klasse II Molekülen, kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86) sowie die Proliferation von B-Lymphozyten. Zudem scheinen TLR-vermittelte Signale den Isotypenwechsel der von B-Lymphozyten sekretierten Immunglobuline zu beeinflussen (Leadbetter et al. 2002, Krieg 2002, Anders et al. 2004, Pasare und Medzhitov 2004, Iwasaki und Medzhitov 2003). Weiterhin modulieren TLR-Agonisten in direkter Weise die Funktion CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Lymphozyten und sind in der Lage, die Lebensdauer aktivierter CD4⁺ T-Lymphozyten zu verlängern (Caramalho et al. 2003, Gelman et al. 2004). Zusammenfassend zeigt sich, dass eine Aktivierung von Toll-like Rezeptoren durch Mikroorganismen und Viren eine zentrale Rolle in der Initiation des angeborenen sowie des adaptiven Immunsystems spielt, wobei das jeweilige Repertoire aktivierter Toll-like Rezeptoren eine koordinierte Immunantwort induziert, die exakt auf das entsprechende Pathogen abgestimmt ist.

Toll-like Rezeptoren scheinen darüber hinaus in der Pathogenese kardiovaskulärer (Atherosklerose) und autoimmuner Erkrankungen (Typ I Diabetes, systemischer Lupus erythematodes, multiple Sklerose) involviert zu sein (Cook et al. 2004, Vink et al. 2004, Bach 2005, Rifkin et al. 2005, Mullick

et al. 2005, Prinz et al. 2006). Wie an transgenen Tiermodellen gezeigt werden konnte, erfolgt eine Aktivierung bestimmter Toll-like Rezeptoren *in vivo* auch in Abwesenheit infektiöser Mikroorganismen („sterile Inflammation“). So wurde beschrieben, dass TLR4 eine Schädigung von Leber und Herzmuskel als Folge einer transienten Ischämie bzw. eines myokardialen Infarktes vermittelt. Für TLR2 konnte eine Rolle bei der Regeneration des ventrikulären Myokards nach akutem Infarkt sowie eine Beteiligung an der Ausbildung atherosklerotischer Läsionen und der Initiation inflammatorischer Prozesse als Folge einer transienten Ischämie in der Niere nachgewiesen werden (Zhai et al. 2004, Oyama et al. 2004, Shishido et al. 2003, Mullick et al. 2005, Leemans et al. 2005). Eine Aktivierung von Toll-like Rezeptoren könnte in diesem Zusammenhang durch bestimmte körpereigene Komponenten, die man als endogene Agonisten bezeichnet (Tab. 1.2.5), vermittelt werden.

1.2.4 TLR-vermittelte Signaltransduktion

Nach Aktivierung durch pathogenassoziierte Strukturen fungieren TLRs als signaltransduzierende Rezeptoren. Die unter 1.2.3 dargestellten zentralen Funktionen in der Immunabwehr machen Toll-like Rezeptoren und die von ihnen aktivierten Signalkaskaden zu einem geeigneten pharmakologischen Ziel, um beispielsweise die Therapie von Autoimmunerkrankungen, von chronischen Entzündungen oder von Sepsis zu optimieren. Deshalb sind seit wenigen Jahren die von Toll-like Rezeptoren vermittelten Signaltransduktionskaskaden Gegenstand intensiver Forschung.

Wie bereits erwähnt wurde, spielt in der Initiation TLR-vermittelter Signalkaskaden die Interaktion zwischen den zytoplasmatischen TIR-Domänen dieser Rezeptoren und zytoplasmatischen Adaptorproteinen eine entscheidende Rolle. Mit MyD88 (myeloid differentiation primary-response protein 88), TIRAP (TIR-domain containing adaptor protein), das auch als MAL (MyD88-adaptor like protein) bezeichnet wird, TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- β) und TRAM (TRIF-related adaptor molecule) wurden bislang 4 verschiedene solcher Adaptorproteine identifiziert. Alle diese Proteine enthalten jeweils eine TIR-Domäne, die zu denen von Toll-like Rezeptoren und IL-1-Rezeptoren homolog ist. Eine Aktivierung von TLRs durch entsprechende Agonisten ermöglicht die homophile Interaktion zwischen den TIR-Domänen von Rezeptoren und Adaptorproteinen und somit die Anlagerung letzterer an die zytoplasmatischen Rezeptordomänen. Man geht davon aus, dass für diese Interaktion eine durch entsprechende Agonisten induzierte Dimerisierung der TLRs notwendig ist (Takeda und Akira 2005). Die Mitglieder der Toll-like-Rezeptorfamilie unterscheiden sich zum Teil erheblich hinsichtlich der von ihnen ausgelösten Signaltransduktionskaskaden und somit in der Regulation bestimmter Gene. Diese Spezifität der Signaltransduktion entsteht hierbei überwiegend auf Ebene der Adaptorproteine, indem individuelle TLRs mit verschiedenen bzw. Kombinationen verschiedener Adaptorproteine interagieren. In diesem Zusammenhang unterscheidet man im Allgemeinen MyD88-abhängige sowie MyD88-unabhängige Signalkaskaden.

MyD88-abhängige Signaltransduktionskaskaden

Für eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und eine davon abhängige Expression inflammatorischer Zytokine wie TNF- α oder IL-6 durch die Toll-like Rezeptoren TLR2, TLR4, TLR5, TLR7/8 und TLR9 spielt das Adaptorprotein MyD88 eine wichtige Rolle (Takeda et al. 2003, Akira und Takeda 2004, Dunne und O'Neill 2003, Horng und Medzhitov 2001, Adachi et al. 1998). Dieses bindet nach Aktivierung der Rezeptoren direkt an die zytoplasmatische TIR-Domäne von TLR5, TLR7/8 und TLR9. Für eine Initiation MyD88-abhängiger Signalwege durch TLR2 und TLR4 ist neben diesem Protein mit TIRAP/MAL ein weiteres Adaptorprotein essentiell (Horng et al. 2001, Fitzgerald et al. 2001, Yamamoto et al. 2002a, Horng et al. 2002). Dieses lagert sich an die TIR-Domänen von TLR2 und TLR4 an, was schließlich zur Bindung von MyD88 an die TIR-Domäne von TIRAP/MAL führt und auf diese Weise eine indirekte Interaktion von MyD88 mit beiden Rezeptoren ermöglicht.

Rezeptorassoziiertes MyD88 führt schließlich zu einer Anlagerung der beiden Serin/Threonin Kinasen IRAK1 und IRAK4 (IL-1R-associated kinases) an den Proteinkomplex. Diese Bindung wird über eine homophile Interaktion zwischen den N-terminalen Todesdomänen (DD, death domain) von MyD88 und der Proteinkinase IRAK4 vermittelt. Gebundenes IRAK4 phosphoryliert schließlich IRAK1, induziert auf diese Weise deren Autophosphorylierung und ermöglicht somit die Anlagerung von TRAF6 (TNF-receptor-associated factor 6) an den rezeptorassoziierten Proteinkomplex. IRAK1-TRAF6-Heterodimere werden daraufhin von diesem Komplex freigesetzt und vermitteln letztlich eine Aktivierung der zytosolischen Proteinkinase TAK1 (TGF- β -activated kinase 1). Letztere phosphoryliert den heterotrimeren IKK-Komplex, bestehend aus den beiden katalytischen Untereinheiten IKK- α und IKK- β und der regulatorischen Untereinheit NEMO/IKK- γ (IKK: I κ B-Kinase, NEMO: NF- κ B essential modulator). Der aktivierte IKK-Komplex schließlich initiiert durch Phosphorylierung von Proteinen der I κ B-Familie (inhibitor of NF- κ B) die Freisetzung des zytoplasmatischen Transkriptionsfaktors NF- κ B aus einem inaktiven Proteinkomplex. Der als freies Dimer vorliegende Transkriptionsfaktor NF- κ B transloziert schließlich in den Zellkern und vermittelt durch Bindung an spezifische DNA-Motive eine transkriptionelle Aktivierung bestimmter Zielgene, wobei im Rahmen MyD88-abhängiger Signalwege insbesondere die Expression inflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-6, IL-1 β) und verschiedener Chemokine induziert wird (Akira und Takeda 2004). Eine Initiation dieser MyD88-abhängigen Signalkaskade erfolgt nach Aktivierung aller oben erwähnten Toll-like Rezeptoren. Dennoch unterscheiden sich die von diesen Rezeptoren induzierten Signalwege hinsichtlich der Regulation bestimmter Gene. So führt eine Aktivierung von TLR7, TLR8 und TLR9, nicht jedoch von TLR2, TLR4 oder TLR5, in MyD88-abhängiger Weise zu einer Induktion der Interferon- α - (IFN- α) Genexpression. Hierbei scheint eine IRAK-1-abhängige Phosphorylierung des zytoplasmatischen Transkriptionsfaktors IRF-7 (interferon-regulatory factor 7) nach Bildung eines rezeptorassoziierten Proteinkomplexes bestehend aus MyD88, TRAF6 und IRAK-1 die Expression von IFN- α zu vermitteln (Kawai et al. 2004, Uematsu et al. 2005). Die Tatsache, dass nach Aktivierung von TLR5, TLR7/8 und TLR9 eine Signaltransduktion ausschließlich in MyD88-abhängiger Weise erfolgt und diese durch eine direkte Bindung von MyD88 an die zytoplasmatische

Einleitung

Rezeptordomäne vermittelt wird, eine Aktivierung von TLR5 die zelluläre IFN- α -Genexpression jedoch nicht beeinflusst, zeigt, dass die differentielle Modulation der Genexpression durch individuelle TLRs komplex ist und scheinbar nicht ausschließlich auf Ebene der rezeptorassoziierten Adaptorproteine definiert wird (Means et al. 2003).

MyD88-unabhängige Signaltransduktionskaskaden

Eine Untersuchung von Makrophagen aus MyD88-defizienten Mäusen zeigte, dass nach Aktivierung von TLR4 eine Expression inflammatorischer Zytokine ausbleibt und eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zeitlich verzögert erfolgt (Kawai et al. 1999). Zudem stellte sich heraus, dass der TLR4-spezifische Agonist LPS in MyD88-defizienten Makrophagen zur Expression einer Reihe Interferon-induzierter Gene führt (Kawai et al. 2001). Beides deutete auf die Existenz MyD88-unabhängiger Signalkaskaden hin. Wie eine Reihe weiterführender Studien zeigen konnte, sind TLR4 und TLR3 in der Lage, in MyD88-unabhängiger Weise die zelluläre Genexpression zu beeinflussen und insbesondere die Expression von Interferon- β (IFN- β) sowie Interferon-regulierter Gene zu induzieren. Hierbei lässt sich der Einfluss auf letztere Gengruppe überwiegend auf die autokrine/parakrine Wirkung von Interferon- β zurückführen (Hoshino et al. 2002, Toshchakov et al. 2002, Doyle et al. 2002, Akira und Takeda 2004). Als zentrale Komponente MyD88-unabhängiger Signalwege konnte das Adaptorprotein TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- β) identifiziert werden, das auch als TICAM1 (TIR-domain-containing molecule 1) bezeichnet wird (Yamamoto et al. 2002b, Oshiumi et al. 2003a). Während TRIF über seine TIR-Domäne direkt mit der TIR-Domäne des aktivierten Toll-like Rezeptors 3 interagiert, wird die Bindung von TRIF an die TIR-Domäne von TLR4 von einem weiteren Adaptorprotein vermittelt, das als TRAM (TRIF-related adaptor molecule) oder TICAM2 (TIR-domain-containing molecule 2) bezeichnet wird (Fitzgerald et al. 2003b, Oshiumi et al. 2003b). TLR3- und TLR4-assoziiertes TRIF vermittelt schließlich die MyD88-unabhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B sowie die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 (interferon-regulatory factor 3) und somit die Expression von IFN- β .

Die C-terminale und N-terminale Domäne des Adaptorproteins TRIF sind an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B beteiligt (Yamamoto et al. 2002b). Die exakten Mechanismen sind in diesem Zusammenhang noch unklar, die Aktivierung von NF- κ B scheint jedoch von TRAF6, RIP1 (receptor-interacting protein 1) und der Proteinkinase TAK1 vermittelt zu werden (Sato et al. 2003, Meylan et al. 2004, Cusson-Hermance et al. 2005). Die Phosphorylierung des konstitutiv exprimierten Transkriptionsfaktors IRF-3 erfolgt im Zytosol durch die beiden Proteinkinasen IKK- ϵ (IKK-i, inducible IKK) und TBK1 (TRAF-family-member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase), die auch als NAK (NF- κ B-activating kinase) bezeichnet wird (Sharma et al. 2003, Fitzgerald et al. 2003a). TBK1 ist in der Lage, direkt an die N-terminale Domäne von TRIF zu binden und scheint in diesem Zusammenhang die dominante Rolle zu spielen (McWhirter et al. 2004, Sato et al. 2003, Fitzgerald et al. 2003a). Phosphoryliertes IRF-3 transloziert nach Dimerisierung schließlich in den Nukleus, wo es an ISRE-Motive (interferon-stimulated response elements) im Promotor entsprechender Zielgene bindet und deren Expression induziert. Hierbei spielt die Induktion der IFN-

β -Genexpression eine besondere Rolle, da dieses nach Sekretion in autokriner/parakriner Weise die Expression zahlreicher sekundärer Interferon-regulierter Gene, wie z.B. TLR3, IRF-7 oder der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS, NOS2) vermittelt (Doyle et al. 2002, Doyle et al. 2003, Toshchakov et al. 2002).

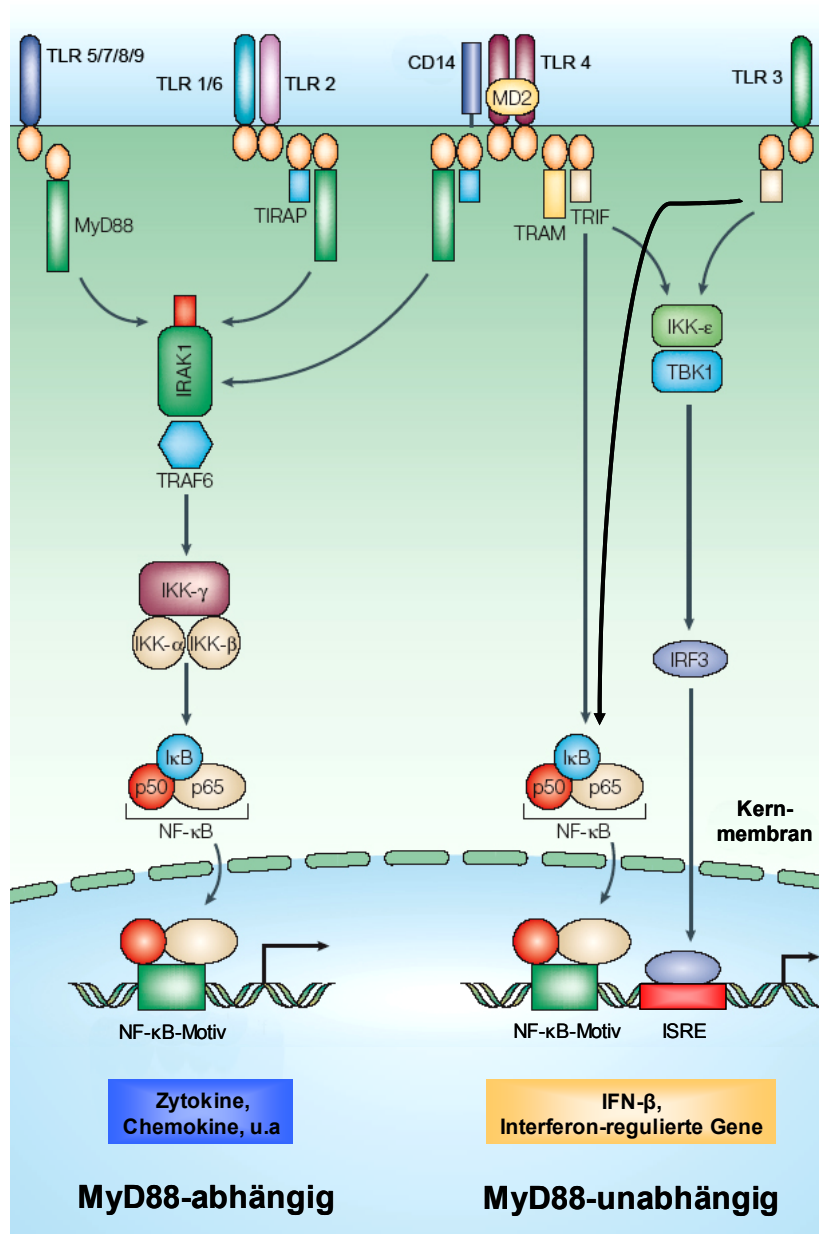


Abbildung 1.2.4: Vereinfachte Darstellung TLR-vermittelter Signalwege: Eine Aktivierung der Toll-like Rezeptoren TLR2, TLR5, TLR7/8, und TLR9 führt in MyD88-abhängiger Weise zu einer raschen (<1h) Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, was unter anderem die Genexpression inflammatorischer Zytokine und Chemokine induziert. TLR3-aktivierte Signalwege hingegen werden in MyD88-unabhängiger Weise vom Adaptorprotein TRIF vermittelt. Hierbei kommt es zu einer verzögerten (1-2h) Aktivierung von NF- κ B sowie zu einer Phosphorylierung von IRF-3. Letzteres bindet an regulatorische ISRE-Motive im Promotor verschiedener Zielgene und induziert in Kooperation mit NF- κ B die Expression des Typ1-Interferons IFN- β . Neusynthetisiertes IFN- β vermittelt schließlich in autokriner/parakriner Weise die Expression Interferon-induzierbarer Gene. TLR4 ist als einziger Vertreter der TLR-Familie in der Lage sowohl MyD88-abhängige als auch MyD88-unabhängige Signalwege zu aktivieren. (gelbe Ovale: TIR-Domäne von TLRs und Adaptorproteinen) (nach Takeda und Akira 2004)

Einleitung

Zusammenfassend zeigt sich, dass eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B sowohl im Rahmen MyD88-abhängiger als auch MyD88-unabhängiger Signalkaskaden erfolgt. MyD88-abhängige Signalwege, die von den Toll-like Rezeptoren TLR2, TLR4, TLR5, TLR7/8 und TLR9 vermittelt werden, führen hierbei in der Regel innerhalb kürzester Zeit (<1h) zu einer Aktivierung von NF- κ B und als Folge hiervon zu einer raschen Induktion der Genexpression von inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und kostimulierenden Signalmolekülen. Als Folge einer Aktivierung MyD88-unabhängiger, TRIF-abhängiger Signalwege durch die beiden Toll-like Rezeptoren TLR3 und TLR4 kommt es hingegen zu einer zeitlich verzögerten (1-2h) Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B sowie zur Phosphorylierung von IRF-3. Ein wesentlicher Unterschied zu MyD88-abhängigen Signalwegen besteht somit in der IRF-3-abhängigen Induktion der IFN- β -Expression sowie in der autokrinen/parokrinen Regulation Interferon-induzierter Gene (Abb. 1.2.4). Weiterhin muss erwähnt werden, dass im Rahmen beider Signalkaskaden eine TAK1-vermittelte Aktivierung verschiedener MAPK (mitogen-activated protein kinase), wie JNK (c-Jun N-terminal kinase), p38 oder ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2, p42/p44), erfolgt und TLRs somit auch die Expression AP1-abhängig regulierter Gene beeinflussen (Akira und Takeda 2004, Huang et al. 2003, Jiang et al. 2003). Zudem zeigt sich, dass TLR4 eine Sonderstellung einnimmt, da er als einziger Vertreter der TLR-Familie mit sämtlichen der 4 beschriebenen zytoplasmatischen Adaptorproteine interagiert und somit sowohl MyD88-abhängige als auch MyD88-unabhängige Signalkaskaden aktivieren kann (Abb. 1.2.4).

1.2.5 Agonisten von Toll-like Rezeptoren

1.2.5.1 Pathogenassoziierte und synthetische TLR-Agonisten

Wie bereits erwähnt wurde, fungieren Toll-like Rezeptoren als signaltransduzierende Mustererkennungsrezeptoren, die durch konservierte Strukturen vieler verschiedener Pathogene aktiviert werden. Diese TLR-aktivierenden Faktoren, die als PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) bezeichnet werden, weisen eine hohe strukturelle Diversität auf und umfassen neben acylierten Proteinen und Peptiden unter anderem auch Nukleinsäuren sowie virale Hüllproteine. Weiterhin besitzt eine Reihe synthetischer Verbindungen, die strukturelle Ähnlichkeiten mit entsprechenden PAMPs aufweisen, TLR-aktivierende Eigenschaften (Tabelle 1.2.5).

TLR2, TLR1, TLR6, TLR10

TLR2 erkennt im Vergleich zu anderen bekannten Toll-like Rezeptoren das breiteste Spektrum an mikrobiellen Strukturen. Als TLR2-spezifische Agonisten wurden in erster Linie Zellwandbestandteile einer Reihe unterschiedlicher Mikroorganismen beschrieben. So besitzen unter anderem Lipoproteine von *Mycobacterium tuberculosis*, *Borrelia burgdorferi* und *Mycoplasma fermentans*, Peptidoglykan und Lipoteichonsäure Gram-positiver Bakterien sowie Lipoarabinomannan von Mykobakterien TLR2-aktivierende Eigenschaften. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Glykoinositolphospholipide von *Trypanosoma Cruzi*, ein phenollösliches Modulin von *Staphylococcus epidermis*, Porine der äußeren Membran von *Neisseria*, Hämagglutinin von

Masernviren sowie Zymosan, einem Zellwandbestandteil von Hefepilzen, von TLR2 erkannt werden (Takeda et al. 2003, Takeda und Akira 2005). Das breite Spektrum an TLR2-spezifischen Agonisten lässt sich zum Teil darauf zurückführen, dass TLR2 mit bestimmten Korezeptoren interagieren kann. Von besonderer Bedeutung bei der Erkennung bakterieller Lipoproteine ist die Bildung funktioneller Heterodimere mit den beiden Toll-like Rezeptoren TLR1 und TLR6. Diese besitzen selbst keine signaltransduzierenden Eigenschaften und fungieren scheinbar ausschließlich als akzessorische Rezeptoren bei der Diskriminierung verschiedener bakterieller Lipoproteintypen. Essentiell für die immunstimulatorischen Eigenschaften bakterieller Lipoproteine sind N-terminale Lipidstrukturen. TLR2/TLR1-Heterodimere erkennen in diesem Zusammenhang den N-terminalen triacylierten Cysteinrest, der Bestandteil vieler bakterieller Lipoproteine ist. Zudem fungiert das synthetische triacylierte Lipoheptapeptid Pam₃Cys-Ser-Lys₄ (Pam₃CSK₄) als Agonist des TLR2/TLR1-Rezeptorkomplexes (Takeuchi et al. 2002). Von Mykoplasmen stammende Lipoproteine, wie MALP-2 (macrophage-activating lipoprotein 2), weisen hingegen einen diacylierten N-Terminus auf und werden von TLR2/TLR6-Heterodimeren erkannt (Takeuchi et al. 2001). Mit dem Protein CD36, einem Vertreter der Typ B Scavengerrezeptorfamilie, wurde kürzlich ein weiterer Korezeptor für TLR2 beschrieben. Dieser ist an der Erkennung von Lipoteichonsäure und MALP-2 beteiligt und scheint als akzessorischer Korezeptor bei der Aktivierung des TLR2/TLR6-Rezeptorkomplexes durch Diacylglyceride zu fungieren (Hoebe et al. 2005). Für TLR10, der zusammen mit TLR2, TLR1 und TLR6 der TLR2-Unterfamilie von Toll-like Rezeptoren zugeordnet wird und der hinsichtlich seiner Struktur insbesondere zu TLR1 und TLR6 eine enge Verwandtschaft aufweist, ist bislang kein spezifischer Agonist beschrieben worden. Während humaner TLR10 vermutlich funktionell ist, scheint das murine Homolog aufgrund eines Sequenzaustausches im *tlr10*-Genlocus nicht funktionell zu sein (Takeda und Akira 2005).

TLR3

Der Toll-like Rezeptor 3 wurde als Rezeptor für doppelsträngige RNA beschrieben (Alexopoulou et al. 2001, Matsumoto et al. 2002). Als TLR3-spezifische Agonisten wurden unter anderem doppelsträngige RNA identifiziert, die aus Reoviren und Rotaviren isoliert wurde (Alexopoulou et al. 2001, Matsumoto et al. 2003). Wie an einem Tiermodell TLR3-defizienter Mäuse gezeigt werden konnte, besitzt dieser Rezeptor auch eine Funktion in der Immunabwehr nach Infektion mit murinem Cytomegalievirus (MCMV), einem DNA-Virus (Tabeta et al. 2004). Dies zeigt, dass TLR3 neben der Erkennung doppelsträngiger RNA-Viren auch an der Immunabwehr von DNA-Viren beteiligt ist, was möglicherweise auf eine generelle Funktion dieses Rezeptors im Rahmen viraler Infektionen hindeutet. Doppelsträngige RNA ist ein molekulares Muster, das im Verlauf des Replikationszyklus verschiedener Virentypen entsteht, beispielsweise durch eine bidirektionale Transkription des Genoms von DNA-Viren. Doppelsträngige Replikationsintermediate können zudem als Folge einer viral induzierten Zelllyse in den extrazellulären Raum freigesetzt werden (Boehme und Compton 2004). TLR3 erkennt darüber hinaus auch doppelsträngige RNA nicht-viralen Ursprungs. So wurde aus Eiern des parasitischen Helminthen *Schistosoma mansoni* präparierte RNA als TLR3-Agonist

Einleitung

beschrieben (Aksoy et al. 2005). Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Reihe synthetischer Ribonukleinsäuren wie das synthetische Homopolymer Polyadenosin-Polyuridin (Poly(A:U)), siRNA (small interfering RNA), shRNA (short hairpin RNA) und *in vitro* transkribierte mRNA TLR3-aktivierende Eigenschaften aufweisen. Den bislang stärksten Aktivator TLR3-vermittelter Signalwege stellt jedoch das synthetische Homopolymer Polyinosin-Polycytidin (Poly(I:C)) dar (Alexopoulou et al. 2001, Kariko et al. 2004a, Kariko et al. 2004b, Kariko et al. 2004c, Matsumoto et al. 2003).

TLR4

Genetische Untersuchungen zweier Mausstämmen (C3H/HeJ und C57BL10/ScCr), die hyposensitiv gegenüber einem durch bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) induzierten septischen Schock sind, zeigten, dass diese Eigenschaft auf Mutationen im *tlr4*-Gen zurückzuführen ist (Poltorak et al. 1998, Qureshi et al. 1999). Nach Herstellung TLR4-defizienter Mäuse durch gezielten „knock-out“ des *tlr4*-Gens konnte die essentielle Funktion dieses Rezeptors bei der Erkennung von Lipopolysacchariden Gram-negativer Bakterien (*E. coli*, *Salmonella*) bestätigt werden (Hoshino et al. 1999). Weiterführende Studien zeigten, dass TLR4 Teil eines LPS-Rezeptorkomplexes ist, der weiterhin das Glykosylphosphatidylinositol-verankerte Membranprotein CD14 sowie das sezernierte Protein MD-2 enthält (Fitzgerald et al. 2004). Letzteres ist mit der extrazellulären Domäne von TLR4 assoziiert (Abb. 1.2.4). Für eine maximale Funktionalität dieses Rezeptorkomplexes ist zudem das aus dem Serum stammende LPS-bindende Protein (LPS-binding protein, LBP) notwendig. Dieses ist in der Lage, bakterielle Lipopolysaccharide mit hoher Affinität zu binden. Die entstehenden LPS-LBP-Komplexe binden anschließend über CD14 an die Zelloberfläche und werden dem TLR4/MD-2-Komplex zugeführt. Dies führt schließlich zu einer Aktivierung von TLR4, der die signaltransduzierende Komponente des multimeren LPS-Rezeptorkomplexes darstellt (Shimazu et al. 1999, Akashi et al. 2000a, Akashi et al. 2000b, Da Silva Correia et al. 2001, Nagai et al. 2002). Neben LPS wurde auch das von *Chlamydia pneumoniae* stammende 60kDa Hitzeschockprotein (Hsp60) als TLR4-Agonist beschrieben (Sasu et al. 2001, Bulut et al. 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass TLR4 auch virale Strukturen erkennt und durch das Fusionsprotein (F-Protein) des respiratorischen Synzytial Virus (RSV) sowie durch bestimmte Hüllproteine muriner Retroviren (mouse mammary tumor virus (MMTV), Moloney murine leukemia virus (MMLV)) aktiviert wird (Kurt-Jones et al. 2000, Rassa et al. 2002). Interessant ist, dass TLR4 auch die immunstimulatorische Wirkung des pflanzlichen Diterpens Taxol vermittelt (Kawasaki et al. 2000).

TLR5

Als bislang einziger Agonist des Toll-like Rezeptors 5 konnte Flagellin identifiziert werden (Hayashi et al. 2001). Flagellin ist als Strukturprotein ein Hauptbestandteil bakterieller Flagellen. Die C-terminalen sowie N-terminalen Bereiche homologer Flagelline verschiedener Gram-negativer Bakterien weisen einen hohen Grad an Konservierung auf und vermitteln die immunstimulatorische Wirkung dieses Proteins. TLR5 scheint somit an der Erkennung begeißelter Bakterien wie *Listeria*

monocytogenes, *Legionella pneumophila* oder *Salmonella* beteiligt zu sein (Eaves-Pyles et al. 2001, Smith et al. 2003, Hawn et al. 2003).

TLR7, TLR8

Die beiden Toll-like Rezeptoren TLR7 und TLR8 sind strukturell sehr ähnlich und werden in vielen Fällen durch die gleichen Agonisten aktiviert. Eine Untersuchung TLR7-defizienter Mäuse zeigte, dass dieser Rezeptor synthetische Imidazoquinoline (Imiquimod, Resiquimod (R-848)) erkennt, die in der Behandlung von Genitalwarzen, die mit viralen Infektionen in Verbindung stehen, eine klinische Anwendung finden (Hemmi et al. 2002). Wie Jurk et al. zeigen konnten, werden diese synthetischen Verbindungen auch von humanen TLR7 und TLR8, jedoch nicht von murinem TLR8, erkannt (Jurk et al. 2002). In weiteren Studien wurde Loxoribin (7-allyl-8-oxoguanosin), eine synthetische Verbindung mit antiviralen Eigenschaften, als weiterer Agonist für TLR7 identifiziert (Lee et al. 2003, Heil et al. 2003). Die Tatsache, dass die Struktur von Imidazoquinolinen und Loxoribin mit der des Guanosinnukleosids verwandt ist, führte zu der Vermutung, dass humaner und muriner TLR7 und humaner TLR8 an der Erkennung viraler Nukleinsäurestrukturen beteiligt sind. Diese Hypothese konnte schließlich in mehreren unabhängigen Studien bestätigt und guanosin- und uridinreiche einzelsträngige RNA viralen Ursprungs (humanes Immundefizienzvirus (HIV), Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV), Influenza Virus) als spezifischer Agonist für TLR7 und humanen TLR8 identifiziert werden (Heil et al. 2004, Diebold et al. 2004, Lund et al. 2004). Wie im Tiermodell TLR7-defizienter Mäuse gezeigt werden konnte, ist dieser Rezeptor entscheidend an der Initiation einer Immunabwehr als Folge einer Infektion mit einzelsträngigen RNA Viren beteiligt (Lund et al. 2004).

TLR9

Eine Untersuchung TLR9-defizienter Mäuse zeigte, dass dieser Rezeptor bakterielle DNA erkennt. Entscheidend für die immunstimulatorische Wirkung bakterieller DNA sind hierbei unmethylierte CpG-Dinukleotide (Desoxycytidylatphosphat-Desoxyguanylat-Dinukleotide) innerhalb bestimmter Basensequenzen, die als CpG-Motive bezeichnet werden und als TLR9-spezifische Agonisten fungieren (Hemmi et al. 2000). Im Genom von Vertebraten ist zum einen die Häufigkeit solcher CpG-Motive deutlich geringer, zum anderen ist der Cytosinrest dieser Motive oft methyliert, was zu einer deutlichen Reduktion der TLR9-aktivierenden Eigenschaften führt. Beides erklärt die geringe immunstimulatorische Wirkung von Säuger-DNA. Neben bakterieller DNA erkennt TLR9 auch CpG-Motive in der DNA von Herpesviren (Herpes simplex Virus (HSV)) und spielt unter anderem eine wichtige Rolle in der Immunabwehr nach Infektion mit murinem Cytomegalievirus (Lund et al. 2003, Krug et al. 2004, Tabeta et al. 2004). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass TLR9 die immunstimulatorische Wirkung verschiedener synthetischer Oligodesoxynukleotide mit entsprechenden CpG-Motiven (CpG-ODN) vermittelt (Hemmi et al. 2003).

TLR11

Der von Epithelzellen der Harnblase exprimierte TLR11 wurde als Rezeptor beschrieben, welcher die Initiation einer Immunabwehr als Folge einer Infektion mit uropathogenen Bakterien vermittelt (Zhang et al. 2004). Die bakteriellen Strukturen, die von TLR11 erkannt werden, sind bislang jedoch unbekannt. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte zudem ein proflinähnliches Protein des parasitischen Protozoen *Toxoplasma gondii* als TLR11-spezifischer Agonist identifiziert werden (Yarovinsky et al. 2005). Während muriner TLR11 funktionell ist, führt ein internes Stop-Codon im humanen *tlr11*-Gen, das aus einer Punktmutation resultiert, zur Synthese eines verkürzten, nicht funktionellen Proteins (Zhang et al. 2004).

1.2.5.2 Endogene TLR-Agonisten

Interessant ist, dass neben pathogenassoziierten Faktoren scheinbar auch eine Reihe körpereigener Komponenten die Eigenschaft besitzen, bestimmte Mitglieder der Toll-like Rezeptorfamilie zu aktivieren. Diese werden als endogene TLR-Agonisten bezeichnet und umfassen unter anderem ubiquitär exprimierte intrazelluläre Komponenten sowie Bestandteile der extrazellulären Matrix (Tabelle 1.2.5). Einige dieser endogenen TLR-Agonisten weisen zudem in struktureller Hinsicht eine enge Verwandtschaft zu entsprechenden PAMPs auf (Beg et al. 2002).

In einer Reihe unabhängiger Studien wurden die immunstimulatorischen Eigenschaften verschiedener humaner und muriner Hitzeschockproteine wie Hsp70, Hsp60, Hsp90 oder gp96 mehrfach beschrieben (Guzhova et al. 1998, Todryk et al. 1999, Kol et al. 1999, Chen et al. 1999, Singh-Jasuja et al. 2000, Asea et al. 2000, Binder et al. 2000b, Berwin et al. 2001, Kuppner et al. 2001, Somersan et al. 2001, Vabulas et al. 2001, Vabulas et al. 2002a, Vabulas et al. 2002b, Panjwani et al. 2002, Bethke et al. 2002, Flohe et al. 2003, Radsak et al. 2003). Wie Basu und Mitarbeiter zeigen konnten, werden die intrazellulären Hitzeschockproteine Hsp70, Hsp90 und gp96 aus nekrotischen, nicht jedoch apoptotischen Zellen freigesetzt und induzieren in dendritischen Zellen die Expression inflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-12), kostimulatorischer Moleküle (CD80, CD86, CD40) und MHC Klasse II Proteine (Basu et al. 2000). Dies zeigt, dass Hitzeschockproteine nach Freisetzung in den extrazellulären Raum in der Lage sind, eine Aktivierung und Reifung von Immunzellen zu induzieren und somit die immunstimulatorische Wirkung nekrotischer Zellen zu vermitteln. In weiterführenden Untersuchungen konnten schließlich die beiden Toll-like Rezeptoren TLR2 und TLR4 als Signalrezeptoren identifiziert werden, welche durch extrazelluläre Hitzeschockproteine (Hsp70, Hsp60, gp96, Hsp90, Hsp32) aktiviert werden und in NF- κ B-abhängiger Weise die Expression von Adhäsionsmolekülen, inflammatorischen Zytokinen und kostimulatorischen Molekülen vermitteln (Kol et al. 2000, Ohashi et al. 2000, Vabulas et al. 2001, Vabulas et al. 2002a, Vabulas et al. 2002b, Vabulas et al. 2002c, Asea et al. 2002, Beg 2002, Kakimura et al. 2002, Dybdahl et al. 2002). Da Hitzeschockproteine die Eigenschaft besitzen, LPS mit hoher Affinität zu binden, ist gegenwärtig jedoch unklar, ob eine Kontamination mit Lipopolysaccharid für die Aktivierung des TLR4-Rezeptorkomplexes verantwortlich ist. Insbesondere in Studien, in welchen rekombinant in *E. coli* exprimierte Hitzeschockproteine eingesetzt wurden,

könnten die TLR4-aktivierenden Eigenschaften dieser Proteine zum Teil auf kontaminierendes LPS zurückzuführen sein (Bausinger et al. 2002, Wallin et al. 2002, Reed et al. 2003, Gao und Tsan 2003a, Gao und Tsan 2003b, Tsan und Gao 2004).

TLR2 und TLR4 sind zudem als Signalrezeptoren beschrieben, welche die inflammatorische Wirkung von extrazellulärem HMGB1 (high mobility group box 1 protein) vermitteln. HMGB1 ist ein chromatinbindendes Protein, das während einer zellulären Nekrose passiv freigesetzt wird (Scaffidi et al. 2002, Park et al. 2004). Arbeiten der Gruppe von Amer Beg zeigen, dass auch nekrotisches Zellmaterial zu einer Aktivierung von TLR2, insbesondere des heterodimeren TLR2/TLR6-Rezeptorkomplexes, führt sowie in TLR2-abhängiger Weise die Genexpression von Makrophagen und Fibroblasten moduliert (Li et al. 2001). Die TLR2-aktivierenden Faktoren nekrotischer Zellen wurden im Rahmen dieser Studie jedoch nicht identifiziert.

Weiterhin fungieren auch Komponenten der extrazellulären Matrix als endogene TLR-Agonisten. In diesem Zusammenhang wurde eine spezifische Aktivierung der Toll-like Rezeptoren TLR2 und TLR4 durch lösliches Biglykan sowie eine Aktivierung von TLR4 durch lösliches Heparansulfat, durch niedermolekulare Fragmente der Hyaluronsäure, durch die EDA-Domäne (type III repeat extra domain A) des Fibronektins und durch Fibrinogen beschrieben (Schaefer et al. 2005, Smiley et al. 2001, Johnson et al. 2002, Termeer et al. 2002, Taylor et al. 2004, Okamura et al. 2001). Diese Komponenten werden als Folge von Gewebsverletzungen oder Entzündungsreaktionen exprimiert (EDA-Domäne des Fibronektins, Biglykan), hydrolytisch aus der intakten extrazellulären Matrix und von Zelloberflächen freigesetzt (lösliches Biglykan, lösliches Heparansulfat, lösliche Hyaluronsäurefragmente) oder in den extravaskulären Raum transloziert (Fibrinogen) und scheinen aufgrund ihrer TLR-aktivierenden Eigenschaften an der Initiation und Verstärkung inflammatorischer Prozesse in den betroffenen Geweben beteiligt zu sein.

Auch das antibakterielle Peptid β -Defensin 2, dessen Expression in Darm- und Lungenepithelien in TLR-abhängiger Weise induziert wird, fungiert als endogener TLR-Agonist und ist in der Lage, in TLR4-abhängiger Weise eine Aktivierung und Reifung dendritischer Zellen zu induzieren (Biragyn et al. 2002). Dieses Peptid könnte als endogener TLR-Agonist Teil eines positiven Rückkopplungsmechanismus darstellen und somit an der Verstärkung lokaler Entzündungsreaktionen sowie an der Initiation einer adaptiven Immunantwort beteiligt sein.

Auch zelluläre Nukleinsäuren sind in der Lage, bestimmte Toll-like Rezeptoren zu aktivieren und stellen somit ebenfalls endogene TLR-Agonisten dar. Es konnte gezeigt werden, dass aus primär wie sekundär nekrotischen Zellen freigesetzte RNA und DNA in Gegenwart von Autoantikörpern aus dem Serum von SLE-Patienten (systemischer Lupus erythematodes) die Expression von IFN- α in plasmazytoiden dendritischen Zellen induzieren (Lovgren et al. 2004). Ergebnisse einer parallelen Studie lassen vermuten, dass sich dies zum Teil auf eine Aktivierung von TLR9 zurückführen lässt, da in humanen Immunkomplexen enthaltene körpereigene DNA als TLR9-Agonist fungiert und unter anderem die IFN- α -Genexpression in plasmazytoiden dendritischen Zellen induziert. Für eine Aktivierung von TLR9 ist hierbei eine vorausgehende und vom Rezeptor CD32 (Fc γ RIIa) vermittelte Endozytose dieser chromatinenthaltenden Immunkomplexe notwendig. Eine Aktivierung von

Einleitung

intrazellulärem TLR9 erfolgt schließlich in lysosomalen/endosomalen Kompartimenten (Means et al. 2005). Ein ähnlicher Mechanismus scheint auch für die Aktivierung autoreaktiver B-Zellen durch Immunkomplexe, bestehend aus dem Immunglobulin IgG2a und Chromatin, verantwortlich zu sein. Hierbei wird die Endozytose der Immunkomplexe vom B-Zell-Rezeptor vermittelt. Zudem konnten in

	pathogenassoziierte (PAMPs) und synthetische Agonisten	endogene Agonisten
TLR1/ TLR2	triacylierte bakterielle Lipoproteine und Lipopeptide Pam ₃ Cys-Ser-Lys ₄ (synthetisch)	nicht bekannt
TLR2	Lipoproteine, Lipopeptide (<i>Mycobacteria</i> , <i>Borrelia</i> , Mykoplasmen) Pam ₃ Cys-Ser-Lys ₄ (synthetisch) Peptidoglykan (Gram-positive Bakterien) Lipoteichonsäure (Gram-positive Bakterien) Lipoarabinomannan (<i>Mycobacteria</i>) Glykoinositolphospholipide (<i>Trypanosoma Cruzi</i>) phenol-lösliches Modulin (<i>Staphylococcus epidermis</i>) Porine (<i>Neisseria</i>), Hämagglutinin (Masernvirus) Zyosan (Hefe)	Hitzeschockproteine HMGB1 (high mobility group box 1 protein) lösliches Biglykan nicht identifizierte Komponente nekrotischer Zellen
TLR3	virale doppelsträngige RNA (Reoviren, Rotaviren) RNA aus Eiern von Helminthen (<i>Schistosoma mansoni</i>) Poly(I:C), Poly(A:U) (synthetische doppelsträngige RNA) siRNA, shRNA (synthetisch) mRNA (synthetisch)	RNA-Ribonukleoprotein-Komplexe RNA nekrotischer Zellen ?
TLR4	Lipopolysaccharid (Gram-negative Bakterien) Hsp60 (<i>Chlamydia pneumoniae</i>) F-Protein (respiratorischer Synzytial Virus, RSV) retrovirale Hüllproteine (MMTV, MMLV) Taxol (pflanzliches Diterpen)	Hitzeschockproteine HMGB1 (high mobility group box 1 protein) lösliches Heparansulfat lösliches Biglykan niedermolekulare Fragmente der Hyaluronsäure Fibronectin (EDA-Domäne) Fibrinogen β-Defensin 2
TLR5	Flagellin (begeißelte Bakterien)	nicht bekannt
TLR6/ TLR2	diacylierte bakterielle Lipoproteine und Lipopeptide MALP-2 (Mykoplasmen)	nicht identifizierte Komponente nekrotischer Zellen
TLR7	virale einzelsträngige RNA (HIV, VSV, Influenza Virus) Imidazoquinoline (Imiquimod, Resiquimod (R-848)) (synthetisch) Loxoribin (synthetisch) mRNA (synthetisch)	mRNA (isoliert aus Milzzellen)
TLR8	virale einzelsträngige RNA Imidazoquinoline (Imiquimod, Resiquimod (R-848)) (synthetisch)	nicht bekannt
TLR9	bakterielle unmethylierte CpG-DNA virale CpG-DNA (HSV, CMV) synthetische CpG-Oligodesoxynukleotide (CpG-ODN)	Chromatin-Immunglobulin-Komplexe
TLR10	nicht bekannt	nicht bekannt
TLR11	nicht identifizierte Komponente uropathogener Bakterien Profilin-ähnliches Protein (<i>Toxoplasma gondii</i>)	nicht bekannt

Tabelle 1.2.5: Pathogenassoziierte, synthetische und endogene TLR-Agonisten

(siRNA: small interfering RNA, shRNA: small hairpin RNA, MMTV: mouse mammary tumor virus, MMLV: Moloney murine leukemia virus, HIV: humanes Immundefizienzvirus, VSV: Vesicular-Stomatitis-Virus, HSV: Herpes simplex Virus, CMV: Cytomegalievirus)

der DNA vorkommende hypomethylierte CpG-Motive als TLR9-aktivierende Komponenten der chromatinenthaltenden Immunkomplexe identifiziert werden (Leadbetter et al. 2002, Viglianti et al. 2003). Des Weiteren wurde RNA, die mit der 70kDa Untereinheit des U1 Ribonukleoproteins (RNP) assoziiert und in Zellkernextrakten enthalten ist, als endogener TLR3-Agonist identifiziert (Hoffman et al. 2004). Zudem existieren Hinweise darauf, dass aus nekrotischen Zellen freigesetzte RNA die Genexpression vitaler Zellen in TLR3-abhängiger Weise moduliert und unter anderem die IFN- α -Genexpression in dendritischen Zellen induziert (Kariko et al. 2004a). Diese Hypothese wird durch eine kürzlich veröffentlichte Studie unterstützt. Wie Brentano und Mitarbeiter zeigen konnten, induzieren nekrotische Zellen ähnlich wie die synthetische doppelsträngige RNA Poly(I:C) die Expression von IFN- β , der beiden Chemokine IP-10 (CXCL10) und RANTES (CCL5) sowie des inflammatorischen Zytokins IL-6 in primären humanen TLR3-exprimierenden Fibroblasten (Brentano et al. 2005). In allen Fällen könnten doppelsträngige Sekundärstrukturen für die TLR3-aktivierenden Eigenschaften extrazellulärer endogener Ribonukleinsäuren verantwortlich sein. Die Tatsache, dass *in vitro* transkribierte mRNA oder aus Milzzellen isolierte mRNA in der Lage ist, in TLR7-abhängiger Weise die IFN- α -Genexpression plasmazytoider dendritischer Zellen zu induzieren, deutet darauf hin, dass auch zelluläre einzelsträngige RNA nach Freisetzung in den extrazellulären Raum einen potentiell endogenen TLR-Agonisten darstellt (Diebold et al. 2004).

Zusammenfassend zeigen diese Studien, dass Toll-like Rezeptoren neben pathogenassoziierten Strukturen auch eine Reihe körpereigener Komponenten erkennen, die im Rahmen von Infektionen oder Verletzungen beispielsweise durch Modifikation der extrazellulären Matrix gebildet oder aus nekrotischen Zellen freigesetzt werden. Diese endogenen TLR-Agonisten könnten in infizierten Geweben als körpereigenes Adjuvans fungieren und zu einer Verstärkung der Immunabwehr beitragen. Weiterhin könnten endogene TLR-Agonisten in verletzten Geweben als Alarmsignale dienen, welche auch in Abwesenheit von Pathogenen eine Initiation inflammatorischer Prozesse sowie eine nachfolgende Regeneration betroffener Gewebe ermöglichen.

1.3 Ziele der Arbeit

Apolipoprotein J ist ein sekretiertes heterodimeres Glykoprotein mit zytoprotektiven, antiapoptotischen, antiinflammatorischen und antioxidativen Eigenschaften, dessen Expression insbesondere in degenerierenden und verletzten Geweben sowie im Rahmen akuter Entzündungsreaktionen stark erhöht ist. Eine vermehrte Expression dieses Proteins beschränkt sich unter pathophysiologischen Bedingungen ausschließlich auf die vitalen Zellen betroffener Gewebe. Unter diesen Bedingungen scheint ApoJ eine Schutzfunktion auszuüben und insbesondere im Rahmen lokaler Entzündungsreaktionen eine voranschreitende Schädigung peripherer Gewebe zu limitieren. Trotz intensiver Forschung ist bislang jedoch unklar, über welche molekularen Mechanismen diese Eigenschaften von ApoJ vermittelt werden und welche Prozesse zur Induktion der ApoJ-Genexpression in degenerierenden Geweben führen.

Eine Arbeitshypothese unserer Gruppe postuliert in diesem Zusammenhang eine Funktion von ApoJ als induzierbare Komponente eines lokalen Systems, das an der Beseitigung von nekrotischem

Einleitung

Zellmaterial beteiligt ist. Bereits veröffentlichte sowie aktuelle Daten unserer Gruppe deuten darauf hin, dass ApoJ hierbei als Adaptorprotein fungiert, welches nach Bindung an denaturierte Proteine sowie Membranfragmente nekrotischer Zellen deren rezeptorvermittelte Endozytose durch umliegende vitale Zellen fördert. Die Endozytose wird hierbei von ApoJ-bindenden Rezeptoren der LDL-Rezeptorfamilie (LRP, Megalin) vermittelt (Bartl et al. 2001, O. Bergner unveröffentlicht). *In vitro* Untersuchungen zur Regulation des ApoJ-Gens zeigten darüber hinaus, dass unter serumhaltigen Bedingungen eine Inkubation mit sedimentierbaren Faktoren nekrotischer Fibroblasten eine Akkumulation von ApoJ-mRNA in embryonalen Fibroblasten der Zelllinie Rat1 induziert (Bach et. al. 2001). Dies ist ein Hinweis darauf, dass geschädigte Zellen durch Induktion der ApoJ-Genexpression in vitalen Zellen zu einer vermehrten Synthese dieses Proteins in degenerierenden Geweben beitragen können. Dass die ApoJ-induzierenden Komponenten dieser Zelltrümmer hitzestabil und trypsinresistent sind und zudem eine Inkubation mit phosphatidylserinhaltigen Liposomen in Rat1-Fibroblasten zu einer vermehrten Expression von ApoJ-mRNA führt, deutet darauf hin, dass in zellulären Membranfragmenten vorhandenes Phosphatidylserin an der Induktion der ApoJ-Genexpression in vitalen Zellen beteiligt sein könnte (Bach et. al. 2001). Im Rahmen weiterführender Untersuchungen stellte sich jedoch heraus, dass eine Inkubation mit phosphatidylserinhaltigen Liposomen ausschließlich in Gegenwart von fetalem Kälberserum, nicht jedoch unter serumfreien Bedingungen, eine Akkumulation von ApoJ-mRNA in Rat1-Fibroblasten induziert. Im Gegensatz hierzu führt die Inkubation mit nekrotischem Zellmaterial auch unter serumfreien Bedingungen zu einer Aktivierung der ApoJ-Genaktivität. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Modulation der ApoJ-Genexpression durch weitere Komponenten nekrotischer Zellen vermittelt wird (M. Baiersdörfer Diplomarbeit).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese noch unbekanntenen Komponenten nekrotischer Zellen zu charakterisieren. Durch Fraktionierung nekrotischer Zellen und Etablierung geeigneter Reinigungsschritte sollten die entsprechenden Faktoren anschließend isoliert werden. Das Ziel bestand darin, durch Identifizierung dieser Komponenten zugleich nähere Hinweise auf die Identität der an der Induktion der ApoJ-Genexpression beteiligten Signalrezeptoren lebender Zellen sowie der damit verbundenen Signaltransduktionskaskaden zu erhalten. Eine *in vitro* Analyse dieser regulatorischen Mechanismen sollte helfen, die Prozesse, die in degenerierenden und verletzten Geweben zu einer vermehrten Expression von ApoJ führen, besser zu verstehen. Eine Literaturrecherche zu Beginn dieser Arbeit zeigte, dass nur sehr wenige Veröffentlichungen existierten, die eine durch nekrotische Zellen induzierte Modulation der zellulären Genexpression beschreiben. Die beteiligten Signaltransduktionsmechanismen wurden in diesen Studien nicht charakterisiert. Vor diesem Hintergrund eröffnete die Untersuchung der Regulation des ApoJ-Gens zugleich die Möglichkeit, in diesem wichtigen Forschungsbereich neue Erkenntnisse zu gewinnen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Laborgeräte

2.1.1 Laborgeräte

Zentrifugen:	Eppendorf Zentrifuge 5402 Laborfuge III, Heraeus Universal 16R, Hettich Sigma 3K15
Ultrazentrifuge:	Centrikon T-1065, Kontron Instruments
SpeedVac-Konzentrator	Univapor UVC 150 H
Spektralphotometer	U-2000 Spectrophotometer, Hitachi
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Titertek Multiskan, Bratolomey Labortechnik
Elektrophoresekammern	AGS, Heidelberg EMBL, Heidelberg
Spannungsgerät	Elektrophorese-Powerpack P24, Biometra
Geldokumentation	MG 5/93, Hitachi Video Copy Processor, Mitsubishi Cybertech CS 1
pH-Meter	Kamera: Fairchild AX-0051
Mikroskop	pH-Meter 765 Calimatic, Knick
Fluoreszenzmikroskop	Hund Wilovert S, Wetzlar
Digitalkamera (Mikroskopie)	SIS F-View-Xs, Olympus
PCR-Prozessor	Uno-Thermoblock, Biometra
Hybridisierungssofen	DNA Thermal Cycler, Perkin Elmer Cetus
Phosphorimager	Bachofer BAS 1800, FujiFilm Imaging Plate BAS-MP 2025, Fujifilm Steuerungssoftware: BAS Reader Auswertungssoftware: AIDA Image Analyzer
CO ₂ -Inkubator	CO ₂ -Auto-Zero, Heraeus
FPLC-Apparatur	Econo System, Bio-Rad Fraktionssammler: Model 2110 Fraction Collector
Pipetten	Schreiber: BD 40, Kipp&Zonen Eppendorf, Gilson

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen (10µl-2500µl)	Greiner bio-one
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2,0ml)	Eppendorf
Plastikröhrchen (15ml, 50ml)	Greiner bio-one
Zellkulturgefäße: Flaschen (75cm ² , 175cm ²), Schalen (Ø 9,4cm)	Greiner bio-one
96-Loch Mikrotiterplatten (Zellkultur)	Greiner bio-one
Kryoröhrchen	Greiner bio-one
Ultrazentrifugenröhrchen (Ultra clear, 13×51mm)	Beckmann
Nylonmembran, positiv geladen	Roche Diagnostics
Blotting-Papier (GB002)	Schleicher&Schuell
Autoradiographiefilm (Hyperfilm MP)	Amersham-Pharmacia
Photochemikalien (Entwickler+Fixierer)	Kodak
Zap Cap Sterilfiltereinheiten (500ml, 0,22µm)	Schleicher&Schuell
Sterilfilter (0,22µm, Celluloseacetat)	
Einwegspritzen, steril (1ml, 5ml, 50ml)	
Kanülen, steril (Ø 22,5 gauge)	
Einwegküvetten (Kunststoff, 1,5ml Volumen, 1cm Schichtdicke)	

Material und Methoden

2.1.3 Chemikalien

Hier nicht aufgeführte Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Roth oder Merck bezogen.

Aceton	AppliChem
Agarose MP	Roche Diagnostics
Agarose peqGOLD Universal Agarose	peqlab
Ampicillin	Merck
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma
Borsäure	Sigma
Camptothecin	Sigma
Casein	Roth
CHAPS	Sigma
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	AppliChem
Dextranblau (MW 2.000.000)	Sigma
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth
DTT (Dithiothreitol)	Sigma
EDTA	Merck
EGTA	Sigma
Ficoll (MW 400.000)	Sigma
Formaldehyd (37%)	Merck
Formamid	Merck
Glycin	Merck
GTC (Guanidinthiocyanat)	Merck
Hefeextrakt	Roth
Isoamylalkohol	Roth
β -Mercaptoethanol	Sigma
MOPS (3-(N-Morpholino-)-propansulfonsäure)	AppliChem
Natriumcitrat	Merck
Natriumlaurylsarkosin	Sigma
Nonidet P40	Roche Diagnostics
Polyvinyl-Pyrrolidon (MW 360.000)	Sigma
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Roth
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Roth
Trichloressigsäure (TCA)	Roth
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	AppliChem
Trypan-Blau-Lösung	Sigma

2.1.4 Proteine, Nukleinsäuren und bioaktive Substanzen

Katalase (aus Rinderleber)	Sigma
Cytochrom c	Sigma
BSA, Fraktion V	Sigma
Proteinase K	Roche Diagnostics
RNAse A (Ribonuklease A)	Roche Diagnostics
DNase I (Desoxyribonuklease I)	Roche Diagnostics
Benzonase	Sigma
Lysozym	Sigma
Trypsin (aus Rinderpankreas)	Sigma
TNF- α (Maus, rekombinant exprimiert)	Roche Diagnostics
Pam ₃ Cys-Ser-Lys ₄	Alexis Biochemicals
Polyinosin-Polycytidin (Poly(I:C))	Calbiochem
Polyinosin (Poly(I))	Sigma
Polycytidin (Poly(C))	Sigma
Polydesoxyinosin-Polydesoxycytidin (Poly(dI:dC))	Sigma
Lipopolysaccharid (aus <i>Salmonella minnesota</i> R595, ultra-pure)	Alexis Biochemicals

RNA TypIV (aus Kalbsleber)	Sigma
RNA TypIII (aus Hefe)	Sigma
t-RNA (aus Hefe)	Sigma

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung stabiler Zelllinien

Da Säugetierzellen in einer *in vitro*-Kultur sehr anfällig für Kontaminationen durch Mikroorganismen aus der Umwelt sind, wurden sämtliche Zellkulturarbeiten unter sterilen Bedingungen in einer Laminar-Flow-Bank durchgeführt. Alle Lösungen und Materialien wurden vor Gebrauch in geeigneter Weise sterilisiert. Zusätzlich wurden alle Gefäße, die Lösungen oder Medien enthielten, nur unter der Sterilbank geöffnet und zuvor gründlich mit 70% Ethanol abgewaschen. Es wurde nur mit Einweghandschuhen gearbeitet, die vor Tätigkeitsbeginn mit Sterilium oder 70% Ethanol desinfiziert wurden.

Alle Zellen wurden in Kulturflaschen in einem geeigneten Volumen an Medium (175 cm² Kulturflasche: 25ml / 75 cm² Kulturflasche: 20ml) bei 37°C und einem CO₂-Partialdruck von 5% kultiviert. Die Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz in ein neues Zellkulturgefäß passagiert (je nach Zelllinie alle 4-6 Tage). Alle 2-3 Tage erfolgte ein vollständiger Wechsel des Kulturmediums.

2.2.1.1.1 Verwendete Zelllinien

Rat1:	embryonal Fibroblasten, <i>Rattus norvegicus</i> (Fischerratte) stabile Zelllinie (spontan immortalisiert) (Van Roy et al. 1986)
MDCK:	epitheliale Nierentubuluszellen, <i>Canis familiaris</i> stabile Zelllinie (Madin und Darby, 1958)
J774A.1:	Monozyten/Makrophagen, <i>Mus musculus</i> (BALB/c) stabile Zelllinie, Tumorzellen (Ralph et al. 1975; Ralph und Nakoinz 1977)
HEK 293:	embryonale Nierenzellen, <i>Homo sapiens</i> stabile Zelllinie, adenoviral transformiert (Graham et al. 1977)
HeLa:	epitheliale Gebärmutterhalszellen, <i>Homo sapiens</i> stabile Zelllinie, Karzinomazellen (Scherer und Hoogasian 1954)
BHK21:	Fibroblasten aus Nierengewebe, <i>Microcrictetus aureus</i> (Goldhamster) stabile Zelllinie, SV40-transformiert (Cooper und Black 1963)
MEF-1, PEA-13:	embryonal Fibroblasten, <i>Mus musculus</i> stabile Zelllinien, SV40-transformiert (Willnow und Herz 1994) MEF-1: LRP +/+ PEA-13: LRP -/- (funktionelle Defizienz)
MEF-1, MEF-2:	embryonal Fibroblasten, <i>Mus musculus</i> stabile Zelllinien, SV40-transformiert (Prof. Dr. Joachim Herz, Dallas) MEF-1: LRP +/+ MEF-2: LRP -/- (genetische Defizienz)
CRL2018:	glatte Gefäßmuskelzellen der Aorta, <i>Rattus norvegicus</i> stabile Zelllinie, SV40-transformiert (Reilly 1990)

Material und Methoden

10A, 1461, 6A3:	embryonale Dottersackzellen, <i>Mus musculus</i> stabile Zelllinien, SV40-transformiert (Niemeier et al. 1999)		
10A:	LRP +/-	Megalyn	+/+
1461:	LRP -/-	Megalyn	+/+
6A3:	LRP -/-	Megalyn	-/-

2.2.1.1.2 Medien und Lösungen

Sämtliche Medienkomponenten und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, von Biochrom bezogen. Alle Puffer und Medien wurden mit Reinstwasser (18,2 M Ω) angesetzt.

PBS ^{-/-} -Puffer:	PBS ^{-/-} Dulbecco (w/o Ca ⁺⁺ Mg ⁺⁺), 9.55 g/l in H ₂ O		
Zusammensetzung:	8 % (w/v)	NaCl	
	0.2 % (w/v)	KCl	
	1.15 % (w/v)	NaH ₂ PO ₄	
	0.2 % (w/v)	KH ₂ PO ₄	

Insulin-Transferrin-Natriumselenit-Supplement (Roche Diagnostics):

Zusammensetzung (500 \times in PBS ^{-/-}):	2.5 mg/ml	Insulin
	2.5 mg/ml	Transferrin
	2.5 μ g/ml	Natriumselenit

Trypsin/EDTA (10 \times):	0.5% (w/v)	Trypsin
	0.2% (w/v)	EDTA

N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin, 200mM (Biochrom)

Glutamax (L-Alanyl-L-Glutamin), 200mM (Gibco)

Zusammensetzung der zelllinienspezifischer Kulturmedien (500ml):

Rat1:	385 ml	H ₂ O
	50 ml	Dulbecco's MEM (10 \times) / 4.5 g/l D-Glucose
	10 ml	L-Glutamin (200mM)
	25 ml	NaHCO ₃ (7.5% w/v)
	5 ml	Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)
	25 ml	fetales Kälberserum (FKS, Gibco)

MEF-1, PEA-13:	365 ml	H ₂ O
	50 ml	Dulbecco's MEM (10 \times) / 4.5 g/l D-Glucose
	5 ml	L-Glutamin (200mM)
	25 ml	NaHCO ₃ (7.5% w/v)
	5 ml	Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)
	50 ml	fetales Kälberserum (FKS, Gibco)

10A, 1461, 6A3:	360 ml	H ₂ O
	50 ml	Dulbecco's MEM (10 \times) / 4.5 g/l D-Glucose
	10 ml	L-Glutamin (200mM)
	5 ml	nicht-essentielle Aminosäuren (100 \times)
	5 ml	HEPES (1M)
	15 ml	NaHCO ₃ (7.5% w/v)
	5 ml	Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)
	50 ml	fetales Kälberserum (FKS, Gibco)

MDCK :	390	ml	H ₂ O
	50	ml	MEM-Earle's (10×)
	5	ml	L-Glutamin (200mM)
	5	ml	nicht-essentielle Aminosäuren (100×)
	5	ml	HEPES (1M)
	15	ml	NaHCO ₃ (7.5% w/v)
	5	ml	Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)
	25	ml	fetales Kälberserum (FKS, Gibco)
HeLa :	365	ml	H ₂ O
	50	ml	MEM-Earle's (10×)
	5	ml	L-Glutamin (200mM)
	5	ml	nicht-essentielle Aminosäuren (100×)
	5	ml	HEPES (1M)
	15	ml	NaHCO ₃ (7.5% w/v)
	5	ml	Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)
	50	ml	fetales Kälberserum (FKS, Gibco)
BHK21 :	305	ml	H ₂ O
	50	ml	Glasgow-MEM (10×, Gibco)
	15	ml	L-Glutamin (200mM)
	5	ml	nicht-essentielle Aminosäuren (100×)
	5	ml	HEPES (1M)
	15	ml	NaHCO ₃ (7.5% w/v)
	5	ml	Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)
	50	ml	Tryptosephosphat Broth (2,9 g/l, Gibco)
50	ml	fetales Kälberserum (FKS, Gibco)	
HEK 293:	385	ml	H ₂ O
	50	ml	Dulbecco's MEM (10×) / 4.5 g/l D-Glucose
	5	ml	L-Glutamin (200mM)
	5	ml	HEPES (1M)
	5	ml	Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)
	50	ml	fetales Kälberserum (FKS, Gibco)
J774A.1:	355	ml	H ₂ O
	50	ml	Dulbecco's MEM (10×) / 4.5 g/l D-Glucose
	10	ml	L-Glutamin (200mM)
	5	ml	Natriumpyruvat (100mM)
	25	ml	NaHCO ₃ (7.5% w/v)
	5	ml	Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)
	50	ml	fetales Kälberserum (FKS, Gibco)
CRL 2018:	375	ml	H ₂ O
	50	ml	Dulbecco's MEM (10×) / 4.5 g/l D-Glucose
	10	ml	L-Glutamin (200mM)
	10	ml	NaHCO ₃ (7.5% w/v)
	5	ml	Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)
	50	ml	fetales Kälberserum (FKS, Gibco)

2.2.1.1.3 Passagieren von Zellen

Alle Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz in einem geeigneten Verhältnis gesplittet (1:5 – 1:40). Dazu wurde das alte Medium abgenommen, die Zellen 2× mit PBS^{-/-} (5-10 ml) gewaschen und trypsinisiert. Hierzu wurden 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung auf dem Zellrasen verteilt, nach kurzem Einwirken wieder abgezogen. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C, bis sich der Zellrasen

Material und Methoden

vollständig vom Gefäßboden gelöst hatte. Die Zellsuspension wurde dann in 10ml frischem Medium aufgenommen und nach Vereinzeln der Zellen für 5 Minuten bei 100×g zentrifugiert, um das Trypsin zu entfernen. Die sedimentierten Zellen wurden dann in 10ml Medium resuspendiert und 250µl-2ml dieser Suspension in neue Kulturflaschen mit einem geeigneten Volumen an frischem Medium gegeben. Anschließend wurden die Zellen durch vorsichtiges Schwenken gleichmäßig im Kulturgefäß verteilt.

2.2.1.1.4 Stimulierung von Zellen für Northern-Blot Analysen

Für Northern-Blot-Analysen wurden in der Regel jeweils 1×10^6 Rat1-Fibroblasten jeweils in \varnothing 9,4cm Zellkulturschalen ausgesät und für 48h unter serumhaltigen Bedingungen bis zu einer Konfluenz von etwa 80% kultiviert. Nachdem das Kulturmedium vollständig entfernt worden war, wurden die Zellen 2× mit jeweils 5ml PBS^{-/-} gewaschen. Anschließend wurden die Rat1-Fibroblasten unter den in den einzelnen Experimenten angegebenen Bedingungen für 1-48h in einem Gesamtvolumen von 10ml frischem Kulturmedium inkubiert. Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeiten wurde zur Entfernung toter Zellen mehrmals gründlich mit PBS^{-/-} gewaschen und der ApoJ-mRNA-Gehalt der lebenden Rat1-Fibroblasten nach Präparation der Gesamt-RNA mittels Northern-Blot-Analyse untersucht.

Bei einem Teil der Experimente wurden die Zellen zunächst für 24h unter serumfreien Bedingungen präinkubiert. Hierzu wurden 1×10^6 Rat1-Zellen, 1×10^6 10A-Zellen bzw. 2×10^6 CRL2018-Zellen in \varnothing 9,4cm Zellkulturschalen ausgesät und für 48h unter serumhaltigen Bedingungen bis zu einer Konfluenz von etwa 80% kultiviert. Nach vollständiger Entfernung des Kulturmediums wurden die Zellen 2× mit jeweils 5ml PBS^{-/-} gewaschen und anschließend für 24h in 9ml frischem und mit Insulin-Transferrin-Natriumselenit supplementiertem serumfreiem Medium präinkubiert. Nach Zugabe von jeweils 1ml der in den entsprechenden Experimenten angegebenen Substanzen erfolgte die anschließende Inkubation der Zellen für weitere 1-48h in einem Gesamtvolumen von 10ml. Anschließend wurde zur Entfernung toter Zellen mehrmals gründlich mit PBS^{-/-} gewaschen und der ApoJ-mRNA-Gehalt der lebenden Zellen nach Präparation der Gesamt-RNA mittels Northern-Blot-Analyse untersucht.

2.2.1.1.5 Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung)

Zellen einer großen Kulturflasche (175 cm²) wurden bis zur Konfluenz kultiviert, 2× mit 10ml PBS^{-/-} gewaschen, trypsinisiert, in 10ml Medium aufgenommen und für 5min bei 100×g sedimentiert. Die Zellen wurden anschließend in 9ml FKS (fetales Kälberserum) resuspendiert und für 10min auf Eis gestellt. Danach wurde 1ml DMSO dazugegeben, kurz gemischt und 1ml Aliquots der Zellsuspension in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden anschließend in einen Styroporbehälter verpackt, mit Klebeband abgedichtet und sofort auf -80°C gestellt. Zweck dieses Verfahrens ist es, die Zellen möglichst langsam auf -80°C herabzukühlen (ideal 1°C / min). Am nächsten Tag wurden einige Röhrchen zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Verbrauchsaliquots wurden für maximal 12 Monate bei -80°C aufbewahrt.

Zur Reaktivierung von Zellen wurde ein Kryoröhrchen zügig aufgetaut und die Zellsuspension sofort in eine mittlere Kulturflasche (75 cm²) mit 10ml vorgewärmtem (37°C) Kulturmedium gegeben. Hierbei bestand die Gefahr der Zellschädigung durch einen osmotischen Schock, da die Zellen aus einer Umgebung mit relativ hohem osmotischem Druck (90% FKS) in das niederosmotische Medium überführt wurden. Daher wurde die Zellsuspension langsam in das Medium pipettiert und erst nach 1-2min vorsichtig im Medium verteilt. Das Kulturvolumen wurde anschließend auf 20ml mit Medium aufgefüllt. Nach Kultivierung für 18-24h wurde das Medium gewechselt, um das aus dem Einfriermedium stammende DMSO vollständig zu entfernen.

2.2.1.1.6 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Um definierte Zellmengen für Experimente auszusäen oder eine bestimmte Anzahl an nekrotischen Zellen zu präparieren, war es notwendig, vorher eine Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer durchzuführen.

Nach Trypsinisierung und Sedimentation der Zellen wurden diese in einem definierten Volumen an frischem Kulturmedium resuspendiert. Nach Herstellung einer verdünnten Suspension wurde die Zellzahl eines Aliquots mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Bei jeder Zellzahlbestimmung wurden mindestens 4 Großquadrate ausgezählt. Durch folgende Formel wurde anschließend die Zelldichte der unverdünnten Ausgangssuspension ermittelt:

$$\frac{\sum \text{Zellen in Großquadraten}}{\sum \text{ausgezählter Großquadrate}} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellzahl / ml}$$

Bei allen Arbeitsschritten wurden abgeschnittene Pipettenspitzen verwendet, um ein Aufbrechen der Zellen durch Scherkräfte zu vermeiden.

2.2.1.2 Präparation apoptotischer Rat1-Fibroblasten

Zur Induktion der Apoptose in vitalen Rat1-Fibroblasten wurde in dieser Arbeit die Substanz Camptothecin genutzt. Camptothecin ist ein DNA-Topoisomerase I-Inhibitor und besitzt die Eigenschaft, in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen Apoptose auszulösen. Die Funktion der DNA-Topoisomerase I besteht darin, superhelikale genomische DNA zu entwinden, um diese für replikative und transkriptionelle Prozesse zugänglich zu machen. Der Mechanismus besteht aus dem Einführen eines Einzelstrangbruches, der Entwindung der DNA zu einer thermodynamisch günstigeren Konformation und anschließender koordinierter Religation des Einzelstrangbruches. Während dieses Prozesses wird das durch den Einzelstrangbruch entstehende freie 5'-Ende der DNA kovalent an die Topoisomerase I gebunden. Die Bindung von Camptothecin an die Topoisomerase I stabilisiert diese intermediären DNA-Enzym-Komplexe und verhindert auf diese Weise die Religation der Einzelstrangbrüche. Als Folge kommt es zu einer sterischen Blockierung von DNA-Polymerasen und RNA-Polymerasen und somit zu einer Inhibierung replikativer und transkriptioneller Vorgänge (Liu et al. 2000, Morris und Geller 1996). Die kovalent mit der DNA

Material und Methoden

verknüpften Topoisomerase I-Moleküle werden nach Ubiquitinierung proteasomal abgebaut, was zur Folge hat, dass freie Einzelstrangbrüche in der DNA zurückbleiben. Diese Schädigung genomischer DNA führt letztlich zur Aktivierung zellulärer Caspasen und somit zur Apoptose der betroffenen Zelle (Kaufmann, 1998).

Lösungen:

Camptothecin, 2mM in DMSO

Trypanblau-Lösung

Protokoll:

Rat1-Fibroblasten wurden in \varnothing 9,4cm Zellkulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert, 2× mit PBS^{-/-} gewaschen und mit 3 μ M Camptothecin bzw. DMSO (Kontrolle) in 6ml serumfreiem Medium je Kulturschale für 18h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Medium der Zellkulturschalen mit den sich abgelösten Zellen durch Dekantierung in 50ml Röhrchen überführt. Die restlichen, noch adhärenenten abgerundeten Zellen in den Zellkulturschalen wurden unter leichtem Klopfen in 5ml PBS^{-/-} abgelöst und ebenfalls in das 50ml Röhrchen gegeben. Nach Sedimentation bei 500×g für 15min und 4°C wurden die Zellen eines 50ml Röhrchens in 5ml serumfreiem Medium aufgenommen, die Suspensionen aller 50ml Röhrchen vereinigt und ein weiteres Mal bei 500×g für 10min und 4°C zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 20ml serumfreiem Medium resuspendiert. 100 μ l dieser Suspension wurden in einem Eppendorfgesäß mit 400 μ l serumfreiem Medium und 500 μ l Trypanblau-Lösung gemischt und für 2min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Verdünnung der Zellsuspension betrug hierbei 1:10. Anschließend wurde die Zellzahl eines Aliquots mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt (2.2.1.1.6) und die Zelldichte der Ausgangssuspension auf 5×10⁶ Zellen/ml eingestellt. Die Zugabe der Trypanblau-Lösung diente zur Detektion von Zellen, die ihre Membranintegrität verloren hatten. Durch die Komplexbildung des Farbstoffes mit intrazellulären Proteinen wiesen solche Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop eine intensive Blaufärbung auf. Diese wurden als sekundär nekrotische Zellen definiert. Apoptotische Zellen mit intakter Plasmamembran werden dagegen nicht angefärbt. Der Anteil trypanblau-positiver Zellen betrug in der Regel 20-30 %. Die präparierte Zellpopulation war somit heterogen. Weiterhin ist anzumerken, dass bei dieser Präparation sämtliche Resuspensionsschritte äußerst vorsichtig mit Glaspipetten oder abgeschnittenen Pipettenspitzen durchgeführt wurden, um eine Beschädigung der Zellmembran durch Scherkräfte so weit wie möglich auszuschließen.

Die auf diese Weise präparierten Zellen wurden als apoptotische Zellen direkt für die Experimente eingesetzt. Aus 40 \varnothing 9,4cm Zellkulturschalen konfluenter Rat1-Fibroblasten konnten in der Regel 5×10⁷ - 1×10⁸ apoptotische Zellen präpariert werden. Vor Beginn der Experimente wurden die auf diese Weise präparierten Rat1-Fibroblasten zudem auf apoptosespezifische Merkmale hin untersucht, um eine Induktion apoptotischer Prozesse als Folge einer Inkubation mit Camptothecin sicherzustellen (2.2.1.2.1).

2.2.1.2.1 Methoden zum Nachweis apoptosespezifischer Merkmale camptothecin-behandelter Rat1-Fibroblasten

2.2.1.2.1.1 Colorimetrischer Nachweis aktivierter Caspase 3

Das Prinzip dieser Methode basiert auf einem enzymatischen Nachweis der zellulären Caspase 3-Aktivität. Dieses zytosolische Enzym gehört zur Familie der Cysteinproteasen und spielt eine zentrale Rolle in der Ausführung des apoptotischen Programms (Nicholson et al. 1995). In lebenden Zellen liegt das Enzym als inaktive Procaspase 3 vor, das im Verlauf der Apoptose proteolytisch aktiviert wird. Nach Präparation von zytosolischem Extrakt apoptotischer Zellen ist es möglich, die enzymatische Aktivität dieser Protease durch Zugabe des C-terminal markierten Peptides Z-Asp-Glu-Val-Asp-pNA, einem Caspase 3-Substrat, nachzuweisen. Durch die enzymatische Reaktion wird das Chromophor p-Nitroanilin (pNA) freigesetzt. Dies führt zu einer erhöhten Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 405nm. Eine Inkubation von Zellextrakt mit dem markierten Peptid und eine anschließende Bestimmung der Absorption dieser Reaktionslösung lässt somit eine Aussage darüber zu, ob in Zellen eine Aktivierung von Caspase 3 und somit eine Induktion apoptotischer Prozesse stattgefunden hat. Um zu gewährleisten, dass es sich hierbei um eine Caspase 3-katalysierte und nicht um eine Umsetzung des Substrats durch andere zelluläre Proteasen handelt, wurde in entsprechenden Kontrollansätzen der Reaktion ein kompetitiver Caspase 3-Inhibitor (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-COH) zugesetzt (Garcia-Calvo et al. 1998). Weiteren Kontrollansätzen wurde Aufschlusspuffer statt Zellextrakt zugesetzt, um die basale Absorption der Reaktionslösung zu bestimmen.

Lösungen und Reagenzien:

Aufschlusspuffer, pH 7,5:	20	mM	HEPES
	10	mM	KCl
	1,5	mM	MgCl ₂
	1	mM	EDTA
	1	mM	EGTA
	1	mM	DTT

Reaktionspuffer, pH 7,2:	50	mM	HEPES
	75	mM	NaCl
	5	mM	DTT
	0,1%	(w/v)	CHAPS

Caspase 3-Substrat: Z-Asp-Glu-Val-Asp-pNA (500µM in DMSO)
(Alexis, ALX-260-048-M001)

Caspase 3-Inhibitor: Ac-Asp-Glu-Val-Asp-COH (10µM in DMSO)
(Alexis, ALX-260-030-M001)

Protokoll:

Rat1-Fibroblasten wurden in Ø 9,4cm Zellkulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert, 2× mit PBS⁻ gewaschen und mit 3µM Camptothecin in serumfreiem Medium für 24h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Medium zweier Zellkulturschalen mit den sich abgelösten Zellen

Material und Methoden

durch Dekantierung in 15ml Röhrchen überführt. Die restlichen, noch adhärennten abgerundeten Zellen in den Zellkulturschalen wurden unter leichtem Klopfen in 5ml PBS^{-/-} abgelöst und ebenfalls in das 15ml Röhrchen gegeben. Nach Sedimentation bei 500×g für 30min und 4°C wurden die Zellen in 1ml PBS^{-/-} resuspendiert, in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und nochmals für 5min bei 2500×g sedimentiert. Alle Arbeitsschritte wurden mit abgeschnittenen Pipettenspitzen durchgeführt, um ein Aufbrechen der Zellen durch Scherkräfte zu vermeiden. Nach Resuspension der Zellen in 120µl Aufschlusspuffer wurden diese durch 5-maliges Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff aufgebrochen, die Zelltrümmer für 30min bei 14.000×g sedimentiert und der Überstand anschließend als Zellextrakt für den colorimetrischen Caspase 3-Nachweis eingesetzt.

Ansätze:	15 µl	Zellextrakt bzw. Aufschlusspuffer
	35 µl	Reaktionspuffer
	5 µl	DMSO bzw. Caspase 3-Inhibitor
	6 µl	Caspase 3-Substrat

Die Ansätze wurden für 90min bzw. 135min bei 37°C inkubiert, die Reaktion anschließend mit 939µl eiskaltem H₂O gestoppt und die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 405nm im Spektralphotometer bestimmt.

2.2.1.2.1.2 Nachweis einer apoptoseabhängigen DNA-Fragmentierung

Die Fragmentierung des Chromatins ist im zeitlichen Ablauf des zellulären apoptotischen Programms ein spätes Ereignis. Die Hydrolyse der genomischen DNA wird durch zelluläre Endonukleasen vermittelt. Hierbei spielt eine als CAD (caspase-aktivierte DNase) bezeichnete Endonuklease eine wichtige Rolle. In lebenden Zellen ist dieses zytosolische Enzym mit dem Protein ICAD (Inhibitor der CAD) komplexiert und somit katalytisch inaktiv. Im Verlauf der Apoptose erfolgt eine Aktivierung des Enzyms Caspase 3, welches schließlich das Protein ICAD proteolytisch inaktiviert. Als Folge kommt es zu einer Freisetzung der aktiven Form der CAD und deren Translokation in den Nukleus. Dort hydrolysiert CAD das Chromatin in den Linker-Regionen zwischen jeweils zwei Nukleosomen, was schließlich zu einer Freisetzung genomischer DNA-Fragmente in das Zytosol führt (Sakahira et al. 1998, Enari et al. 1998, Nagata 2000). Die entstehenden DNA-Fragmente besitzen eine Größe von ca. 180bp (Monomer) bzw. eines entsprechenden Vielfachen (Oligomere). Nach Isolation aus apoptotischen Zellen und elektrophoretischer Trennung sind diese zytosolischen DNA-Fragmente als charakteristisches „Leitermuster“ im Agarosegel zu erkennen. Diese Methode ist als Apoptosenachweis anzusehen, da bei nekrotischem Zelltod eine solche koordinierte Degradierung des Chromatins in DNA-Fragmente definierter Größe nicht auftritt. DNA nekrotischer Zellen erscheint im Agarosegel als Folge einer ungerichteten Degradierung des Chromatins als Schmier. Die in vorliegender Arbeit angewandte Methode zum Nachweis apoptotischer DNA-Fragmente basiert auf einem modifizierten Protokoll des von Herrmann et al. beschriebenen Verfahrens (Herrmann et al. 1994).

Lösungen:

TEN-Puffer, pH 7,6: 50 mM Tris/HCl
 20 mM EDTA
 1%(w/v) Nonidet P40 (NP40)

RNAse A, 10µg/ml

Proteinase K, 2mg/ml

SDS, 10% (w/v)

Natriumacetat, 3M, pH 5,5

Protokoll:

Rat1-Fibroblasten wurden in Ø 9,4cm Zellkulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert, 2× mit PBS^{-/-} gewaschen und mit 3µM Camptothecin bzw. DMSO (Kontrolle) in serumfreiem Medium für 18h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Medium zweier Zellkulturschalen mit den sich abgelösten Zellen durch Dekantierung in 15ml Röhrchen überführt. Die restlichen, noch adhärennten abgerundeten Zellen in den Zellkulturschalen wurden unter leichtem Klopfen in 5ml PBS^{-/-} abgelöst und ebenfalls in das 15ml Röhrchen gegeben. Adhärennte Zellen wurden durch Trypsinbehandlung vom Gefäßboden gelöst, in 5ml PBS^{-/-} resuspendiert und in 15ml Röhrchen überführt.

Nach Sedimentation bei 500×g für 20min und 4°C wurden die Zellen in 1ml PBS^{-/-} resuspendiert, in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und nochmals für 5min bei 2500×g sedimentiert. Alle Arbeitsschritte wurden mit abgeschnittenen Pipettenspitzen durchgeführt, um ein Aufbrechen der Zellen durch Scherkräfte zu vermeiden. Die Zellyse erfolgte für maximal 1min durch Resuspension der Zellen in 180µl TEN-Puffer. Anschließend wurden die Zellkerne für 5min bei 3000×g sedimentiert und der Überstand mit RNAse A und Proteinase K verdaut, um Ribonukleinsäuren und Proteine zu entfernen. Die im Überstand enthaltene DNA wurde schließlich mit Ethanol präzipitiert.

Ansatz:	180	µl	Zelllysat
	20	µl	10% (w/v) SDS
	10	µl	RNAse A (10µg/ml)
		→	Inkubation für 2h bei 55°C
+ 20	µl		Proteinase K (2mg/ml)
		→	Inkubation ü.N. bei 50°C
Ethanol-fällung der DNA:	+ 26	µl	3M Natriumacetat, pH 5.5 (¹ / ₉ × Volumen)
	+ 640	µl	Ethanol, eiskalt (2,5 × Volumen)
		→	DNA-Fällung für 2h bei -80°C
		→	Sedimentation für 90min bei 14.000×g, 4°C

Die sedimentierte DNA wurde luftgetrocknet und anschließend in 100µl H₂O aufgenommen und pro Ansatz 20µl für eine Agarosegelelektrophorese (2,5% (w/v) Agarose) eingesetzt (2.2.5.3). Analyse und Dokumentation der DNA erfolgten anschließend unter UV-Licht mit entsprechender Geldokumentationsanlage.

2.2.1.2.1.3 Nachweis von externalisiertem Phosphatidylserin durch Annexin V

In der Plasmamembran lebender Zellen, die eine Lipiddoppelschicht darstellt, weisen bestimmte Phospholipide eine asymmetrische Verteilung auf. In der nach außen weisenden Schicht finden sich ausschließlich ungeladene Phospholipidmoleküle wie z.B. Phosphatidylcholin. Negativ geladene Phospholipide wie z.B. Phosphatidylserin sind dagegen nur in der inneren, dem Zytoplasma zugewandten Schicht enthalten. Diese Asymmetrie wird von lebenden Zellen unter Energieverbrauch aufrechterhalten. In einem frühen Stadium der Apoptose kommt es zu einem Zusammenbruch dieser Asymmetrie, was dazu führt, dass Phosphatidylserin auch auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran exponiert wird. Bei diesen Vorgängen bleibt die Integrität der Plasmamembran erhalten (Martin et al. 1995).

Das Prinzip des hier verwendeten Nachweises von zelloberflächenexponiertem Phosphatidylserin beruht auf der phosphatidylserinspezifischen Bindung des Proteins Annexin V (van Engeland et al. 1998). Dieses Protein wurde in Form eines Biotin-Konjugats eingesetzt. An die Plasmamembran apoptotischer Zellen gebundene Annexin V-Biotin-Konjugate wurden schließlich in indirekter Weise mittels biotinspezifischem, fluoreszenzmarkiertem Streptavidin nachgewiesen. Hierfür wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 gekoppeltes Streptavidin verwendet.

Lösungen und Reagenzien:

Bindepuffer, pH 7,4:	10	mM	HEPES
	140	mM	NaCl
	2,5	mM	CaCl ₂

Annexin V (human, rekombinant), Biotin-Konjugat (Alexis, ALX-209-002-T020)

Streptavidin-Cy3-Konjugat (Dr. Oliver Ulrich, Universität Mainz)

Protokoll:

Rat1-Fibroblasten wurden in Ø 9,4cm Zellkulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert, 2× mit PBS⁻ gewaschen und mit 3µM Camptothecin in serumfreiem Medium für 18h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Medium zweier Zellkulturschalen mit den sich abgelösten Zellen durch Dekantierung in 15ml Röhrchen überführt. Die restlichen, noch adhärennten abgerundeten Zellen in den Zellkulturschalen wurden unter leichtem Klopfen in 5ml PBS⁻ abgelöst und ebenfalls in das 15ml Röhrchen gegeben. Nach Sedimentation bei 500×g für 20min und 4°C wurden die Zellen in 300µl Bindepuffer resuspendiert und 30µl hiervon wurden auf einen Objektträger überführt. Alle Arbeitsschritte wurden mit abgeschnittenen Pipettenspitzen durchgeführt, um ein Aufbrechen der Zellen durch Scherkräfte zu vermeiden.

Alle folgenden Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur in einer mit feuchtem Blotting-Papier ausgelegten Kammer durchgeführt, um ein Austrocknen des Präparats zu vermeiden. 5µl des Annexin V-Biotin-Konjugates wurden direkt zu den Zellen auf dem Objektträger gegeben und für 20min inkubiert. Anschließend wurden 5µl des 1:500 in PBS⁻ verdünnten Streptavidin-Cy3-Konjugates zugegeben und für weitere 20min inkubiert. Um eine unspezifische Bindung des

Streptavidins an die Zellen auszuschließen, wurde eine entsprechende Kontrolle ausschließlich mit Streptavidin-Cy3-Konjugat inkubiert. Nach Auflegen von Deckgläschen wurden die Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert und mit einem digitalen Kamerasystem dokumentiert.

2.2.1.3 Präparation von konditioniertem Medium Camptothecin-behandelter Rat1-Fibroblasten

Bei Inkubation von Rat1-Zellen mit Camptothecin kommt es zur Induktion apoptotischer Prozesse und zur Akkumulation apoptotischer Zellen. Da eine Entsorgung dieser apoptotischen Zellen durch Phagozytose unter den gegebenen Bedingungen *in vitro* nicht stattfindet, verlieren diese mit zunehmender Inkubationsdauer ihre Plasmamembranintegrität und gehen in die sekundäre Nekrose über. Hierbei kommt es zu einer Freisetzung intrazellulärer Komponenten, die schließlich im Kulturmedium akkumulieren. Nach Sedimentation der toten Zellen und der Zelltrümmer ist es mittels Ultrafiltration möglich, solche Faktoren im Rückstand zu konzentrieren sowie das für nachfolgende Untersuchungen störende Camptothecin zu entfernen.

Lösungen:

Camptothecin, 2mM in DMSO

DMSO

Protokoll:

Rat1-Zellen wurden in 175cm² Kulturflaschen bis zur Konfluenz kultiviert, 2× mit PBS^{-/-} gewaschen und anschließend mit 3µM Camptothecin unter serumfreien Bedingungen in einem Volumen von 20ml je Kulturflasche inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug je nach Experiment 6-48h. Das Kulturmedium wurde anschließend in 50ml Röhrrchen dekantiert und für 30min bei 2000×g und 4°C zentrifugiert, um tote Zellen und Zelltrümmer zu sedimentieren. Um nicht sedimentierte Partikel aus der Lösung zu entfernen, wurde der zellfreie Überstand zunächst steril filtriert (0,22µm Porengröße) und anschließend unter Verwendung von 15ml Zentrifugeneinheiten (MWCO 100kDa) bei 3000×g und 4°C ultrafiltriert (2.2.2.1). Das komplette Ausgangsvolumen an konditioniertem Medium wurde schrittweise in der gleichen Ultrafilterzentrifugeneinheit konzentriert. Die Filtrate wurden verworfen. Nachdem das Volumen des Rückstandes auf ca. 500µl reduziert worden war, wurden in zwei aufeinander folgenden Waschsritten jeweils 10ml PBS^{-/-} zugegeben und wiederum bis zu einem Rückstandsvolumen von ca. 500µl filtriert. Hiermit sollte das Camptothecin vollständig aus der Lösung ausgewaschen werden. Anschließend wurde das Volumen des Rückstandes mit PBS^{-/-} auf $\frac{1}{20}$ des ursprünglichen Volumens an konditioniertem Medium aufgefüllt, so dass ein 20× Konzentrat entstand. Diese Lösung wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.1.3.1 Enzymatische Bestimmung der Lactatdehydrogenase (LDH) in konditionierten Medien Camptothecin-behandelter Rat1-Fibroblasten

Ein entscheidender Unterschied zwischen apoptotischem und nekrotischem Zelltod besteht in der Aufrechterhaltung der Plasmamembranintegrität während der Apoptose. Die zelluläre Plasmamembran bleibt während der Ausführung des apoptotischen Programms intakt, wodurch ein Austreten intrazellulärer Komponenten in den extrazellulären Raum verhindert wird. Nekrose hingegen ist ein unkontrollierter Prozess, in dessen Verlauf es aufgrund einer Ruptur der Plasmamembran schnell zu einer Freisetzung intrazellulärer Bestandteile kommt. Hierbei unterscheidet man zwischen primärer und sekundärer Nekrose. Während die primäre Nekrose durch chemische oder mechanische Einflüsse induziert wird, tritt die sekundäre Nekrose bei Zellen auf, die im Verlauf der Apoptose nicht durch Phagozyten entsorgt werden und infolgedessen sekundär in die Nekrose übergehen. Um den Anteil nekrotischer Zellen in einer Zellpopulation nachzuweisen, bedient man sich dem enzymatischen Nachweis der Lactatdehydrogenase (LDH) in Zellkulturmedien. Dieses ubiquitär exprimierte Enzym ist im Zytosol lebender Zellen lokalisiert und wird während der Nekrose in den extrazellulären Raum freigesetzt. Dieser Vorgang erfolgt passiv und in energieunabhängiger Weise. Die Menge an extrazellulärer LDH dient als Maßstab, um den Anteil nekrotischer Zellen einer Zellpopulation zu bestimmen.

Das Prinzip der in dieser Arbeit verwendeten enzymatischen Bestimmung freigesetzter LDH beruht auf einer gekoppelten zweistufigen Reaktion (Abb. 2.2.3.1). Der erste Schritt beinhaltet die Oxidation von Lactat zu Pyruvat, einer enzymatischen Reaktion, die spezifisch durch das Enzym Lactatdehydrogenase katalysiert wird. Hierbei wird vorhandenes NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert. Letzteres dient in einem zweiten Schritt dazu, ein gelbes Tetrazoliumsalz zu einem roten Farbstoff (Formazan) zu reduzieren. Diese Reduktion wird von dem im Reaktionsansatz vorhandenen Enzym Diaphorase katalysiert. Die Menge des entstehenden Farbstoffes kann man anschließend durch Bestimmung der Absorption bei 492nm colorimetrisch quantifizieren. Die Menge an LDH und des produzierten Formazans stehen hierbei in einem direkt proportionalen Verhältnis.

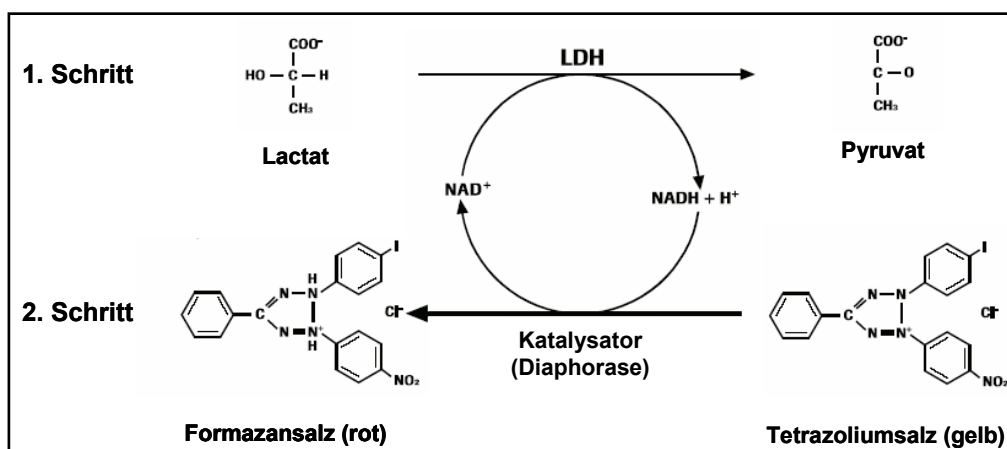


Abbildung 2.2.1.3.1: Prinzip des colorimetrischen Nachweises zur enzymatischen Bestimmung des Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH)

Lösungen:

Cytotoxicity Detection Kit (Roche Diagnostics):

enthält: Lösung 1: Katalysator (Diaphorase, NAD⁺)

Lösung 2: Jodotetrazoliumchlorid, Natriumlactat

Protokoll:

Rat1-Fibroblasten wurden in 175cm² Kulturflaschen bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend unter serumfreien Bedingungen mit 3µM Camptothecin bzw. DMSO (Kontrolle) für 6h, 12h, 24h, 36h und 48h inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde nach entsprechender Inkubationszeit in 50ml Röhrchen dekantiert und tote Zellen sowie Zelltrümmer für 30 min bei 2000×g und 4°C sedimentiert. Für die Bestimmung der LDH-Aktivität in den konditionierten zellfreien Kulturüberständen wurden diese zunächst in einem Verhältnis von 1:50 mit frischem serumfreien Medium verdünnt und 100µl dieser Verdünnungen in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte vorgelegt. Anschließend wurden Lösung 1 (Katalysator) und Lösung 2 im Verhältnis 1:45 gemischt und jeweils 100 µl hiervon zu den Proben in die 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben. Nach Inkubation im Dunklen für 30min bei Raumtemperatur wurde die Absorption der Proben bei 492nm in einem 96-Loch-Mikrotiterplatten-Lesegerät bestimmt. Für jeden einzelnen Kulturüberstand wurde eine 3-fach-Bestimmung durchgeführt. Da sich während der Inkubation das Jodotetrazoliumchlorid in geringer Menge auch spontan zu Formazan umsetzt, wurden Kontrollwerte mit unkonditioniertem frischem serumfreien Kulturmedium ermittelt. Um bei den Messungen nur den durch die LDH-Aktivität vermittelten Anteil an entstandenem Formazan zu erfassen, wurden diese Kontrollwerte als Hintergrundwerte von allen Messwerten abgezogen.

2.2.1.4 Präparation nekrotischer Zellen

In dieser Arbeit wurden sowohl primär nekrotische als auch sekundär nekrotische Zellen eingesetzt. Die Präparation primär nekrotischer Zellen erfolgte durch das mechanische Aufbrechen lebender Zellen durch 5-maliges Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff sowie Auftauen der Suspension bei 37°C im Wasserbad. Diese Vorgehensweise stellt eine gängige Methode zur Präparation nekrotischer Zellen dar (Basu et al. 2000, Li et al. 2001, Scaffidi et al. 2002; Kariko et al. 2004a). Apoptotische Zellen, die durch 5-maliges Einfrieren und Auftauen aufgebrochen wurden, wurden als sekundär nekrotische Zellen definiert. Der Unterschied zwischen primärer und sekundärer Nekrose besteht darin, dass bei sekundär nekrotischen Zellen vor Desintegration apoptotische Prozesse induziert wurden.

Protokoll:

Zellen wurden in Kulturflaschen (175cm²) bis zur Konfluenz kultiviert, 2× mit PBS^{-/-} gewaschen, durch Trypsinbehandlung vom Gefäßboden gelöst und in PBS^{-/-} resuspendiert. Zur Entfernung des Trypsins wurden die Zellen für 10min bei 100×g und 4°C sedimentiert und in 20ml serumfreiem Medium resuspendiert. Anschließend wurde ein Aliquot der Suspension 1:50 verdünnt und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt (2.2.1.1.6). Dann wurde die Zelldichte der Ausgangssuspension durch Verdünnung mit serumfreiem Medium auf 5×10⁶ Zellen/ml eingestellt.

Material und Methoden

Das Aufbrechen der Zellen erfolgte durch 5-maliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen der Suspension bei 37°C im Wasserbad. Auf diese Weise behandelte Zellen wurden als primär nekrotische Zellen definiert. Bei der Präparation sekundär nekrotischer Zellen wurden zunächst apoptotische Zellen präpariert (2.2.1.2) und anschließend ebenfalls durch 5-maliges Schockgefrieren der Zellsuspension aufgebrochen. Nach Präparation wurden nekrotische Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

2.2.1.5 Präparation von Zellextrakt

Die Präparation von Zellextrakt vitaler Zellen folgt prinzipiell dem Protokoll zur Präparation von Zytosol (2.2.1.6). Der Unterschied besteht im Verfahren des Aufbrechens der Zellen. Bei der Zytosolpräparation werden die Zellen durch Scherkräfte mittels Passage durch eine Kanüle aufgeschlossen. Bei der Präparation von Zellextrakt erfolgt dies durch einmaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff. Die Brechungsrate der Zellen beträgt hierbei 100% (Zytosolpräparation 25-35%). Da alle Nuklei unter dem Mikroskop im Phasenkontrast eine zusammenhängende, dunkle granuläre Struktur aufweisen, ist davon auszugehen, dass bei dieser Präparationsmethode neben der Plasmamembran auch die Kernmembran sowie die Membranen verschiedener Organellen zerstört werden. Die Suspension wurde zunächst bei 3000×g und anschließend bei 100.000×g zentrifugiert. Der entstehende Überstand wurde als Zellextrakt definiert und stellt eine Mischung löslicher Komponenten aus dem Zytosol, der Kernmatrix sowie anderer Organellen dar.

Protokoll:

Zellen wurden in Kulturflaschen (175 cm²) bis zur Konfluenz kultiviert, 2× mit PBS^{-/-} gewaschen, durch Trypsinbehandlung vom Gefäßboden gelöst und in PBS^{-/-} resuspendiert. Zur Entfernung des Trypsins wurden die Zellen für 10min bei 100×g und 4°C sedimentiert und in 20ml serumfreiem Medium resuspendiert. Anschließend wurde ein Aliquot der Suspension 1:50 verdünnt und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt (2.2.1.1.6). Jeweils 5×10⁷ Zellen wurden in 15ml Röhrchen überführt und nochmals zentrifugiert (10min, 100×g, 4°C). Die Zellen wurden dann in jeweils 1ml serumfreiem Medium resuspendiert (5×10⁷ Zellen/ml) und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach dem Auftauen der Suspension bei 37°C im Wasserbad wurde ein Aliquot entnommen und die Brechungsrate unter dem Lichtmikroskop im Phasenkontrast auf Vollständigkeit überprüft. Anschließend wurde die Suspension für 20min bei 3000×g und 4°C zentrifugiert, um große Zelltrümmer und Zellkerne zu sedimentieren. Der Überstand wurde dann in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und für 60min bei 40.000U/min (100.000×g) und 4°C in der Ultrazentrifuge (Centrikon T-1065, Kontron Instruments) mit Ausschwingrotor (TST 55.5) zentrifugiert. Anschließend wurde die oberste Schicht des Überstandes abgenommen und verworfen. Hierbei handelte es sich um Lipide, die während der Ultrazentrifugation aufgrund ihrer geringen Dichte an der Flüssigkeitsoberfläche akkumulierten. Der restliche Überstand (Zellextrakt) mit einer Konzentration von 5×10⁷ Zellen/ml wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.1.6 Präparation von Zytosol

Das Prinzip der hier verwendeten Methode zur Präparation von zellulärem Zytosol besteht darin, adhärente Zellen nach Trypsinbehandlung zunächst in einem hypotonischen Puffer zu überführen. Hierbei kommt es aufgrund der niedrigen Osmolarität des Puffers zu einem Anschwellen der Zellen. Mit Hilfe einer Einwegspritze und einer Kanüle mit definiertem Innendurchmesser erfolgt das Aufbrechen der Zellen durch mehrfaches Aufziehen der Zellsuspension. Hierbei kommt es durch Scherkräfte zur selektiven Ruptur der Plasmamembran. Die Membran der freigesetzten Nuklei bleibt intakt. Unter dem Phasenkontrastmikroskop sind die freien Zellkerne anhand ihres hellen Membransaums deutlich zu erkennen und können aufgrund ihrer Größe von intakten Zellen unterschieden werden. Beschädigte Zellkerne erscheinen als dunkle granuläre Strukturen ohne hellen Saum. Die freien Zellkerne können anschließend bei 3000×g sedimentiert werden. Der als PNS (postnuclear supernatant) bezeichnete kernfreie Überstand wird schließlich für 60min bei 100.000×g und 4°C in der Ultrazentrifuge (Centrikon T-1065, Kontron Instruments) mit Ausschwingrotor (TST 55.5) zentrifugiert, um weitere Organellen (Endosomen, Lysosomen, Mitochondrien, Ribosomen) zu entfernen. Der resultierende Überstand wird als Zytosol definiert.

Lösungen:

Homogenisierungspuffer:	250 mM	Saccharose
	3 mM	Imidazol

Protokoll:

Rat1-Fibroblasten wurden in Kulturflaschen (175 cm²) bis zur Konfluenz kultiviert, 2× mit PBS^{-/-} gewaschen, durch Trypsinbehandlung vom Gefäßboden gelöst und in PBS^{-/-} resuspendiert. Zur Entfernung des Trypsins wurden die Zellen für 10min bei 100×g und 4°C sedimentiert und in 40-50 ml PBS^{-/-} resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt, indem ein Aliquot einer 1:10 verdünnten Suspension mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt wurde (2.2.1.1.6). Jeweils 5×10⁷ Zellen wurden in 15ml Röhrchen überführt, sedimentiert (10min, 100×g, 4°C) und in je 3ml Homogenisierungspuffer resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10min, 100×g, 4°C) wurden die Zellen in jeweils 500µl Homogenisierungspuffer resuspendiert, so dass die Zelldichte der Suspension 1×10⁸ Zellen/ml betrug. Nach einer 10minütigen Inkubation auf Eis erfolgte das Aufbrechen der Zellen mittels Einwegspritze (1ml) durch mehrmaliges vollständiges Aufziehen der gesamten Suspension durch eine Kanüle (Ø 22,5 gauge). Nach jeder einzelnen Passage wurde ein Aliquot der Zellsuspension auf einen Objektträger überführt, ein Deckgläschen aufgelegt und unter dem Phasenkontrastmikroskop der Zustand der freigesetzten Zellkerne überprüft. Waren nur intakte Nuklei zu erkennen, erfolgte eine weitere Passage der Zellsuspension durch die Kanüle. Beim Auftreten erster beschädigter Zellkerne, die als dunkle, granuläre Strukturen zu erkennen waren, wurde der Vorgang beendet. In der Regel erfolgten 4 Passagen der gesamten Zellsuspension. Anschließend wurde die Brechungsrate der Zellen ermittelt, indem ein Aliquot der Suspension mittels Neubauer-Zählkammer analysiert wurde. Hierzu wurde sowohl die Anzahl der

Material und Methoden

freien Nuklei als auch die Anzahl intakter Zellen in zwei kleinen Quadraten bestimmt. Die Brechungsrate wurde anschließend wie folgt ermittelt:

$$\frac{\Sigma \text{ freie Zellkerne}}{\Sigma \text{ freie Zellkerne} + \text{intakte Zellen}} = \text{Brechungsrate [\%]}$$

In der Regel betrug die Brechungsrate 25-35%. Die Suspension wurde anschließend für 15min bei 3000×g und 4°C zentrifugiert, um die freien Zellkerne und intakte Zellen zu sedimentieren. Der daraus resultierende, als PNS (postnuclear supernatant) bezeichnete kernfreie Überstand wurde dann in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und für 60min bei 40.000 U/min (100.000×g) und 4°C in der Ultrazentrifuge (Centrikon T-1065, Kontron Instruments) mit Ausschwingrotor (TST 55.5) zentrifugiert. Anschließend wurde die oberste Schicht des Überstandes abgenommen und verworfen. Der restliche Überstand (Zytosol) wurde dann entsprechend der Brechungsrate sowie der Zelldichte der ursprünglichen Suspension (1×10^8 Zellen/ml) mit serumfreiem Rat1-Medium verdünnt, so dass sich eine Zytosolkonzentration von 5×10^6 Zellen/ml ergab. Die Lösung wurde anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.1.7 Colorimetrische Zellvitalitätsbestimmung mittels MTS-Assay

Um den relativen Anteil lebender Zellen einer Population zu bestimmen, wurde in dieser Arbeit eine modifizierte Methode des MTT-Assays angewandt (Buttke et al. 1993). Diese beruht darauf, dass lebende, metabolisch aktive Zellen das Substrat MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium], eine modifizierte MTT-Verbindung, zu einem wasserlöslichen Formazan-Produkt reduzieren. Diese Reduktion wird durch die zellulären Reduktionsäquivalente NADH und NADPH vermittelt. Nur in metabolisch aktiven Zellen werden diese Reduktionsäquivalente durch Dehydrogenasen in die reduzierte Form überführt und stehen für eine Reduktion des Substrats MTS zur Verfügung (Abb. 2.2.7). Das entstehende Formazan kann anschließend durch Bestimmung der Absorption bei 492nm quantifiziert werden und steht in direkt proportionalem Verhältnis zur Anzahl lebender Zellen in einer Population.

Die hier verwendete MTS-Methode hat mehrere Vorteile gegenüber dem klassischen MTT-Test. Zum einen sind sämtliche Komponenten, inklusive des Elektronenkopplungsreagenzes PES, in Form einer einzigen stabilen Lösung vorhanden, wodurch die Rekonstitution von Einzelkomponenten in entsprechenden Lösungsmitteln entfällt. Zum anderen ist es nicht notwendig, vor Messung der Absorption das in der Probe präzipitierte Formazan zu resolubilisieren, da die Modifikation des MTT zu MTS zur Entstehung einer wasserlöslichen Form des Formazans führt. Diese Methode ist auch dazu geeignet, Zellproliferationsuntersuchungen durchzuführen. Sie kann alternativ zur klassischen Methode der [^3H]Thymidin-Inkorporation angewendet werden.

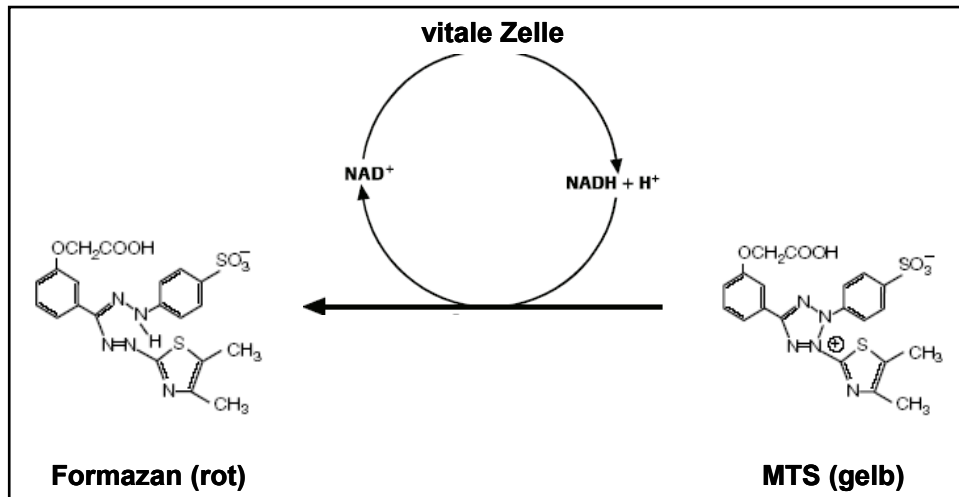


Abbildung 2.2.1.7: Prinzip des MTS-Assays

Lösungen:

CellTiter 96[®] AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay (Promega):
 enthält: MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]
 Elektronenkopplungsreagenz: PES (Phenazinethosulfat)

Protokoll:

Für Experimente wurden jeweils 5×10^3 Zellen pro Loch in 96-Loch-Mikrotiterplatten ausgesät und für 24h unter serumhaltigen Bedingungen kultiviert. Nach vollständiger Entfernung des Kulturmediums wurden die Zellen $2 \times$ mit $100 \mu\text{l}$ PBS^{-/-} gewaschen und anschließend unter den in den einzelnen Experimenten beschriebenen Bedingungen für 12h-72h in einem Gesamtvolumen von $100 \mu\text{l}$ frischem Kulturmedium inkubiert. Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeiten wurde die Vitalität der Zellen in den einzelnen Ansätzen bestimmt. Hierzu wurde zunächst das Kulturmedium vollständig abgenommen und die verbliebenen adhärennten Zellen $2 \times$ mit $100 \mu\text{l}$ PBS^{-/-} gewaschen. Anschließend wurden pro Loch $100 \mu\text{l}$ frisches serumfreies Medium sowie $20 \mu\text{l}$ der CellTiter 96[®] AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation-Lösung zugegeben. Um die spontane Umsetzung des MTS zu erfassen, wurden zellfreie Kontrollen zur Hintergrundbestimmung angesetzt. Diese Kontrollwerte wurden später von den Probenwerten subtrahiert. Nachdem die Lösungen durch leichtes Klopfen der 96-Loch-Mikrotiterplatte gemischt waren, erfolgte die Reaktion für exakt 4h im CO₂-Inkubator. Die Absorption der Proben bei 492nm wurde anschließend mit einem 96-Loch-Mikrotiterplatten-Lesegerät bestimmt. Ebenso wurde mit Proben verfahren, bei der die Zellvitalitätsbestimmung zu Beginn des jeweiligen Experimentes durchgeführt wurde (0h). Sämtliche Werte wurden jeweils durch eine 3-fach-Bestimmung ermittelt. Um innerhalb des experimentellen Zeitraums die relative Zunahme- bzw. Abnahme der Anzahl vitaler Zellen zu bestimmen, wurden in jedem Experiment die Werte der einzelnen Proben als relative Absorption bezogen auf den zu Beginn des jeweiligen Experimentes ermittelten Ausgangswert (0h) ausgedrückt.

2.2.2 Methoden zur Isolierung ApoJ-induzierender und zytoprotektiver Faktoren

2.2.2.1 Ultrafiltration

Das Prinzip der Ultrafiltration beruht auf der Trennung von Molekülen unterschiedlichen Molekulargewichts durch Verwendung einer Membran mit definierter Porengröße. Die Ultrafiltration stellt eine einfache und schnelle Methode dar, um Proteine in nativer Form zu konzentrieren sowie niedermolekulare Substanzen effizient aus Proteinlösungen zu entfernen. Die Wahl der Membran mit einer geeigneten Ausschlussgrenze (MWCO, molecular weight cut-off) hängt hierbei vom Molekulargewicht der zu trennenden Komponenten bzw. des zu konzentrierenden Proteins ab. In dieser Arbeit wurden Zentrifugeneinheiten mit einer Membran aus regenerierter Zellulose verwendet (Amicon Ultra, Millipore). Die Ultrafiltration wurde unter anderem zur Fraktionierung von Zellextrakt, dem Entfernen von Camptothecin aus konditionierten Medien sowie zur Konzentration der Proben vor Gelpermeationschromatographien eingesetzt.

Material:

Ultrafilterzentrifugeneinheiten (Amicon Ultra, Millipore):
Amicon Ultra-15 PLGC Centrifugal Filter Unit 10kDa MWCO
Amicon Ultra-15 PLTK Centrifugal Filter Unit 30kDa MWCO
Amicon Ultra-15 PLHK Centrifugal Filter Unit 100kDa MWCO

Protokoll:

Die Ultrafilterzentrifugeneinheiten wurden mit einem geeigneten Volumen der entsprechenden Ausgangslösungen beschickt und anschließend bei 3000×g und 4°C in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor (Universal 16R, Hettich) zentrifugiert, bis das Volumen des Rückstandes ca. 500µl betrug. Zur vollständigen Entfernung niedermolekularer Substanzen (Camptothecin, DTT) und des Trypsins erfolgten zwei zusätzliche Waschschrte mit jeweils 10ml PBS^{-/-}.

2.2.2.2 Anionenaustauscherchromatographie

Zur Fraktionierung komplex zusammengesetzter Proben kann die Methode der Ionenaustauscherchromatographie angewandt werden. Hierbei werden die verschiedenen Komponenten der Probe anhand ihrer unterschiedlichen Nettoladung voneinander getrennt. Aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen erfolgt im Falle eines Anionenaustauschers die Bindung negativ geladener Moleküle an eine positiv geladene immobilisierte Matrix. Positiv geladene Komponenten können dagegen nicht binden und durch Waschen entfernt werden. Die gebundenen Moleküle können anschließend durch Erhöhung des Salzgehaltes der Lösung selektiv von der Matrix gelöst werden. Hierbei werden diese durch den Anstieg der Konzentration an negativ geladenen Ionen kompetitiv von der Matrix verdrängt und wieder in die Lösung freigesetzt (Elution). Die Salzkonzentration, die notwendig ist, um ein bestimmtes Molekül zu eluieren, hängt von dessen Nettoladung ab, die wiederum vom pH-Wert der Lösung beeinflusst wird.

Für die Anionenaustauscherchromatographie wurden in dieser Arbeit zentrifugierbare Säuleneinheiten mit regenerierter Zellulose als Matrix sowie quaternärem Ammonium als

funktioneller Gruppe benutzt. Als Puffersysteme wurden sowohl ein basischer Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) als auch ein saurer Natriumacetat-Puffer (pH 5,5) verwendet. Die Elution erfolgte in beiden Fällen schrittweise mit steigenden Konzentrationen an Natriumchlorid. Mit Hilfe der Anionenaustauscherchromatographie wurden sowohl Zellextrakt als auch konditioniertes Medium Camptothecin-behandelter Rat1-Zellen im analytischen und präparativen Maßstab fraktioniert.

Vorteil der hier verwendeten Zentrifugeneinheiten gegenüber der FPLC-basierenden Chromatographie war der geringe Arbeits- und Zeitaufwand, der zur Durchführung von Chromatographien im präparativen Maßstab nötig war. Zudem war eine vorangehende Entgasung des Puffers nicht notwendig. Ein Elutionsprofil konnte hingegen nicht erstellt werden. Die Überprüfung des Proteingehaltes einzelner Fraktionen erfolgte durch Proteinbestimmung (2.2.2.5) und denaturierender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (2.2.2.6).

Lösungen und Material:

Zentrifugeneinheit: Vivapure Maxi H Typ Q (Vivascience)
Matrix: regenerierte Zellulose, 2,7ml Bettvolumen
funktionelle Gruppe: quaternäres Ammonium ($R-CH_2-N^+(CH_3)_3$)
maximales Probenvolumen: 19ml
maximale Bindekapazität: 60-80mg Protein

Puffersystem 1: Puffer A: 25mM Tris/HCl, pH 8,0
Puffer B: 25mM Tris/HCl, 2M NaCl, pH 8,0

Puffersystem 2: Puffer A: 25mM Natriumacetat, pH 5,5
Puffer B: 25mM Natriumacetat, 2M NaCl, pH 5,5

Protokoll:

Alle Arbeitsschritte (Äquilibration, Bindung, Waschen, Elution) wurden für 5min bei 400×g und 4°C in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor (Universal 16R, Hettich) durchgeführt, bis die Lösung das Säulenmaterial komplett durchlaufen hatte. Zudem wurden die Zentrifugeneinheiten für jeden Arbeitsschritt in ein frisches 50ml Röhrchen überführt. Alle Puffer wurden auf 4°C vorgekühlt. Der Durchfluss sowie sämtliche Eluate wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Vor Beginn der Chromatographie wurde das Säulenmaterial zunächst mit 5ml Puffer A des jeweiligen Puffersystems äquilibriert. Das Ausgangsmaterial (Zellextrakt, konditioniertes Medium Camptothecin-behandelter Rat1-Fibroblasten) wurde dann in einem Verhältnis von 1:5 in Puffer A verdünnt und in Portionen von 15 ml durch das Säulenmaterial zentrifugiert. Der Durchfluss wurde ein weiteres Mal über die Säule geführt, um die Bindungseffizienz entsprechender Proteine zu maximieren. Anschließend wurde mindestens 3× mit 15ml Puffer A gewaschen, um ungebundene Proteine aus der Säulenmatrix zu entfernen. Die Elution erfolgte schrittweise mit steigender Salzkonzentration (50mM – 1M NaCl). Hierzu wurden Puffer A und Puffer B zuvor in einem entsprechenden Verhältnis gemischt und jeweils 15ml für jeden Elutionsschritt eingesetzt.

Nach Abschluss der Chromatographie wurde das Säulenmaterial zunächst 3× mit 15ml Puffer B gewaschen und anschließend 1× mit 15ml Puffer A entsalzt. Nach Zugabe von 5ml Puffer A wurde

Material und Methoden

die Zentrifugeneinheit dicht verschlossen und bei 4°C gelagert. Nach Regeneration konnten die Zentrifugeneinheiten mehrmals verwendet werden.

2.2.2.3 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie stellt eine effiziente Methode zur Fraktionierung komplexer Proben dar. Hierbei können Biomoleküle aufgrund ihrer biologischen Funktion oder ihrer individuellen chemischen Struktur voneinander getrennt werden. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, eine spezifische Substanz (Ligand) kovalent an ein immobilisiertes Trägermaterial (Matrix) zu koppeln. Bei anschließender Chromatographie der Probe kommt es zu einer reversiblen ligandenspezifischen Bindung von Molekülen an die Matrix. Ungebundenes Material kann ausgewaschen werden. Durch Erhöhung der Ionenstärke bzw. Zugabe des Liganden in löslicher Form wird die reversible Bindung adsorbierter Moleküle an die Matrix aufgehoben. Es ist möglich, die gebundenen Moleküle spezifisch vom immobilisierten Trägermaterial zu eluieren. Mit Hilfe der Affinitätschromatographie lassen sich hoch effiziente Reinigungen in nur einem Trennschritt erreichen.

In vorliegender Arbeit wurde die Affinitätschromatographie angewandt, um Zellextrakt zu fraktionieren. Es sollte überprüft werden, ob verschiedene Säulenmaterialien zur Reinigung ApoJ-induzierender und zytoprotektiver Faktoren geeignet sind. Als gruppenspezifischer Ligand wurden Heparin und der Farbstoff Cibacron™ Blue F3G-A benutzt. Beide Liganden lagen als Agarose-Konjugat in gepackten Säulen vor (HiTrap Heparin HP, HiTrap Blue HP). Die Chromatographie wurde mit einer FPLC-Apparatur (fast performance liquid chromatography) durchgeführt. Als Puffersystem diente in beiden Fällen 25mM TRIS/HCl, pH 7,4. Die Elution erfolgte durch eine schrittweise Erhöhung der Natriumchloridkonzentration (250mM-2M).

Lösungen und Material:

HiTrap Heparin HP, 5ml (Amersham-Pharmacia):

Säulenmaterial: Agarose, 5ml Volumen

Ligand: Heparin (sulfatiertes Glucosaminoglykan)

Gruppenspezifität: DNA-bindende Proteine, Wachstumsfaktoren, Proteine der Blutgerinnungskaskade, Steroidhormonrezeptoren, u.a.

HiTrap Blue HP, 5ml (Amersham-Pharmacia)

Säulenmaterial: Agarose, 5ml Volumen

Ligand: Cibacron™ Blue F3G-A

Gruppenspezifität: NAD⁺/NADP⁺-bindende Enzyme, Albumin, Proteine der Blutgerinnungskaskade, Interferon, u.a.

Puffersystem: Puffer A: 25mM Tris/HCl, pH 7,4

Puffer B: 25mM Tris/HCl, 2M NaCl, pH 7,4

Protokoll:

Vor Beginn der Arbeiten wurden beide Puffer frisch entgast, indem sie für mindestens 30min unter Vakuum (Wasserstrahlpumpe) gerührt wurden. Zudem wurden beide Puffer steril filtriert (0,22µm Porengröße), um etwaige Partikel zu entfernen.

Die Chromatographie wurde mit einer FPLC-Apparatur (Econo System, Bio-Rad) bei Raumtemperatur durchgeführt. Zunächst wurde die Säule mit Puffer A für mindestens 30min bei einer Flussrate von 1ml/min äquilibriert. 1ml Zelleextrakt einer Konzentration von 5×10^7 Zellen/ml wurde in einem Verhältnis von 1:5 in Puffer A verdünnt, steril filtriert (0,22 μ M Porengröße) und mit einer Einwegspritze über die Injektionseinheit komplett auf die Säule aufgetragen. Die anschließende Chromatographie wurde bei einer konstanten Flussrate von 1ml/min mit Puffer A durchgeführt. Das Volumen der über die gesamte Chromatographie gesammelten Fraktionen betrug 1ml. Die Absorption des Durchflusses bei einer Wellenlänge von 280nm wurde mit Hilfe eines UV-Monitors detektiert und mittels Schreiber ein entsprechendes Elutionsprofil erstellt. Nachdem die Absorption wieder auf den Ausgangswert gefallen war, wurden die an die Säule gebundenen Proteine eluiert, indem die Natriumchloridkonzentration des Puffers schrittweise erhöht wurde (250mM \rightarrow 500mM \rightarrow 1M \rightarrow 2M). Hierzu wurden Puffer A und Puffer B mittels Gradientenmischers jeweils in einem entsprechenden Verhältnis gemischt. Für jede Konzentrationsstufe an Natriumchlorid erfolgte die Elution mit konstanter Flussrate (1ml/min) bis die Absorption des Eluats bei 280nm wieder auf den Ausgangswert gefallen war. Alle Fraktionen wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Nach Abschluss der Chromatographie wurde die Säule zunächst für 30min mit Puffer B gewaschen und dann für mindestens 30min mit Puffer A äquilibriert. Anschließend konnte die Säule direkt wieder verwendet werden. Wurde die Säule längere Zeit nicht benötigt, wurde sie in 0,1% (w/v) Natriumazid bei 4°C dauerhaft gelagert.

2.2.2.4 Gelpermeationschromatographie

Mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie ist es möglich, Moleküle nach ihrem molekularen Radius (M_r) voneinander zu trennen. Im Falle globulärer Proteine ist der molekulare Radius direkt proportional zum Molekulargewicht (MW). Das Prinzip dieser Methode besteht darin, die Probe in einem geeigneten Puffer durch eine poröse Gelmatrix laufen zu lassen. Hierbei kommt es durch die Filterwirkung des Gelmaterials zu einer Trennung der Probenkomponenten. Hochmolekulare Substanzen, die nicht oder nur in geringem Maße in die Poren der Gelmatrix diffundieren, durchlaufen das Gelvolumen deutlich schneller und eluieren somit früher als Moleküle mit geringem Molekulargewicht. Niedermolekulare Substanzen diffundieren in das poröse Material. Aus diesem Grund durchlaufen sie ein größeres Volumen, verbleiben länger in der Gelmatrix und eluieren zeitverzögert. Durch Kalibrierung der Gelpermeationssäule mit globulären Proteinen bekannten Molekulargewichts ist es zudem möglich, das Molekulargewicht unbekannter Proteine anhand ihres Elutionsvolumens zu bestimmen.

In dieser Arbeit wurde die Gelpermeationschromatographie zur Fraktionierung von Zelleextrakt und konditioniertem Medium Camptothecin-behandelter Rat1-Fibroblasten angewandt. Die Chromatographie wurde mit einer FPLC-Apparatur bei Raumtemperatur durchgeführt. Als Puffer diente PBS⁻. Nach Kalibrierung der verwendeten Gelpermeationssäule (HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade) mit den Proteinen Katalase (232kDa), Rinderserumalbumin (BSA, 69kDa) und

Material und Methoden

Cytochrom c (12,3kDa) konnten die jeweiligen Elutionsvolumina (V_E) in einem halblogarithmischen Diagramm gegen das Molekulargewicht aufgetragen werden. Anhand einer daraus abgeleiteten Eichgerade war schließlich eine Abschätzung des Molekulargewichts der ApoJ-induzierenden und zytoprotektiven Faktoren möglich.

Lösungen und Material:

Säule: HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade (Amersham-Pharmacia)
Gelmatrix: kovalentes Dextran-Agarose-Konjugat
Partikelgröße: 34 μ m
Maße: \varnothing 1,6cm, Länge 60cm
Gelvolumen: 120ml
Trennbereich: 10.000 – 600.000 Da für globuläre Proteine

Kalibrierlösungen:

Dextranblau (2.000.000 Da):	1mg/ml	in PBS ^{-/-}
Katalase (aus Rinderleber, 232.000 Da):	10mg/ml	in PBS ^{-/-}
BSA (69.000 Da):	10mg/ml	in PBS ^{-/-}
Cytochrom c (12.300 Da):	5mg/ml	in PBS ^{-/-}

Protokoll:

Vor Beginn der Arbeiten wurde PBS^{-/-}-Puffer durch Rühren unter Vakuum (Wasserstrahlpumpe) für mindestens 30min frisch entgast und anschließend steril filtriert (0,22 μ m Porengröße), um etwaige Partikel zu entfernen. Die Chromatographie wurde mit einer FPLC-Apparatur (Econo System, Bio-Rad) bei Raumtemperatur durchgeführt. Zunächst wurde die Säule mit 2 \times Säulenvolumen PBS^{-/-} bei einer Flussrate von 1ml/min äquilibriert. 1ml der Probe wurde zunächst steril filtriert (0,22 μ m Porengröße) und mit einer Einwegspritze über die Injektionseinheit komplett auf die Säule aufgetragen. Die Chromatographie wurde bei einer konstanten Flussrate von 0,5ml/min durchgeführt. Als Chromatographiepuffer diente PBS^{-/-}. Die Absorption des Eluats bei einer Wellenlänge von 280nm wurde mit Hilfe eines UV-Monitors detektiert und mittels Schreiber ein entsprechendes Profil erstellt. Fraktionen mit einem Volumen von 1ml wurden gesammelt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Abschluss der Chromatographie wurde die Säule mit 2 Säulenvolumen PBS^{-/-} bei einer Flussrate von 1ml/min gewaschen und konnte anschließend direkt wieder verwendet werden. Wurde die Säule über einen längeren Zeitraum nicht benötigt, wurde sie in 0,1% (w/v) Natriumazid bei 4°C dauerhaft gelagert.

Vor Beginn der Experimente wurde zunächst das Ausschlussvolumen (V_0) der Säule mit Hilfe von 1ml der Dextranblau-Lösung ermittelt. Die anschließenden Kalibrierungsschritte erfolgten separat mit jeweils 1ml der oben angegebenen Proteinlösungen. Für die Fraktionierung von Zellextrakt und konditioniertem Medium Camptothecin-behandelter Rat1-Fibroblasten nach einer vorangegangenen Anionenaustauscherchromatographie war es notwendig, das Probenvolumen vor Beginn der Gelpermeationschromatographie mittels Ultrafiltration (MWCO 30kDa) (2.2.2.1) auf 1ml zu reduzieren.

2.2.2.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung des Proteingehaltes von Lösungen erfolgte colorimetrisch nach der von Bradford beschriebenen Methode (Bradford 1976). Dieses Verfahren basiert auf einer unspezifischen Komplexierung von Proteinen mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250. Die Zugabe dieses Farbstoffes führt zu einem Farbumschlag proteinhaltiger Lösungen und somit zu einer Erhöhung der Absorption bei einer Wellenlänge von 595nm. Die Absorption verhält sich hierbei direkt proportional zur Proteinkonzentration der Lösung. Durch Vergleich mit einer Verdünnungsreihe einer Standardlösung mit definiertem Proteingehalt lässt sich auf diese Weise die Proteinkonzentration von Proben bestimmen.

Lösungen und Material

Bradford-Reagenz: Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad)
Proteinstandard: 0,5 mg/ml BSA
Ameisensäure, p.a.
Einwegküvetten: Kunststoff, 1,5ml Volumen, 1cm Schichtdicke

Protokoll:

5-50µl der Proben wurde mit H₂O auf ein Volumen von 50µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 50µl Ameisensäure wurden die Ansätze gründlich gevortext und für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 900µl des 1:5 in H₂O verdünnten Bradford-Reagenzes zugegeben, gründlich gemischt und weitere 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Überführung der Ansätze in Einwegküvetten wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595nm im Spektralphotometer bestimmt. Durch parallele Messung einer linearen Verdünnungsreihe des Proteinstandards (0µg, 2µg, 4µg, 6µg, 8µg, 10µg BSA) wurde eine Eichgerade erstellt, mit Hilfe derer die Proteinmengen in den einzelnen Ansätzen bestimmt wurden. Anschließend konnten die Proteinkonzentrationen der unverdünnten Ausgangsproben errechnet werden. Bei allen Proteinbestimmungen diente ein proteinfreier Ansatz mit entsprechendem Puffer als Referenz. Die Proteinmengen aller Proben wurden jeweils durch eine Doppelbestimmung ermittelt.

2.2.2.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Lämmli

In dieser Arbeit wurde ein diskontinuierliches Gelsystem angewandt, das aus einem Trenngel sowie einem Sammelgel besteht. Die Matrix beider Gele unterscheidet sich sowohl im pH-Wert als auch im Polyacrylamidgehalt. Zu Beginn der Elektrophorese durchlaufen die Proben zunächst das Sammelgel, das keine Trenneigenschaften besitzt. An der Grenze zum Trenngel erfolgt eine Konzentration der Probe, was in der Entstehung einer feinen gleichmäßigen Lauffront zu erkennen ist. Bei der anschließenden Migration durch das Trenngel kommt es zu einer Trennung einzelner Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Der Vorteil dieses Systems gegenüber kontinuierlichen Gelen ist eine deutlich höhere Auflösung der Proteintrennung.

Material und Methoden

Nach Anionenaustauscher-, Affinitäts- und Gelpermeationschromatographie von Zellextrakt und konditioniertem Medium Camptothecin-behandelter Rat1-Fibroblasten wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zur Überprüfung der Proteinverteilung in den einzelnen Fraktionen herangezogen. Zudem konnten nach partieller Reinigung der ApoJ-induzierenden und zytoprotektiven Faktoren einzelne Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten und mittels massenspektrometrischer Analyse (MALDI-TOF-MS) untersucht werden. Alle Proben wurden vor Beginn der Elektrophorese durch das im Probenpuffer vorhandene Dithiothreitol (DTT) reduziert. Bei jeder Gelelektrophorese wurde zudem ein Proteinmolekulargewichtsstandard aufgetragen.

Lösungen und Material:

Gelapparatur: Mini-PROTEAN II (Bio-Rad)
mit geeigneten Glasplatten, Spacern, Kämmen, Elektrophoresekammer,
Halterung zum Gießen der Gele

Molekulargewichtsstandard: Roti[®]-Mark PRESTAINED (Roth)
Molekulargewichtsbereich: 17 kDa – 245 kDa

Acrylamid-Stammlösung: Rotiphorese[®] 30; 37,5:1 (Roth)
29,2% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid

Elektrophoresepuffer, pH 8,3 25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1% (w/v) SDS

Probenpuffer (2×): 500 mg SDS
1,5 mg EDTA
4,0 mg Bromphenolblau
250 mg DTT
10 ml Glycerin
6,25 ml 1,5M Tris/HCl, pH 8,8
ad 25 ml H₂O

Trenngelpuffer 3M Tris, pH 8,8

Sammelgelpuffer 1M Tris, pH 6,8

N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)

Ammoniumpersulfat (APS), 10% (w/v)

SDS, 10% (w/v)

Essigsäure, 40% (v/v)

Zusammensetzung des Trenngels (10ml):

Polyacrylamidgehalt		7,5 %	10 %	12,5 %
H ₂ O	[ml]	6,1	5,3	4,4
Trenngelpuffer	[ml]	1,25	1,25	1,25
SDS	[μ l]	100	100	100
Acrylamid	[ml]	2,5	3,3	4,2
TEMED	[μ l]	10	10	10
APS	[μ l]	50	50	50

Zusammensetzung des Sammelgels (10ml):

Polyacrylamidgehalt		5 %
H ₂ O	[ml]	6,9
Sammelgelpuffer	[ml]	1,25
SDS	[μ l]	100
Acrylamid	[ml]	1,7
TEMED	[μ l]	10
APS	[μ l]	50

Protokoll:

Nach gründlicher Reinigung der Glasplatten mit Ethanol und Aceton wurden diese zusammen mit den Spacern in entsprechender Halterung befestigt. Anschließend wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten auf eine Höhe von ca. 5-6cm gegossen und vorsichtig mit H₂O überschichtet, um eine waagerechte Oberfläche des Trenngels zu gewährleisten. Nachdem das Trenngel vollständig polymerisiert war, wurde das H₂O entfernt, das Sammelgel bis zur Oberkante der Glasplatten gegossen (1-2cm) und schließlich der Kamm angebracht. Nachdem auch das Sammelgel vollständig polymerisiert war, wurde die Gelapparatur nach Herstellerangaben zusammengesetzt und beide Pufferreservoirs mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Nach Zugabe von 20 μ l Probenpuffer (2 \times) zu den TCA-präzipitierten Proben (2.2.2.6.2) wurden diese für 5min bei 100°C im Heizblock denaturiert, kurz zentrifugiert und anschließend mit ausgezogenen Pipettenspitzen komplett auf das Gel aufgetragen. Auf jedes Gel wurden zudem 6 μ l des Proteinmolekulargewichtsstandards aufgetragen. Freie Taschen wurden mit 20 μ l Probenpuffer gefüllt. Die Elektrophorese wurde zunächst bei 150V durchgeführt, bis sich die Proben an der Grenze zwischen Trenn- und Sammelgel zu einer feinen gleichmäßigen Lauffront konzentriert hatten. Anschließend wurde die elektrophoretische Trennung der Proteine bei einer Spannung von 200V durchgeführt. Nach etwa 40min wurde die Elektrophorese beendet und das Gel in eine Plastikwanne überführt. Durch Inkubation des Polyacrylamidgels für 2h in 40% Essigsäure wurden die Proteine fixiert.

2.2.2.6.1 Kolloidal-Coomassie-Färbung

Die Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen kann mit zwei verschiedenen Methoden erfolgen. Die gängigste Methode besteht darin, die Proteine durch Komplexbildung mit einem blauen Farbstoff (Coomassie) nachzuweisen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, Silbernitrat zur Detektion zu verwenden. Gegenüber der klassischen Coomassie-Färbung besteht der Vorteil dieses als Silverstaining bezeichneten Verfahrens in einer deutlich höheren Sensitivität des Nachweises. Für die MALDI-TOF-Analyse war eine Coomassie-Färbung eine zwingende Voraussetzung. Deshalb wurden die Proteine standardmäßig mit einem Kolloidal-Coomassie-Kit (Invitrogen/Novex)

Material und Methoden

nachgewiesen. Mit Hilfe dieser Färbemethode können Banden mit einem Proteingehalt von 15ng oder höher detektiert werden.

Lösungen:

Coomassie-Färbelösung: Colloidal Blue Staining Kit (Invitrogen/Novex)
enthält: Färbelösung A, Färbelösung B

Methanol, p.a.

Protokoll:

Nach Fixierung der Proteine wurde das Gel mehrmals kurz gewässert und anschließend mit 50ml der frisch angesetzten Coomassie-Färbelösung für mindestens 6h unter Schütteln inkubiert. Die Färbelösung setzte sich folgendermaßen zusammen:

27,5	ml	H ₂ O
10	ml	Methanol
2,5	ml	Färbelösung B
10	ml	Färbelösung A

Das Gel wurde anschließend durch mehrmaliges Waschen mit H₂O entfärbt, bis der Hintergrund vollständig farblos war. Nach luftdichtem Einschweißen des Gels in einer klaren Plastikfolie erfolgte die Dokumentation mittels Computer und handelsüblichem Scanner.

2.2.2.6.2 TCA-Präzipitation von Proteinen

Durch Zugabe von Trichloressigsäure zu Proteinlösungen kommt es aufgrund der Erniedrigung des pH-Wertes zur Denaturierung und Präzipitation der Proteine. Dies stellt eine einfache und sehr effiziente Methode dar, um Proteine in Lösung für eine anschließende Polyacrylamidgelelektrophorese zu konzentrieren.

Lösungen:

Trichloressigsäure (TCA): 72% (w/w) in H₂O

Lysozym 100 µg/ml in H₂O

Aceton, p.a.

Protokoll:

Nach Zugabe von $\frac{1}{5}$ Volumen der TCA-Lösung wurde die Probe gründlich gemischt und für 30min auf Eis inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden anschließend durch Zentrifugation für 15min bei 14.000×g und 4°C sedimentiert. Um Reste an TCA zu entfernen, wurde das Pellet mit 1ml Aceton überschichtet und ein weiteres Mal zentrifugiert (15min, 14.000×g, 4°C). Das Aceton wurde anschließend vorsichtig abgenommen und das Präzipitat vollständig luftgetrocknet. Präzipitierte Proteine wurden für die anschließende Polyacrylamidgelelektrophorese in 20µl Probenpuffer (2×) aufgenommen. Um bei Proben mit einer sehr geringen Proteinkonzentration eine vollständige und

somit quantitative Fällung zu gewährleisten, wurde den Proben vor TCA-Präzipitation 1µg Lysozym als Trägerprotein zugesetzt.

2.2.3 RNA-Präparation nach Chomczynski und Sacchi

Beim Umgang mit RNA besteht die Gefahr, dass diese durch eine Kontamination mit RNAsen degradiert wird. Diese RNAsen können zum einen durch Hautkontakt in die Präparation gelangen, zum anderen können sie aus nicht ausreichend gereinigten Geräten stammen. Alle Geräte und Verbrauchsmaterialien wurden vor Beginn der Tätigkeit entweder für mindestens 1h in 0.3% H₂O₂ eingelegt oder für 60min autoklaviert. Sämtliche Lösungen wurden ausschließlich mit 0.01% Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser angesetzt. Hierzu wurde ein Liter H₂O mit 100µl DEPC versetzt, kräftig geschüttelt und nach einer Einwirkungsdauer von 1h für 60min autoklaviert.

Lösungen und Puffer:

GTC-Puffer: 4 M Guanidinthiocyanat
 25 mM Natriumcitrat, pH 7
 0.5% (w/v) Natriumlaurylsarkosin
 7.2 µl/ml β-Mercaptoethanol (Zugabe kurz vor Gebrauch)

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI), 25:24:1 (v/v/v), pH 4,0 (AppliChem)

Chloroform-Isoamylalkohol, 24:1 (v/v)

Natriumacetat, 2M, pH 4,0

Isopropanol, p.a.

Ethanol, 70% (v/v)

Protokoll:

Nach Ablauf der Stimulierungsdauer wurde das Kulturmedium abgezogen und die adhärennten Zellen einer Ø 9,4cm Schale 2× mit 5ml PBS^{-/-} gewaschen, um Zelltrümmer sowie sich abgelöste Zellen komplett zu entfernen. Anschließend wurden 2,5ml GTC-Puffer (mit β-Mercaptoethanol) zugegeben und sofort über die gesamte Schalenfläche verteilt. Hierbei wurden die Zellen lysiert und zudem endogene RNAsen inaktiviert. Die Zelllysate wurden mit einem Zellschaber gesammelt, vollständig in 15ml Röhrchen überführt und 280µl 2M Natriumacetat sowie 3ml Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI) zugegeben. Nach gründlichem Vortexen wurden die Proben für mindestens 15min auf Eis gestellt und anschließend für 15 Minuten bei 5000×g und 4°C zentrifugiert. Nach der Phasentrennung wurde die obere, wässrige Phase in ein frisches 15ml Röhrchen überführt und ein zweites Mal mit 3ml PCI extrahiert. Die wässrige Phase wurde nach Überführung in ein frisches 15ml Röhrchen mit 3ml Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) versetzt, gevortext und bei 5000×g und 4°C für 15min zentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wurde abgenommen und mit 0.7× Volumen Isopropanol gemischt. Die anschließende Fällung der RNA fand über Nacht bei -20°C statt. Die präzipitierte RNA wurde bei 5000×g und 4°C für 60min sedimentiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 1ml 70% Ethanol überschichtet. Nach Zentrifugation (5000×g, 4°C, 30min) wurde der Überstand komplett abgenommen, das Pellet kurz luftgetrocknet und die RNA schließlich in 100-

Material und Methoden

600µl H₂O (abhängig von der Menge sedimentierter RNA) aufgenommen. RNA-Lösungen wurden dauerhaft bei -20°C gelagert.

2.2.3.1 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung präparierter Gesamt-RNA

Es wurden 1:100-Verdünnungen der RNA-Stammlösungen in einer 1ml Quarzküvette photometrisch (Spektrophotometer, Hitachi) auf Konzentrationsgehalt und Reinheitsgrad untersucht. Dazu wurde die Absorption der Lösung bei den Wellenlängen 260nm (Nukleinsäuren) und 280nm (Proteine) gemessen. Dabei gilt:

$$\text{Abs}_{260\text{nm}} = 1 \quad \triangleq 40\mu\text{g/ml RNA (einzelsträngig)}$$

$$\text{Abs}_{260\text{nm}}/\text{Abs}_{280\text{nm}} = 1,8 - 2,0 \quad \triangleq \text{reine RNA-Lösung}$$

2.2.4 Northern-Blot-Analyse

Zur qualitativen und quantitativen Analyse eines spezifischen RNA-Transkripts in der Gesamt-RNA wurde die Methode der Northern-Blot-Analyse angewandt. Das Prinzip dieses Verfahrens besteht darin, die verschiedenen RNA-Moleküle der Gesamt-RNA unter denaturierenden Bedingungen in einem formaldehydhaltigen Agarosegel nach ihrer Größe aufzutrennen, auf eine Membran zu transferieren und dort zu immobilisieren. Anschließend ist es möglich, das gewünschte RNA-Transkript nachzuweisen, indem man mit einer zum entsprechendem Transkript komplementären markierten RNA- oder DNA-Sonde hybridisiert. Die entstehenden Hybridmoleküle können mit einer dem Markierungsverfahren entsprechenden Methode sichtbar gemacht werden.

Mit Hilfe der Northern-Blot-Analyse sind neben qualitativen Untersuchungen auch quantitative Aussagen über die relativen Mengen eines spezifischen RNA-Transkriptes in verschiedenen Proben möglich. Die Methode wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um Genregulationsanalysen durchzuführen. Zum Nachweis einzelner mRNAs dienten mit Radionukleotiden markierte sequenzspezifische DNA-Moleküle als Sonden.

2.2.4.1 Denaturierende Agarosegelelektrophorese

Einzelsträngige RNA-Moleküle können unter physiologischen Bedingungen aufgrund intramolekularer komplementärer Sequenzen Sekundärstrukturen ausbilden. Dies führt zu dem, dass sie während einer Gelelektrophorese mit einer Geschwindigkeit migrieren, die nicht ihre tatsächliche Molekülgröße widerspiegelt. Zum anderen sinkt die Effizienz, mit der eine markierte Sonde mit einem immobilisierten komplementären RNA-Transkript hybridisieren kann. Um eine exakte Auftrennung der verschiedenen RNA-Spezies während der Gelelektrophorese sowie eine hohe Hybridisierungseffizienz zu gewährleisten, wurden die RNA-Proben vor dem Auftragen auf das Agarosegel denaturiert und die Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen in einem formaldehydhaltigen Agarosegel durchgeführt.

Lösungen und Material:

MOPS/EDTA, pH 7 (10x):	400 mM	MOPS (3-(N-Morpholino-)-propansulfonsäure)
	100 mM	Natriumacetat
	10 mM	EDTA
RNA-Probenpuffer:	1 mM	EDTA, pH 8
	0.25%(w/v)	Bromphenolblau
Ethidiumbromid-Färbelösung:	0.5µg/ml	Ethidiumbromid in H ₂ O
Agarose (peqGOLD Universal Agarose, peqlab)		

Zusammensetzung des Formaldehydgels

Die Elektrophorese wurde in einem Agarosegel (1% (w/v) Agarose) mit einem Formaldehyd Gehalt von 6% durchgeführt. Das Gel besaß ein Volumen von 250ml, das sich wie folgt zusammensetzte:

2,5	g	Agarose
184	ml	H ₂ O
		→ Lösen der Agarose durch Erhitzen
25	ml	10×MOPS/EDTA
41	ml	Formaldehyd

Das Gel wurde in eine horizontale Flachbettgelapparatur (AGS, Heidelberg) gegossen. Das anschließende Aushärten erfolgte für mindestens 2h. Die Gelkammer wurde dann mit 2,5l Elektrophoresepuffer (1× MOPS/EDTA) gefüllt. Vor Beladung des Gels wurde ein Vorlauf für 10min bei einer Spannung von 130 Volt durchgeführt.

Bevor die Proben auf das Agarosegel aufgetragen wurden, wurde die RNA denaturiert. Hierzu wurden 5–20µg Gesamt-RNA in einem Eppendorf-Gefäß unter Vakuum vollständig lyophilisiert und anschließend in folgenden Komponenten gelöst:

7	µl	H ₂ O
3	µl	10x MOPS/EDTA
5	µl	Formaldehyd
15	µl	Formamid

Die Denaturierung erfolgte für 20min bei 65°C im Wasserbad. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gestellt, mit 6µl RNA-Probenpuffer versetzt und dann auf das Gel aufgetragen. In jedem Experiment wurden die Proben doppelt aufgetragen. Anschließend wurde die Elektrophorese für 2,5 Stunden bei 130 Volt durchgeführt.

Nach Abschluss der Elektrophorese wurde eine Hälfte des Gels 2× für 15min in H₂O gewaschen und anschließend für 30min in einer Ethidiumbromid-Lösung angefärbt. Dann wurde das Gel für 30min in H₂O entfärbt, um ungebundenes Ethidiumbromid zu entfernen. Unter UV-Licht (245nm) konnte anschließend anhand der erkennbaren ribosomalen RNA-Banden die Gleichmäßigkeit der RNA-Menge in den verschiedenen Proben sowie deren Qualität (evtl. Degradierung) überprüft und dokumentiert werden. Die andere Hälfte des Gels, die nicht mit Ethidiumbromid angefärbt wurde, wurde für den Kapillarblot verwendet.

Material und Methoden

2.2.4.2 Kapillarblot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde die Gesamt-RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Dabei wurde die Methode des Kapillarblots angewandt. Bei dieser wird mittels Saugpapier Puffer durch das Gel und die aufliegende Membran geleitet. Während der Transferpuffer durch das Gel fließt, wird mit ihm die RNA auf die darüber liegende Membran transferiert. Dieser Vorgang wird durch Kapillarkräfte angetrieben.

Lösungen und Material:

Denaturierungspuffer:	50 mM	NaOH
	1,5 M	NaCl
Neutralisierungspuffer, pH 7,4:	0,5 M	Tris/HCl
	1,5 M	NaCl
Transferpuffer (20× SSC), pH 7:	3,0 M	NaCl
	0,3 M	Natriumcitrat

Nylonmembran, positiv geladen (Roche Diagnostics)

Blotting-Papier (GB002, Schleicher&Schuell)

Protokoll:

Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel für 30min in Denaturierungspuffer inkubiert. Dabei sollten große RNA-Transkripte (> 2 kb) durch den alkalischen pH-Wert der Lösung partiell hydrolysiert werden, um deren Transfereffizienz zu steigern. Dann wurde das Gel für 20min in Neutralisierungspuffer inkubiert und für 45min in Transferpuffer (20× SSC) äquilibriert. Der Transfer der RNA auf die positiv geladene Nylonmembran erfolgte mittels Kapillarblot unter Verwendung von 20× SSC als Transferpuffer über Nacht (12–16 Stunden) bei Raumtemperatur.

Am nächsten Tag wurde die Membran für mindestens 1h bei Raumtemperatur getrocknet. Die Immobilisierung der RNA erfolgte durch Bestrahlung der Membran mit UV-Licht (0,24 Joule/cm²). Hierbei wird die RNA kovalent an die Nylonmembran gebunden. Die Membran wurde bis zur Hybridisierung bei 4°C gelagert.

2.2.4.3 Radioaktive Markierung von cDNA-Sonden

Die radioaktive Markierung der cDNA-Sonden erfolgte nach dem Prinzip des „random-primed-labeling“. An der denaturierten einzelsträngigen cDNA wird der komplementäre Strang durch eine DNA-Polymerase-Reaktion (Klenow-Enzym) neu synthetisiert. Die radioaktive Markierung erfolgt durch die Zugabe eines Radionukleotids (α -³²P-dCTP). Die für die Reaktion notwendigen anderen Desoxyribonukleotide (dATP, dGTP, dTTP) liegen als unmarkierte Nukleotide vor. Die zum Start der Polymerasereaktion notwendige freie 3'-OH-Gruppe wird von einem Gemisch an Oligonukleotiden aller möglichen Sequenzkombinationen bereitgestellt („random primer“), die an entsprechend komplementäre Sequenzen an der nach Denaturierung einzelsträngig vorliegenden cDNA-Matrize hybridisieren. Während der Synthese des komplementären DNA-Stranges kommt es durch die statistische Verteilung der Oligonukleotid-Primer an der cDNA-Matrize als auch durch die 5'→3'-

Exonukleaseaktivität des Klenow-Enzyms zu einer gleichmäßig radioaktiven Markierung der DNA. Die verschiedenen in dieser Arbeit als spezifische Sonden verwendeten cDNAs wurden zuvor nach Restriktionsverdau entsprechender cDNA-Plasmidkonstrukte (2.2.5.2) bzw. nach Amplifikation entsprechender cDNAs durch eine PCR (2.2.5.5) mittels DNA-Gelextraktion (2.2.5.4) präpariert.

Lösungen und Material:

High-Prime-Kit (Roche Diagnostics)

enthält: Klenow-Enzym, 5x Reaktionspuffer, randomisiertes Oligonukleotid-Gemisch, unmarkierte Desoxyribonukleotide (dATP, dGTP, dTTP)

α -³²P-dCTP EasyTides® (3000 Ci/mMol, 10 μ Ci/ μ l) (Perkin Elmer)

EDTA, 200mM, pH 8

Ansatz:

11 μ l	cDNA (80-100ng DNA)
	→ Denaturierung für 10min bei 95°C
	→ sofort auf Eis
+ 4 μ l	High-Prime-Kit
+ 5 μ l	α - ³² P-dCTP (50 μ Ci)
	→ Reaktion für 10min bei 37°C

Alle Inkubationsschritte wurden in einem PCR-Prozessor durchgeführt. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 2 μ l 200mM EDTA gestoppt. Nach Denaturierung des kompletten Ansatzes für 10min bei 95°C wurden pro Hybridisierung jeweils 10 μ l des Ansatzes als spezifische radioaktiv markierte cDNA-Sonde eingesetzt.

2.2.4.4 Hybridisierung

Lösungen:

50x Denhardt's-Lösung:

1% (w/v)	Ficoll
1% (w/v)	Polyvinyl-Pyrrolidon
1% (w/v)	BSA, Fraktion V

20x SSC, pH 7:

3 M	NaCl
0,3 M	Natriumcitrat

Hybridisierungspuffer:

5x	SSC
5x	Denhardt's-Lösung
50% (v/v)	Formamid
1% (w/v)	SDS

Waschpuffer 1:

2x	SSC
0,1% (w/v)	SDS

Waschpuffer 2:

0,2x	SSC
0,1% (w/v)	SDS

degradierte DNA aus Heringssperma (10 mg/ml) (Sigma)

Protokoll:

Zunächst wurde die Nylonmembran mit der immobilisierten RNA kurz in H₂O eingelegt. Der Hybridisierungspuffer wurde vor Gebrauch für mindestens 20min bei 80°C erhitzt und anschließend

Material und Methoden

mit 100µg/ml degradierter Heringssperma-DNA versetzt. Die Prähybridisierung der Membran erfolgte in 15ml Hybridisierungspuffer für mindestens 2h in einer Hybridisierungsröhre unter Rotation bei 42°C in einem Hybridisierungsöfen. Dies diente zur Absättigung unspezifischer Bindestellen auf der Membran. Anschließend wurden 10µl der kurz zuvor denaturierten radioaktiven cDNA-Sonde (2.2.4.3) zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht (12-16 Stunden) unter Rotation bei 42°C.

Am nächsten Tag wurden dann ungebundene Sondenmoleküle und freie Radionukleotide sowie unspezifisch gebundene Sondenmoleküle von der Membran entfernt. Hierzu wurde die Membran zwei niederstringenten sowie zwei hochstringenten Waschschritten unterzogen.

niederstringent:	2×	50 ml	Waschpuffer 1	25 °C	5 min
hochstringent:	1×	150 ml	Waschpuffer 2	42 °C	30 min
hochstringent:	1×	250 ml	Waschpuffer 2	42 °C	60 min

Zwischen den einzelnen Waschschritten wurde die Radioaktivität der Membran mit dem Handmonitor überprüft. Bei geringer Signalstärke wurde der Waschvorgang vorzeitig beendet. Die Membran wurde in Plastikfolie verpackt und konnte anschließend für die phosphorimager-basierende Auswertung sowie eine Autoradiographie verwendet werden.

2.2.4.5 Hybridisierung mit Rapid Hyb Buffer

Lösungen:

Rapid Hyb Buffer (Amersham-Pharmacia)

20× SSC, pH 7:	3,0	M	NaCl
	0,3	M	Natriumcitrat

Protokoll:

Für die Hybridisierung mit dem kommerziell erhältlichen Rapid Hyb Buffer musste das Protokoll leicht modifiziert werden, da dieser im Gegensatz zu dem selbst hergestellten Hybridisierungspuffer kein Formamid enthält. Zunächst wurde die Nylonmembran mit der immobilisierten RNA ebenfalls kurz in H₂O eingelegt. 15ml des Rapid Hyb Buffers wurden vor Gebrauch für mindestens 30min bei 65°C erhitzt und konnten anschließend direkt für die Prähybridisierung bei 65°C für mindestens 2h eingesetzt werden. Nach Zugabe von 10µl der denaturierten radioaktiven cDNA-Sonde (2.2.4.3) erfolgte die Hybridisierung über Nacht (12-16 Stunden) unter Rotation bei 65°C.

Die Entfernung von ungebundenen Sondenmolekülen und freien Radionukleotiden sowie unspezifisch gebundener Sondenmoleküle von der Membran erfolgte unter Verwendung der unter 2.2.4.4 beschriebenen Puffer durch zwei niederstringente und zwei hochstringente Waschschrritte.

niederstringent:	2×	50 ml	Waschpuffer 1	25 °C	60 min
hochstringent:	1×	150 ml	Waschpuffer 2	42 °C	60 min
hochstringent:	1×	250 ml	Waschpuffer 2	42 °C	60 min

Nach Abschluss des Waschvorgangs wurde die Membran in Plastikfolie verpackt und konnte anschließend für die phosphorimager-basierende Auswertung sowie eine Autoradiographie verwendet werden.

2.2.4.6 Auswertung und Autoradiographie

Material:

Hyperfilm MP (Amersham-Pharmacia)

Photochemikalien (Entwickler+Fixierer), (Kodak)

Die Exposition eines Phosphorimaging-Screens (BAS-IP MP 2025, FujiFilm) mit der Membran erfolgte für 24h bei Raumtemperatur in entsprechender Kassette. Anschließend wurden die Daten an einem Phosphorimager (BAS 1800, FujiFilm) mit entsprechender Software ausgelesen (BAS Reader) und densitometrisch quantifiziert (AIDA Image Analyzer). Zusätzlich wurde eine Autoradiographie durchgeführt. Hierzu wurde die Membran zusammen mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm MP, Amersham) in einer Röntgenkassette mit Verstärkerfolie für 1-6 Tage (je nach Signalstärke) bei -80°C exponiert. Der Röntgenfilm wurde anschließend unter Verwendung entsprechender Photochemikalien nach Herstellerangaben entwickelt.

2.2.4.7 Rehybridisierung der Membran

Um dieselbe Membran mehrmals mit verschiedenen radioaktiv markierten cDNA-Sonden hybridisieren zu können, ist es notwendig, die Sonde einer vorangegangenen Hybridisierung zu entfernen. Hier ist zu beachten, dass die Membran zwischen den verschiedenen Hybridisierungen nicht austrocknet, da eine Entfernung der Sonde sonst nicht mehr möglich ist.

Lösungen:

Stripping-Puffer:	50	mM	Tris/HCl, pH 8.0
	1%	(w/v)	SDS
	50%	(v/v)	Formamid

Protokoll:

Zur Entfernung hybridisierter radioaktiver cDNA-Sonden wurde die Membran zunächst für 30min bei 67°C mit 100ml Stripping-Puffer unter Rotation im Hybridisierungsofen inkubiert und daraufhin kurz mit H_2O gewaschen. Anschließend konnte die Membran für eine Hybridisierung mit einer weiteren cDNA-Sonde verwendet werden (2.2.4.4, 2.2.4.5).

2.2.5 Präparation und Analyse von DNA

2.2.5.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation großer Mengen Plasmid-DNA erfolgt in der Regel durch das als Transformation bezeichnete Einbringen entsprechender Plasmide in Bakterien (*Escherichia coli*), Selektion plasmidtragender Einzelzellen (Klonierung) sowie deren anschließender Vermehrung. Hierbei kommt es zu einer Amplifikation der eingebrachten Plasmid-DNA, die anschließend in großem Maßstab aus den Bakterien isoliert werden kann.

In dieser Arbeit wurden mehrere rekombinante Plasmidkonstrukte verwendet, die cDNA-Teilsequenzen verschiedener Gene enthielten. Eine ApoJ-spezifische SGP2-cDNA, eine α -Aktin-cDNA sowie eine GAPDH-cDNA aus Rattenzellen (rGAPDH-cDNA) waren in das Plasmid pBluescript II SK inkloniert. Die cDNA für die ribosomale 18S-Untereinheit (18S-cDNA) lag als rekombinantes pUC 19-Plasmid, die humane GAPDH-cDNA als rekombinantes pCR 4 Blunt TOPO-Plasmid vor. Alle Plasmidkonstrukte lagen in Form transformierter *Escherichia coli*-Klone (Stamm XL-1 blue, Stamm DH5 α) vor.

Die Amplifikation der cDNA-Plasmidkonstrukte erfolgte durch die Vermehrung der entsprechend transformierten Bakterienklone in LB-Medium mit anschließender Präparation der Plasmid-DNA nach Methode der alkalischen Lyse (QIAfilter Plasmid-Maxi-Kit, QIAGEN). Auf diese Weise war es möglich, große Mengen an Plasmid-DNA zu isolieren und diese von chromosomaler DNA, RNA und bakteriellen Proteinen zu trennen. Die gereinigten Plasmidkonstrukte konnten dann zur Präparation der entsprechenden cDNAs mittels Restriktionsverdau oder PCR eingesetzt werden.

Lösungen und Material:

Plasmid pBluescript II SK / SGP2-cDNA (1289 bp, Ratte) in XL-1 blue (Christina Weindel, Mainz)
Plasmid pBluescript II SK / rGAPDH-cDNA (515 bp, Ratte) in XL-1 blue (Christina Weindel, Mainz)
pUC 19 / 18S-cDNA (1078 bp, Ratte) in XL-1 blue (Christina Weindel, Mainz)
Plasmid pBluescript II SK / α -Aktin-cDNA (1500 bp, Maus) in XL-1 blue (Stratagene)
Plasmid pCR 4 Blunt TOPO / hGAPDH-cDNA (433 bp, human) in DH5 α (Dr. Rolf Postina, Mainz)

LB-Medium: 1% (w/v) Casein
 0,5% (w/v) Hefeextrakt
 0,5% (w/v) NaCl

Ampicillin, 50mg/ml

Ethanol, 70% (v/v)

Isopropanol, p.a.

QIAfilter Plasmid-Maxi-Kit (QIAGEN):

enthält: Puffer P1 (Resuspensionpuffer), Puffer P2 (Lysispuffer), Puffer P3 (Neutralisierungspuffer),
Puffer QBT (Äquilibriumspuffer), Puffer QC (Waschpuffer), Puffer QF (Elutionspuffer),
QIA-Filter-Maxi-Cartridges, QIAGEN tip 500 Säulen

Protokoll:

Zunächst wurden die Bakterienklone, welche die entsprechenden cDNA-Plasmide enthielten, vermehrt. Hierzu wurde 150ml steriles LB-Medium, das mit Ampicillin (50µg/ml) versetzt war, mit der entsprechenden Bakteriendauerkultur angeimpft und über Nacht im Wasserbadschüttler bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden dieser Kultur 100ml entnommen, die Bakterien für 20min bei 5000×g und 4°C sedimentiert und anschließend in 10ml Puffer P1 resuspendiert. Um die Bakterien zu lysieren und die Plasmid-DNA freizusetzen, wurden der Suspension 10ml Puffer P2 zugegeben, kurz gemischt (nicht gevortext) und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 10ml kalten Puffer P3 wurde das Lysat in einen Filter (QIA-Filter-Maxi-Cartridge) überführt und 10min inkubiert. Anschließend wurde das Lysat durch den Filter direkt auf eine QIAGEN-tip500-Säule aufgetragen, die zuvor mit 10ml Puffer QBT äquilibriert worden war. Nachdem das Filtrat die Säule vollständig durchlaufen hatte, wurde die an das Säulenmaterial gebundene Plasmid-DNA 2× mit 30ml Puffer QC gewaschen und anschließend mit 15ml Puffer QF eluiert.

Als letzter Schritt der Präparation wurde die eluierte Plasmid-DNA gefällt. Hierzu wurde das Eluat mit 10.5ml Isopropanol gemischt und für 60 Minuten bei 5000×g und 4°C zentrifugiert. Die präzipitierte DNA wurde anschließend mit 5ml 70% Ethanol überschichtet und nochmals zentrifugiert (20 Minuten, 5000×g, 4°C). Schließlich wurde die Plasmid-DNA kurz luftgetrocknet und in 1000µl H₂O aufgenommen.

2.2.5.1.1 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung präparierter Plasmid-DNA

Es wurden 1:100-Verdünnungen der DNA-Stammlösungen in einer 1ml Quarzküvette photometrisch (Spektrophotometer, Hitachi) auf Konzentrationsgehalt und Reinheitsgrad untersucht. Hierzu wurde die Absorption der Lösung bei den Wellenlängen 260nm (Nukleinsäuren) und 280nm (Proteine) gemessen. Dabei gilt:

$$\text{Abs}_{260\text{nm}} = 1 \quad \hat{=} \quad 50\mu\text{g/ml RNA (doppelsträngig)}$$

$$\text{Abs}_{260\text{nm}}/\text{Abs}_{280\text{nm}} = 1,8 - 2,0 \quad \hat{=} \quad \text{reine DNA-Lösung}$$

2.2.5.2 Restriktionsverdau rekombinanter Plasmide

Um die in die Plasmide einklonierten Apolipoprotein J-spezifische SGP2-cDNA, die α-Aktin-cDNA, die aus der Ratte stammende GAPDH-cDNA (rGAPDH) sowie die ribosomale 18S-cDNA zu isolieren, mussten zunächst die rekombinanten Plasmide mit Hilfe geeigneter Restriktionsendonukleasen hydrolysiert werden.

Hierzu wurden die rekombinanten Plasmide pSK-SGP2 und pUC19-18S mit den Enzymen *Bam*HI und *Hind*III, das Plasmid pSK-rGAPDH mit den Enzymen *Ap*aI und *Ac*cI und das Konstrukt pSK-α-Aktin mit den Enzymen *Eco*RI und *Xho*I verdaut. Alle cDNAs waren jeweils über die entsprechenden Restriktionsschnittstellen in das Plasmid integriert worden und konnten somit vollständig herausgeschnitten werden.

Material und Methoden

Lösungen und Reagenzien:

Restriktionsendonukleasen:	<i>EcoRI</i>	10 U/μl	(Roche Diagnostics)
	<i>HindIII</i>	10 U/μl	(Roche Diagnostics)
	<i>BamHI</i>	10 U/μl	(Roche Diagnostics)
	<i>Apal</i>	10 U/μl	(Roche Diagnostics)
	<i>Accl</i>	10 U/μl	(New England Biolabs)
	<i>XhoI</i>	20 U/μl	(New England Biolabs)

10× Restriktionspuffer B (Roche Diagnostics)

10× Restriktionspuffer H (Roche Diagnostics)

10× Restriktionspuffer NEB 4 (New England Biolabs)

Restriktionsansätze:

pSK-SGP-2 × *BamHI* + *HindIII*, pUC19-18S × *BamHI* + *HindIII*:

	75	μg	Plasmid-cDNA-Konstrukt
	30	μl	10× Restriktionspuffer
	5	μl	<i>HindIII</i> (10 U/μl)
	5	μl	<i>BamHI</i> (10 U/μl)
ad	300	μl	H ₂ O

pSK-α-Aktin × *EcoRI* + *XhoI*:

	75	μg	Plasmid-cDNA-Konstrukt
	30	μl	10× Restriktionspuffer H
	5	μl	<i>EcoRI</i> (10 U/μl)
	5	μl	<i>XhoI</i> (20 U/μl)
ad	300	μl	H ₂ O

pSK-rGAPDH × *Apal* + *Accl*:

	75	μg	Plasmid-cDNA-Konstrukt
	30	μl	10× Restriktionspuffer NEB 4
	5	μl	<i>Apal</i> (10 U/μl)
ad	294	μl	H ₂ O
		→	Inkubation für 6h bei 30°C
	+ 6	μl	<i>Accl</i> (10 U/μl)

Beim Doppelverdau des pSK-rGAPDH-Konstruktes war es notwendig, beide Restriktionen nacheinander durchzuführen. Grund hierfür war das unterschiedliche Temperaturoptimum der verwendeten Enzyme. Deshalb wurde das Plasmidkonstrukt zunächst mit *Apal* für 6h bei 30°C linearisiert und anschließend mit dem Enzym *Accl*, wie alle anderen Restriktionsansätze auch, über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Restriktionen auf Vollständigkeit überprüft, indem 2μl der Ansätze elektrophoretisch in einem Agarosegel (0.7% Agarose) aufgetrennt wurden (2.2.5.3). Bei einem vollständigen Verdau waren jeweils 2 DNA-Fragmente zu erkennen, die in ihrer Größe den linearisierten Plasmiden pSK (≈2.9kb) bzw. pUC19 (≈2.7kb) und der cDNA (SGP-2: 1289 bp, 18S: 1078 bp, α-Aktin: 1500 bp, rGAPDH: 515 bp) entsprachen. Bei unvollständigem Verdau wurden nochmals je 2μl der entsprechenden Restriktionsendonukleasen zugegeben und der Ansatz für weitere 5-6 h inkubiert. Nach vollständiger Restriktion der Plasmid-cDNA-Konstrukte wurden die einzelnen cDNAs mittels präparativer DNA-Agarosegelelektrophorese und anschließender Gelextraktion isoliert.

2.2.5.3 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die DNA-Agarosegelelektrophorese wurde in vorliegender Arbeit unter anderem zur Überprüfung von Plasmid-DNA-Restriktionen, zum Nachweis von PCR-Produkten, zur Auswertung semiquantitativer RT-PCRs sowie zur Überprüfung der Reinheit isolierter DNA (Plasmid-DNA, cDNA) verwendet. Neben analytischen Untersuchungen wurde die Agarosegelelektrophorese auch eingesetzt, um spezifische DNA-Moleküle aus einem komplexen Gemisch im präparativen Maßstab zu isolieren. Hierzu wurden nach elektrophoretischer Trennung einzelne DNA-Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die entsprechenden DNA-Fragmente anschließend mittels Gelextraktion gereinigt (2.2.5.4).

Lösungen und Material:

1× TBE-Puffer, pH 8,3:	89 mM	Tris
	89 mM	Borsäure
	2 mM	EDTA
6× Probenpuffer:	0.25%(w/v)	Bromphenolblau
	40% (w/v)	Saccharose

DNA-Längenstandards VII + XIV (Roche Diagnostics)

Ethidiumbromid, 10mg/ml

Agarose MP (Roche Diagnostics)

Protokoll:

Je nach Agarosegehalt des Gels wurde eine entsprechende Menge Agarose in einem Erlenmeyerkolben mit 75ml 0,5× TBE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle aufgekocht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nach Zugabe von 1µl Ethidiumbromidlösung wurde der Ansatz in eine Flachbettgelapparatur gegossen. Nach dem Aushärten (15-20min) und dem Überschichten des Gels mit 0,5x TBE-Puffer wurden die Proben aufgetragen und die Elektrophorese bei einer Spannung von 10V/cm Gellänge für 30min durchgeführt. Alle Proben wurden vorher mit $\frac{1}{5}$ Volumen Probenpuffer versetzt. Zusätzlich wurde bei jeder Agarosegelelektrophorese 1µg DNA eines DNA-Längenstandards aufgetragen. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel auf einem UV-Transilluminator analysiert und mit einem Kamerasystem dokumentiert.

2.2.5.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Sowohl die durch Restriktionsverdau der entsprechenden Plasmidkonstrukte als auch die durch PCR hergestellten cDNAs wurden mit Hilfe einer präparativen Agarosegelelektrophorese (2.2.5.3) und anschließender Extraktion der cDNAs aus dem Gel aufgereinigt.

Während der präparativen Gelelektrophorese werden die cDNAs aufgrund von Molekulargewichtsunterschieden von der linearisierten Plasmid-DNA bzw. von unspezifischen PCR-Produkten getrennt. Nach Ablauf der Elektrophorese wird dann die gewünschte DNA-Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Das Prinzip der anschließenden DNA-Gelextraktion besteht darin, die in dem Gelstück enthaltene DNA durch Schmelzen der Agarose in

Material und Methoden

einem geeigneten Puffer in Lösung zu bringen. Anschließend wird die DNA an eine Matrix gebunden, die als immobilisiertes Säulenmaterial (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN) vorliegt. Nach mehreren Waschschritten kann die DNA schließlich in reiner Form eluiert werden.

Lösungen und Material:

QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)
enthält: Puffer QG, Puffer PE, Puffer EB, QIAquick-Zentrifugensäulen
Isopropanol, p.a.

Protokoll:

Das aus dem Agarosegel ausgeschnittene Gelstück wurde gewogen und in einem entsprechenden Volumen an Puffer QG (300µl Puffer QG / 100mg Gel) bei 50°C im Wasserbad vollständig geschmolzen. Anschließend wurden 100µl Isopropanol pro 100mg Gel zugesetzt und die Probe gemischt. Der gesamte Ansatz wurde dann auf eine QIAquick-Zentrifugensäule gegeben und für 1min bei 10.000×g in einer Tischzentrifuge (Labotech) zentrifugiert. War das Gesamtvolumen größer als 750µl, wurde dieser Schritt wiederholt. Dabei war darauf zu achten, dass die DNA-Menge die maximale Bindekapazität der Säule (10µg DNA) nicht überschreitet. Nach Bindung der DNA an das Säulenmaterial folgte zunächst ein Waschschriff mit 500µl Puffer QG und anschließend ein weiterer Waschschriff mit 750µl Puffer PE. Das essentielle Trocknen des Säulenmaterials erfolgte dann durch Zentrifugation der Säule für mindestens 2min bei 10.000×g. Anschließend wurden 60µl Puffer EB auf die Säule gegeben und die DNA nach 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur durch Zentrifugation (1min, 10.000×g) eluiert. Menge und Reinheit der isolierten DNA wurden schließlich mittels Agarosegelelektrophorese (2.2.5.3) überprüft.

2.2.5.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

In dieser Arbeit wurde mittels PCR unter anderem eine Teilsequenz der humanen cDNA für das Enzym Glycerinaldehyddehydrogenase (GAPDH) in großen Mengen hergestellt, die anschließend als spezifische Sonde für die Northern-Blot-Hybridisierung eingesetzt wurde. Als Matrize diente hierbei ein rekombinantes Plasmidkonstrukt, das die entsprechende GAPDH-Sequenz enthielt. Für die Präparation anderer cDNAs wurde eine RT-PCR durchgeführt. RT-PCRs wurden zudem als qualitative Methode für Genexpressionsanalysen sowie als semiquantitative Methode für Genregulationsanalysen (semiquantitative RT-PCR) herangezogen.

2.2.5.5.1 Erststrangsynthese mittels reverser Transkription von RNA

Die Erststrangsynthese erfolgt durch reverse Transkription von RNA in einzelsträngige DNA durch das Enzym Reverse Transkriptase, einer retroviralen RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Dieses Enzym synthetisiert einen zu einzelsträngiger RNA (Matrize) komplementären DNA-Strang. Das freie 3'-OH Ende, das zum Start der DNA-Polymerasereaktion benötigt wird, wird in Form einzelsträngiger Oligo-dT-Nukleotide zur Verfügung gestellt. Diese hybridisieren an das

polyadenylierte 3'-Ende aller in der Gesamt-RNA vorliegenden mRNA-Moleküle. Während der Polymerasereaktion entstehen intermediär RNA-DNA-Hybride. Der RNA-Anteil dieser doppelsträngigen Bereiche wird durch die RNaseH-Aktivität der reversen Transkriptase hydrolysiert, was zu einem Abbau des RNA-Matrizenmoleküls führt. Der neu synthetisierte komplementäre DNA-Gegenstrang (cDNA) eines mRNA-Moleküls liegt schließlich als einzelsträngige DNA vor. Durch reverse Transkription zellulärer Gesamt-RNA entsteht ein Gemisch verschiedener einzelsträngiger cDNA-Moleküle (Erststränge), welche anschließend als Ausgangsmaterial für die Amplifikation einer spezifischen doppelsträngigen cDNA mittels PCR unter Verwendung genspezifischer Primer eingesetzt werden kann.

Lösungen und Reagenzien:

SuperScript II Reverse Transcriptase (200 U/μl), (Invitrogen, Cat.No. 18064022)

5× Reaktionspuffer (250mM Tris/HCl, pH 8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂)

DTT (100mM)

dNTP-Mix (10mM, 4× 2,5mM), (Invitrogen)

Oligo-dT-Primer (500ng/μl), (Invitrogen)

Protokoll:

5μg zelluläre Gesamt-RNA wurden unter Vakuum lyophilisiert und anschließend in 10μl H₂O gelöst.

Die Erststrangsynthese wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Ansatz:	10 μl	Gesamt-RNA (5μg)
	1 μl	Oligo-dT-Primer
	1 μl	dNTP-Mix
	→	Denaturierung für 5 min bei 65°C
	→	sofort für 2 min auf Eis
	+ 4 μl	5× Reaktionspuffer
	+ 2 μl	DTT
	+ 1 μl	H ₂ O
	→	Äquilibrierung für 2 min bei 42°C
	+ 1 μl	Superscript II Reverse Transcriptase (200 U/μl)

Die Reaktion erfolgte für 50min bei 42°C im Thermocycler. Die reverse Transkriptase wurde anschließend für 15min bei 70°C inaktiviert und der Ansatz schließlich mit 30μl H₂O auf ein Gesamtvolumen von 50μl aufgefüllt. Hiervon wurden in der Regel 5μl als Erststrang (+RT) für die anschließenden PCRs verwendet. Bei jeder Erststrangsynthese wurde zudem ein Kontrollansatz pipettiert, bei dem statt der reversen Transkriptase 1μl H₂O zugegeben wurde. Dieser als Erststrang (-RT) bezeichnete Ansatz wurde bei PCR-basierenden Genexpressionsanalysen als Matrize in entsprechenden Kontrollreaktionen eingesetzt.

2.2.5.5.2 Amplifikation von cDNA mittels PCR

Als DNA-Polymerase wurde in dieser Arbeit eine chemisch modifizierte *Taq*-Polymerase (Hot Star Taq Master Mix Kit (QIAGEN, Cat.No. 203443)) verwendet, die vor Beginn der Reaktion zunächst für 15min bei 94°C aktiviert werden musste. Dieses Enzym war Teil eines bereits vorgefertigten, 2× konzentrierten Reaktionsgemisches, das zusätzlich dNTPs (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), Reaktionspuffer und die benötigten enzymatischen Kofaktoren enthielt.

2.2.5.5.2.1 Verwendete Primer

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz	Größe des PCR-Amplifikats
GAPDH-F	sense	5'- GAA GGG CTC ATG ACC ACA -3'	437 bp
GAPDH-R	antisense	5'- TCA TTG TCG TAC CAG GAA ATG -3'	
MMP-3-F	sense	5'- TGA AGA TGA CAG GGA AGC TG -3'	685 bp
MMP-3-R	antisense	5'- CTG ACT GCA TCG AAG GAC AA -3'	
CTGF-F2	sense	5'- GGG AAA TGC TGT GAG GAG TG -3'	511 bp
CTGF-R	antisense	5'- TGT AAT GGC AGG CAC AGG TC -3'	
iNOS-F2	sense	5'- CAG AAG CAG AAT GTG ACC ATC -3'	927 bp
iNOS-R	antisense	5'- CAT GGT GAA CAC GTT CTT GG -3'	
MIP-2-F	sense	5'- CTC AAT GCT GTA CTG GTC CTG -3'	277 bp
MIP-2-R	antisense	5'- AGT TAG CCT TGC CTT TGT TCA G -3'	
TLR2-F	sense	5'- CGT GAG ATA TTT AGA ACT AAG AG -3'	726 bp
TLR2-R	antisense	5'- CTA ACA TCC AAC ACC TCC AG -3'	
TLR3-F	sense	5'- GGA GGG TCT TGA GAA TCT AG -3'	728 bp
TLR3-R	antisense	5'- TCT CTG TCT TTC TGG GCA TG -3'	
TLR4-F	sense	5'- TCA TGG GTC TAG AAG AGC TG -3'	994 bp
TLR4-R	antisense	5'- AAG ATA CAC CAA CGG CTC TG -3'	
IFN-β-F	sense	5'- GAT GGA GAA GAG TTA CAC TG -3'	239 bp
IFN-β-R	antisense	5'- GTA CCC TCC AGT AAT AGC TC -3'	
IFN-α1-F	sense	5'- GCA CAA ATG AGG AGA CTC TC -3'	389 bp
IFN-α1-R	antisense	5'- ACT TCT GCT TTG ACC ACC TC -3'	

2.2.5.5.2 Präparative RT-PCR

In vorliegender Arbeit wurden mittels präparativer RT-PCR große Mengen genspezifischer cDNA hergestellt, um diese nach Markierung als cDNA-Sonden für Northern-Blot-Analysen sowie für Sequenzierungsreaktionen zu verwenden. Für die Präparation einer einzigen cDNA wurden in der Regel mehrere (4-6) identische PCR-Reaktionen parallel angesetzt.

PCR-Ansatz:	12,5 µl	Hot Star Taq Master Mix Kit (QIAGEN)
	5 µl	Erststrang (+RT)
	2 µl	Sense-Primer (10pmol/µl)
	2 µl	Antisense-Primer (10pmol/µl)
	3,5 µl	H ₂ O

Die anschließende PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

15min	94 °C	initiale Denaturierung, Aktivierung der <i>Taq</i> -Polymerase	} × 30 - 35 Zyklen
1min	94 °C	Denaturierung	
1min	57 °C	Hybridisierung	
1min	72 °C	Elongation	
10min	72 °C	finale Extension	

Die PCR-Amplifikate wurden mit Hilfe einer präparativen Agarosegelelektrophorese (2.2.5.3) und anschließender Gelextraktion (2.2.5.4) aufgereinigt. Um die Spezifität aller in dieser Arbeit verwendeten PCR-Amplifikate sicherzustellen, wurden diese unter Verwendung der entsprechenden spezifischen Primer im Auftrag sequenziert (GENterprise GmbH, Universität Mainz).

2.2.5.5.3 Genexpressionsanalyse mittels analytischer RT-PCR

Um zu überprüfen, ob Zellen ein bestimmtes Gen exprimieren, wurde ebenfalls die Methode der RT-PCR angewandt. Grundvoraussetzung für die Expression eines bestimmten Proteins ist die Transkription des entsprechenden Gens, was zur Synthese der genspezifischen mRNA führt. Diese mRNA kann schließlich nach Präparation der zellulären Gesamt-RNA, reverser Transkription und nachfolgender PCR mit spezifischen Primern nachgewiesen werden. Ist ein bestimmtes Gen transkriptionell aktiv, entsteht hierbei während der PCR ein entsprechendes genspezifisches PCR-Amplifikat. Dieses lässt sich dann mit Ethidiumbromid unter UV-Licht im Agarosegel sichtbar machen. Im Falle transkriptionell inaktiver, nicht exprimierter Gene erfolgt keine Amplifikation genspezifischer PCR-Produkte während der PCR.

Um auszuschließen, dass eine Kontamination von PCR-Komponenten durch fremde DNA bzw. eine Kontamination der RNA durch genomische DNA für die Entstehung des PCR-Amplifikates verantwortlich ist, wurden Kontroll-PCRs durchgeführt, denen Erststrang (-RT) (2.2.5.5.1) als Matrize zugesetzt wurde. Zudem wurden ausschließlich sterile gestopfte Pipettenspitzen verwendet, um eine Kontamination durch Aerosole zu vermeiden.

Material und Methoden

PCR-Ansatz:	12,5 μ l	Hot Star Taq Master Mix Kit (QIAGEN)
	5 μ l	Erststrang (+RT / -RT)
	1 μ l	Sense-Primer (10pmol/ μ l)
	1 μ l	Antisense-Primer (10pmol/ μ l)
	5,5 μ l	H ₂ O

Die anschließende PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

15min	94 °C	initiale Denaturierung, Aktivierung der <i>Taq</i> -Polymerase	} × 25 Zyklen
1min	94 °C	Denaturierung	
1min	50 °C	Hybridisierung	
1min	72 °C	Elongation	
10min	72 °C	finale Extension	

Im Anschluss wurden 10 μ l der PCR-Ansätze auf ein Agarosegel aufgetragen und die DNA elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.5.3). Auswertung und Dokumentation erfolgte mit einem UV-Transilluminator und entsprechender Kamera.

2.2.5.5.2.4 Genregulationsanalyse mittels semiquantitativer RT-PCR

Die Methode der RT-PCR kann auch für quantitative Analysen herangezogen werden. In dieser Arbeit wurde hierfür die semiquantitative Endpunkt-RT-PCR angewandt. Mit dieser ist es möglich, eine Aussage über die relativen Mengen einer bestimmten mRNA in verschiedenen Proben zu machen. Unterscheiden sich diese Mengen deutlich voneinander, sind nach Erststrangsynthese, PCR und anschließender Agarosegelelektrophorese unter UV-Licht unterschiedlich starke Bandenintensitäten des entsprechenden PCR-Amplifikates bei verschiedenen Proben zu erkennen. Im Gegensatz zur quantitativen Real-Time-PCR oder der Northern-Blot-Analyse sind aufgrund der logarithmischen Amplifikation des Signals während der PCR sowie des optischen Detektionsverfahrens durch Ethidiumbromid unter UV-Licht jedoch keine exakten quantitativen Aussagen möglich. Mengenunterschiede einer bestimmten mRNA um Faktor ≥ 10 sind jedoch nachweisbar. Ein großer Vorteil der semiquantitativen RT-PCR gegenüber der Northern-Blot-Analyse ist der geringe Zeitaufwand. Zudem ist es möglich, mehrere verschiedene mRNAs zeitgleich in einem Experiment zu untersuchen.

In der Durchführung unterscheidet sich die semiquantitative RT-PCR nur gering von der analytischen RT-PCR. Aufgrund des quantitativen Charakters dieser Experimente soll das entsprechende Protokoll dennoch separat erwähnt werden. Die Erststrangsynthesen verschiedener Proben desselben Experimentes wurden zeitgleich durchgeführt. Der PCR-Ansatz war identisch zu dem der analytischen RT-PCR. Um Pipettierfehler zu minimieren, wurden Sense, Antisenseprimer und H₂O in entsprechendem Verhältnis zuvor gemischt und 7,5 μ l hiervon für eine PCR-Reaktion eingesetzt. Für jede untersuchte mRNA einzelner Proben wurde jeweils eine separate PCR angesetzt. Um zu gewährleisten, dass in allen PCRs eines Experimentes gleiche Mengen an revers transkribierter Gesamt-RNA eingesetzt wurden, wurde für jede Probe zusätzlich eine Reaktion mit GAPDH-

spezifischen Primern angesetzt. Das entsprechende PCR-Amplifikat diente hierbei als interner Standard. Alle PCRs eines Experimentes wurden zeitgleich im selben Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

15min	94 °C	initiale Denaturierung, Aktivierung der <i>Taq</i> -Polymerase	} × 25 Zyklen
1min	94 °C	Denaturierung	
1min	54 °C	Hybridisierung	
1min	72 °C	Elongation	
10min	72 °C	finale Extension	

Anschließend wurden 3µl-20µl der einzelnen PCR-Ansätze (je nach Spezifität der PCR) in einem 1,5%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Auswertung und Dokumentation erfolgte mit einem UV-Transilluminator und entsprechender Kamera.

2.2.5.5.2.5 Präparative PCR zur Amplifikation der humanen GAPDH-cDNA

Für die Herstellung großer Mengen an humaner GAPDH-cDNA als Sonde für die Northern-Blot-Analyse wurde eine präparative PCR durchgeführt. Diese cDNA lag in Form eines rekombinanten Plasmidkonstruktes (pCR 4 Blunt TOPO / GAPDH-cDNA) vor, das als Matrize für die PCR diente. Bei der Integration des humanen GAPDH-RT-PCR-Amplifikates (437 bp) in das Plasmid kam es zu einer Deletion von 4 Basenpaaren am 5'-Ende der cDNA. Somit konnte sich der entsprechende GAPDH-spezifische Sense-Primer in der folgenden PCR nur über die 14 3'-terminalen Nukleotide an die Matrizen-DNA anlagern. Aus diesem Grund musste die Hybridisierungstemperatur während der PCR auf 38°C herabgesetzt werden. Dem PCR-Ansatz wurden 40ng DNA des pCR 4 Blunt TOPO / GAPDH-cDNA-Plasmids sowie jeweils 20pmol Sense-Primer (GAPDH-F) und Antisense-Primer (GAPDH-R) zugesetzt. Die anschließende PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

15min	94 °C	initiale Denaturierung, Aktivierung der <i>Taq</i> -Polymerase	} × 30 Zyklen
1min	94 °C	Denaturierung	
1min	38 °C	Hybridisierung	
1min	72 °C	Elongation	
10min	72 °C	finale Extension	

Das PCR-Amplifikat wurde dann mit Hilfe einer präparativen Agarosegelelektrophorese (2.2.5.3) und anschließender Gelextraktion (2.2.5.4) aufgereinigt und konnte daraufhin als spezifische GAPDH cDNA-Sonde für Northern-Blot-Analysen eingesetzt werden.

3 Ergebnisse

3.1. Einfluss nekrotischer Zellen auf die ApoJ-mRNA-Expression in vitalen Rat1-Fibroblasten in Gegenwart von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin

Wie Ergebnisse unsere Arbeitsgruppe zeigten, führt eine Inkubation von embryonalen Fibroblasten der Zelllinie Rat1 mit Fragmenten apoptotischer und nekrotischer Zellen unter serumhaltigen Bedingungen zu einer Induktion der ApoJ-mRNA-Expression in diesen Zellen (Bach et al. 2001). Dass die ApoJ-induzierenden Komponenten der sedimentierbaren Zellfragmente sowohl hitze- als auch trypsinresistente Eigenschaften aufwiesen und auch eine Inkubation von Rat1-Fibroblasten mit phosphatidylserinhaltigen Liposomen zu einer vermehrten Expression von ApoJ-mRNA führte, ist ein Hinweis darauf, dass in zellulären Membranfragmenten vorhandenes Phosphatidylserin an der durch nekrotische Zellen induzierten ApoJ-Genexpression beteiligt sein könnte (Bach et al. 2001). Weiterführende Untersuchungen an einem Zellsystem von Rat1-Fibroblasten, die zuvor auf eine Kultivierung unter permanent serumfreien Bedingungen adaptiert wurden, zeigten, dass eine Inkubation mit phosphatidylserinhaltigen Liposomen ausschließlich in Gegenwart von fetalem Kälberserum, nicht jedoch unter serumfreien Bedingungen, eine Akkumulation ApoJ-spezifischer mRNA induziert. Im Gegensatz hierzu führte die Inkubation mit nekrotischem Zellmaterial auch unter serumfreien Bedingungen zu einer Aktivierung der ApoJ-Genaktivität in diesen Zellen. Zudem waren unter serumfreien Bedingungen die Phospholipide Phosphatidsäure und Lysophosphatidsäure in der Lage, eine Akkumulation von ApoJ-mRNA in serumfrei-adaptierten Rat1-Fibroblasten zu induzieren. Dies deutete darauf hin, dass die Modulation der ApoJ-Genexpression durch nekrotische Zellen in diesen adaptierten Rat1-Zellen nicht durch Phosphatidylserin vermittelt wird. Zugleich war dies ein Hinweis darauf, dass in Membranfragmenten nekrotischer Zellen enthaltene Phosphatidsäure an der Regulation der ApoJ-Genexpression in serumfrei-adaptierten Rat1-Fibroblasten beteiligt sein könnte (M. Baiersdörfer, Diplomarbeit).

Weiterführende Untersuchungen im Rahmen vorliegender Arbeit zeigten, dass für eine durch Phosphatidylserin induzierte 2-fache Erhöhung der ApoJ-mRNA-Expression in Rat1-Fibroblasten, die nicht auf eine permanente Kultivierung unter serumfreien Bedingungen adaptiert wurden, ebenfalls die Gegenwart von Serumkomponenten notwendig ist (ohne Abb.). Um auch in diesem Zellsystem eine potentielle serumunabhängige Induktion der ApoJ-Genexpression durch nekrotisches Zellmaterial zu untersuchen, sollten in ersten Experimenten Rat1-Zellen, die standardmäßig in Gegenwart von 5% fetalem Kälberserum (FKS) kultiviert werden, sowohl unter serumhaltigen Bedingungen als auch in Abwesenheit von Serum mit nekrotischen Zellen koinkubiert werden. Anschließend sollte mittels Northern-Blot-Analysen der ApoJ-mRNA Gehalt der vitalen Rat1-Zellen mit dem entsprechender Kontrollzellen verglichen werden. Eine vermehrte Expression von ApoJ *in vivo* erfolgt häufig in degenerierenden Geweben, in denen Zellen nach Induktion apoptotischer Prozesse absterben und es als Folge zu einer lokalen Akkumulation apoptotischer und sekundär nekrotischer (postapoptotischer) Zellen kommt. Um den Einfluss einer vorausgehenden Induktion apoptotischer Prozesse auf die ApoJ-induzierenden Eigenschaften nekrotischer Zellen zu

untersuchen, sollte zudem überprüft werden, ob primär nekrotische oder sekundär nekrotische (postapoptotische) Zellen in unterschiedlicher Weise die ApoJ-mRNA-Expression vitaler Rat1-Zellen beeinflussen. Mittels differentieller Zentrifugation von nekrotischem Zellmaterial sollte anschließend überprüft werden, zu welchem Anteil lösliche bzw. sedimentierbare Faktoren die ApoJ-induzierenden Eigenschaften nekrotischer Zellen vermitteln.

3.1.1 Die Inkubation mit nekrotischen Zellen induziert in serumunabhängiger Weise die ApoJ-mRNA-Expression in vitalen Rat1-Fibroblasten

Zunächst wurden nekrotische Zellen wie unter 2.2.1.4 beschrieben durch 5-maliges Einfrieren und Auftauen lebender Rat1-Fibroblasten (primäre Nekrose) bzw. apoptotischer Rat1-Fibroblasten (sekundäre Nekrose) in flüssigem Stickstoff präpariert. Als apoptotische Zellen wurden hierbei Rat1-Fibroblasten verwendet, die nach serumfreier Inkubation für 18h mit 3 μ M Camptothecin wie unter 2.2.1.2 beschrieben präpariert wurden und die apoptosespezifische Merkmale (Caspase 3-Aktivierung, DNA-Fragmentierung, Externalisierung von Phosphatidylserin) aufwiesen (ohne Abb.). Die nekrotischen Zellen lagen in beiden Fällen in serumfreiem Medium vor, das 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin enthielt.

Um den Einfluss der auf diese Weise präparierten primär und sekundär nekrotischen Zellen auf die Regulation des ApoJ-Gens lebender Zellen zu untersuchen, wurden vitale Rat1-Fibroblasten unter serumfreien Bedingungen bzw. in Gegenwart von 5% FKS mit 7 \times 10⁶ primär bzw. sekundär nekrotischen Rat1-Fibroblasten für 6h-48h inkubiert. Kontrollzellen wurden unter den entsprechenden Bedingungen (0% FKS, 5% FKS) in Abwesenheit nekrotischer Zellen inkubiert. Das für dieses Experiment verwendete Zellkulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurde der ApoJ-mRNA-Gehalt der lebenden Rat1-Fibroblasten nach Präparation der Gesamt-RNA mittels Northern-Blot-Analyse untersucht.

Wie Abbildung 3.1.1 zeigt, führt die Koinkubation lebender Rat1-Fibroblasten mit primär und sekundär nekrotischen Zellen zu einem Anstieg des ApoJ-mRNA-Gehaltes in den vitalen Rat1-Fibroblasten. Eine deutliche Erhöhung der Menge an ApoJ-spezifischer mRNA ist hierbei nach einer Inkubationsdauer von etwa 24h zu beobachten. Weiterhin ist die durch nekrotische Zellen induzierte Akkumulation von ApoJ-mRNA in lebenden Rat1-Fibroblasten serumunabhängig. Darüber hinaus ist kein deutlicher Unterschied in der ApoJ-induzierenden Wirkung primär und sekundär nekrotischer Zellen zu erkennen. Eine Aktivierung der ApoJ-induzierenden Faktoren während der Apoptose scheint somit nicht notwendig zu sein. Der Einfluss von Serum beschränkt sich auf die Reduktion des relativen Ausmaßes der ApoJ-Regulation nach 48h. Eine densitometrische Auswertung mittels Phosphorimager zeigt, dass relativ zu entsprechenden Kontrollzellen die Inkubation mit primär nekrotischen Zellen nach 48h eine Erhöhung des ApoJ-mRNA/GAPDH-mRNA-Verhältnisses in vitalen Rat1-Fibroblasten um Faktor 6,43 (0% FKS) bzw. 1,94 (5% FKS) induziert. Das entsprechende ApoJ-mRNA/GAPDH-mRNA-Verhältnis in Rat1-Fibroblasten nach 48-stündiger Inkubation mit sekundär nekrotischen Zellen ist gegenüber den jeweiligen Kontrollen um Faktor 3,46 (0% FKS) bzw. 1,50 (5% FKS) erhöht.

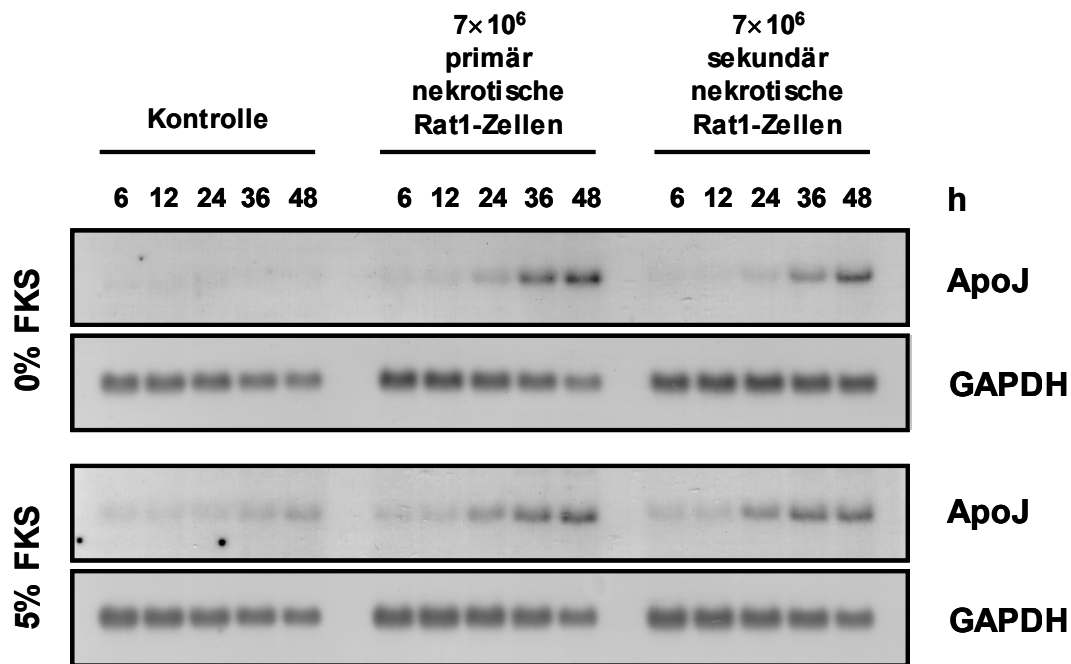


Abbildung 3.1.1: Die Inkubation mit nekrotischen Zellen induziert in serumunabhängiger Weise die ApoJ-mRNA-Expression in vitalen Rat1-Fibroblasten: Northern-Blot-Analyse von 15µg Gesamt-RNA aus Rat1-Zellen, die für 6, 12, 24, 36 und 48h unter serumfreien (0% FKS) sowie serumhaltigen (5% FKS) Bedingungen mit 7×10⁶ primär nekrotischen Rat1-Zellen bzw. 7×10⁶ sekundär nekrotischen Rat1-Zellen inkubiert wurden. Kontrollzellen wurden mit entsprechendem Medium allein inkubiert (Kontrolle). Das Zellkulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz.

Wie weitere Experimente zeigten, beeinflusst die Inkubation mit 5×10⁶ apoptotischen Zellen die Regulation des ApoJ-Gens in vitalen Rat1-Fibroblasten in ähnlicher Weise wie primär und sekundär nekrotische Rat1-Zellen (ohne Abb.). Wie sich zeigte, besitzen auch apoptotische Rat1-Fibroblasten die Eigenschaft, nach einer Inkubationsdauer von etwa 24h in serumunabhängiger Weise eine Akkumulation ApoJ-spezifischer mRNA in lebenden Rat1-Zellen zu induzieren. Allerdings ist aufgrund der relativ langen Inkubationsdauer anzunehmen, dass während dieser Experimente zumindest ein Teil der apoptotischen Zellen in eine sekundäre Nekrose übergegangen war und somit der Anteil sekundär nekrotischer Zellen nicht unerheblich zur Induktion der ApoJ-mRNA-Expression in den vitalen Rat1-Fibroblasten beigetragen hat.

3.1.2 Die Induktion der ApoJ-mRNA-Expression in vitalen Rat1-Fibroblasten wird durch sedimentierbare und lösliche Faktoren nekrotischer Zellen vermittelt

Um zu überprüfen, ob die Induktion der transkriptionellen Aktivität des ApoJ-Gens durch lösliche oder sedimentierbare Faktoren nekrotischer Zellen vermittelt wird, sollten primär nekrotische Rat1-Fibroblasten zunächst mittels differentieller Zentrifugation fraktioniert und die einzelnen Fraktionen anschließend getrennt voneinander auf ihre ApoJ-induzierenden Eigenschaften hin untersucht werden.

Die Präparation primär nekrotischer Rat1-Zellen erfolgte wie unter 2.2.1.4 beschrieben durch 5-maliges Einfrieren und Auftauen einer Suspension vitaler Rat1-Fibroblasten (5×10^6 Zellen/ml) in flüssigem Stickstoff. Die Zellen lagen hierbei in serumfreiem Medium vor, dem 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin zugesetzt war. Durch Zentrifugation der nekrotischen Zellen für 60min bei $14.000 \times g$ und $4^\circ C$ wurden sedimentierbare Komponenten von löslichen Faktoren getrennt. Das Pellet wurde anschließend in PBS^{-/-} resuspendiert und ein weiteres Mal für 60min bei $14.000 \times g$ und $4^\circ C$ zentrifugiert. Nach erneuter Resuspension in serumfreiem Medium wurde dieses schließlich als $14.000 \times g$ Pellet für das Experiment eingesetzt. Die Präparation des $100.000 \times g$ Überstandes erfolgte durch Zentrifugation des $14.000 \times g$ Überstandes für 60min bei $100.000 \times g$ und $4^\circ C$ in der Ultrazentrifuge (Centrikon T-1065 (Kontron Instruments) mit Ausschwingrotor TST 55.5). Anschließend wurden Rat1-Fibroblasten für 48h unter serumfreien Bedingungen bzw. in Gegenwart von 5% FKS mit 5×10^6 primär nekrotischen Rat1-Fibroblasten, der sedimentierbaren ($14.000 \times g$ Pellet) sowie der löslichen Fraktion ($14.000 \times g$ Überstand, $100.000 \times g$ Überstand) von 5×10^6 primär nekrotischen Rat1-Fibroblasten inkubiert. Kontrollzellen wurden mit entsprechendem Medium allein inkubiert. Das verwendete Zellkulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der ApoJ-mRNA-Gehalt der lebenden Rat1-Fibroblasten nach Präparation der Gesamt-RNA mittels Northern-Blot-Analyse untersucht.

Wie Abbildung 3.1.2 zeigt, führt unter serumfreien Bedingungen (0% FKS) nur die Inkubation mit nekrotischen Zellen, dem $14.000 \times g$ Überstand sowie dem $100.000 \times g$ Überstand nekrotischer Zellen zu einem ca. 7-fachen Anstieg der ApoJ-mRNA-Menge in Rat1-Fibroblasten. Zellen, die mit sedimentierbaren Komponenten nekrotischer Zellen in Form des $14.000 \times g$ Pellets inkubiert wurden, weisen einen ApoJ-mRNA-Gehalt auf, der dem der entsprechenden Kontrollen nahezu identisch ist. Nach densitometrischer Auswertung der Northern-Blot-Analyse zeigt sich, dass unter serumfreien Bedingungen nekrotische Zellen sowie die beiden daraus präparierten Überstände ($14.000 \times g$ $100.000 \times g$) keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer ApoJ-induzierenden Eigenschaften aufweisen (Abb. 3.1.2 b). In Gegenwart von 5% FKS hingegen führt neben der Inkubation mit nekrotischen Zellen und beiden Überständen ($14.000 \times g$ $100.000 \times g$) auch eine Inkubation mit sedimentierbaren Komponenten in Form des $14.000 \times g$ Pellets zu einer Erhöhung des ApoJ-mRNA-Gehaltes in vitalen Rat1-Zellen. Das Ausmaß der durch sedimentierbare Faktoren induzierten ApoJ-Regulation ist hierbei schwächer (1,7-fach) als das Ausmaß der durch nekrotische Zellen oder lösliche Faktoren induzierten Akkumulation von ApoJ-mRNA (ca. 2,3-fach). Zudem ist, wie unter serumfreien Bedingungen, kein signifikanter Unterschied zwischen nekrotischen Zellen und den beiden daraus präparierten Überständen bezüglich ihrer ApoJ-induzierenden Eigenschaft zu erkennen. Zudem zeigt sich, dass die Gegenwart von Serum zu einer Reduktion des relativen Ausmaßes der durch nekrotische Zellen bzw. der löslichen Fraktion nekrotischer Zellen induzierten ApoJ-Regulation führt.

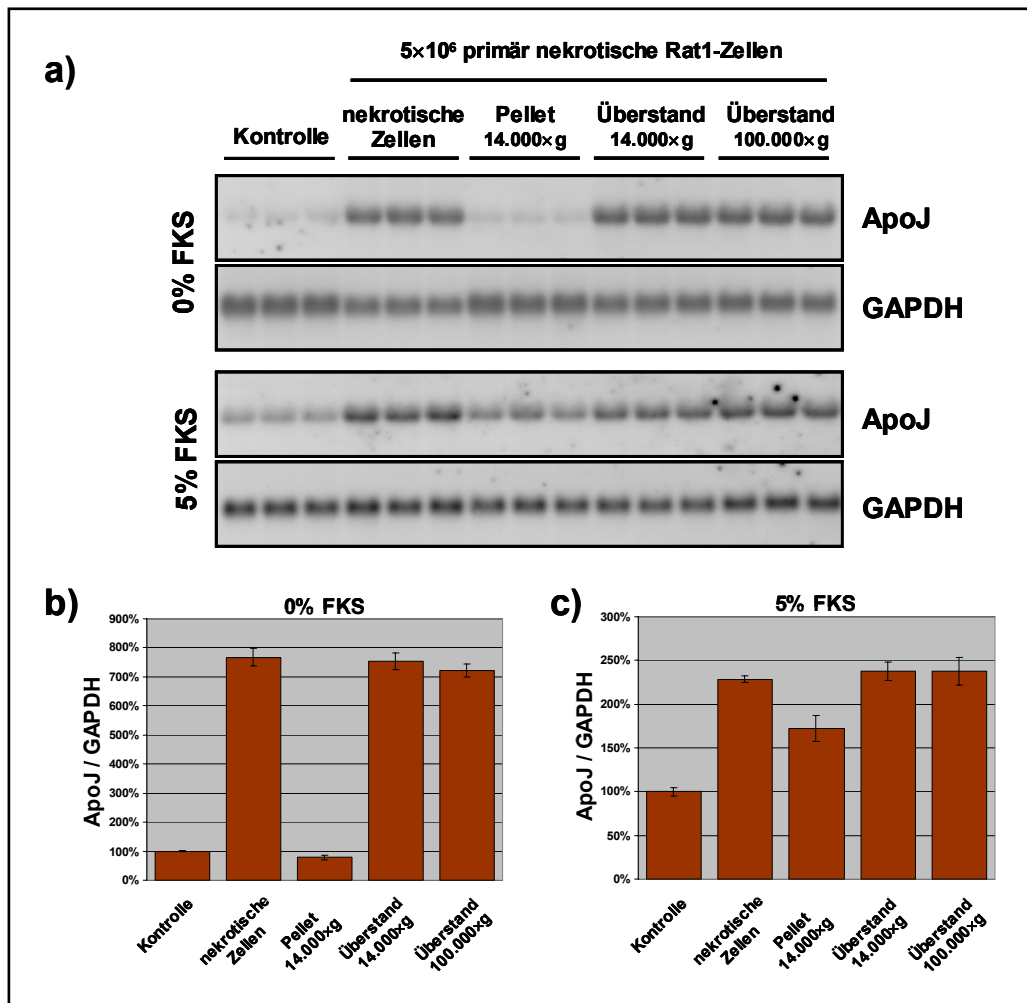


Abbildung 3.1.2: Die Induktion der ApoJ-mRNA-Expression in vitalen Rat1-Fibroblasten wird durch sedimentierbare und lösliche Faktoren nekrotischer Zellen vermittelt: a) Northern-Blot-Analyse von 15µg Gesamt-RNA aus Rat1-Zellen, die für 48h unter serumfreien (0% FKS) sowie serumhaltigen (5% FKS) Bedingungen mit 5x10⁶ primär nekrotischen Rat1-Zellen, sedimentierbaren Komponenten (14.000xg Pellet) sowie löslichen Faktoren (14.000xg Überstand, 100.000xg Überstand) von 5x10⁶ primär nekrotischen Rat1-Zellen inkubiert wurden. Kontrollzellen wurden mit Medium allein inkubiert (Kontrolle). Das Zellkulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz. **b+c)** Densitometrische Auswertung der Northern-Blot-Analyse aus a). Die Intensitäten der ApoJ-Banden wurden zu den Intensitäten der entsprechenden GAPDH-Banden ins Verhältnis gesetzt und sind als relatives Verhältnis bezogen auf den Wert der entsprechenden Kontrolle dargestellt (Mittelwert ±Standardabweichung der Dreifachbestimmung) b) zeigt die densitometrische Auswertung des Experimentes unter serumfreien Bedingungen (0% FKS), c) in Gegenwart von 5% FKS.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Induktion des ApoJ-Gens in vitalen Rat1-Fibroblasten sowohl durch lösliche als auch durch sedimentierbare Faktoren nekrotischer Zellen vermittelt wird. Lösliche Komponenten scheinen hierbei eine primäre Rolle zu spielen, da sie in der Lage sind, die ApoJ-mRNA-Expression über einen serumunabhängigen Mechanismus zu induzieren und zudem zu einer stärkeren Regulation des ApoJ-Gens führen als sedimentierbare Komponenten. Für eine Induktion der ApoJ-Genaktivität durch die sedimentierbare Fraktion des nekrotischen Zellmaterials scheint die Gegenwart von Serumfaktoren notwendig zu sein. In weiteren Experimenten stellte sich zudem heraus, dass auch die durch sekundär nekrotische Zellen induzierte ApoJ-Genaktivität überwiegend durch lösliche Faktoren vermittelt wird. Die ApoJ-induzierende Wirkung sedimentierbarer

Komponenten sekundär nekrotischer Zellen war hierbei ebenfalls serumabhängig und weniger stark als die der löslichen Fraktion (ohne Abb.).

3.1.3 Lösliche Faktoren nekrotischer Zellen besitzen zytoprotektive Wirkung auf serumfrei kultivierte Rat1-Fibroblasten

Während der Experimente zur Untersuchung des Einflusses nekrotischer Zellen auf die ApoJ-Regulation in lebenden Rat1-Fibroblasten konnte beobachtet werden, dass es unter serumfreien Bedingungen zu einem Absterben der Zellen in den Kontrollansätzen kam. Bei Inkubation mit nekrotischen Zellen und löslichen Faktoren nekrotischer Zellen waren hingegen über einen Zeitraum von bis zu 48h kaum absterbende Zellen in den jeweiligen Kulturschalen zu erkennen. Die Morphologie der Rat1-Fibroblasten in den entsprechenden Ansätzen des unter 3.1.2 beschriebenen Experimentes wurde im Lichtmikroskop mit Hilfe eines digitalen Kamerasystems dokumentiert und ist in Abb. 3.1.3 a) – d) dargestellt. Um diese zellschützende Wirkung nekrotischer Zellen sowie der daraus präparierten löslichen Faktoren auf serumfrei kultivierte Rat1-Fibroblasten quantitativ zu erfassen, wurde in einem separaten Experiment eine MTS-basierende Zellvitalitätsbestimmung durchgeführt. Hierzu wurden Rat1-Fibroblasten in 96-Loch-Mikrotiterplatten unter serumfreien Bedingungen für 48h mit 5×10^4 primär nekrotischen Rat1-Zellen sowie daraus präpariertem 14.000×g Pellet, 14.000×g und 100.000×g Überstand inkubiert. Kontrollzellen wurden mit serumfreiem Medium allein inkubiert. In einem weiteren Ansatz wurden Zellen mit 5% FKS inkubiert. Das verwendete Zellkulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz. Nach 48h wurde die relative Menge vitaler Zellen in den einzelnen Ansätzen, wie unter 2.2.1.7 beschrieben, mit Hilfe eines MTS-basierenden colorimetrischen Verfahrens bestimmt.

Wie in Abb. 3.1.3 deutlich zu sehen ist, führt eine Inkubation für 48h unter serumfreien Bedingungen bei einem Großteil der Rat1-Fibroblasten zum Verlust der Zellvitalität (Abb. 3.1.3 b). Dies äußert sich in der Ablösung einzelner Zellen aus dem Zellverband, was verglichen mit der Morphologie der Zellen zu Beginn des Experimentes (Abb. 3.1.3 a) nach 48h zu einer deutlich geringeren Anzahl adhärenter Zellen führt. Bei Inkubation der Rat1-Fibroblasten mit primär nekrotischen Zellen hingegen ist trotz einiger abgelöster Zellen nach 48h ein konfluenter Zellmonolayer erkennbar (Abb. 3.1.3 c). Eine hiermit identische Morphologie besitzen Rat1-Fibroblasten, die für 48h mit löslichen Faktoren primär nekrotischer Zellen in Form des 100.000×g Überstandes inkubiert wurden (Abb. 3.1.3 d). Die colorimetrische Zellvitalitätsbestimmung (Abb. 3.1.3 e) zeigt zudem, dass bei Inkubation serumfrei kultivierter Rat1-Zellen mit primär nekrotischen Zellen sowie daraus präparierten löslichen Faktoren (14.000×g und 100.000×g Überstand) die Anzahl lebender Zellen über den experimentellen Zeitraum von 48h zunimmt. Eine Inkubation mit sedimentierbaren Komponenten nekrotischer Zellen führt, ähnlich wie bei den Kontrollen, bei etwa 90% der Zellen zu einem Verlust der Lebensfähigkeit. Rat1-Fibroblasten, die in Gegenwart von Serum (5% FKS) kultiviert wurden, zeigen hingegen ein für diese Zelllinie typisches Proliferationsverhalten.

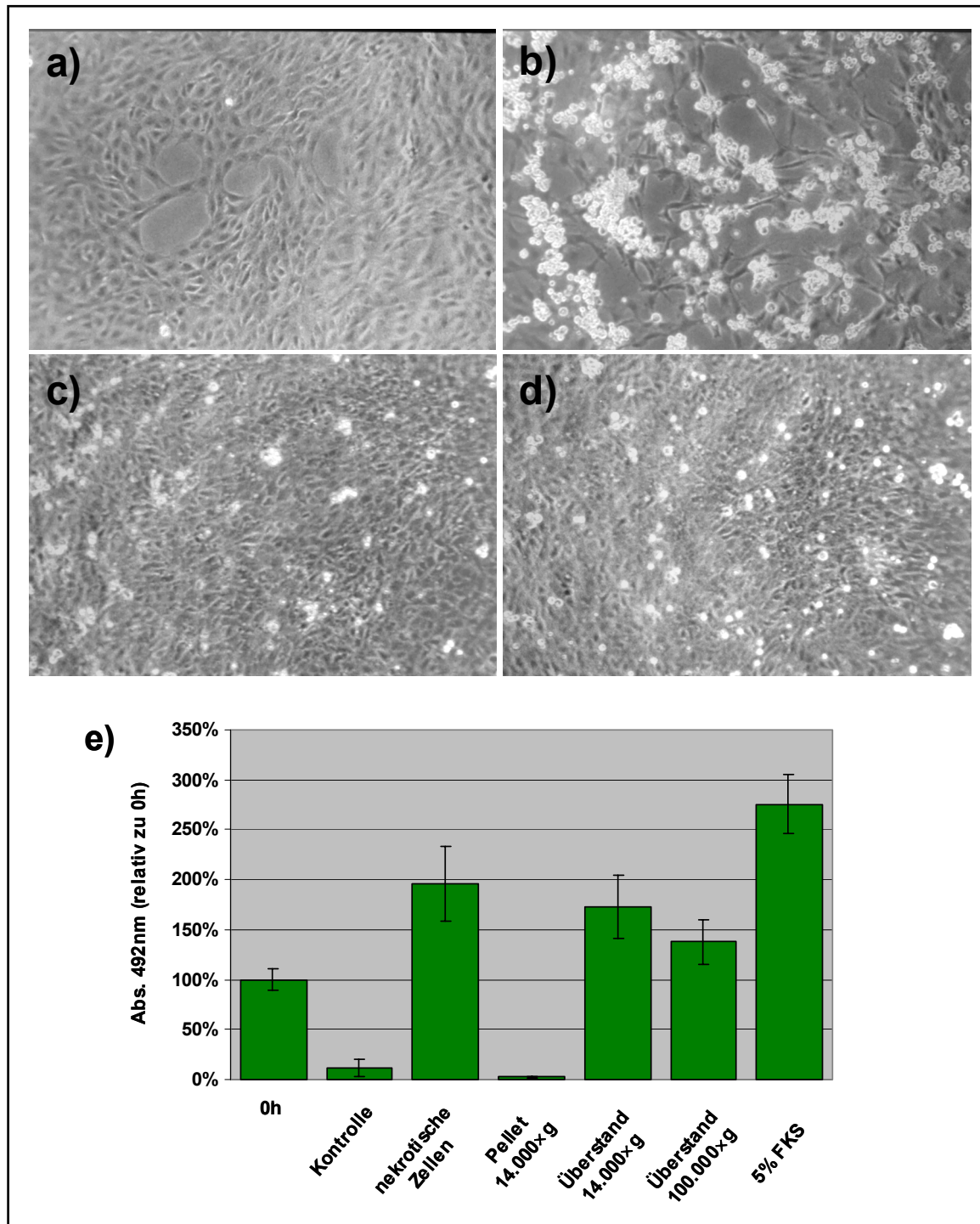


Abbildung 3.1.3: Lösliche Faktoren primär nekrotischer Zellen besitzen zytoprotektive Wirkung auf serumfrei kultivierte Rat1-Fibroblasten: Morphologie von Rat1-Fibroblasten zu Beginn des Experimentes (a) und nach Inkubation für 48h mit serumfreiem Medium allein (b), mit 5×10^6 primär nekrotischen Rat1-Zellen (c) sowie einer entsprechenden Menge an 100.000xg Überstand (d). Das Zellkulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz. **e)** Colorimetrische Bestimmung der Zellvitalität mittels MTS-Assays von Rat1-Fibroblasten zu Beginn des Experimentes (0h) sowie nach Inkubation für 48h mit serumfreiem Medium allein (Kontrolle), 5×10^4 primär nekrotischen Rat1-Zellen, daraus präpariertem 14.000xg Pellet, 14.000xg Überstand und 100.000xg Überstand sowie 5% FKS. Das Zellkulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz. Alle Werte sind als relative Absorption bezogen auf den zu Beginn (0h) des Experimentes ermittelten Ausgangswert (100%) dargestellt.

Zusammenfassend zeigt sich, dass ein Entzug von Serumkomponenten innerhalb von 48h zu einem Absterben von Rat1-Fibroblasten führt. Die Gegenwart löslicher Faktoren primär nekrotischer Zellen kann diesen Serumentzug jedoch teilweise kompensieren und ein Überleben der Rat1-Fibroblasten unter serumfreien Kulturbedingungen gewährleisten.

3.1.4 Zusammenfassung

Wie gezeigt werden konnte, führt eine Koinkubation lebender Rat1-Fibroblasten mit primär und sekundär nekrotischen Zellen zu einem Anstieg der ApoJ-mRNA-Menge in den vitalen Zellen. Der Beginn der ApoJ-mRNA-Akkumulation ist hierbei nach 24h detektierbar. Ähnlich wie für eine Induktion der ApoJ-mRNA-Expression durch phosphatidylserinhaltige Liposomen ist für eine durch die sedimentierbare Fraktion des nekrotischen Zellmaterials induzierte ApoJ-mRNA-Akkumulation in Rat1-Fibroblasten die Gegenwart von Serumkomponenten während der Inkubation notwendig. Dies deutet darauf hin, dass unter serumhaltigen Bedingungen Phosphatidylserin als ApoJ-induzierende Komponente in den Membranfragmenten nekrotischer Zellen fungieren könnte. Im Vergleich zur sedimentierbaren Fraktion induzieren lösliche Faktoren nekrotischer Zellen in serumunabhängiger Weise eine stärkere Akkumulation von ApoJ-mRNA in Rat1-Fibroblasten, was ein deutlicher Hinweis darauf ist, dass die ApoJ-induzierende Wirkung nekrotischer Zellen primär durch lösliche Faktoren vermittelt wird. Diese besitzen zudem zellschützende Eigenschaften, da sie in der Lage sind, einem durch Serumentzug induzierten Zelltod kultivierter Rat1-Fibroblasten entgegenzuwirken.

Die Korrelation zwischen der durch lösliche Faktoren nekrotischer Zellen induzierten ApoJ-Genaktivität sowie deren zytoprotektiver Wirkung war im Hinblick auf die beschriebenen antiapoptotischen bzw. zytoprotektiven Eigenschaften von ApoJ eine interessante Beobachtung. Aus diesem Grund wurden weiterführende Experimente unter serumfreien Bedingungen durchgeführt, wobei sowohl die ApoJ-induzierenden als auch die zytoprotektiven Faktoren charakterisiert und identifiziert werden sollten.

3.2. Charakterisierung und Identifizierung löslicher ApoJ-induzierender und zytoprotektiver Faktoren nekrotischer Zellen

3.2.1 Die ApoJ-induzierende und zytoprotektive Wirkung von Zellextrakt auf serumfrei kultivierte Rat1-Fibroblasten ist dosisabhängig

In Vorversuchen zeigte sich, dass löslichen Faktoren nekrotischer Zellen und Zellextrakt, der wie unter 2.2.1.5 beschrieben durch einmaliges Einfrieren und Auftauen lebender Rat1-Fibroblasten in flüssigem Stickstoff sowie anschließender Zentrifugation bei 3.000×g und 100.000×g präpariert wurde, keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer ApoJ-induzierenden und zytoprotektiven Eigenschaften aufwiesen (ohne Abb.). Aus diesem Grund wurde aus vitalen Rat1-Fibroblasten präparierter Zellextrakt als Ausgangsmaterial für eine weiterführende Charakterisierung der ApoJ-induzierenden und zytoprotektiven Faktoren herangezogen.

Ergebnisse

Um die für die ApoJ-induzierende und zytoprotektive Wirkung notwendige minimale Konzentration an Zellextrakt zu ermitteln sowie eine potentielle Dosisabhängigkeit beider Effekte zu untersuchen, wurden Rat1-Fibroblasten für 48h unter serumfreien Bedingungen mit steigenden Konzentrationen an Zellextrakt inkubiert.

Zur Überprüfung einer dosisabhängigen Induktion des ApoJ-Gens durch Zellextrakt wurden Rat1-Fibroblasten unter serumfreien Bedingungen für 48h mit Zellextrakt in Konzentrationen von 5×10^3 - 1×10^6 Rat1-Fibroblasten/ml inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der ApoJ-mRNA-Gehalt der lebenden Rat1-Fibroblasten nach Präparation der Gesamt-RNA mittels Northern-Blot-Analyse untersucht. Zur Überprüfung einer Dosisabhängigkeit der durch Zellextrakt vermittelten Zytoprotektion wurde in einem weiteren Experiment ein MTS-basierender Zellvitalitätsassay durchgeführt (2.2.1.7). Hierzu wurden Rat1-Fibroblasten in 96-Loch-Mikrotiterplatten unter serumfreien Bedingungen für 48h mit Zellextrakt in Konzentrationen von 5×10^3 - $2,5 \times 10^6$ Rat1-Fibroblasten/ml inkubiert. In einem weiteren Ansatz wurden Zellen mit Kulturmedium inkubiert, dem 5% FKS zugesetzt wurde. Kontrollzellen beider Experimente wurden in Abwesenheit von Zellextrakt inkubiert. In beiden Experimenten enthielten sowohl Kulturmedium als auch Zellextrakt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz.

Wie Abbildung 3.2.1 a, b zeigt, ist Zellextrakt in einer Konzentration von $2,5$ - 5×10^4 Zellen/ml notwendig, um die ApoJ-mRNA-Expression in Rat1-Zellen zu induzieren. Eine Maximalkonzentration an Zellextrakt von 1×10^6 Zellen/ml führt in vitalen Rat1-Zellen zu einer Erhöhung der ApoJ-mRNA-Menge um Faktor 7,8. Dass die Inkubation mit zunehmenden Mengen an Zellextrakt zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg des ApoJ-mRNA-Gehaltes in lebenden Rat1-Fibroblasten führt, zeigt deutlich, dass die durch Zellextrakt induzierte Erhöhung der ApoJ-Genaktivität dosisabhängig ist. Die in diesem Experiment eingesetzten Konzentrationen an Zellextrakt scheinen zudem noch außerhalb eines potentiellen Sättigungsbereiches des Effekts zu liegen.

Das Ausmaß des zellschützenden Effekts auf serumfrei kultivierte Rat1-Fibroblasten ist ebenfalls abhängig von der eingesetzten Konzentration an Zellextrakt (Abb. 3.2.1 c). In Ansätzen, in denen die Zellen mit Zellextrakt einer Konzentration von mindestens 1×10^5 Zellen/ml inkubiert wurden, ist im Vergleich zu den Kontrollen ein signifikant erhöhter Anteil vitaler Rat1-Fibroblasten detektierbar. Zellextrakt in einem Konzentrationsbereich von 1×10^5 - $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml scheint hierbei das Absterben der Zellen über den experimentellen Zeitraum von 48h zu vermindern und in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml vollständig zu verhindern, da in diesem Fall die Anzahl vitaler Rat1-Fibroblasten über den experimentellen Zeitraum von 48h nahezu konstant bleibt. Zellextrakt in Konzentrationen von 1×10^6 Zellen/ml oder höher scheint zudem zu einer Zunahme der Anzahl vitaler Zellen zu führen und somit eine proliferative Wirkung zu besitzen. Die Inkubation mit Zellextrakt in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml führt innerhalb von 48h zu einem Anstieg der Zellzahl serumfrei kultivierter Rat1-Fibroblasten um Faktor 2,5. Werden die Zellen in Gegenwart von 5% FKS kultiviert, ist deren typisches Proliferationsverhalten zu beobachten. Dies äußert sich in einer Zunahme der Zellzahl nach 48h um Faktor 3,5 - 4.

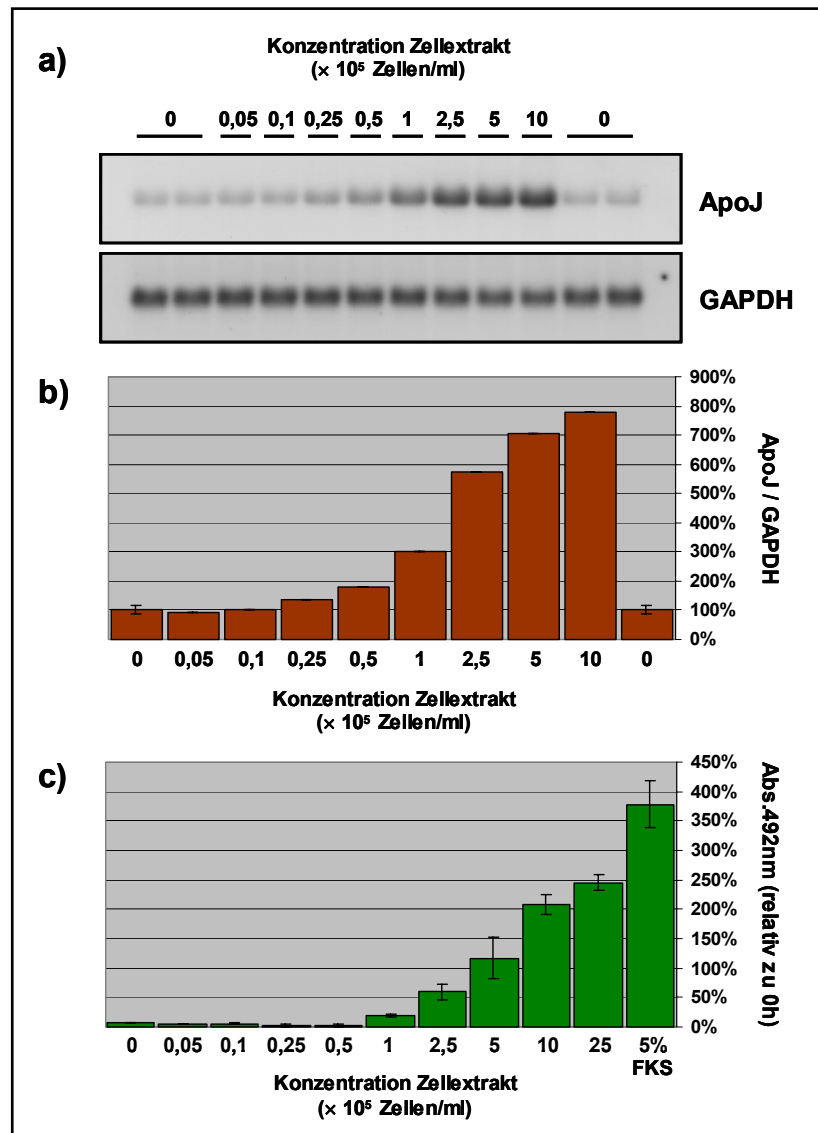


Abbildung 3.2.1: Die ApoJ-induzierende und zytoprotektive Wirkung von Zellextrakt auf serumfrei kultivierte Rat1-Fibroblasten ist dosisabhängig: a) Northern-Blot-Analyse von 15µg Gesamt-RNA aus Rat1-Zellen, die für 48h unter serumfreien Bedingungen mit Zellextrakt in Konzentrationen von 5×10^3 - 1×10^6 Rat1-Zellen/ml inkubiert wurden. Kontrollzellen wurden mit serumfreiem Medium allein inkubiert. Das Zellkulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz. **b)** Densitometrische Auswertung der Northern-Blot-Analyse aus a). Die Intensitäten der ApoJ-Banden wurden zu den Intensitäten der entsprechenden GAPDH-Banden ins Verhältnis gesetzt und sind als relatives Verhältnis bezogen auf den Mittelwert der Kontrollen (0) dargestellt. Dieser wurde durch eine Vierfachbestimmung ermittelt (Mittelwert \pm Standardabweichung der Vierfachbestimmung) **c)** Colorimetrische Bestimmung der Zellvitalität mittels MTS-basierendem Assay von Rat1-Fibroblasten, die für 48h unter serumfreien Bedingungen mit Zellextrakt von 5×10^3 - $2,5 \times 10^6$ Rat1-Zellen/ml sowie 5% FKS inkubiert wurden. Kontrollzellen wurden mit serumfreiem Medium allein inkubiert. Das Zellkulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz. Alle Werte sind als relative Absorption bezogen auf den zu Beginn (0h) des Experimentes ermittelten Ausgangswert (100%, nicht gezeigt) dargestellt (Mittelwert \pm Standardabweichung der Dreifachbestimmung).

Zusammenfassend zeigt sich, dass unter serumfreien Bedingungen im Zellextrakt von Rat1-Fibroblasten vorhandene Faktoren nach Freisetzung in den extrazellulären Raum bereits in geringen Konzentrationen ($2,5 - 5 \times 10^4$ Zellen/ml) zu einer Induktion des ApoJ-Gens in vitalen Rat1-Fibroblasten führen und erst in 2-4 höheren Konzentrationen einem durch Serumentzug induzierten Absterben dieser Zellen entgegenwirken.

3.2.2 Die ApoJ-induzierenden und zytoprotektiven Faktoren sind im Zytosol lebender Zellen lokalisiert

Dass die Faktoren, welche unter serumfreien Bedingungen die ApoJ-induzierenden und zytoprotektiven Eigenschaften nekrotischer Zellen vermitteln, lösliche Komponenten darstellen, die bereits durch einmaliges Einfrieren und Auftauen lebender Rat1-Fibroblasten freigesetzt werden, ließ vermuten, dass es sich in beiden Fällen um zytosolische Faktoren handeln könnte. Um die subzelluläre Lokalisation dieser Komponenten näher zu charakterisieren, sollte überprüft werden, ob eine Inkubation mit Zytosol ähnlich wie mit Zellextrakt zu einer Induktion der ApoJ-Genaktivität in serumfrei kultivierten Rat1-Fibroblasten führt und in der Lage ist, unter diesen Bedingungen ein Überleben der Zellen zu gewährleisten.

Hierzu wurde Zytosol, wie unter 2.2.1.6 beschrieben, durch Aufbrechen lebender und in Homogenisierungspuffer suspendierter Rat1-Fibroblasten mittels Kanüle sowie einer anschließenden Zentrifugation der Suspension bei $3.000\times g$ (kernfreier Überstand, PNS) und $100.000\times g$ (Zytosol) präpariert. Anschließend wurden Rat1-Fibroblasten unter serumfreien Bedingungen für 48h mit Zellextrakt von 5×10^5 Rat1-Fibroblasten/ml sowie kernfreiem Überstand (PNS, postnuclear supernatant) und Zytosol von 5×10^5 Rat1-Fibroblasten/ml inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der ApoJ-mRNA-Gehalt der lebenden Rat1-Fibroblasten nach Präparation der Gesamt-RNA mittels Northern-Blot-Analyse untersucht. Um die zellschützenden Eigenschaften von Zytosol zu überprüfen, wurde in einem weiteren Experiment ein MTS-basierender Zellvitalitätsassay durchgeführt. Hierzu wurden Rat1-Fibroblasten in 96-Loch-Mikrotiterplatten unter serumfreien Bedingungen für 48h mit Zellextrakt von 5×10^5 Rat1-Fibroblasten/ml sowie Zytosol von 5×10^5 Rat1-Fibroblasten/ml inkubiert. In einem weiteren Ansatz wurden Zellen mit Kulturmedium inkubiert, dem 5% FKS zugesetzt wurde. In beiden Experimenten wurden Kontrollzellen sowohl in serumfreiem Medium allein als auch in Gegenwart eines entsprechenden Volumens an Homogenisierungspuffer (HP) inkubiert. Für beide Experimente wurde Kulturmedium verwendet, das 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz enthielt.

Wie in Abbildung 3.2.2 a, b zu sehen ist, führt neben Zellextrakt auch die Inkubation mit kernfreiem Überstand (PNS, postnuclear supernatant) und Zytosol zu einer Induktion der ApoJ-mRNA-Expression in serumfrei kultivierten Rat1-Fibroblasten. Das Ausmaß der ApoJ-Regulation ist in beiden Fällen annähernd gleich. Relativ zur serumfreien Kontrolle (K) scheint Zytosol jedoch weniger stark induzierend zu wirken als Zellextrakt (ZE). Bezogen auf den ApoJ-mRNA-Gehalt von Rat1-Zellen, die nur mit Homogenisierungspuffer (HP) inkubiert wurden, ergibt sich jedoch eine durch Zytosol induzierte relative ApoJ-Regulation um Faktor 3,3. Diese ist nahezu identisch mit der durch Zellextrakt induzierten Erhöhung der ApoJ-mRNA-Menge um Faktor 3,4.

Eine Bestimmung der Zellvitalität zeigt, dass sich die zytoprotektive Wirkung von Zellextrakt und Zytosol nicht signifikant unterscheidet (Abb. 3.2.2 c). In beiden Fällen führt eine Inkubation für 48h zu einem Anstieg der Zellzahl um etwa 50%. Eine Inkubation mit Homogenisierungspuffer führt hingegen, ähnlich wie bei den serumfreien Kontrollen, bei etwa 90% der Rat1-Fibroblasten zu einem

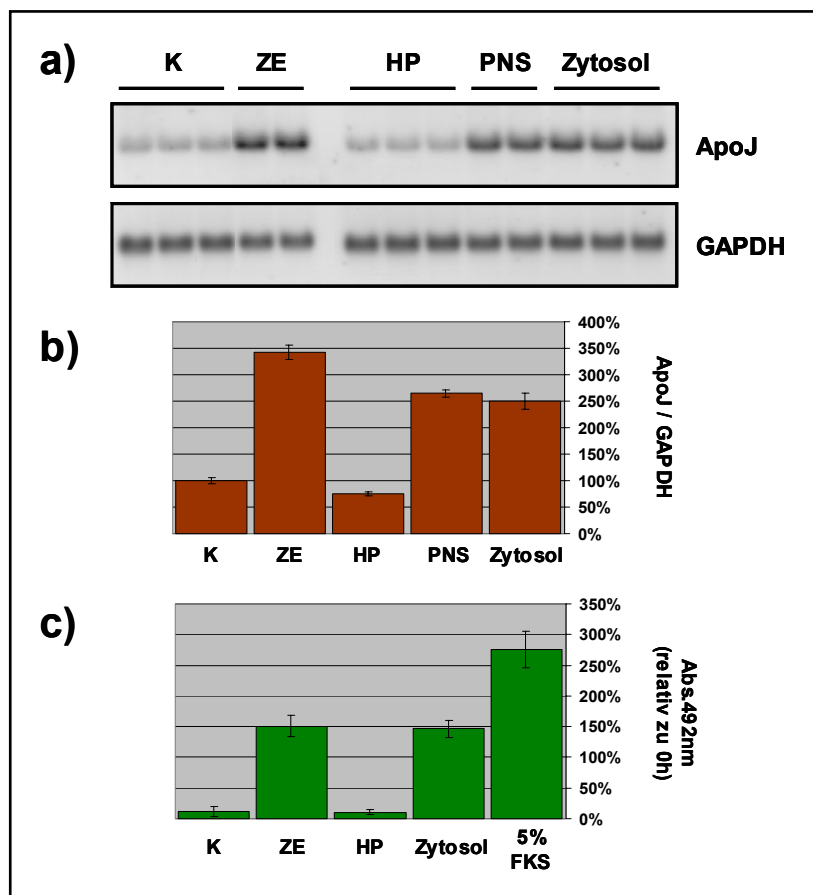


Abbildung 3.2.2: Die ApoJ-induzierenden und zytoprotektiven Faktoren sind im Zytosol lebender Zellen lokalisiert: **a)** Northern-Blot-Analyse von 15µg Gesamt-RNA aus Rat1-Fibroblasten, die für 48h unter serumfreien Bedingungen mit Zellextrakt von 5×10^5 Rat1-Zellen/ml (ZE), Homogenisierungspuffer (HP) sowie kernfreiem Überstand (PNS) und Zytosol von 5×10^5 Rat1-Zellen/ml inkubiert wurden. Kontrollzellen wurden mit serumfreiem Medium allein inkubiert (K). Das Zellkulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz. **b)** Densitometrische Auswertung der Northern-Blot-Analyse aus a). Die Intensitäten der ApoJ-Banden wurden zu den Intensitäten der entsprechenden GAPDH-Banden ins Verhältnis gesetzt und sind als relatives Verhältnis bezogen auf den Mittelwert der Kontrollen (K) dargestellt (Mittelwert \pm Standardabweichung der Mehrfachbestimmungen) **c)** Colorimetrische Bestimmung der Zellvitalität mittels MTS-basierendem Assay von Rat1-Fibroblasten, die für 48h unter serumfreien Bedingungen mit Zellextrakt von 5×10^5 Rat1-Zellen/ml (ZE), Homogenisierungspuffer (HP), Zytosol von 5×10^5 Rat1-Zellen/ml sowie 5% FKS inkubiert wurden. Kontrollzellen wurden mit serumfreiem Medium allein inkubiert (K). Das Zellkulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz. Alle Werte sind als relative Absorption bezogen auf den zu Beginn des Experimentes ermittelten Ausgangswert (100%, nicht gezeigt) dargestellt (Mittelwert \pm Standardabweichung der Dreifachbestimmung).

Verlust der Lebensfähigkeit. In Gegenwart von 5% FKS zeigen die Zellen ihr typisches Proliferationsverhalten. Obwohl nicht auszuschließen ist, dass ApoJ-induzierende und zellschützende Faktoren auch in anderen Zellkompartimenten vorliegen, zeigt dieses Experiment, dass zumindest der überwiegende Anteil dieser Komponenten im Zytosol lebender Zellen lokalisiert ist.

3.2.3 Parallele Freisetzung von Lactatdehydrogenase, ApoJ-induzierenden und zytoprotektiven Faktoren aus Camptothecin-behandelten Rat1-Fibroblasten

Wie gezeigt werden konnte, handelt es sich bei den ApoJ-induzierenden und zytoprotektiven Faktoren um lösliche zytosolische Komponenten lebender Zellen, die nach Einfrieren und Auftauen lebender und apoptotischer Rat1-Fibroblasten freigesetzt werden. Dass es möglich ist, diese Faktoren mittels Ultrafiltration (MWCO 100kDa) zu konzentrieren, zeigt deutlich, dass sowohl die ApoJ-induzierenden als auch die zytoprotektiven Komponenten ein Molekulargewicht von ≥ 100 kDa besitzen (ohne Abb.). Wie bereits erwähnt wurde, führt auch die Koinkubation mit apoptotischen Zellen in serumunabhängiger Weise zu einer ApoJ-Induktion in lebenden Rat1-Fibroblasten (ohne Abb.) Da unter serumfreien Bedingungen jedoch ausschließlich lösliche intrazelluläre Komponenten diesen Effekt vermitteln, war anzunehmen, dass diese Faktoren auch von apoptotischen Zellen in den extrazellulären Raum abgegeben werden. Durch einen Vergleich des zeitlichen Verlaufs der Akkumulation des Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) mit der ApoJ-induzierender und zytoprotektiver Faktoren im Kulturmedium Camptothecin-behandelter Rat1-Fibroblasten sollte in folgendem Experiment überprüft werden, ob ein Verlust der zellulären Plasmamembranintegrität mit der Freisetzung dieser Faktoren aus apoptotischen Zellen in Zusammenhang steht.

Zunächst wurden konfluente Rat1-Fibroblasten unter serumfreien Bedingungen für 6h, 12h, 24h, 36h und 48h mit $3\mu\text{M}$ Camptothecin bzw. DMSO (Kontrolle) inkubiert. Hierbei kam es in Gegenwart von Camptothecin bereits nach 6h zu einem massiven Absterben der Zellen. Dass dies auf eine Induktion apoptotischer Prozesse zurückzuführen ist, konnte bereits in Vorexperimenten durch Untersuchung Camptothecin-behandelter Rat1-Fibroblasten auf apoptosespezifische Merkmale (Caspase 3-Aktivierung, DNA-Fragmentierung, Externalisierung von Phosphatidylserin) bestätigt werden (ohne Abb.). Verglichen hiermit war die Menge absterbender Zellen in den Kontrollansätzen (DMSO) deutlich geringer. Nach Sedimentation der toten Zellen und der Zelltrümmer wurden Aliquots der zellfreien konditionierten Medien, wie unter 2.2.1.3.1 beschrieben, für die colorimetrische Bestimmung der LDH-Aktivität herangezogen. Um das Camptothecin aus den Medien zu entfernen, wurden anschließend jeweils 20ml der einzelnen konditionierten Medien, wie unter 2.2.1.3 beschrieben, ultrafiltriert (MWCO 100kDa). Die Rückstände, welche die ApoJ-induzierenden und zytoprotektiven Faktoren enthalten, wurden daraufhin auf ein Volumen von jeweils 2ml mit PBS^{-/-} aufgefüllt, so dass sich relativ zum Ausgangsvolumen von 20ml $10\times$ Konzentrate ergaben. Zur Überprüfung der ApoJ-induzierenden Eigenschaften der konditionierten Kulturmedien wurden Rat1-Fibroblasten mit jeweils 500 μl dieser Konzentrate unter serumfreien Bedingungen für 48h in einem Gesamtvolumen von 10ml inkubiert. Kontrollen wurden 500 μl PBS^{-/-} zugesetzt. Anschließend wurde ApoJ-mRNA-Gehalt der lebenden Rat1-Fibroblasten nach Präparation der Gesamt-RNA mittels Northern-Blot-Analyse untersucht. Zur Überprüfung der zellschützenden Eigenschaften der konditionierten Medien, wurden Rat1-Fibroblasten in 96-Loch-Mikrotiterplatten für 48h unter serumfreien Bedingungen mit jeweils 2 μl dieser Konzentrate in einem Gesamtvolumen von 100 μl inkubiert. Kontrollen wurden mit serumfreiem Medium allein inkubiert. Anschließend wurde, wie unter 2.2.1.7 beschrieben, eine colorimetrische Zellvitalitätsbestimmung

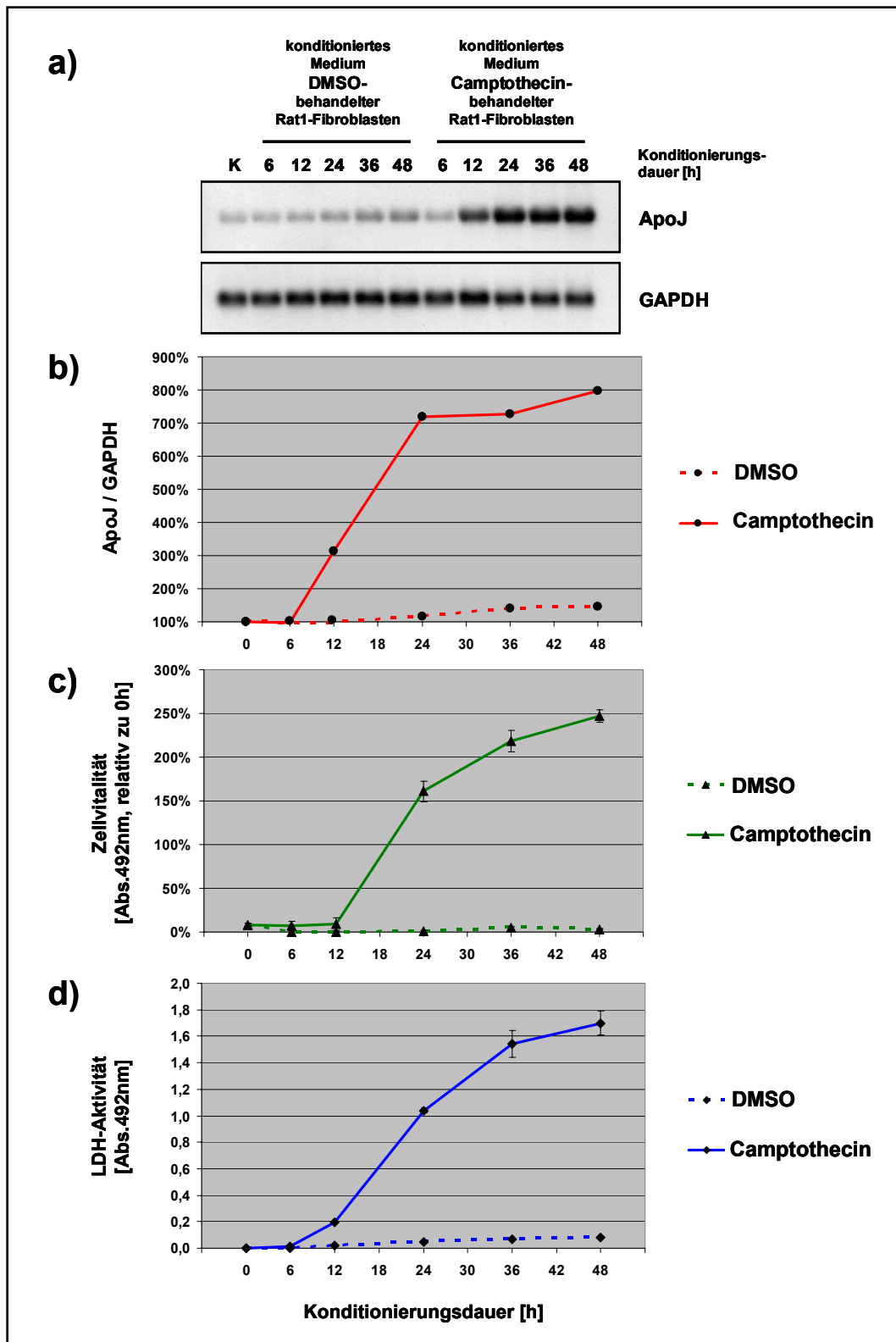


Abbildung 3.2.3: Der zeitliche Verlauf der Freisetzung von ApoJ-induzierenden und zytoprotektiven Faktoren aus Camptothecin-behandelnten Rat1-Fibroblasten erfolgt parallel zur LDH-Freisetzung: a) Northern-Blot-Analyse von 15µg Gesamt-RNA aus Rat1-Fibroblasten, die für 48h unter serumfreien Bedingungen mit konditioniertem Medium DMSO- bzw. Camptothecin-behandelter Rat1-Zellen inkubiert wurden. Die vorangehende Konditionierung erfolgte jeweils für 6-48h. Alle konditionierten Medien lagen nach Ultrafiltration (MWCO 100kDa) als 10× Konzentrat in PBS⁻ vor und wurden 1:20 verdünnt eingesetzt. Kontrollzellen wurden mit PBS⁻ inkubiert (K). Das Zellkulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz. b) Densitometrische Auswertung der Northern-Blot-Analyse aus a). Die Intensitäten der ApoJ-Banden wurden zu den Intensitäten der entsprechenden GAPDH-Banden ins Verhältnis gesetzt und sind als relatives Verhältnis bezogen auf den Wert der Kontrolle (K=0h) dargestellt.

Abbildung 3.2.3 (vorausgehende Seite): Der zeitliche Verlauf der Freisetzung von ApoJ-induzierenden und zytoprotektiven Faktoren aus Camptothecin-behandelten Rat1-Fibroblasten erfolgt parallel zur LDH-Freisetzung: c) Colorimetrische Bestimmung der Zellvitalität mittels MTS-basierendem Assay von Rat1-Fibroblasten, die für 48h unter serumfreien Bedingungen mit konditioniertem Medium DMSO- bzw. Camptothecin-behandelter Rat1-Zellen inkubiert wurden. Die vorangehende Konditionierung erfolgte jeweils für 6-48h. Alle konditionierten Medien lagen nach Ultrafiltration (MWCO 100kDa) als 10× Konzentrat in PBS^{-/-} vor und wurden 1:50 verdünnt eingesetzt. Kontrollzellen wurden mit serumfreiem Medium allein inkubiert (0h). Das Zellkulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz. Alle Werte sind als relative Absorption bezogen auf den zu Beginn des Experimentes ermittelten Ausgangswert (100%, nicht gezeigt) dargestellt (Mittelwert ±Standardabweichung der Dreifachbestimmung). **d)** Colorimetrische Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) in konditionierten Medien DMSO- bzw. Camptothecin-behandelter Rat1-Zellen. Die Konditionierung erfolgte jeweils für 6-48h. Alle Werte sind als absolute Absorption dargestellt (Mittelwert ±Standardabweichung der Dreifachbestimmung).

mittels MTS-basierendem Assay durchgeführt. In beiden Experimenten wurde Kulturmedium verwendet, das 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz enthielt.

Wie Abbildung 3.2.3 a, b zeigt, enthält bereits das Kulturmedium von Rat1-Fibroblasten, die für 12h mit 3µM Camptothecin inkubiert wurden, ApoJ-induzierende Faktoren. Im weiteren Verlauf der Konditionierung kommt es zu einer extrazellulären Akkumulation dieser Komponenten. Nach 24h erreicht die Konzentration dieser Faktoren ein Niveau, das bis zu 48h nahezu konstant bleibt. Die für 24h-48h konditionierten Medien Camptothecin-behandelter Rat1-Fibroblasten führen zu einer Erhöhung des ApoJ-mRNA-Gehaltes lebender Zellen um Faktor 7-8. Im Gegensatz hierzu enthalten die konditionierten Medien DMSO-behandelter Rat1-Zellen nur sehr geringe Konzentrationen an ApoJ-induzierenden Faktoren. Eine Inkubation von Rat1-Fibroblasten mit konditioniertem Medium von Zellen, die für 48h mit DMSO behandelt wurden, führt zu einer Erhöhung der ApoJ-Genaktivität um Faktor 1,5. Neben ApoJ-induzierenden Faktoren akkumulieren auch zytoprotektive Faktoren im Medium Camptothecin-behandelter Rat1-Fibroblasten (Abb. 3.2.3 c). Der Beginn der Freisetzung scheint im Vergleich zu den ApoJ-induzierenden Faktoren etwas verzögert zu sein. Ausschließlich Medien von Zellen, die für mindestens 24h mit Camptothecin behandelt wurden, weisen zellschützende Eigenschaften auf. Ebenso wie bei den ApoJ-induzierenden Faktoren steigt die Konzentration zytoprotektiver Komponenten im Medium im weiteren Verlauf der Inkubation mit Camptothecin an. Eine Behandlung von Rat1-Zellen mit DMSO führt hingegen zu keiner Freisetzung deutlich wirksamer Mengen an zytoprotektiven Faktoren.

Die colorimetrische Bestimmung der enzymatischen LDH-Aktivität in den konditionierten Medien zeigt deutlich, dass es bei Inkubation mit Camptothecin nach 12h zu einer Freisetzung dieses zytosolischen Enzyms aus Rat1-Fibroblasten führt (Abb. 3.2.4 d). Der zeitliche Verlauf der extrazellulären Akkumulation von LDH ist hierbei sehr ähnlich der ApoJ-induzierender und zytoprotektiver Faktoren. Die konditionierten Medien DMSO-behandelter Zellen besitzen hingegen nur eine geringe LDH-Aktivität.

Das zytosolische Enzym Lactatdehydrogenase (LDH) wird nur nach Verlust der Plasmamembranintegrität aus Zellen freigesetzt. Eine energieabhängige aktive Sekretion dieses Proteins durch lebende Zellen ist nicht möglich. Die Bestimmung extrazellulärer LDH-Aktivität ist aus diesem Grund eine klassische Methode zum Nachweis nekrotischer Zellen. Da im Rahmen vorliegender Arbeit gezeigt werden konnte, dass eine Inkubation von Rat1-Fibroblasten mit

Camptothecin sowohl apoptotische Prozesse induziert (ohne Abb.) sowie zu einer Freisetzung des Enzyms Lactatdehydrogenase aus diesen Zellen führt, muss angenommen werden, dass bereits nach 12h ein Teil der Zellen, welche die Apoptose durchlaufen haben, ihre Plasmamembranintegrität verlieren. Diese Zellen sind folglich als postapoptotisch bzw. sekundär nekrotisch zu bezeichnen. Der nahezu parallele zeitliche Verlauf der extrazellulären Akkumulation von LDH sowie der ApoJ-induzierenden und zytoprotektiven Faktoren ist somit ein deutlicher Hinweis auf eine passive Freisetzung dieser Komponenten aus postapoptotischen (sekundär nekrotischen) Zellen. Eine aktive Sekretion dieser Faktoren aus lebenden Zellen scheint nicht zu erfolgen, da die konditionierten Medien DMSO-behandelter Rat1-Zellen neben einer geringen LDH-Aktivität nur eine schwache ApoJ-induzierende und keine zytoprotektive Wirkung besitzen.

3.2.4 Die ApoJ-induzierende und zytoprotektive Wirkung von Zellextrakten ist spezies- und zelltypunabhängig

In sämtlichen vorangehenden Experimenten dienten Rat1-Fibroblasten als Quelle intrazellulärer ApoJ-induzierender und zytoprotektiver Faktoren. Um eine Beteiligung Rat1-Fibroblastenspezifischer Komponenten auszuschließen, sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden, ob Zellextrakt anderer Zelltypen bzw. Zellextrakt, der aus Zellen anderer Spezies präpariert wurde, ebenfalls ApoJ-induzierende sowie zellschützende Wirkung auf serumfrei kultivierte Rat1-Fibroblasten besitzt. Zudem sollte überprüft werden, ob die Wirkungsweise der entsprechenden Faktoren potentiellen zelltyp- bzw. speziesspezifischen Restriktionen unterliegt.

Hierzu wurden, wie unter 2.2.1.5 beschrieben, Zellextrakte aus 7 weiteren Zelllinien präpariert und anschließend deren ApoJ-induzierende und zytoprotektive Eigenschaften durch Inkubation mit serumfrei kultivierten Rat1-Fibroblasten untersucht. Bei den entsprechenden Zelllinien handelte es sich um MEF-1 (Embryonalfibroblasten, *Mus musculus*), HEK 293 (embryonale Nierenzellen, *Homo sapiens*), HeLa (epitheliale Gebärmutterhalszellen, *Homo sapiens*), 10A (embryonale Dottersackzellen, *Mus musculus*), J774A.1 (Monozyten/Makrophagen, *Mus musculus*), MDCK (epitheliale Nierenzellen, *Canis familiaris*) sowie BHK21 (Nierenfibroblasten, *Microcrictetus aureus*). Alle Zellextrakte lagen in serumfreiem Rat1-Medium vor, das 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz enthielt. Zur Überprüfung der ApoJ-induzierenden Eigenschaften wurden Rat1-Fibroblasten für 48h unter serumfreien Bedingungen mit jeweils unterschiedlichen Konzentrationen ($1-5 \times 10^5$ Zellen/ml) der verschiedenen Zellextrakte inkubiert und anschließend der ApoJ-mRNA-Gehalt der lebenden Rat1-Fibroblasten nach Präparation der Gesamt-RNA mittels Northern-Blot-Analyse untersucht. Zur Untersuchung der zellschützenden Wirkung dieser Zellextrakte wurden in einem weiteren Experiment Rat1-Fibroblasten in 96-Loch-Mikrotiterplatten für 48h unter serumfreien Bedingungen mit unterschiedlichen Konzentrationen ($2,5-10 \times 10^5$ Zellen/ml) der verschiedenen Zellextrakte inkubiert und anschließend eine colorimetrische Zellvitalitätsbestimmung mittels MTS-basierendem Assay durchgeführt. Das in beiden Experimenten verwendete Kulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz.

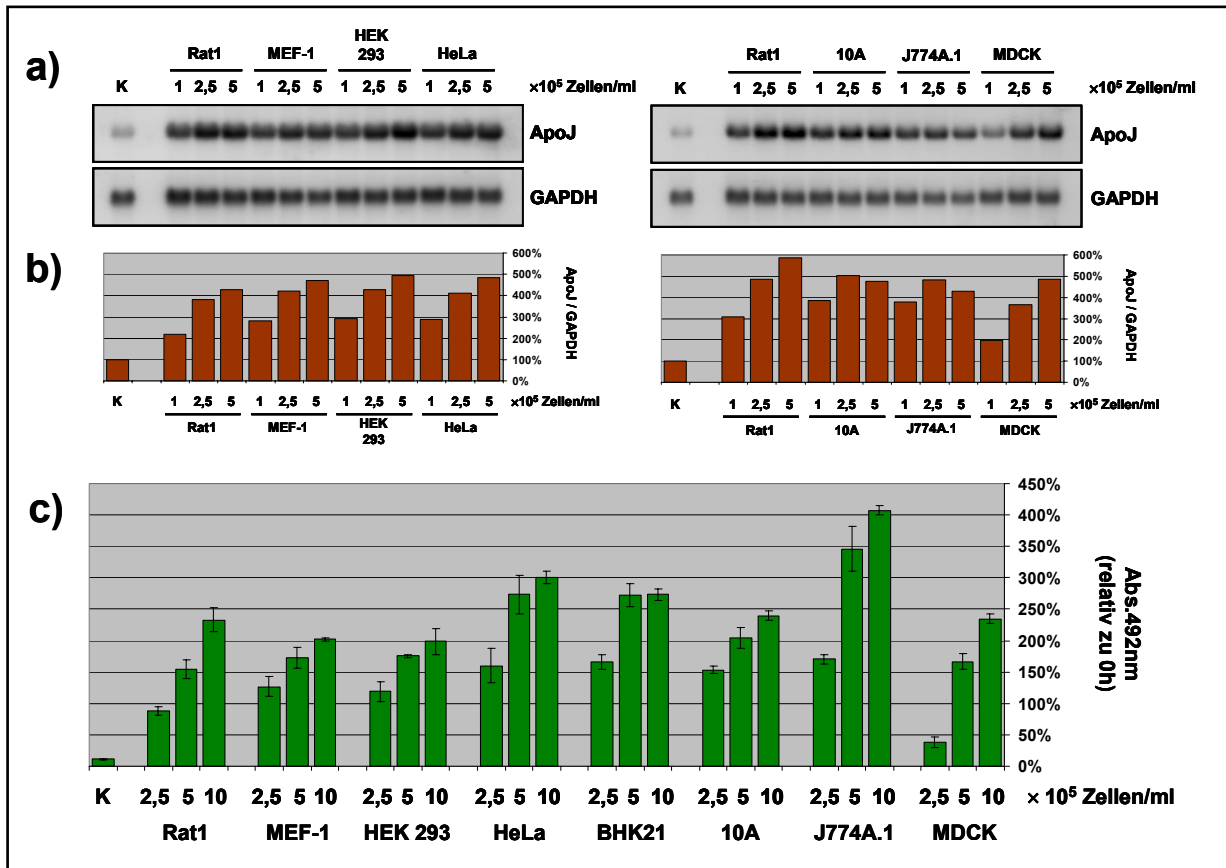


Abbildung 3.2.4: Die ApoJ-induzierende und zytoprotektive Wirkung von Zellextrakten ist spezies- und zelltypunabhängig: **a)** Northern-Blot-Analysen von 15µg Gesamt-RNA aus Rat1-Fibroblasten, die für 48h unter serumfreien Bedingungen mit Zellextrakten der Zelllinien Rat1, MEF-1, HEK 293, HeLa, 10A, J774A.1 und MDCK inkubiert wurden. Die Zellextrakte wurden in Konzentrationen von 1-5×10⁵ Zellen/ml eingesetzt. Kontrollzellen wurden mit serumfreiem Medium allein inkubiert (K). Das Zellkulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz. **b)** Densitometrische Auswertung der Northern-Blot-Analysen aus a). Die Intensitäten der ApoJ-Banden wurden zu den Intensitäten der entsprechenden GAPDH-Banden ins Verhältnis gesetzt und sind als relatives Verhältnis bezogen auf die Werte der entsprechenden Kontrollen (K) dargestellt. **c)** Colorimetrische Bestimmung der Zellvitalität mittels MTS-basierendem Assay von Rat1-Fibroblasten, die unter serumfreien Bedingungen für 48h mit Zellextrakten der Zelllinien Rat1, MEF-1, HEK 293, HeLa, BHK21, 10A, J774A.1 und MDCK inkubiert wurden. Die Zellextrakte wurden in Konzentrationen von 2,5-10×10⁵ Zellen/ml eingesetzt. Kontrollzellen wurden mit serumfreiem Medium allein inkubiert (K). Das Zellkulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz. Alle Werte sind als relative Absorption bezogen auf den zu Beginn des Experimentes ermittelten Ausgangswert (100%, nicht gezeigt) dargestellt (Mittelwert ±Standardabweichung der Dreifachbestimmung).

Die Inkubation mit Zellextrakten aus allen Zelllinien führt zu einer Akkumulation von ApoJ-mRNA in Rat1-Fibroblasten (Abb. 3.2.4 a, b). Bis auf die Zellextrakte aus den beiden murinen Zelllinien 10A und J774A.1 ist zudem eine deutliche Dosisabhängigkeit der induzierten ApoJ-Genaktivität zu erkennen. Die unterschiedlichen Zellextrakte in einer Konzentration von 5×10⁵ Zellen/ml induzieren eine maximale ApoJ-Regulation um Faktor 4-5. Dieses Maximum wird im Falle der aus 10A-Zellen und J774A.1-Zellen stammenden Extrakte bereits bei einer Konzentration von 2,5×10⁵ Zellen/ml erreicht, was in beiden Fällen auf einen potentiellen Sättigungsbereich dieses Effekts hindeutet. Mit Ausnahme dieser beiden Zelllinien scheinen die Extrakte der anderen Zelllinien ähnliche Konzentrationen an ApoJ-induzierenden Komponenten zu enthalten. Dieses Experiment zeigt weiterhin, dass sich das Vorkommen ApoJ-induzierender Faktoren nicht auf Fibroblasten

beschränkt, da auch Epithelzellen und Monozyten diese Komponenten enthalten. Zudem scheint der Mechanismus einer durch diese Faktoren induzierten ApoJ-Regulation speziesunabhängig zu sein, da neben dem Extrakt aus Rat1-Fibroblasten auch die Extrakte verschiedener muriner (MEF-1, 10A, J774A.1), humaner (HEK 293, HeLa) und aus dem Hund stammender Zellen (MDCK) wirksam sind. Die Bestimmung der Zellvitalität zeigt, dass die Extrakte aus allen verwendeten Zelllinien zytoprotektive Wirkung auf serumfrei kultivierte Rat1-Fibroblasten besitzen (Abb. 3.2.4 c). Wie bei der Induktion der ApoJ-Genaktivität ist in allen Fällen das Ausmaß des Effektes abhängig von der eingesetzten Konzentration an Zellextrakt. Extrakt aus Monozyten der Zelllinie J774A.1 besitzt die stärkste proliferative Wirkung. Eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml führt hierbei zu einer Erhöhung der Anzahl lebender Rat1-Fibroblasten um Faktor 4. In den Extrakten aller anderen Zelllinien scheinen die entsprechenden Komponenten in ähnlichen Konzentrationen vorhanden zu sein. Neben ApoJ-induzierenden sind somit auch zytoprotektive Faktoren in allen verwendeten Zelltypen (Fibroblasten, Epithelzellen, Monozyten) vorhanden. Ebenso ist der Mechanismus der Zytoprotektion, bezogen auf den Ursprung der entsprechenden Faktoren, speziesunabhängig, da neben Rat1-Fibroblasten auch verschiedene Zelllinien aus der Maus (MEF-1, 10A, J774A.1), dem Hamster (BHK21), dem Menschen (HEK 293, HeLa) und dem Hund (MDCK) Faktoren enthalten, die ein Überleben serumfrei kultivierter Rat1-Fibroblasten gewährleisten. In weiteren Experimenten zeigte sich, dass aus Rat1-, MEF-1- sowie MDCK-Zellen präparierte Extrakte auch in der Lage sind, ein durch Serumentzug induziertes Absterben kultivierter MEF-1-Zellen zu inhibieren (ohne Abb.), was den speziesunabhängigen Mechanismus der zytoprotektiven Wirkung intrazellulärer Komponenten bestätigt.

Zusammenfassend deutet das Ergebnis dieses Experimentes auf eine potentiell ubiquitäre Expression intrazellulärer ApoJ-induzierender und zytoprotektiver Faktoren hin, die nach Freisetzung in den extrazellulären Raum auch über Speziesgrenzen hinweg wirksam sind. Eine Beteiligung zelltypspezifischer Komponenten wie beispielsweise bestimmter Wachstumsfaktoren scheint somit unwahrscheinlich.

3.2.5 Die ApoJ-induzierenden und zytoprotektiven Faktoren aus Zellextrakt sind hitzelabil

Um erste Hinweise darüber zu erhalten, welcher Stoffgruppe die ApoJ-induzierenden und zytoprotektiv wirksamen Bestandteile des Zellextraktes angehören, sollte zunächst überprüft werden, ob diese hitzestabil sind oder ob deren Wirkung durch eine vorausgehende Erhitzung des Zellextraktes vermindert werden kann. Hierzu wurde aus Rat1-Fibroblasten präparierter Zellextrakt bzw. serumfreies Medium (Kontrolle) für jeweils 30min auf 60°C oder 90°C erhitzt. Anschließend wurden Rat1-Fibroblasten für 48h unter serumfreien Bedingungen mit unbehandelten oder hitzebehandelten Zellextrakten einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml inkubiert. Kontrollen wurde jeweils ein entsprechendes Volumen an unbehandeltem bzw. hitzebehandeltem serumfreiem Medium zugesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der ApoJ-mRNA-Gehalt der lebenden Rat1-Fibroblasten nach Präparation der Gesamt-RNA mittels Northern-Blot-Analyse untersucht. Zur

Ergebnisse

Überprüfung der zellschützenden Eigenschaften hitzebehandelter Zellextrakte wurden Rat1-Fibroblasten in 96-Loch-Mikrotiterplatten für 48h unter serumfreien Bedingungen mit unbehandelten oder hitzebehandelten Zellextrakten einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml inkubiert und anschließend eine colorimetrische Zellvitalitätsbestimmung mittels MTS-basierendem Assay durchgeführt. In beiden Experimenten enthielt das verwendete Kulturmedium 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz.

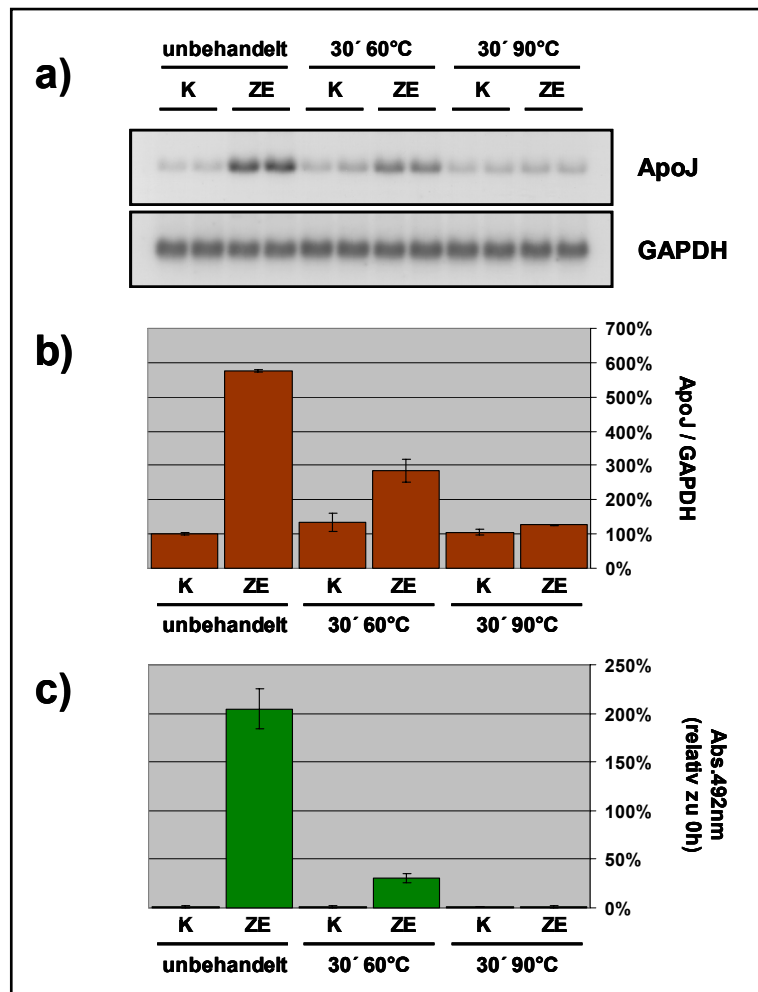


Abbildung 3.2.5: Die ApoJ-induzierenden und zytoprotektiven Faktoren aus Zellextrakt sind hitzelabil:
a) Northern-Blot-Analyse von 15µg Gesamt-RNA aus Rat1-Fibroblasten, die für 48h unter serumfreien Bedingungen mit unbehandelten oder hitzebehandelten Zellextrakten (ZE) einer Konzentration von 5×10^5 Rat1-Fibroblasten/ml inkubiert wurden. Entsprechende Kontrollen (K) wurden in serumfreiem Medium inkubiert, dem jeweils 1ml unbehandeltes oder hitzebehandeltes serumfreies Medium zugesetzt wurde. Die vorausgegangene Hitzebehandlung erfolgte für jeweils 30min bei 60°C oder 90°C. Das Zellkulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz. **b)** Densitometrische Auswertung der Northern-Blot-Analyse aus a). Die Intensitäten der ApoJ-Banden wurden zu den Intensitäten der entsprechenden GAPDH-Banden ins Verhältnis gesetzt und sind als relatives Verhältnis bezogen auf den Wert der unbehandelten Kontrolle dargestellt (Mittelwert \pm Standardabweichung der Doppelbestimmung). **c)** Colorimetrische Bestimmung der Zellvitalität mittels MTS-basierendem Assay von Rat1-Fibroblasten, die unter serumfreien Bedingungen für 48h mit unbehandelten oder hitzebehandelten Zellextrakten (ZE) einer Konzentration von 1×10^6 Rat1-Fibroblasten/ml inkubiert wurden. Entsprechende Kontrollen (K) wurden in serumfreiem Medium inkubiert, dem jeweils 20µl unbehandeltes oder hitzebehandeltes serumfreies Medium zugesetzt wurde. Die vorangegangene Hitzebehandlung erfolgte für jeweils 30min bei 60°C oder 90°C. Das Zellkulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz. Alle Werte sind als relative Absorption bezogen auf den zu Beginn des Experimentes ermittelten Ausgangswert (100%, nicht gezeigt) dargestellt (Mittelwert \pm Standardabweichung der Dreifachbestimmung).

Verglichen mit unbehandeltem Zellextrakt führt eine vorangegangene Inkubation für 30min bei 60°C zu einer Reduktion der ApoJ-induzierenden Eigenschaft um 50% (Abb. 3.2.5 a, b). Rat1-Fibroblasten, die mit Zellextrakt inkubiert wurden, welcher zuvor für 30min auf 90°C erhitzt wurde, weisen hingegen keine deutliche Akkumulation ApoJ-mRNA auf. Dies deutet auf eine nahezu vollständige Inaktivierung der ApoJ-induzierenden Komponenten hin. Die aus Zellextrakt stammenden ApoJ-induzierenden Faktoren sind somit hitzelabil. Dennoch scheinen sie gegenüber moderat erhöhten Temperaturen eine gewisse Stabilität zu besitzen, da eine Inkubation des Zellextrakts für 30min bei 60°C nur zu einer partiellen Inaktivierung der entsprechenden Faktoren führt. Der ApoJ-mRNA-Gehalt der Kontrollzellen, die mit hitzebehandelten serumfreien Medien inkubiert wurden, liegt auf dem Niveau der unbehandelten Kontrollen, so dass eine Entstehung ApoJ-induzierender Faktoren durch Erhitzung des serumfreien Mediums ausgeschlossen werden kann.

Ebenso wie die Induktion der ApoJ-Genaktivität wird auch die zellschützende Wirkung von Zellextrakt durch hitzelabile Komponenten vermittelt (Abb. 3.2.5 c). Die Inkubation von Rat1-Fibroblasten mit Zellextrakt, der zuvor für 30min auf 60°C erhitzt wurde, führt nach 48h bei 70% der Zellen zu einem Verlust der Lebensfähigkeit. In Gegenwart von unbehandeltem Zellextrakt kommt es hingegen im selben Zeitraum zu einer Verdopplung der Anzahl lebender Zellen. Vergleicht man diese Werte mit der gezeigten Dosisabhängigkeit des Effekts (Abb. 3.2.1 c), entspricht die Wirkung des bei 60°C behandelten Zellextrakts einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in etwa der von unbehandeltem Zellextrakt einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/ml. Dies deutet darauf hin, dass eine 30-minütige Inkubation bei 60°C zu einer Inaktivierung von etwa 80% der entsprechenden Faktoren führt. Eine Erhitzung des Zellextrakts auf 90°C führt zu einem vollständigen Verlust der zytoprotektiven Eigenschaften. Nach 48h beträgt der Anteil vitaler Zellen im entsprechenden Ansatz, ähnlich wie bei den Kontrollansätzen, nur noch etwa 5% der für das Experiment eingesetzten Menge lebender Zellen.

3.2.6 Die zytoprotektiven Faktoren aus Zellextrakt sind trypsinsensitiv

Die Inaktivierung ApoJ-induzierender und zytoprotektiver Eigenschaften von Zellextrakt durch Hitzebehandlung könnte in beiden Fällen ein Hinweis darauf sein, dass die entsprechenden Faktoren der Stoffgruppe der Proteine angehören. Um diese Vermutung zu bestätigen, sollte überprüft werden, ob die Inkubation von Zellextrakt mit der Protease Trypsin zu einer Inaktivierung der zytoprotektiven Komponenten führt. Hierbei zeigte sich jedoch im Rahmen mehrerer Vorversuche, dass Trypsin, selbst in Gegenwart hoher Konzentrationen an Trypsininhibitor, während der anschließenden Inkubation des Ansatzes mit serumfrei kultivierten Rat1-Fibroblasten zytotoxische Wirkung besitzt. Hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs unterschied sich hierbei ein durch Trypsin induziertes Absterben der Zellen von einem durch Serumentzug induzierten Zelltod. Da sich das Molekulargewicht des Trypsins (ca. 30kDa) deutlich vom Molekulargewicht der zytoprotektiven Faktoren (≥ 100 kDa) unterscheidet, wurde versucht, beide Komponenten nach vorausgegangener Koinkubation mittels Ultrafiltration (MWCO 100kDa) wieder voneinander zu trennen. Für den

Ergebnisse

tryptischen Verdau wurde 1ml Zellextrakt einer Konzentration von 5×10^7 Rat1-Fibroblasten/ml in einem Verhältnis von 1:10 mit PBS^{-/-} verdünnt und mit 1mg/ml Trypsin (aus Rinderpankreas) in einem Gesamtvolumen von 10ml für 3h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz, dem kein Trypsin zugegeben wurde. Anschließend wurden beide Ansätze getrennt voneinander in entsprechenden Zentrifugeneinheiten (MWCO 100kDa) bei $3.000 \times g$ und 4°C ultrafiltriert, bis das Restvolumen des Rückstandes 250µl betrug. Zur vollständigen Entfernung des Trypsins wurden beide Ansätze daraufhin 2× mit jeweils 10ml PBS^{-/-} gewaschen und die Rückstände (250µl) schließlich mit PBS^{-/-} auf ein Gesamtvolumen von jeweils 1ml aufgefüllt, so dass die Konzentration an Faktoren mit einem Molekulargewicht von $\geq 100kDa$ dem des Ausgangsmaterials entsprach (5×10^7 Zellen/ml). Zur Überprüfung der zytoprotektiven Eigenschaft wurden Rat1-Fibroblasten in 96-Loch-Mikrotiterplatten für 48h unter serumfreien Bedingungen mit verschiedenen Konzentrationen beider Ultrafiltrationsrückstände, die Zellextrakt einer Konzentration von 1×10^5 - 5×10^6 Zellen/ml entsprachen, inkubiert. Kontrollen wurden mit serumfreiem Medium allein inkubiert. Anschließend erfolgte die colorimetrische Zellvitalitätsbestimmung wie unter 2.2.1.7 beschrieben. Das in diesem Experiment verwendete Kulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz.

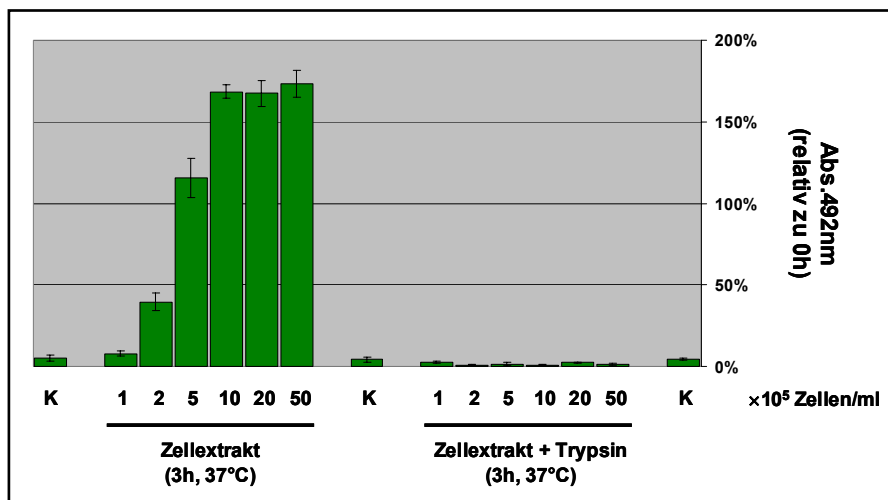


Abbildung 3.2.6: Die zytoprotektiven Faktoren aus Zellextrakt sind trypsinsensitiv: Colorimetrische Bestimmung der Zellvitalität mittels MTS-basierendem Assay von Rat1-Fibroblasten, die unter serumfreien Bedingungen für 48h mit Ultrafiltrationsrückstand (MWCO 100kDa) von Zellextrakt aus Rat1-Fibroblasten inkubiert wurden, welcher zuvor in Abwesenheit bzw. Gegenwart von 1mg/ml Trypsin für 3h bei 37°C präinkubiert wurde. Die Rückstände der Ultrafiltration wurden in Verdünnungen eingesetzt, die Zellextraktkonzentrationen von 1×10^5 - 5×10^6 Zellen/ml entsprechen. Kontrollen (K) wurden mit serumfreiem Medium allein inkubiert. Das Zellkulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz. Alle Werte sind als relative Absorption bezogen auf den zu Beginn des Experimentes ermittelten Ausgangswert (100%, nicht gezeigt) dargestellt (Mittelwert \pm Standardabweichung der Dreifachbestimmung).

Wie Abbildung 3.2.6 zeigt, führt ein Verdau mit Trypsin zu einem vollständigen Verlust der zellschützenden Eigenschaften im Zellextrakt vorhandener hochmolekularer Komponenten ($\geq 100kDa$). Dass dieser inhibitorische Effekt auf die Inkubation mit Trypsin zurückzuführen ist und nicht durch endogene Proteasen aus dem Zellextrakt vermittelt wird, zeigt der entsprechende Kontrollansatz, der in Abwesenheit von Trypsin für 3h bei 37°C inkubiert wurde. Hier bleiben die

zytoprotektiven Eigenschaften der hochmolekularen Fraktion des Zellextrakts erhalten. Der Ultrafiltrationsrückstand des entsprechenden Kontrollansatzes zeigt im Hinblick auf seine zellschützenden Eigenschaften eine dosisabhängige Wirkung, wobei ab Konzentrationen von 1×10^6 Zellen/ml eine Sättigung des Effekts erreicht wird. Hierbei kommt es innerhalb von 48h zu einem Anstieg der Anzahl vitaler Rat1-Fibroblasten von ca. 75%. Der Ultrafiltrationsrückstand des mit Trypsin verdauten Zellextraktes hingegen zeigt selbst in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml keine zytoprotektiven Eigenschaften. Eine potentiell toxische Wirkung dieses Rückstandes aufgrund einer unvollständigen Entfernung des Trypsins während der Ultrafiltration ist unwahrscheinlich, da der Verlust der Lebensfähigkeit der entsprechenden Zellen im zeitlichen Verlauf dem der serumfrei inkubierten Kontrollen entsprach. Anhand des Ergebnisses dieses Experimentes lässt sich jedoch keine Aussage darüber treffen, ob ein Verdau mit Trypsin zu einer vollständigen Inaktivierung der im Zellextrakt vorhandenen zytoprotektiven Faktoren führt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass tryptische Fragmente, die nach Ultrafiltration im Durchfluss vorliegen, ihre zellschützende Wirkung beibehalten. Diese Fraktion konnte jedoch aufgrund der toxischen Wirkung des darin enthaltenen Trypsins nicht für eine Inkubation mit den Zellen eingesetzt werden. Dass sich aber das Molekulargewicht der zytoprotektiven Faktoren durch Trypsinverdau auf $<100\text{kDa}$ verringert, zeigt jedoch, dass es sich bei diesen Komponenten um Proteine oder proteinassoziierte Faktoren handeln muss.

Wie weiterführende Experimente zeigten, werden die ApoJ-induzierenden und zytoprotektiven Eigenschaften von Zellextrakt durch eine 3-stündige Inkubation mit 100mM Dithiothreitol (DTT) nicht beeinträchtigt (ohne Abb.). Dies zeigt, dass die für beide Effekte verantwortlichen Komponenten unter reduzierenden Bedingungen stabil sind, was bedeutet, dass die Funktion der zytoprotektiv wirksamen Proteine nach Reduktion potentieller Disulfidbrücken erhalten bleibt und dass sich hieraus ergebende strukturelle Veränderungen keine Beeinträchtigung der Proteinfunktion zur Folge haben.

3.2.7 Fraktionierung von Zellextrakt mittels Anionenaustauscherchromatographie

Um nähere Informationen über den pI-Wert der zytoprotektiven Proteine zu erhalten, wurde zunächst versucht, Zellextrakt mittels Ionenaustauscherchromatographie zu fraktionieren. Hiermit sollte zudem überprüft werden, ob eine Trennung im Zellextrakt enthaltener Proteinen auf Ebene ihrer Ladungseigenschaften als erster Schritt zur Reinigung ApoJ-induzierender Komponenten und zytoprotektiver Proteine geeignet war.

In vorausgehenden Experimenten zeigte sich, dass nach Kationenaustauscherchromatographie von Zellextrakt mittels Zentrifugeneinheit (Vivapure Mini H Typ S, funktionelle Gruppe: $\text{R-CH}_2\text{-SO}_3$, Vivascience) in einem Natriumacetat-Puffersystem (25mM Natriumacetat, pH 5,5) die zytoprotektiven Proteine ausschließlich im Durchfluss zu finden waren. Bei Verwendung eines starken Anionenaustauschers mit quaternärem Ammonium ($\text{R-CH}_2\text{-N}^+ \text{-(CH}_3)_3$) als funktioneller Gruppe und einem Tris/HCl-Puffersystem (25mM Tris/HCl, pH 8,0) wurden sowohl die zytoprotektiv

Ergebnisse

wirksamen Proteine als auch die ApoJ-induzierenden Komponenten an das Säulenmaterial gebunden und konnten anschließend mit einer Natriumchloridkonzentration von 300mM-400mM gemeinsam eluiert werden (ohne Abb.). Eine Analyse dieser Fraktionen mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließender Coomassie-Färbung zeigte jedoch, dass die Trenneigenschaften der Anionenaustauscherchromatographie unter alkalischen Bedingungen (pH 8,0) nicht zufriedenstellend waren. Um diese zu verbessern, sollte die Fraktionierung von Zellextrakt mittels Anionenaustauscherchromatographie und unter Verwendung des für die Kationenaustauscherchromatographie eingesetzten sauren Natriumacetat-Puffersystems (pH 5,5) wiederholt werden.

Hierzu wurden zunächst 2ml Zellextrakt einer Konzentration von 5×10^7 Rat1-Fibroblasten/ml in einem Verhältnis von 1:5 in 25mM Natriumacetat (pH 5,5) verdünnt. 2ml hiervon wurden als Ausgangsmaterial für die späteren Experimente abgenommen. Die verbliebenen 8ml wurden für die Anionenaustauscherchromatographie mittels entsprechender Zentrifugeneinheit (Vivapure Maxi H Typ Q, Vivascience) eingesetzt (2.2.2.2). Nach Bindung der Komponenten an das Säulenmaterial wurde dieses 2× mit jeweils 8ml des Natriumacetat-Puffers gewaschen. Die Elution erfolgte anschließend schrittweise mit jeweils 8ml des Natriumacetat-Puffers, dem 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 bzw. 400mM Natriumchlorid zugesetzt war.

Zur Überprüfung der ApoJ-induzierenden Eigenschaften einzelner Fraktionen wurden Rat1-Fibroblasten für 48h unter serumfreien Bedingungen mit jeweils 500µl des Ausgangsmaterials, des Durchflusses, der Eluate beider Waschschriffe sowie der einzelnen NaCl-Eluate in einem Gesamtvolumen von 10ml inkubiert. Kontrollen wurden 500µl des natriumchloridfreien Chromatographiepuffers zugesetzt. Anschließend wurde der ApoJ-mRNA-Gehalt der lebenden Rat1-Fibroblasten nach Präparation der Gesamt-RNA mittels Northern-Blot-Analyse untersucht. Zur Überprüfung der zytoprotektiven Wirkung einzelner Fraktionen wurden Rat1-Fibroblasten in 96-Loch-Mikrotiterplatten für 48h unter serumfreien Bedingungen mit jeweils 10µl des Ausgangsmaterials, des Durchflusses, der Eluate beider Waschschriffe sowie der einzelnen NaCl-Eluate in einem Gesamtvolumen von 100µl inkubiert und anschließend eine colorimetrische Zellvitalitätsbestimmung mittels MTS-basierendem Assay durchgeführt. Kontrollen wurden 10µl des natriumchloridfreien Chromatographiepuffers zugesetzt. In beiden Experimenten enthielt das eingesetzte Zellkulturmedium 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz.

Wie Abbildung 3.2.7 zeigt, eluieren sowohl die ApoJ-induzierenden Komponenten als auch die zytoprotektiven Proteine unter sauren Bedingungen (pH 5,5) bei einer Natriumchloridkonzentration von 200-250mM. Die ApoJ-induzierenden und zellschützenden Eigenschaften sowohl des Durchflusses als auch aller anderen Fraktionen entsprechen in etwa denen der Kontrollen. Somit scheinen die entsprechenden Faktoren zunächst komplett an das Säulenmaterial zu binden und bei einer Konzentration von 200mM und 250mM NaCl vollständig zu eluieren. Beide Fraktionen führen unter serumfreien Bedingungen sowohl zu einer 4-fachen Erhöhung des ApoJ-mRNA-Gehaltes in Rat1-Fibroblasten als auch innerhalb von 48h zu einer Verdopplung der Anzahl lebender Zellen. Verglichen mit dem Ausgangsmaterial ist das Ausmaß der Effekte hierbei etwas geringer, was ver-

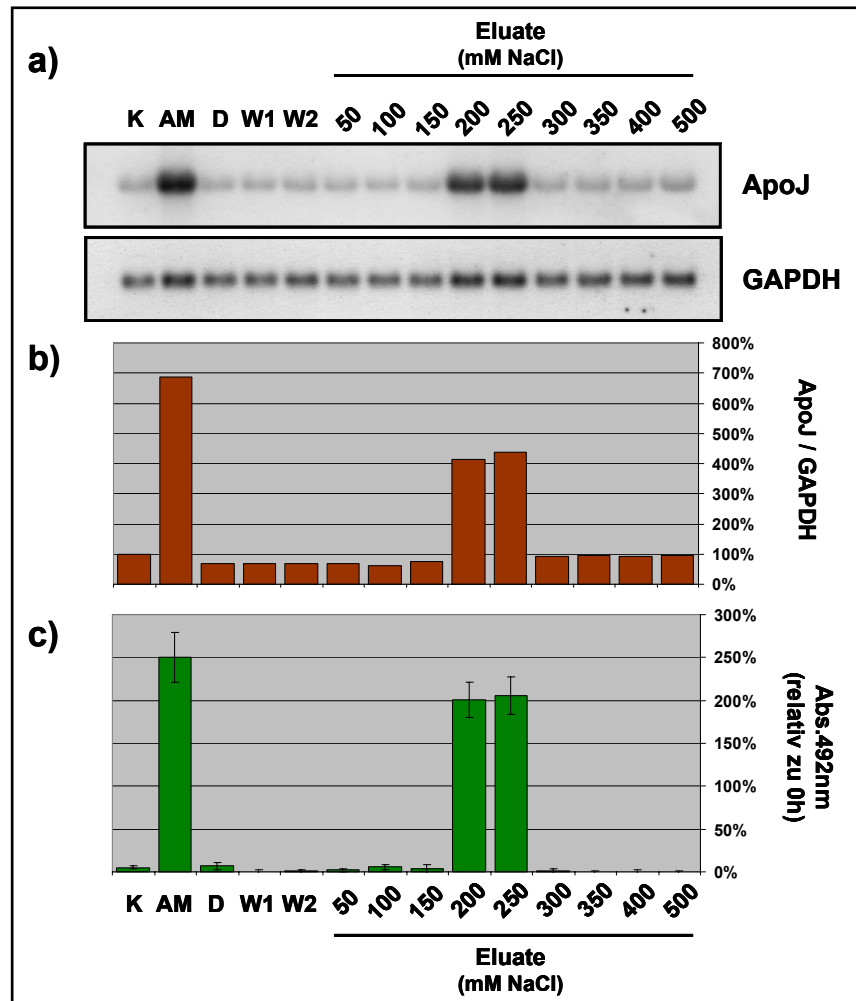


Abbildung 3.2.7: Überprüfung der ApoJ-induzierenden und zytoprotektiven Eigenschaften einzelner Fraktionen nach Anionenaustauscherchromatographie von Zellextrakt: **a)** Northern-Blot-Analyse von 15µg Gesamt-RNA aus Rat1-Fibroblasten, die unter serumfreien Bedingungen für 48h mit Ausgangsmaterial (AM), Durchfluss (D), Eluaten der beiden Waschschriffe (W1, W2) sowie den mit Natriumchlorid eluierten Fraktionen (50-500mM NaCl) nach Anionenaustauscherchromatographie (pH 5,5) von Zellextrakt (1×10^7 Rat1-Zellen/ml) inkubiert wurden. Sämtliche Fraktionen wurden 1:20 verdünnt eingesetzt. Kontrollen (K) wurde 500µl natriumchloridfreier Chromatographiepuffer (25mM Natriumacetat, pH 5,5) zugesetzt. Das Zellkulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz. **b)** Densitometrische Auswertung der Northern-Blot-Analyse aus a). Die Intensitäten der ApoJ-Banden wurden zu den Intensitäten der entsprechenden GAPDH-Banden ins Verhältnis gesetzt und sind als relatives Verhältnis bezogen auf den Wert der Kontrolle dargestellt. **c)** Colorimetrische Bestimmung der Zellvitalität mittels MTS-basierendem Assay von Rat1-Fibroblasten, die unter serumfreien Bedingungen für 48h mit Ausgangsmaterial (AM), Durchfluss (D), Eluaten der beiden Waschschriffe (W1, W2) sowie den mit Natriumchlorid eluierten Fraktionen (50-500mM NaCl) nach Anionenaustauscherchromatographie (pH 5,5) von Zellextrakt (1×10^7 Rat1-Zellen/ml) inkubiert wurden. Sämtliche Fraktionen wurden 1:10 verdünnt eingesetzt. Kontrollen (K) wurde 10µl natriumchloridfreier Chromatographiepuffer (25mM Natriumacetat, pH 5,5) zugesetzt. Das Zellkulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz. Alle Werte sind als relative Absorption bezogen auf den zu Beginn des Experimentes ermittelten Ausgangswert (100%, nicht gezeigt) dargestellt (Mittelwert \pm Standardabweichung der Dreifachbestimmung).

mutlich auf die Verteilung der entsprechenden Komponenten auf zwei Fraktionen und somit auf eine verringerte Konzentration dieser Faktoren in den entsprechenden Fraktionen zurückzuführen ist. Eine anschließende Überprüfung der Proteinverteilung zwischen den einzelnen Fraktionen mittels Polyacrylamidgelelektrophorese und Coomassie-Färbung zeigte gegenüber dem alkalischen Puffersystem (25mM Tris/HCl, pH 8,0) deutlich verbesserte Trenneigenschaften. Somit scheint eine

Fraktionierung von Zellextrakt durch Anionenaustauscherchromatographie unter Verwendung des sauren Natriumacetat-Puffersystems (pH 5,5) als erster Schritt zur Reinigung der ApoJ-induzierenden und zytoprotektiven Komponenten geeignet. Weiterhin zeigt dieses Experiment, dass sowohl die im Zellextrakt enthaltenen ApoJ-induzierenden als auch die zytoprotektiven Faktoren unter den gewählten Bedingungen eine negative Nettoladung besitzen und somit zumindest der isoelektrische Punkt (pI) der an der Zytoprotektion beteiligten Proteine in einem Bereich $<5,5$ liegt. Dass die ApoJ-induzierenden Komponenten gemeinsam mit den zytoprotektiven Proteinen eluieren, ist zudem ein Hinweis darauf, dass beide Effekte durch dieselben Faktoren vermittelt werden.

3.2.8 Fraktionierung von Zellextrakt mittels Gelpermeationschromatographie

Parallel zur Etablierung der Anionenaustauscherchromatographie als primärem Schritt zur Reinigung der ApoJ-induzierenden und zytoprotektiven Faktoren wurde untersucht, ob eine an die Anionenaustauscherchromatographie anschließende Gelpermeationschromatographie zur weiteren Anreicherung dieser Faktoren geeignet ist. Zudem sollte mit Hilfe dieser Methode eine Abschätzung der nativen Molekulargewichte entsprechender Faktoren stattfinden. Für die Gelpermeationschromatographie wurde eine vorgepackte Superdex 200-Säule (HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade, Amersham-Pharmacia) verwendet. Die Gelmatrix dieser Säule besteht aus einem Dextran-Agarose-Konjugat und besitzt nach Herstellerangaben einen Trennbereich von 10.000 – 600.000 Da für globuläre Proteine. Dieses Säulenmaterial schien somit zur Reinigung und Molekulargewichtsbestimmung der ApoJ-induzierenden und zytoprotektiven Komponenten geeignet. Vor Beginn der Experimente wurde zunächst das Ausschlussvolumen (V_0) der Säule mittels Dextranblau (MW 2.000.000 Da) bestimmt. Die anschließende Kalibrierung erfolgte in Einzelschritten mit 10mg Katalase (232 kDa), 10mg Rinderserumalbumin (BSA, 69 kDa) und 5mg Cytochrom c (12,3 kDa). Das Probenvolumen betrug hierbei jeweils 1ml. Die Chromatographie wurde, wie bei den späteren Experimenten auch, mit einer FPLC-Apparatur (Econo System, Bio-Rad) bei Raumtemperatur und einer konstanten Flussrate von 0,5ml/min durchgeführt. Als Puffer wurde PBS^{-/-} verwendet. Bei der Kalibrierung der Säule mit Katalase und BSA konnte beobachtet werden, dass während der Gelpermeationschromatographie beide Proteine scheinbar sowohl als Monomere als auch als Dimere eluierten. Durch Analyse der Stammlösungen sowie der entsprechenden Fraktionen mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese konnte dies bestätigt werden und zugleich eine Kontamination mit anderen Proteinen ausgeschlossen werden. Zudem wurde sowohl für Katalase als auch für Rinderserumalbumin eine Aggregation zu Dimeren bereits beschrieben (Takeda und Samejima 1977, Hunter und Carta 2001). In beiden Fällen wurde das Elutionsvolumen der Dimere für die Kalibrierung der Säule mit herangezogen. Durch Auftragen der einzelnen Elutionsvolumina gegen das Molekulargewicht der entsprechenden Proteine bzw. Proteinkomplexe in einem halblogarithmischen Diagramm wurde eine Kalibriergerade erstellt (Abb. 3.2.8.1), die später zur Bestimmung des Molekulargewichts der ApoJ-induzierenden und zytoprotektiven Faktoren diente.

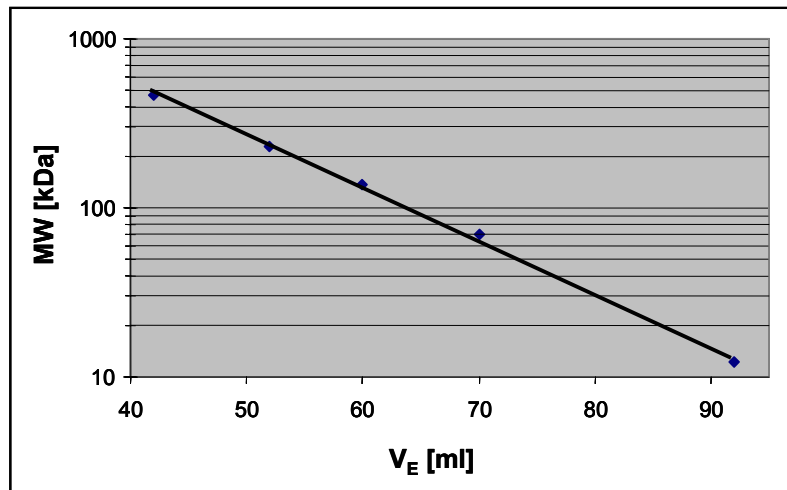


Abbildung 3.2.8.1: Kalibriergerade der HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade Säule: Die Kalibrierung der Säule erfolgte in Einzelschritten mit Katalase, BSA und Cytochrom c. Die Elutionsvolumina (V_E) der monomeren bzw. dimeren Proteine sind gegen den Logarithmus der entsprechenden Molekulargewichte aufgetragen. Die einzelnen Elutionsvolumina (V_E) betragen 42ml für dimere Katalase (464 kDa), 52ml für monomere Katalase (232 kDa), 60ml für dimeres BSA (138 kDa), 70ml für monomeres BSA (69 kDa) und 92ml für Cytochrom c (12,3 kDa). Die dargestellte Kalibriergerade wurde zur Bestimmung des Molekulargewichtes ApoJ-induzierender Faktoren und zytoprotektiver Proteine verwendet. Das Ausschlussvolumen (V_0) der Säule wurde mit Hilfe von Dextranblau (2.000 kDa) ermittelt und beträgt 39ml.

Als Ausgangsmaterial für die Gelpermeationschromatographie wurde aus Rat1-Fibroblasten präparierter Zellextrakt eingesetzt, der zuvor mittels Anionenaustauscherchromatographie unter Verwendung des alkalischen Puffersystems (25mM Tris/HCl, pH 8,0) fraktioniert wurde. Das 400mM NaCl-Eluat, welches die ApoJ-induzierenden und zytoprotektiven Faktoren enthielt, wurde dann mittels Ultrafiltration (MWCO 30kDa) auf ein Volumen von 1,2ml eingengt, steril filtriert (0,22 μ M) und anschließend als Ausgangsmaterial für die Gelpermeationschromatographie eingesetzt. Die Chromatographie wurde bei Raumtemperatur und einer konstanten Flussrate von 0,5ml/min durchgeführt. Als Pufferlösung wurde PBS^{-/-} verwendet. Während der Chromatographie wurde die Absorption des Eluats bei 280nm mittels UV-Monitor detektiert und mit Hilfe eines Schreibers aufgezeichnet. Es wurden Fraktionen von 1ml Volumen gesammelt.

Anschließend wurden Rat1-Fibroblasten unter serumfreien Bedingungen für 48h mit jeweils 250 μ l vier aufeinander folgender Fraktionen inkubiert und der ApoJ-mRNA-Gehalt der lebenden Rat1-Fibroblasten nach Präparation der Gesamt-RNA mittels Northern-Blot-Analyse untersucht. Kontrollen wurde 1ml PBS^{-/-} zugesetzt. Zur Überprüfung der durch die einzelnen Fraktionen vermittelten Zytoprotektion wurden Rat1-Fibroblasten in 96-Loch-Mikrotiterplatten unter serumfreien Bedingungen für 48h pro Loch mit jeweils 8 μ l zweier aufeinander folgender Fraktionen sowie 8 μ l des Ausgangsmaterials in einem Gesamtvolumen von 100 μ l inkubiert und anschließend eine colorimetrische Zellvitalitätsbestimmung mittels MTS-basierendem Assay durchgeführt. Kontrollen wurden 16 μ l PBS^{-/-} zugesetzt. In beiden Experimenten enthielt das eingesetzte Zellkulturmedium 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz.

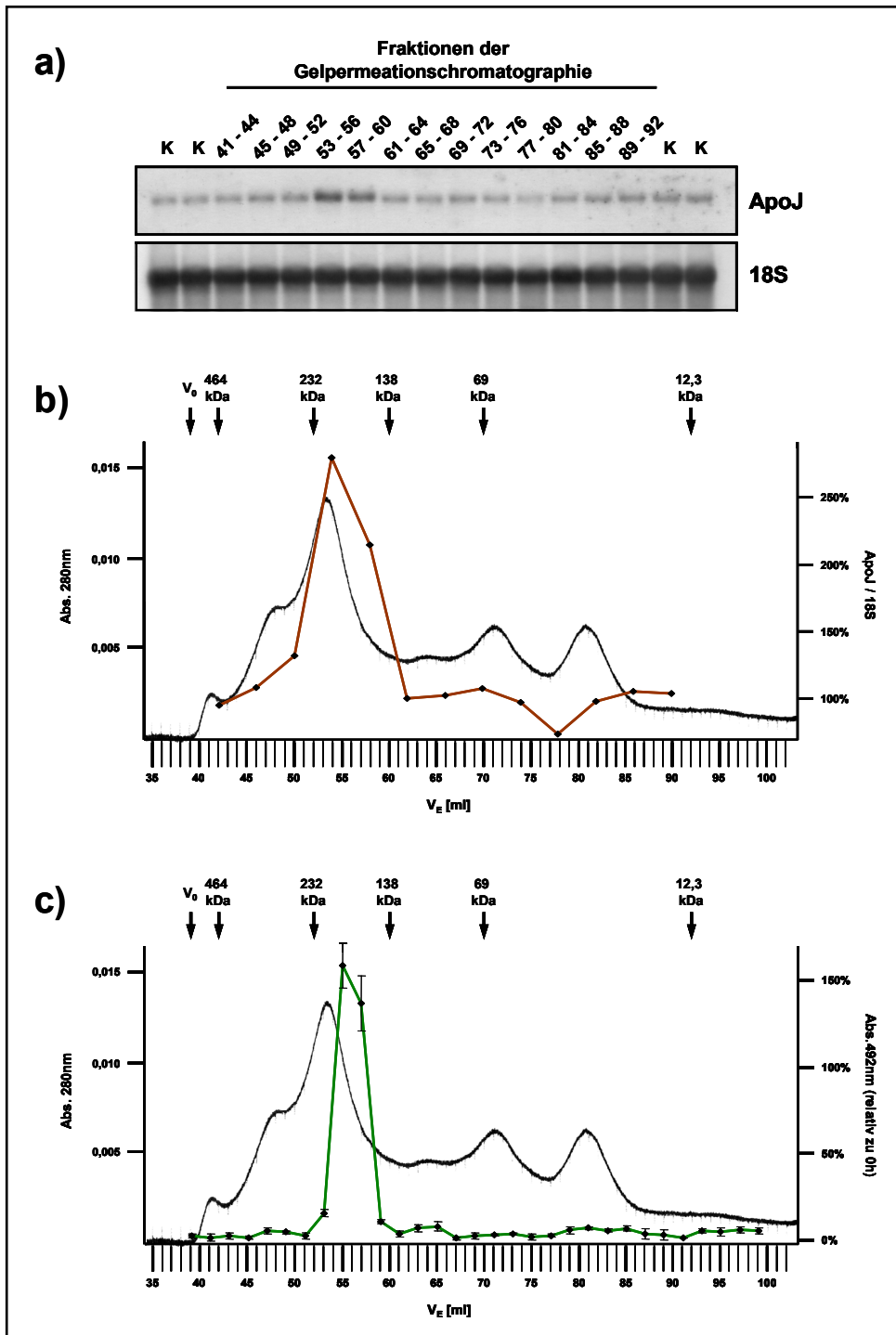


Abbildung 3.2.8.2: Gelpermeationschromatographie der ApoJ-induzierenden/zytoprotektiven Fraktion nach vorausgegangener Anionenaustauscherchromatographie von Zellextrakt: a) Northern-Blot-Analyse von 8µg Gesamt-RNA aus Rat1-Fibroblasten, die unter serumfreien Bedingungen für 48h mit jeweils 250µl der angegebenen Fraktionen inkubiert wurden. Kontrollen (K) wurde 1ml PBS⁻ zugesetzt. Das Zellkulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz. **b)** Densitometrische Auswertung der Northern-Blot-Analyse aus a). Die Intensitäten der ApoJ-Banden wurden zu den Intensitäten der entsprechenden 18S-Banden ins Verhältnis gesetzt und sind als relatives Verhältnis bezogen auf den Mittelwert der vier Kontrollen in Form eines Profils dargestellt (ApoJ/18S, braun). Als weiteres Profil ist die Absorption des Durchflusses bei 280nm (schwarz) dargestellt. **c)** Colorimetrische Bestimmung der Zellvitalität mittels MTS-basierendem Assay von Rat1-Fibroblasten, die für 48h unter serumfreien Bedingungen mit jeweils 8µl zweier aufeinander folgender Fraktionen (39+40 - 99+100) inkubiert wurden. Das Zellkulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz. Alle Werte sind als relative Absorption bezogen auf den zu Beginn des Experimentes ermittelten Ausgangswert (100%, nicht gezeigt) in Form eines Profils (Abs. 492nm (relativ zu 0h), grün) dargestellt (Mittelwert ±Standardabweichung der Dreifachbestimmung). Als weiteres Profil ist die Absorption des Eluats bei 280nm (schwarz) dargestellt. In b) und c) sind Ausschlussvolumen (V_0) sowie die ermittelten Elutionsvolumina (V_E) der bei der Kalibrierung der Säule verwendeten Proteine angegeben (Pfeile).

Die Überprüfung der ApoJ-induzierenden Eigenschaften der Fraktionen zeigt, dass die Inkubation mit den vereinigten Fraktionen 53-56 und 57-60 zu einer Erhöhung des ApoJ-mRNA-Gehaltes in serumfrei kultivierten Rat1-Fibroblasten (Faktor 2,8 bzw. 2,1) führt (Abb. 3.2.8.2 a, b). Alle anderen Fraktionen zeigen keine ApoJ-induzierende Wirkung. Dies zeigt, dass alle ApoJ-induzierenden Komponenten bei einem Volumen von 53-60ml in einem einzelnen Peak eluieren. Das native Molekulargewicht dieser Faktoren liegt somit in einem Bereich von 130-220 kDa.

Wie in Abbildung 3.2.8.2 c zu sehen ist, eluieren die zellschützenden Proteine während der Gelpermeationschromatographie bei einem Volumen von 55-58ml. Nur die vereinigten Fraktionen 55+56 und 57+58 zeigen deutliche zellschützende Eigenschaften, die in etwa der des Ausgangsmaterials entsprechen (nicht dargestellt) und die während der 48-stündigen Inkubation zu einer Zunahme der Anzahl vitaler Zellen um 60% führt. Bei Inkubation mit allen anderen Fraktionen kommt es, wie bei den Kontrollen auch (nicht dargestellt), bei etwa 90% der Rat1-Zellen zu einem Verlust der Lebensfähigkeit. Es zeigt sich, dass auch die zellschützenden Proteine in einem einzigen Peak eluieren und sich deren Molekulargewicht auf einen Bereich von etwa 150-190 kDa eingrenzen lässt.

Dass sowohl die ApoJ-induzierenden Faktoren als auch die zytoprotektiven Proteine jeweils in einem einzelnen Peak eluieren, lässt vermuten, dass beide Effekte jeweils durch einen einzigen Faktor vermittelt werden. Vergleicht man das Elutionsprofil der zytoprotektiven Proteine mit dem der Gesamtproteinmenge (Abs. 280nm), zeigt sich, dass kein korrelierender Peak auf Ebene der Absorption bei 280nm zu erkennen ist. Die für die zellschützenden Eigenschaften verantwortlichen Proteine scheinen somit in den entsprechenden Fraktionen unterrepräsentiert zu sein. Dass ApoJ-induzierende Faktoren und zytoprotektiv wirksame Proteine während der Gelpermeationschromatographie gemeinsam eluieren (Fraktionen 55-58), zeigt, dass diese neben ähnlichen Ladungseigenschaften auch ein ähnliches natives Molekulargewicht besitzen. Dies ist ein weiterer deutlicher Hinweis darauf, dass beide Effekte durch das gleiche Protein vermittelt werden. Nach TCA-Präzipitation von jeweils 600µl der Fraktionen 50-63 wurde deren Proteinzusammensetzung mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese und Coomassie-Färbung analysiert. Es konnte jedoch keine Korrelation einzelner Proteinbanden mit den ApoJ-induzierenden und zellschützenden Eigenschaften der entsprechenden Fraktionen hergestellt werden, da in einem Teil der Fraktionen eine dominante Proteinbande vorhanden war, die eine Analyse unterrepräsentierter Proteine nicht zuließ (ohne Abbildung).

3.2.9 Partielle Reinigung des zytotoxischen Proteins aus konditioniertem Medium Camptothecin-behandelter Rat1-Fibroblasten

Wie in den vorausgehenden Abschnitten (3.2.7, 3.2.8) gezeigt werden konnte, schien die Fraktionierung von Zellextrakt mittels Anionenaustauscherchromatographie unter sauren Bedingungen (pH 5,5) und einer anschließenden Gelpermeationschromatographie der aktiven Fraktionen zur partiellen Reinigung ApoJ-induzierender und zytotoxischer Proteine geeignet. Wie sich jedoch in Folgeexperimenten herausstellte, war die Kopplung beider Reinigungsschritte nicht ausreichend, um nach Polyacrylamidgelelektrophorese eine Korrelation einzelner Proteinbanden mit den zytotoxischen Eigenschaften der entsprechenden Fraktionen herzustellen. Grund hierfür war der zu hohe Gehalt an Gesamtprotein in den zytotoxischen Fraktionen, der eine Analyse unterrepräsentierter Proteinbanden unmöglich machte (ohne Abbildung). Deshalb wurde in weiteren Experimenten versucht, zusätzliche Reinigungsschritte zu etablieren. Hierfür wurde, wie unter 2.2.2.3 beschrieben, Zellextrakt mittels Affinitätschromatographie fraktioniert. Es zeigte sich jedoch, dass die zwei verwendeten Säulenmaterialien unterschiedlicher Gruppenspezifität (HiTrap Heparin HP, HiTrap Blue HP, Amersham-Pharmacia) zur Reinigung der zytotoxischen Proteine nicht geeignet waren. In beiden Fällen erfolgte keine Bindung der zytotoxischen Proteine an das Säulenmaterial (ohne Abb.).

In weiteren Experimenten sollte schließlich untersucht werden, ob die Verwendung von konditioniertem Medium Camptothecin-behandelter Rat1-Fibroblasten als Ausgangsmaterial für eine partielle Reinigung der zytotoxischen Proteine mittels Anionenaustauscher- und anschließender Gelpermeationschromatographie geeignet ist. Die Idee hierbei war, die Gesamtproteinmenge bereits auf Ebene des für die Reinigung verwendeten Ausgangsmaterials zu reduzieren. Während einer Inkubation serumfrei kultivierter Rat1-Fibroblasten mit 3 μ M Camptothecin kommt es zu einer extrazellulären Akkumulation ApoJ-induzierender sowie zytotoxischer Komponenten im Kulturmedium. Diese lassen sich auch nach 48-stündiger Konditionierung durch Ultrafiltration (MWCO 100kDa) des konditionierten Mediums im Überstand konzentrieren (Abb. 3.2.3). Es ist anzunehmen, dass während der Konditionierung ein Teil der freigesetzten Proteine ohne ApoJ-induzierende oder zellschützende Wirkung degradiert und sich mittels Ultrafiltration (MWCO 100kDa) aus dem konditionierten Medium entfernen lässt. Somit sollte der relative Anteil zytotoxischer Proteine an der Gesamtproteinmenge im Rückstand höher sein in Zellextrakt, was eine anschließende Reinigung dieser zellschützenden Faktoren mittels Anionenaustauscher- und Gelpermeationschromatographie begünstigen würde. Um während der anschließenden Fraktionierung von konditioniertem Medium Camptothecin-behandelter Rat1-Fibroblasten mit Hilfe der beiden etablierten chromatographischen Reinigungsschritte den zeitlichen Aufwand der Analyse einzelner Fraktionen zu reduzieren, wurden diese ausschließlich mittels MTS-basierendem Zellvitalitätsassay auf zellschützende Eigenschaften überprüft. Aufgrund der ähnlichen Eigenschaften ApoJ-induzierender und zytotoxischer Faktoren war anzunehmen, dass die entsprechenden zytotoxisch wirksamen Proteine zumindest zum Teil an der Regulation der ApoJ-Genaktivität in Rat1-Fibroblasten beteiligt sind.

Als Ausgangsmaterial für die Anionenaustauscherchromatographie wurde konditioniertes Medium von 18× 175cm² Kulturflaschen konfluenter Rat1-Fibroblasten verwendet, die für 48h mit 3µM Camptothecin in jeweils 20ml serumfreiem Medium pro Kulturflasche inkubiert wurden. Anschließend erfolgte die Präparation und Konzentrierung des konditionierten Mediums mittels Ultrafiltration (MWCO 100kDa) wie unter 2.2.1.3 beschrieben. Das Ausgangsmaterial der Anionenaustauscherchromatographie (15ml) besaß eine Proteinkonzentration von etwa 1,3mg/ml und eine Gesamtproteinmenge von 19,5 mg. Dieses Ausgangsmaterial wurde zunächst in einem Verhältnis von 1:5 in Chromatographiepuffer (25mM Natriumacetat, 100mM NaCl, pH 5,5) verdünnt und anschließend, wie unter 2.2.2.2 beschrieben, für die Anionenaustauscherchromatographie mit einer Zentrifugeneinheit (Vivapure Maxi H Typ Q, Vivascience) eingesetzt. Die Elution erfolgte mit jeweils 15ml Chromatographiepuffer bei Natriumchloridkonzentrationen von 150mM, 250mM, 500mM und 2M. Die beiden letzten Elutionsschritte (500mM und 2M NaCl) dienten der Überprüfung der vorangegangenen Elution zellschützender Proteine auf Vollständigkeit.

Zur Überprüfung der zellschützenden Eigenschaften einzelner Fraktionen wurden Rat1-Fibroblasten in 96-Loch-Mikrotiterplatten unter serumfreien Bedingungen für 48h pro Loch mit jeweils 10µl des 1:5 in Chromatographiepuffer verdünnten Ausgangsmaterials, des Durchflusses sowie der einzelnen Eluate (150mM, 250mM, 500mM, 2M NaCl) inkubiert. Kontrollzellen wurden 10µl des Chromatographiepuffers (25mM Natriumacetat, 100mM NaCl, pH 5,5) zugesetzt. Das verwendete Zellkulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz. Anschließend wurde eine colorimetrische Zellvitalitätsbestimmung mittels MTS-basierendem Assay durchgeführt.

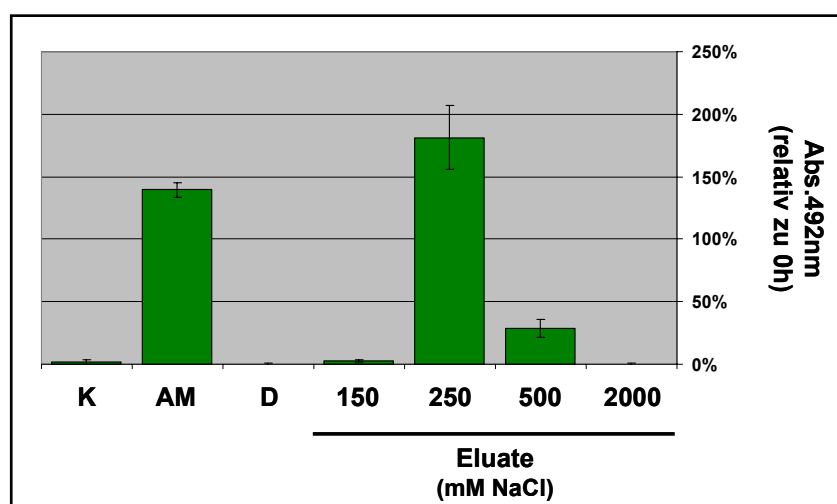


Abbildung 3.2.9.1: Überprüfung der zytoprotektiven Eigenschaften einzelner Fraktionen nach Anionenaustauscherchromatographie von konditioniertem Medium Camptothecin-behandelter Rat1-Fibroblasten: Colorimetrische Bestimmung der Zellvitalität mittels MTS-basierendem Assay von Rat1-Fibroblasten, die für 48h unter serumfreien Bedingungen mit Ausgangsmaterial (AM), Durchfluss (D) und den mit Natriumchlorid eluierten Fraktionen (150, 250, 500, 2000mM NaCl) inkubiert wurden. Sämtliche Fraktionen wurden 1:10 verdünnt eingesetzt. Kontrollen (K) wurde 10µl Chromatographiepuffer (25mM Natriumacetat, 100mM NaCl, pH 5,5) zugesetzt. Das Zellkulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz. Alle Werte sind als relative Absorption bezogen auf den zu Beginn des Experimentes ermittelten Ausgangswert (100%, nicht gezeigt) dargestellt (Mittelwert ±Standardabweichung der Dreifachbestimmung).

Ergebnisse

Wie Abbildung 3.2.9.1 zeigt, binden die zytoprotektiven Proteine aus konditioniertem Medium Camptothecin-behandelter Rat1-Zellen unter Verwendung des sauren Chromatographiepuffers (25mM Natriumacetat, 100mM NaCl, pH 5,5) vollständig an das Säulenmaterial. Der überwiegende Anteil dieser Proteine eluiert anschließend bei einer Natriumchloridkonzentration von 250mM. Dass auch das 500mM NaCl-Eluat in geringem Maße zellschützende Eigenschaften besitzt, deutet auf eine unvollständige Elution dieser Proteine bei 250mM NaCl hin. Vergleicht man die Fraktionierung mittels Anionenaustauscherchromatographie von konditioniertem Medium mit der von Zellextrakt (Abb. 3.2.7), ist kein Unterschied im Elutionsverhalten der zytoprotektiv wirksamen Proteine festzustellen. Die im Vergleich zum 250mM NaCl-Eluat geringere zellschützende Wirkung des Ausgangsmaterials lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass für die Zellvitalitätsbestimmung gleiche Volumina (jeweils 10 μ l) eingesetzt wurden, die Konzentration entsprechender Proteine jedoch in dem mit Chromatographiepuffer verdünnten Ausgangsmaterial (75ml) geringer war als im 250mM NaCl-Eluat (15ml). Eine Bestimmung des Proteingehaltes der 250mM NaCl-Fraktion ergab eine Proteinkonzentration von 83,4 μ g/ml und somit eine Gesamtproteinmenge von 1,25mg. Bezogen auf die Gesamtproteinmenge des Ausgangsmaterials (19,5mg) wurden die zytoprotektiven Proteine durch Anionenaustauscherchromatographie um Faktor 15,6 angereichert.

Das 250mM NaCl-Eluat wurde anschließend als Ausgangsmaterial für die Gelpermeationschromatographie eingesetzt. Hierzu wurde zunächst das Volumen der Probe mittels Ultrafiltration (MWCO 30kDa) auf 1,5ml reduziert und anschließend steril filtriert (0,22 μ M). Die Gelpermeationschromatographie unter Verwendung einer FPLC-Apparatur (Econo System, Bio-Rad) sowie einer HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade Säule (Amersham-Pharmacia) erfolgte, wie unter 2.2.2.4 beschrieben, bei Raumtemperatur und einer konstanten Flussrate von 0,5ml/min. Fraktionen von 1ml Volumen wurden gesammelt. Zur Überprüfung der zytoprotektiven Eigenschaften einzelner Fraktionen wurden Rat1-Fibroblasten in 96-Loch-Mikrotiterplatten für 48h unter serumfreien Bedingungen pro Loch mit jeweils 10 μ l zweier aufeinander folgender Fraktionen sowie 10 μ l des für die Gelpermeationschromatographie eingesetzten Ausgangsmaterials in einem Gesamtvolumen von 100 μ l inkubiert. Kontrollen wurde 20 μ l PBS^{-/-} zugesetzt. Das eingesetzte Zellkulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz. Anschließend wurde eine colorimetrische Zellvitalitätsbestimmung mittels MTS-basierendem Assay durchgeführt.

Wie in Abbildung 3.2.9.2 zu sehen ist, eluieren die zytoprotektiven Proteine bei einem Volumen von 54ml-61ml als einzelner Peak. Hierbei weisen die vereinigten Fraktionen 56+57 sowie 58+59 die stärksten zellschützenden Eigenschaften auf. Diese führen bei 48-stündiger Inkubation mit serumfrei kultivierten Rat1-Zellen zu einer Zunahme der Anzahl lebender Zellen um 50%. Verglichen hiermit ist die zytoprotektive Wirkung der vereinigten Fraktionen 54+55 sowie 60+61 nur etwa halb so stark, was darauf hindeutet, dass eine wirksame Konzentration zellschützender Proteine jeweils nur in den beiden Fraktionen vorhanden ist, die dem Elutionsmaximum jeweils am nächsten liegen (Fraktion 55, Fraktion 60). Somit scheint sich das effektive Elutionsvolumen dieser Proteine auf 55ml-60ml einschränken zu lassen. Das hieraus abgeleitete Molekulargewicht der Proteine beträgt 130-190kDa

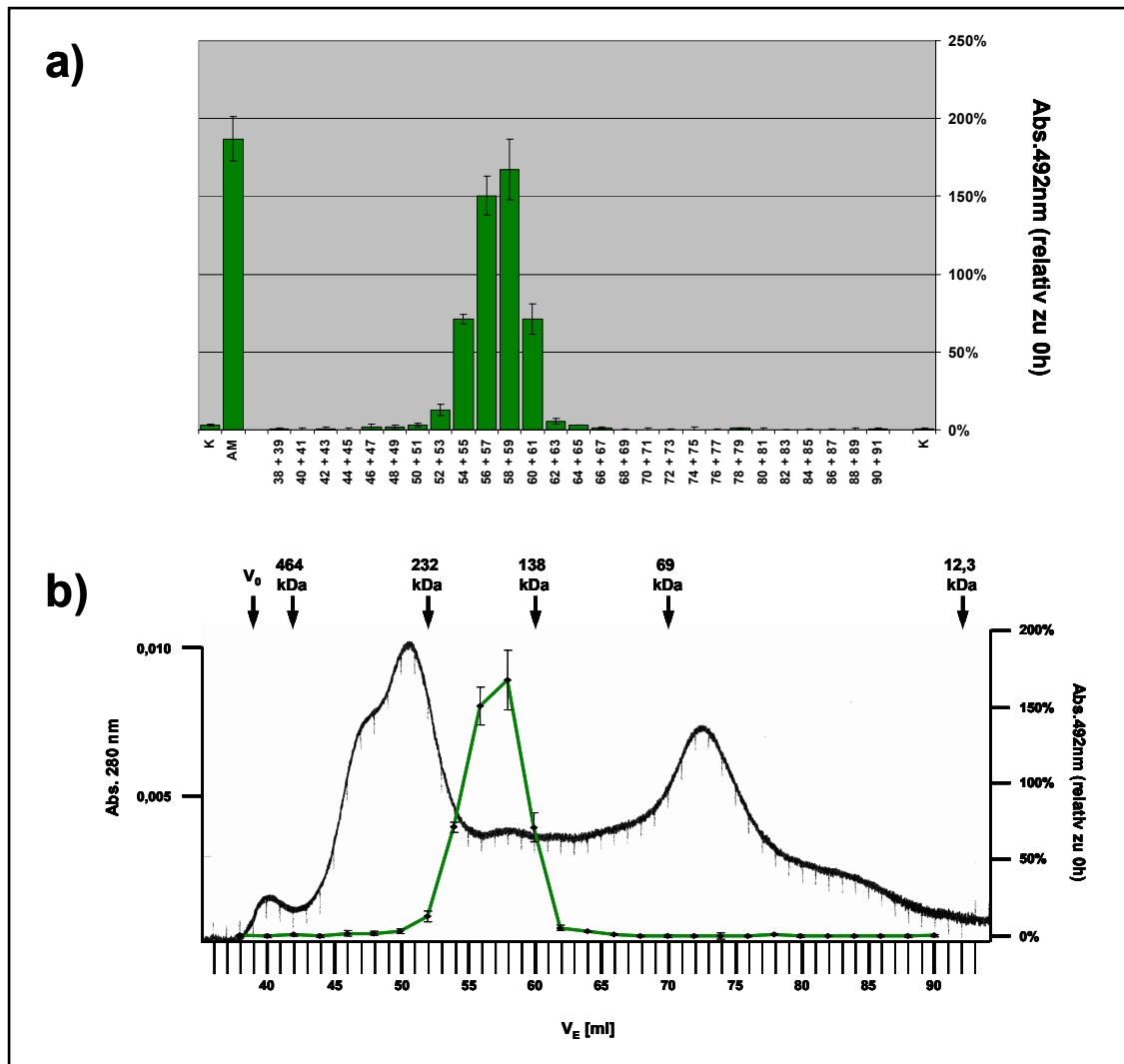


Abbildung 3.2.9.2: Gelpermeationschromatographie der zytoprotektiven Fraktion nach vorausgegangener Anionenaustauscherchromatographie von konditioniertem Medium Camptothecin-behandelter Rat1-Fibroblasten: a) Colorimetrische Bestimmung der Zellvitalität mittels MTS-basierendem Assay von Rat1-Fibroblasten, die für 48h unter serumfreien Bedingungen mit 10 μ l des Ausgangsmaterials sowie jeweils 10 μ l zweier aufeinander folgender Fraktionen (38+39 - 90+91, 2 \times 10 μ l) inkubiert wurden. Den Kontrollen (K) wurde 20 μ l PBS⁻ zugesetzt. Das Zellkulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz. Alle Werte sind als relative Absorption bezogen auf den zu Beginn des Experimentes ermittelten Ausgangswert (100%, nicht gezeigt) dargestellt (Mittelwert \pm Standardabweichung der Dreifachbestimmung). b) Darstellung der unter a) ermittelten Werte als Elutionsprofil (Abs. 492nm, grün). Als weiteres Profil ist die Absorption des Eluats bei 280nm (schwarz) dargestellt. Zudem sind Ausschlussvolumen (V_0) sowie die ermittelten Elutionsvolumina (V_E) der bei der Kalibrierung der Säule verwendeten Proteine angegeben (Pfeile).

und ist somit gegenüber dem Molekulargewicht der im Zellextrakt vorhandenen zellschützenden Proteine nahezu unverändert (Abb. 3.2.9.2). Ein Vergleich des Elutionsprofils der zytoprotektiv wirksamen Proteine mit dem Profil der Gesamtproteinmenge (Abs. 280nm) zeigt, dass in letzterem kein korrelierender Proteinpeak zu erkennen ist und somit die zytoprotektiven Proteine in den entsprechenden Fraktionen scheinbar unterrepräsentiert sind. Eine Bestimmung des Proteingehaltes der Fraktionen 55-60 ergab relativ gleichmäßige Konzentrationen, die im Mittel etwa 25 μ g/ml betragen. Die Gesamtproteinmenge der Fraktionen 55-60 beträgt folglich ca. 150 μ g. Bezogen auf die Proteinmenge des Ausgangsmaterials von 1,25mg ergibt sich somit eine mittels

Ergebnisse

Gelpermeationschromatographie erzielte Anreicherung der zytoprotektiven Proteine um Faktor 8,3. Bezieht man nur die Fraktionen 56-59, welche die stärkste zytoprotektive Wirkung haben, in die Berechnung ein, ergibt sich ein Gesamtproteingehalt von etwa 100µg und folglich ein Reinigungsfaktor von 12,5. Ausgehend von ultrafiltriertem konditioniertem Medium (19,5mg Gesamtprotein) wurden die zellschützenden Proteine mit Hilfe der beiden chromatographischen Reinigungsschritte um Faktor 195 angereichert.

Um eine potentielle Korrelation einzelner Proteine mit der zytoprotektiven Wirkung entsprechender Fraktionen zu überprüfen, sollten die Proteinzusammensetzungen der Fraktionen 50-65 mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert werden. Hierzu wurden jeweils 400µl zweier aufeinander folgender Fraktionen vereinigt, 1µg Lysozym als Trägerprotein (Carrier) zugesetzt und die Proteine anschließend mittels TCA-Präzipitation (2.2.2.6.2) quantitativ gefällt. Die Proteinpräzipitate wurden nach Reduktion unter denaturierenden Bedingungen in einem 10%igem Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und mittels eines Colloidal Blue Staining Kits (Invitrogen/Novex) gefärbt. Um die Trenneigenschaften des Gels im hochmolekularen Bereich zu verbessern, wurde eine weitere Elektrophorese in einem 7,5%igem Polyacrylamidgel durchgeführt. Als Proben wurden in diesem Fall die TCA-präzipitierten Proteine der Fraktionen 49-54, 55-60 sowie 61-66 eingesetzt. Vor der Proteinfällung wurden hierfür jeweils 100µl der entsprechenden 6 Fraktionen vereinigt.

Vergleicht man nach elektrophoretischer Trennung in einem Polyacrylamidgel die Proteinzusammensetzung der vereinigten Fraktionen 50+51 - 64+65 auf Ebene des Bandenmusters, so zeigt sich, dass die drei in Abbildung 3.2.9.3 a markierten Proteine nur in Fraktionen enthalten sind, die zellschützende Eigenschaften aufweisen (Fraktionen 54+55 - 60+61). Zudem korreliert deren Bandenintensität mit dem Ausmaß der zytoprotektiven Wirkung der jeweiligen Fraktionen. Alle anderen in den aktiven Fraktionen zu erkennenden Banden sind entweder auch in Fraktionen enthalten, die keine zellschützende Wirkung besitzen (Fraktionen 50+51, 52+53, 62+63, 64+65), oder korrelieren auf Ebene ihrer Bandenintensität nicht mit dem Ausmaß des zytoprotektiven Effekts. Somit scheinen nur die drei markierten Banden als potentiell zellschützende Proteine in Frage zu kommen. Aufgrund der nicht zufrieden stellenden Auflösung des verwendeten Gels im Bereich der Proteinbande 1 wurden die Fraktionen 55-60 nochmals unter Verwendung eines 7,5%igen Polyacrylamidgels elektrophoretisch getrennt. Nach Coomassie-Färbung der Proteine ist deutlich zu erkennen, dass die als Protein 1 markierte Bande nur in den zytoprotektiv wirksamen Fraktionen 55-60 enthalten ist (Abb. 3.2.9.3 b). Die anhand des Molekulargewichtsstandards abgeschätzten Molekulargewichte der drei markierten Proteinbanden betragen 75kDa (Protein 1), 65kDa (Protein 2) und 50kDa (Protein 3). Alle drei Proteinbanden wurden für eine spätere Analyse mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie (3.3.4) aus den Gelen ausgeschnitten.

Um die Korrelation dieser drei Proteinbanden mit der zytoprotektiven Wirkung entsprechender Fraktionen zu bestätigen, wurde eine weitere Präparation (Präparation2) durchgeführt. Hierbei diente 280ml konditioniertes Medium Camptothecin-behandelter Rat1-Fibroblasten (14× 175cm² Kulturflaschen) als Ausgangsmaterial. Nach Gelpermeationschromatographie wurden die zytoprotektiven

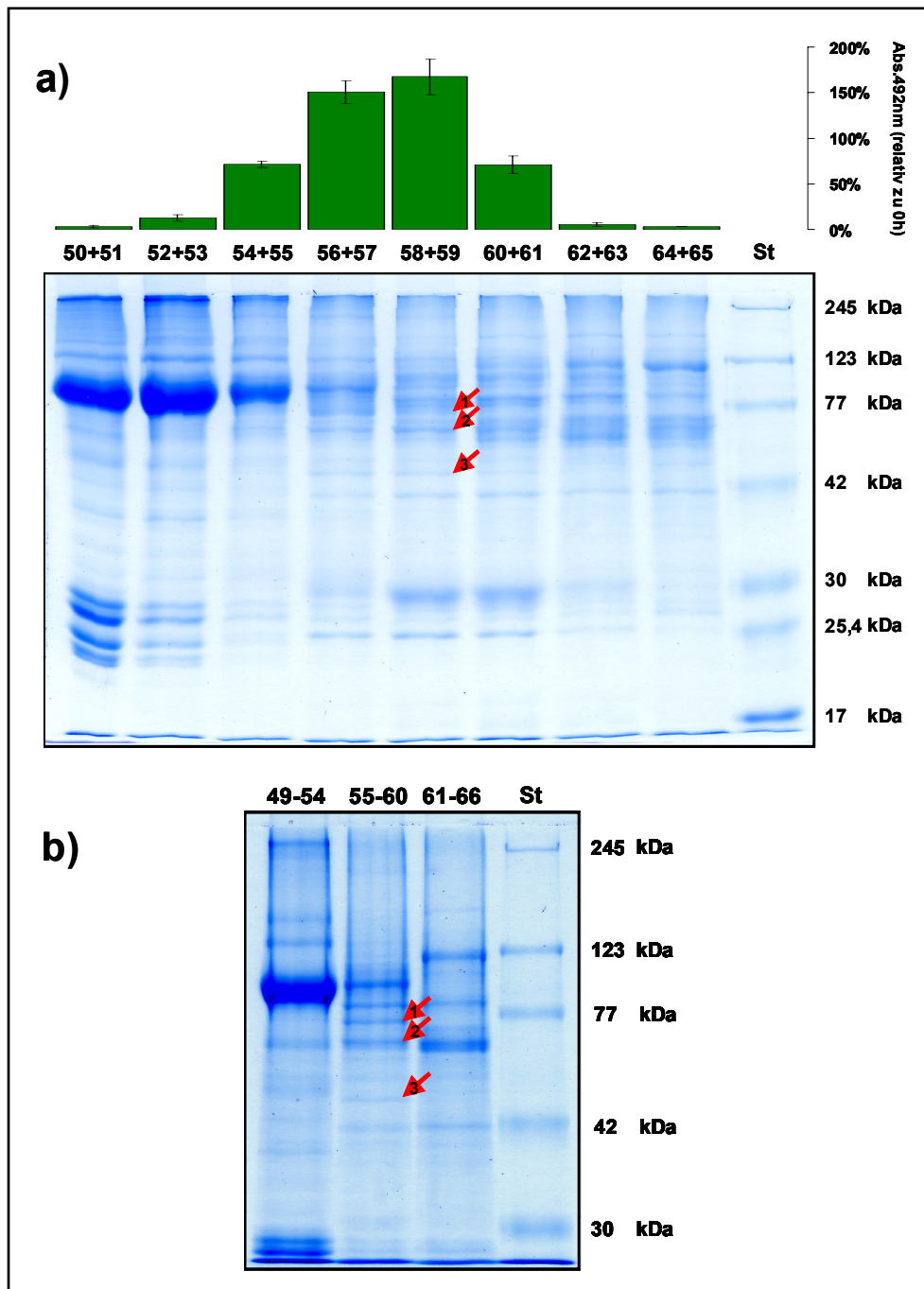


Abbildung 3.2.9.3: Proteinzusammensetzung zytoprotektiver Fraktionen nach denaturierender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Präparation 1): a) Jeweils 400 μ l zweier aufeinander folgender Fraktionen der Gelpermeationschromatographie (Fraktionen 50+51, 52+53, 54+55, 56+57, 58+59, 60+61, 62+63, 64+65) wurden vereinigt. Nach TCA-Präzipitation wurden die Proteine in einem 10%igem Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt. Ein Vergleich der Bandenmuster zwischen den Proben zeigt drei Proteinbanden, die mit dem Ausmaß der zytoprotektiven Wirkung der entsprechenden Fraktionen korrelieren (Pfeile 1-3). Um diese Korrelation zu verdeutlichen, sind darüber die entsprechenden Werte der zuvor durchgeführten Zellvitalitätsbestimmung (Abb. 3.3.2) dargestellt. b) Jeweils 100 μ l von sechs aufeinander folgenden Fraktionen der Gelpermeationschromatographie (Fraktionen 49-54, 55-60, 61-66) wurden vereinigt. Nach TCA-Präzipitation wurden die Proteine in einem 7,5%igem Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt. Ein Vergleich der Bandenmuster zwischen den Proben zeigt, dass die bereits unter a) markierten drei Proteinbanden nur in der Probe enthalten sind, die den zellschützenden Fraktionen 55-60 entspricht (Pfeile 1-3). Aufgrund der besseren Auflösung im hochmolekularen Bereich ist die Proteinbande 1 hier deutlicher zu erkennen als unter a). St: Molekulargewichtsstandard

Ergebnisse

Eigenschaften der Fraktionen wie bei der ersten Präparation (Abb. 3.2.9.2) mit Hilfe des MTS-basierenden Zellvitalitätsassays bestimmt. Die zytoprotektiven Proteine eluieren wie in Präparation 1 in einem einzelnen Peak bei einem Volumen von 54-59ml (ohne Abbildung). Für eine anschließende Analyse der Proteinzusammensetzung zellschützender Fraktionen wurden jeweils 400µl zweier aufeinander folgender Fraktionen vereinigt (Fraktionen 50+51 - 62+63) und die TCA-präzipitierten Proteine nach Reduktion unter denaturierenden Bedingungen in einem 7,5%igem Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt.

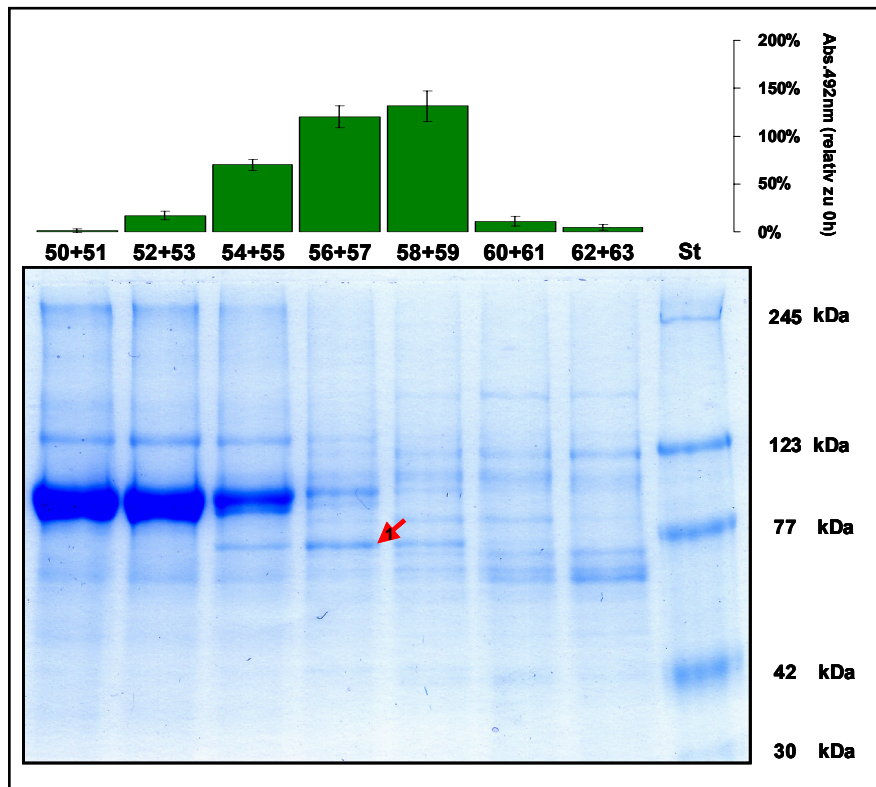


Abbildung 3.2.9.4: Proteinzusammensetzung zytoprotektiver Fraktionen nach denaturierender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Präparation 2): Jeweils 400µl zweier aufeinander folgender Fraktionen der Gelpermeationschromatographie (Fraktionen 50+51, 52+53, 54+55, 56+57, 58+59, 60+61, 62+63) wurden vereinigt. Nach TCA-Präzipitation wurden die Proteine in einem 7,5%igem Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt. Ein Vergleich der Bandenmuster zwischen den Proben zeigt eine Proteinbande, die mit der zytoprotektiven Wirkung der entsprechenden Fraktionen korreliert (Pfeil 1). Zur Verdeutlichung dieser Korrelation, sind darüber die entsprechenden Werte der zuvor durchgeführten colorimetrischen Zellvitalitätsbestimmung dargestellt. Diese erfolgte mittels MTS-basierendem Assay von Rat1-Fibroblasten, die für 48h unter serumfreien Bedingungen mit jeweils 2×10^4 µl zweier aufeinander folgender Fraktionen (50+51 - 62+63) inkubiert wurden. Das Zellkulturmedium enthielt 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz. Alle Werte sind als relative Absorption bezogen auf den zu Beginn des Experimentes ermittelten Ausgangswert (100%, nicht gezeigt) dargestellt (Mittelwert \pm Standardabweichung der Dreifachbestimmung). St: Molekulargewichtsstandard

Wie bereits bei der ersten Präparation (Abb. 3.2.9.3) ist bei Vergleich der Bandenmuster zwischen den einzelnen Proben auch in dieser Präparation eine Proteinbande zu erkennen, die nur in den zytoprotektiv wirksamen Fraktionen 54+5, 56+57 und 58+59 enthalten ist (Abb. 3.2.9.4 Pfeil 1). Das geschätzte Molekulargewicht des entsprechenden Proteins beträgt etwa 75kDa und entspricht somit dem Molekulargewicht der in der ersten Präparation als Protein 1 bezeichneten Bande. Die beiden

Proteinbanden 2 (65kDa) und 3 (50kDa) der ersten Präparation sind in diesem Gel nicht zu erkennen. Grund hierfür könnte die verringerte Menge an Ausgangsmaterial sein, die für diese zweite Präparation verwendet wurde. Die in Abbildung 3.2.9.4 als Protein 1 markierte Proteinbande wurde für eine anschließende Analyse mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie aus dem Gel ausgeschnitten.

3.2.10 Identifizierung potentiell zytoprotektiver Proteine mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Um die drei potentiell zytoprotektiven Proteine relativ zügig identifizieren zu können, sollten diese mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie (matrix-assisted-laser-desorption-ionization-time-of-flight) analysiert werden. Das Prinzip dieses Verfahrens besteht darin, die zu untersuchenden Proteine zunächst proteolytisch (meist mit Trypsin) zu fragmentieren und anschließend die Massen der entstandenen Peptide zu bestimmen. Hierzu werden diese in eine geeignete Matrix eingebettet und mittels kurzer Laserimpulse ionisiert. Dies führt zu einer Freisetzung der Proteinfragmente aus der Matrix in die Gasphase. In einem elektrostatischen Feld werden dann alle ionisierten Bruchstücke auf die gleiche kinetische Energie von mehreren keV beschleunigt. Nach Durchfliegen einer feldfreien Driftstrecke treffen diese auf einen Detektor, der schließlich über einen Sekundärelektronenvervielfacher ein Signal generiert. Bei diesem Vorgang kann die Zeit, welche die ionisierten Proteinfragmente zum Durchfliegen der feldfreien Driftstrecke benötigen, exakt bestimmt werden. Da Teilchen gleicher kinetischer Energie und ungleichem Masse/Ladungsverhältnis diese Distanz unterschiedlich schnell zurücklegen, ist es möglich, die Massen der einzelnen ionisierten Proteinfragmente anhand ihrer Flugzeiten genau zu berechnen. Die eigentliche Identifikation der Proteine erfolgt anschließend durch einen Abgleich der berechneten Fragmentmassen mit einer Datenbank. Diese enthält sämtliche Peptidmassen gespeicherter Proteinsequenzen nach rechnerischer Trypsin-Fragmentierung, wobei die wichtigsten Aminosäuremodifikationen, Isotopenverteilungen und Redoxzustände von Sulfhydrylgruppen berücksichtigt werden. Mit speziellen Algorithmen werden nun diese theoretischen Fragmentmassen mit den in der MALDI-TOF-Massenspektrometrie ermittelten Fragmentmassen der zu identifizierenden Proteine verglichen. Idealerweise liefert dieser rechnerunterstützte Datenbankabgleich ein Protein, dessen theoretische Fragmentmassen sich allen in der Massenspektrometrie bestimmten Fragmentmassen exakt zuordnen lassen. Aufgrund von Messungenauigkeiten sowie dem bezüglich der Massenunterschiede limitierten Auflösungsvermögen des massenspektrometrischen Verfahrens erhält man in der Praxis gewöhnlich eine Liste potentieller „Kandidatenproteine“, deren Rangfolge sich nach der Anzahl exakt zugeordneter MALDI-TOF-Fragmentmassen richtet. Voraussetzung für eine erfolgreiche Identifizierung von Proteinen ist hierbei, dass deren Sequenzinformationen bereits in der Datenbank verfügbar sind. Unbekannte Proteine lassen sich mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie nicht identifizieren. Hierzu muss deren Aminosäuresequenz direkt bestimmt werden.

Zur Identifikation wurden die aus den Polyacrylamidgelen ausgeschnittenen Proteinbanden (Protein 1 (Abb. 3.2.9.4), Protein 2, Protein 3 (Abb. 3.2.9.3 a)) mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Ergebnisse

analysiert. Die massenspektrometrische Analyse wurde von Dr. Monica Linder (Biochemisches Institut (FB11), Justus-Liebig-Universität, Gießen) im Rahmen einer Kooperation durchgeführt. Die mit der MALDI-TOF-Massenspektrometrie erhaltenen Fragmentmassen der drei analysierten Proteinbanden wurden im Rahmen einer computerunterstützten Auswertung mit dem Programm Mascot (www.matrixscience.com) mit der NCBI-Datenbank abgeglichen. Dies lieferte für jede analysierte Proteinbande eine Reihenfolge potentieller „Kandidatenproteine“. An erster Stelle standen das Enzym Acylpeptidhydrolase für Protein 1, Hsc 70 (heat shock cognate protein 70) für Protein 2 und Glutamatdehydrogenase für Protein 3 (Tab. 3.2.10.1). Der vom Programm Mascot verwendete Mowse-Algorithmus ermittelt zusätzlich einen Wert (Mowse-Score), mit dem die Wahrscheinlichkeit (P) angegeben wird, nach der die Übereinstimmung zwischen den theoretischen Peptidmassen des angegebenen Proteins und den gemessenen Peptidmassen ein zufälliges Ereignis ist ($\text{Mowse-Score} = -10 \times \log(P)$). Somit steigt mit dem Wert des Mowse-Scores auch die Wahrscheinlichkeit, dass das identifizierte Protein dem analysierten Protein entspricht. Mowse-Scores >67 sind als signifikant ($p < 0,05$) anzusehen. Bei allen drei identifizierten Proteinen liegt der Wert des Mowse-Scores deutlich über der Signifikanzgrenze. Relativ hoch sind auch der Anteil zugeordneter Peptidmassen und der abgedeckte Sequenzbereich der identifizierten Proteine. Die durchschnittlichen Abweichungen der gemessenen Peptidmassen von den theoretischen Werten betragen zudem lediglich 31-91 ppm (parts per million). Die Identifikation der drei Proteine kann somit als nahezu sicher angesehen werden.

Proteinbande	identifiziertes Protein (NCBI-Datenbank Accession Nr.)	Anzahl gemessener Peptide / Anzahl übereinstimmender Peptide	durchschnittliche Differenz zwischen theoretischer und gemessener Peptidmasse in Δ ppm	durch Peptide abgedeckter Sequenzanteil des identifizierten Proteins	Mowse-Score
1	Acylpeptidhydrolase (CAA33040)	22 / 13	91	29,9%	133
2	heat shock cognate protein 70 (NP 077327)	33 / 14	82	28,2%	101
3	Glutamatdehydrogenase (NP 036702)	26 / 14	31	26,9%	131

Tabelle 3.2.10.1: Ergebnisse der MALDI-TOF-Massenspektrometrie: Die Proteinbande 1 wurde als Acylpeptidhydrolase, die Proteinbande 2 als Hsc70 (heat shock cognate protein 70) und die Proteinbande 3 als Glutamatdehydrogenase identifiziert. Angegeben sind für jedes Protein die Accession Number der NCBI-Datenbank, die Anzahl der gemessenen Peptide sowie die Anzahl der gemessenen Peptide, die mit den errechneten Peptiden auf Ebene der Proteinfragmentmassen übereinstimmen. Des Weiteren sind die durchschnittlichen Abweichungen zwischen den gemessenen und errechneten Peptidmassen übereinstimmender Proteinfragmente in ppm (parts per million) sowie der durch die übereinstimmenden Peptide abgedeckte Sequenzanteil des jeweiligen Proteins angegeben. Zudem ist der mittels Mowse-Algorithmus errechnete Wert angegeben. Dieser drückt das Maß der Wahrscheinlichkeit aus, mit der identifiziertes und analysiertes Protein übereinstimmen. Werte >67 sind in diesem Zusammenhang als signifikant anzusehen ($p < 0,05$).

Um nähere Hinweise darüber zu erhalten, welches dieser drei identifizierten Proteine die zytoprotektive Wirkung von Zellextrakt bzw. konditioniertem Medium Camptothecin-behandelter Rat1-Fibroblasten vermitteln könnte, sollten diese drei Proteine zunächst auf Ebene ihres Expressionsmusters, ihrer subzellulären Lokalisation, ihres Molekulargewichtes sowie ihres isoelektrischen Punktes (pI) mit dem im Zellextrakt vorhandenen zellschützenden Protein verglichen werden (Tab. 3.2.10.2). Eine Recherche in der Proteindatenbank Swiss-Prot (<http://au.expasy.org/sprot/sprot-top.html>) ergab, dass alle drei identifizierten Proteine ubiquitär und konstitutiv exprimiert werden, was mit der zelltypunabhängigen Expression des zytoprotektiven Proteins (Abb. 3.2.4) korrelieren würde. Acylpeptidhydrolase (ACPH) und Hsc70 sind als zytosolische Proteine beschrieben, was ebenfalls mit der subzellulären Lokalisation des zellschützenden Proteins (Abb. 3.2.2) übereinstimmen würde. Das Enzym Glutamatdehydrogenase (GDH) hingegen ist ein mitochondriales Matrixprotein mit einem isoelektrischen Punkt von 8,05. Der pI-Wert des zytoprotektiven Proteins hingegen liegt unterhalb von 5,5 (Abb. 3.2.7, Abb. 3.2.9.1) und somit in einem Bereich, in dem auch die isoelektrischen Punkte der beiden Proteine Acylpeptidhydrolase (pI=5,46) und Hsc70 (pI=5,37) liegen. Die Molekulargewichte der drei identifizierten Proteine betragen 81,4kDa (ACPH), 70,9kDa (Hsc70) und 61,4kDa (GDH). Dass diese Proteine während der Gelpermeationschromatographie mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 130-190kDa eluieren, deutet darauf hin, dass sie unter nativen Bedingungen als hochmolekulare Proteinkomplexe vorliegen. Bei dem als Chaperon beschriebenen Hsc70 ist aufgrund seiner Funktion eine Komplexierung mit anderen intrazellulären Proteinen denkbar. Das Enzym ACPH ist als Homotetramer (300kDa), GDH als Homohexamer beschrieben. In beiden Fällen könnte die Elution mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 130-190kDa auf eine in Rat1-Fibroblasten vorliegende dimere Form der ACPH bzw. trimere Form der GDH hindeuten.

Protein	Expression	subzelluläre Lokalisation	Molekulargewicht (native Struktur)	pI
Acylpeptidhydrolase (ACPH) (EC 3.4.19.1)	ubiquitär konstitutiv	Zytosol	Monomer: 81,4 kDa (Homotetramer)	5,46
Hsc70	ubiquitär konstitutiv	Zytosol	Monomer: 70,9 kDa	5,37
Glutamatdehydrogenase (GDH) (EC 1.4.1.3)	ubiquitär konstitutiv	Mitochondrienmatrix	Monomer: 61,4 kDa (Homohexamer)	8,05
zytoprotektives Protein	potentiell ubiquitär	Zytosol	130-190 kDa	< 5,5

Tabelle 3.2.10.2: Vergleich der Eigenschaften der drei identifizierten Proteine mit denen des zytoprotektiven Proteins: Dargestellt sind Expressionsmuster, subzelluläre Lokalisation, Molekulargewicht und native Struktur sowie der isoelektrische Punkt der mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifizierten Proteine Acylpeptidhydrolase (ACPH), Hsc70 und Glutamatdehydrogenase (GDH). Im Vergleich sind die entsprechenden Eigenschaften des zytoprotektiven Proteins angegeben.

Ergebnisse

Das Enzym Acylpeptidhydrolase (EC 3.4.19.1) katalysiert die Hydrolyse von N-terminalen Peptidbindungen in N-acetylierten Peptiden unter Freisetzung einer freien N-acetylierten Aminosäure und eines um eine Aminosäure verkürzten Peptids mit freiem N-Terminus. Es wird vermutet, dass dieses Enzym eine Rolle im Abbau durch N-Acetylierung stabilisierter intrazellulärer Proteine spielt. Das Enzym Acylpeptidhydrolase ist eine Serinpeptidase und wird der Familie der Prolyl oligopeptidasen zugeordnet (Polgar 2002). In der Literatur wird die Acylpeptidhydrolase auch als OPH (oxidized protein hydrolase) bezeichnet, da sie die Eigenschaft besitzt, durch Oxidation modifizierte Proteine wie z.B. Rinderserumalbumin proteolytisch abzubauen (Fujino et al. 2000a, Fujino et al. 2000b). Das Enzym Glutamatdehydrogenase (EC 1.4.1.3) ist Mitglied der Familie von Aminosäuredehydrogenasen und katalysiert die oxidative Deaminierung von Glutamat zu α -Ketoglutarat, wobei freies NH_4^+ entsteht und parallel eine Reduktion von NAD(P)^+ zu NAD(P)H/H^+ erfolgt. Bei niedriger Energieladung der Zelle wird auf diese Weise Glutamat abgebaut, wobei das entstehende α -Ketoglutarat anschließend zur Gewinnung von Stoffwechselenergie im Citratzyklus katabolisiert wird. Hsc70 ist ein Mitglied der Hsp70-Familie von Hitzeschockproteinen (Hsp) und fungiert als intrazelluläres Chaperon. Hitzeschockproteine spielen eine wichtige Rolle in der korrekten Faltung neusynthetisierter Proteine sowie in der Stabilisierung und Funktionserhaltung von Proteinen in thermal- oder oxidativ-gestressten Zellen.

Von den drei identifizierten Proteinen ist ausschließlich für Hsc70 eine extrazelluläre Funktion beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass aus Muskelgewebe präpariertes Hsc70/Hsp70 nach Zugabe in das Kulturmedium eine Differenzierung humaner promonozytärer U-937 Zellen *in vitro* induziert und darüber hinaus einer durch $\text{TNF-}\alpha$ induzierten Apoptose in diesen Zellen entgegenwirkt (Guzhova et al. 1998). In einer weiteren Studie wurde beschrieben, dass Proteine der Hsp70-Familie nach Freisetzung aus nekrotischen Zellen eine partielle Aktivierung und Differenzierung dendritischer Zellen induzieren. Zudem scheinen diese Proteine auch Einfluss auf die zelluläre Genexpression zu haben, da Makrophagen nach Inkubation mit Hsp70 die Zytokine IL-1 β , $\text{TNF-}\alpha$ sowie IL-12 vermehrt sekretieren (Basu et al. 2000). Auch in Mikrogliazellen induziert extrazelluläres Hsp70 die Sekretion der inflammatorischen Zytokine IL-6 und $\text{TNF-}\alpha$ (Kakimura et al. 2002). Bei der Vermittlung der beschriebenen Eigenschaften von extrazellulärem Hsc70/Hsp70 scheinen bestimmte Mitgliedern der Toll-like-Rezeptorfamilie (TLR2, TLR4) eine wichtige Rolle als signaltransduzierende Rezeptoren zu spielen (Kakimura et al. 2002, Dybdahl, et al. 2002, Vabulas et al. 2002a, Asea et al. 2002). Zudem wurden das Protein CD91/LRP (LDL-receptor-related protein) und der Scavenger-Rezeptor LOX-1 als Endozytoserezeptoren für extrazelluläres Hsp70 beschrieben (Basu et al. 2001, Delneste et al. 2002). Eine extrazelluläre Funktion der beiden anderen identifizierten Proteine, Acylpeptidhydrolase und Glutamatdehydrogenase, ist nicht beschrieben.

Hinsichtlich ihrer Eigenschaften (Tab. 3.2.10.2) weisen nur Hsc70 und Acylpeptidhydrolase deutliche Gemeinsamkeiten mit dem zytoprotektiven Protein auf. Somit schien es am wahrscheinlichsten, dass eines dieser beiden Proteine an der Inhibierung eines durch Serumentzug induzierten Zelltods kultivierter Rat1-Fibroblasten und möglicherweise auch an der Regulation der ApoJ-Genexpression in diesen Zellen beteiligt ist. Da N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin, das in sämtlichen vorausgehenden

Experimenten dem Kulturmedium als Glutaminsupplement zugesetzt worden war, ein potentielles Substrat für das Enzym Acylpeptidhydrolase darstellt, sollte zunächst überprüft werden, inwiefern dieses N-acetylierte Dipeptid bei Inkubation mit Zellextrakt oder nekrotischen Zellen die Zellvitalität und die Regulation der ApoJ-Genexpression von serumfrei kultivierten Rat1-Fibroblasten beeinflusst.

3.2.11 Einfluss von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin auf die Zellvitalität und einer durch nekrotische Zellen induzierten ApoJ-mRNA-Expression in Rat1-Fibroblasten

3.2.11.1 Die zytoprotektive Wirkung von Zellextrakt auf serumfrei kultivierte Rat1-Fibroblasten ist abhängig von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin

Um zu überprüfen, ob eine mögliche Hydrolyse von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin durch das Enzym Acylpeptidhydrolase die zellschützende Wirkung von Zellextrakt auf serumfrei kultivierte Rat1-Fibroblasten vermittelt, sollte in einem ersten Experiment untersucht werden, ob die in Gegenwart von 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin gezeigten dosisabhängigen zytoprotektiven Eigenschaften von Zellextrakt (Abb. 3.2.1) auch unter glutaminfreien Bedingungen und in Gegenwart von 2mM freiem L-Glutamin (anstatt N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin) zu beobachten sind. In einem weiteren Experiment sollte zudem untersucht werden, ob die zytoprotektive Wirkung von Zellextrakt durch verminderte Konzentrationen N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin im Kulturmedium (< 2mM) limitiert wird.

Hierfür wurden Rat1-Fibroblasten in 96-Loch-Mikrotiterplatten in einem ersten Experiment sowohl in glutaminfreiem Kulturmedium als auch in Medium, dem 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin bzw. 2mM freies L-Glutamin zugesetzt wurde, für 48h unter serumfreien Bedingungen mit Zellextrakt in Konzentrationen von 1×10^5 - 1×10^6 Rat1-Fibroblasten/ml inkubiert. Der verwendete Zellextrakt lag hierbei in glutaminfreiem Kulturmedium vor. Entsprechende Kontrollzellen wurden jeweils ohne Zellextrakt in den verschiedenen serumfreien Medien inkubiert. In einem weiteren Experiment wurden Rat1-Fibroblasten für 48h in serumfreien Kulturmedien mit unterschiedlichen Konzentrationen (0, 40 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M, 1mM, 2mM) an N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin bzw. freiem L-Glutamin sowohl ohne Zellextrakt als auch mit Zellextrakt einer Konzentration von 1×10^6 Rat1-Fibroblasten/ml inkubiert. In beiden Experimenten erfolgte die anschließende Zellvitalitätsbestimmung mit Hilfe des MTS-basierenden Assays.

Wie in Abbildung 3.2.11.1 a zu sehen ist, besitzt Zellextrakt ausschließlich in Gegenwart von 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin die Fähigkeit, ein Absterben serumfrei kultivierter Rat1-Fibroblasten zu verhindern. Diese zytoprotektive Wirkung ist, wie schon unter 3.2.1 gezeigt, abhängig von der eingesetzten Konzentration an Zellextrakt. Unter diesen Bedingungen führt eine 48-stündige Inkubation der Rat1-Fibroblasten mit Zellextrakt von 1×10^6 Zellen/ml zu einer Verdopplung der Anzahl lebender Zellen. Unter glutaminfreien Bedingungen hingegen weisen selbst hohe Konzentrationen an Zellextrakt keine zellschützenden Eigenschaften auf. Für die zytoprotektive Wirkung von Zellextrakt ist somit die Gegenwart des N-acetylierten Dipeptids notwendig. Ist im Kul-

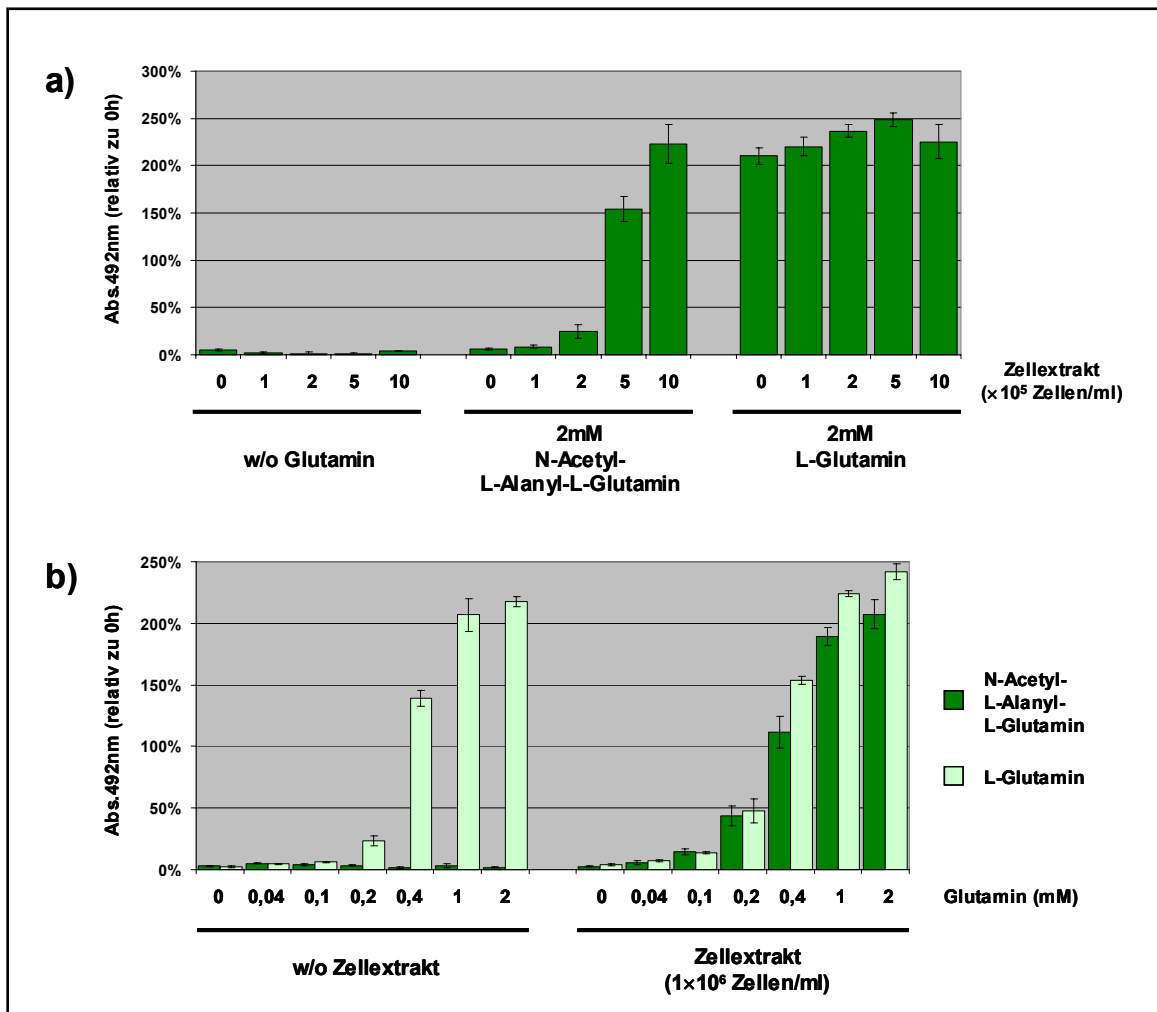


Abbildung 3.2.11.1: Die zytoprotektive Wirkung von Zellextrakt auf serumfrei kultivierte Rat1-Fibroblasten ist abhängig von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin: a) Colorimetrische Bestimmung der Zellvitalität mittels MTS-basierendem Assay von Rat1-Fibroblasten, die für 48h unter serumfreien Bedingungen mit Zellextrakt in Konzentrationen von 1×10^5 – 1×10^6 Rat1-Zellen/ml inkubiert wurden. Die Inkubation erfolgte in glutaminfreiem Kulturmedium (w/o Glutamin) sowie in Kulturmedium, dem 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin bzw. 2mM L-Glutamin zugesetzt war. Alle Werte sind als relative Absorption bezogen auf den zu Beginn des Experimentes ermittelten Ausgangswert (100%, nicht gezeigt) dargestellt (Mittelwert \pm Standardabweichung der Dreifachbestimmung). b) Colorimetrische Bestimmung der Zellvitalität mittels MTS-basierendem Assay von Rat1-Fibroblasten, die für 48h unter serumfreien Bedingungen ohne Zellextrakt (w/o Zellextrakt) bzw. mit Zellextrakt einer Konzentration von 1×10^6 Rat1-Zellen/ml inkubiert wurden. Die Inkubation erfolgte jeweils in glutaminfreiem Kulturmedium sowie in Kulturmedium, dem 40 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M, 1mM oder 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin bzw. L-Glutamin zugesetzt war. Alle Werte sind als relative Absorption bezogen auf den zu Beginn des Experimentes ermittelten Ausgangswert (100%, nicht gezeigt) dargestellt (Mittelwert \pm Standardabweichung der Dreifachbestimmung).

turmedium statt N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin freies L-Glutamin vorhanden, ist ebenfalls kein signifikanter Einfluss von Zellextrakt auf die Lebensfähigkeit serumfrei kultivierter Rat1-Fibroblasten zu erkennen. Unter diesen Bedingungen ist freies L-Glutamin auch in Abwesenheit von Zellextrakt in der Lage, ein Überleben der Zellen zu gewährleisten. Eine 48-stündige Inkubation von Rat1-Zellen mit 2mM L-Glutamin allein führt ähnlich wie die gemeinsame Inkubation mit Zellextrakt (1×10^6 Zellen/m) und 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin im experimentellen Zeitraum von 48h zu einer Verdopplung der Zellzahl. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass der Mechanismus der durch Zellextrakt vermittelten Zytoprotektion auf einer enzymatischen Hydrolyse des N-acetylierten

Dipeptids und der Freisetzung von L-Glutamin beruht. Vergleicht man in Abwesenheit von Zellextrakt den Einfluss beider Glutaminsupplemente auf die Lebensfähigkeit serumfrei kultivierter Rat1-Zellen, so zeigt sich, dass im Gegensatz zu freiem L-Glutamin N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin unter serumfreien Bedingungen scheinbar vollkommen wirkungslos ist.

Auch das Ergebnis des zweiten Experimentes (Abb. 3.2.11.1 b) deutet darauf hin, dass der Mechanismus, der die zellschützende Wirkung von Zellextrakt vermittelt, eine Hydrolyse von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin und die Freisetzung von L-Glutamin umfasst. Bei einer konstanten Konzentration an Zellextrakt (1×10^6 Zellen/m) ist das Ausmaß der zytoprotektiven Wirkung abhängig von der Konzentration an eingesetztem N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin. Geringe Konzentrationen an N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin (100-400 μ M) limitieren diesen Effekt. Zudem entspricht das Ausmaß der zellschützenden Wirkung, das von Zellextrakt in Gegenwart der verschiedenen Konzentrationen an N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin vermittelt wird, in etwa dem der entsprechenden Konzentrationen an freiem L-Glutamin. Wie schon in Abb. 3.2.11.1 a gezeigt, besitzt Zellextrakt in Gegenwart von L-Glutamin keinen deutlichen Einfluss auf die Zellvitalität serumfrei kultivierter Rat1-Fibroblasten. Eine 48-stündige Inkubation in Abwesenheit von Zellextrakt führt unabhängig von der verwendeten Konzentration an N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin bei etwa 95% der Rat1-Zellen zu einem Verlust der Lebensfähigkeit. Dies zeigt deutlich, dass Rat1-Fibroblasten das in Form des N-acetylierten Dipeptids vorliegende L-Glutamin unter serumfreien Bedingungen und in Abwesenheit von Zellextrakt nicht verwerten können.

3.2.11.2 Einfluss von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin auf die durch nekrotische Zellen induzierte ApoJ-mRNA-Expression in Rat1-Fibroblasten

Die Charakterisierung der durch Zellextrakt induzierten ApoJ-Genaktivität und Zytoprotektion zeigt, dass beide Effekte durch Faktoren vermittelt werden, die hinsichtlich ihrer Eigenschaften (Molekulargewicht, isoelektrischer Punkt, Expressionsmuster, subzelluläre Lokalisation, Freisetzung aus primär und sekundär nekrotischen Zellen) große Ähnlichkeiten aufweisen. Da sich die zellschützende Eigenschaft von Zellextrakt scheinbar auf eine durch das Enzym Acylpeptidhydrolase katalysierte Umsetzung des Glutaminsupplements N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin und der damit einhergehenden Freisetzung von L-Glutamin zurückführen lässt, stellte sich die Frage, ob bzw. zu welchem Anteil diese enzymatische Reaktion für die durch nekrotische Zellen induzierte Akkumulation von ApoJ-mRNA in Rat1-Fibroblasten verantwortlich ist. Zudem sollte überprüft werden, ob das unter der Bezeichnung Glutamax (Invitrogen) kommerziell erhältliche stabile Glutaminsupplement L-Alanyl-L-Glutamin ähnlichen Einfluss auf Zellvitalität und ApoJ-Regulation kultivierter Rat1-Fibroblasten besitzt wie N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin. Weiterhin sollten die Experimente sowohl unter serumfreien Bedingungen als auch in Gegenwart von 5% FKS durchgeführt werden, um unter den verschiedenen Bedingungen den Einfluss von Serum auf die ApoJ-Regulation und Vitalität von kultivierter Rat1-Fibroblasten zu erfassen.

Hierzu wurden Rat1-Fibroblasten für 48h jeweils in glutaminfreiem Kulturmedium sowie in Gegenwart von 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin, 2mM L-Alanyl-L-Glutamin (Glutamax) oder 2mM

Ergebnisse

L-Glutamin mit 5×10^6 primär nekrotischen Rat1-Fibroblasten bzw. ohne nekrotische Zellen in einem Gesamtvolumen von 10ml inkubiert. Das Experiment wurde sowohl unter serumfreien Bedingungen als auch in Gegenwart von 5% FKS durchgeführt. Anschließend wurde der ApoJ-mRNA-Gehalt der lebenden Rat1-Fibroblasten nach Präparation der Gesamt-RNA mittels Northern-Blot-Analyse untersucht. Auf gleiche Weise wurde RNA von Zellen analysiert, die zu Beginn des Experimentes (0h) geerntet wurden. Zur Überprüfung des Einflusses nekrotischer Zellen auf die Vitalität der unter verschiedenen Bedingungen kultivierten Rat1-Fibroblasten wurde ein MTS-basierender Zellvitalitätsassay durchgeführt. Hierzu wurden Rat1-Fibroblasten in 96-Loch-Mikrotiterplatten für 48h mit 5×10^4 primär nekrotischen Rat1-Fibroblasten bzw. ohne nekrotische Zellen in einem Gesamtvolumen von 100 μ l inkubiert. Das Experiment wurde unter serumfreien Bedingungen bzw. in Gegenwart von 5% FKS jeweils in glutaminfreiem Kulturmedium sowie in Kulturmedium, dem zuvor 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin, 2mM L-Alanyl-L-Glutamin (Glutamax) oder 2mM L-Glutamin zugesetzt wurde, durchgeführt. Die colorimetrische Zellvitalitätsbestimmung erfolgte anschließend wie unter 2.2.1.7 beschrieben.

Verglichen mit entsprechenden Kontrollen (-nekrotische Zellen) führt unter serumfreien Bedingungen die Inkubation mit primär nekrotischen Zellen unabhängig von der Art des verwendeten Glutaminsupplements zu einer Induktion der ApoJ-mRNA-Expression in Rat1-Fibroblasten (Abb. 3.2.11.2 a, b). Hierfür scheint jedoch die Gegenwart von Glutamin notwendig zu sein, da unter glutaminfreien Bedingungen keine deutliche, durch nekrotische Zellen induzierte Akkumulation von ApoJ-mRNA in den Zellen zu erkennen ist. Im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen wird unter serumfreien Bedingungen jedoch das Ausmaß der durch nekrotische Zellen induzierten ApoJ-mRNA-Akkumulation die verschiedenen Glutaminsupplemente beeinflusst. Die Inkubation mit nekrotischen Zellen führt in Gegenwart von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin zu einer relativen Erhöhung der zellulären ApoJ-mRNA-Menge um Faktor 4,8. Unter Verwendung von L-Alanyl-L-Glutamin bzw. L-Glutamin kommt es hingegen nur zu einer relativen ApoJ-mRNA-Akkumulation um Faktor 1,8 bzw. 2,0. Grund hierfür ist der Einfluss der einzelnen Glutaminsupplemente auf die zeitliche ApoJ-mRNA-Regulation in den entsprechenden serumfrei kultivierten Kontrollzellen. Während das Verhältnis der mRNA-Mengen von ApoJ und GAPDH in Gegenwart des N-acetylierten Dipeptids ähnlich wie unter glutaminfreien Bedingungen über den experimentellen Zeitraum von 48h nahezu konstant bleibt, führt allein die serumfreie Kultivierung in Gegenwart von L-Alanyl-L-Glutamin bzw. L-Glutamin zu einem Anstieg der zellulären ApoJ-mRNA-Menge um Faktor 3,1-3,8. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass sich die durch nekrotische Zellen induzierte Akkumulation der ApoJ-mRNA unter serumfreien Bedingungen unter Verwendung von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminersatz auf zwei unterschiedliche Mechanismen zurückführen lässt. Zum einen scheint eine durch das Enzym Acylpeptidhydrolase katalysierte Umsetzung des N-acetylierten Dipeptids eine Rolle zu spielen, wobei das freigesetzte L-Glutamin schließlich eine Akkumulation der ApoJ-mRNA induziert. Zum anderen scheinen jedoch noch weitere Faktoren nekrotischer Zellen, unabhängig von der Art des verwendeten Glutaminsupplements die Expression von ApoJ-mRNA in Rat1-Zellen zu erhöhen.

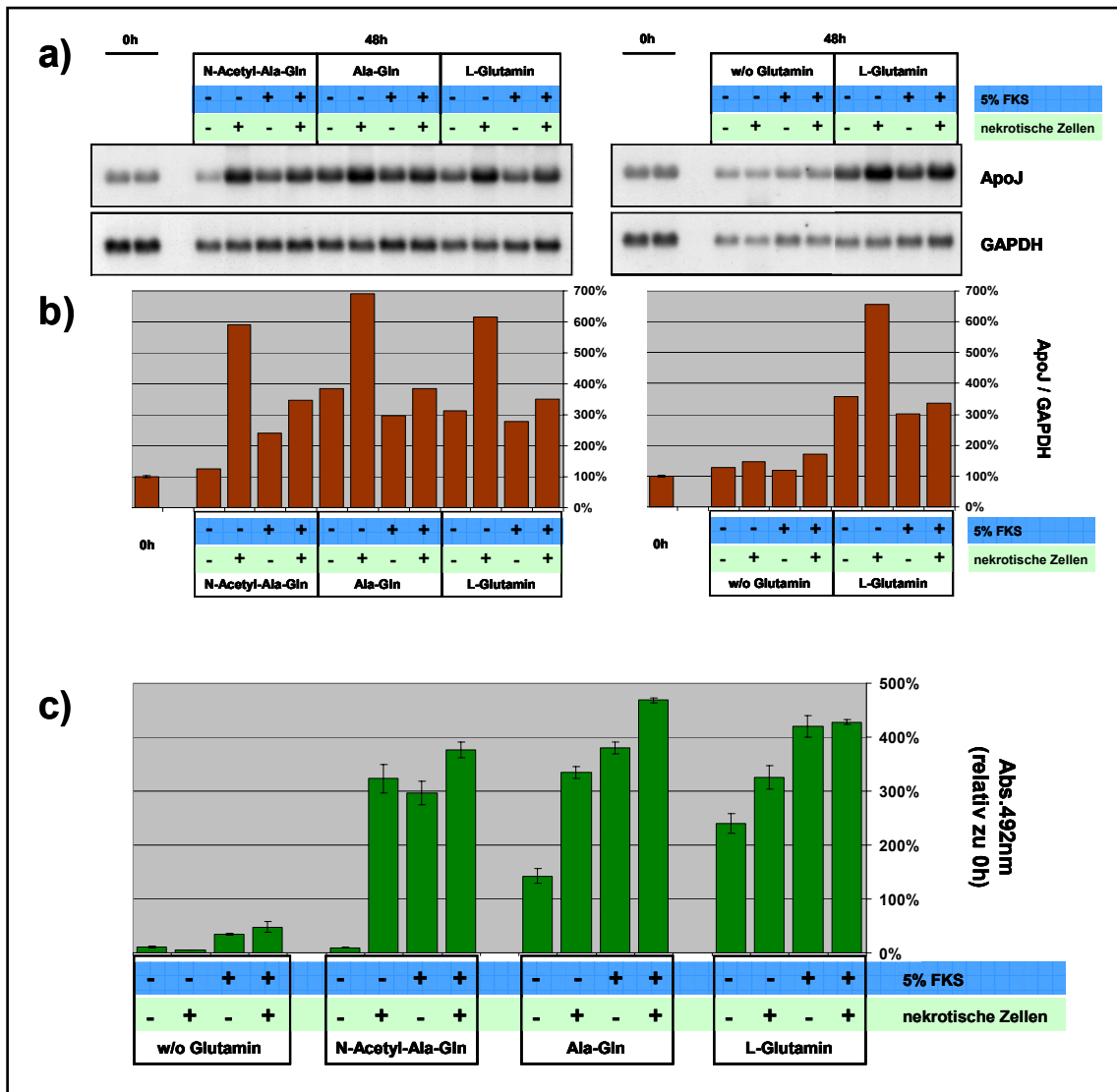


Abbildung 3.2.11.2: Einfluss verschiedener Kulturbedingungen auf Zellvitalität und Induktion der ApoJ-mRNA-Expression in Rat1-Fibroblasten bei Inkubation mit nekrotischen Zellen: a) Northern-Blot-Analyse von 15µg Gesamt-RNA aus Rat1-Fibroblasten zu Beginn des Experimentes (0h) und nach Inkubation für 48h ohne (-) bzw. mit (+) 5×10^6 primär nekrotischen Rat1-Zellen. Das Experiment wurde sowohl unter serumfreien (-) Bedingungen als auch in Gegenwart von 5% FKS (+) jeweils in glutaminfreiem Kulturmedium (w/o Glutamin) sowie in Gegenwart von 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin, 2mM L-Alanyl-L-Glutamin (Glutamax) oder 2mM L-Glutamin durchgeführt. b) Densitometrische Auswertung der Northern-Blot-Analyse aus a). Die Intensitäten der ApoJ-Banden wurden zu den Intensitäten der entsprechenden GAPDH-Banden ins Verhältnis gesetzt und sind als relatives Verhältnis bezogen auf den Wert zu Beginn des Experimentes (0h) dargestellt. Dieser Kontrollwert (0h) wurde durch eine Zweifachbestimmung ermittelt (Mittelwert \pm Standardabweichung der Zweifachbestimmung) c) Colorimetrische Bestimmung der Zellvitalität mittels MTS-basierendem Assay von Rat1-Fibroblasten, die für 48h ohne (-) bzw. mit (+) 5×10^4 primär nekrotischen Rat1-Zellen inkubiert wurden. Das Experiment wurde sowohl unter serumfreien (-) Bedingungen als auch in Gegenwart von 5% FKS (+) jeweils in glutaminfreiem Kulturmedium (w/o Glutamin) sowie in Gegenwart von 2mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin, 2mM L-Alanyl-L-Glutamin (Glutamax) oder 2mM L-Glutamin durchgeführt. Alle Werte sind als relative Absorption bezogen auf den zu Beginn des Experimentes ermittelten Ausgangswert (100%, nicht gezeigt) dargestellt (Mittelwert \pm Standardabweichung der Dreifachbestimmung).

Hierfür ist jedoch die Gegenwart von Glutamin notwendig. Weiterhin zeigt dieses Experiment, dass Serum in Gegenwart von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin, L-Alanyl-L-Glutamin und L-Glutamin die ApoJ-induzierende Wirkung nekrotischer Zellen inhibiert.

Ergebnisse

Eine Untersuchung des Einflusses verschiedener Kulturbedingungen auf die Vitalität der Rat1-Fibroblasten zeigt, dass nekrotische Zellen nur unter serumfreien Bedingungen und bei Verwendung von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminsupplement das Absterben der Zellen verhindern können (Abb. 3.2.11.2 c). Dieser Effekt lässt sich vermutlich auf die Umsetzung des N-acetylierten Dipeptids durch das Enzym Acylpeptidhydrolase und der daraus resultierenden Freisetzung von L-Glutamin zurückführen. Bestätigt wird diese Annahme zum einen dadurch, dass unter glutaminfreien Bedingungen eine zytoprotektive Wirkung nekrotischer Zellen nicht zu beobachten ist. Zum anderen bestätigt sich, dass unter serumfreien Bedingungen allein die Gegenwart von L-Glutamin ein Überleben der Rat1-Zellen ermöglicht. Die Wirkung nekrotischer Zellen reduziert sich unter diesen Bedingungen auf einen schwachen proliferativen Effekt. Relativ zur entsprechenden serumfreien Kontrolle ist jedoch in Gegenwart von L-Alanyl-L-Glutamin (Glutamax) eine deutlich stärkere proliferative Wirkung nekrotischer Zellen zu erkennen, was vermuten lässt, dass es unter diesen Bedingungen auch zu einer Hydrolyse des nicht-acetylierten Dipeptids und somit ebenfalls zu einer Freisetzung von L-Glutamin kommt. Wie weitere Experimente zeigten, scheinen die entsprechenden Enzyme ähnlich wie das Enzym Acylpeptidhydrolase während einer Inkubation mit Camptothecin passiv aus sekundär nekrotischen (postapoptotischen) Rat1-Fibroblasten freigesetzt zu werden. Der isoelektrische Punkt dieser unbekanntenen Hydrolasen unterscheidet sich jedoch deutlich von dem der Acylpeptidhydrolase, da diese Enzyme im Gegensatz zur Acylpeptidhydrolase bei einer Anionenaustauscherchromatographie von Zellextrakt unter sauren Bedingungen (pH 5,5) nicht an das Säulenmaterial binden (ohne Abb.). Die extrazelluläre Hydrolyse von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin und L-Alanyl-L-Glutamin in Gegenwart nekrotischer Zellen scheint somit durch unterschiedliche Enzyme katalysiert zu werden, wobei die Umsetzung des N-acetylierten Dipeptids spezifisch durch das Enzym Acylpeptidhydrolase vermittelt zu werden scheint. Vergleicht man in Abwesenheit nekrotischer Zellen den Einfluss der verschiedenen Glutaminsupplemente auf die Lebensfähigkeit serumfrei kultivierter Rat1-Fibroblasten, zeigt sich, dass sich diese in ihrer Wirkung stark voneinander unterscheiden. Bei Kultivierung mit N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin (Biochrom) kommt es wie unter glutaminfreien Bedingungen zu einem Absterben von etwa 90% der Zellen, was darauf hindeutet, dass die Zellen das in Form des N-acetylierten Dipeptids vorliegende L-Glutamin nicht verwerten können. Wird dieses Dipeptid hingegen in nicht-acetylierter Form als L-Alanyl-L-Glutamin (Glutamax, Invitrogen) eingesetzt, sind die Zellen scheinbar in der Lage, ihren Bedarf an L-Glutamin zu decken und unter serumfreien Bedingungen zu überleben. Die Zugabe von freiem L-Glutamin führt darüber hinaus zur Proliferation der Rat1-Fibroblasten unter serumfreien Bedingungen. In Gegenwart von Serum unterscheiden sich die drei Glutaminsupplemente hingegen kaum in ihrer Wirkung. In allen drei Fällen führt die Inkubation mit 5% FKS zu einer deutlichen Proliferation der Zellen, was über einen Zeitraum von 48h zu einer Zunahme der Zellzahl um Faktor 3-4 führt. Für eine effektive Verwertung des L-Glutamins in Form beider Dipeptide scheint somit die Gegenwart von Serum notwendig zu sein. Dass die zellschützende Wirkung von Serum unter glutaminfreien Bedingungen deutlich schwächer ist als die von 2mM L-Glutamin unter serumfreien Bedingungen, lässt zudem vermuten, dass sich das unter Verwendung von N-Acetyl-L-Alanyl-L-

Glutamin beschriebene Absterben der Rat1-Fibroblasten nach Serumentzug primär auf einen Glutaminmangel zurückführen lässt.

Vergleicht man den Einfluss verschiedener Kulturbedingungen auf die Regulation des ApoJ-Gens und die Vitalität der Rat1-Fibroblasten, ist zu erkennen, dass unter Bedingungen, die zu einem Absterben der Zellen führen, das Verhältnis der mRNA-Mengen von ApoJ und GAPDH konstant bleibt. Hierbei ist anzumerken, dass für die Northern-Blot-Analysen nur die überlebenden adhären Zellen der entsprechenden Ansätze verwendet wurden, so dass eine Beeinflussung der ApoJ-mRNA-Bestimmungen durch abgestorbene Zellen weitestgehend ausgeschlossen werden kann. Kulturbedingungen, die ein Überleben der Rat1-Fibroblasten ermöglichen, führen hingegen über einen Zeitraum von 48h zu einer Akkumulation von ApoJ-mRNA in den Zellen. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieses Experimentes darauf hin, dass eine Hydrolyse des Glutaminersatzes N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin durch das Enzym Acylpeptidhydrolase unter Freisetzung von L-Glutamin nicht nur die unter serumfreien Bedingungen beschriebenen zellschützenden Eigenschaften nekrotischer Zellen vermittelt sondern auch zum Teil deren ApoJ-induzierende Wirkung.

3.2.12 Zusammenfassung

Die Charakterisierung ApoJ-induzierender und zytoprotektiver Komponenten aus Zellextrakt zeigte, dass beide Effekte durch hitzelabile und im Zytosol lebender Zellen lokalisierte Faktoren vermittelt werden, die unter nativen Bedingungen ein Molekulargewicht von etwa 130-190kDa besitzen, eine negative Nettoladung aufweisen ($pI < 5,5$), unter reduzierenden Bedingungen stabil sind und in Zellextrakten aller verwendeten Zelllinien vorhanden sind. Die Wirkungsweise dieser Komponenten unterliegt keinen speziesspezifischen Restriktionen. Zudem zeigte sich, dass diese Faktoren im Verlauf einer durch Camptothecin induzierten Apoptose passiv aus sekundär nekrotischen Rat1-Fibroblasten freigesetzt werden. Dass die ApoJ-induzierenden und zytoprotektiven Faktoren nahezu identische physiochemische Eigenschaften aufweisen, deutet darauf hin, dass beide Effekte durch dieselben Komponenten induziert werden. Mit Hilfe eines tryptischen Verdaus konnte anschließend gezeigt werden, dass zumindest die zytoprotektive Wirkung von Zellextrakt durch Proteine oder proteinassoziierte Faktoren vermittelt wird.

In weiterführenden Experimenten wurde das zytoprotektiv wirksame Protein mittels Anionenaustauscherchromatographie und Gelpermeationschromatographie aus konditioniertem Medium Camptothecin-behandelter Rat1-Fibroblasten partiell gereinigt. Nach Polyacrylamidgelelektrophorese konnten drei Proteinbanden, die mit den zellschützenden Eigenschaften entsprechender Fraktionen korrelierten, mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie als Acylpeptidhydrolase, Hsc70 und Glutamatdehydrogenase identifiziert werden. Eine anschließende Überprüfung des Einflusses des stabilen Glutaminsupplements N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin auf die Zellvitalität serumfrei kultivierter Rat1-Fibroblasten zeigte, dass Zellextrakt ausschließlich in Gegenwart von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin zytoprotektive Eigenschaften besitzt. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass sich die zellschützenden Eigenschaften von Zellextrakt und

Ergebnisse

nekrotischen Zellen nahezu vollständig auf das Enzym Acylpeptidhydrolase zurückführen lassen. Zudem scheint dieses Enzym zumindest teilweise an der durch nekrotische Zellen induzierten Erhöhung der ApoJ-Genaktivität in vitalen Rat1-Zellen beteiligt zu sein. Der Mechanismus lässt sich vermutlich auf eine Hydrolyse des im Kulturmedium enthaltenen stabilen Glutaminersatzes N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin zu N-Acetyl-L-Alanin und L-Glutamin zurückführen. Entstehendes freies L-Glutamin ermöglicht das Überleben der Zellen und führt somit zu einer Akkumulation von ApoJ-mRNA in Rat1-Fibroblasten. In Abwesenheit von Zellextrakt oder nekrotischen Zellen scheinen serumfrei kultivierte Rat1-Fibroblasten nicht in der Lage zu sein, das in Form des N-acetylierten Dipeptids vorliegende L-Glutamin zu verwerten. Dass auch unter Verwendung von freiem L-Glutamin die Inkubation mit nekrotischen Zellen zu einer Induktion der ApoJ-mRNA-Expression in lebenden Rat1-Fibroblasten führt, zeigt deutlich, dass nekrotische Zellen noch weitere Faktoren enthalten, die in der Lage sind, eine Induktion der ApoJ-mRNA-Expression in lebenden Zellen zu vermitteln. Für deren ApoJ-induzierende Wirkung ist jedoch die Gegenwart von L-Glutamin notwendig. Diese glutaminabhängige Wirkungsweise scheint sich jedoch nicht allein darauf zurückführen zu lassen, dass L-Glutamin für die Erhaltung der Zellvitalität notwendig ist. Wie in weiteren Experimenten gezeigt werden konnte, sind unter glutaminfreien Bedingungen auch nicht-essentielle Aminosäuren (NEA) in der Lage, ein Überleben serumfrei kultivierter Rat1-Fibroblasten zu gewährleisten. Unter diesen Bedingungen kommt es, ähnlich wie in Gegenwart von L-Glutamin, innerhalb von 48h zu einer Akkumulation von ApoJ-mRNA um Faktor 3,5. Die Inkubation mit nekrotischen Zellen führt in Gegenwart nicht-essentieller Aminosäuren jedoch zu keiner verstärkten ApoJ-mRNA-Expression (ohne Abb.).

Zusammenfassend zeigt Abbildung 3.2.12 den hypothetischen Mechanismus, der unter Verwendung von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin die zytoprotektiven und ApoJ-induzierenden Eigenschaften nekrotischer Zellen vermittelt. Im Verlauf der Fraktionierung nekrotischer Zellen und der partiellen Reinigung zytoprotektiver und ApoJ-induzierender Komponenten scheint es zu einer Trennung des Enzyms Acylpeptidhydrolase von weiteren ApoJ-induzierenden Faktoren gekommen zu sein. Aufgrund der glutaminabhängigen Wirkungsweise dieser Komponenten war jedoch nicht möglich, deren ApoJ-induzierende Eigenschaften in Abwesenheit des Enzyms Acylpeptidhydrolase zu erfassen.

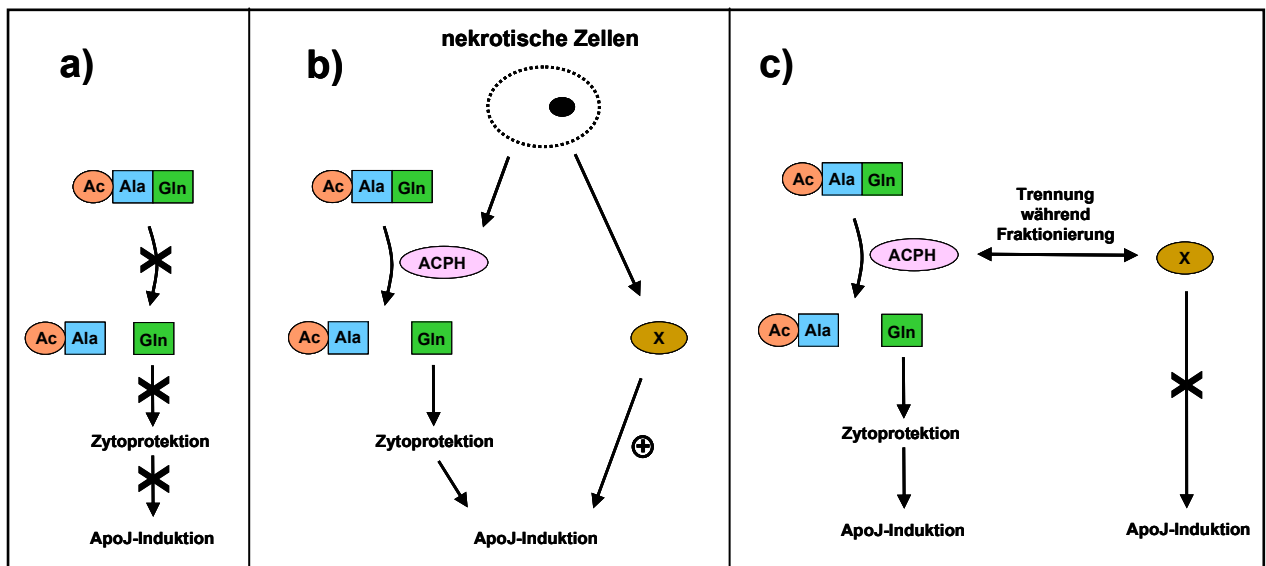


Abbildung 3.2.12: Hypothetischer Mechanismus der durch nekrotische Zellen vermittelten Zytoprotektion und ApoJ-Induktion in Gegenwart von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin: **a)** Unter serumfreien Bedingungen und in Abwesenheit nekrotischer Zellen erfolgt keine extrazelluläre Hydrolyse des stabilen Glutaminsupplements N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin (Ac-Ala-Gln). Dies hat zur Folge, dass serumfrei kultivierte Rat1-Fibroblasten aufgrund eines Mangels an verfügbarem freiem L-Glutamin absterben. Zudem bleibt der Gehalt an zellulärer ApoJ-mRNA unter diesen Bedingungen über einen Zeitraum von 48h nahezu konstant. **b)** Die passive Freisetzung des zytosolischen Enzyms Acylpeptidhydrolase (ACPH) aus nekrotischen Zellen katalysiert die extrazelluläre Hydrolyse von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin (Ac-Ala-Gln) zu N-Acetyl-L-Alanin (Ac-Ala) und freiem L-Glutamin (Gln). Dieses ist in der Lage, ein Überleben serumfrei kultivierter Rat1-Fibroblasten zu ermöglichen (Zytoprotektion). Als Folge hiervon kommt es zu einem Anstieg des zellulären ApoJ-mRNA-Gehaltes (ApoJ-Induktion). Nekrotische Zellen induzieren jedoch in glutaminabhängiger Weise durch weitere freigesetzte oder membranassoziierte Faktoren (X) eine zusätzliche Akkumulation von ApoJ-mRNA in vitalen Rat1-Zellen (+). **c)** Im Verlauf der Fraktionierung nekrotischer Zellen und der partiellen Reinigung zytoprotektiver Faktoren wurden Acylpeptidhydrolase und diese unbekanntes ApoJ-induzierende Faktoren voneinander getrennt. Dies hatte zur Folge, dass ausschließlich die acylpeptidhydrolase-vermittelte Zytoprotektion und ApoJ-Induktion erfasst wurden. Bei Inkubation mit acylpeptidhydrolase-freien Fraktionen erfolgte keine extrazelluläre Hydrolyse des im Kulturmedium vorhandenen N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamins. In Abwesenheit von L-Glutamin waren die unbekanntes Faktoren (X) nicht in der Lage, die ApoJ-mRNA-Expression in serumfrei kultivierten Rat1-Fibroblasten zu induzieren. Ac: Acetyl-Gruppe, Ala: L-Alanin, Gln: L-Glutamin, ACPH: Acylpeptidhydrolase, X: membranassoziierte oder freigesetzte ApoJ-induzierende Faktoren nekrotischer Zellen

3.3 Charakterisierung einer durch nekrotischen Zellen induzierten ApoJ-mRNA-Expression in vitalen Zellen in Gegenwart von L-Glutamin

Die im vorausgehenden Abschnitt (3.2) dargestellten Ergebnisse sind ein deutlicher Hinweis darauf, dass in Gegenwart von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin eine durch nekrotische Zellen induzierte ApoJ-mRNA-Expression in serumfrei kultivierten Rat1-Fibroblasten zum Teil auf eine acylpeptidhydrolase-katalysierte Spaltung des im Kulturmedium vorhandenen acetylierten Dipeptids und der Freisetzung von L-Glutamin zurückzuführen ist. Dieser Mechanismus scheint jedoch physiologisch irrelevant zu sein. Dass die Inkubation mit nekrotischen Zellen auch unter Verwendung von L-Glutamin eine Akkumulation von ApoJ-mRNA induziert, deutet darauf hin, dass noch weitere bislang uncharakterisierte Komponenten nekrotischer Zellen an der Regulation der ApoJ-Genaktivität in serumfrei kultivierten Rat1-Fibroblasten beteiligt sind. Um nähere Informationen über die Eigenschaften dieser Faktoren zu erhalten, war es notwendig, unter Verwendung von freiem L-Glutamin als Kulturmedienzusatz eine durch nekrotische Zellen induzierte Regulation der ApoJ-mRNA-Expression erneut zu charakterisieren.

3.3.1 Die Induktion der ApoJ-mRNA-Expression in vitalen Rat1-Fibroblasten durch nekrotische Zellen ist dosisabhängig

Um eine Abhängigkeit des Ausmaßes der ApoJ-mRNA-Expression von der eingesetzten Menge an nekrotischen Zellen zu überprüfen sowie die für eine ApoJ-Induktion notwendige Menge an nekrotischen Zellen zu ermitteln, wurden Rat1-Fibroblasten für 48h unter serumfreien Bedingungen und in Gegenwart von 2mM L-Glutamin mit 2×10^5 - 8×10^6 primär nekrotischen Rat1-Fibroblasten in einem Gesamtvolumen von 10ml inkubiert. Anschließend wurde der ApoJ-mRNA-Gehalt der lebenden Rat1-Fibroblasten nach Präparation der Gesamt-RNA mittels Northern-Blot-Analyse untersucht. Durch Hybridisierung mit einer MMP-3-spezifischen cDNA-Sonde wurde zudem untersucht, ob die Inkubation mit nekrotischen Zellen eine Transkription des Matrix-Metalloproteinase-3-Gens (MMP-3, Stromelysin-1) in vitalen Rat1-Fibroblasten induziert. Dieses Enzym wird von Fibroblasten exprimiert und u.a. in verletzten Geweben vermehrt synthetisiert (Henney et al. 1991, Galis et al. 1994, Madlener 1998, Cursio et al. 2001). Es katalysiert den proteolytischen Abbau verschiedener Komponenten der extrazellulären Matrix und spielt eine wichtige Rolle bei inflammatorischen und geweberegenerativen Prozessen (Chin et al. 1985, Wilhelm et al. 1987, Bullard et al. 1999, Wang et al. 1999). Zudem konnte gezeigt werden, dass bei Inkubation mit nekrotischen Zellen die MMP-3-Genexpression in embryonalen Mausfibroblasten in NF- κ B-abhängiger Weise induziert wird (Li et al. 2001). Eine Analyse der MMP-3-mRNA-Expression diente in erster Linie als Kontrolle, um die von Li et al. beschriebene Modulation der zellulären Genexpression durch nekrotische Zellen in dem hier verwendeten Zellsystem embryonaler Rattenfibroblasten zu überprüfen.

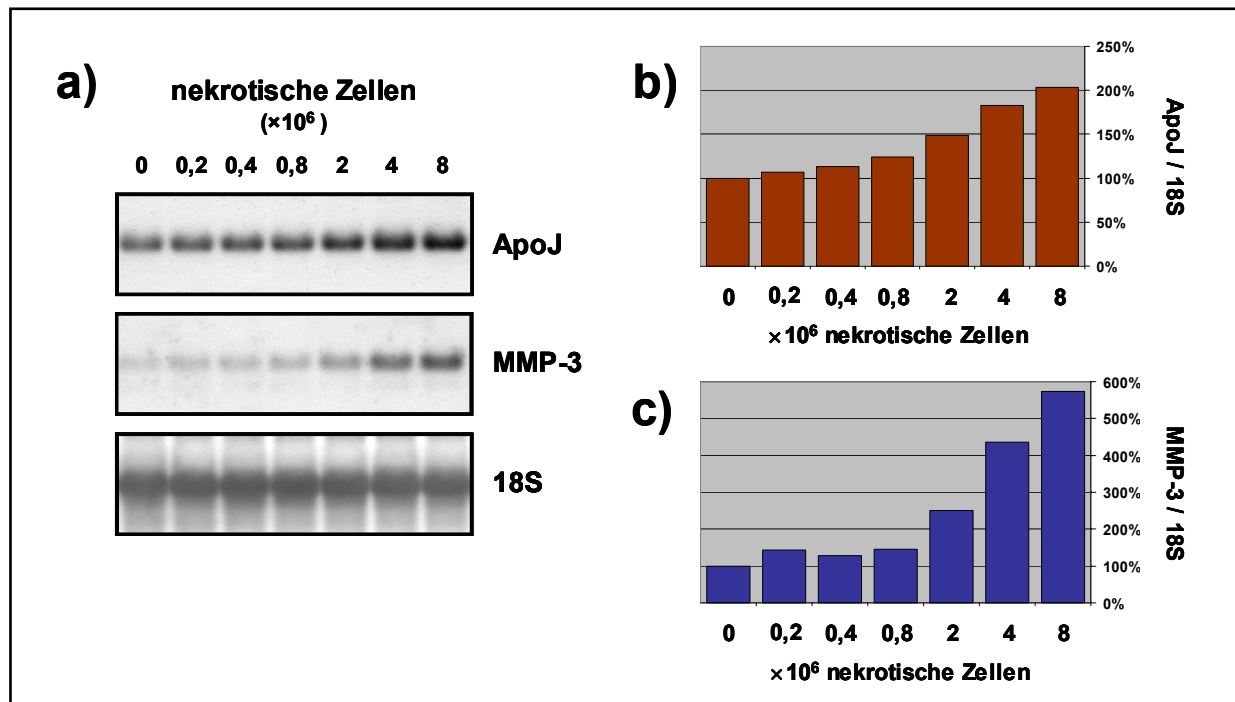


Abbildung 3.3.1: Die Induktion der ApoJ- und MMP-3-mRNA-Expression in vitalen Rat1-Fibroblasten durch nekrotische Zellen ist dosisabhängig: a) Northern-Blot-Analyse von 15µg Gesamt-RNA aus Rat1-Fibroblasten, die für 48h unter serumfreien Bedingungen mit 2×10^5 - 8×10^6 primär nekrotischen Rat1-Zellen inkubiert wurden. Kontrollzellen wurden mit serumfreiem Medium allein inkubiert (0). Das Zellkulturmedium enthielt 2mM L-Glutamin. b+c) Densitometrische Auswertung der Northern-Blot-Analyse aus a). Die Intensitäten der ApoJ- (b) bzw. MMP-3-Banden (c) wurden zu den Intensitäten der entsprechenden 18S-Banden ins Verhältnis gesetzt und sind als relatives Verhältnis bezogen auf den Wert der Kontrolle (0) dargestellt.

Wie Abbildung 3.3.1 zeigt, führt die Inkubation mit nekrotischen Zellen in Rat1-Fibroblasten sowohl zu einer Akkumulation von ApoJ-mRNA als auch zu einer vermehrten Expression von MMP-3-mRNA, was die von Li et al. beschriebene Induktion der MMP-3-Genexpression in murinen Fibroblasten bei Inkubation mit nekrotischen Zellen bestätigt (Li et al. 2001). Dies zeigt deutlich, dass sich das in veröffentlichter Studie verwendete Zellsystem embryonaler Mausfibroblasten zumindest auf Ebene der durch nekrotische Zellen induzierten MMP-3-Regulation mit dem in vorliegender Arbeit verwendeten Zellsystem embryonaler Rattenfibroblasten vergleichen lässt. Wie Abbildung 3.3.1 auch zeigt, wird hierbei die transkriptionelle Aktivität des MMP-3-Gens deutlich stärker induziert als die des ApoJ-Gens. Die Inkubation mit 8×10^6 nekrotischen Zellen führt zu einem Anstieg der mRNA-Mengen um Faktor 2 (ApoJ) und Faktor 5,7 (MMP-3). Zudem zeigt dieses Experiment, dass eine durch nekrotische Zellen induzierte transkriptionelle Regulation beider Gene dosisabhängig ist. Für eine deutliche Akkumulation von ApoJ- und MMP-3-mRNA ist eine Inkubation mit mindestens 2×10^6 nekrotischen Zellen notwendig. Um eine deutliche ApoJ-mRNA-Expression zu induzieren, scheint in Gegenwart von L-Glutamin eine vierfach höhere Menge an nekrotischen Zellen notwendig zu sein als unter Verwendung von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin (Abb. 3.2.1). Wie in parallelen Experimenten unserer Arbeitsgruppe mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung ApoJ-spezifischer Antikörper gezeigt werden konnte, führt die Inkubation serumfrei kultivierter Rat1-Fibroblasten mit 1×10^7 primär nekrotischen Zellen nach 48h zu einem um Faktor 2 erhöhten ApoJ-

Gehalt im Kulturmedium (M. Schwarz, unveröffentlicht). Dies zeigt deutlich, dass nekrotische Zellen neben einer Akkumulation von ApoJ-mRNA auch eine vermehrte Synthese und Sekretion des reifen Proteins induzieren.

3.3.2 Die Induktion der ApoJ-mRNA-Expression in vitalen Rat1-Fibroblasten wird durch sedimentierbare und lösliche Faktoren nekrotischer Zellen vermittelt

Um nähere Informationen darüber zu erhalten, ob die Induktion der ApoJ-Genaktivität in Gegenwart von L-Glutamin durch sedimentierbare oder lösliche Faktoren nekrotischer Zellen vermittelt wird, wurden primär nekrotische Rat1-Fibroblasten (1×10^7 Zellen/ml) zunächst für 60min bei $14.000 \times g$ zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde anschließend für 60min bei $100.000 \times g$ nochmals zentrifugiert. Um zu untersuchen, ob sich etwaige lösliche ApoJ-induzierende Komponenten mit Hilfe geeigneter Ultrafiltermembranen gegebenenfalls für eine weiterführende Fraktionierung konzentrieren lassen, wurde der gewonnene $100.000 \times g$ Überstand ultrafiltriert (MWCO 30kDa). Sämtliche Fraktionen ($14.000 \times g$ Pellet, $14.000 \times g$ Überstand, $100.000 \times g$ Überstand, Durchfluss und Rückstand der Ultrafiltration) wurden anschließend getrennt voneinander für eine 48-stündige Inkubation mit Rat1-Fibroblasten in serumfreiem Kulturmedium (2mM L-Glutamin) eingesetzt. Um einen potentiellen Verlust ApoJ-induzierender Faktoren während der Ultrafiltration zu erfassen, wurden Durchfluss und Rückstand in einem weiteren Ansatz zusammen eingesetzt. Anschließend wurde sowohl der ApoJ-mRNA-Gehalt als auch der MMP-3-mRNA-Gehalt der lebenden Rat1-Fibroblasten nach Präparation der Gesamt-RNA mittels Northern-Blot-Analyse untersucht. Die ApoJ- bzw. MMP-3-induzierenden Eigenschaften aller eingesetzten Fraktionen wurden jeweils durch eine Zweifachbestimmung ermittelt.

Während unter serumfreien Bedingungen und der Verwendung von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin ausschließlich die lösliche Fraktion nekrotischer Zellen ApoJ-induzierende Eigenschaften aufweist (Abb. 3.1.2), wird in Gegenwart von L-Glutamin die Induktion der ApoJ-Genexpression in serumfrei kultivierten Rat1-Fibroblasten sowohl durch lösliche als auch durch sedimentierbare Komponenten nekrotischer Zellen vermittelt (Abb. 3.3.2). Dies zeigt deutlich, dass sich bereits auf Ebene der Fraktionierung nekrotischer Zellen mittels Zentrifugation ApoJ-induzierende Faktoren vom Enzym Acylpeptidhydrolase trennen lassen. Dass nach Ultrafiltration der löslichen Fraktion die vom Filtermaterial zurückgehaltenen Komponenten in Form des Rückstandes (R) zu einer 2-fachen und somit stärkeren Induktion des ApoJ-Gens führen als der Durchfluss (Faktor 1,4), deutet darauf hin, dass der überwiegende Anteil löslicher ApoJ-induzierender Faktoren ein Molekulargewicht $\geq 30kDa$ besitzt bzw. dass diese Faktoren Bestandteile hochmolekularer Komplexe darstellen. Zusammenfassend betrachtet zeigt dieses Experiment jedoch, dass eine mögliche weiterführende Reinigung und Identifizierung der ApoJ-induzierenden Faktoren nekrotischer Zellen aufgrund ihrer Verteilung auf sedimentierbare und lösliche Fraktionen erheblich erschwert werden würde. Im Gegensatz zur ApoJ-Genexpression wird die Induktion der MMP-3-mRNA-Expression durch nekrotische Zellen nahezu ausschließlich durch lösliche Faktoren mit einem Molekulargewicht $\geq 30kDa$ vermittelt.

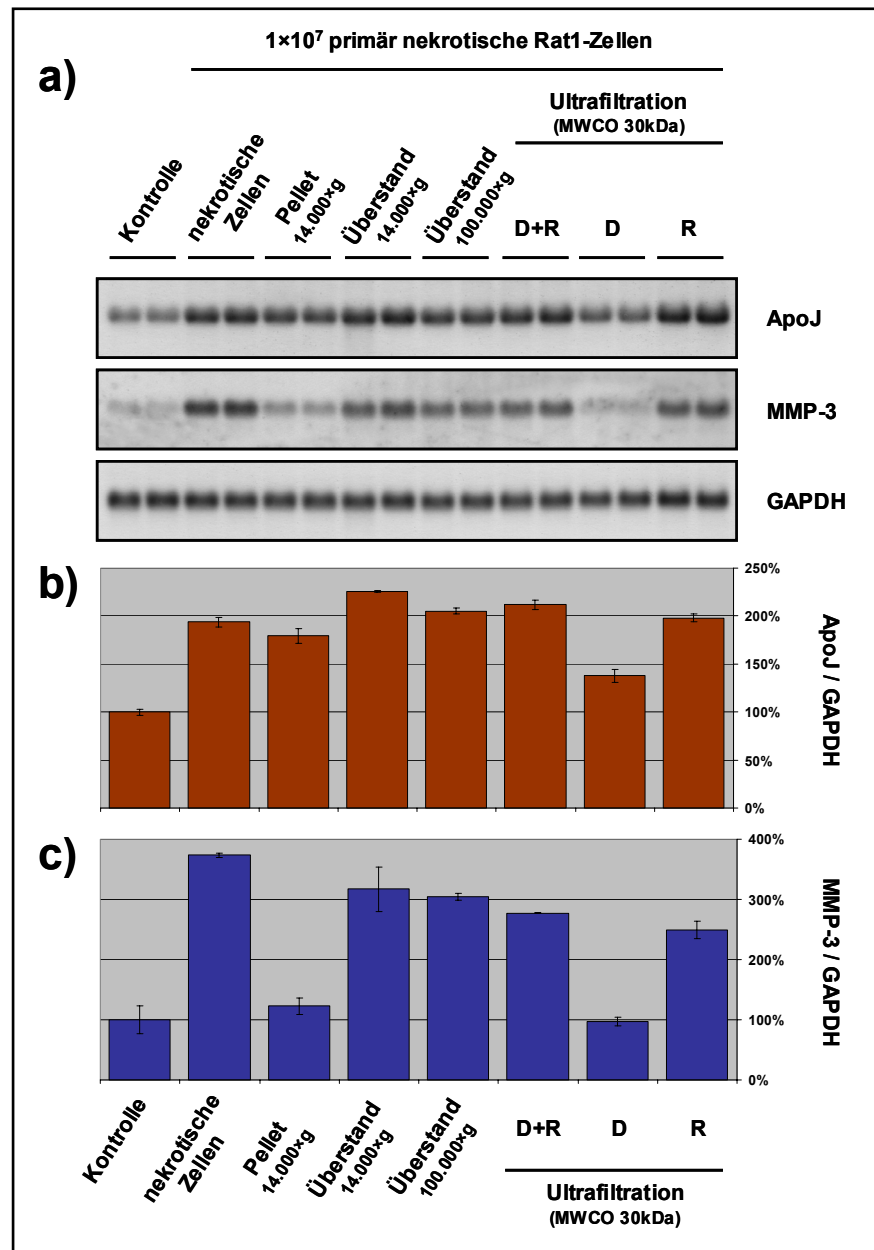


Abbildung 3.3.2: Die Induktion der ApoJ-mRNA-Expression in vitalen Rat1-Fibroblasten wird durch sedimentierbare und lösliche Faktoren nekrotischer Zellen vermittelt: a) Northern-Blot-Analyse von 15µg Gesamt-RNA aus Rat1-Fibroblasten, die für 48h unter serumfreien Bedingungen (2mM L-Glutamin) mit 1×10^7 primär nekrotischen Rat1-Zellen sowie einer entsprechenden Menge an sedimentierbaren (14.000×g Pellet) und löslichen Faktoren (14.000×g Überstand, 100.000×g Überstand) nekrotischer Zellen inkubiert wurden. Zusätzlich wurden nach Ultrafiltration (MWCO 30kDa) des 100.000×g Überstandes Durchfluss (D), Rückstand (R) sowie beide Fraktionen zusammen (R+D) eingesetzt. Kontrollzellen wurden mit serumfreiem Medium allein inkubiert (Kontrolle). **b+c)** Densitometrische Auswertung der Northern-Blot-Analyse aus a). Die Intensitäten der ApoJ- (b) bzw. MMP-3-Banden (c) wurden zu den Intensitäten der entsprechenden GAPDH-Banden ins Verhältnis gesetzt und sind als relatives Verhältnis bezogen auf den Wert der Kontrolle dargestellt (Mittelwert \pm Standardabweichung der Zweifachbestimmung).

In einem weiteren Experiment konnten die in Abb. 3.3.2 dargestellten Ergebnisse bestätigt werden. Zudem zeigte sich, dass in Gegenwart von Serum sowohl die Induktion der ApoJ-Genexpression durch lösliche und sedimentierbare Faktoren als auch die Induktion der MMP-3-Genexpression durch lösliche Komponenten nekrotischer Zellen inhibiert wird (ohne Abbildung). Um zu überprüfen,

ob lösliche ApoJ-induzierende Faktoren nach Durchlaufen der Apoptose passiv aus sekundär nekrotischen Zellen freigesetzt werden, wurden in einem zusätzlichen Experiment vitale Rat1-Fibroblasten in Gegenwart von 2mM L-Glutamin mit den bereits unter 3.2.3 verwendeten konditionierten Medien Camptothecin- bzw. DMSO-behandelter Rat1-Fibroblasten inkubiert. Hierbei zeigte sich, dass ausschließlich die konditionierten Medien von Zellen, die für 24-48h mit Camptothecin inkubiert wurden, ApoJ-induzierende Eigenschaften aufweisen, was darauf hindeutet, dass die löslichen ApoJ-induzierenden Faktoren passiv aus sekundär nekrotischen (postapoptotischen) Zellen freigesetzt werden (ohne Abbildung). In diesem Experiment war jedoch nicht auszuschließen, dass ein Teil der freigesetzten ApoJ-induzierenden Faktoren bei der Ultrafiltration (MWCO 100kDa) der konditionierten Medien die Filtermembran passierte und somit verloren ging.

3.3.3 Die ApoJ-induzierende Wirkung von Zellextrakten auf vitale Rat1-Fibroblasten ist spezie- und zelltypunabhängig

Da sich die beobachtete ApoJ-induzierende Wirkung von Zellextrakten verschiedener Zelllinien unter Verwendung von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin (Abb. 3.2.4) vermutlich teilweise auf das ubiquitär exprimierte Enzym Acylpeptidhydrolase zurückführen lässt, stellte sich die Frage, ob es auch in Gegenwart von L-Glutamin bei Inkubation mit Zellextrakten unterschiedlicher Zelllinien zur Induktion der ApoJ-mRNA-Expression in Rat1-Fibroblasten kommt. Durch dieses Experiment sollte geklärt werden, ob die aus Rat1-Fibroblasten stammenden löslichen ApoJ-induzierenden Faktoren zelltypspezifische Komponenten darstellen oder ob diese auch in anderen Zelltypen bzw. Zellen anderer Spezies exprimiert werden. Zudem sollte überprüft werden, ob die Wirkungsweise dieser löslichen Faktoren möglicherweise zelltyp- oder speziesspezifischen Restriktionen unterliegt.

Hierzu wurden wie unter 2.2.1.5 beschrieben Zellextrakte von 6 verschiedenen Zelllinien präpariert und deren ApoJ-induzierende Eigenschaften durch Inkubation mit vitalen Rat1-Fibroblasten überprüft. Bei den verwendeten Zelllinien handelte es sich um MEF-1 (Embryonalfibroblasten, *Mus musculus*), HEK 293 (embryonale Nierenzellen, *Homo sapiens*), 10A (embryonale Dottersackzellen, *Mus musculus*), J774A.1 (Monozyten/Makrophagen, *Mus musculus*), MDCK (epitheliale Nierenzellen, *Canis familiaris*) und BHK21 (Nierenfibroblasten, *Microcrictus aureus*). Alle Zellextrakte lagen in serumfreiem Rat1-Medium vor, das 2mM L-Glutamin enthielt. Zur Überprüfung der Induktion der ApoJ-Genexpression wurden Rat1-Fibroblasten unter serumfreien Bedingungen für 48h mit den verschiedenen Zellextrakten in einer Konzentration von jeweils 5×10^5 Zellen/ml inkubiert. Das verwendete Zellkulturmedium enthielt 2mM L-Glutamin. Der ApoJ-mRNA-Gehalt der Rat1-Fibroblasten wurde nach Präparation der Gesamt-RNA mittels Northern-Blot-Analyse untersucht.

Wie in Abbildung 3.3.3 zu sehen ist, führt die Inkubation mit allen Zellextrakten zu einer Erhöhung des ApoJ-mRNA-Gehaltes in serumfrei kultivierten Rat1-Fibroblasten. Dies zeigt deutlich, dass die Expression der intrazellulären löslichen ApoJ-induzierenden Faktoren nicht auf die embryonale Fibroblastenzelllinie Rat1 beschränkt ist. Diese Komponenten sind Bestandteil des Zellextraktes aller

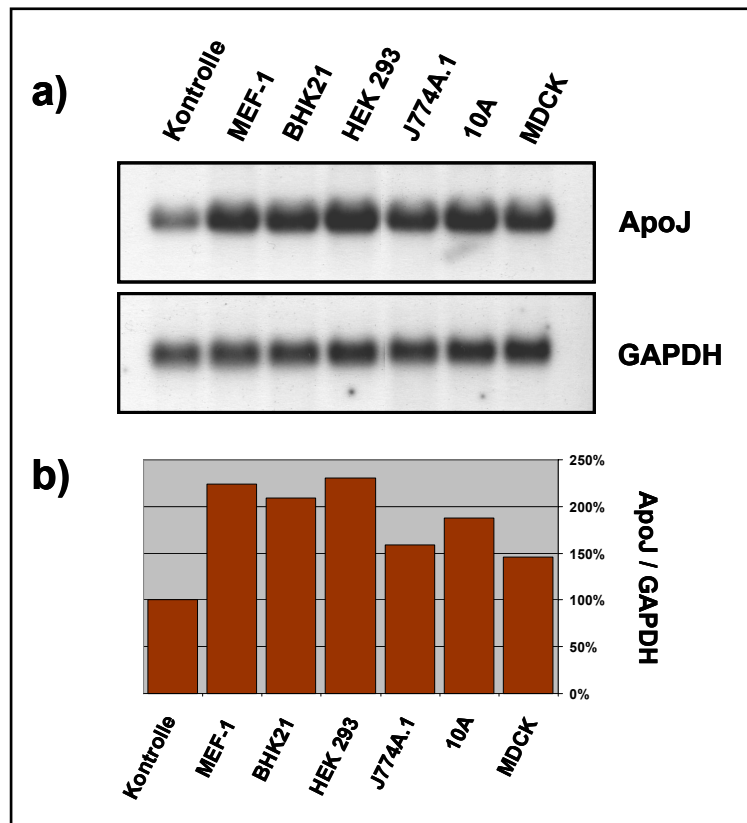


Abbildung 3.3.3: Die ApoJ-induzierende Wirkung von Zellextrakten auf vitale Rat1-Fibroblasten ist spezies- und zelltypunabhängig: a) Northern-Blot-Analyse von 15 µg Gesamt-RNA aus Rat1-Fibroblasten, die für 48h unter serumfreien Bedingungen mit Extrakten von jeweils 5 × 10⁶ Zellen der Zelllinien MEF-1, BHK21, HEK 293, J774A.1, 10A und MDCK inkubiert wurden. Kontrollzellen wurden mit serumfreiem Medium allein inkubiert (Kontrolle). Das Zellkulturmedium enthielt 2mM L-Glutamin. b) Densitometrische Auswertung der Northern-Blot-Analyse aus a). Die Intensitäten der ApoJ-Banden wurden zu den Intensitäten der entsprechenden GAPDH-Banden ins Verhältnis gesetzt und sind als relatives Verhältnis bezogen auf den Wert der Kontrolle dargestellt.

verwendeten Zelltypen, die neben Fibroblasten (MEF-1, BHK21, HEK 293) auch Epithelzellen (MDCK) und Monozyten/Makrophagen (J774A.1) umfassen. Dass die Inkubation mit Extrakten aus einer humanen Zelllinie (HEK 293) sowie Maus-, Hamster- und Hundezellen die ApoJ-mRNA-Expression in embryonalen Rattenfibroblasten induziert, zeigt zudem, dass diese Faktoren in der Lage sind, über die Speziesgrenzen hinweg eine Erhöhung der ApoJ-Genexpression zu induzieren. Einzig im Ausmaß der induzierten ApoJ-Regulation unterscheiden sich die Zellextrakte der verwendeten Zelllinien. Während Extrakte der Zelllinien J774A.1 (Monozyten/Makrophagen) und MDCK (epitheliale Nierenzellen) einen Anstieg der ApoJ-mRNA-Expression um Faktor 1,5 - 1,6 induzieren, führen aus Fibroblasten (MEF-1, BHK21, HEK 293) präparierte Zellextrakte zu einer Erhöhung des ApoJ-mRNA-Gehaltes um Faktor 2,1 - 2,3. Vergleicht man dieses Ergebnis mit dem unter 3.2.4 beschriebenen Experiment, bei dem N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als Glutaminsupplement verwendet wurde, liegt die Vermutung nahe, dass sich die ApoJ-induzierende Wirkung aller verwendeten Zellextrakte nicht allein auf das ubiquitär exprimierte Enzym Acylpeptidhydrolase zurückführen lässt. Somit scheinen auch die in Gegenwart von L-Glutamin wirksamen löslichen ApoJ-induzierenden Faktoren möglicherweise ubiquitär exprimiert zu werden.

3.3.4 Kinetische Analyse der durch nekrotische Zellen induzierten ApoJ-mRNA-Expression in vitalen Rat1-Fibroblasten

Unter Verwendung von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin ist ein deutlich erhöhter ApoJ-mRNA-Gehalt nur in Rat1-Fibroblasten zu erkennen, die für mindestens 24h mit nekrotischen Zellen bzw. Zellextrakt inkubiert wurden (Abb. 3.1.1). Die unter diesen Bedingungen verzögerte Induktion der ApoJ-mRNA-Expression deutet darauf hin, dass im Anschluss an primäre Prozesse die Regulation des ApoJ-Gens Teil einer sekundären Antwort der Rat1-Fibroblasten auf die Gegenwart nekrotischer Zellen sein könnte. Da eine durch das Enzym Acylpeptidhydrolase vermittelte Freisetzung von L-Glutamin unter Verwendung des N-acetylierten Dipeptids einen primären Vorgang darstellen könnte, sollte untersucht werden, ob unter Verwendung von L-Glutamin die Induktion der ApoJ-mRNA-Expression durch nekrotische Zellen einen anderen zeitlichen Verlauf aufweist. Zugleich sollte die Kinetik der durch nekrotische Zellen induzierten MMP-3-Genexpression untersucht sowie ein potentieller Einfluss nekrotischer Zellen auf die Genregulation von CTGF (connective tissue growth factor) überprüft werden. CTGF ist ein sekretiertes cysteinreiches Protein und Mitglied der CCN-Familie von Wachstumsfaktoren, das profibrotische Eigenschaften besitzt und an Wundheilungsprozessen beteiligt ist. CTGF induziert die Expression extrazellulärer Matrixproteine (Kollagen, Fibronectin) vor allem in Fibroblasten und bewirkt deren Differenzierung zu kontraktilen Myofibroblasten (Frazier et al. 1996, Leask und Abraham 2003).

Wie bereits gezeigt werden konnte, wird die durch nekrotische Zellen induzierte ApoJ-mRNA-Expression durch Serumkomponenten inhibiert (Abb. 3.2.11.2). Um eine negative Beeinflussung der ApoJ-Induktion durch Serumkomponenten zu minimieren, wurden die Zellen in allen weiteren Experimenten vor Zugabe nekrotischer Zellen zunächst für 24h in serumfreiem Medium präinkubiert. Nach Zugabe nekrotischer Zellen erfolgte die anschließende Inkubation im gleichen Kulturmedium. Ein vollständiger Wechsel des Kulturmediums vor Zugabe nekrotischer Zellen, wie in sämtlichen vorausgehenden Experimenten, wurde nicht durchgeführt. Zudem wurde in allen folgenden Experimenten für die 24-stündige Präinkubation serumfreies Medium verwendet, dem ein Supplement bestehend aus Insulin, Transferrin und Natriumselenit (ITS) zugesetzt war.

Für das Experiment wurden Rat1-Fibroblasten zunächst für 24h in 9ml serumfreiem, ITS-supplementiertem Medium präinkubiert. Anschließend wurden 1×10^7 primär nekrotische Rat1-Zellen bzw. 1ml serumfreies Medium (Kontrollen) zugesetzt und die Zellen für weitere 1-48h inkubiert. Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeiten wurden der ApoJ-, MMP-3- und CTGF-mRNA-Gehalt der Rat1-Fibroblasten nach Präparation der Gesamt-RNA mittels Northern-Blot-Analyse untersucht. Ebenso wurde mit zwei Proben verfahren, die von Zellen stammen, die vor der serumfreien Präinkubation (-24h) bzw. direkt vor Zugabe nekrotischer Zellen (0h) geerntet wurden.

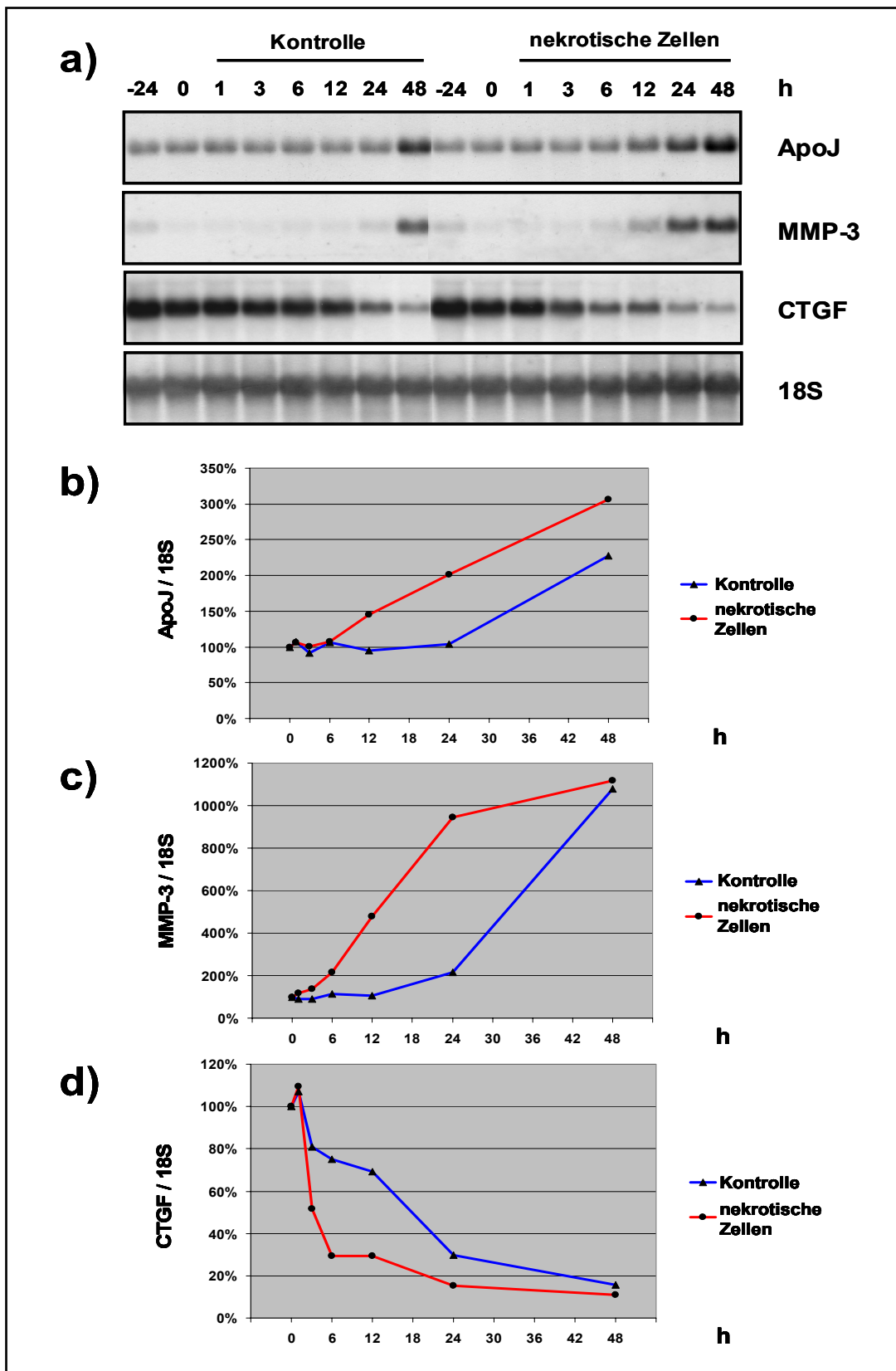


Abbildung 3.3.4: Einfluss nekrotischer Zellen auf den zeitlichen Verlauf der ApoJ-, MMP-3- und CTGF-mRNA-Expression in vitalen Rat1-Fibroblasten: a) Northern-Blot-Analyse von 15µg Gesamt-RNA aus Rat1-Fibroblasten vor einer 24-stündigen Präinkubation in serumfreiem Medium (-24h), zu Beginn des Experimentes (0h) und nach Inkubation für 1h, 3h, 6h, 12h, 24h und 48h mit 1×10^7 primär nekrotischen Rat1-Zellen (nekrotische Zellen) bzw. serumfreiem Medium allein (Kontrollen). b-d) Densitometrische Auswertung der Northern-Blot-Analyse aus a). Die Intensitäten der ApoJ- (b), MMP-3 (c) bzw. CTGF-Banden (d) wurden zu den Intensitäten der entsprechenden 18S-Banden ins Verhältnis gesetzt und sind als relatives Verhältnis bezogen auf den zu Beginn des Experimentes ermittelten Wert (0h) dargestellt.

Ergebnisse

Wie in Abbildung 3.3.4 zu sehen ist, führt die Inkubation mit nekrotischen Zellen erst nach 12h zu einer Akkumulation der ApoJ-mRNA in serumfrei kultivierten Rat1-Fibroblasten. Dies zeigt deutlich, dass auch unter Verwendung von L-Glutamin die vermehrte Transkription des ApoJ-Gens einer Verzögerung von mindestens 6h unterliegt, was darauf hindeuten könnte, dass eine durch nekrotische Zellen induzierte Erhöhung der ApoJ-Genaktivität möglicherweise über autokrine/parakrine Mechanismen verläuft. Im weiteren Verlauf des Experimentes steigt die ApoJ-mRNA-Menge der Zellen bis zu 48h nahezu linear an. Nach 48h weisen jedoch auch die Kontrollzellen einen um Faktor 2,3 erhöhten ApoJ-mRNA-Gehalt auf, womit die bereits beobachtete zeitliche Regulation des ApoJ-Gens unter Bedingungen, die ein Überleben der Zellen gewährleisten, bestätigt wird (Abb. 3.2.11.2). Das relative Maximum der durch nekrotische Zellen induzierten ApoJ-mRNA-Akkumulation ist nach 24h zu erkennen. Zu diesem Zeitpunkt weisen die mit nekrotischen Zellen inkubierten Rat1-Fibroblasten gegenüber den entsprechenden Kontrollen einen um Faktor 2 erhöhten ApoJ-mRNA-Gehalt auf.

Der zeitliche Verlauf der MMP-3-mRNA-Expression ist der von ApoJ-mRNA sehr ähnlich. Auch hier ist für eine deutliche Akkumulation von MMP-3-mRNA eine Inkubation der Rat1-Fibroblasten mit nekrotischen Zellen für mindestens 12h notwendig. Da die Kontrollzellen nach 48h ebenfalls einen stark erhöhten MMP-3-mRNA-Gehalt aufweisen, ist auch in diesem Fall das relative Maximum der durch nekrotische Zellen induzierten Akkumulation von MMP-3-mRNA nach etwa 12-24h zu sehen (Faktor 4,5).

Wie eine Analyse der CTGF-mRNA zeigt, führt die Inkubation serumfrei kultivierter Rat1-Fibroblasten mit nekrotischen Zellen zu einer Repression der CTGF-Genaktivität. Gegenüber den entsprechenden Kontrollen weisen mit nekrotischen Zellen inkubierte Rat1-Fibroblasten nach 6-12h einen um 60% verringerten CTGF-mRNA-Gehalt auf. Der Beginn der CTGF-Repression ist hierbei schon nach 3h deutlich zu erkennen. Da mit zunehmender Inkubationszeit auch bei den Kontrollzellen eine Abnahme des CTGF-mRNA-Gehaltes zu beobachten ist, nähern sich die entsprechenden CTGF-mRNA-Mengen der Kontrollen im weiteren Verlauf des Experimentes denen von Rat1-Fibroblasten an, die mit nekrotischen Zellen inkubiert wurden.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Inkubation serumfrei kultivierter Rat1-Fibroblasten mit nekrotischen Zellen die Regulation aller drei untersuchten Gene beeinflusst. Im Falle von ApoJ und MMP-3 kommt es zu einer verzögerten Induktion der mRNA-Expression; die Genaktivität von CTGF hingegen wird inhibiert. Dass eine ähnliche Regulation aller drei analysierten Gene im weiteren Verlauf des Experimentes jedoch auch bei den Kontrollzellen zu sehen ist, lässt vermuten, dass es bei länger andauernder Kultivierung (3 Tage) von Rat1-Fibroblasten unter serumfreien Bedingungen zu einer verzögerten Induktion ähnlicher Prozesse kommt wie bei einer Inkubation mit nekrotischen Zellen. In den serumfreien Kontrollansätzen könnten absterbende Zellen eine Rolle spielen.

3.3.5 Einfluss nekrotischer Zellen auf die ApoJ-mRNA-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen (CRL 2018) und embryonalen Dottersackzellen (10A)

Für alle bisherigen Untersuchungen zur Induktion der ApoJ-Genaktivität in vitalen Zellen bei Inkubation mit nekrotischen Zellen wurden ausschließlich embryonale Fibroblasten der Zelllinie Rat1 verwendet. In weiteren Experimenten sollte überprüft werden, ob die Inkubation mit nekrotischen Zellen auch in anderen Zelltypen zu einer erhöhten ApoJ-mRNA-Expression führt. Für diese Analysen wurden aus der Aorta stammende glatte Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018 (*Rattus norvegicus*) sowie aus dem Dottersack stammende embryonale Zellen der Linie 10A (*Mus musculus*) herangezogen. Die Zelllinie CRL2018 schien geeignet, da eine verstärkte ApoJ-Expression glatter Gefäßmuskelzellen in atherosklerotischen Läsionen bereits gezeigt werden konnte (Jordan-Starck et al. 1994, Ishikawa et al. 1998). Des Weiteren wurde beschrieben, dass nach Verletzung der Aorta mittels Ballondilatation eine starke Induktion der ApoJ-Genexpression in glatten Gefäßmuskelzellen der Media stattfindet (Miyata et al. 2001). In beiden Fällen besteht folglich die Möglichkeit, dass nekrotisches Zellmaterial an der Regulation der ApoJ-Genexpression in glatten Gefäßmuskelzellen beteiligt ist. Neben drei weiteren Zelllinien gehört die embryonale Dottersackzelllinie 10A als LRP- (LDL-receptor-related protein, CD91) und Megalin- (LRP2) exprimierende Zelllinie zu einem Zellsystem, an dem in unserer Arbeitsgruppe die Funktion von Rezeptoren der LDL-Rezeptorfamilie untersucht wird. Es sollte überprüft werden, ob die ApoJ-Genexpression in 10A-Zellen durch Inkubation mit nekrotischen Zellen induziert wird, um gegebenenfalls mit Hilfe entsprechender LRP- und Megalin-defizienter Zelllinien eine Beteiligung beider Rezeptoren an der durch nekrotische Zellen induzierten Regulation des ApoJ-Gens zu untersuchen.

Zur Überprüfung des Einflusses nekrotischer Zellen auf die ApoJ-Genregulation beider Zelllinien wurden CRL2018- und 10A-Zellen zunächst für 24h in 9ml entsprechendem serumfreiem, ITS-supplementiertem Medium präinkubiert. Anschließend wurden 1×10^7 homologe, primär nekrotische Zellen (CRL2018 bzw. 10A) bzw. 1ml serumfreies Medium (Kontrollen) zugesetzt und für weitere 6-48h inkubiert. Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeiten wurde der ApoJ-, MMP-3- und CTGF-mRNA-Gehalt lebender CRL2018- und 10A-Zellen nach Präparation der Gesamt-RNA mittels Northern-Blot-Analyse untersucht. Ebenso wurde mit jeweils zwei Proben verfahren, die von Zellen stammen, die vor der serumfreien Präinkubation (-24h) bzw. direkt vor Zugabe nekrotischer Zellen (0h) geerntet wurden. Um die ApoJ-induzierende Wirkung primär nekrotischer CRL2018-Zellen zu überprüfen, wurden wie in 3.3.4 Rat1-Fibroblasten für 24h unter serumfreien Bedingungen mit 1×10^7 primär nekrotischen CRL2018-Zellen bzw. mit serumfreiem Rat1-Medium allein (Kontrolle) inkubiert. Auf eine Überprüfung der ApoJ-induzierenden Eigenschaften nekrotischer 10A-Zellen wurde verzichtet, da bereits gezeigt werden konnte, dass aus 10A-Zellen stammender Zellextrakt und somit zumindest lösliche Faktoren dieser Zellen in der Lage sind, eine Akkumulation von ApoJ-mRNA in Rat1-Fibroblasten zu induzieren (Abb. 3.3.3).

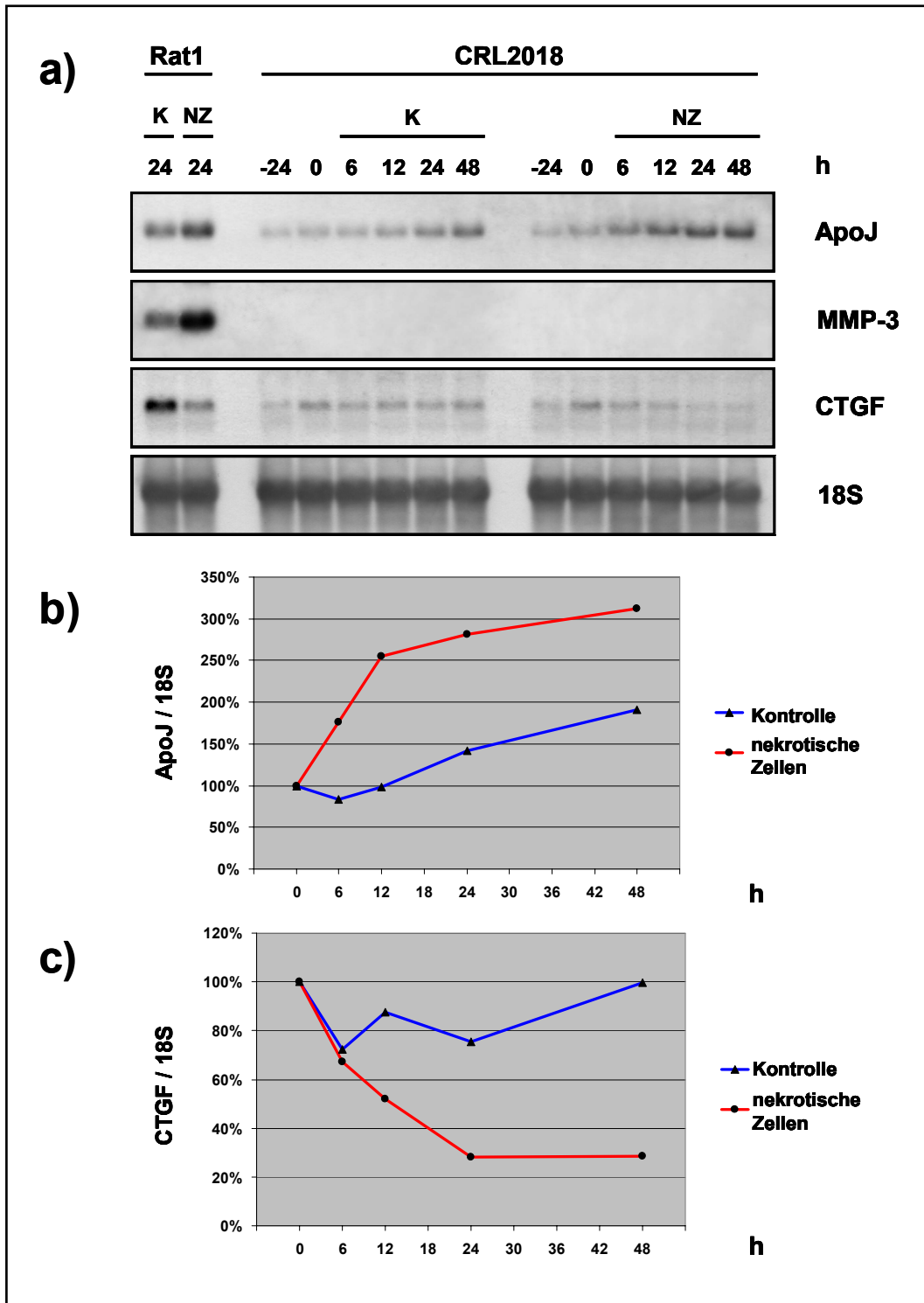


Abbildung 3.3.5.1: Einfluss nekrotischer Zellen auf den zeitlichen Verlauf der ApoJ- und CTGF-mRNA-Expression in vitalen CRL2018-Zellen: a) Northern-Blot-Analyse von 15µg Gesamt-RNA aus CRL2018-Zellen vor einer 24-stündigen Präinkubation in serumfreiem Medium (-24h), zu Beginn des Experimentes (0h) und nach Inkubation für 6h, 12h, 24h und 48h mit 1×10^7 primär nekrotischen CRL2018-Zellen (NZ) bzw. serumfreiem Medium allein (K). Rat1-Fibroblasten, die für 24h mit 1×10^7 primär nekrotischen CRL2018-Zellen (NZ) bzw. serumfreiem Rat1-Medium allein (K) inkubiert wurden, dienten als Kontrolle zur Überprüfung ApoJ-induzierender Eigenschaften primär nekrotischer CRL2018-Zellen. **b+c)** Densitometrische Auswertung der Northern-Blot-Analyse aus a). Die Intensitäten der ApoJ- (b) bzw. CTGF-Banden (c) wurden zu den Intensitäten der entsprechenden 18S-Banden ins Verhältnis gesetzt und sind als relatives Verhältnis bezogen auf den zu Beginn des Experimentes ermittelten Wert (0h) dargestellt.

Ähnlich wie in Rat1-Fibroblasten führt die Inkubation mit nekrotischen Zellen auch in serumfrei kultivierten CRL2018-Zellen zu einer Erhöhung des ApoJ-mRNA-Gehaltes (Abb. 3.3.5.1). Dies zeigt deutlich, dass eine durch nekrotische Zellen induzierte Erhöhung der ApoJ-mRNA-Expression nicht auf Rat1-Fibroblasten beschränkt ist sondern auch in den in diesem Experiment verwendeten glatten Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018 erfolgt. Der zeitliche Verlauf der ApoJ-mRNA-Expression in beiden Zelllinien unterscheidet sich jedoch. In CRL2018-Zellen führt eine Inkubation mit nekrotischen Zellen innerhalb von 12h zu einem vergleichsweise starken Anstieg des ApoJ-mRNA-Gehaltes um Faktor 2,5, wobei eine deutlich erhöhte ApoJ-mRNA-Menge bereits nach 6h zu erkennen ist (Faktor 1,8). Ähnlich wie bei Rat1-Fibroblasten ist auch bei den hier verwendeten CRL2018-Zellen eine Regulation des ApoJ-Gens in den Kontrollzellen zu erkennen. Deren ApoJ-mRNA-Gehalt steigt während des experimentellen Zeitraums von 48h nahezu linear an. Gegenüber Zellen, die zu Beginn des Experimentes geerntet wurden (0h), weisen die Kontrollen nach 48h einen um Faktor 1,9 erhöhten ApoJ-mRNA-Gehalt auf. Die Inkubation serumfrei kultivierter Rat1-Fibroblasten mit nekrotischen CRL2018-Zellen führt, wie bei Verwendung nekrotischer Rat1-Zellen, sowohl zu einer Induktion der ApoJ- und MMP-3-Genexpression als auch zu einer Repression der CTGF-Genaktivität. Dies bestätigt zum einen den Einfluss nekrotischer Zellen auf die Regulation dieser drei Gene und zeigt zum anderen, dass neben den unter 3.3.3 verwendeten Zelllinien auch nekrotische CRL2018-Zellen ApoJ-induzierende Komponenten enthalten. Bei sämtlichen Proben, die aus CRL2018-Zellen stammen, ist hingegen kein MMP-3-spezifisches Hybridisierungssignal detektierbar. Dies deutet darauf hin, dass glatte Gefäßmuskelzellen dieses Enzym nicht oder nur in sehr geringem Maße exprimieren. Somit scheinen Expression und Regulation des MMP-3-Gens durch nekrotische Zellen zelltypspezifisch und auf Fibroblasten beschränkt zu sein. Ähnlich wie in Rat1-Fibroblasten wird auch die CTGF-mRNA-Expression in CRL2018-Zellen bei Inkubation mit nekrotischen Zellen inhibiert, womit eine durch nekrotische Zellen induzierte Repression der CTGF-Genaktivität bestätigt wird. Im Vergleich mit Rat1-Zellen erfolgt die Abnahme der CTGF-mRNA-Menge in CRL2018-Zellen jedoch verzögert. Erst nach 12h ist ein gegenüber den entsprechenden Kontrollen deutlich verringerter CTGF-mRNA-Gehalt zu erkennen, der sich im weiteren Verlauf des Experimentes auf etwa 30% des Ausgangswertes (0h) reduziert. Anders als in Rat1-Fibroblasten bleibt bei CRL2018-Zellen die CTGF-mRNA-Expression in den Kontrollzellen über den gesamten experimentellen Zeitraum von 48h relativ konstant.

Wie Abbildung 3.3.5.2 zeigt, führt die Inkubation mit nekrotischen Zellen zu keiner deutlichen Induktion der ApoJ-mRNA-Expression in serumfrei kultivierten embryonalen Dottersackzellen der Zelllinie 10A. Anders als in Rat1-Fibroblasten und glatten Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018 bleibt der ApoJ-mRNA-Gehalt sowohl in den mit nekrotischen Zellen inkubierten 10A-Zellen als auch in den Kontrollzellen über den gesamten experimentellen Zeitraum von 48h relativ konstant. Nach 24-stündiger Inkubation mit nekrotischen Zellen ist zwar eine leicht erhöhte Menge an ApoJ-mRNA (Faktor 1,3) zu erkennen, die sich nach 48h jedoch wieder dem Ausgangswert (0h) annähert. Da bereits gezeigt werden konnte, dass aus 10A-Zellen stammender Extrakt zu einer Erhöhung der ApoJ-mRNA-Expression in Rat1-Fibroblasten führt (Abb. 3.3.3), ist auszuschließen, dass die in

Ergebnisse

diesem Experiment verwendeten primär nekrotischen 10A-Zellen Grund für eine ausbleibende Induktion der ApoJ-Genaktivität in vitalen 10A-Zellen sind. Zudem ist die bei Rat1-Fibroblasten und CRL2018-Zellen beobachtete Akkumulation von ApoJ-mRNA in den Kontrollzellen nicht zu erkennen. Nach Hybridisierung der Membran mit einer MMP-3-spezifischen und einer CTGF-spezifischen cDNA-Sonde waren keine Signale detektierbar. Dies deutet darauf hin, dass die in diesem Experiment verwendeten embryonalen Dottersackzellen beide Proteine nicht oder nur in sehr geringem Maße exprimieren.

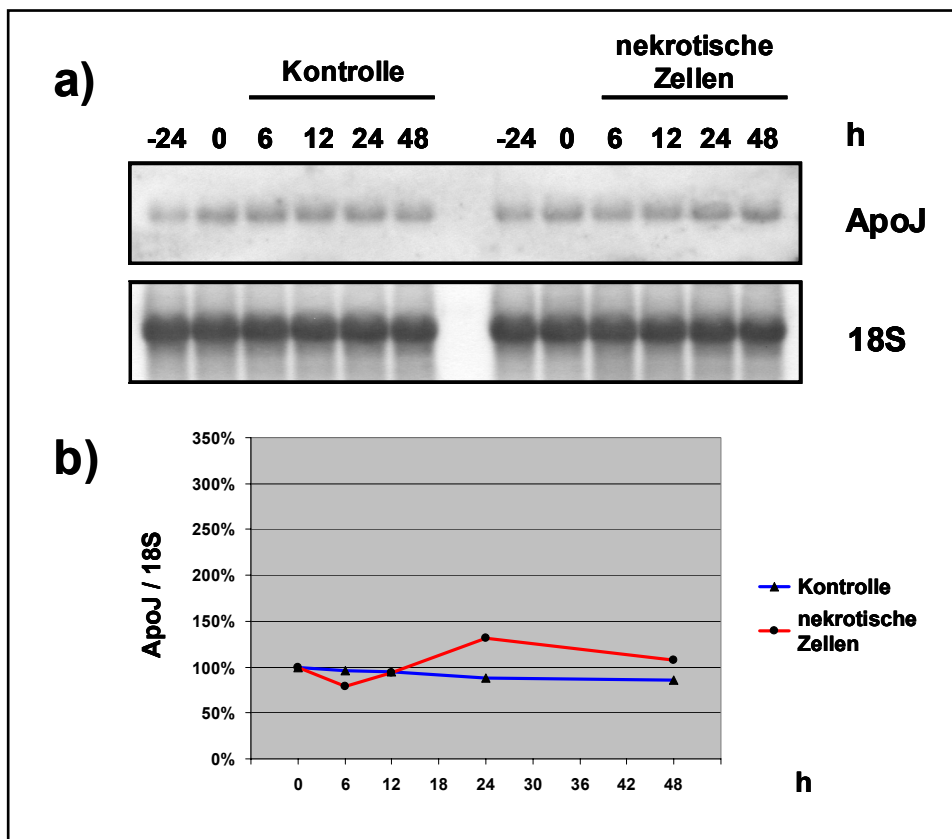


Abbildung 3.3.5.2: Einfluss nekrotischer Zellen auf den zeitlichen Verlauf der ApoJ-mRNA-Expression in vitalen 10A-Zellen: a) Northern-Blot-Analyse von 15µg Gesamt-RNA aus 10A-Zellen vor einer 24-stündigen Präinkubation in serumfreiem Medium (-24h), zu Beginn des Experimentes (0h) und nach Inkubation für 6h, 12h, 24h und 48h mit 1×10^7 primär nekrotischen 10A-Zellen (nekrotische Zellen) bzw. serumfreiem Medium allein (Kontrolle). b) Densitometrische Auswertung der Northern-Blot-Analyse aus a). Die Intensitäten der ApoJ-Banden wurden zu den Intensitäten der entsprechenden 18S-Banden ins Verhältnis gesetzt und sind als relatives Verhältnis bezogen auf den zu Beginn des Experimentes ermittelten Wert (0h) dargestellt.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die in Rat1-Fibroblasten nachgewiesene Erhöhung der ApoJ-mRNA-Expression sowie die Repression der CTGF-mRNA-Expression bei Inkubation mit nekrotischen Zellen auch in glatten Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018 erfolgt, was den Einfluss nekrotischer Zellen auf die Regulation beider Gene bestätigt. In embryonalen Dottersackzellen der Zelllinie 10A führt die Inkubation mit nekrotischen Zellen hingegen zu keiner deutlichen Erhöhung der ApoJ-mRNA-Expression. Dies lässt vermuten, dass die beiden in 10A-Zellen exprimierten Proteine der LDL-Rezeptorfamilie (LRP/CD91 und Megalin) nicht an der Induktion der ApoJ-Genexpression durch nekrotische Zellen beteiligt sind oder deren Expression allein nicht ausreichend ist.

3.3.6 Differentielle Expression von Toll-like Rezeptoren in Rat1-, CRL2018- und 10A-Zellen

Wie gezeigt werden konnte, führt die Inkubation mit nekrotischen Zellen in Rat1-Fibroblasten und CRL2018-Zellen zu einer Induktion der ApoJ-mRNA-Expression sowie zu einer Repression der CTGF-Genaktivität. Des Weiteren induzieren nekrotische Zellen eine Akkumulation von MMP-3-mRNA in Rat1-Fibroblasten. Die Suche nach Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Regulation der ApoJ-, CTGF- und MMP-3-Genexpression im Rahmen einer Literaturrecherche ergab, dass eine Induktion der ApoJ- und MMP-3-Genaktivität in Fibroblasten sowie eine Repression der CTGF-Expression in Fibroblasten und glatten Gefäßmuskelzellen scheinbar durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B vermittelt wird (Li et al. 2002, Li et al. 2001, Lin et al. 1998, Abraham et al. 2000, Villacorta et al. 2003). Zudem wurde beschrieben, dass die Inkubation mit nekrotischen Zellen in dendritischen Zellen, Makrophagen und Fibroblasten zu einer Aktivierung von NF- κ B führt sowie in NF- κ B-abhängiger Weise die Genexpression in Makrophagen und Fibroblasten moduliert (Basu et al. 2000, Li et al. 2001). Unter diesen Bedingungen wird unter anderem die MMP-3-mRNA-Expression in embryonalen Mausfibroblasten in NF- κ B-abhängiger Weise induziert (Li et al. 2001). Dies lässt vermuten, dass bei Inkubation mit nekrotischen Zellen die Regulation der ApoJ-, MMP-3- und CTGF-mRNA-Expression in vitalen Rat1-Fibroblasten und CRL2018-Zellen möglicherweise in NF- κ B-abhängiger Weise erfolgt.

TLR2, ein Mitglied der Toll-like Rezeptorfamilie, wurde als Signalrezeptor identifiziert, der die NF- κ B-aktivierende Wirkung nekrotischer Zellen vermittelt (Li et al. 2001). Dass eine Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors auch von anderen Toll-like Rezeptoren vermittelt werden kann und zudem vermutet wird, dass u.a. aus nekrotischen Zellen freigesetzte Hitzeschockproteine (Hsp60, Hsp70, Hsp90, gp96) und RNA potentielle endogene Agonisten für die Toll-like Rezeptoren TLR4 bzw. TLR3 darstellen (1.2.5.2), führte zur Hypothese, dass Mitglieder der Toll-like Rezeptorfamilie an der Regulation des ApoJ-Gens beteiligt sein könnten. Hierbei könnten von nekrotischen Zellen exponierte membranassoziierte oder freigesetzte Komponenten als endogene TLR-Agonisten fungieren und in TLR-abhängiger Weise über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B die ApoJ-induzierenden Eigenschaften nekrotischer Zellen vermitteln. Unterstützt wird diese Hypothese durch bereits veröffentlichte Studien, die zeigen, dass eine Inkubation primärer Astrozyten und gemischter Gliazellkulturen mit dem TLR4-spezifischen Agonisten Lipopolysaccharid (LPS) zu einer vermehrten Expression von ApoJ führt (Saura et al. 2003, LaDu et al. 2000).

Um eine potentielle Beteiligung von Mitgliedern der Toll-like Rezeptorfamilie an der Induktion der ApoJ-Genexpression durch nekrotische Zellen zu überprüfen, sollte mittels RT-PCR zunächst die Expression von TLR2, TLR3 und TLR4 in den verwendeten Zelllinien Rat1, CRL2018 und 10A untersucht werden. Hierfür wurden jeweils 0,5 μ g revers transkribierte Gesamt-RNA aus Rat1-, CRL2018- und 10A-Zellen für eine PCR mit TLR2-, TLR3- und TLR4-spezifischen Primern eingesetzt. Die für die reverse Transkription eingesetzte Gesamt-RNA stammte aus Zellen, die jeweils zu Beginn (0h) der unter 3.3.4 und 3.3.5 beschriebenen Experimente geerntet wurden. Um einen möglichen Einfluss kontaminierender genomischer DNA auf das Ergebnis der PCR-Analyse

Ergebnisse

auszuschließen, wurden jeweils entsprechende Kontrollreaktionen mit nicht-revers transkribierter Gesamt-RNA (-RT) angesetzt (2.2.5.5.1). Jeweils 10µl der einzelnen PCR-Ansätze wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (0,7% Agarose) analysiert.

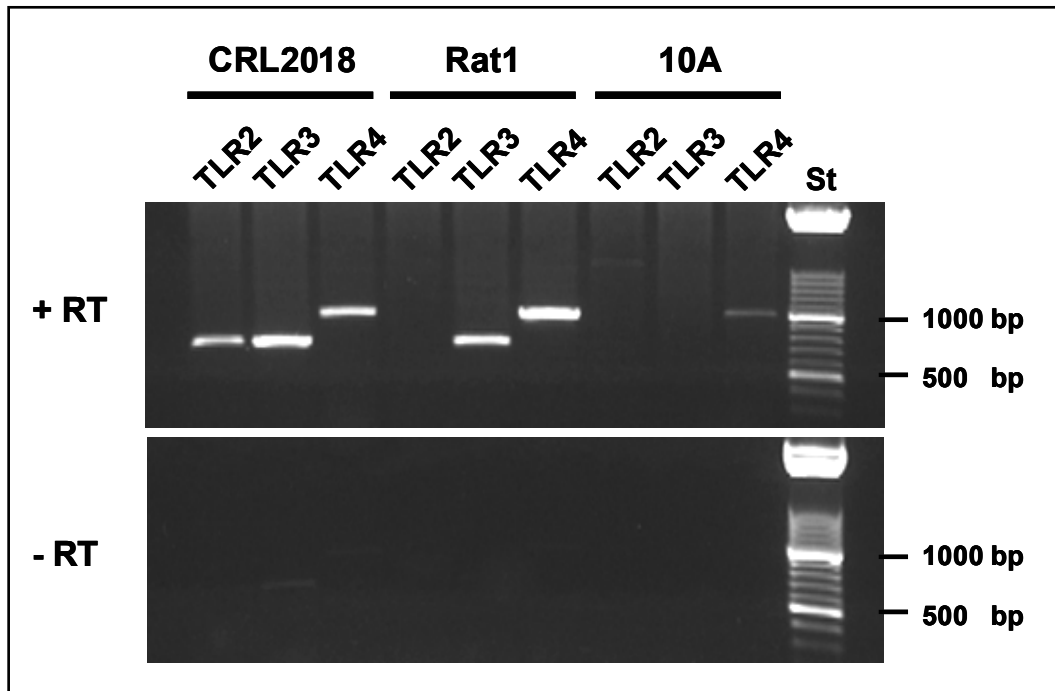


Abbildung 3.3.6: Differentielle Expression der Toll-like Rezeptoren TLR2, TLR3 und TLR4 in CRL2018-, Rat1- und 10A-Zellen: Gesamt-RNA aus glatten Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018, embryonalen Fibroblasten der Zelllinie Rat1 sowie aus epithelialen Dottersackzellen der Zelllinie 10A wurde revers transkribiert (+RT) und anschließend für eine PCR mit TLR2-, TLR3- und TLR4-spezifischen Primern eingesetzt. Als Kontrolle dienten Ansätze, bei denen die Erststrangsynthese in Abwesenheit reverser Transkriptase durchgeführt wurde (-RT). Jeweils 10µl der einzelnen PCR-Ansätze wurden in einem Agarosegel (0,7% Agarose) elektrophoretisch getrennt. Die Größe der einzelnen PCR-Amplifikate beträgt 726 bp (TLR2), 728 bp (TLR3) und 994 bp (TLR4). Zusätzlich wurde 1µg DNA eines Längenstandards (XIV, Roche Diagnostics) aufgetragen (St).

Abbildung 3.3.6 zeigt, dass unter Verwendung revers transkribierter RNA aus glatten Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018 eine PCR mit TLR2-, TLR3- und TLR4-spezifischen Primern zu Amplifikaten führt, deren Molekulargewichte mit den jeweiligen theoretischen Molekulargewichten der TLR-spezifischen PCR-Amplifikate übereinstimmen. Durch eine anschließende Sequenzierung dieser PCR-Produkte konnte deren Spezifität bestätigt werden. Da in den entsprechenden Kontrollansätzen (-RT) keine PCR-Amplifikate zu detektieren sind, lässt sich ein Einfluss kontaminierender genomischer DNA auf das Ergebnis dieser PCR-Analyse ausschließen. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass CRL2018-Zellen die Toll-like Rezeptoren TLR2, TLR3 und TLR4 exprimieren. Embryonale Fibroblasten der Zelllinie Rat1 hingegen exprimieren nur TLR3 und TLR4. Ein TLR2-spezifisches PCR-Amplifikat ist nicht detektierbar. Murine embryonale Dottersackzellen exprimieren weder TLR2 noch TLR3 und scheinbar nur sehr geringe Mengen an TLR4, da die Bande, die dem TLR4-spezifischen PCR-Amplifikat entspricht, eine

vergleichsweise geringe Intensität aufweist. Wie bei den CRL2018-Zellen sind auch in den einzelnen Kontrollansätzen (-RT) der beiden Zelllinien Rat1 und 10A keine PCR-Amplifikate detektierbar, womit auch in diesem Fall ein Einfluss kontaminierender genomischer DNA auf die Resultate der Genexpressionsanalyse ausgeschlossen werden kann. Das in Abbildung 3.3.6 dargestellte Ergebnis konnte in zwei weiteren unabhängigen Experimenten bestätigt werden.

Vergleicht man die durch nekrotische Zellen induzierte ApoJ-mRNA-Expression in den drei verschiedenen Zelllinien mit deren Expression von Toll-like Rezeptoren, so ist eine deutliche Korrelation zu erkennen. Bei Inkubation mit nekrotischen Zellen ist in glatten Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018, welche die Toll-like Rezeptoren TLR2, TLR3 und TLR4 exprimieren, bereits nach 6h ein deutlich erhöhter Gehalt an ApoJ-mRNA detektierbar (Abb. 3.3.5.1). Embryonale Rat1-Fibroblasten exprimieren hingegen nur die beiden Toll-like Rezeptoren TLR3 und TLR4 und weisen bei Inkubation mit nekrotischen Zellen eine gegenüber den CRL2018-Zellen verzögerte Induktion der ApoJ-mRNA-Expression auf. Eine deutliche Erhöhung der ApoJ-mRNA-Menge ist in diesen Zellen erst nach einer 12-stündigen Inkubation mit nekrotischen Zellen nachweisbar (Abb. 3.3.4). Bei embryonalen Dottersackzellen der Zelllinie 10A, die weder TLR2 noch TLR3 und scheinbar nur geringe Mengen an TLR4 exprimieren, führt eine Inkubation mit nekrotischen Zellen hingegen zu keiner deutlichen Erhöhung der ApoJ-mRNA-Expression (Abb. 3.3.5.2).

Zusammenfassend unterstützt die Korrelation der differentiellen Induktion der ApoJ-mRNA-Expression durch nekrotische Zellen mit der unterschiedlichen Expression von TLR2, TLR3 und TLR4 in den drei untersuchten Zelllinien die Hypothese, dass diese Rezeptoren an der durch nekrotische Zellen induzierten ApoJ-Genexpression in vitalen CRL2018- und Rat1-Zellen beteiligt sind.

3.3.7 Zusammenfassung

Unter Verwendung von L-Glutamin als Mediumsupplement ist die Induktion der ApoJ-mRNA-Expression in Rat1-Fibroblasten durch nekrotische Zellen dosisabhängig und wird sowohl durch sedimentierbare als auch lösliche Faktoren nekrotischer Zellen vermittelt. Zudem ist die durch lösliche Faktoren induzierte Erhöhung der ApoJ-Genaktivität in Rat1-Fibroblasten unabhängig von Zelltyp und Spezies der nekrotischen Zellen, was auf eine breite Expression dieser löslichen ApoJ-induzierenden Faktoren hindeutet sowie deren speziesunabhängige Wirkungsweise zeigt. Eine Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der durch nekrotische Zellen induzierten ApoJ-mRNA-Expression in Rat1-Fibroblasten zeigt, dass die Akkumulation von ApoJ-mRNA verzögert erfolgt und erst nach einer Inkubation von etwa 12h detektierbar ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nekrotische Zellen auch die Expression zweier weiterer Gene beeinflussen, die beide eine Rolle in geweberegenerativen Prozessen und während der Wundheilung spielen. Die Inkubation mit nekrotischen Zellen führt in Rat1-Fibroblasten zum einen zu einer Induktion der mRNA-Expression des Enzyms Matrix-Metalloproteinase-3 (MMP-3, Stromelysin-1) sowie zu einer Repression der CTGF-mRNA-Expression (connective tissue growth factor). Eine Überprüfung des Einflusses nekrotischer Zellen auf die ApoJ-Genexpression in zwei weiteren Zelllinien zeigt, dass die Inkubation

mit nekrotischen Zellen auch in glatten Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018 zu einer Akkumulation von ApoJ-mRNA führt. In embryonalen Dottersackzellen der Zelllinie 10A erfolgt unter diesen Bedingungen hingegen keine deutliche Regulation der ApoJ-mRNA-Expression. Eine Genexpressionsanalyse von Mitgliedern der Toll-like Rezeptorfamilie zeigt eine deutliche Korrelation der Expression von TLR2, TLR3 und TLR4 mit der durch nekrotische Zellen induzierten ApoJ-Genexpression in Rat1-Fibroblasten, CRL2018- und 10A-Zellen. Während CRL2018-Zellen, die bereits nach 6-stündiger Inkubation mit nekrotischen Zellen einen erhöhten ApoJ-mRNA-Gehalt aufweisen, alle drei Toll-like Rezeptoren exprimieren, konnte in embryonalen Dottersackzellen der Zelllinie 10A, die bei Inkubation mit nekrotischen Zellen keine deutliche Induktion der ApoJ-Genaktivität aufweisen, nur eine schwache Expression von TLR4 nachgewiesen werden. TLR2 und TLR3 werden in diesen Zellen nicht exprimiert. Embryonale Rat1-Fibroblasten hingegen exprimieren TLR3 und TLR4. Diese Korrelation ist ein Hinweis darauf, dass TLR2, TLR3 und TLR4 als signaltransduzierende Rezeptoren die ApoJ-induzierende Wirkung nekrotischer Zellen vermitteln könnten und von nekrotischen Zellen exponierte membranassoziierte oder freigesetzte lösliche Faktoren als endogene TLR-Agonisten fungieren könnten.

3.4 Charakterisierung der ApoJ-Regulation durch Toll-like Rezeptoren

Um eine potentielle Beteiligung der Toll-like Rezeptoren TLR2, TLR3 und TLR4 an der durch nekrotische Zellen induzierten ApoJ-Genaktivität zu überprüfen, sollte in weiterführenden Experimenten zunächst untersucht werden, ob und gegebenenfalls welche dieser drei Rezeptoren Einfluss auf die ApoJ-Regulation in vitalen Zellen besitzen. Diese Untersuchungen sollten mit Hilfe synthetischer und gereinigter Substanzen durchgeführt werden, die als spezifische Agonisten für die einzelnen Toll-like Rezeptoren beschrieben sind. Als TLR2-spezifischer Agonist wurde das kationische Lipohexapeptid Pam₃Cys-Ser-Lys₄ (Pam₃CSK₄, (S)-[2,3-Bis(palmitoyloxy)-(2-RS)-propyl]-N-palmitoyl-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys₄-OH) verwendet, das ein synthetisches Analogon zum immunstimulatorischen N-terminalen Anteil bakterieller Lipoproteine darstellt (Müller et al. 2001, Toshchakov et al. 2002, Takeuchi et al. 2002). Das synthetische Homopolymer Polyinosin-Polycytidin (Poly(I:C)), eine doppelsträngige Ribonukleinsäure, ist als spezifischer Agonist für TLR3 beschrieben (Alexopoulou et al. 2001). Aus dem Gram-negativen Bakterienstamm *Salmonella minnesota* R595 isoliertes hochreines Lipopolysaccharid (LPS) wurde als TLR4-spezifischer Agonist eingesetzt (Tapping et al. 2000).

3.4.1 Einfluss der TLR-spezifischen Agonisten Pam₃Cys-Ser-Lys₄, Poly(I:C) und LPS auf die ApoJ-mRNA-Expression in CRL2018-Zellen

In einem ersten Experiment sollte zunächst überprüft werden, ob bei Inkubation glatter Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018 mit verschiedenen Konzentrationen an Pam₃Cys-Ser-Lys₄, Poly(I:C) und LPS die transkriptionelle Aktivität des ApoJ-Gens induziert werden kann. Als Zelllinie wurden glatte Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018 gewählt, da diese die Toll-like Rezeptoren

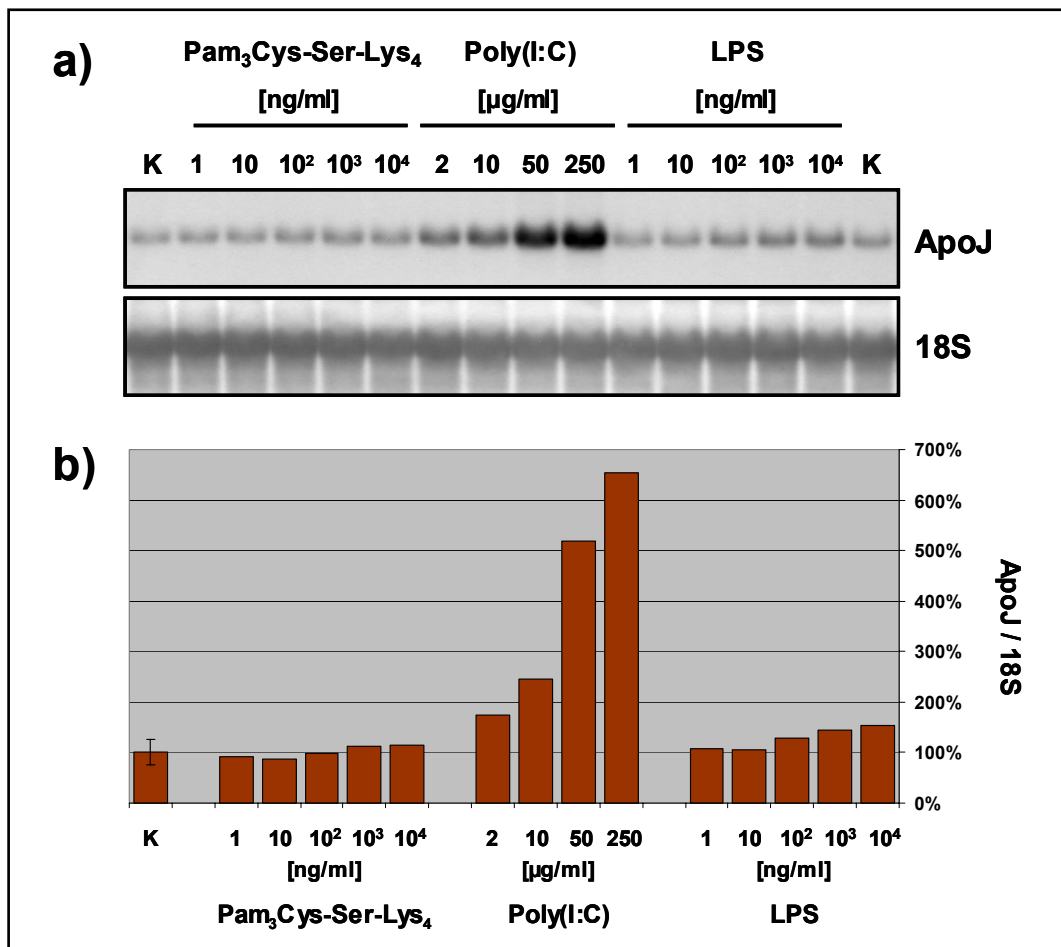


Abbildung 3.4.1: Einfluss der TLR-spezifischen Agonisten Pam₃Cys-Ser-Lys₄, Poly(I:C) und LPS auf die ApoJ-mRNA-Expression in CRL2018-Zellen: a) Northern-Blot-Analyse von 15µg Gesamt-RNA aus CRL2018-Zellen, die für 16h unter serumfreien Bedingungen mit 1ng/ml-10µg/ml des TLR2-spezifischen Agonisten Pam₃Cys-Ser-Lys₄ bzw. des TLR4-spezifischen Agonisten Lipopolysaccharid (LPS) oder mit 2µg/ml-250µg/ml des TLR3-spezifischen Agonisten Poly(I:C), einer synthetischen doppelsträngigen RNA, inkubiert wurden. Kontrollzellen (K) wurden mit serumfreiem Medium allein inkubiert. b) Densitometrische Auswertung der Northern-Blot-Analyse aus a). Die Intensitäten der ApoJ-Banden wurden zu den Intensitäten der entsprechenden 18S-Banden ins Verhältnis gesetzt und sind als relatives Verhältnis bezogen auf den Wert der Kontrolle (K, Mittelwert ± Standardabweichung der Zweifachbestimmung) dargestellt.

TLR2, TLR3 und TLR4 exprimieren (Abb. 3.3.6). CRL2018-Zellen wurden zunächst für 24h in 9ml serumfreiem ITS-supplementiertem Medium präinkubiert und anschließend für 16h unter serumfreien Bedingungen mit 1ng/ml-10µg/ml Pam₃Cys-Ser-Lys₄, 2µg/ml-250µg/ml Poly(I:C) bzw. 1ng/ml-10µg/ml LPS inkubiert. Kontrollen wurden in serumfreiem Medium kultiviert. Anschließend wurde der ApoJ-mRNA-Gehalt der CRL2018-Zellen nach Präparation der Gesamt-RNA mittels Northern-Blot-Analyse untersucht.

Wie in Abbildung 3.4.1 zu sehen ist, führt der TLR2-spezifische Agonist Pam₃Cys-Ser-Lys₄ selbst in einer Konzentration von 10µg/ml zu keinem signifikanten Anstieg der ApoJ-mRNA-Menge in serumfrei kultivierten CRL2018-Zellen. Die synthetische doppelsträngige RNA Poly(I:C) hingegen ist in der Lage, in konzentrationsabhängiger Weise die ApoJ-mRNA-Expression in diesen Zellen zu induzieren. Bereits eine Konzentration von 2µg/ml des TLR3-spezifischen Agonisten führt zu einem deutlichen Anstieg des ApoJ-mRNA-Gehaltes in CRL2018-Zellen (Faktor 1,7). Zellen, die mit 250µg/ml Poly(I:C) inkubiert wurden, weisen gegenüber den Kontrollen einen um Faktor 6,5

erhöhten Gehalt an ApoJ-mRNA auf. Der TLR4-spezifische Agonist Lipopolysaccharid (LPS) hat verglichen mit Poly(I:C) relativ geringen Einfluss auf die ApoJ-Regulation in CRL2018-Zellen. Eine deutliche Akkumulation von ApoJ-mRNA ist hierbei nur in den Zellen nachweisbar, die mit einer Konzentration von mindestens 1µg/ml LPS inkubiert wurden (Faktor 1,5). Eine 10-fach höhere Konzentration an LPS (10µg/ml) führt zu keinem deutlich stärkeren Effekt.

Dass von den eingesetzten Substanzen ausschließlich Poly(I:C) zu einer starken Induktion der ApoJ-mRNA-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018 führt, lässt vermuten, dass von den drei Toll-like Rezeptoren TLR2, TLR3 und TLR4 vor allem die Aktivierung TLR3-vermittelter Signaltransduktionskaskaden zu einer Induktion der transkriptionellen Aktivität des ApoJ-Gens führt. Die Aktivierung einer TLR2- bzw. TLR4-abhängigen Signaltransduktion scheint hingegen keinen bzw. nur geringen Einfluss auf die transkriptionelle Regulation des ApoJ-Gens zu besitzen. Mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung ApoJ-spezifischer Antikörper konnte in parallelen Experimenten unserer Arbeitsgruppe zudem gezeigt werden, dass es bei Inkubation mit 50µg/ml Poly(I:C) zu einer deutlich verstärkten Akkumulation von ApoJ im Kulturmedium von CRL2018-Zellen kommt (M. Schwarz, unveröffentlicht). Dies zeigt, dass die Inkubation mit Poly(I:C) nicht nur die Expression von ApoJ-mRNA induziert sondern auch zu einer gesteigerten Synthese sowie zu einer vermehrten Sekretion des reifen Proteins führt.

3.4.2 Die ApoJ-mRNA-Expression in CRL2018-Zellen wird spezifisch durch doppelsträngige RNA induziert

TLR3 ist als Rezeptor beschrieben, der spezifisch durch doppelsträngige RNA aktiviert wird (Alexopoulou et al. 2001, Matsumoto et al. 2002). Um eine TLR3-vermittelte Regulation des ApoJ-Gens zu bestätigen, sollte in einem weiteren Experiment untersucht werden, ob die doppelsträngige Struktur der synthetischen RNA Poly(I:C) notwendig für die ApoJ-induzierende Wirkung ist. Hierzu wurden glatte Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018 nach 24-stündiger Präinkubation in ITS-supplementiertem serumfreiem Medium für 16h mit jeweils 10µg/ml und 50µg/ml der doppelsträngigen RNA Poly(I:C), den beiden einzelsträngigen Ribonukleinsäuren Polyinosin (Poly(I)) und Polycytidin (Poly(C)) sowie 50µg/ml doppelsträngiger DNA in Form von Polydesoxyinosin-Polydesoxycytidin (Poly(dI:dC)) inkubiert. Zudem sollte überprüft werden, ob eine vorausgehende Hybridisierung der beiden komplementären einzelsträngigen Ribonukleinsäuren Poly(I) und Poly(C) zu einer veränderten ApoJ-mRNA-Expression führt. Hierzu wurde CRL2018-Zellen in einem weiteren Ansatz jeweils 10µg/ml Poly(I) und Poly(C) sowie jeweils 50µg/ml Poly(I) und Poly(C) nach vorangegangener 1-stündiger Hybridisierung in PBS^{-/-} bei Raumtemperatur zugesetzt. Kontrollen wurden in serumfreiem Medium allein inkubiert. Da sämtliche synthetischen Nukleinsäuren in PBS^{-/-} gelöst vorlagen, wurde weiteren Zellen ein entsprechendes Volumen an PBS^{-/-} zugesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der ApoJ-mRNA-Gehalt der CRL2018-Zellen nach Präparation der Gesamt-RNA mittels Northern-Blot-Analyse untersucht.

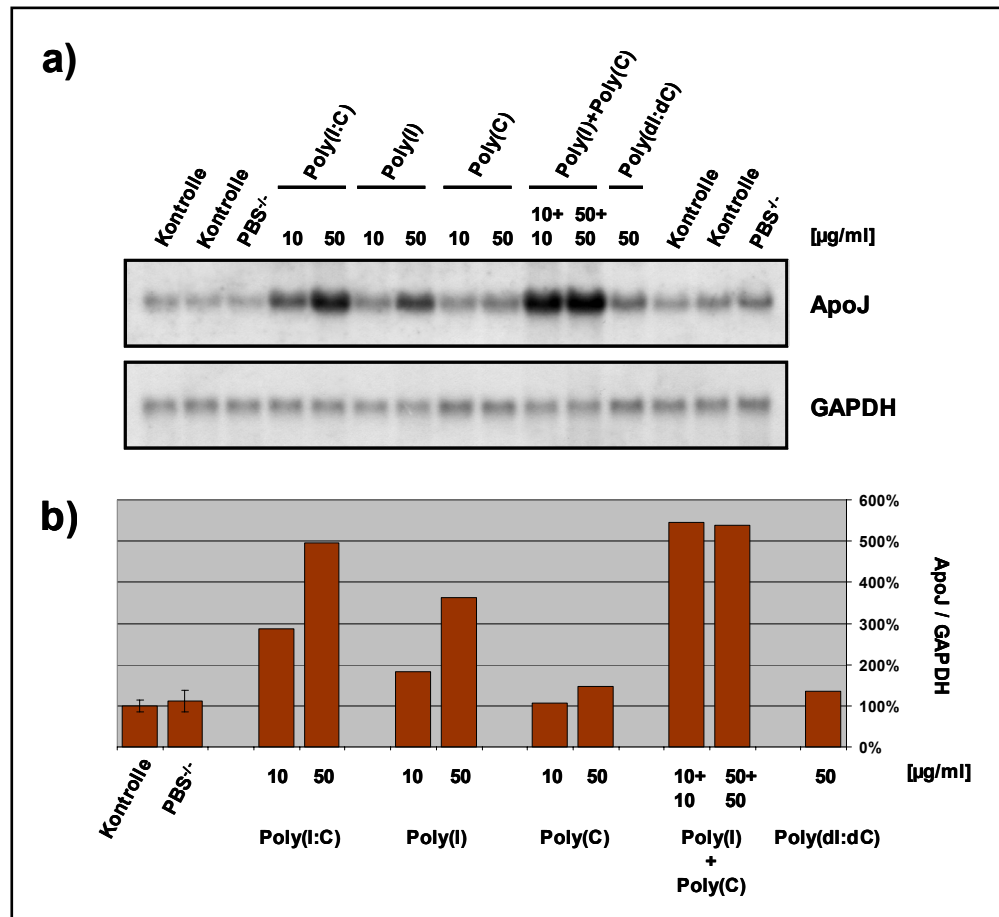


Abbildung 3.4.2: Einfluss synthetischer Nucleinsäuren auf die ApoJ-mRNA-Expression in CRL2018-Zellen: **a)** Northern-Blot-Analyse von 15µg Gesamt-RNA aus CRL2018-Zellen, die für 16h unter serumfreien Bedingungen mit jeweils 10µg/ml und 50µg/ml Poly(I:C), Poly(I) und Poly(C) bzw. 50µg/ml Poly(dI:dC) inkubiert wurden. Weitere Zellen wurden mit Poly(I) und Poly(C) nach 1-stündiger Hybridisierung dieser beiden komplementären Ribonucleinsäuren inkubiert (Poly(I)+Poly(C)). Die Konzentrationen der beiden Ribonucleinsäuren betrug hierbei jeweils 10µg/ml bzw. 50µg/ml. Kontrollzellen wurden mit serumfreiem Medium allein inkubiert (Kontrollen). Weiteren Zellen wurde 1ml PBS^{-/-} zugesetzt (PBS^{-/-}). **b)** Densitometrische Auswertung der Northern-Blot-Analyse aus a). Die Intensitäten der ApoJ-Banden wurden zu den Intensitäten der entsprechenden GAPDH-Banden ins Verhältnis gesetzt und sind als relatives Verhältnis bezogen auf den Wert der Kontrolle (Mittelwert ± Standardabweichung der Vierfachbestimmung) dargestellt. Der ApoJ-mRNA-Gehalt der mit PBS^{-/-} inkubierten Zellen wurde in einer Zweifachbestimmung ermittelt und ist ebenfalls relativ zu den Kontrollen dargestellt (Mittelwert ± Standardabweichung der Zweifachbestimmung).

Neben der doppelsträngigen Ribonucleinsäure Poly(I:C) führt auch die Inkubation mit 50µg/ml Poly(I) und den beiden prähybridisierten komplementären einzelsträngigen Ribonucleinsäuren Poly(I)+Poly(C) zu einer deutlichen Induktion der ApoJ-mRNA-Expression in CRL2018-Zellen (Abb. 3.4.2). Einzelsträngige RNA in Form von Poly(C) sowie die doppelsträngige DNA Poly(dI:dC) sind hingegen nicht in der Lage, die transkriptionelle Aktivität des ApoJ-Gens deutlich zu erhöhen. Poly(I) hingegen führt in einer Konzentration von 10µg/ml zu einer vergleichsweise schwachen (Faktor 1,8) und in einer Konzentration von 50µg/ml zu einer deutlichen (Faktor 3,6) Akkumulation von ApoJ-mRNA. Zellen, die mit den beiden prähybridisierten komplementären einzelsträngigen Ribonucleinsäuren Poly(I)+Poly(C) inkubiert wurden, besitzen einen um Faktor 5,4 erhöhten ApoJ-mRNA-Gehalt. Dieser Synergismus der ApoJ-induzierenden Wirkung von Poly(I) und Poly(C) lässt sich höchstwahrscheinlich auf die Ausbildung doppelsträngiger RNA-Strukturen zurückführen, die

während der 1-stündigen Präinkubation durch Hybridisierung beider komplementären RNAs miteinander entstanden sind. Dies führte zur Rekonstitution der Struktur und der ApoJ-induzierenden Wirkung von Poly(I:C). Ähnlich könnte sich die Induktion der ApoJ-Genexpression durch Poly(I) erklären lassen, das im Gegensatz zu Poly(C) in der Lage ist, inter- und intramolekulare doppelsträngige Bereiche auszubilden. Grund hierfür ist die Eigenschaft des Inosins, nicht nur mit Cytosin, Adenosin oder Uracil zu paaren, sondern auch mit anderen Inosinmolekülen unter Ausbildung zweier Wasserstoffbrücken Basenpaarungen einzugehen. Poly(C) hingegen benötigt zur Ausbildung doppelsträngiger Bereiche die Gegenwart anderer komplementärer Nukleotide wie Inosin oder Guanosin. Poly(C) alleine ist folglich nicht in der Lage doppelsträngige Strukturen auszubilden, was erklären würde, dass es keinen Einfluss auf die ApoJ-Genexpression von CRL2018-Zellen besitzt. Dass die synthetische doppelsträngige DNA Poly(dI:dC), die sich in ihrer Basenzusammensetzung nicht von Poly(I:C) unterscheidet, ebenfalls zu keiner deutlichen Akkumulation von ApoJ-mRNA führt, zeigt zudem, dass die transkriptionelle Aktivität des ApoJ-Gens nicht generell durch doppelsträngige Nukleinsäuren sondern vielmehr spezifisch durch doppelsträngige RNA reguliert wird.

Zusammenfassend zeigt dieses Experiment, dass unter Verwendung synthetischer Nukleinsäuren ausschließlich die Inkubation mit RNA, die doppelsträngige Strukturen besitzt bzw. ausbilden kann, zu einer Akkumulation von ApoJ-mRNA in den verwendeten CRL2018-Zellen führt. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass eine Aktivierung von TLR3, der als Rezeptor für doppelsträngige RNA beschrieben ist, zu einer vermehrten Expression von ApoJ in glatten Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018 führt.

3.4.3 Additive Wirkung von Pam₃Cys-Ser-Lys₄ und LPS auf die durch Poly(I:C) induzierte ApoJ-mRNA-Expression in CRL2018-Zellen

Da es während der zellulären Nekrose zu einem Verlust der Plasmamembranintegrität kommt, ist es wahrscheinlich, dass verschiedene potentielle endogene TLR-Agonisten von nekrotischen Zellen freigesetzt bzw. exponiert werden. Diese könnten schließlich in vitalen Nachbarzellen eine Aktivierung mehrerer unterschiedlicher Toll-like Rezeptoren bewirken. Denkbar wäre, dass neben doppelsträngiger RNA als TLR3-Agonisten auch diverse Mitglieder der Familie der Hitzeschockproteine nach Freisetzung aus nekrotischen Zellen als endogene TLR2- bzw. TLR4-Agonisten fungieren. Dies wiederum könnte dazu führen, dass nekrotische Zellen eine parallele Aktivierung TLR2-, TLR3- und TLR4-vermittelter Signaltransduktionskaskaden in vitalen Zellen bewirken. Im Vergleich zur Aktivierung einzelner spezifischer TLR-abhängiger Signaltransduktionskaskaden könnte somit in Gegenwart verschiedener TLR-Agonisten die zelluläre Genexpression auf unterschiedliche Weise modifiziert werden. Deshalb sollte in einem weiteren Experiment untersucht werden, ob verschiedene Kombinationen von Pam₃Cys-Ser-Lys₄, Poly(I:C) und LPS in unterschiedlicher Weise die Regulation der ApoJ-mRNA-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen beeinflussen.

Hierzu wurden CRL2018-Zellen nach 24-stündiger Präinkubation in 9ml ITS-supplementiertem serumfreiem Medium für 18h mit jeweils 1µg/ml Pam₃Cys-Ser-Lys₄, 25µg/ml Poly(I:C) und 1µg/ml LPS allein sowie mit verschiedenen Kombinationen dieser Substanzen inkubiert. Kontrollen wurden in serumfreiem Medium kultiviert. Anschließend wurde der ApoJ-mRNA-Gehalt der CRL2018-Zellen nach Präparation der Gesamt-RNA mittels Northern-Blot-Analyse untersucht.

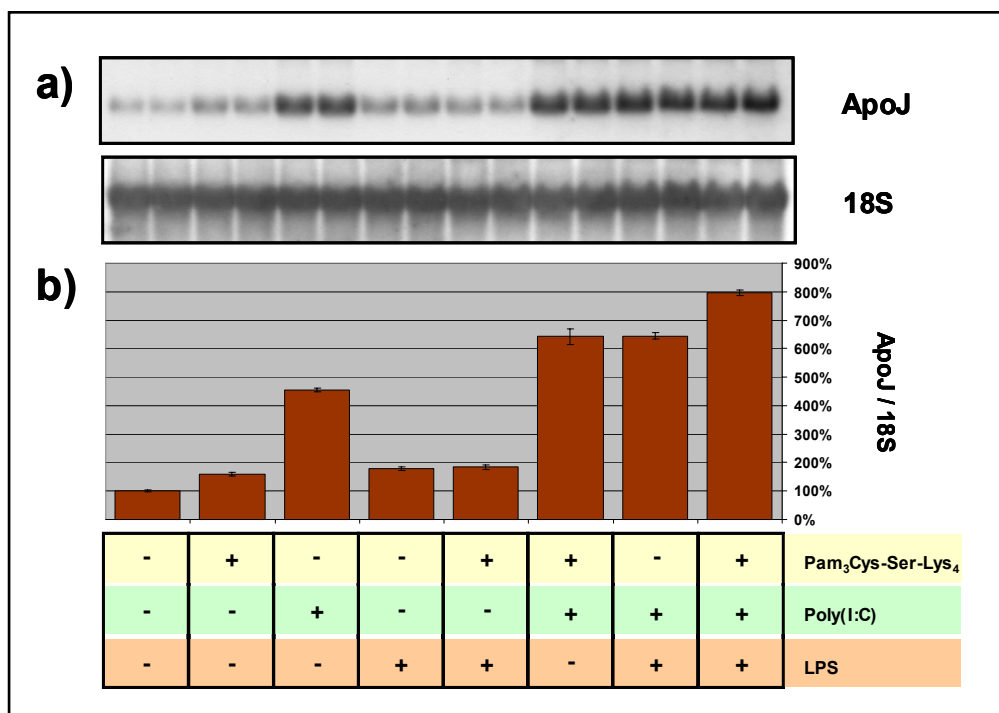


Abbildung 3.4.3: Additive Wirkung von Pam₃Cys-Ser-Lys₄ und LPS auf die durch Poly(I:C) induzierte ApoJ-mRNA-Expression in CRL2018-Zellen: a) Northern-Blot-Analyse von 15µg Gesamt-RNA aus CRL2018-Zellen, die unter serumfreien Bedingungen für 18h in Gegenwart (+) oder Abwesenheit (-) von 1µg/ml Pam₃Cys-Ser-Lys₄, 25µg/ml Poly(I:C) und 1µg/ml LPS allein sowie mit verschiedenen Kombinationen dieser TLR-Agonisten inkubiert wurden. b) Densitometrische Auswertung der Northern-Blot-Analyse aus a). Die Intensitäten der ApoJ-Banden wurden zu den Intensitäten der entsprechenden 18S-Banden ins Verhältnis gesetzt und sind als relatives Verhältnis bezogen auf den Wert der Kontrollen dargestellt (Mittelwert ± Standardabweichung der Zweifachbestimmung).

Wie Abbildung 3.4.3 zeigt, führt die Inkubation der CRL2018-Zellen mit Poly(I:C) zu einer starken Akkumulation von ApoJ-mRNA (Faktor 4,6). Die ApoJ-induzierende Wirkung von Pam₃Cys-Ser-Lys₄ und LPS ist hingegen deutlich schwächer. Während Zellen, die mit dem TLR2-spezifischen Agonisten inkubiert wurden (Pam₃Cys-Ser-Lys₄), einen um Faktor 1,6 erhöhten ApoJ-mRNA-Gehalt aufweisen besitzen Zellen, die in Gegenwart von LPS als TLR4-spezifischen Agonisten kultiviert wurden, eine um Faktor 1,8 erhöhte Menge an ApoJ-mRNA enthalten. Dies bestätigt, dass unter den verwendeten TLR-Agonisten vor allem die synthetische doppelsträngige RNA Poly(I:C) als TLR3-spezifischer Agonist zu einer starken Induktion der ApoJ-mRNA-Expression führt. Weiterhin zeigt dieses Experiment, dass Pam₃Cys-Ser-Lys₄ in Gegenwart von LPS zu keiner zusätzlichen Akkumulation von ApoJ-mRNA führt. Dies könnte daraufhin deuten, dass eine von TLR2 und TLR4 vermittelte Signaltransduktion hinsichtlich der Regulation des ApoJ-Gens redundant ist und in Gegenwart von 1µg/ml des TLR4-spezifischen Agonisten LPS bereits maximal aktiviert ist. Bei

Inkubation mit Poly(I:C) und Pam₃Cys-Ser-Lys₄ bzw. mit Poly(I:C) und LPS ist in beiden Fällen eine um Faktor 1,4 stärkere Akkumulation von ApoJ-mRNA zu beobachten als unter Verwendung von Poly(I:C) alleine. Dies zeigt, dass eine TLR2- bzw. TLR4-vermittelte Signaltransduktion in additiver Weise die TLR3-vermittelte Induktion der ApoJ-Genexpression verstärkt. Zudem führt die gemeinsame Inkubation mit allen drei TLR-Agonisten zu einer zusätzlichen Akkumulation von ApoJ-mRNA. Zellen, die in Gegenwart von Pam₃Cys-Ser-Lys₄, Poly(I:C) und LPS kultiviert wurden, weisen gegenüber den Kontrollen einen um Faktor 8,0 erhöhten Gehalt an ApoJ-mRNA auf, wohingegen die Inkubation mit Pam₃Cys-Ser-Lys₄ und Poly(I:C) bzw. LPS und Poly(I:C) jeweils nur zu einer 6,4-fachen Induktion der ApoJ-Genexpression führt. Dies zeigt, dass in Gegenwart von Poly(I:C) eine gleichzeitige Aktivierung TLR2- und TLR4-vermittelter Signaltransduktionswege die ApoJ-mRNA-Expression in synergistischer Weise beeinflusst.

Zusammenfassend zeigt dieses Experiment, dass die Inkubation von CRL2018-Zellen mit mehreren verschiedenen TLR-Agonisten zu einer verstärkten Induktion der ApoJ-Genexpression führen kann. Voraussetzung hierfür ist jedoch die Gegenwart von Poly(I:C) und damit einhergehend die Aktivierung von TLR3. Zudem weisen Pam₃Cys-Ser-Lys₄ und LPS hinsichtlich ihrer ApoJ-induzierenden Wirkung deutliche Ähnlichkeiten auf, was vermuten lässt, dass in den verwendeten glatten Gefäßmuskelzellen die Aktivierung von TLR2 und TLR4 zu einer Induktion ähnlicher Signaltransduktionskaskaden führt, die gegenüber TLR3-abhängigen Signaltransduktionskaskaden einen vergleichsweise geringen Einfluss auf die ApoJ-Genexpression besitzen. Unter der Voraussetzung, dass nekrotische Zellen durch Freisetzung bzw. Exposition endogener Agonisten in TLR-abhängiger Weise die ApoJ-Genexpression in lebenden Zellen induzieren, wäre somit denkbar, dass unterschiedliche Komponenten nekrotischer Zellen verschiedene Toll-like Rezeptoren aktivieren, welche schließlich in kooperativer Weise die Regulation des ApoJ-Gens beeinflussen könnten.

3.4.4 Kinetische Analyse der durch Poly(I:C) induzierten Expression von ApoJ-mRNA in CRL2018-Zellen

Eine Inkubation von Makrophagen und humanen Embryonalfibroblasten (HEK293) mit Poly(I:C) führt in TLR3-abhängiger Weise zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB und zu einer Induktion der Expression der TypI-Interferone IFN-α und IFN-β (Alexopoulou et al. 2001, Matsumoto et al. 2002, Oshiumi et al. 2003, Jiang et al. 2004). Nach Sekretion in den extrazellulären Raum vermitteln diese Interferone in autokriner/parokriner Weise die Expression weiterer Gene. Somit lassen sich Gene, deren Expression in TLR3-abhängiger Weise erhöht wird, in zwei verschiedenen Gruppen aufteilen. Gene wie z.B. IFN-β, für deren Aktivierung eine funktionelle Proteinbiosynthese nicht notwendig ist, werden als primär induzierte Gene bezeichnet. Deren Expression wird nach Aktivierung von TLR3 direkt durch Transkriptionsfaktoren induziert, wobei NF-κB und IRF-3 (interferon regulatory factor 3) eine zentrale Rolle spielen. Für die TLR3-abhängige Expression einer zweiten Gruppe von Genen ist hingegen eine funktionelle Proteinbiosynthese notwendig. Diese werden im Rahmen einer sekundären Antwort in autokriner/parokriner Weise durch IFN-β und/oder

IFN- α reguliert Dieser biphasische Charakter der zellulären Antwort nach Aktivierung von TLR3 äußert sich auch im zeitlichen Verlauf der Regulation primär und sekundär induzierter Gene. Während eine Induktion primär regulierter Gene bereits nach 1-2h erfolgt, ist eine IFN- β -vermittelte Induktion sekundär regulierter Gene verzögert und erst nach etwa 2-6h detektierbar (Doyle et al. 2002).

Um nähere Informationen darüber zu erhalten, ob die Induktion der ApoJ-Genexpression bei Inkubation glatter Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018 mit Poly(I:C) Teil einer TLR3-vermittelten primären oder sekundären IFN- β -abhängigen Antwort darstellt, sollte der zeitliche Verlauf der durch Poly(I:C) induzierten ApoJ-Regulation mit dem primär (IFN- β) und sekundär (TLR3, iNOS) regulierter Gene verglichen werden. Dass eine Inkubation von Makrophagen und dendritischen Zellen mit Poly(I:C) zu einer vermehrten Expression des Toll-like Rezeptors 3 sowie zu einer Induktion der Genexpression der induzierbaren Stickstoffmonoxid- (NO-) Synthase (iNOS, NOS2) und damit einhergehen zu einer vermehrten Produktion von Stickstoffmonoxid führt, wurde bereits beschrieben (Doyle et al. 2003, Tanabe et al. 2003, Kariko et al. 2004a, Alexopoulou et al. 2001, Punturieri et al. 2004, Whitmore et al. 2004). Während unter diesen Bedingungen die TLR3-Expression scheinbar ausschließlich in autokriner/parakriner Weise durch TypI-Interferone, insbesondere IFN- β , vermittelt wird, ist für die Induktion der iNOS-Expression eine zusätzliche Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B essentiell. Eine IFN- β -induzierte Signaltransduktion führt hierbei zusammen mit aktiviertem NF- κ B in synergistischer Weise zu einer starken Expression dieses Enzyms (Doyle et al. 2003, Heinz et al. 2003, Fujihara et al. 1994, Gao et al. 1998, Jacobs und Ignarro 2001, Toshchakov et al. 2002, Heitmeier et al. 1998). Zusätzlich sollte in diesem Experiment der Einfluss von Poly(I:C) auf die Regulation des TypI-Interferons IFN- α 1 als Vertreter der IFN- α -Multigenfamilie untersucht werden.

Zur Überprüfung des zeitlichen Verlaufs der durch Poly(I:C) induzierten ApoJ-mRNA-Expression wurden CRL2018-Zellen nach 24-stündiger Präinkubation in 9ml ITS-supplementiertem serumfreiem Medium für 1-24h mit 50 μ g/ml Poly(I:C) inkubiert. Kontrollzellen wurden in serumfreiem Medium kultiviert. Anschließend wurde der ApoJ-, TLR3-, und iNOS-mRNA-Gehalt der CRL2018-Zellen nach Präparation der Gesamt-RNA mittels Northern-Blot-Analyse untersucht. Ebenso wurde mit zwei Proben verfahren, die von Zellen stammen, die zu Beginn des Experimentes (0h) geerntet wurden. Die Analyse des IFN- β - und IFN- α 1-mRNA-Gehaltes erfolgte, wie unter 2.2.5.5.2.4 beschrieben, mittels semiquantitativer RT-PCR unter Verwendung genspezifischer Primer. Hierbei dienen PCRs mit iNOS-spezifischen Primern als Kontrolle, um das Ergebnis der Northern-Blot-Analyse zu bestätigen. Zur Überprüfung der für die einzelnen Reaktionen eingesetzten Mengen an revers transkribierter RNA wurden PCRs mit GAPDH-spezifischen Primern durchgeführt. Jeweils 10 μ l (IFN- β), 5 μ l (IFN- α 1), 10 μ l (iNOS) und 7,5 μ l (GAPDH) der entsprechenden PCR-Ansätze wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (1,5% Agarose) analysiert.

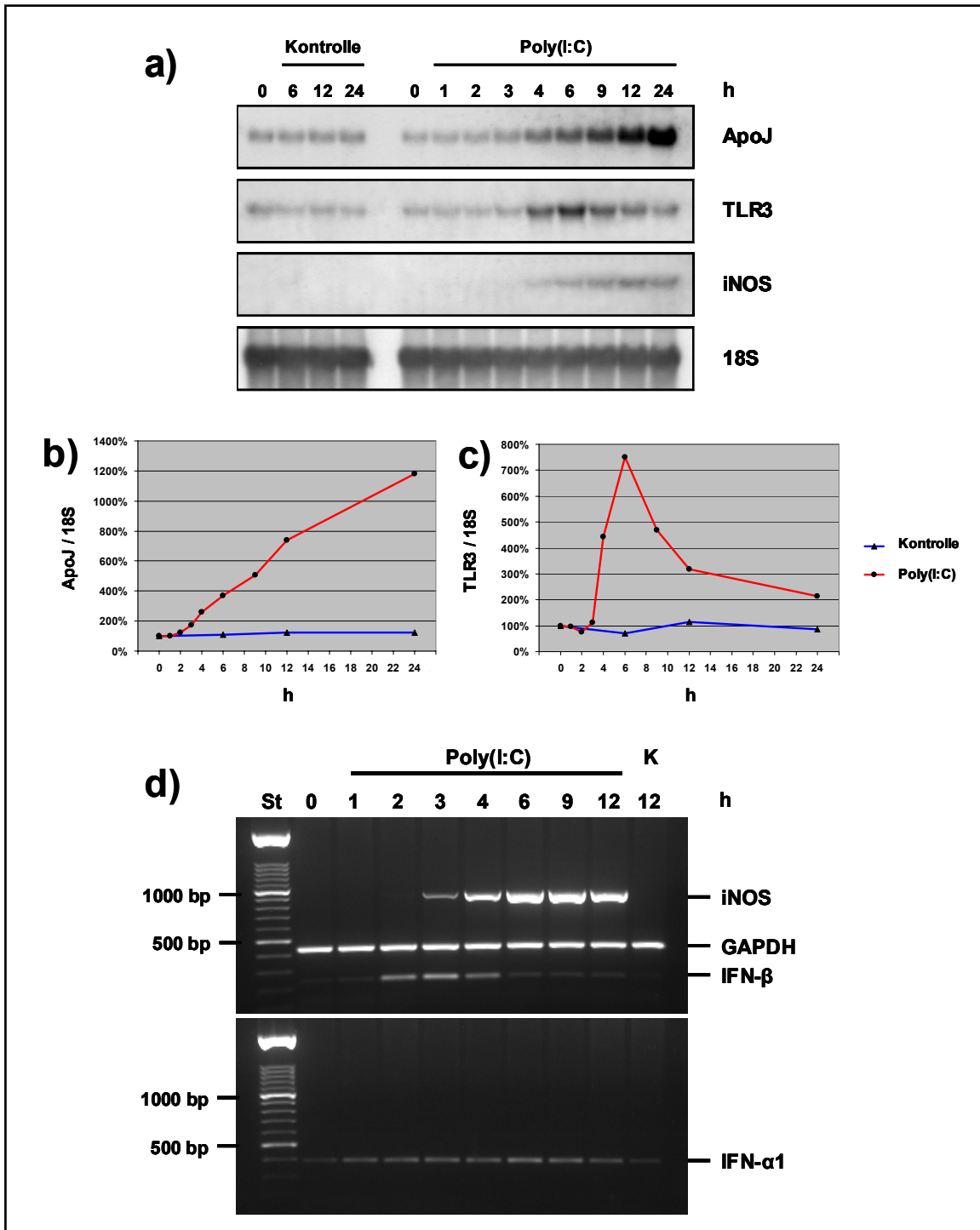


Abbildung 3.4.4: Zeitlicher Verlauf der durch Poly(I:C) induzierten ApoJ-, TLR3-, iNOS-, IFN-β- und IFN-α1-mRNA-Expression in CRL2018-Zellen: **a)** Northern-Blot-Analyse von 15µg Gesamt-RNA aus CRL2018-Zellen zu Beginn des Experimentes (0h) und nach Inkubation für 1-24h mit 50µg/ml Poly(I:C). Kontrollen (K) wurden für 6h, 12h und 24h mit serumfreiem Medium allein inkubiert. **b+c)** Densitometrische Auswertung der Northern-Blot-Analyse aus **a)**. Die Intensitäten der ApoJ- (**b**) bzw. TLR3-Banden (**c**) wurden zu den Intensitäten der entsprechenden 18S-Banden ins Verhältnis gesetzt und sind als relatives Verhältnis bezogen auf den Wert zu Beginn des Experimentes (0h) dargestellt. Eine Quantifizierung der relativen Mengen an iNOS-mRNA konnte aufgrund des nicht detektierbaren Hybridisierungssignals bei den Kontrollen nicht durchgeführt werden. **d)** Semiquantitative RT-PCR zur Analyse des relativen Gehaltes an IFN-β-, IFN-α1- und iNOS-mRNA in CRL2018-Zellen zu Beginn des Experimentes (0h) und nach Inkubation für 1-12h mit 50µg/ml Poly(I:C). Revers transkribierte RNA aus Zellen, die für 12h mit serumfreiem Medium allein inkubiert wurden, diente als Kontrolle (K). Die einzelnen PCR-Ansätze wurden mittels Agarosegelelektrophorese (1,5% Agarose) analysiert. Die Größe der einzelnen PCR-Amplifikate beträgt 927 bp (iNOS), 239 bp (IFN-β), 389 bp (IFN-α1) bzw. 437 bp (GAPDH). Zusätzlich wurden 500ng DNA eines Längenstandards (XIV, Roche Diagnostics) aufgetragen (St).

Die Inkubation glatter Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018 mit Poly(I:C) führt sowohl zu einer Akkumulation der ApoJ-mRNA als auch zu einer Erhöhung der Menge an TLR3- und iNOS-spezifischer mRNA (Abb. 3.4.4 a). Dies zeigt deutlich, dass die in Makrophagen und dendritischen Zellen beschriebene Induktion der TLR3- bzw. iNOS-Genexpression durch Poly(I:C) auch in glatten Gefäßmuskelzellen erfolgt (Doyle et al. 2003, Whitmore et al. 2004). Eine durch Poly(I:C) induzierte Akkumulation von ApoJ-mRNA ist in diesem Experiment nach etwa 3-4h detektierbar. Im weiteren Verlauf des Experimentes kommt es zu einem linearen Anstieg des ApoJ-mRNA-Gehaltes in CRL2018-Zellen. Gegenüber Zellen zu Beginn des Experimentes (0h) führt eine 24-stündige Inkubation mit Poly(I:C) zu einer um Faktor 11,8 erhöhten Menge an zellulärer ApoJ-mRNA (Abb. 3.4.4 b). Der ApoJ-mRNA-Gehalt der Kontrollzellen, die mit serumfreiem Medium allein inkubiert wurden, bleibt hingegen über den gesamten experimentellen Zeitraum von 24h nahezu konstant. Weiterhin sieht man, dass Poly(I:C) eine transiente Akkumulation von TLR3-mRNA induziert (Abb. 3.4.4 c). Der Beginn der TLR3-mRNA-Akkumulation erfolgt nach etwa 4h. Nach einer Inkubationsdauer von 6h ist das Maximum (Faktor 7,5) der Poly(I:C) induzierten TLR3-mRNA-Akkumulation erreicht. Im weiteren Verlauf des Experimentes nimmt die TLR3-mRNA-Menge der Zellen wieder ab. Der TLR3-mRNA-Gehalt der Kontrollzellen hingegen bleibt während des gesamten Experimentes nahezu unverändert. Ein iNOS-mRNA-spezifisches Hybridisierungssignal ist in diesem Experiment nur in den Proben detektierbar, die von Zellen stammen, welche für mindestens 4h mit Poly(I:C) inkubiert wurden (Abb. 3.4.4 a). Dies zeigt deutlich, dass in den verwendeten glatten Gefäßmuskelzellen auch die transkriptionelle Aktivität des iNOS-Gens durch Poly(I:C) positiv reguliert wird.

Die durch Poly(I:C) induzierte Akkumulation von iNOS-mRNA lässt sich ebenfalls durch eine semiquantitative RT-PCR-Analyse der entsprechenden Gesamt-RNAs nachweisen (Abb. 3.4.4 d), was den quantitativen Charakter dieser Methode bestätigt. Aufgrund der gegenüber der Northern-Blot-Analyse scheinbar höheren Sensitivität lässt sich mit Hilfe der RT-PCR-Analyse bereits nach einer 3-stündigen Inkubation mit Poly(I:C) ein iNOS-spezifisches Transkript in der Gesamt-RNA nachweisen. Unter Verwendung von RNA aus Zellen zu Beginn des Experimentes (0h) sowie aus Zellen, die für weniger als 3h mit Poly(I:C) oder für 12h mit serumfreiem Medium allein (K) inkubiert wurden, ist nach RT-PCR mit iNOS-spezifischen Primern kein PCR-Amplifikat detektierbar. Eine RT-PCR-Analyse mit spezifischen Primern für das Typ1-Interferon IFN- β zeigt, dass Zellen, die für 2-4h mit Poly(I:C) inkubiert wurden, einen deutlich erhöhten Gehalt an IFN- β -spezifischen Transkripten aufweisen. Dies lässt auf eine durch Poly(I:C)-induzierte transiente Regulation der IFN- β -Genexpression in einem Zeitraum von 2-4h schließen und zeigt, dass die in Makrophagen, dendritischen Zellen und Fibroblasten beschriebene Poly(I:C)-induzierte IFN- β -Genexpression auch in glatten Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018 erfolgt. Der Einfluss von Poly(I:C) auf die transkriptionelle Regulation des Typ1-Interferons IFN- α 1 ist hingegen weniger stark ausgeprägt. Nach RT-PCR unter Verwendung von RNA aus Zellen, die für 1h-12h mit Poly(I:C) inkubiert wurden, sind die Bandenintensitäten der IFN- α 1-spezifischen PCR-Amplifikate dennoch deutlich stärker als in den entsprechenden Kontrollproben (0h, 12h Kontrolle). Dies stimmt mit dem beschriebenen,

gegenüber der IFN- β -Regulation weniger starken Einfluss von Poly(I:C) auf die IFN- α -Genexpression in Makrophagen überein (Alexopoulou et al. 2001). In sämtlichen Proben weisen die Banden der GAPDH-spezifischen PCR-Amplifikate identische Intensitäten auf. Dies zeigt, dass für alle PCR-Ansätze gleiche Mengen an revers transkribierter RNA eingesetzt wurden und somit die Unterschiede in der Menge an iNOS-, IFN- β - und IFN- α -spezifischen PCR-Amplifikaten auf unterschiedliche mRNA-Konzentrationen in den verwendeten Proben zurückzuführen sein müssen. Das Ergebnis der dargestellten semiquantitativen RT-PCR konnte in zwei weiteren Experimenten bestätigt werden.

Vergleicht man den zeitlichen Verlauf der durch Poly(I:C) induzierten Akkumulation von ApoJ-mRNA mit der durch Poly(I:C) induzierten Regulation primärer (IFN- β) und sekundärer Gene (TLR3, iNOS), zeigt sich, dass die Induktion der transkriptionellen Aktivierung von ApoJ, TLR3 und iNOS nahezu zeitgleich etwa 3-4h nach Zugabe von Poly(I:C) erfolgt. Dem vorausgehend wird die Transkription des IFN- β -Gens bereits nach 1-2h induziert. Dies ist zum einen ein deutlicher Hinweis darauf, dass mit Poly(I:C) inkubierte CRL2018-Zellen vermehrt funktionelles IFN- β synthetisieren, das nach Sekretion in autokriner/parakriner Weise die Expression von TLR3 und iNOS vermittelt. Zum anderen deuten die Ähnlichkeiten im zeitlichen Verlauf der Regulation der TLR3-, iNOS- und ApoJ-mRNA-Expression darauf hin, dass eine autokrine/parakrine Wirkung von IFN- β auch an der durch Poly(I:C) induzierten ApoJ-Genexpression beteiligt sein könnte.

3.4.5 Einfluss nicht-synthetischer Ribonukleinsäuren auf die ApoJ-mRNA-Expression in CRL2018-Zellen

Wie gezeigt werden konnte, führt ausschließlich die Inkubation mit synthetischen Ribonukleinsäuren, die doppelsträngige Bereiche besitzen bzw. ausbilden können, zu einer vermehrten ApoJ-mRNA-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018 (Abb. 3.4.2), was ein deutlicher Hinweis auf eine Beteiligung des Toll-like Rezeptors 3 an der ApoJ-Genregulation ist. Dieser Rezeptor wird neben Poly(I:C) auch durch andere extrazelluläre doppelsträngige Ribonukleinsäuren wie dem synthetischen Homopolymer Polyadenosin-Polyuridin (Poly(A:U)), siRNA (small interfering RNA), shRNA (short hairpin RNA) sowie *in vitro* transkribierter mRNA aktiviert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch isolierte virale doppelsträngige RNA und aus Eiern des Endoparasiten *Schistosoma mansoni* präparierte RNA TLR3-Agonisten darstellen (Alexopoulou et al. 2001, Kariko et al. 2004a, Kariko et al. 2004b, Kariko et al. 2004c, Matsumoto et al. 2003, Aksoy et al. 2005).

Ausgehend von der Hypothese, dass die Inkubation mit nekrotischen Zellen ebenfalls zu einer Aktivierung dieses Rezeptors in vitalen Zellen führt und in TLR3-abhängiger Weise die ApoJ-Genexpression dieser Zellen induziert, lässt vermuten, dass in freigesetzter zellulärer RNA enthaltene doppelsträngige Sekundärstrukturen als potentiell endogene TLR3-Agonisten fungieren könnten, welche die ApoJ-induzierende Wirkung nekrotischer Zellen vermitteln. In diesem Zusammenhang sollte zunächst untersucht werden, ob bei Inkubation mit nicht-synthetischen Ribonukleinsäuren, ähnlich wie mit Poly(I:C), die ApoJ-mRNA-Expression in CRL2018-Zellen induziert wird. Hierfür wurden CRL2018-Zellen nach 24-stündiger Präinkubation in 9ml ITS-

supplementiertem serumfreiem Medium für 16h mit jeweils 5µg/ml, 50µg/ml und 500µg/ml aus Kalbsleber isolierter Gesamt-RNA (Typ IV), aus Hefe isolierter Gesamt-RNA (Typ III) und aus Hefe isolierter t-RNA inkubiert. Weitere Zellen wurden mit 10µg/ml und 50µg/ml Poly(I:C) inkubiert. Kontrollen wurden in serumfreiem Medium kultiviert. Da sämtliche Nukleinsäuren in PBS^{-/-} gelöst vorlagen, wurden weiteren Zellen 1ml PBS^{-/-} zugesetzt. Anschließend wurde der ApoJ-mRNA-Gehalt der CRL2018-Zellen nach Präparation der Gesamt-RNA mittels Northern-Blot-Analyse untersucht.

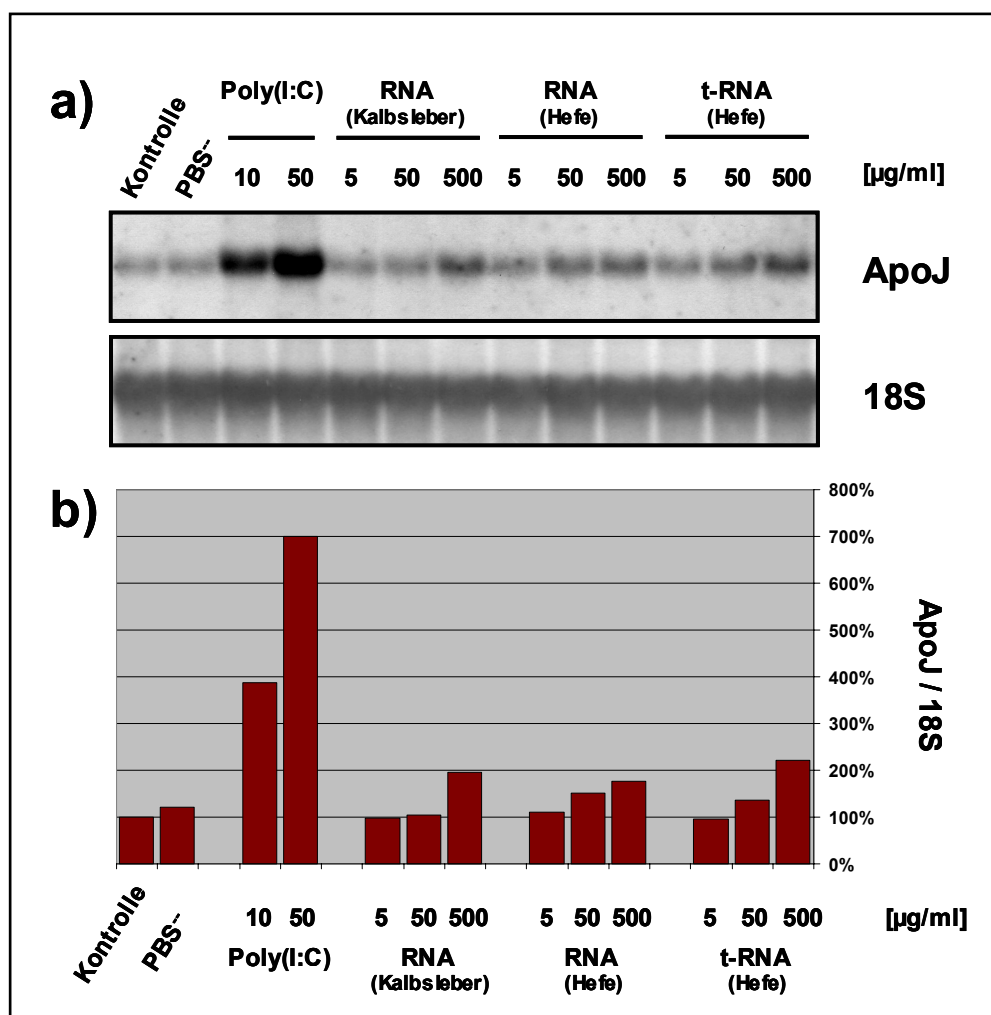


Abbildung 3.4.5: Einfluss nicht-synthetischer Ribonukleinsäuren auf die ApoJ-mRNA-Expression in CRL2018-Zellen: a) Northern-Blot-Analyse von 15µg Gesamt-RNA aus CRL2018-Zellen, die für 16h unter serumfreien Bedingungen mit 10µg/ml und 50µg/ml Poly(I:C) sowie jeweils 5µg/ml, 50µg/ml und 500µg/ml RNA aus Kalbsleber, RNA aus Hefe und t-RNA aus Hefe inkubiert wurden. Kontrollzellen wurden mit serumfreiem Medium allein inkubiert (Kontrolle). Weiteren Zellen wurde 1ml PBS^{-/-} zugesetzt (PBS^{-/-}) b) Densitometrische Auswertung der Northern-Blot-Analyse aus a). Die Intensitäten der ApoJ-Banden wurden zu den Intensitäten der entsprechenden 18S-Banden ins Verhältnis gesetzt und sind als relatives Verhältnis bezogen auf den Wert der Kontrolle dargestellt.

Wie Abbildung 3.4.5 zeigt, führt neben Poly(I:C) auch eine Inkubation mit Gesamt-RNA aus Kalbsleber und Hefe sowie aus Hefe isolierter t-RNA zu einer zu einer Akkumulation von ApoJ-mRNA in CRL2018-Zellen. Dies könnte auf eine Aktivierung des Toll-like Rezeptors 3 auch durch die

in diesem Experiment eingesetzten nicht-synthetischen Ribonukleinsäuren hindeuten. Verglichen mit Poly(I:C) sind jedoch relativ hohe Konzentrationen (500µg/ml) an Gesamt-RNA und t-RNA notwendig, um eine deutliche Erhöhung des zellulären ApoJ-mRNA-Gehaltes zu induzieren. Während Konzentrationen von 10µg/ml und 50µg/ml Poly(I:C) eine Akkumulation von ApoJ-mRNA um Faktor 3,9 bzw. 7,0 bewirken, führt die Inkubation mit jeweils 500µg/ml der verschiedenen nicht-synthetischen RNAs zu einem Anstieg der ApoJ-mRNA-Menge um Faktor 1,8-2,2. Dieser Unterschied lässt sich möglicherweise auf einen, gegenüber dem Homopolymer Poly(I:C), geringeren molaren Anteil doppelsträngiger Bereiche in den verwendeten nicht-synthetischen Ribonukleinsäuren erklären oder an den Nukleotidsequenzen liegen, die an der Ausbildung von Sekundärstrukturen beteiligt sind. Für letztgenannte Möglichkeit spricht, dass im Vergleich zu Poly(I:C) das synthetische Homopolymer Poly(A:U) deutlich weniger starke TLR3-aktivierende Eigenschaften besitzt (Alexopoulou et al. 2001). Das Ausmaß der ApoJ-mRNA-Expression, das durch die verwendeten nicht-synthetischen RNAs sowie durch 1×10^7 nekrotische Zellen induziert wird, liegt jedoch in etwa auf gleichem Niveau (ca. 2-fach). Somit besteht die Möglichkeit, dass auch aus nekrotischen Zellen freigesetzte oder membranassoziierte RNA ApoJ-induzierende Wirkung besitzen könnte.

3.4.6 Einfluss verschiedener Nukleasen auf die ApoJ-induzierenden Eigenschaften nekrotischer Zellen

Um eine Beteiligung von Ribonukleinsäuren an der Induktion der ApoJ-Genexpression durch nekrotische Zellen zu überprüfen, wurde in einem weiteren Experiment untersucht, inwiefern eine Präinkubation mit verschiedenen Nukleasen die ApoJ-induzierende Wirkung nekrotischer Zellen bzw. daraus präparierter löslicher Faktoren beeinflusst. Für dieses Experiment wurden drei verschiedene Endonukleasen mit unterschiedlicher Substratspezifität verwendet. Zur Überprüfung einer Beteiligung von Desoxyribonukleinsäuren an der ApoJ-Regulation wurde das Enzym DNase I eingesetzt, das in sequenzunspezifischer Weise ausschließlich einzelsträngige und doppelsträngige DNA-Moleküle hydrolysiert. Weiterhin wurde das Enzym RNase A eingesetzt, das spezifisch einzelsträngige RNA verdaut. Die Ausbildung intramolekularer Sekundärstrukturen ist Grund dafür, dass in zellulärer Gesamt-RNA ein gewisser Anteil doppelsträngiger RNA-Bereiche enthalten ist. Um den Einfluss dieser doppelsträngigen RNA-Bereiche auf die ApoJ-Genregulation zu überprüfen, wurden nekrotische Zellen und daraus präparierte lösliche Faktoren in weiteren Ansätzen mit dem Enzym Benzonase inkubiert. Benzonase (EC 3.1.30.2) ist eine rekombinant in *E. coli* exprimierte sekretierte Endonuklease des Bakteriums *Serratia marcescens*, die unspezifisch neben einzel- und doppelsträngige DNA auch einzelsträngige RNA und zu einem gewissen Anteil doppelsträngige RNA hydrolysiert (Moreno et al. 1991, Meiss et al. 1999).

Nach Präparation von 5×10^6 primär nekrotischen CRL2018-Zellen und der löslichen Fraktion von 5×10^6 primär nekrotischen CRL2018-Zellen in Form des 14.000×g Überstandes wurden diese für 4h bei 37°C mit 400µg/ml RNase A, 300U/ml Benzonase oder 60kU/µl DNase I inkubiert. Entsprechende Kontrollansätze wurden ohne Enzym für 4h sowohl bei 37°C als auch bei 4°C

inkubiert, um eine potentiell unspezifische Degradierung ApoJ-induzierender Faktoren während der 4-stündigen Inkubation bei 37°C zu erfassen. Nekrotische Zellen und der daraus präparierte 14.000×g Überstand lagen in serumfreiem Medium vor. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden jeweils 35µl der einzelnen Ansätze mittels nicht-denaturierender Agarosegelelektrophorese (2.2.5.3) analysiert, um den RNA- und DNA-Verdau auf Vollständigkeit zu überprüfen. Anschließend wurden die einzelnen Ansätze für eine Inkubation mit serumfrei kultivierten CRL2018-Zellen eingesetzt. Hierzu wurden CRL2018-Zellen nach 24-stündiger Präinkubation in 9ml ITS-supplementiertem serumfreiem Medium für 16h mit jeweils 1ml der einzelnen Ansätze inkubiert. Dies entsprach einer

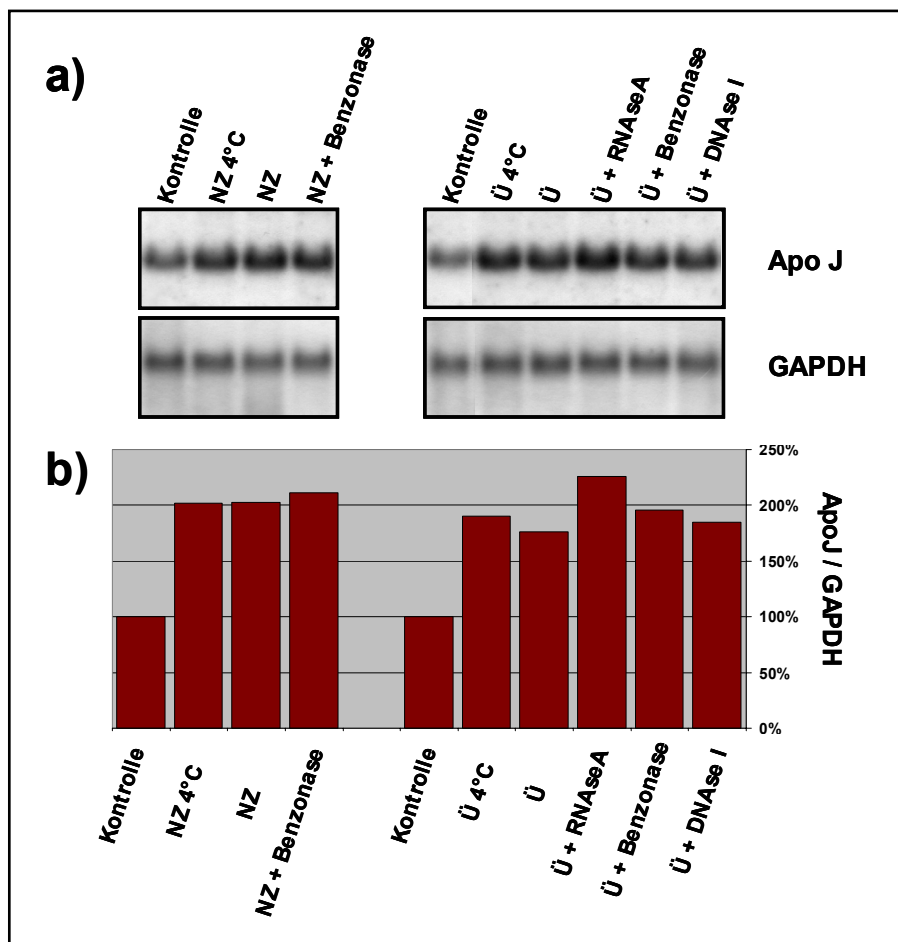


Abbildung 3.4.6: Einfluss verschiedener Nukleasen auf die ApoJ-induzierenden Eigenschaften nekrotischer Zellen: a) Northern-Blot-Analyse von 15µg Gesamt-RNA aus CRL2018-Zellen, die für 16h unter serumfreien Bedingungen mit 5×10^6 primär nekrotischen CRL2018-Zellen (NZ) und daraus präparierten 14.000×g Überstand (Ü) inkubiert wurden. Nekrotische Zellen sowie der 14.000×g Überstand wurden zuvor jeweils für 4h ohne Nukleasen bei 4°C (NZ 4°C, Ü 4°C) und 37°C (NZ, Ü) bzw. mit 400µg/ml RNase A, 300U/ml Benzonzase und 60kU/µl DNase I für 4h bei 37°C inkubiert. Kontrollzellen wurden mit serumfreiem Medium allein inkubiert (Kontrolle). b) Densitometrische Auswertung der Northern-Blot-Analyse aus a). Die Intensitäten der ApoJ-Banden wurden zu den Intensitäten der entsprechenden GAPDH-Banden ins Verhältnis gesetzt und sind als relatives Verhältnis bezogen auf den Wert der entsprechenden Kontrolle dargestellt.

Ergebnisse

Menge von 5×10^6 primär nekrotischen CRL2018-Zellen bzw. der löslichen Fraktion (14.000×g Überstand) von 5×10^6 primär nekrotischen CRL2018-Zellen. Kontrollen wurde 1ml serumfreies Medium zugesetzt. Anschließend wurde der ApoJ-mRNA-Gehalt der CRL2018-Zellen nach Präparation der Gesamt-RNA mittels Northern-Blot-Analyse untersucht.

Abbildung 3.4.6 zeigt, dass die Präinkubation nekrotischer Zellen mit Benzonase sowie die Präinkubation der löslichen Fraktion nekrotischer Zellen mit RNase A, Benzonase oder DNase I zu keiner Verminderung der ApoJ-induzierenden Eigenschaften führt. Unabhängig von den Bedingungen während der 4-stündigen Präinkubation induzieren nekrotische Zellen bzw. daraus präparierter 14.000×g Überstand eine Akkumulation von ApoJ-mRNA in CRL2018-Zellen (Faktor 1,8-2,3). Vor Beginn des Experimentes war nach nicht-denaturierender Agarosegelelektrophorese und anschließender Ethidiumbromidfärbung keine RNA in den mit RNase A und Benzonase verdauten Ansätzen detektierbar (ohne Abbildung). Dies zeigt, dass die ApoJ-induzierenden Faktoren nekrotischer Zellen resistent gegenüber einem 4-stündigem Verdau mit den hier verwendeten Nukleasen sind und deutet darauf hin, dass weder DNA noch RNA an der durch nekrotische Zellen induzierten ApoJ-mRNA-Expression in CRL2018-Zellen beteiligt ist. Um dies zu bestätigen und somit eine Beteiligung doppelsträngiger RNA an der ApoJ-Regulation definitiv auszuschließen, ist es jedoch notwendig, das Enzym RNase III in weiterführende Untersuchungen einzubeziehen. Dieses Enzym hydrolysiert spezifisch doppelsträngige RNA und ist unter physiologischen Bedingungen in der Lage, die TLR3-aktivierenden Eigenschaften aus Eiern des Parasiten *Schistosoma mansoni* isolierter RNA vollständig zu inaktivieren (Aksoy et al. 2005).

3.4.7 Einfluss von Pam₃Cys-Ser-Lys₄, Poly(I:C) und LPS auf die ApoJ-mRNA-Expression in Rat1- Fibroblasten und 10A-Zellen

Wie unter 3.3.6 gezeigt werden konnte, unterscheiden sich die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien CRL2018, Rat1 und 10A in der Expression verschiedener Toll-like Rezeptoren. Während glatte Muskelzellen der Zelllinie CRL2018 TLR2, TLR3 und TLR4 exprimieren, beschränkt sich die Expression in embryonalen Rattenfibroblasten der Zelllinie Rat1 auf TLR3 und TLR4. Murine embryonale Dottersackzellen der Zelllinie 10A hingegen exprimieren weder TLR2 noch TLR3 und scheinbar nur geringe Mengen an TLR4. Um eine Abhängigkeit der durch die verschiedenen TLR-Agonisten induzierten Genregulation von der Expression des jeweiligen Toll-like Rezeptors zu überprüfen, sollte in einem weiteren Experiment der Einfluss von Pam₃Cys-Ser-Lys₄, Poly(I:C) und LPS auf die transkriptionelle Regulation des ApoJ-, MMP3- und iNOS-Gens von CRL2018-, Rat1- und 10A-Zellen untersucht werden. Vergleichend hierzu sollte der Einfluss nekrotischer Zellen auf die Regulation dieser Gene überprüft werden.

CRL2018-Zellen, Rat1-Fibroblasten und 10A-Zellen wurden nach 24-stündiger Präinkubation in 9ml ITS-supplementiertem serumfreiem Medium für 18h mit jeweils 5×10^6 primär nekrotischen MEF-1-Zellen (embryonale Mausfibroblasten), 1µg/ml Pam₃Cys-Ser-Lys₄, 50µg/ml Poly(I:C) und 1µg/ml LPS in einem Gesamtvolumen von 10ml inkubiert. Entsprechende Kontrollen wurden jeweils in

serumfreiem Medium allein kultiviert. Anschließend wurde der ApoJ-, MMP-3-, bzw. iNOS-mRNA-Gehalt der Zellen nach Präparation der Gesamt-RNA mittels Northern-Blot-Analyse untersucht.

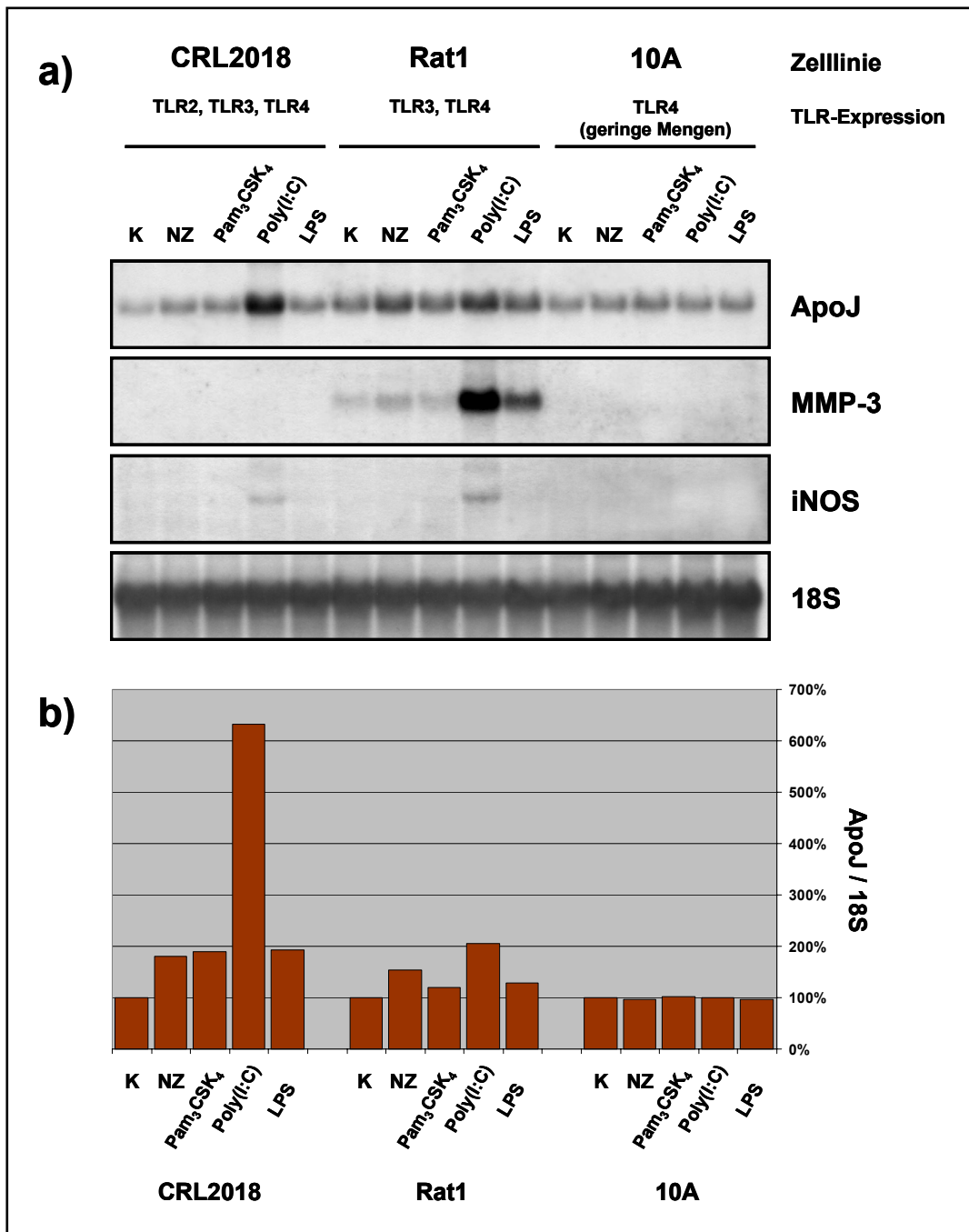


Abbildung 3.4.7: Einfluss von Pam₃Cys-Ser-Lys₄, Poly(I:C), LPS und nekrotischen Zellen auf die ApoJ-, MMP-3- und iNOS-mRNA-Expression in CRL2018-, Rat1- und 10A-Zellen: a) Northern-Blot-Analyse von 15µg Gesamt-RNA aus CRL2018-, Rat1- und 10A-Zellen, die unter serumfreien Bedingungen für 18h mit jeweils 5×10⁶ primär nekrotischen MEF-1-Zellen (NZ), 1µg/ml Pam₃Cys-Ser-Lys₄ (Pam₃CSK₄), 25µg/ml Poly(I:C) und 1µg/ml LPS inkubiert wurden. Kontrollen (K) wurden mit serumfreiem Medium allein inkubiert. b) Densitometrische Auswertung der Northern-Blot-Analyse aus a). Die Intensitäten der ApoJ-Banden wurden zu den Intensitäten der entsprechenden 18S-Banden ins Verhältnis gesetzt und sind als relatives Verhältnis bezogen auf den Wert der entsprechenden Kontrollen dargestellt.

Ergebnisse

Wie in Abbildung 3.4.7 zu sehen ist, bestätigt dieses Experiment, dass die Inkubation mit nekrotischen Zellen nur in glatten Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018 und embryonalen Fibroblasten der Zelllinie Rat1, nicht jedoch in embryonalen Dottersackzellen der Zelllinie 10A eine Akkumulation von ApoJ-mRNA induziert (CRL2018: Faktor 1,8; Rat1: Faktor 1,5). Gleiches gilt für die Inkubation mit Poly(I:C), das nur in den beiden TLR3-exprimierenden Zelllinien CRL2018 und Rat1, nicht jedoch in 10A-Zellen zu einer Erhöhung der ApoJ-mRNA-Expression führt. Dies bestätigt, dass eine durch Poly(I:C) induzierte Aktivierung der ApoJ-Gentranskription in TLR3-abhängiger Weise erfolgt. Das Ausmaß der durch Poly(I:C) induzierten Akkumulation von ApoJ-mRNA in Rat1-Fibroblasten (Faktor 2,1) ist jedoch deutlich geringer als in CRL2018-Zellen (Faktor 6,3). Während in CRL2018-Zellen die Inkubation mit Pam₃Cys-Ser-Lys₄ und LPS jeweils eine Erhöhung des ApoJ-mRNA-Gehaltes um Faktor 1,9 induziert, besitzen diese beiden TLR-Agonisten keinen deutlichen Einfluss auf die ApoJ-mRNA-Expression in Rat1-Zellen. In 10A-Zellen führt neben der Inkubation mit nekrotischen Zellen und Poly(I:C) auch die Inkubation mit Pam₃Cys-Ser-Lys₄ und LPS zu keinem Anstieg der intrazellulären ApoJ-mRNA-Menge.

Eine Untersuchung des zellulären Gehaltes an MMP-3-mRNA zeigt, dass nur in RNA, die aus Rat1-Fibroblasten stammt, eine mittels Northern-Blot-Analyse detektierbare Menge an MMP-3-spezifischer mRNA vorhanden ist. Dies bestätigt, dass von den drei verwendeten Zelllinien scheinbar ausschließlich Rat1-Zellen dieses Enzym exprimieren. Zudem wird die MMP-3-mRNA-Expression der Rat1-Fibroblasten nicht nur bei Inkubation mit nekrotischen Zellen, sondern auch in Gegenwart der TLR3- bzw. TLR4-spezifischen Agonisten Poly(I:C) und LPS induziert. Unterschiede bestehen jedoch im Ausmaß der MMP-3-induzierenden Wirkungen. Während nekrotische Zellen eine 1,6-fache MMP-3-mRNA-Akkumulation induzieren, führt die Inkubation mit Poly(I:C) und LPS zu einem deutlich stärkeren Anstieg des zellulären MMP-3-mRNA-Gehaltes (Faktor 14,7 bzw. Faktor 5,1). Pam₃Cys-Ser-Lys₄ hingegen besitzt keinen Einfluss auf die MMP-3-mRNA-Expression in Rat1-Fibroblasten, was vermutlich auf die fehlende Expression von TLR2 in diesen Zellen zurückzuführen ist.

Eine Analyse der transkriptionellen Regulation der iNOS-Genexpression zeigt, dass nur in Gesamt-RNA aus CRL2018- und Rat1-Zellen, die mit Poly(I:C) inkubiert wurden, durch Northern-Blot nachweisbare Mengen an iNOS-spezifischer mRNA vorhanden sind. In der entsprechenden Probe TLR3-negativer 10A-Zellen hingegen ist kein iNOS-mRNA-spezifisches Hybridisierungssignal detektierbar. Dies deutet darauf hin, dass auch in Rat1-Fibroblasten die Inkubation mit Poly(I:C) in TLR3-abhängiger Weise die Expression Interferon-regulierter Gene induziert. Die Inkubation mit nekrotischen Zellen, Pam₃Cys-Ser-Lys₄ und LPS hingegen führt scheinbar in keiner der drei verwendeten Zelllinien zu einer Induktion der iNOS-mRNA-Expression.

Dass in Rat1-Fibroblasten neben nekrotischen Zellen ausschließlich die Inkubation mit Poly(I:C) zu einer deutlichen Akkumulation von ApoJ-mRNA führt, könnte ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung von TLR3 an der durch nekrotische Zellen induzierten ApoJ-Genexpression sein. Da in CRL2018-Zellen der ApoJ-mRNA-Gehalt zudem durch Pam₃Cys-Ser-Lys₄ und LPS erhöht wird, wäre eine zelltypspezifische Beteiligung von TLR2 und TLR4 an der durch nekrotische Zellen

induzierten ApoJ-Genregulation in glatten Gefäßmuskelzellen denkbar. Interessanterweise lässt sich in Rat1-Fibroblasten auch die MMP-3-Genexpression durch Poly(I:C) und LPS induzieren, was darauf hindeuten könnte, dass in diesen Zellen TLR3 und TLR4 auch die MMP-3-induzierende Wirkung nekrotischer Zellen vermitteln. Zudem zeigt dies deutlich, dass eine durch LPS aktivierte TLR4-abhängige Signaltransduktion in Rat1-Fibroblasten funktionell ist, jedoch keinen deutlichen Einfluss auf die ApoJ-Genexpression in diesen Zellen besitzt. Ein deutlicher Unterschied besteht aber in der durch Poly(I:C) und durch nekrotische Zellen induzierten Regulation der iNOS-Genexpression. Während Poly(I:C) in den beiden TLR3-exprimierenden Zelllinien CRL2018 und Rat1 zu einer Akkumulation der iNOS-mRNA führt, scheint die Inkubation mit nekrotischen Zellen die Regulation dieses Gens nicht zu beeinflussen.

3.4.8 Einfluss nekrotischer Zellen auf die IFN- β - und IFN- α 1-mRNA-Expression in Rat1-Fibroblasten

Wie gezeigt werden konnte, führt eine Aktivierung des Toll-like Rezeptors 3 durch den spezifischen Agonisten Poly(I:C) zu einer Induktion der Genexpression von Typ1-Interferonen sowie zu einer Akkumulation von ApoJ-mRNA in CRL2018-Zellen (Abb. 3.4.4). Geht man davon aus, dass bestimmte Komponenten nekrotischer Zellen in der Lage sind, diesen Rezeptor zu aktivieren, so sollte die Inkubation TLR3-exprimierender Zellen mit nekrotischen Zellen ebenfalls zu einer vermehrten Transkription von IFN- α -Genen sowie des IFN- β -Gens führen. Dass neben einer Inkubation mit nekrotischen Zellen ausschließlich Poly(I:C), nicht jedoch Pam₃Cys-Ser-Lys₄ und LPS, eine Akkumulation von ApoJ-mRNA in Rat1-Fibroblasten bewirkt (Abb. 3.4.7), deutet darauf hin, dass zumindest in diesen Zellen TLR3 eine zentrale Rolle in der durch nekrotische Zellen induzierten ApoJ-Genaktivität spielen könnte. Deshalb sollte in einem weiteren Experiment der Einfluss nekrotischer Zellen auf die IFN- α 1- und IFN- β -mRNA-Expression in Rat1-Fibroblasten untersucht werden.

Hierzu wurden entsprechende RNA-Proben des unter 3.3.4 dargestellten Experimentes zunächst revers transkribiert und anschließend mittels semiquantitativer RT-PCR unter Verwendung IFN- α 1- und IFN- β -spezifischer Primer analysiert. Die Gesamt-RNA stammte hierbei aus serumfrei kultivierten Rat1-Fibroblasten, die für 1-24h mit 1×10^7 primär nekrotischen Rat1-Zellen bzw. für 3-24h mit serumfreiem Medium allein (Kontrollen) inkubiert wurden. PCRs mit MMP-3-spezifischen Primern dienten in diesem Experiment als Kontrolle, um zum einen das Ergebnis der unter 3.3.4 dargestellten Northern-Blot-Analyse zu bestätigen und zum anderen den quantitativen Charakter der PCR-Analyse zu überprüfen. PCRs mit GAPDH-spezifischen Primern dienten zur Überprüfung der für die einzelnen Reaktionen eingesetzten Mengen an revers transkribierter RNA. Jeweils 17 μ l (IFN- β), 12 μ l (IFN- α 1), 4 μ l (MMP-3) und 3 μ l (GAPDH) der einzelnen PCR-Ansätze wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (1,5% Agarose) analysiert.

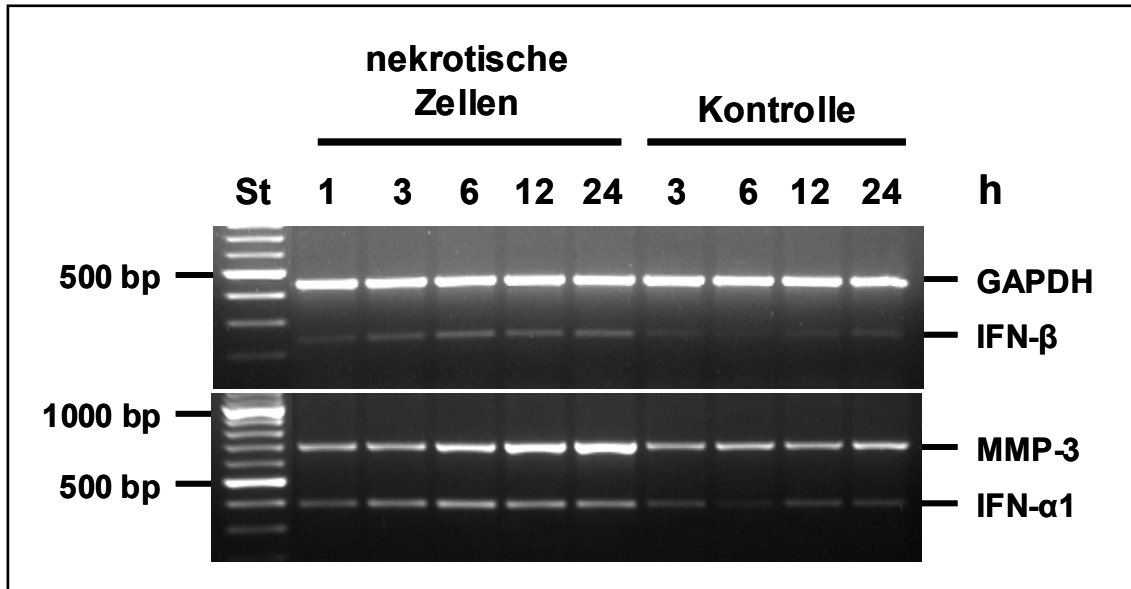


Abbildung 3.4.8: Einfluss nekrotischer Zellen auf die IFN-β- und IFN-α1-mRNA-Expression in Rat1-Fibroblasten: Semiquantitative RT-PCR zur Analyse des relativen Gehaltes an IFN-β-, IFN-α1- und MMP-3-mRNA in Rat1-Zellen, die für 1-24h mit 1×10^7 primär nekrotischen Rat1-Zellen inkubiert wurden. Gesamt-RNA aus Rat1-Zellen, die für 3-24h in serumfreiem Medium allein kultiviert wurden, diente als Kontrolle. Die einzelnen PCR-Ansätze wurden mittels Agarosegelelektrophorese (1,5% Agarose) analysiert. Die Größe der einzelnen PCR-Amplifikate beträgt 239 bp (IFN-β), 389 bp (IFN-α1), 685 bp (MMP-3) bzw. 437 bp (GAPDH). Zusätzlich wurden 500ng DNA eines Längenstandards (XIV, Roche Diagnostics) aufgetragen (St).

Wie Abbildung 3.4.8 zeigt, führt die Inkubation mit nekrotischen Zellen sowohl zu einer Akkumulation von IFN-β- als auch IFN-α1-mRNA in Rat1-Fibroblasten. Während in den Kontrollproben nur sehr geringe Mengen der entsprechenden PCR-Amplifikate enthalten sind, weisen die Proben, die mit nekrotischen Zellen inkubierten Rat1-Fibroblasten entsprechen, einen deutlich höheren Gehalt an IFN-β- und IFN-α1-spezifischen PCR-Amplifikaten auf. Dies zeigt, dass es als Folge der Inkubation mit nekrotischen Zellen zu einer Akkumulation der beiden Typ1-Interferon-mRNAs in Rat1-Fibroblasten gekommen ist. Der zeitliche Verlauf der IFN-β- und IFN-α1-mRNA-Expression deutet darauf hin, dass es in einem Zeitraum von 1-3h nach Zugabe nekrotischer Zellen zu einer Induktion der transkriptionellen Aktivität beider Gene kommt. Nach 6h erreicht der IFN-β- und IFN-α1-mRNA-Gehalt der Zellen ein Niveau, das anschließend für mindestens 18h konstant bleibt. Der hier dargestellte zeitliche Verlauf der IFN-β-Genregulation unterscheidet sich jedoch von dem der durch Poly(I:C) induzierten IFN-β-Genexpression in CRL2018-Zellen. Es zeigt sich, dass der TLR3-spezifische Agonist eine deutlich stärkere sowie transiente IFN-β-mRNA-Expression in CRL2018-Zellen induziert (Abb. 3.4.4). Hinsichtlich des Einflusses auf die Regulation des IFN-α1-Gens scheinen jedoch kaum Unterschiede zwischen Poly(I:C) und nekrotischen Zellen zu bestehen. Wie bereits die Analyse der entsprechenden Gesamt-RNAs mittels Northern-Blot zeigte, führt die Inkubation mit nekrotischen Zellen nach etwa 6h zu einer Induktion der MMP-3-mRNA-Expression von Rat1-Fibroblasten (Abb. 3.3.4). Dass sich diese Regulation der MMP-3-Genexpression auch in vorliegendem Experiment nachvollziehen lässt, bestätigt den quantitativen Charakter der durchgeführten RT-PCR-Analyse. Zudem weisen die Banden der GAPDH-spezifischen PCR-

Amplifikate aller Proben nahezu identische Intensitäten auf. Dies zeigt, dass für alle PCR-Ansätze gleiche Mengen an revers transkribierter RNA eingesetzt wurden und somit die Unterschiede in der Menge an MMP-3-, IFN- β - und IFN- α -spezifischen PCR-Amplifikaten auf jeweils unterschiedliche mRNA-Konzentrationen in den verwendeten Gesamt-RNAs zurückzuführen sein müssen.

Zusammenfassend zeigt dieses Experiment, dass Poly(I:C) und nekrotische Zellen neben der Induktion der ApoJ-Genexpression in TLR3-exprimierenden Zellen und einer Induktion der MMP-3-Genaktivität in Rat1-Fibroblasten auch die gemeinsame Eigenschaft besitzen, die Expression der beiden TypI-Interferone IFN- β - und IFN- α 1 zu induzieren. Dies könnte als weiterer Hinweis angesehen werden, dass bei Inkubation mit nekrotischem Zellmaterial eine Aktivierung TLR3-vermittelter Signaltransduktionswege in lebenden Zellen erfolgt. Weiterhin zeigt dieses Experiment, dass die bei Inkubation mit nekrotischen Zellen beschriebene Induktion der IFN- α - und IFN- β -Expression in primären dendritischen Zellen und primären humanen Fibroblasten auch in embryonalen Fibroblasten der Zelllinie Rat1 erfolgt (Kariko et al. 2004a, Brentano et al. 2005).

3.4.9 Zusammenfassung und weiterführende Arbeiten

Wie im vorausgehenden Abschnitt gezeigt werden konnte, besitzen die verschiedenen TLR-spezifischen Agonisten Pam₃Cys-Ser-Lys₄, Poly(I:C) und LPS eine ApoJ-induzierende Wirkung auf glatte Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018. Dies würde die Hypothese einer potentiellen Beteiligung von Toll-like Rezeptoren an der durch nekrotische Zellen induzierten Regulation des ApoJ-Gens unterstützen. Unter den verwendeten Substanzen induziert der TLR3-spezifische Agonist Poly(I:C), eine synthetische doppelsträngige RNA, die stärkste Akkumulation von ApoJ-mRNA. Dass zum einen der doppelsträngige Charakter von Poly(I:C) für dessen ApoJ-induzierende Wirkung notwendig ist und zum anderen Poly(I:C) nur in den beiden TLR3-exprimierenden Zelllinien CRL2018 und Rat1, nicht jedoch in TLR3-negativen embryonalen Dottersackzellen der Zelllinie 10A zu einer vermehrten ApoJ-Genexpression führt, ist ein sehr deutlicher Hinweis darauf, dass die Expression des ApoJ-Gens im Rahmen TLR3-vermittelter Signaltransduktionswege reguliert wird. Aufgrund des zeitlichen Verlaufs der durch Poly(I:C) induzierten ApoJ-Genexpression scheint sich ApoJ hierbei in die Gruppe sekundär regulierter Gene einordnen zu lassen, denen eine vermehrte Expression des primär regulierten TypI-Interferons IFN- β vorausgeht. Weiterhin deuten die durchgeführten Experimente darauf hin, dass in CRL2018-Zellen TLR2- und TLR4-vermittelte Signaltransduktionswege hinsichtlich einer Aktivierung der ApoJ-Gentranskription redundant sind und verglichen mit Poly(I:C) zu einer deutlich geringeren Akkumulation von ApoJ-mRNA führen. Dass Pam₃Cys-Ser-Lys₄ und LPS in additiver Weise die durch Poly(I:C) induzierte Akkumulation von ApoJ-mRNA verstärken, zeigt zudem, dass eine parallele Aktivierung von TLR2 und TLR3 bzw. TLR4 und TLR3 einen zusätzlichen positiven Einfluss auf die Regulation des ApoJ-Gens besitzt. Dass unter den verwendeten TLR-Agonisten der TLR3-spezifische Agonist Poly(I:C) die stärkste Akkumulation von ApoJ-mRNA in CRL2018-Zellen induziert, nach Inkubation mit nekrotischen Zellen ausschließlich in den beiden TLR3-exprimierenden Zelllinien CRL2018 und Rat1 eine vermehrte ApoJ-mRNA-Expression nachweisbar ist und LPS trotz der Expression von TLR4 keinen deutlichen

Ergebnisse

Einfluss auf die ApoJ-Genregulation in Rat1-Fibroblasten besitzt, könnte darauf hindeuten, dass von den untersuchten Toll-like Rezeptoren möglicherweise TLR3 eine zentrale Rolle in der durch nekrotische Zellen induzierten ApoJ-Genexpression spielt. Dass auch die Inkubation mit nicht synthetischen Ribonukleinsäuren, insbesondere t-RNA, eine Akkumulation von ApoJ-mRNA in CRL2018-Zellen induziert, deutet in diesem Zusammenhang darauf hin, dass freigesetzte bzw. membranassoziierte RNA die ApoJ-induzierende Komponente nekrotischer Zellen darstellt (Kariko et al. 2004a, Brentano et al. 2005). In zellulärer RNA enthaltene doppelsträngige Sekundärstrukturen könnten hierbei als potentielle endogene TLR3-Agonisten fungieren. Dass eine 4-stündige Präinkubation nekrotischer Zellen und daraus präpariertem Überstand (14.000×g) mit verschiedenen Nukleasen (RNAse A, Benzonase, DNase I) deren ApoJ-induzierende Wirkung nicht vermindert, spricht zunächst gegen eine Beteiligung von Nukleinsäuren an der durch nekrotische Zellen induzierten ApoJ-Genexpression (Abb. 3.4.6). Um eine Beteiligung doppelsträngiger RNA an der ApoJ-Regulation definitiv auszuschließen, sind jedoch weiterführende Untersuchungen notwendig. In diesem Zusammenhang könnte untersucht werden, inwiefern ein Verdau mit dem Enzym RNAse III, das spezifisch doppelsträngige RNA hydrolysiert, die ApoJ-induzierenden Eigenschaften nekrotischer Zellen vermindert (Aksoy et al 2005). Alternativ hierzu wäre es möglich, den Verdau nekrotischer Zellen mit RNAse A unter salzfreien Bedingungen durchzuführen. Wie Aksoy et al. zeigen konnten, lassen sich die TLR3-aktivierenden Eigenschaften aus Eiern des Parasiten *Schistosoma mansoni* isolierter RNA sowie von Poly(I:C) unter salzfreien Bedingungen, nicht jedoch in Gegenwart physiologischer Salzkonzentrationen, durch RNAse A vollständig inaktivieren (Aksoy et al. 2005). Zudem könnte untersucht werden, ob eine längere Inkubation (>4h) mit RNAse A und Benzonase die ApoJ-induzierenden Eigenschaften nekrotischer Zellen vermindert. Eine parallele Inkubation von Poly(I:C) mit entsprechenden Nukleasen wäre in allen Fällen eine geeignete Kontrolle, um unter den gewählten Bedingungen eine effiziente Inaktivierung TLR3-aktivierender Eigenschaften doppelsträngiger RNA zu überprüfen. Durch Inkubation von CRL2018- bzw. Rat1-Zellen könnten die ApoJ-induzierenden Eigenschaften einzelner Reaktionsansätze anschließend mittels Northern- oder Western-Blot-Analyse untersucht werden. Dass Poly(I:C) und nekrotische Zellen neben ihrer ApoJ-induzierenden Wirkung weiterhin die gemeinsame Eigenschaft besitzen, die Expression der beiden Typ1-Interferone IFN- β und IFN- α 1 sowie eine Akkumulation von MMP-3-mRNA in Rat1-Fibroblasten zu induzieren, könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass es in vitalen Zellen in Gegenwart von nekrotischem Zellmaterial zu einer Aktivierung TLR3-vermittelter Signaltransduktionskaskaden kommt.

Um einen klaren Beweis für eine Beteiligung von TLR3 an der durch nekrotische Zellen induzierten Regulation der ApoJ-Genexpression zu erhalten, wäre es zunächst notwendig, durch Transfektion der TLR3-negativen 10A-Zellen mit einem TLR3-Expressionsplasmid Zellen zu generieren, die eine stabile Expression von rekombinantem TLR3 aufweisen. Durch eine vergleichende Untersuchung des Einflusses nekrotischer Zellen auf die ApoJ-Regulation von Wildtypzellen und TLR3-Transfektanten wäre im Anschluss eine klare Aussage hinsichtlich der Beteiligung von TLR3 an der durch nekrotische Zellen induzierten ApoJ-Genexpression möglich. In alternativen Experimenten

könnte mittels RNAi (RNA interference) unter Verwendung sequenzspezifischer siRNAs (small interference RNA) die Auswirkung einer Suppression der TLR3-Expression in CRL2018-Zellen und Rat1-Fibroblasten auf die durch nekrotische Zellen induzierte ApoJ-Genexpression dieser Zellen untersucht werden (Li et al. 2005). Darüber hinaus könnte eine funktionelle Inhibierung dieses Rezeptors in CRL2018-Zellen und Rat1-Fibroblasten durch Expression von mutiertem TLR3 mit deletierter TIR-Domäne und dominant-negativer Wirkungsweise erfolgen (Alexopoulou et al. 2001).

4 Diskussion

4.1 Einfluss des Glutaminsupplements N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin auf Zellvitalität und ApoJ-Genexpression kultivierter Rat1-Fibroblasten

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, führt die Inkubation mit nekrotischen Zellen zu einer vermehrten Transkription des ApoJ-Gens in serumfrei kultivierten Fibroblasten der Zelllinie Rat1. Für diesen Effekt ist jedoch die Gegenwart von extrazellulärem L-Glutamin im Kulturmedium notwendig. Dass diese Aminosäure selbst eine Akkumulation von ApoJ-mRNA in serumfrei kultivierten Rat1-Fibroblasten bewirkt, hat zur Folge, dass verschiedene Glutaminsupplemente in Abhängigkeit von den verwendeten Kulturbedingungen (+/- Serum, +/- nekrotische Zellen) in unterschiedlicher Weise nicht nur das Proliferationsverhalten und die Zellvitalität, sondern auch die transkriptionelle Regulation der ApoJ-Genexpression in kultivierten Rat1-Fibroblasten beeinflussen. Unter serumhaltigen Kulturbedingungen weisen diese Zellen unabhängig von der Art des verwendeten Glutaminsupplements ihr typisches Proliferationsverhalten auf. Zudem ist in Gegenwart von Serum, hinsichtlich der Regulation des ApoJ-Gens, kein Unterschied zwischen den verschiedenen Glutaminformen feststellbar. N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin, L-Alanyl-L-Glutamin sowie freies L-Glutamin unterscheiden sich jedoch in ihrer Eigenschaft, ein Überleben serumfrei kultivierter Rat1-Fibroblasten zu gewährleisten. Dies wiederum wirkt sich auf die Regulation der ApoJ-Genexpression in serumfrei kultivierten Rat1-Fibroblasten aus. So stellte sich im Verlauf der vorliegenden Arbeit heraus, dass unter Verwendung von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als stabilem Glutaminsupplement das relative Ausmaß einer durch nekrotischen Zellen induzierten Erhöhung der ApoJ-Genexpression beeinflusst wird (Abb. 3.2.11.2 a, b). Grund hierfür scheint eine Hydrolyse des N-acetylierten Dipeptids durch das aus nekrotischen Zellen freigesetzte zytosolische Enzym Acylpeptidhydrolase zu sein. Kontrollzellen sind unter diesen Bedingungen scheinbar nicht in der Lage, das in Form des N-acetylierten Dipeptids vorliegende L-Glutamin zu verwerten und sterben folglich aufgrund eines Mangels an verfügbarem L-Glutamin ab. Für die Northern-Blot-Analysen wurde jedoch ausschließlich der Anteil an Kontrollzellen verwendet, der in der Lage war, unter diesen Bedingungen zu überleben. Es stellte sich heraus, dass es in diesen Zellen zu keiner Akkumulation von ApoJ-mRNA kommt. Werden die Rat1-Fibroblasten jedoch in Gegenwart von L-Glutamin unter serumfreien Bedingungen kultiviert, weisen diese nach 48h einen um Faktor 3,1-3,6 erhöhten Gehalt an ApoJ-mRNA auf. Hieraus lässt sich schließen, dass sich die unter serumfreien Bedingungen und unter Verwendung von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin beobachtete ApoJ-induzierende Wirkung nekrotischer Zellen ebenfalls zum Teil auf eine Hydrolyse des N-acetylierten Dipeptids und der damit zusammenhängenden Entstehung von freiem L-Glutamin zurückführen lässt. Hierbei scheint diese Aminosäure zum einen selbst ApoJ-induzierende Eigenschaften zu besitzen und zum anderen für eine zusätzliche Erhöhung der ApoJ-Genexpression durch weitere unbekannte Komponenten nekrotischer Zellen benötigt zu werden.

Aufgrund des unterschiedlichen Einflusses verschiedener Glutaminsupplemente auf Zellvitalität, Proliferation sowie die Regulation der ApoJ-Genexpression in kultivierten Rat1-Fibroblasten soll

zunächst auf die Verwendung stabiler Glutaminsupplemente als Ersatz für freies L-Glutamin in Zellkulturmedien eingegangen sowie deren potentielle Wirkungsmechanismen unter verschiedenen Kulturbedingungen erläutert werden. Anschließend soll eine Beteiligung des Enzyms Acylpeptidhydrolase an der zytoprotektiven und ApoJ-induzierenden Wirkung nekrotischer Zellen auf serumfrei kultivierte Rat1-Fibroblasten unter Verwendung des stabilen Glutaminsupplements N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin diskutiert werden.

4.1.1 L-Glutamin-enthaltende Dipeptide als stabile Glutaminsupplemente von Zellkulturmedien

Glutamin wird als nicht essentielle Aminosäure klassifiziert, da Säugerzellen in der Lage sind, Glutamin in einem bestimmten Umfang zu synthetisieren. Unter bestimmten Bedingungen jedoch, wie z.B. bei starker zellulärer Proliferation, kann die benötigte Menge an Glutamin die mittels Synthese bereitgestellte Menge übersteigen. In dieser Situation sind entsprechende Zellen auf extrazelluläres Glutamin angewiesen, weshalb Glutamin auch als konditionell essentielle Aminosäure bezeichnet wird. Um ein optimales Wachstum kultivierter Säugerzellen *in vitro* zu gewährleisten, ist Glutamin als Zusatz von Kulturmedien notwendig. Die Aufnahme von extrazellulärem Glutamin wird zelltyp- bzw. gewebespezifisch von verschiedenen Aminosäuretransportsystemen (System ASC, System N, System B^o, System B^{o,+}) in Na⁺-abhängiger Weise vermittelt (Tapiero et al. 2002). Intrazelluläres Glutamin spielt schließlich eine zentrale Rolle im zellulären Stoffwechsel und dient u.a. der Gewinnung von Stoffwechselenergie sowie als Vorstufe für die Synthese vieler verschiedener Biomoleküle wie z.B. Aminosäuren und Glutathion (γ -Glu-Cys-Gly) sowie Purin- und Pyrimidinnukleotiden.

Freies L-Glutamin besitzt jedoch die Eigenschaft, sich in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert des Kulturmediums spontan zu Pyrrolidincarboxylat und Ammoniak umzusetzen (Tritsch und Moore, 1962). Diese spontane Degradierung des L-Glutamins führt gleichsam zu einer Akkumulation von Ammoniak im Kulturmedium, das aufgrund seiner proliferationsinhibierenden sowie toxischen Wirkung das Wachstum entsprechend sensitiver Zelllinien beeinträchtigen kann (Hassell et al. 1991). Um dieses Problem zu umgehen, wurde versucht, durch Modifikation des L-Glutamins stabile Glutaminsupplemente zu entwickeln. Das zugrunde liegende Prinzip dieser Modifikationen besteht darin, die freie α -Aminogruppe des L-Glutamins durch eine kovalente Bindung zu stabilisieren und somit die spontane Zyklisierung des freien L-Glutamins zu verhindern. In Zellkulturmedien werden gegenwärtig Dipeptide als Ersatz für freies L-Glutamin häufig verwendet. Das als Glutamax bezeichnete Dipeptid L-Alanyl-L-Glutamin (Invitrogen) und das N-acetylierte Dipeptid N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin (Biochrom) sind kommerziell erhältlich. Wie sich im Verlauf dieser Arbeit herausstellte, sind in Gegenwart von Serum beide Dipeptide, ähnlich wie L-Glutamin, in der Lage, das Wachstum kultivierter Rat1-Fibroblasten zu gewährleisten. Verglichen mit L-Glutamin zeigen sich unter serumfreien Bedingungen jedoch deutliche Unterschiede in der Wirkungsweise beider Dipeptide. Während die Zellen in Gegenwart von L-Alanyl-L-Glutamin überleben, jedoch nicht proliferieren, kommt es unter Verwendung des N-acetylierten Dipeptids zu einem massiven

Diskussion

Absterben der Zellen. In Kulturmedium, dem 2mM freies L-Glutamin zugesetzt ist, sind Rat1-Zellen hingegen in der Lage, selbst unter serumfreien Bedingungen zu proliferieren, was die bereits beschriebene mitogene Wirkung eines Überschusses an freiem L-Glutamin bestätigt (Zetterberg und Engstrom 1981). Da Rat1-Fibroblasten unter glutaminfreien und serumhaltigen Bedingungen jedoch nicht in der Lage sind, zu überleben, zeigt deutlich, dass sich das in vorliegender Arbeit beobachtete Absterben serumfrei kultivierter Rat1-Fibroblasten unter Verwendung des N-acetylierten Dipeptids primär nicht auf einen Entzug von Wachstumsfaktoren, sondern vielmehr auf einen Mangel an verfügbarem L-Glutamin zurückführen lässt. Diese Zellen scheinen unter serumfreien Bedingungen das in den beiden Dipeptiden enthaltene L-Glutamin nicht (N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin) bzw. nur teilweise (L-Alanyl-L-Glutamin) verwerten zu können.

Der Mechanismus, mit dem das in Form von Dipeptiden vorliegende L-Glutamin für kultivierte Zellen verfügbar gemacht wird, ist jedoch nur wenig bekannt. Diskutiert wird eine extrazelluläre Hydrolyse dieser Peptide durch sekretierte bzw. zelloberflächenassoziierte Hydrolasen, wobei die Identität der beteiligten Enzyme unbekannt ist (Hubl et al. 1989, Christie und Butler 1994). Auch von Mitarbeitern der Firma Biochrom waren keine näheren Informationen über den Wirkungsmechanismus des N-acetylierten Dipeptids in Erfahrung zu bringen. Geht man von einer extrazellulären Hydrolyse aus, könnte der unterschiedliche Einfluss beider Dipeptide auf die Zellvitalität von Rat1-Fibroblasten darauf zurückzuführen sein, dass verschiedene Hydrolasen in substratspezifischer Weise die Umsetzung beider Dipeptide zu freien Aminosäuren katalysieren, wobei Rat1-Fibroblasten ausschließlich das für die Hydrolyse von L-Alanyl-L-Glutamin benötigte Enzym in ausreichender Menge synthetisieren. Denkbar wäre auch, dass eine einzige Hydrolase für die extrazelluläre Umsetzung beider Dipeptide verantwortlich ist, wobei das entsprechende Enzym eine deutlich höhere Affinität zu dem Substrat L-Alanyl-L-Glutamin besitzt. Weiterhin lässt sich eine Beteiligung von Mitgliedern der Oligopeptidtransporterfamilie, wie z.B. Pept-1, nicht ausschließen. Der entsprechende Mechanismus würde hierbei die zelluläre Aufnahme der Dipeptide sowie eine anschließende intrazelluläre Hydrolyse durch zytosolische Peptidasen umfassen (Thamotharan et al. 1998, Walker et al. 1998). Die unterschiedlichen Wirkungsweisen beider Dipeptide könnten unter dieser Voraussetzung beispielsweise auf eine differentielle Transportrate von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin und L-Alanyl-L-Glutamin zurückzuführen sein. Dass Rat1-Fibroblasten in Gegenwart von Serum ihr typisches Proliferationsverhalten unabhängig von der Art des verwendeten Glutaminsupplements aufweisen, zeigt, dass die Zellen unter diesen Bedingungen das in beiden Dipeptiden enthaltene L-Glutamin verwerten können. Grund hierfür könnte eine durch Serumkomponenten induzierte vermehrte Synthese sekretierter oder zelloberflächenassoziiierter Hydrolasen bzw. eine vermehrte Synthese bestimmter Oligopeptidtransporter sein. Alternativ hierzu wäre auch eine Beteiligung im Serum enthaltener Hydrolasen denkbar. Es wurde bereits beschrieben, dass Plasma und Serum in geringem Maße hydrolytische Eigenschaften gegenüber L-Alanyl-L-Glutamin aufweisen. Allerdings wird die Beteiligung von Serumhydrolasen an der effizienten Umsetzung von L-Alanyl-L-Glutamin durch kultivierte Hybridomazellen als zu gering eingeschätzt (Christie und Butler 1994). Interessant ist, dass das in vorliegender Arbeit als zytoprotektives Protein

identifizierte Enzym Acylpeptidhydrolase, das im Zytosol lebender Zellen lokalisiert ist, scheinbar auch in humanem sowie aus der Ratte stammendem Blutplasma vorhanden ist (Fujino et al. 2000b, Fujino et al. 2000c). Somit scheint die Möglichkeit zu bestehen, dass das Enzym Acylpeptidhydrolase auch in fetalem Kälberserum vorhanden ist und unter serumhaltigen Kulturbedingungen eine Hydrolyse von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin im Kulturmedium katalysiert. Das entstehende freie L-Glutamin stände den Zellen unter diesen Bedingungen in ausreichendem Maße zur Verfügung, was erklären würde, dass Rat1-Fibroblasten in serumhaltigem Kulturmedium und bei Verwendung von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin als stabilem Glutaminsupplement ihr typisches Proliferationsverhalten aufweisen.

Die in dieser Arbeit gezeigte zytoprotektive bzw. proliferative Wirkung nekrotischer Zellen auf serumfrei kultivierte Rat1-Fibroblasten unter Verwendung beider Dipeptide lässt sich vermutlich auf deren effiziente extrazelluläre Hydrolyse durch freigesetzte zelluläre Peptidasen zurückführen, wobei die entsprechenden Effekte schließlich von freiem L-Glutamin vermittelt werden. Hierbei scheint die Hydrolyse von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin spezifisch durch das zytosolische Enzym Acylpeptidhydrolase katalysiert zu werden, die Umsetzung von L-Alanyl-L-Glutamin jedoch durch andere intrazelluläre Peptidasen mit weniger saurem Charakter vermittelt zu werden (ohne Abb.). Letztere scheinen ebenfalls im Zytosol lebender Zellen lokalisiert zu sein, wobei deren Identität jedoch nicht bekannt ist (Christie und Butler 1994). Dies zeigt, dass Rat1-Fibroblasten entsprechende zytosolische Enzyme zur Verwertung beider Dipeptide zwar exprimieren, diese jedoch nur von primär bzw. sekundär nekrotischen Rat1-Zellen in ausreichender Menge freigesetzt werden, um eine effiziente Hydrolyse beider Glutaminsupplemente zu gewährleisten. Dass diese Freisetzung auf passive Weise erfolgt, zeigt sich dadurch, dass die Akkumulation entsprechender Enzyme im Kulturmedium Camptothecin-behandelter Rat1-Fibroblasten im zeitlichen Verlauf parallel zur Freisetzung des Enzyms Lactatdehydrogenase erfolgt. Das konditionierte Kulturmedium vitaler Kontrollzellen hingegen besitzt keine deutlichen hydrolytischen und somit zytoprotektiven/proliferativen Eigenschaften (Abb. 3.2.3, ohne Abb.). Inwiefern diese Enzyme an der Verwertung entsprechender glutaminenthaltender Dipeptide durch vitale Rat1-Fibroblasten beteiligt sind, ist nicht bekannt. Da neben Rat1-Fibroblasten auch embryonale Fibroblasten der Zelllinie MEF-1 unter serumfreien Bedingungen nicht in der Lage sind, das in Form des N-acetylierten Dipeptids zugesetzte L-Glutamin zu verwerten, schließt einen für die Zelllinie Rat1 spezifischen Defekt in der Verwertung von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin aus (ohne Abb.). Drei weitere untersuchte Zelllinien (10A, MDCK, BHK) waren jedoch in der Lage, unter serumfreien Bedingungen und unter Verwendung des N-acetylierten Dipeptids zu überleben (ohne Abb.). Da den entsprechenden Kulturmedien jedoch standardmäßig nicht-essentielle Aminosäuren (NEA) zugesetzt waren und diese die Eigenschaft besitzen, einem Absterben serumfrei kultivierter Rat1-Fibroblasten unter glutaminfreien Bedingungen entgegenzuwirken, lässt keine Aussage darüber zu, inwiefern eine Umsetzung von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin durch sekretierte bzw. zelloberflächenassoziierte Hydrolasen an der Erhaltung der Zellvitalität serumfrei kultivierter 10A-, MDCK- und BHK-Zellen beteiligt ist.

Zusammenfassend wurde in vorliegender Arbeit gezeigt, dass glutaminenthaltende Dipeptide in Abhängigkeit der Kulturbedingungen teils massiven Einfluss auf Vitalität und Genexpression *in vitro* kultivierter Zellen besitzen. Obwohl Dipeptide als stabile Glutaminsupplemente in Zellkulturmedien häufig Verwendung finden, ist nur wenig über deren Wirkungsmechanismus bekannt. In diesem Zusammenhang könnte das in dieser Arbeit identifizierte ubiquitär exprimierte Enzym Acylpeptidhydrolase an einer zellvermittelten Hydrolyse des Dipeptids N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin beteiligt sein. Da dieses Enzym ebenfalls ein potentieller Bestandteil von fetalem Kälberserum ist, könnte es unter serumhaltigen Kulturbedingungen zudem die extrazelluläre Hydrolyse von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin im Kulturmedium katalysieren.

4.1.2 Beteiligung des Enzyms Acylpeptidhydrolase an der zytoprotektiven und ApoJ-induzierenden Wirkung nekrotischer Zellen

Das Enzym Acylpeptidhydrolase (EC 3.4.19.1) wird als Serinpeptidase der Familie der Prolyloligopeptidasen zugeordnet. Es wurde von mehreren Arbeitsgruppen aus unterschiedlichen Spezies und Geweben, unter anderem der Leber (Rind, Ratte), dem Gehirn (Ratte), der Skelettmuskulatur (Kaninchen), der Darmschleimhaut (Schwein), der Augenlinse (Rind) sowie humanen und Schafserythrozyten isoliert (Gade und Brown 1981, Tsunasawa et al. 1975, Kobayashi et al. 1987, Marks et al. 1983, Witheiler und Wilson 1972, Schönberger und Tschesche 1981, Radhakrishna und Wold 1989, Sharma und Ortwerth 1993, Raphel et al. 1993, Raphel et al. 1999). Das native Protein besitzt ein Molekulargewicht von etwa 300kDa und setzt sich aus vier identischen, nicht kovalent verbundenen Untereinheiten zusammen, die jeweils ein Molekulargewicht von 75-80kDa besitzen. Jede Untereinheit enthält 18 Cysteinreste, wovon 12 eine reduzierte Sulfhydrylgruppe besitzen und die anderen an der Ausbildung dreier intramolekularer Disulfidbrücken beteiligt sind (Scaloni et al 1994). Nach Klonierung der humanen cDNA und der cDNA aus Ratte und Schwein konnte die Aminosäuresequenz des Enzyms aufgeklärt werden (Mitta et al. 1996, Mitta et al. 1989, Kobayashi et al. 1989). Eine Untereinheit des Enzyms setzt sich hierbei aus 732 Aminosäuren zusammen, wobei die Primärstruktur zwischen den Spezies zu mehr als 90% identisch ist. Der aus der Aminosäuresequenz abgeleitete theoretische isoelektrische Punkt eines Monomers beträgt 5,46, der mittels isoelektrischer Fokussierung experimentell bestimmte pI-Wert des aus humanen Erythrozyten isolierten Homotetramers ist mit 4,1 beschrieben (Scaloni et al. 1994). Das zytosolische Enzym wird ubiquitär exprimiert, wobei einzig bestimmte Tumorzellen aus Niere und Lunge sehr geringe Mengen bzw. aufgrund einer chromosomalen Deletion keine Expression der Acylpeptidhydrolase aufweisen (Erlandsson et al. 1991, Scaloni et al. 1992).

Das Enzym katalysiert die Hydrolyse der N-terminalen Peptidbindung von Oligopeptiden, deren N-Terminus durch Acylierung modifiziert vorliegt (N-Acetyl-, N-Chloroacetyl-, N-Formyl- oder N-Carbamyl-), wobei eine freie N-acylierte Aminosäure sowie ein um eine Aminosäure verkürztes Oligopeptid entstehen (Jones et al. 1986). N-acylierte Proteine hingegen stellen kein Substrat dar. Von der Gruppe N-acetylierter Oligopeptide werden vor allem Di- und Tripeptide, die Alanin, Methionin oder Serin als N-terminal modifizierte Aminosäure enthalten, effizient von der

Acylpeptidhydrolase umgesetzt, wobei mit zunehmender Kettenlänge des Substrats die maximale Geschwindigkeit der Hydrolyse (V_{\max}) abnimmt (Kobayashi und Smith 1987, Jones und Manning 1988, Jones et al. 1991, Radakrishna und Wold 1992, Sokolik et al. 1993, Raphael et al. 1993, Raphael et al. 1999). Zudem wird die enzymatische Aktivität dieses Enzyms durch N-acetylierte Aminosäuren, die u.a. als Produkte während der acylpeptidhydrolase-katalysierten Hydrolyse N-terminal acetylierter Oligopeptide entstehen, kompetitiv inhibiert (Jones et al. 1986, Sharma und Ortwerth 1993, Raphael et al. 1999). Da dieses Enzym eine Seringruppe im aktiven katalytischen Zentrum besitzt, lässt es sich durch DFP (Diisopropylfluorophosphat) irreversibel inhibieren. Der Proteaseinhibitor PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid) hingegen scheint die Aktivität dieses Enzyms kaum zu beeinträchtigen (Raphael et al. 1999). Aufgrund seiner enzymatischen Eigenschaften wird eine Funktion der Acylpeptidhydrolase im Abbau intrazellulärer N-terminal modifizierter Proteine und Oligopeptide vermutet. Zwei Arbeitsgruppen konnten zudem unabhängig voneinander eine endoprotease-ähnliche Aktivität der Acylpeptidhydrolase gegenüber oxidativ modifizierten Proteinen nachweisen, weshalb dieses Enzym in der Literatur auch als OPH (oxidized protein hydrolase) bezeichnet wird. In diesem Zusammenhang wird eine Funktion der Acylpeptidhydrolase im Abbau intrazellulärer denaturierter Proteine in oxidativ gestressten Zellen diskutiert (Beppu et al. 1994, Fujino et al. 1998, Fujino et al. 2000a, Fujino et al. 2000b, Fujino et al. 2000c, Sharma und Ortwerth 1993, Chongcharoen und Sharma 1998). Aktuelle Studien zeigen, dass eine Überexpression des rekombinanten Enzyms in COS-7-Zellen diesen eine gewisse Resistenz gegenüber oxidativen Substanzen (z.B. H_2O_2) verleiht und unter diesen Bedingungen den Anteil absterbender Zellen vermindert (Shimizu et al. 2003, Shimizu et al. 2004).

Geht man davon aus, dass das in dieser Arbeit identifizierte Enzym Acylpeptidhydrolase die zellschützende und ApoJ-induzierende Wirkung nekrotischer Zellen vermittelt, indem es die hydrolytische Freisetzung von L-Glutamin aus dem stabilen Glutaminsupplement N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin katalysiert, würde dies erklären, dass beide Effekte ausschließlich durch einen löslichen, im Zytosol lebender Zellen lokalisierten Faktor vermittelt werden, der nicht aktiv sekretiert, sondern nur nach Verlust der Plasmamembranintegrität in passiver Weise aus Zellen freigesetzt wird. Das ubiquitäre Expressionsmuster dieses Enzyms wäre eine Erklärung dafür, dass Zellextrakte aus allen untersuchten Zelllinien in spezies- und zelltypunabhängiger Weise zytoprotektive und ApoJ-induzierende Eigenschaften besitzen. Obwohl sich die enzymatische Aktivität der Acylpeptidhydrolase nicht durch einen tryptischen Verdau inaktivieren lässt, wird dieses Enzym dennoch durch die proteolytische Wirkung des Trypsins in zwei Fragmente gespalten, die ein Molekulargewicht von 22 kDa und 55 kDa aufweisen (Sharma und Ortwerth 1993, Chongcharoen und Sharma 1998). Dies würde erklären, dass nach einem tryptischen Verdau von Zellextrakt sowie einer anschließenden Ultrafiltration (MWCO 100kDa) zur Entfernung des Trypsins keine zellschützende Wirkung vom Rückstand ausgeht (Abb. 3.2.6), da während der Ultrafiltration das enzymatisch aktive Fragment (55 kDa) der Acylpeptidhydrolase die Filtermembran passiert hat. Wie bereits erwähnt wurde, bilden pro Monomer 6 der 18 Cysteinreste 3 intramolekulare Disulfidbrücken aus. Jedoch scheint eine Reduktion dieser Disulfidbrücken durch DTT oder β -Mercaptoethanol die

Diskussion

enzymatische Aktivität des Enzyms nicht signifikant zu beeinträchtigen (Raphel et al. 1999). In Übereinstimmung hierzu lässt sich auch die zytoprotektive und ApoJ-induzierende Wirkung von Zellextrakt durch eine Inkubation mit DTT nicht vermindern (ohne Abb.). Sowohl der theoretische (pI 5,46) als auch der experimentell bestimmte isoelektrische Punkt (pI 4,1) der Acylpeptidhydrolase liegen in einem Bereich, der das Elutionsverhalten des zytoprotektiven und ApoJ-induzierenden Faktors während der Anionenaustauscherchromatographie erklären würde. Dieser bindet unter sauren Bedingungen (pH 5,5) an das Säulenmaterial und eluiert bei einer Natriumchloridkonzentration von 200-250mM vollständig, was einen pI-Wert von <5,5 voraussetzt (Abb. 3.2.7). Einzig im Molekulargewicht scheint sich die Acylpeptidhydrolase von dem des zellschützenden und ApoJ-induzierenden Faktors zu unterscheiden. Während das native Molekulargewicht des Enzyms mit etwa 300kDa beschrieben ist, scheint dieser Faktor unabhängig von der Art des Ausgangsmaterials (Zellextrakt, konditioniertes Medium Camptothecin-behandelter Zellen) während der Gelpermeationschromatographie mit einem Molekulargewicht von etwa 130-190kDa zu eluieren (Abb. 3.2.8.2, Abb. 3.2.9.2). In den entsprechenden Fraktionen mit zellschützender Wirkung ist jedoch ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 75kDa enthalten, das mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie als Acylpeptidhydrolase identifiziert werden konnte (Abb. 3.2.9.3, Abb. 3.2.9.4). Eine Erklärung hierfür wäre, dass dieses Enzym in Rat1-Fibroblasten ausschließlich als Homodimer vorliegt, das sich aus zwei identischen 75kDa Untereinheiten zusammensetzt. Dass die tetramere Form der Acylpeptidhydrolase für deren Enzymaktivität nicht notwendig ist, konnte im Rahmen von Dissoziations-Reassoziations-Experimenten unter Verwendung hoher Konzentration an chaotropen Salzen nachgewiesen werden (Senthilkumar und Sharma 2002). Dies würde die Hypothese einer enzymatisch aktiven dimeren Form des Enzyms in Rat1-Fibroblasten unterstützen. Den deutlichsten Hinweis auf eine Beteiligung der Acylpeptidhydrolase an der zytoprotektiven und ApoJ-induzierenden Wirkung nekrotischer Zellen auf serumfrei kultivierte Rat1-Fibroblasten liefert jedoch die Beobachtung, dass diese Effekte vollständig (Zytoprotektion) bzw. partiell (ApoJ-Induktion) abhängig von der Gegenwart des stabilen Glutaminsupplements N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin sind. Dieses besitzt alle strukturellen Eigenschaften eines hochaffinen Substrats der Acylpeptidhydrolase. Jedoch wurde dieses N-acetylierte Dipeptid bislang in keiner Studie als Substrat für das Enzym eingesetzt, so dass keine Informationen über die kinetischen Parameter einer entsprechenden Reaktion verfügbar sind. Dass freies L-Glutamin zum Teil ähnliche zellschützende und ApoJ-induzierende Eigenschaften besitzt wie nekrotische Zellen in Gegenwart des stabilen Glutaminsupplements N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin, lässt vermuten, dass unter diesen Bedingungen eine durch das Enzym Acylpeptidhydrolase katalysierte Hydrolyse des N-acetylierten Dipeptids an der zytoprotektiven und ApoJ-induzierenden Wirkung nekrotischer Zellen beteiligt ist. Hierbei scheint sich der zellschützende Effekt nahezu vollständig, die Induktion der ApoJ-Genexpression jedoch nur teilweise auf die enzymatische Freisetzung von L-Glutamin zurückführen zu lassen.

Während sich die zellschützenden Eigenschaften von L-Glutamin vermutlich durch dessen zentrale Rolle im zellulären Stoffwechsel erklären lassen, sind die Mechanismen, welche die ApoJ-

induzierende Wirkung von L-Glutamin vermitteln, vollkommen unklar. Denkbar wäre, dass eine durch L-Glutamin induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 hierbei eine Rolle spielt. Wie Rhoads und Mitarbeiter zeigen konnten, besitzt L-Glutamin die Eigenschaft, in kultivierten Darmepithelzellen (IEC-6, IPEC-J2) eine Aktivierung von ERK-1/2 (extracellular signal regulated kinase1/2, p42/p44) und JNK (c-Jun N-terminal kinase), zwei Mitgliedern der MAPK-Familie, zu induzieren. Dies hat zur Folge, dass es in Gegenwart von L-Glutamin zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 und damit einhergehend zu einer um Faktor 4 erhöhten Transkriptionsrate AP-1-abhängig regulierter Gene kommt (Rhoads et al. 1997, Rhoads et al. 2000). Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie scheinen auch die ApoJ-Genexpression positiv zu beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass ein im ApoJ-Promotor lokalisiertes AP-1-Motiv funktionell ist und eine Rolle bei der durch TGF- β induzierten Erhöhung der transkriptionellen Aktivität des ApoJ-Gens von Epithelzellen und Fibroblasten spielt (Jin und Howe 1997, Jin und Howe 1999). Zudem zeigen Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, dass die Inkubation von PC12-Zellen mit NGF und EGF in AP-1-abhängiger Weise zu einer vermehrten Transkription des ApoJ-Gens führt (Gutacker et al. 1999). Eine Aktivierung von ERK-1/2 scheint zudem nicht nur an einer durch Glutamin induzierten Genexpression beteiligt zu sein, sondern auch eine wichtige Rolle bei der durch IGF-I (insulin-like growth factor 1) induzierten ApoJ-Genexpression in der Zelllinie MCF-7 zu spielen (Criswell et al. 2005). Zusammenfassend besteht somit die Möglichkeit, dass durch L-Glutamin aktivierte Signalwege auch die Regulation des ApoJ-Gens in Rat1-Fibroblasten positiv beeinflussen könnten, wobei vor allem ERK-1/2 sowie Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie als vermittelnde Komponenten eine wichtige Rolle spielen könnten. L-Glutamin könnte jedoch noch über einen weiteren Mechanismus die Regulation des ApoJ-Gens beeinflussen. So wäre es möglich, dass in Abwesenheit von L-Glutamin dessen fehlende supprimierende Wirkung auf apoptotische Signalwege dazu führt, dass diese aktiviert werden. Dies könnte letztlich zu einer Inhibierung der ApoJ-Genexpression auf transkriptioneller Ebene führen, was den ApoJ-mRNA-Gehalt in glutaminfrei kultivierten Rat1-Fibroblasten negativ beeinflussen würde. Dass der Entzug von Glutamin in einer Reihe verschiedener Zelltypen zu einer Aktivierung apoptotischer Signalwege führt, konnte bereits mehrfach gezeigt werden (Petronini et al. 1996, Sanfeliu und Stephanopoulos 1999, Papaconstantinou et al. 2000, Fumarola et al. 2001, Tinto et al. 2002, Paquette et al. 2005). Zudem konnten Arbeiten unserer und anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass eine Induktion apoptotischer Prozesse in verschiedenen Zellen (u.a. MDCK und HUVEC) zu einer Repression der ApoJ-Genexpression führt (Flach et al. 1995, Zwain und Amato 2001, Artwohl et al. 2004).

Da das synthetische Dipeptid N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin keine physiologische Bedeutung hat und den Geweben im Allgemeinen ausreichende Mengen an L-Glutamin zur Verfügung stehen, muss man davon ausgehen, dass das Enzym Acylpeptidhydrolase in nekrotischen Geweben keine Rolle bei der Regulation der ApoJ-Genexpression in vitalen Zellen spielt. Aufgrund seiner endoproteolytischen Aktivität gegenüber oxidativ modifizierten Proteinen lässt sich jedoch in nekrotischen Geweben eine mögliche Beteiligung der Acylpeptidhydrolase am Abbau extrazellulärer denaturierter Proteine nicht ausschließen, zumal das Enzym nach Freisetzung aus sekundär

nekrotischen (postapoptotischen) Zellen stabil und enzymatisch aktiv zu sein scheint (Abb. 3.2.3). Dass jedoch die Inkubation mit nekrotischen Zellen auch unter Verwendung von freiem L-Glutamin zu einer Akkumulation von ApoJ-mRNA in serumfrei kultivierten Rat1-Fibroblasten führt, zeigt, dass nekrotische Zellen neben dem Enzym Acylpeptidhydrolase zusätzliche Faktoren freisetzen bzw. exponieren, die unabhängig von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin eine vermehrte ApoJ-Genexpression in vitalen Zellen induzieren können.

4.2. Regulation der ApoJ-Genexpression durch Toll-like Rezeptoren

Die unter Verwendung von L-Glutamin durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss nekrotischer Zellen auf die Genexpression in vitalen Zellen zeigten, dass eine Inkubation mit nekrotischen Zellen in serumfrei kultivierten Rat1-Fibroblasten die Expression von ApoJ und dem Enzym Matrix-Metalloproteinase-3 (MMP-3, Stromelysin-1) induziert und zugleich die Expression des profibrotischen Wachstumsfaktors CTGF (connectiv tissue growth factor) reprimiert. Eine Überprüfung weiterer Zelllinien zeigte, dass die Inkubation mit nekrotischen Zellen auch in glatten Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018 zu einer Induktion der ApoJ-Genexpression und zu einer Repression der CTGF-Expression führt. Die Expression des ApoJ-Gens in embryonalen Dottersackzellen der Zelllinie 10A hingegen wird in Gegenwart nekrotischer Zellen nicht beeinflusst. Dass die ApoJ-induzierende Wirkung nekrotischer Zellen in gleichem Maße durch sedimentierbare sowie lösliche Faktoren vermittelt wird, deutet auf eine möglicherweise komplexe Natur der entsprechenden Komponenten hin. Eine erfolgreiche Isolierung der ApoJ-induzierenden Faktoren schien somit wenig vielversprechend.

Eine Literaturrecherche ergab, dass eine vermehrte Expression von ApoJ- und MMP-3 in Fibroblasten sowie eine Repression der CTGF-Expression in Fibroblasten und glatten Gefäßmuskelzellen durch das inflammatorische Zytokin TNF- α induziert und scheinbar durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B vermittelt wird (Li et al. 2002, Li et al. 2001, Lin et al. 1998, Abraham et al. 2000, Villacorta et al. 2003). Dass die Inkubation mit nekrotischen Zellen in dendritischen Zellen, Makrophagen und Fibroblasten ebenfalls zu einer Aktivierung von NF- κ B führt sowie in NF- κ B-abhängiger Weise die Genexpression in Makrophagen und Fibroblasten moduliert und in diesem Zusammenhang eine NF- κ B-abhängige Induktion der MMP-3-Expression in embryonalen Mausfibroblasten erfolgt, wurde als Hinweis darauf gedeutet, dass auch die in vorliegender Arbeit gezeigte Regulation der ApoJ-, MMP-3- und CTGF-Genexpression in vitalen Rat1-Fibroblasten und CRL2018-Zellen bei Inkubation mit nekrotischen Zellen möglicherweise in NF- κ B-abhängiger Weise erfolgen könnte (Basu et al. 2000, Li et al. 2001).

TLR2, ein Mitglied der Toll-like Rezeptorfamilie, wurde als Signalrezeptor identifiziert, der die NF- κ B-aktivierende Wirkung nekrotischer Zellen vermittelt (Li et al. 2001). Die TLR2-aktivierenden Faktoren nekrotischer Zellen wurden in der zitierten Studie jedoch nicht identifiziert. Da eine Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors von allen Toll-like Rezeptoren vermittelt werden kann und zudem vermutet wird, dass u.a. aus nekrotischen Zellen freigesetzte Hitzeschockproteine (Hsp60, Hsp70, Hsp90, gp96) und RNA potentielle endogene Agonisten für die Toll-like Rezeptoren TLR4 bzw. TLR3

darstellen, führte schließlich zu der Hypothese, dass in Gegenwart nekrotischer Zellen Mitglieder der Toll-like Rezeptorfamilie als signaltransduzierende Rezeptoren an der Regulation des ApoJ-Gens in vitalen Rat1-Fibroblasten und CRL2018-Zellen beteiligt sein könnten (Vabulas et al. 2002a, Vabulas et al. 2002b, Vabulas et al. 2002c, Vabulas et al. 2001, Asea et al. 2002, Kakimura et al. 2002, Dybdahl, et al. 2002, Ohashi et al. 2000, Beg 2002, Kariko et al. 2004a, Brentano et al. 2005). Hierbei könnten von nekrotischen Zellen exponierte membranassoziierte bzw. freigesetzte Komponenten als endogene TLR-Agonisten fungieren und in TLR-abhängiger Weise durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B die ApoJ-induzierenden Eigenschaften nekrotischer Zellen vermitteln. Unterstützt wird diese Hypothese durch bereits veröffentlichte Studien, die zeigen, dass eine Inkubation primärer Astrozyten sowie gemischter Gliazellkulturen mit dem TLR4-spezifischen Agonisten Lipopolysaccharid (LPS) zu einer vermehrten Expression von ApoJ führt (Saura et al. 2003, LaDu et al. 2000).

Eine mittels RT-PCR durchgeführte Genexpressionsanalyse zeigte, dass Rat1-Fibroblasten TLR3 sowie TLR4 und CRL2018-Zellen TLR2, TLR3 sowie TLR4 exprimieren. 10A-Zellen hingegen, bei denen eine Inkubation mit nekrotischen Zellen keine Akkumulation von ApoJ-mRNA induziert, exprimieren weder TLR2 noch TLR3 und weisen nur eine geringe Expression von TLR4 auf. In weiterführenden Experimenten zeigte sich, dass eine Inkubation mit TLR-spezifischen Agonisten zu einer Induktion der ApoJ-Genexpression in glatten Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018 führt, wobei der stärkste Effekt durch den TLR3-spezifischen Agonisten Poly(I:C), einer synthetischen doppelsträngigen RNA, induziert wird. Die Inkubation dieser Zellen mit dem TLR2-spezifischen Agonisten Pam₃Cys-Ser-Lys₄ und dem TLR4-spezifischen Agonisten Lipopolysaccharid (LPS) führen zu einer vergleichsweise geringen Erhöhung der ApoJ-Genexpression. Eine vergleichende Untersuchung des Einflusses TLR-spezifischer Agonisten und nekrotischer Zellen auf die ApoJ-Genregulation embryonaler Fibroblasten der Zelllinie Rat1 zeigte, dass diese Zellen nur bei Inkubation mit Poly(I:C) und nekrotischen Zellen eine deutlich vermehrte ApoJ-Genexpression aufweisen. Zudem besitzen neben nekrotischen Zellen auch Poly(I:C) und LPS positiven Einfluss auf die MMP-3-Genexpression dieser Zellen. Die ApoJ-Genregulation von 10A-Zellen hingegen wird weder durch die verwendeten TLR-Agonisten noch durch nekrotische Zellen beeinflusst. Zusammenfassend könnten diese vergleichenden Untersuchungen auf eine Beteiligung von Toll-like Rezeptoren an einer durch nekrotische Zellen induzierten ApoJ-Genexpression hindeuten, wobei eine Aktivierung des Toll-like Rezeptors 3 durch endogene Agonisten eine zentrale Rolle spielen könnte.

Es zeigte sich, dass kaum Informationen hinsichtlich einer Beteiligung TLR-vermittelter Signalwege an der ApoJ-Genregulation existieren. Bislang wurde ausschließlich die ApoJ-induzierende Wirkung von Lipopolysaccharid, einem TLR4-spezifischen Agonisten, auf primäre Astrozyten und gemischte Gliazellkulturen beschrieben. Hierbei scheint im Rahmen LPS induzierter Signalkaskaden eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B essentiell für eine vermehrte ApoJ-Genexpression zu sein (Saura et al. 2003, LaDu et al. 2000). Die in vorliegender Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher TLR-spezifischer Agonisten auf die ApoJ-

Genexpression in glatten Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018 stellen somit die erste vergleichende Studie hinsichtlich einer TLR2-, TLR3- sowie TLR4-vermittelten Regulation des ApoJ-Gens dar. Da sich die Signalwege, welche durch die drei untersuchten Toll-like Rezeptoren aktiviert werden, teilweise deutlich voneinander unterscheiden und vor allem durch extrazelluläre doppelsträngige RNA induzierte TLR3-vermittelte Signalwege zu einer starken Erhöhung der ApoJ-Genexpression in CRL2018-Zellen führen, könnten neue, bislang unbekannte Perspektiven hinsichtlich der Regulation der ApoJ-Genexpression eröffnen. Deshalb sollen an dieser Stelle zunächst potentielle Mechanismen diskutiert werden, die im Rahmen TLR2-, TLR3- und TLR4-vermittelter Signaltransduktionskaskaden die Regulation der ApoJ-Genexpression von CRL2018-Zellen und Rat1-Fibroblasten beeinflussen könnten. Anschließend soll auf eine potentielle Beteiligung endogener TLR-Agonisten an der durch nekrotische Zellen induzierten ApoJ-Genexpression eingegangen werden.

4.2.1 Einfluss TLR2-, TLR3- und TLR4-vermittelter Signalwege auf die Regulation der ApoJ-Genexpression in CRL2018-Zellen und Rat1-Fibroblasten

Essentiell für die signaltransduzierende Funktion aller Toll-like Rezeptoren ist eine konservierte zytoplasmatische Domäne aus etwa 200 Aminosäuren, die als TIR-Domäne (Toll/IL-1R-Domänen) bezeichnet wird (Slack et al. 2000, Akira und Takeda 2004). Diese ermöglicht nach Rezeptoraktivierung die Anlagerung verschiedener TIR-Domänen-enthaltender Adaptorproteine an die TIR-Domäne der Toll-like Rezeptoren und somit die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege. Die Interaktion mit unterschiedlichen intrazellulären Adaptorproteinen definiert hierbei die von verschiedenen Toll-like Rezeptoren initiierten Signalkaskaden. Diese lassen sich grundsätzlich in zwei verschiedenen Gruppen einteilen, MyD88-abhängige und MyD88-unabhängige Signaltransduktionskaskaden (1.2.4). Eine Aktivierung TLR2-vermittelter Signalkaskaden erfolgt hierbei ausschließlich in MyD88-abhängiger Weise und verläuft über die beiden Adaptorproteine MyD88 (myeloid differentiation primary-response protein 88) und TIRAP/MAL (TIR-domain containing adaptor protein / MyD88-adaptor like protein) (Hornig et al. 2001, Yamamoto et al. 2002a, Hornig et al. 2002, Akira und Takeda 2004). Im Verlauf dieser Signaltransduktion kommt es schließlich es zu einer raschen (<1h) Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und einer davon abhängigen Expression inflammatorischer Zytokine, Chemokine und kostimulierender Signalmoleküle. Im Gegensatz hierzu erfolgt eine Aktivierung TLR3-vermittelter Signalwege ausschließlich in MyD88-unabhängiger Weise. Als zentrale Komponente dieser MyD88-unabhängigen Signalwege konnte das Adaptorprotein TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- β) identifiziert werden (Yamamoto et al. 2002b, Oshiumi et al. 2003a). Dieses vermittelt eine zeitlich verzögerte (1-2h) Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B sowie eine Aktivierung der beiden zytosolischen Proteinkinasen IKK- ϵ (IKK-i, inducible IKK) und TBK1 (TRAF-family-member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase), welche die Phosphorylierung des konstitutiv exprimierten Transkriptionsfaktors IRF-3 (interferon-regulatory factor 3) katalysieren (Sharma et al. 2003, Fitzgerald et al. 2003a). Ein wesentlicher Unterschied zu MyD88-abhängigen

Signalwegen besteht somit in der IRF-3-abhängigen Induktion der IFN- β -Expression sowie in der autokrinen/parakrinen Regulation Interferon-induzierter Gene im Rahmen TLR3-vermittelter MyD88-unabhängiger, TRIF-abhängiger Signalkaskaden (Akira und Takeda 2004). Bezogen auf die Signaltransduktion nimmt TLR4 eine Sonderstellung ein. Dieser ist als einziger Vertreter der TLR-Familie in der Lage, sowohl MyD88-abhängige als auch MyD88-unabhängige Signalkaskaden zu aktivieren. Die Aktivierung MyD88-abhängiger Signalkaskaden erfolgt hierbei wie bei TLR2 durch die Interaktion von TLR4 mit den beiden Adaptorproteinen MyD88 und TIRAP/MAL (Horng et al. 2001, Fitzgerald et al. 2001, Yamamoto et al. 2002a, Horng et al. 2002, Akira und Takeda 2004). Im Gegensatz zu TLR3 ist für eine TLR4-vermittelte Aktivierung MyD88-unabhängiger Signalkaskaden neben dem Adaptorprotein TRIF mit TRAM (TRIF-related adaptor molecule) jedoch ein weiteres Adaptorprotein notwendig (Yamamoto et al. 2002b, Fitzgerald et al. 2003b, Oshiumi et al. 2003b, Akira und Takeda 2004).

Wie in vorliegender Arbeit gezeigt werden konnte, führt die Inkubation glatter Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018, welche die Toll-like Rezeptoren TLR2, TLR3 und TLR4 exprimieren, mit entsprechenden TLR-spezifischen Agonisten zu einer vermehrten Expression von ApoJ-mRNA. Dass eine Aktivierung von TLR2 ausschließlich MyD88-abhängige Signalwege, eine Aktivierung von TLR3 jedoch ausschließlich MyD88-unabhängige Signalwege induziert, zeigt, dass die Expression von ApoJ im Rahmen beider Signaltransduktionskaskaden induziert wird, MyD88-unabhängige Signalwege jedoch zu einer deutlich stärkeren Akkumulation von ApoJ-mRNA führen. Vergleicht man die Wirkung von LPS und Pam₃Cys-Ser-Lys₄ hinsichtlich ihrer ApoJ-induzierenden Wirkung, ist, selbst unter Verwendung hoher Konzentrationen beider Substanzen ($\geq 1\mu\text{g/ml}$), kein deutlich stärkerer Effekt des TLR4-Agonisten zu erkennen (Abb. 3.4.1, Abb. 3.4.3, Abb. 3.4.7). Zudem besitzen LPS und Pam₃Cys-Ser-Lys₄ keine additive Wirkung hinsichtlich der ApoJ-Genexpression, was darauf hindeuten könnte, dass in CRL2018-Zellen TLR2- und TLR4-vermittelte Signalwege redundant sind und bereits allein durch Pam₃Cys-Ser-Lys₄ oder LPS maximal aktiviert werden (Abb. 3.4.3). Dies lässt vermuten, dass im Gegensatz zu dendritischen Zellen und Makrophagen eine Aktivierung von TLR4 in CRL2018-Zellen zu keiner bzw. nur zu einer schwachen Induktion MyD88-unabhängiger Signalwege führt und die ApoJ-induzierende Wirkung von LPS hierbei überwiegend durch MyD88-abhängige Signalwege vermittelt wird. Dies könnte auf eine unterschiedlich starke TLR4-vermittelte Aktivierung MyD88-unabhängiger Signalwege in verschiedenen Zelltypen zurückzuführen sein. Durch Überexpression von rekombinantem MyD88 mit dominant negativer Wirkungsweise konnte gezeigt werden, dass in primären humanen Fibroblasten und Endothelzellen das Adaptorprotein MyD88 essentiell für eine LPS-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B ist, während in primären humanen Makrophagen eine TLR4-vermittelte NF- κ B-Aktivierung auch in MyD88-unabhängiger Weise erfolgt (Andreakos et al. 2004, Sacre et al. 2004). Verglichen mit TLR3 scheinen zudem das Ausmaß einer TLR4-vermittelten Aktivierung MyD88-unabhängiger Signaltransduktionskaskaden und einer damit verbundenen Induktion der IFN- β -Genexpression deutlich schwächer zu sein (Doyle et al. 2003, Akira und Takeda 2004, Brentano et al. 2005). Eine

Diskussion

ausbleibende bzw. unzureichende Induktion der INF- β -Genexpression im Rahmen TLR4-vermittelter MyD88-unabhängiger Signalwege könnte auch eine Erklärung dafür sein, dass im Gegensatz zu Poly(I:C) eine Inkubation mit LPS (1 μ g/ml) in keiner der beiden TLR4-exprimierenden Zelllinien CRL2018 und Rat1 zu einer Expression des Enzyms iNOS führt (Abb. 3.4.7). Für eine transkriptionelle Aktivierung des iNOS-Gens sind neben aktiviertem NF- κ B auch vom INF- α/β -Rezeptor (IFNAR) vermittelte Signale notwendig. Dieser Rezeptor wird in LPS-stimulierten Makrophagen durch INF- β in autokriner/parakriner Weise aktiviert (Gao et al. 1998, Toshchakov et al. 2002).

Welche Mechanismen im Rahmen MyD88-abhängiger Signalwege die Induktion der ApoJ-Gentranskription vermitteln, ist nicht bekannt. Wie bereits gezeigt werden konnte, ist für eine deutlich vermehrte ApoJ-Genexpression gemischter Gliazellkulturen und primärer Astrozyten eine Inkubation mit LPS für mindestens 12h notwendig (Saura et al. 2003, LaDu et al. 2000). Dass eine Aktivierung TLR4-vermittelter Signalwege innerhalb kürzester Zeit (<1h) zu einer vermehrten Expression primärer Zielgene führt, lässt vermuten, dass die Induktion der ApoJ-Genexpression indirekt verläuft und durch sekundäre Prozesse vermittelt wird. Ob hierbei die im Promotorbereich des ApoJ-Gens vorhandenen potentiellen NF- κ B-Bindestellen eine Rolle spielen, ist nicht bekannt. Die beschriebene Suppression einer LPS-induzierten ApoJ-Genexpression durch NF- κ B-Inhibitoren könnte sich auch auf eine Inhibierung TLR4-vermittelter, NF- κ B-abhängiger primärer Prozesse zurückführen lassen. Dies könnte zugleich auch eine nachfolgende Aktivierung sekundärer, ApoJ-induzierender Prozesse verhindern. Eine sekundäre Induktion der ApoJ-Genexpression nach Aktivierung von TLR2 und TLR4 könnte beispielsweise in autokriner/parakriner Weise durch inflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 β oder IL-6 vermittelt werden, zumal die ApoJ-induzierende Wirkung dieser drei Zytokine bereits mehrfach nachgewiesen wurde (Kyprianou et al. 1991, Hardardottir et al. 1994, Hardardottir et al. 1997, Zwain et al. 1994, Berge et al. 1997, Van Lenten et al. 2001a, Li et al. 2002, Patel et al. 2004). Eine durch TNF- α induzierte Expression von ApoJ-mRNA in Rat1-Fibroblasten konnte zudem im Verlauf dieser Arbeit gezeigt werden (ohne Abb.). Dass im Gegensatz zu CRL2018-Zellen eine 18-stündige Inkubation von Rat1-Fibroblasten mit LPS zu keiner deutlich erhöhten Expression von ApoJ-mRNA führt, könnte möglicherweise auf eine unzureichende Synthese inflammatorischer Zytokine zurückzuführen sein. Grund hierfür könnte die beschriebene NF- κ B-inhibierende Wirkung von ApoJ sein (Santilli et al. 2003). Weil Rat1-Fibroblasten gegenüber CRL2018-Zellen eine um Faktor 2,5 erhöhte Basalexpression an ApoJ-mRNA aufweisen (Abb. 3.4.7), könnte eine vermehrte Synthese von ApoJ in Rat1-Fibroblasten einer TLR4-vermittelten NF- κ B-Aktivierung stärker entgegenwirken, was wiederum zu einer verminderten Expression inflammatorischer Zytokine führen würde. Die ausbleibende Induktion der ApoJ-Genexpression durch LPS in 10A-Zellen lässt sich wahrscheinlich auf das geringe Expressionsniveau an TLR4 zurückführen. Um eine Beteiligung inflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6) an der TLR2- und TLR4-vermittelten ApoJ-Genexpression zu untersuchen, wäre es zunächst notwendig, mittels RT-PCR oder ELISA die vermehrte Expression dieser Proteine in Gegenwart von Pam₃Cys-Ser-Lys₄ und LPS zu überprüfen.

Anschließend könnte der Nachweis einer funktionellen Beteiligung dieser Zytokine an der Regulation der ApoJ-Genexpression in CRL2018-Zellen durch Zugabe zytokinspezifischer neutralisierender Antikörper in das Kulturmedium erbracht. Dass die Inkubation von Rat1-Fibroblasten mit LPS zu einer vermehrten Expression von MMP-3 führt, zeigt deutlich, dass in diesen Zellen TLR4-vermittelte Signalwege funktionell sind, was die in Fibroblasten und Epithelzellen beschriebene Induktion dieses Enzyms durch LPS bestätigt (Warner et al. 2004). Dass eine induzierende Wirkung von Peptidoglykan, einem TLR2-spezifischen Agonisten, auf die MMP-3-Genexpression in humanen Fibroblasten beschrieben wurde, eine Inkubation mit Pam₃Cys-Ser-Lys₄ jedoch zu keiner vermehrten MMP-3-mRNA-Expression in Rat1-Zellen führt, lässt sich durch die fehlende Expression von TLR2 in diesen Zellen erklären (Kyburz et al. 2003). Zugleich bestätigt dies die spezifische Aktivierung TLR2-vermittelter Signalwege durch Pam₃Cys-Ser-Lys₄.

Eine Beteiligung der autokrinen/parakrinen Wirkung inflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 β oder IL-6 lässt sich auch an der durch Poly(I:C) induzierten ApoJ-Genexpression nicht ausschließen. Dass die Inkubation von CRL2018-Zellen mit Pam₃Cys-Ser-Lys₄ und LPS gemeinsam zu keiner stärkeren Akkumulation von ApoJ-mRNA führt als mit jeweils beiden Substanzen separat, diese jedoch in Gegenwart von Poly(I:C) in additiver Weise die ApoJ-Genexpression erhöhen (Abb. 3.4.3), lässt vermuten, dass im Rahmen TLR3-vermittelter, MyD88-unabhängiger Signalwege unabhängige Mechanismen zu einer Aktivierung des ApoJ-Gens führen. Zudem induziert Poly(I:C) eine deutlich stärkere Akkumulation von ApoJ-mRNA in CRL2018-Zellen als Pam₃Cys-Ser-Lys₄ und LPS. Ein wesentlicher Unterschied MyD88-abhängiger und MyD88-unabhängiger Signalkaskaden besteht darin, dass es im Verlauf letzterer zu einer Phosphorylierung des konstitutiv exprimierten Transkriptionsfaktors IRF-3 und damit einhergehend zu einer Induktion der IFN- β -Genexpression kommt (Abb. 4.2.1). IFN- β wiederum aktiviert nach Sekretion in autokriner/parakriner Weise den IFN- α/β -Rezeptorkomplex, bestehend aus den beiden Transmembranproteinen IFNAR-1 und IFNAR-2. Dies führt zu einer Kreuzaktivierung der beiden rezeptorassoziierten Tyrosinkinasen Jak 1 und Tyk 2, Mitgliedern aus der Familie der Janus Proteintyrosinkinasen. Diese phosphorylieren schließlich die im Zytosol vorliegenden Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2 (signal transducers and activators of transcription). Durch Homodimerisierung von STAT1 formiert sich der Proteinkomplex AAF (IFN- α -activated factor), phosphoryliertes STAT2 hingegen bildet mit STAT1 und IRF-9 (p48, ISGF3 γ) einen heterotrimeren Proteinkomplex, der als ISGF3 (interferon stimulated gene factor 3) bezeichnet wird. Beide Proteinkomplexe translozieren in den Nukleus, wo sie durch Bindung an spezifische DNA-Sequenzen im Promotorbereich von Zielgenen deren Expression induzieren. Hierbei bindet der Transkriptionsfaktorkomplex AAF an GAS-Elemente (IFN- γ -activated sequence), ISGF3 hingegen bindet an ISRE-Elemente (interferon-stimulated response element) (Darnell et al. 1994, Stark et al. 1998). Unter den zahlreichen, durch IFN- β -induzierten Genen befinden sich auch Mitglieder der IRF-Familie, von denen IRF-7, das normalerweise nur in geringen Mengen im Zytosol von Zellen vorliegt, eine entscheidende Rolle bei der Induktion von mehreren IFN- α -Subtypen spielt. Die beiden im Rahmen MyD88-unabhängiger Signalwege aktivierten Kinasen

IKKε und TBK1 phosphorylieren neu synthetisiertes IRF-7, das nach Dimerisierung schließlich an entsprechende, auch als PRD-LE (positive regulatory domain-like elements) bezeichnete ISRE-Elemente im Promotorbereich verschiedener IFN-α-Gene bindet und deren Expression induziert.

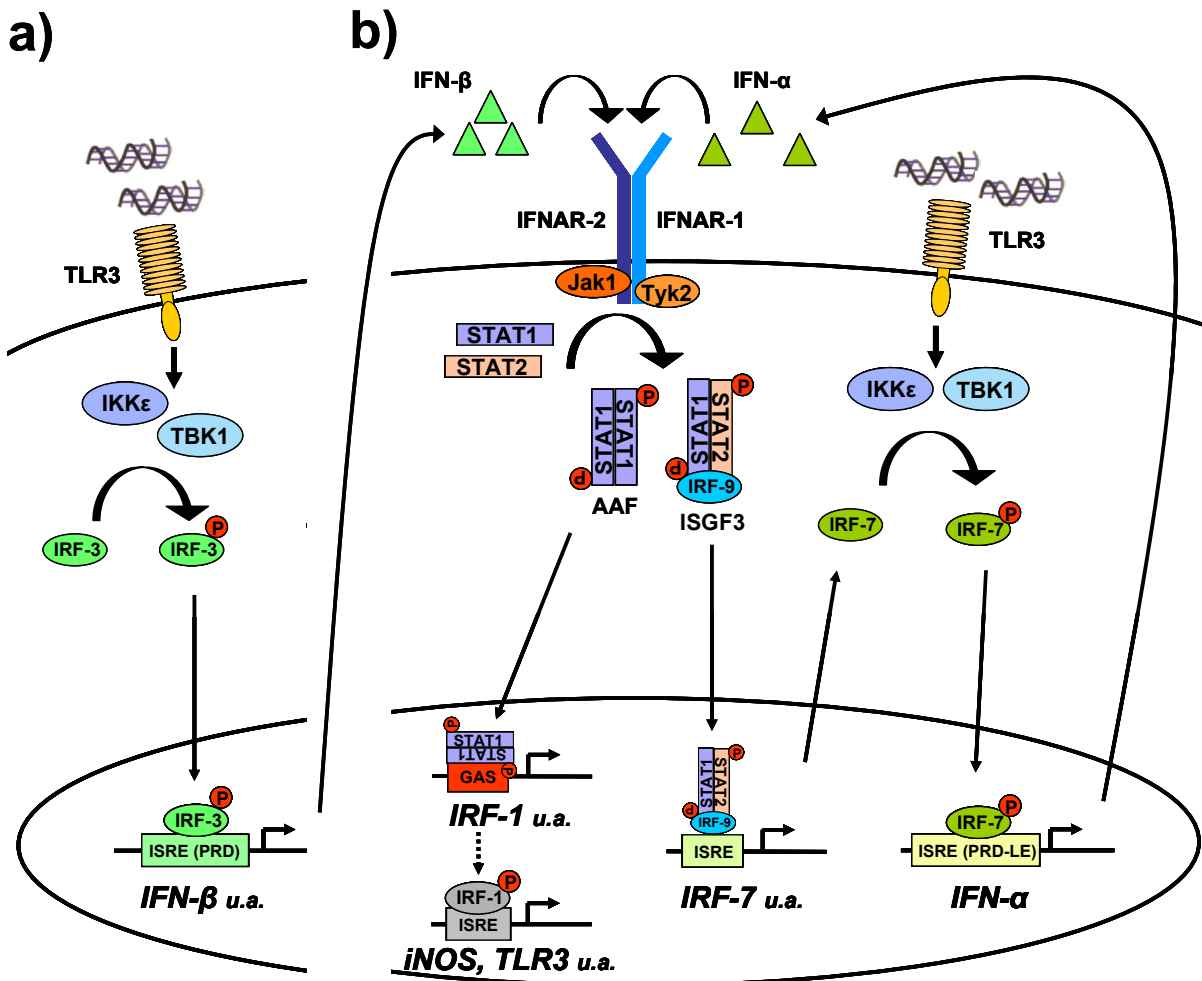


Abbildung 4.2.1: Mechanismus einer TLR3-abhängigen und durch Poly(I:C) induzierten Expression Interferon-regulierter Gene: a) Die Aktivierung von TLR3 durch Poly(I:C) führt in MyD88-unabhängiger Weise zu einer Aktivierung der beiden zytosolischen Proteinkinasen IKKε und TBK1. Diese phosphorylieren den im Zytosol vorliegenden konstitutiv exprimierten Transkriptionsfaktor IRF-3, der nach Dimerisierung an entsprechende ISRE-Elemente (PRDI, PRDIII) im Promotorbereich des IFN-β-Gens bindet und die IFN-β-Expression induziert. b) Neusynthetisiertes und sekretiertes IFN-β aktiviert anschließend in autokriner/parakriner Weise den heterodimeren IFNAR-Rezeptorkomplex (IFNAR-1, IFNAR-2). Nach Aktivierung der beiden rezeptorassoziierten Tyrosinkinasen Jak 1 und Tyk 2 phosphorylieren diese die beiden zytosolischen Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2. Phosphoryliertes STAT1 bildet sowohl homodimere (AAF) als auch zusammen mit phosphoryliertem STAT2 und IRF-9 heterotrimere Transkriptionsfaktorkomplexe (ISGF3) aus, welche in den Nucleus translozieren und unterschiedliche Gene aktivieren. Durch Bindung an GAS-Elemente induziert homodimeres STAT1 u.a. die Expression des Transkriptionsfaktors IRF-1, der nach Aktivierung an spezifische ISRE-Elemente (IRF-E) bindet und die Expression weiterer Gene (u.a. iNOS, TLR3) vermittelt (vereinfacht dargestellt). Der Transkriptionsfaktorkomplex ISGF3 induziert durch Bindung an andere ISRE-Elemente die Expression weiterer Interferon-regulierter Gene. Hierbei spielt die Induktion der IRF-7-Expression eine besondere Rolle, da neusynthetisiertes IRF-7 nach Phosphorylierung durch die aktivierten Proteinkinasen IKKε und TBK1 an ISRE-Elemente (PRD-LE) im Promotorbereich verschiedener IFN-α-Gene bindet und deren Expression induziert. Nach Sekretion ist neusynthetisiertes IFN-α, ähnlich wie IFN-β, in der Lage, den IFNAR-Rezeptorkomplex zu aktivieren. Dies führt schließlich zu einer Amplifikation der Interferonantwort und damit einhergehend zu einer verstärkten Expression Interferon-regulierter Gene.

Neu synthetisiertes IFN- α schließlich aktiviert nach Sekretion in autokriner/parakriner Weise den IFN- α/β -Rezeptorkomplex, was letztlich zu einer Amplifikation der Interferonantwort führt (Taniguchi und Takaoka 2002, Takaoka und Taniguchi 2003, Sharma et al. 2003).

Für eine Induktion der transkriptionellen Aktivität des TLR3-Gens durch Poly(I:C) scheint die autokrine/parakrine Wirkung von IFN- β ausreichend zu sein. Wie Heinz und Mitarbeiter zeigen konnten, spielt bei einer durch IFN- β induzierten TLR3-Genexpression die Bindung des Transkriptionsfaktors IRF-1 (interferon regulatory factor 1) an ein ISRE-Element im Promotorbereich des TLR3-Gens eine entscheidende Rolle (Heinz et al. 2003). Dies deutet darauf hin, dass die Induktion der TLR3-Genexpression durch IFN- β nach Aktivierung des IFNAR-Rezeptorkomplexes über eine AAF-vermittelte Induktion der IRF-1-Genexpression verläuft, wobei schließlich neusynthetisiertes und aktiviertes IRF-1 die Transkription des TLR3-Gens induziert (Taniguchi und Takaoka 2002, Takaoka und Taniguchi 2003). Ein ähnlicher Mechanismus scheint auch an einer durch Poly(I:C) induzierten Genexpression von iNOS beteiligt zu sein (Kamijo et al. 1994, Martin et al. 1994, Jacobs und Ignarro 2001, Taniguchi und Takaoka 2002, Takaoka und Taniguchi 2003). Hierbei scheint eine durch die autokrine/parakrine Wirkung von IFN- β vermittelte Aktivierung von IRF-1 zwar notwendig, jedoch nicht ausreichend für eine effiziente Expression dieses Enzyms zu sein und zusätzlich eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zu benötigen (Heitmeier et al. 1998, Toshchakov et al. 2002). Über welche Mechanismen neusynthetisiertes IRF-1 aktiviert wird, scheint bislang unklar. Untersuchungen von Watanabe et al. deuten jedoch darauf hin, dass eine Phosphorylierung von IRF-1 hierbei eine Rolle spielen könnte (Watanabe et al. 1991).

Wie in vorliegender Arbeit gezeigt werden konnte, führt die Inkubation von CRL2018-Zellen mit dem TLR3-spezifischen Agonisten Poly(I:C) sowohl zu einer transienten Induktion der IFN- β -Expression (2-4h) als auch zu einer vermehrten Expression der beiden sekundär durch IFN- β induzierten Gene TLR3 und iNOS (≥ 3 h). Zudem kommt es in diesem Zusammenhang auch zu einer Erhöhung des zellulären Gehalts an IFN- α 1-spezifischer mRNA. Dies zeigt deutlich, dass die Inkubation mit Poly(I:C) zu einer Initiation des IFN- α/β -Systems in CRL2018-Zellen führt. Vergleicht man den zeitlichen Verlauf der TLR3- und iNOS-Genregulation mit der von ApoJ, fällt auf, dass die Induktion der transkriptionellen Aktivität des ApoJ-Gens nach 3-4h zeitgleich zur Induktion der beiden IFN- β -regulierten Gene erfolgt. Dies lässt vermuten, dass ApoJ bei Inkubation mit Poly(I:C) im Rahmen einer TLR3-vermittelten Interferonantwort reguliert werden könnte. Ein Zusammenhang zwischen der ApoJ-Genregulation und dem Typ I-Interferonsystem ist bislang jedoch noch nicht beschrieben worden. Eine Analyse des 5'-untranskribierten Bereichs des ApoJ-Gens der Ratte (GenBank accession number M64733) mit dem Programm MatInspector 2.2 (Quandt et al. 1995) zeigte, dass dieser Genbereich mehrere potentielle GAS/STAT- und ISRE/IRF-Elemente enthält. Aktuelle Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen jedoch, dass weder eine Inkubation von CRL2018-Zellen mit rekombinantem IFN- β noch mit IFN- β und Pam₃Cys-Ser-Lys₄ gemeinsam zu einer deutlich vermehrten Expression von ApoJ führt (M. Schwarz, unveröffentlicht). Somit scheint weder eine Aktivierung des IFN- α/β -Rezeptorkomplexes noch eine synergistische Wirkung IFNAR-

Diskussion

und TLR2-vermittelter Signalwege zu einer starken Aktivierung des ApoJ-Gens zu führen. Dass eine Induktion der TLR3-Expression durch IFN- β sowie eine Induktion der iNOS-Genexpression bei gleichzeitiger Inkubation mit IFN- β und Pam₃Cys-Ser-Lys₄ bereits beschrieben wurde (Heinz et al. 2003, Toshchakov et al. 2002), zeigt, dass sich die Mechanismen, welche im Rahmen einer durch Poly(I:C) aktivierten und TLR3-vermittelten Signaltransduktionskaskade zu einer Induktion der ApoJ-Genexpression führen, von denen unterscheiden, welche die Regulation des iNOS- bzw. TLR3-Gens beeinflussen (Abb. 4.2.1).

Da eine stark vermehrte Expression von ApoJ in CRL2018-Zellen weder durch IFN- β noch durch die gleichzeitige Inkubation mit Pam₃Cys-Ser-Lys₄ und IFN- β , jedoch durch Poly(I:C) induziert werden kann, muss es folglich im Rahmen TLR3-vermittelter, MyD88-unabhängiger Signalwege neben einer Aktivierung von NF- κ B und einer IFNAR-vermittelten Aktivierung von ISGF3 und AAF zu einer Aktivierung weiterer Signalkomponenten kommen, welche letztlich für die starke Induktion der ApoJ-mRNA-Expression verantwortlich sind. Verglichen mit TLR2- und IFNAR-vermittelten Signalwegen besteht ein essentieller Unterschied TLR3-vermittelter Signalwege in der Aktivierung der beiden Kinasen IKK ϵ und TBK1 (Abb. 1.2.4, Abb. 4.2.1), welche die Phosphorylierung der zytosolischen Transkriptionsfaktoren IRF-3 und IRF-7 katalysieren (Sharma et al. 2003). Dies bedeutet, dass zwar bei Inkubation mit Poly(I:C), nicht jedoch bei Inkubation mit Pam₃Cys-Ser-Lys₄ und/oder IFN- β , eine Aktivierung dieser beiden Transkriptionsfaktoren erfolgt. Die im Promotorbereich des ApoJ-Gens der Ratte vorhandenen potentiellen ISRE/IRF-Elemente (relative Position zum Transkriptionsstart: -1689/-1679, -1502/-1483, -981/-962, -565/-546, -460/-441) stellen mögliche DNA-Bindestellen für diese beiden Transkriptionsfaktoren dar, was darauf hindeutet, dass phosphoryliertes IRF-3/IRF-7 an der Regulation der ApoJ-Genexpression beteiligt sein könnte. Eine Inkubation von CRL2018-Zellen mit Poly(I:C) könnte unter diesen Voraussetzungen über eine von den beiden Kinasen IKK ϵ und TBK1 vermittelte Aktivierung von IRF-3 zunächst direkt zu einer geringen Induktion der ApoJ-Genexpression führen, die im Verlauf einer durch IFN- β vermittelten Induktion und Amplifikation der Interferonantwort über eine vermehrte Expression und Aktivierung von IRF-7 verstärkt würde. In diesem Zusammenhang wäre zudem denkbar, dass neben IRF-3- oder IRF-7-Homodimeren auch IRF-3/IRF-7-Heterodimere durch Bindung an die im Promotorbereich des ApoJ-Gens vorhandenen potentiellen ISRE/IRF-Elemente dessen Transkription induzieren (Au et al. 2001, Honda et al. 2005). Zur Überprüfung dieser Hypothese, wäre es zunächst notwendig zu untersuchen, inwiefern ein autokriner/parakriner Mechanismus von TypI-Interferonen an der durch Poly(I:C)-induzierten ApoJ-Genexpression in CRL2018-Zellen beteiligt ist. Dies könnte mit Hilfe neutralisierender Antikörper überprüft werden, die gegen IFN- α bzw. IFN- β gerichtet sind. Gegebenenfalls könnte anschließend eine Beteiligung von IRF-3 und IRF-7 an der Regulation des ApoJ-Gens durch Überexpression von IRF-3- und IRF-7-Mutanten mit dominant negativer Wirkungsweise untersucht werden (Sharma et al. 2003, Fitzgerald et al. 2003, Au et al. 2001). Eine direkte Bindung von IRF-3 oder IRF-7 an einzelne ISRE/IRF-Elemente im ApoJ-Promotor von Poly(I:C)-stimulierten CRL2018-Zellen könnte mit Hilfe von EMSA-Studien (electromobility shift assay) untersucht werden. Hierbei könnte die spezifische Bindung von IRF-3 oder IRF-7 an einzelne ISRE-Elemente im ApoJ-Promotor mittels

Supershiftassays unter Verwendung IRF-3 und IRF-7-spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Alternativ hierzu könnte der Nachweis einer Assoziation dieser Transkriptionsfaktoren mit entsprechenden ISRE-Elementen in Poly(I:C)-stimulierten CRL2018-Zellen und Rat1-Fibroblasten auch mit Hilfe eines ChIP-Assays (chromatin immunoprecipitation assay) unter Verwendung IRF-3- und IRF7-spezifischer Antikörper sowie ISRE-flankierender Primerpaare erfolgen. Letztere dienen zur PCR-basierenden Amplifikation spezifischer, nach Immunopräzipitation angereicherter genomischer DNA-Sequenzen, welche die einzelnen ISRE/IRF-Elemente des ApoJ-Promotorbereichs beinhalten (Takaoka et al. 2003, Au und Pitha 2001). Gegenüber der EMSA-Methode besteht der Vorteil des ChIP-Assays darin, dass hiermit der Nachweis einer intrazellulären Bindung spezifischer Transkriptionsfaktoren an individuelle Promotorelemente möglich ist.

Ähnlich wie in CRL2018-Zellen wird auch in Rat1-Fibroblasten die Expression von ApoJ und iNOS durch Poly(I:C) induziert (Abb. 3.4.7). Zudem führt neben LPS auch eine Inkubation mit Poly(I:C) zu einer starken Akkumulation von MMP-3-mRNA in Rat1-Zellen, was zeigt, dass dieses Enzym sowohl in TLR4- als auch in TLR3-abhängiger Weise reguliert wird. Wie bereits gezeigt werden konnte, induziert eine Inkubation mit IFN- β die MMP-3-Expression in der humanen Fibroblastenzelllinie FS-4 (Sciavolino et al. 1994). Die im Vergleich zu LPS deutlich stärkere Aktivierung des MMP-3-Gens durch Poly(I:C) könnte folglich auf die autokrine/parakrine Wirkung von IFN- α/β zurückzuführen sein. Gegenüber CRL2018-Zellen führt die Inkubation von Rat1-Fibroblasten mit Poly(I:C) jedoch zu einer schwächeren Induktion der ApoJ-Genexpression. Ein Grund hierfür könnte sein, dass gegenüber CRL2018-Zellen eine durch Poly(I:C)-induzierte Regulation der ApoJ-Genexpression in Rat1-Zellen, ähnlich wie bei der Inkubation mit nekrotischen Zellen, zeitlich verzögert stattfindet. Hierbei könnte in beiden Zelllinien eine teils unterschiedliche subzelluläre Lokalisation von TLR3 eine Rolle spielen. Während TLR2 und TLR4 zelloberflächenständige Rezeptoren darstellen, scheint TLR3 in dendritischen Zellen, Makrophagen, B-Zellen und Fibrosarkomazellen (HT1080) nahezu ausschließlich in endosomalen/lysosomalen Kompartimenten lokalisiert zu sein (Matsumoto et al. 2003, Nishiya und DeFranco 2004, Sen und Sarkar 2005). Eine Studie beschreibt jedoch, dass in zwei unterschiedlichen humanen Fibroblasten-Zelllinien (MRC-5, FS-4) dieser Rezeptor zum Teil auf der Zelloberfläche lokalisiert ist (Matsumoto et al. 2002). Im Vergleich zu dendritischen Zellen weisen diese Fibroblasten zudem eine deutlich frühere Induktion der IFN- β -Expression bei Inkubation mit Poly(I:C) auf. Die Autoren vermuten, dass bei dendritischen Zellen eine vorangehende Internalisierung von Poly(I:C) notwendig für eine effiziente Aktivierung von endosomal lokalisiertem TLR3 ist und dies der Grund für die verzögerte Aktivierung TLR3-vermittelter Signalwege in diesen Zellen ist. Bei den verwendeten Fibroblasten hingegen könnte eine Aktivierung des Rezeptors direkt an der Zelloberfläche erfolgen (Matsumoto et al. 2003). Ähnliche Unterschiede in der subzellulären Lokalisation dieses Rezeptors könnten auch die Poly(I:C)-induzierte ApoJ-Genexpression in CRL2018-Zellen und Rat1-Fibroblasten beeinflussen, wobei CRL2018-Zellen möglicherweise einen höheren Anteil an zelloberflächenständigem TLR3 aufweisen, was eine frühere Induktion der ApoJ-Genexpression zur Folge hätte. Die Lokalisation von TLR3 in beiden Zelllinien könnte mikroskopisch

Diskussion

mittels Immunofluoreszenzfärbung unter Verwendung TLR3-spezifischer Antikörper überprüft werden. Des Weiteren könnte eine relative Mengenbestimmung an oberflächenständigem TLR3 beider Zelllinien mittels FACS-Analyse durchgeführt werden.

Neben einer Aktivierung des Toll-like Rezeptors 3 kann eine Initiation des Interferonsystems durch Poly(I:C) auch in TLR3- und TRIF-unabhängiger Weise erfolgen. Dies zeigt, dass neben TLR3 noch weitere zelluläre Komponenten an der Erkennung von doppelsträngiger RNA beteiligt sind (Hoebe et al. 2003, Sen und Sarkar 2005, Honda et al. 2005). Diese TLR3-unabhängigen Mechanismen scheinen jedoch ausschließlich durch intrazelluläres Poly(I:C) aktiviert zu werden, da es hierfür notwendig ist, Poly(I:C) mittels Transfektionsreagenzien in das Zytosol von Zellen einzubringen. Die Erkennung von intrazellulärem Poly(I:C) erfolgt insbesondere durch die beiden RNA Helikasen RIG-I (retinoic acid inducible gene I) und MDA-5 (melanoma differentiation-associated gene 5). Diese sind in der Lage, über ihre C-terminale Dömane an doppelsträngige RNA zu binden und mittels N-terminaler CARD-Domäne (caspase recruitment domain) Signalwege zu initiieren, die eine Aktivierung von NF- κ B und IRF-3 bewirken und damit verbunden die Expression von IFN- β induzieren (Yoneyama et al. 2004, Andrejeva et al. 2004). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass auch die Proteinkinase PKR (interferon-inducible dsRNA-dependent protein kinase) an der Erkennung von intrazellulärem Poly(I:C) beteiligt sein könnte (Diebold et al. 2003). Diese TLR3-unabhängigen Mechanismen werden jedoch nicht durch extrazelluläres Poly(I:C) aktiviert (Li et al. 2005). Dass in vorliegender Arbeit Poly(I:C) ausschließlich in wässriger Lösung dem Kulturmedium zugesetzt wurde und zudem eine Inkubation mit Poly(I:C) zu keiner vermehrten Expression von ApoJ-mRNA in TLR3-negativen 10A-Zellen führt, spricht deutlich für eine TLR3-vermittelte Induktion der ApoJ-Genexpression durch Poly(I:C) (Abb. 3.4.7). Dass Poly(I:C) in 10A-Zellen, die zuvor mit einem TLR3-Expressionsplasmid transfiziert wurden, eine Akkumulation von ApoJ-mRNA induziert, bestätigt die TLR3-abhängige Regulation des ApoJ-Gens durch Poly(I:C) (M. Schwarz, unveröffentlicht).

Dass neben dem TLR3-spezifischen Agonisten Poly(I:C), der als Analogon zu viraler doppelsträngiger RNA angesehen wird, auch aus Reo- und Rotaviren isolierte doppelsträngige genomische RNA in TLR3-abhängiger Weise eine Aktivierung von Immunzellen induziert, deutet darauf hin, dass TLR3 an der Erkennung viraler Infektionen beteiligt ist (Alexopoulou et al. 2001, Matsumoto et al. 2003). Viren werden jedoch auch über TLR3-unabhängige Mechanismen erkannt. Dies umfassen sowohl die oben erwähnten intrazellulären Helikasen RIG-I und MDA-5 als auch die Toll-like Rezeptoren TLR7/8 und TLR9 (Li et al. 2005, Lund et al. 2004, Diebold et al. 2004, Heil et al. 2004, Tabeta et al. 2004). Alle diese Proteine besitzen die Eigenschaft, durch Nukleinsäuren aktiviert zu werden, wobei einzelsträngige RNA mit GU-reichen Sequenzen als spezifischer Agonist für TLR7 und humanen TLR8 sowie DNA mit unmethylierten CpG-Motiven als TLR9-spezifischer Agonist beschrieben sind (Heil et al. 2004, Diebold et al. 2004, Lund et al. 2004, Hemmi et al. 2000). Zellen scheinen somit in der Lage zu sein, über unterschiedliche Mechanismen sowohl extrazelluläre als auch im Zytoplasma lokalisierte virale Nukleinsäuren zu erkennen. In allen Fällen konvergieren

die anschließenden Signalwege auf Ebene der Aktivierung von NF- κ B und der Initiation des Typ1-Interferonsystems als essentiellen Bestandteil der antiviralen Antwort. Gegenüber der TLR3-vermittelten, MyD88-unabhängigen Induktion der IFN- α/β -Expression erfolgte die TLR7/8- und TLR9-vermittelte Aktivierung des Typ1-Interferonsystems jedoch in MyD88-abhängiger Weise. Hierbei scheint eine direkte Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-7 als Teil eines Proteinkomplexes, bestehend aus MyD88, TRAF6 und IRAK-1, die Expression von IFN- α zu induzieren. Diese MyD88-abhängige Regulation der IFN- α -Expression scheint zudem spezifisch von den Toll-like Rezeptoren TLR7/8 und TLR9 vermittelt zu werden, da eine Aktivierung von TLR2, TLR4 und TLR5 zwar MyD88-abhängige Signalwege initiiert, jedoch nicht die Expression von IFN- α induziert (Kawai et al. 2004, Uematsu et al. 2005, Means et al. 2003). Geht man davon aus, dass eine TLR3-vermittelte Induktion der IFN- α/β -Expression durch extrazelluläres Poly(I:C) zu einer vermehrten Expression von ApoJ beiträgt, wäre es interessant zu überprüfen, ob eine Initiation des Typ1-Interferonsystems durch TLR3-unabhängige Mechanismen ebenfalls die Regulation des ApoJ-Gens beeinflusst. Um eine Beteiligung intrazellulärer doppelsträngiger RNA an der Regulation der ApoJ-Genexpression zu untersuchen, könnte Poly(I:C) mittels Lipofektion in das Zytosol TLR3-negativer Zellen (z.B. 10A-Zellen) eingebracht werden. Ein potentieller Einfluss TLR7/8- bzw. TLR9-aktivierter Signalwege auf die Regulation des ApoJ-Gens könnte mit Hilfe synthetischer CpG-Oligodesoxynukleotide (CpG-ODN) als TLR9-spezifische Agonisten bzw. synthetischer Imidazoquinolin-Verbindungen wie Imiquimod oder Resiquimod (R-848), die als TLR7/8-spezifische Agonisten beschrieben sind, in geeigneten Zellsystemen erfolgen (Hemmi et al. 2002, Jurk et al. 2002). In allen Fällen könnte die ApoJ-Genexpression entsprechender Zellen auf Protein- bzw. mRNA-Ebene mittels Western- bzw. Northern-Blot analysiert werden.

Interessant wäre zu untersuchen, ob eine vermehrte Expression des ApoJ-Gens auch im Rahmen viraler Infektionen erfolgt. Erste Hinweise aus der Literatur könnten auf einen solchen Zusammenhang hindeuten. Wie Morgan und Mitarbeiter zeigen konnten, führt eine Infektion embryonaler Fibroblasten aus dem Huhn mit einem Herpesvirus (Marek's disease virus) neben einer Induktion Interferon-regulierter Gene (IRF-1, MHC Klasse I u.a.) auch zu einer zellulären Akkumulation ApoJ-spezifischer mRNA (Morgan et al. 2001). Die molekularen Mechanismen, die in diesem Fall der Aktivierung der ApoJ-Gentranskription zugrunde liegen, sind jedoch nicht bekannt. Weiterhin ist beschrieben, dass eine Transfektion humaner Endothelzellen (HUVEC) mit HIV-1-basierenden Vektoren sowie eine Transfektion der humanen Tumorzelllinien KoTCC-1 und PC3 mit einem rekombinanten adenoviral-basierenden Vektor (AdCMV-p53) eine vermehrte Expression des ApoJ-Gens induziert (Zhao et al. 2005, Miyake et al. 2005, Yamanaka et al. 2005b). Ob in letztgenanntem Fall die rekombinante Expression von p53 für die ApoJ-Regulation verantwortlich ist, ist allerdings unklar, da Experimente mit entsprechendem Kontrollvektor nicht durchgeführt wurden. Die Beobachtung, dass in Mäusen während einer akuten Infektion mit Influenzaviren eine erhöhte Menge an HDL-assoziiertem ApoJ nachweisbar ist, deutet darauf hin, dass die ApoJ-Genexpression auch *in vivo* im Rahmen viraler Infektionen induziert werden könnte (Van Lenten et al. 2001b).

4.2.2 Potentielle Beteiligung endogener TLR-Agonisten an der Induktion der ApoJ-Genexpression durch nekrotische Zellen

Apoptose wird als physiologische Form des Zelltodes angesehen und spielt unter anderem während der Embryonalentwicklung, der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase sowie der Selektion der T-Zellen im Thymus eine wichtige Rolle. Durch die Induktion apoptotischer Prozesse werden nicht mehr benötigte, gealterte oder potentiell schädliche Zellen zunächst abgetötet und anschließend von professionellen Phagozyten wie Makrophagen oder dendritischen Zellen sowie von umliegenden Gewebezellen durch Phagozytose entsorgt. Eine Aktivierung von Immunzellen findet hierbei nicht statt. Treten Phagozyten mit apoptotischen Zellen in Kontakt, hat dies zur Folge, dass selbst in Anwesenheit pathogenassoziierter Substanzen wie LPS in den Phagozyten die Expression inflammatorischer Zytokine inhibiert und die Expression antiinflammatorischer Zytokine (TGF- β , IL-10) induziert wird. Dass apoptotische Zellen unter physiologischen Bedingungen in der Regel rasch phagozytiert werden und zugleich immunsuppressive Wirkung besitzen, hat zur Folge, dass lokale Entzündungsreaktionen vermieden werden (Voll et al. 1997, Savill et al. 2002, Fadeel 2003, Fadok et al. 1998, Fadok et al. 2000, Cvetanovic und Ucker 2004). Nekrose als pathologische Form des Zelltodes ist hingegen durch den Verlust der Plasmamembranintegrität betroffener Zellen gekennzeichnet und tritt beispielsweise in hypoxischen Geweben oder als Folge mechanischer, chemischer und thermaler Verletzungen sowie bakterieller und viraler Infektionen auf (primäre Nekrose). In Geweben, in denen das lokale Entsorgungssystem für apoptotische Zellen gestört ist oder dessen Kapazität nicht ausreichend ist, um die anfallende Menge an apoptotischen Zellen vollständig zu beseitigen, kann die Apoptose als Folge einer ausbleibenden Phagozytose sterbender Zellen in ein Stadium voranschreiten, welches als sekundäre Nekrose bezeichnet wird. Aufgrund des Verlustes der Plasmamembranintegrität primär und sekundär nekrotischer Zellen kommt es zur Freisetzung verschiedener Zellinhaltsstoffe in den extrazellulären Raum, wo einige dieser intrazellulären Komponenten von Immunzellen und vitalen Nachbarzellen als Alarmsignale (danger signals) interpretiert werden und lokale Entzündungsreaktionen auslösen können.

Bei der Aktivierung von Makrophagen und dendritischen Zellen scheinen in diesem Zusammenhang neben Harnsäure (Shi et al. 2003), dem chromatinbindenden Protein HMGB1 (Scaffidi et al. 2002) und bestimmten Proteasen (Fadok et al. 2001) vor allem Mitglieder der Familie der Hitzeschockproteine eine Rolle zu spielen. Diese werden aus nekrotischen Zellen freigesetzt und sind in der Lage, in Makrophagen und dendritischen Zellen die Expression inflammatorischer Zytokine sowie die Aktivierung und Reifung dendritischer Zellen zu induzieren (Guzhova et al. 1998, Todryk et al. 1999, Kol et al. 1999, Chen et al. 1999, Singh-Jasuja et al. 2000, Asea et al. 2000, Binder et al. 2000a, Basu et al. 2000, Berwin et al. 2001, Kuppner et al. 2001, Somersan et al. 2001, Vabulas et al. 2001, Vabulas et al. 2002a, Vabulas et al. 2002b, Panjwani et al. 2002, Bethke et al. 2002, Flohe et al. 2003, Radsak et al. 2003). Als Zelloberflächenrezeptoren für die Hitzeschockproteine gp96, Hsp70, Hsp90 und Calreticulin ist CD91/LRP (LDL-receptor-related protein), ein Protein der LDL-Rezeptorfamilie, beschrieben (Binder et al. 2000b, Basu et al. 2001, Binder und Srivastava 2004). Freigesetzte Hitzeschockproteine binden auch an Scavenger-

Rezeptoren, wobei LOX-1 als Rezeptor für Hsp70, SRA (scavenger receptor class-A) und SREC-I (scavenger receptor expressed by endothelial cells-I) als Rezeptoren für gp96 und Calreticulin identifiziert wurden (Delneste et al. 2002, Berwin et al. 2003, Berwin et al. 2004). Sowohl CD91/LRP als auch die genannten Scavenger-Rezeptoren fungieren als Endozytoserezeptoren bei der Aufnahme extrazellulärer Hitzeschockproteine. Ob durch die Interaktion dieser Rezeptoren mit Hitzeschockproteinen Signalkaskaden aktiviert werden, welche die zelluläre Genexpression modulieren oder zu einer Aktivierung von Immunzellen führen, ist bislang nicht bekannt.

Als Signalrezeptoren, welche die immunstimulatorische Wirkung extrazellulärer Hitzeschockproteine vermitteln, wurden bisher einzig die beiden Toll-like Rezeptoren TLR2 und TLR4 beschrieben. Diese scheinen die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und damit einhergehend die Expression von Adhäsionsmolekülen, inflammatorischen Zytokinen, kostimulatorischen Molekülen und somit die Aktivierung dendritischer Zellen und Makrophagen in Gegenwart extrazellulärer Hitzeschockproteine (Hsp70, Hsp60, gp96) zu vermitteln (Kol et al. 2000, Ohashi et al. 2000, Vabulas et al. 2001, Vabulas et al. 2002a, Vabulas et al. 2002b, Vabulas et al. 2002c, Asea et al. 2002, Beg 2002, Kakimura et al. 2002, Dybdahl et al. 2002). Da Hitzeschockproteine die Eigenschaft besitzen, bakterielles Lipopolysaccharid hochaffin zu binden, wird gegenwärtig jedoch diskutiert, ob eine Kontamination mit LPS für die TLR4-aktivierende Wirkung einzelner Hitzeschockproteinpräparationen verantwortlich sein könnte (Bausinger et al. 2002, Wallin et al. 2002, Reed et al. 2003, Gao und Tsan 2003a, Gao und Tsan 2003b, Tsan und Gao 2004). TLR2 und TLR4 sind zudem als Signalrezeptoren beschrieben, welche die inflammatorische Wirkung von extrazellulärem HMGB1 (high mobility group box 1 protein) vermitteln (Park et al. 2004). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation mit nekrotischen Zellen zu einer Aktivierung von TLR2, insbesondere des heterodimeren TLR2/TLR6-Rezeptorkomplexes, führt sowie in TLR2-abhängiger Weise die Genexpression in Makrophagen und Fibroblasten moduliert (Li et al. 2001). Die TLR2-aktivierenden Komponenten nekrotischer Zellen wurden in dieser Studie jedoch nicht identifiziert. Weiterhin wird vermutet, dass aus nekrotischen Zellen freigesetzte RNA in TLR3-abhängiger Weise die IFN- α -Expression in dendritischen Zellen und die Expression von IFN- β , IP-10 (CXCL10), RANTES (CCL5) und IL-6 in humanen Fibroblasten induziert (Kariko et al. 2004a, Brentano et al. 2005). In beiden Fällen könnten die in zellulären Ribonukleinsäuren vorhandenen doppelsträngigen Sekundärstrukturen eine Aktivierung dieses Rezeptors vermitteln. Auch aus nekrotischen Zellen freigesetzte einzelsträngige RNA könnte als endogener TLR-Agonist fungieren und in TLR7/8-vermittelter Weise zu einer vermehrten Expression von IFN- α und inflammatorischen Zytokinen beitragen (Heil et al. 2004, Diebold et al. 2004). In diesem Zusammenhang wäre es denkbar, dass sich die beschriebene immunstimulatorische Wirkung nekrotischer Zellen zumindest teilweise auf die Exposition bzw. Freisetzung intrazellulärer Komponenten wie HMGB1, verschiedenen Hitzeschockproteinen sowie RNA und DNA zurückführen lässt. Diese Faktoren könnten schließlich durch Aktivierung entsprechender Toll-like Rezeptoren (TLR2, 3, 4, 7/8, 9) die lokale Expression von Zytokinen und Chemokinen durch Immunzellen und vitale Gewebezellen

induzieren, was schließlich zur Entstehung lokaler Entzündungsherde in den betroffenen Geweben beitragen würde.

Wie in vorliegender Arbeit gezeigt werden konnte, führt eine Inkubation von Rat1-Fibroblasten mit nekrotischen Zellen zu einer vermehrten Expression von ApoJ und MMP-3 sowie zu einer Repression der CTGF-Expression. Dass die Regulation dieser Gene in ähnlicher Weise durch das inflammatorische Zytokin TNF- α moduliert wird, könnte darauf hindeuten, dass die inflammatorische Wirkung nekrotischer Zellen die Expression von ApoJ, MMP-3 und CTGF in Rat1-Zellen beeinflusst, wobei Toll-like Rezeptoren als potentielle Signalrezeptoren involviert sein könnten (Li et al. 2002, Li et al. 2001, Sciavolino et al. 1994, Lin et al. 1998, Abraham et al. 2000, Villacorta et al. 2003). Da TLR2 bislang als einziger Vertreter der Toll-like-Rezeptorfamilie identifiziert werden konnte, der durch nekrotische Zellen aktiviert wird (Li et al. 2001), Rat1-Fibroblasten diesen Rezeptor jedoch nicht exprimieren, zeigt deutlich, dass nekrotische Zellen auch in TLR2-unabhängiger Weise die Genexpression in vitalen Zellen beeinflussen können. Dies zeigt zudem, dass die in embryonalen Mausfibroblasten beschriebene NF- κ B-abhängige Induktion der MMP-3-Expression in Gegenwart nekrotischer Zellen durch weitere Rezeptoren vermittelt werden kann. Hierbei könnten die in Rat1-Fibroblasten exprimierten Toll-like Rezeptoren TLR3 und TLR4 als weitere Vertreter dieser Rezeptorfamilie eine Rolle als Signalrezeptoren spielen. Wie in vorliegender Arbeit gezeigt werden konnte, führt die Inkubation dieser Zellen mit entsprechenden rezeptorspezifischen Agonisten (Poly(I:C), LPS) zu einer vermehrten Expression von MMP-3-mRNA. Es besteht folglich die Möglichkeit, dass die MMP-3-induzierende Wirkung nekrotischer Zellen zum Teil auf die Freisetzung endogener TLR-Agonisten wie beispielsweise RNA, Hitzeschockproteine oder HMGB-1 zurückzuführen ist, welche über eine Aktivierung TLR3- bzw. TLR4-vermittelter Signalwege die Expression dieser Protease in vitalen Rat1-Fibroblasten induzieren. Ähnliche Mechanismen könnten auch an der durch nekrotische Zellen induzierten ApoJ-Genexpression beteiligt sein. Hierfür spricht, dass auch ApoJ in TLR-abhängiger Weise reguliert wird und zudem ausschließlich die beiden TLR-exprimierenden Zelllinien CRL2018-Zellen (TLR2, TLR3, TLR4) und Rat1 (TLR3, TLR4), nicht jedoch 10A-Zellen, welche weder TLR2 noch TLR3 und scheinbar nur geringe Mengen an TLR4 exprimieren, nach Inkubation mit nekrotischen Zellen einen erhöhten Gehalt an ApoJ-mRNA aufweisen. Dass im Gegensatz zu glatten Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018 neben nekrotischen Zellen ausschließlich die synthetische doppelsträngige RNA Poly(I:C), nicht jedoch LPS, eine deutliche Akkumulation von ApoJ-mRNA in Rat1-Zellen induziert, könnte zudem darauf hindeuten, dass in Gegenwart nekrotischer Zellen eine Aktivierung TLR3-vermittelter Signalwege eine zentrale Rolle in der Regulation der ApoJ-Genexpression spielt. Hierbei könnte aus nekrotischen Zellen freigesetzte bzw. mit nekrotischen Zellen assoziierte RNA als endogener TLR3-Agonist fungieren (Kariko et al. 2004a, Hoffman et al. 2004, Brentano et al. 2005). Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass neben Poly(I:C) auch eine Inkubation mit nicht-synthetischer eukaryotischer Gesamt-RNA und t-RNA zu einer Akkumulation ApoJ-spezifischer mRNA in TLR3-exprimierenden CRL2018-Zellen führt. Dass unter den verwendeten RNA-Spezies t-RNA die deutlichste Induktion der ApoJ-Genaktivität induziert, könnte auf den hohen Anteil doppelsträngiger

Sekundärstrukturen zurückzuführen sein. Im Gegensatz zu Poly(I:C) besitzen diese natürlichen RNAs allerdings eine deutlich geringere ApoJ-induzierende Wirkung (Faktor 1,5-2,0), die jedoch mit der von $0,5-1 \times 10^7$ nekrotischen Zellen vergleichbar ist. Die im Vergleich zu Poly(I:C) geringere ApoJ-induzierende Wirkung der verwendeten nicht-synthetischen RNAs ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Poly(I:C) gegenüber anderen RNAs wie synthetischem Poly(A:U), viraler doppelsträngiger RNA und *in vitro* transkribierter mRNA deutlich stärkere TLR3-aktivierende Eigenschaften besitzt (Alexopoulou et al. 2001, Matsumoto et al. 2003, Kariko et al. 2004a). Neben der ApoJ-induzierenden Wirkung besitzen Poly(I:C) und nekrotische Zellen weiterhin die gemeinsame Eigenschaft, die zelluläre Expression der Typ1-Interferone IFN- α 1 und IFN- β zu induzieren. Dies bestätigt den bereits beschriebenen Einfluss nekrotischer Zellen auf die Regulation der IFN- α - und IFN- β -Genexpression in vitalen Zellen und könnte zugleich als weiterer Hinweis auf eine Aktivierung TLR3-vermittelter Signalwege in Gegenwart nekrotischer Zellen gedeutet werden (Kariko et al. 2004a, Brentano et al. 2005). Eine Analyse der iNOS- und TLR3-Expression in CRL2018-Zellen und Rat1-Fibroblasten zeigte allerdings, dass im Gegensatz zu Poly(I:C) eine Inkubation mit nekrotischen Zellen in keiner der beiden Zelllinien die Expression dieser beiden sekundär durch Interferon regulierten Gene induziert (Abb. 3.4.7, ohne Abb.). Dies könnte möglicherweise darin begründet sein, dass die durch nekrotische Zellen induzierte Menge an neusynthetisierten Typ1-Interferonen nicht ausreichend ist, um in autokriner/parakriner Weise die Expression von iNOS und TLR3 zu erhöhen.

Dass eine Präinkubation mit verschiedenen Nukleasen (RNAse A, Benzonase, DNase I) die ApoJ-induzierende Wirkung nekrotischer Zellen und dem daraus präparierten Überstand (14.000 \times g) nicht vermindert, spricht zunächst gegen eine Beteiligung von Nukleinsäuren an der ApoJ-Regulation (Abb. 3.4.6). Das Enzym Benzonase ist als Endonuklease beschrieben, welche in unspezifischer Weise einzel- und doppelsträngige DNA, einzelsträngige RNA sowie zu einem gewissen Anteil auch doppelsträngige RNA hydrolysiert (Moreno et al. 1991, Meiss et al. 1999). Inwiefern die Inkubation nekrotischer Zellen bzw. der daraus präparierten löslichen Faktoren mit diesem Enzym zu einer vollständigen Hydrolyse der enthaltenen doppelsträngigen RNA führt, ist allerdings unklar. Eine Analyse nekrotischer Zellen sowie daraus präparierter löslicher Faktoren mittels nicht-denaturierender Agarosegelelektrophorese zeigte, dass nach Inkubation mit Benzonase keine durch Ethidiumbromidfärbung detektierbaren Nukleinsäuren mehr in den Proben vorhanden waren (ohne Abb.). Ob hierbei jedoch eine vollständige Hydrolyse niedermolekularer doppelsträngiger RNA-Moleküle stattfand, ist unklar, da die verwendeten Agarosegele (2% Agarose) für eine Analyse niedermolekularer Nukleinsäuren nicht geeignet waren. Da auch doppelsträngige RNA-Moleküle mit einer Länge von 21 Basenpaaren TLR3-aktivierende Eigenschaften besitzen (Kariko et al. 2004b, Kariko et al. 2004c), lässt sich somit eine Beteiligung doppelsträngiger RNA an der durch nekrotische Zellen induzierten ApoJ-Genexpression in vitalen CRL2018-Zellen und Rat1-Fibroblasten auf Ebene der bislang durchgeführten Experimente nicht vollständig ausschließen. Dies könnte jedoch, wie unter 3.4.9 beschrieben, in weiterführenden Untersuchungen (salzfreie Reaktionsbedingungen, längere Inkubationszeiten, Verwendung des Enzyms RNAse III) erfolgen.

Diskussion

Hierbei würde ein paralleler Verdau von Poly(I:C) eine geeignete Kontrolle darstellen, um unter den gewählten Reaktionsbedingungen die vollständige Inaktivierung der TLR3-aktivierenden Eigenschaften doppelsträngiger RNA zu überprüfen.

Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, korreliert die durch nekrotische Zellen induzierte ApoJ-mRNA-Expression in CRL2018-, Rat1- und 10A-Zellen mit der zelllinienspezifischen Expression von Toll-like Rezeptoren. Dass zugleich auch die ApoJ-induzierenden Eigenschaften entsprechender TLR-spezifischer Agonisten gezeigt werden konnten, könnte darauf hindeuten, dass in Gegenwart nekrotischer Zellen Toll-like Rezeptoren die Induktion der ApoJ-Genexpression in vitalen Zellen vermitteln. Um unter diesen Bedingungen eine Beteiligung einzelner Mitglieder der Toll-like Rezeptorfamilie, insbesondere TLR3 und TLR4, an der Induktion der ApoJ-Genexpression zu überprüfen, sind jedoch weiterführende Arbeiten notwendig. Ein experimenteller Ansatz könnte darin bestehen, die Funktion einzelner Toll-like Rezeptoren in den beschriebenen Zellsystemen (CRL2018, Rat1) spezifisch zu inhibieren. Eine Inhibierung der Rezeptorfunktion durch spezifische blockierende Antikörper ist in diesem Fall jedoch nicht möglich, da geeignete Antikörper mit entsprechenden funktionellen Eigenschaften und Spezifität nicht verfügbar sind. Durch Inhibierung der Rezeptorexpression mittels RNAi (RNA interference) unter Verwendung sequenzspezifischer siRNAs (small interference RNA) wäre jedoch eine funktionelle Analyse von TLR2, TLR3 und TLR4 in glatten Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018 und in Rat1-Fibroblasten möglich (Li et al. 2005). Weiterhin könnte eine funktionelle Inhibierung endogen exprimierter TLRs in CRL2018-Zellen und Rat1-Fibroblasten mittels Expression entsprechender spezifischer TLR-Mutanten mit deletierter TIR-Domäne und dominant-negativer Wirkungsweise erfolgen (Alexopoulou et al. 2001, Li et al. 2001). Ein anderer experimenteller Ansatz könnte darin bestehen, murinen TLR2, TLR3 bzw. TLR4 in 10A-Zellen stabil zu exprimieren. Durch Analyse der ApoJ-Genexpression einzelner Zellklone nach Inkubation mit nekrotischen Zellen könnte anschließend eine funktionelle Beteiligung entsprechender Toll-like Rezeptoren an der Induktion der ApoJ-Genexpression überprüft werden. Die für diese Experimente notwendigen rekombinanten Expressionsplasmide für murinen TLR2, TLR3, TLR4 sowie dem Protein MD-2 als essentiellen Bestandteil des TLR4-Rezeptorkomplexes wurden uns im Rahmen einer Kooperation von der Arbeitsgruppe Stefan Bauer (Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, TU München) zur Verfügung gestellt. Aufgrund der bereits beschriebenen endogenen Agonisten könnte der Nachweis einer Beteiligung einzelner Toll-like Rezeptoren an der Induktion der ApoJ-Genexpression in Gegenwart nekrotischer Zellen zugleich nähere Hinweise auf die Identität der ApoJ-induzierenden Faktoren nekrotischer Zellen liefern.

4.3 Induktion der ApoJ-Genexpression in geschädigten Geweben

In vivo ist eine Induktion der ApoJ-Genexpression häufig mit degenerativen und inflammatorischen Prozessen assoziiert. Im Pankreas der Ratte wurde eine vermehrte Expression dieses Proteins im Rahmen einer durch Streptozotocin induzierten Degeneration insulinproduzierender β -Zellen sowie in verschiedenen Modellen akuter und chronischer Pankreatitis beschrieben, wobei glucagonproduzierende α -Zellen und Azinuszellen verstärkt ApoJ synthetisieren (Park et al. 1999, Calvo et al. 1998, Xie et al. 2001). Weiterhin führt eine Induktion nekrotischer Gewebeschäden durch Tetrachlorkohlenstoff zu einer lokalen Expression ApoJ-spezifischer mRNA in der Leber (Bursch et al. 1995). Auch eine Schädigung des Nierengewebes durch Cisplatin, als Folge einer induzierten Entzündungsreaktion (Nephritis) und als Folge einer transienten Ischämie führt zu einer vermehrten Expression dieses Proteins (Silkensen et al. 1997, Yamada et al. 2001, Rosenberg und Paller 1991, Witzgall et al. 1994, Yoshida et al. 2002). Auch nach mechanischer Verletzung von neuronalem Gewebe wie Rückenmark, optischem Nerv und Gehirn sowie einer durch Hypoxie induzierten Schädigung des Gehirns in unterschiedlichsten Modellen zerebraler Ischämie lässt sich eine gesteigerte Menge an ApoJ in den verletzten Geweben nachweisen. Dieses Protein ist hierbei oft mit abgestorbenen bzw. sterbenden Neuronen assoziiert; die lokale ApoJ-Synthese beschränkt sich hingegen in erster Linie auf reaktive Astrozyten (Bonnard et al. 1997, Klimaschewski et al. 2001, Ohlsson et al. 2003, Bellander et al. 2001, Gwon et al. 2004, May et al. 1992, Wiessner et al. 1993, Kida et al. 1995, Walton et al. 1996, Yamashita et al. 1996, Van Beek et al. 2000, Wehrli et al. 2001, Wiggins et al. 2003). Wie in verschiedenen Tiermodellen gezeigt werden konnte, wird die ApoJ-Genexpression auch nach Schädigung des Herzmuskels im Rahmen einer autoimmunen und viralen Myokarditis sowie einer lokalen Ischämie in ventrikulären Myozyten induziert. Infiltrierende Immunzellen synthetisieren dieses Protein hingegen nicht (Swertfeger et al. 1996, Silkensen et al. 1998, McLaughlin et al. 2000). Zudem ist ein erhöhter Gehalt an ApoJ auch in myokardialen Läsionen von Patienten zu finden, die einen Herzinfarkt erlitten hatten (Vakeva et al. 1993). ApoJ wird auch vermehrt in atherosklerotischen Läsionen gefunden, wobei scheinbar eine lokale Synthese durch glatte Gefäßmuskelzellen der Intima und Media zusätzlich zu dem aus dem Serum stammenden ApoJ die Konzentration dieses Proteins in den Läsionen erhöht (Jordan-Starck et al. 1994, Ishikawa et al. 1998). Darüber hinaus hat auch eine mittels Ballondilatation induzierte mechanische Verletzung der Aorta innerhalb von 6h eine vermehrte Expression von ApoJ in glatten Gefäßmuskelzellen zur Folge (Miyata et al. 2001).

Zusammenfassend zeigt sich, dass eine lokale Induktion der ApoJ-Genexpression in vielen unterschiedlichen Geweben mit mechanischen, chemischen oder hypoxischen Schädigungen sowie inflammatorischen Prozessen assoziiert ist. Die molekularen Mechanismen, die zu einer vermehrten Expression von ApoJ im Rahmen degenerativer Gewebeprozesse führen, sind bislang jedoch unbekannt. Eine vermehrte Synthese dieses Proteins als Folge einer Schädigung ist auf intakte Gewebebereiche beschränkt und erfolgt in unterschiedlichsten Zelltypen wie z.B. Astrozyten, glatten Gefäßmuskelzellen, Myozyten, Azinuszellen, Epithelzellen der Nierentubuli oder Endothelzellen. Lokale bzw. infiltrierende Immunzellen weisen hingegen keine ApoJ-Expression auf (Swertfeger et

al. 1996, Silkensen et al. 1998). Die Beobachtung, dass sich in vielen Fällen die ApoJ-exprimierenden Zellen in unmittelbarer Nähe der entsprechenden Läsionen befinden und sich die Intensität der ApoJ-Genexpression mit zunehmender Distanz zu diesen Läsionen verringert, lässt vermuten, dass diffundierbare Faktoren in den geschädigten Bereichen die Aktivierung der ApoJ-Genaktivität in umliegenden Zellen vermitteln (Swertfeger et al. 1996). Hierbei könnten auch in den Läsionen vorhandene geschädigte Zellen durch Freisetzung löslicher Faktoren zur Induktion der ApoJ-Genexpression beitragen. Wie bereits in einer Veröffentlichung unserer Arbeitsgruppe beschrieben wurde und auch in vorliegender Arbeit gezeigt werden konnte, sind neben löslichen Faktoren auch sedimentierbare Komponenten nekrotischer Zellen in der Lage, eine Aktivierung der ApoJ-Genaktivität in vitalen Rat1-Fibroblasten zu induzieren (Bach et al. 2001, Ab. 3.4.2). Dieser sedimentierbare Anteil nekrotischer Zellen, der vermutlich Fragmente zellulärer Membranen und Organellen enthält, könnte somit zu einer gesteigerten ApoJ-Genexpression in den Zellen beitragen, die in unmittelbarer Nähe der Gewebeläsionen lokalisiert sind und in direktem Kontakt mit nekrotischem Zellmaterial stehen. Diese Hypothese unterstützend konnte im Rahmen einer durch Ischämie induzierten zerebralen und myokardialen Verletzung die stärkste ApoJ-Expression in den Zellen nachgewiesen werden, die sich an der Grenze zwischen nekrotischem und intaktem Gewebe befinden (Swertfeger et al. 1996, Wehrli et al. 2001).

Interessant ist, dass viele der Zelltypen, die unter pathophysiologischen Bedingungen eine vermehrte ApoJ-Genexpression aufweisen, als TLR-exprimierende Zelltypen beschrieben sind. Die untersuchten Zelltypen umfassen hierbei *in vitro* kultivierte primäre Hepatozyten (TLR2, TLR4), primäre Tubulusepithelzellen der Niere (TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6), primäre Astrozyten (TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR9), primäre ventrikuläre Kardiomyozyten (TLR2, TLR3, TLR4, TLR6), primäre Endothelzellen (TLR4) und primäre glatte Gefäßmuskelzellen (TLR2, TLR4) (Matsumura et al. 2000, Frantz et al. 2001, Tsuboi et al. 2002, Bsibsi et al. 2002, Bowman et al. 2003, Carpentier et al. 2005, Farina et al. 2005, Jimenez et al. 2005, Yang et al. 2005, Faure et al. 2000). Die Expression von TLR3 in primären glatten Gefäßmuskelzellen wurde bislang noch nicht analysiert. Dass die Inkubation mit Poly(I:C) die Genexpression dieser Zellen moduliert und darüber hinaus in humanen Arterien TLR3-mRNA nachgewiesen wurde, ist jedoch ein Hinweis darauf, dass neben der stabilen Zelllinie CRL2018 auch primäre glatte Gefäßmuskelzellen TLR3 exprimieren (Yang et al. 2005, Edfeldt et al. 2002). Zudem wurde eine erhöhte Expression von TLR2 und TLR4 in Endothelzellen im Bereich atherosklerotischer Läsionen und eine erhöhte Expression von TLR4 in Myozyten und Endothelzellen des Herzmuskels von Patienten mit Kardiomyopathien beschrieben (Edfeldt et al. 2002, Frantz et al. 1999). Zudem konnte am Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) gezeigt werden, dass es im Rahmen steriler inflammatorischer Prozesse zu einer Induktion der TLR-Expression (TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9) im Gehirn betroffener Mäuse kommt (Prinz et al. 2006). Dies zeigt, dass im Rahmen degenerativer Prozesse eine lokale Induktion der TLR-Expression in den betroffenen Geweben stattfinden kann. Dass *in vivo* auch in Abwesenheit bakterieller Infektionen eine Aktivierung des Toll-like Rezeptors 4 als Folge einer transienten Ischämie in Leber und Herzmuskel

erfolgt, konnte an zwei unterschiedlichen Stämmen TLR4-defizienter Mäuse (C57/BL10 ScCr und C3H/HeJ) gezeigt werden (Oyama et al. 2004, Zhai et al. 2004). Eine Aktivierung TLR4-vermittelter Signalwege, insbesondere MyD88-unabhängiger/TRIF-IRF-3-abhängiger Signalwege, durch endogene Agonisten scheint hierbei eine wichtige Rolle in der Initiation lokaler Entzündungsreaktionen und damit einhergehend in der Entstehung und Extension von Gewebeläsionen zu spielen. Inwiefern eine Aktivierung TLR4-exprimierender Gewebezellen (Hepatozyten, Myozyten, Endothelzellen) durch nekrotisches Zellmaterial zu diesen Prozessen beiträgt, ist allerdings nicht bekannt. Aktuelle Studien an knochenmark-chimären Mäusen zeigen, dass die Aktivierung von TLR9 in nicht-hämatopoetischen zerebralen Zellen im Rahmen einer experimentellen allergischen Enzephalomyelitis (EAE) zu einer beschleunigten Pathogenese führt und die Aktivierung von TLR2 in Tubulusepithelzellen im Rahmen einer durch Ischämie induzierten Verletzung der Niere eine Initiation inflammatorischer Prozesse vermittelt, welche letztlich zu einem akuten Nierenversagen führen (Prinz et al. 2006, Leemans et al. 2005). In beiden Fällen wird eine Beteiligung von Pathogenen an der Aktivierung von TLR9 und TLR2 ausgeschlossen und vermutet, dass von verletzten Zellen freigesetzte endogene Agonisten in den betroffenen Geweben zur lokalen Aktivierung dieser Rezeptoren beitragen.

Zusammenfassend wäre somit eine Beteiligung verschiedener Toll-like Rezeptoren an der ApoJ-Regulation in verletzten Geweben denkbar, wobei lösliche und membranassoziierte Komponenten geschädigter Zellen als endogene TLR-Agonisten fungieren und in TLR-abhängiger Weise zu einer Induktion der ApoJ-Genexpression im umliegenden Gewebe beitragen könnten. Weiterhin könnten in Membranfragmenten nekrotischer Zelltrümmer enthaltene Phospholipide wie Phosphatidylserin oder Phosphatidsäure über bislang unbekannte Mechanismen ebenfalls zu einer vermehrten Expression dieses Proteins in degenerierten Geweben führen (Bach et al. 2001, M. Baiersdörfer unveröffentlicht). Dass in vorliegender Arbeit gezeigt werden konnte, dass die ApoJ-Genexpression durch bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), durch ein synthetisch hergestelltes bakterielles Lipopeptid (Pam₃Cys-Ser-Lys₄) und durch doppelsträngige RNA induziert werden kann, lässt vermuten, dass eine vermehrte Expression dieses Proteins auch im Rahmen bakterieller und viraler Infektionen erfolgen könnte. Hierbei könnten pathogenassoziierte Strukturen (PAMPs) in TLR-abhängiger Weise zu einer direkten Induktion der ApoJ-Genexpression führen. Zudem könnte im Rahmen einer Infektion eine durch Bakterien oder Viren induzierte Schädigung des Gewebes zur Freisetzung ApoJ-induzierender Faktoren aus verletzten Zellen führen und somit in indirekter Weise die Expression dieses Proteins beeinflussen. Eine TLR-vermittelte Aktivierung von Gewebezellen und insbesondere lokaler Immunzellen (Makrophagen, dendritische Zellen) durch pathogenassoziierte Strukturen und aus nekrotischen Zellen freigesetzte endogene Agonisten hätte zudem eine Aktivierung des Immunsystems und damit eine Entzündungsreaktion zur Folge. Es ist anzunehmen, dass auch von Gewebezellen exprimierte Zytokine und Chemokine, welche in TLR-abhängiger Weise durch nekrotische Zellen oder Pathogene induziert werden, zur Initiation lokaler Entzündungsreaktionen beitragen. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass eine Inkubation mit nekrotischen Zellen zu einer Induktion der Chemokinexpression (KC/GRO α , MIP-

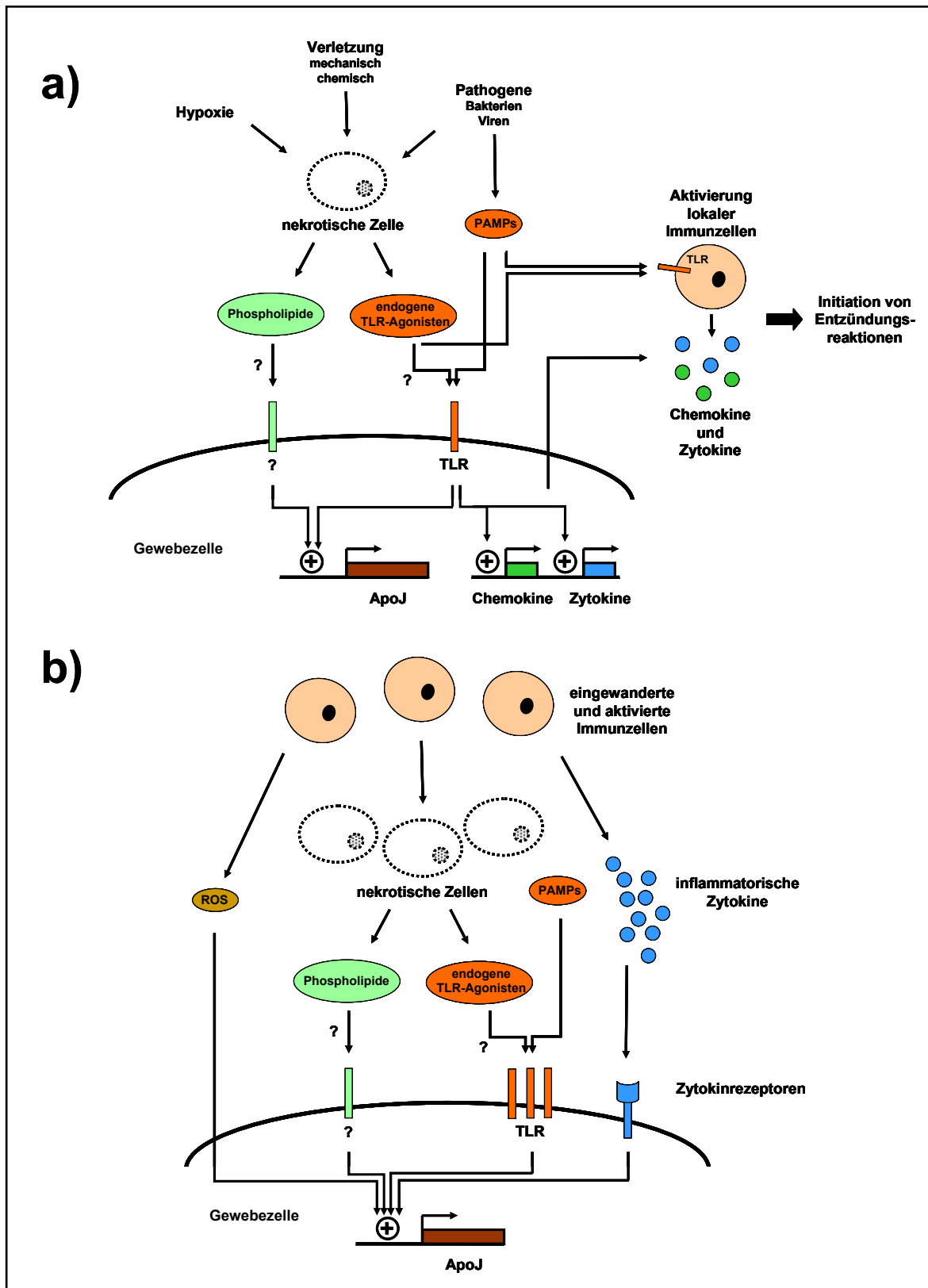


Abbildung 4.3: Modell zur Regulation der ApoJ-Genexpression in verletzten Geweben: a) Frühe Phase: Nekrotische Zellen, die als Folge mechanischer/chemischer Verletzungen, Hypoxie oder Infektionen entstehen, könnten durch Freisetzung endogener TLR-Agonisten bzw. durch Exposition bestimmter Phospholipide in Membranfragmenten die ApoJ-Genexpression in umliegenden Gewebezellen induzieren. Im Falle einer Infektion können auch pathogenassoziierte Strukturen (PAMPs) an der Regulation der ApoJ-Genexpression beteiligt sein. Eine Aktivierung von TLRs durch endogene Agonisten oder PAMPs führt zudem zu einer Aktivierung lokaler Immunzellen und induziert in Gewebe- und Immunzellen die Expression und Sekretion von Zytokinen und Chemokinen. In ihrer Gesamtheit initiieren diese Prozesse schließlich lokale Entzündungsreaktionen.

Abbildung 4.3 (vorausgehende Seite): b) Inflammatorische Phase: Eingewanderte und aktivierte Immunzellen verursachen im Rahmen inflammatorischer Vorgänge zusätzliche Gewebeschäden und somit eine Akkumulation nekrotischer Zellen. Diese tragen zusammen mit PAMPs sowie reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS, reactive oxygen species) und inflammatorischen Zytokinen, welche von aktivierten Immunzellen in großen Mengen freigesetzt werden und an der Extension der Gewebeschäden beteiligt sind, zu einer gesteigerten ApoJ-Expression im umliegenden vitalen Gewebe bei. Eine lokale Induktion der TLR-Expression in den betroffenen Geweben verstärkt hierbei die durch endogene Agonisten und PAMPs induzierte Expression von ApoJ.

2/GROß) in murinen Fibroblasten sowie in TLR2-abhängiger Weise zu einer Induktion der IL-8-Expression in humanen HEK293-Zellen führt (Li et al. 2001). Wie zudem in einer kürzlich veröffentlichten Studie gezeigt werden konnte, führt die Inkubation humaner Fibroblasten mit nekrotischen Zellen *in vitro*, ähnlich wie die Inkubation mit dem TLR3-spezifischen Agonisten Poly(I:C), zu einer vermehrten Expression von IFN- β , der beiden Chemokine IP-10 (CXCL10) und RANTES (CCL5) sowie des inflammatorischen Zytokins IL-6 (Brentano et al. 2005). Eine anschließende Infiltration und Akkumulation aktivierter Immunzellen (neutrophile Granulozyten, Makrophagen, natürliche Killerzellen, T-Zellen) würde beispielsweise durch Freisetzung inflammatorischer Zytokine, reaktiver Sauerstoffverbindungen oder Proteasen zu einer Verstärkung der Gewebeschäden führen. Eine Akkumulation nekrotischer Zellen sowie eine verstärkte lokale Expression von Toll-like Rezeptoren könnten schließlich eine weitere Erhöhung der ApoJ-Genexpression in vitalen Gewebezellen zur Folge haben. Zudem ist es wahrscheinlich, dass im Rahmen inflammatorischer Prozesse von Immunzellen freigesetzte reaktive Sauerstoffverbindungen und Zytokine wie TNF- α , IL-1 β oder IL-6 durch eine direkte Induktion der ApoJ-Genexpression an der Regulation dieses Proteins in den betroffenen Geweben beteiligt sind. Die ApoJ-induzierenden Eigenschaften erwähnter Zytokine sowie eine vermehrte Expression von ApoJ als Folge von oxidativem Stress konnten bereits mehrfach nachgewiesen werden (Kyprianou et al. 1991, Hardardottir et al. 1994, Hardardottir et al. 1997, Zwain et al. 1994, Berge et al. 1997, Van Lenten et al. 2001a, Li et al. 2002, Patel et al. 2004, Calvo et al. 1998, Viard et al. 1999, Dumont et al. 2000, Fripiat et al. 2001). Eine durch TNF- α induzierte Akkumulation von ApoJ-mRNA in Rat1-Fibroblasten konnte zudem im Rahmen vorliegender Arbeit gezeigt werden (ohne Abb.). Eine Induktion der ApoJ-Genexpression in degenerierenden Geweben könnte somit in komplexer Weise erfolgen, wobei nekrotische Zellen sowohl in einer durch Verletzung, durch Hypoxie oder durch Pathogene induzierten frühen Phase der Gewebeschädigung (Abb. 4.3 a) als auch im Rahmen nachfolgender inflammatorischer Prozesse an der Regulation dieses Proteins in vitalen Gewebezellen beteiligt sein könnten (Abb. 4.3 b). Zudem könnte neben Zytokinen und oxidativem Stress eine Akkumulation von nekrotischem Zellmaterial als Folge einer Entzündungsreaktion eine Erklärung dafür sein, dass eine vermehrte Expression von ApoJ häufig mit inflammatorischen Prozessen assoziiert ist und im Bereich entzündlicher Läsionen lokalisierte Zellen die stärkste ApoJ-Genexpression aufweisen.

4.4 Mögliche Funktionen von ApoJ in geschädigten Geweben

Eine spezifische Funktion von ApoJ in verletzten und degenerierenden Geweben konnte bislang noch nicht identifiziert werden. Untersuchungen ApoJ-defizienter Mäuse zeigen jedoch, dass dieses Protein im Rahmen einer autoimmunen Myokarditis gewebesetzende Eigenschaften besitzt, indem es die Extension akuter entzündlicher Läsionen limitiert. Nach Abklingen der akuten Entzündungsreaktion scheint ApoJ zudem an der Regeneration des geschädigten Herzmuskels beteiligt zu sein (McLaughlin et al. 2000). Weiterhin konnte am Modell einer permanenten fokalen zerebralen Ischämie gezeigt werden, dass verglichen mit Wildtyp- und ApoJ-defizienten Mäusen die Anzahl sterbender Zellen im geschädigten Gehirnbereich transgener Mäuse reduziert ist, welche humanes ApoJ konstitutiv exprimieren. Dies zeigt deutlich die neuroprotektiven Eigenschaften dieses Proteins im Rahmen einer durch Hypoxie induzierten zerebralen Entzündungsreaktion *in vivo* (Wehrli et al. 2001). Untersuchungen an isolierten Lungen von Kaninchen zeigen zudem, dass eine vorausgehende Perfusion mit ApoJ einer durch das Peptid N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) induzierten und durch Leukozyten vermittelten Schädigung des Lungengewebes entgegenwirken kann (Heller et al. 2003). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die zytoprotektive Wirkung von ApoJ zumindest teilweise auf dessen antiinflammatorische Eigenschaften zurückzuführen ist. In verletzten Geweben könnte die lokale Expression dieses Proteins das Ausmaß nachfolgender Entzündungsreaktionen limitieren und somit einer im Rahmen inflammatorischer Prozesse auftretenden sekundären Schädigung des Gewebes entgegenwirken.

In funktioneller Hinsicht könnte hierbei die Inhibierung des Komplementsystems eine Rolle spielen. ApoJ ist in der Lage, einer komplementvermittelten Hämolyse entgegenzuwirken, indem es die Ausbildung des membranangreifenden Komplexes (MAC) auf Zelloberflächen verhindert. Diese Inhibierung erfolgt auf Ebene der terminalen Komplementkomponenten, wobei zum einen die Bindung von ApoJ an die Proteinkomplexe C5b-8 und C5b-9 eine Anlagerung und Polymerisierung weiterer C9-Moleküle und somit die Entstehung des porenbildenden Komplexes verhindert. Zum anderen inhibiert die Bindung von ApoJ an den Proteinkomplex C5b-7 dessen Anlagerung an zelluläre Plasmamembranen, was dazu führt, dass der entstehende Proteinkomplex (sC5b-9) in Lösung verbleibt (Murphy et al. 1989b, Jenne und Tschopp 1989, Tschopp et al. 1993, McDonald und Nelsestuen 1997). Aufgrund dieser Eigenschaften könnte ApoJ in verletzten Geweben eine komplementvermittelte Lyse vitaler Zellen im Bereich entzündlicher Läsionen verhindern. Dass ApoJ im Rahmen einer Glomerulonephritis sowie eines myokardialen Infarkts mit Immunkomplexen assoziiert ist, Bestandteil des löslichen membranangreifenden Komplementkomplexes ist sowie mit terminalen Komplementkomponenten auf der Plasmamembran beschädigter Zellen kolokalisiert, unterstützt diese Hypothese (Murphy et al. 1988, Murphy et al. 1989a, Väkevä et al. 1993).

Zudem könnte die Eigenschaft von ApoJ, einem durch oxidativen Stress und TNF- α induzierten Zelltod entgegenzuwirken, an dessen zytoprotektiver Wirkung in degenerativen Geweben beteiligt sein. Wie gezeigt werden konnte, ist dieses Protein in der Lage, in einer Reihe verschiedener Zelltypen die Induktion apoptotischer Prozesse in Gegenwart oxidativer Substanzen wie H₂O₂ zu inhibieren (Schwochau et al. 1998, Viard et al. 1999, Dumont et al. 2002, Trougakos et al. 2004).

Weiter wurde beschrieben, dass extrazelluläres ApoJ in dosisabhängiger Weise einen durch TNF- α induzierten Zelltod humaner Prostatakarzinomazelllinien (PC3, LNCaP) und muriner Fibroblasten (L929) inhibiert (Sensibar et al. 1995, Sintich et al. 1999, Humphreys et al. 1997). Somit wäre denkbar, dass ApoJ auch in verletzten Geweben im Bereich entzündlicher Läsionen umliegende vitale Zellen vor der toxischen Wirkung von TNF- α und reaktiven Sauerstoffverbindungen schützt, welche im Verlauf einer lokalen Immunreaktion u.a. von aktivierten Makrophagen und neutrophilen Granulozyten freigesetzt werden.

Eine Inhibierung der Protease MT6-MMP/MMP-25 könnte zudem die zytoprotektiven Eigenschaften von ApoJ erklären. MT6-MMP/MMP-25 ist ein membranständiges, glykosylphosphatidylinositol-verankertes Mitglied der Matrix-Metalloproteinase-Familie, das nahezu ausschließlich von neutrophilen Granulozyten exprimiert wird und als Folge einer Aktivierung dieser Zellen in löslicher Form in das extrazelluläre Milieu freigesetzt wird. Dieses Enzym ist vor allem am Abbau extrazellulärer Matrixproteine beteiligt und scheint eine wichtige Rolle während der Migration neutrophiler Granulozyten zu Entzündungsherden zu spielen. In inflammatorischen Läsionen, in denen eine Akkumulation dieser Zellen stattfindet, könnte eine erhöhte Konzentration dieses Enzyms zur Entstehung lokaler Gewebeschäden beitragen. Dass ApoJ die Eigenschaft besitzt, an diese Protease zu binden und die entstehenden stabilen Proteinkomplexe katalytisch inaktiv sind, könnte auf eine Funktion von ApoJ in der lokalen Regulation der enzymatischen Aktivität von MT6-MMP/MMP-25 im Bereich entzündlicher Läsionen hindeuten (Matsuda et al. 2003).

Durch Inhibierung einer NF- κ B-abhängigen Genexpression könnte ApoJ zudem an der Regulation lokaler inflammatorischer Prozesse beteiligt sein. Wie Santilli und Mitarbeiter mit Hilfe NF- κ B-abhängiger Reporterplasmide zeigen konnten, weisen aus ApoJ-defizienten Mäusen stammende primäre Fibroblasten ein deutlich erhöhtes Niveau an konstitutiv aktivem NF- κ B auf. Durch Transfektion dieser Fibroblasten und einer humanen Neuroblastomazelllinie (LAN5) mit einem ApoJ-cDNA-enthaltenden Expressionsplasmid war es möglich, sowohl die basale NF- κ B-Aktivität zu reduzieren, eine durch TNF- α und Doxorubicin induzierte Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors zu inhibieren als auch einer durch TNF- α -induzierten NF- κ B-abhängigen Genexpression entgegenzuwirken (Santilli et al. 2003). Die molekularen Mechanismen, welche diese ApoJ-abhängige Regulation der NF- κ B-Aktivität vermitteln, sind noch völlig unklar. Hierbei scheinen eine Stabilisierung und eine verminderte proteasomale Degradation von I κ B-Proteinen, insbesondere I κ B- β , eine Rolle zu spielen. In diesem Zusammenhang wäre denkbar, dass eine erhöhte Expression von ApoJ im Bereich entzündlicher Läsionen zu einer Inhibierung NF- κ B-anhängiger Signalwege führt. Da ApoJ ein sekretiertes Protein ist, wäre denkbar, dass sich dessen NF- κ B-inhibierende Wirkung zudem nicht nur auf ApoJ-exprimierende Gewebezellen beschränkt und ApoJ die Genexpression eingewanderter Immunzellen darüber hinaus in parakriner Weise beeinflusst. Aufgrund der zentralen Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B in inflammatorischen Prozessen und der Aktivierung von Immunzellen könnte eine Inhibierung der NF- κ B-Aktivität durch ApoJ einer übermäßigen Aktivierung lokaler Immunreaktionen entgegenwirken und in diesem Zusammenhang eine Schädigung des umliegenden intakten Gewebes minimieren.

Diskussion

Weiterhin könnte ApoJ in degenerierenden Geweben als extrazelluläres Chaperon fungieren. Studien der Arbeitsgruppe Wilson zeigen, dass ApoJ ähnliche Eigenschaften wie kleine intrazelluläre Hitzeschockproteine aufweist. Es ist in der Lage, hydrophobe Domänen einer Vielzahl partiell denaturierter Proteine zu binden und mit diesen stabile lösliche hochmolekulare Komplexe zu bilden. Auf diese Weise verhindert ApoJ zum einen die Präzipitation der denaturierten Proteine und stabilisiert diese zum anderen in einem Stadium, das eine ATP-abhängige Rückfaltung in die native Konformation ermöglicht. ApoJ selbst ist jedoch nicht in der Lage, eine Renaturierung gebundener Proteine zu initiieren. Hierfür ist die Gegenwart weiterer Chaperone wie z.B. Hsp70 notwendig. Ein leicht saures Milieu verstärkt zudem die chaperonähnlichen Eigenschaften von ApoJ (Humphreys et al. 1999, Poon et al. 2000, Wilson und Easterbrook-Smith 2000, Poon et al. 2002a, Poon et al. 2002b). Vorstellbar wäre, dass ApoJ in verletzten Geweben eine vollständige Denaturierung und Präzipitation aus nekrotischen Zellen freigesetzter intrazellulärer Proteine verhindert. Umliegende Zellen könnten die entstehenden löslichen ApoJ-Proteinkomplexe endozytieren und somit zu einer Entsorgung von nekrotischem Zellmaterial beitragen. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe deuten in diesem Zusammenhang auf eine Adaptorfunktion von ApoJ hin, das nach Bindung an denaturierte Proteine und Fragmente nekrotischer Zellen deren Endozytose durch ApoJ-bindende Rezeptoren aus der LDL-Rezeptorfamilie (LRP, Megalin) vermittelt. Veröffentlichte wie aktuelle Daten unserer Gruppe zeigen, dass bei einer Reihe verschiedener Zelllinien in Gegenwart von ApoJ eine vermehrte LRP- und megalinabhängige Endozytose von hitzedenaturierten zytosolischen Proteinen und Fragmenten nekrotischer Zellen erfolgt. Zudem verstärkt nekrotisches Zellmaterial in ähnlicher Weise die rezeptorvermittelte Endozytose von ApoJ (Bartl et al. 2001, O. Bergner unveröffentlicht). Unterstützt wird diese Hypothese auch durch eine Studie, die zeigen konnte, dass in den Testes ApoJ-defizienter Mäuse die Entsorgung durch Hitzebehandlung geschädigter Keimzellen vermindert ist (Bailey et al. 2002). Zusammenfassend könnte ApoJ in degenerierenden Geweben aufgrund seiner beschriebenen chaperonähnlichen Eigenschaften die Präzipitation aus nekrotischen Zellen freigesetzter denaturierender Proteine inhibieren sowie deren Endozytose durch ApoJ-spezifische Rezeptoren vermitteln und somit zur Entsorgung von nekrotischem Zellmaterial beitragen. Dies könnte schließlich den Rückgang lokaler Entzündungsreaktionen fördern und die Regeneration postinflammatorischer Gewebe unterstützen.

Wie in vorliegender Arbeit gezeigt werden konnte, führt die Inkubation mit nekrotischen Zellen neben einer vermehrten Expression von ApoJ auch zur Induktion der MMP-3—mRNA-Expression in Rat1-Fibroblasten sowie zu einer Repression der CTGF-mRNA-Expression in Rat1-Fibroblasten und glatten Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018 (Abb. 3.3.1, Abb. 3.3.2, Abb. 3.3.4, Abb. 3.3.5.1, Abb. 3.4.7). Deshalb soll an dieser Stelle die mögliche physiologische Bedeutung der durch nekrotische Zellen modulierten Expression beider Gene kurz diskutiert werden.

MMP-3 (Stromelysin-1, EC 3.4.24.17) ist eine zinkabhängige Endopeptidase, die der Familie der Matrix-Metalloproteinasen (MMP) angehört. Matrix-Metalloproteinasen sind an einer Vielzahl verschiedener biologischer (Embryogenese, Wundheilung, Angiogenese u.a.) und pathologischer

Prozesse (rheumatoide Arthritis, Krebs, kardiovaskuläre und fibrotische Erkrankungen u.a.) beteiligt (Nagase und Woessner 1999, Chakraborti et al. 2003). Eine erhöhte Expression von MMP-3 wurde unter anderem als Folge einer durch Ischämie induzierten Schädigung in der Leber sowie in atherosklerotischen Plaques beschrieben (Cursio et al. 2002, Henney et al. 1991, Galis et al. 1994). Untersuchungen MMP-3-defizienter Mäuse zeigten, dass diese Protease eine Funktion in der dermalen Wundheilung und in der Initiation T-Zell-vermittelter inflammatorischer Immunreaktionen besitzt (Bullard et al. 1999, Wang et al. 1999). Die Expression dieses Proteins wird auf transkriptioneller Ebene reguliert und in vielen Zelltypen, vor allem Fibroblasten, durch inflammatorische Mediatoren wie TNF- α und IL-1 β sowie den TLR-Agonisten LPS (TLR4) und Peptidoglykan (TLR2) induziert (Sciavolino et al. 1994, Li et al. 2001, Ito et al. 1996, Kitamura 1998, Witek-Zawada und Koj 2003, Warner et al. 2004, Kyburz et al. 2003). Zudem konnte im Rahmen vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass der TLR3-spezifische Agonist Poly(I:C) die MMP-3-mRNA-Expression in embryonalen Rat1-Fibroblasten induziert (Abb. 3.4.7). Wie viele andere Matrix-Metalloproteinasen auch wird neusynthetisiertes MMP-3 als katalytisch inaktives Vorläuferprotein (pro-MMP-3) sekretiert. Dieses Vorläuferprotein setzt sich aus einer N-terminalen Propeptidomäne, einer katalytischen Domäne mit der Zink-Bindestelle und einem konservierten Methioninrest sowie einer C-terminalen hämopexinähnlichen Domäne zusammen (Nagase und Woessner 1999, Chakraborti et al. 2003). Durch Abspaltung der inhibitorischen N-terminalen Propeptidomäne wird das katalytisch inaktive Vorläuferprotein in die enzymatisch aktive Form (45kDa) überführt. Diese proteolytische Aktivierung von MMP-3 kann durch die Proteasen Plasmin, Kallikrein und Trypsin katalysiert werden (Chin et al. 1998, Wilhelm et al. 1997, Chakraborti et al. 2003). Die aktivierte Form des Enzyms besitzt ein breites Substratspektrum, wobei die primäre Funktion von MMP-3 im proteolytischen Abbau verschiedener Komponenten der extrazellulären Matrix besteht. Als MMP-3-Substrate wurden verschiedene Kollagene (Typ III, Typ IV, Typ V, Typ IX), Fibronectin, Laminin, Osteonectin, Decorin und Proteoglykane beschrieben (Chin et al. 1998, Wilhelm et al. 1997, Chakraborti et al. 2003). Durch proteolytische Abspaltung der Propeptidomäne der katalytisch inaktiven Vorläuferformen von MMP-1 (Kollagenase-1), MMP-7 (Matrilysin), MMP-8 (Kollagenase-2), MMP-9 (Gelatinase B) und MMP-13 (Kollagenase-3) ist MMP-3 zudem in der Lage, weitere Mitglieder der MMP-Familie zu aktivieren und trägt auf diese Weise indirekt zum Abbau weiterer extrazellulärer Matrixproteine bei (Chakraborti et al. 2003). Eine zentrale Funktion der Matrix-Metalloprotease-3 besteht somit im Abbau der extrazellulären Matrix während der frühen inflammatorischen Phase der Wundheilung, was unter anderem die Einwanderung an Wundheilungsprozessen beteiligter Zelltypen (Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Fibroblasten, Keratinozyten u.a.) in die verletzte Gewebe fördert. Eine unkontrollierte Aktivierung von MMP-3 und anderen Matrix-Metalloproteinasen kann in diesem Zusammenhang jedoch zu einer zusätzlichen Schädigung betroffener Gewebe führen (Nagase und Woessner 1999, Cursio et al. 2002). Da auch bestimmte Zytokine und Chemokine MMP-3-Substrate darstellen, scheint sich die Funktion dieser Protease jedoch nicht auf die Degradierung der extrazellulären Matrix zu beschränken. Dass die MMP-3-Genexpression durch das inflammatorische Zytokin IL-1 β induziert

Diskussion

wird und MMP-3 neben MMP-1, MMP-2 und MMP-9 in der Lage ist, IL-1 β proteolytisch zu inaktivieren, könnte bedeuten, dass dieses Enzym Teil eines negativen Rückkopplungsmechanismus darstellt, der die lokale Expression und Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen reguliert (Ito et al. 1996). Zugleich deutet dies auf eine Beteiligung von Matrix-Metalloproteinasen an der Regulation von Entzündungsreaktionen hin. Unterstützt wird dies durch weitere Veröffentlichungen, die zeigen konnten, dass auch die Chemokine SDF-1 α/β (stromal cell-derived factor-1, CXCL-12), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1, CCL-2), MCP-2 (CCL-8), MCP-3 (CCL-7) und MCP-4 (CCL-13) Substrate für MMP-3 und andere Matrix-Metalloproteinasen darstellen (McQuibban et al. 2001, McQuibban et al. 2002). Die durch MMPs katalysierte proteolytische Modifikation dieser Chemokine beschränkt sich in allen Fällen auf eine Abspaltung des N-terminalen Tetrapeptids. Während dies bei SDF-1 α/β zu einem Verlust der Rezeptorbindungseigenschaften führt, fungieren die verkürzten Formen der MCP-Chemokine als Antagonisten für die Chemokinrezeptoren CCR-2 und CCR-3. Die proteolytisch modifizierten MCP-Chemokine binden an beide Rezeptoren ohne diese zu aktivieren und inhibieren zugleich eine Rezeptoraktivierung durch die unprozessierten MCP-Formen (McQuibban et al. 2001). Somit scheint MMP-3 neben anderen Matrix-Metalloproteinasen auch die Menge einwandernder Monozyten, dendritischer Zellen, eosinophiler und basophiler Granulozyten, natürlicher Killerzellen sowie B- und T-Lymphozyten in verletzte Gewebe zu regulieren. Zusammenfassend könnte die bei Inkubation mit nekrotischen Zellen beschriebene Induktion der MMP-3-mRNA-Expression in Fibroblasten *in vitro* (Li et al. 2001, Abb. 3.3.1, Abb. 3.3.2, Abb. 3.3.4, Abb. 3.3.5.1, Abb. 3.4.7) darauf hindeuten, dass geschädigte Zellen durch Induktion der MMP-3-Genexpression in umliegenden vitalen Gewebezellen und Fibroblasten den lokalen Abbau der extrazellulären Matrix initiieren bzw. fördern und somit die frühe Phase der Wundheilung einleiten bzw. Wundheilungsprozesse unterstützen. Denkbar wäre auch, dass eine vermehrte Expression und Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen in verletzten Geweben proteolytisch zur Entsorgung von nekrotischem Zellmaterial beiträgt. Da MMP-3 in der Lage ist, das inflammatorische Zytokin IL-1 β sowie bestimmte Chemokine zu inaktivieren, könnten nekrotische Zellen durch Induktion der MMP-3-Genexpression in vitalen Zellen zugleich an der Regulation lokaler Entzündungsreaktionen in geschädigten Geweben beteiligt sein.

CTGF (connective tissue growth factor) ist ein sekretiertes cysteinreiches Protein mit einem Molekulargewicht von 36-38kDa und profibrotischen Eigenschaften. CTGF ist Mitglied der CCN-Familie (CTGF/cystein-rich 61/nephroblastoma-overexpressed gene) von Wachstumsfaktoren und besitzt einen modularen Aufbau bestehend aus einer N-terminalen IFGBP- (insulin-like growth factor-binding protein-) Domäne, einer vWFC- (von Willebrand factor type C-) Domäne, einer TSP-1- (thrombospondin type 1-) Domäne und einer cysteinreichen C-terminalen CTCK- (C-terminal cystin knot-like-) Domäne (Lau und Lam 1999, Moussad und Brigstock 2000, Leask und Abraham 2003). CTGF-defiziente Mäuse weisen eine unzureichende Knochenbildung auf und sterben kurz nach der Geburt, was auf die essentielle Rolle dieses Proteins in der Induktion der Genexpression knochenspezifischer Matrixproteine sowie seine mitogene Wirkung auf Chondrozyten zurückzuführen ist (Ivkovic et al. 2003). In adulten Tieren erfolgt eine erhöhte Expression von CTGF

im Rahmen von Wundheilungsprozessen in der Haut, der Leber und der Hornhaut der Augen (Igarashi et al. 1993, Ujike et al. 2000, Blalock et al. 2003). Zudem exprimieren in humanen atherosklerotischen Läsionen lokalisierte glatte Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen vermehrt CTGF (Oemar et al. 1997). Eine konstitutiv erhöhte CTGF-Expression ist mit einer Vielzahl fibrotischer Erkrankungen wie Sklerodermie oder fibrotischen Läsionen in der Leber, dem Pankreas, der Lunge, der Niere oder dem Myokard assoziiert. Diese Erkrankungen sind durch eine übermäßige extrazelluläre Ablagerung von Kollagen gekennzeichnet (Igarashi et al. 1996, Igarashi et al. 1998, Ito et al. 1998, Lasky et al. 1998, Mori et al. 1999, Abraham et al. 2000, Stratton et al. 2001, Leask und Abraham 2003, Dean et al. 2005). CTGF ist in der Lage, die Proliferation und Migration von Fibroblasten und Endothelzellen zu induzieren (Bradham et al. 1991, Frazier et al. 1996, Shimo et al. 1999, Babic et al. 1999, Crean et al. 2002). Weiterhin vermittelt CTGF in integrin- und heparinsulfatproteoglykan-abhängiger Weise die Zelladhäsion von Fibroblasten und Endothelzellen (Babic et al. 1999, Chen et al. 2001, Ball et al. 2003). Zudem induziert CTGF in Fibroblasten die Genexpression der extrazellulären Matrixproteine Kollagen (Typ I) und Fibronectin. Weiterhin fördert es die Differenzierung von Fibroblasten zu kontraktile Myofibroblasten und somit die Ausbildung von Granulationsgewebe *in vivo* (Frazier et al. 1996, Shi-wen et al. 2000, Crean et al. 2002). Während die mitogenen und zelladhäsiven Eigenschaften durch das C-terminale 10kDa-Fragment von CTGF vermittelt werden, ist für eine Induktion der Kollagensynthese und eine Differenzierung von Fibroblasten die N-terminale Domäne von CTGF ausreichend (Brigstock et al. 1997, Ball et al. 2003, Grotendorst und Duncan 2005). Während die CTGF-Expression in Fibroblasten, glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen durch TNF- α , IL-4, Prostaglandine und Prostazykline supprimiert wird (Lin et al. 1998, Abraham et al. 2000, Villacorta et al. 2003, Rishikof et al. 2002, Ricupero et al. 1999, Stratton et al. 2001, Stratton et al. 2002), besitzen u.a. Thrombin, der Gerinnungsfaktor VIIa (FVIIa), Insulin und Glukose CTGF-induzierende Eigenschaften *in vitro* (Chambers et al. 2000, Howell et al. 2001, Pendurthi et al. 2000, Paradis et al. 2001). Eine zentrale Rolle in der Regulation dieses Wachstumsfaktors spielt jedoch TGF- β (transforming growth factor β), das insbesondere in Fibroblasten die CTGF-Expression induziert (Igarashi et al. 1993, Grotendorst et al. 1996). Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass während der proliferativen Phase der Wundheilung CTGF in autokriner/parokriner Weise zumindest einen Teil der durch TGF- β induzierten Effekte vermittelt und an der Ausbildung des Granulationsgewebes beteiligt ist, indem es u.a. die Einwanderung von Fibroblasten in die verletzten Gewebe sowie deren Differenzierung zu Myofibroblasten fördert und durch Induktion der Kollagen- und Fibronectinsynthese in Fibroblasten zum Aufbau der extrazellulären Matrix beiträgt (Grotendorst 1997, Kothapalli et al. 1997, Duncan et al. 1999, Yokoi et al. 2001, Weston et al. 2003). Vermutet wird, dass in diesem Zusammenhang eine deregulierte CTGF-Expression und somit ein konstitutiv erhöhtes Expressionsniveau dieses Wachstumsfaktors in den betroffenen Geweben zu einer unkontrollierten lokalen Synthese und Ablagerung von Kollagen führt und auf diese Weise zur Entstehung chronischer fibrotischer Läsionen beiträgt (Leask und Abraham 2003). Dass die Inkubation mit nekrotischen Zellen die CTGF-Expression in Rat1-Fibroblasten und glatten Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018

Diskussion

reprimiert sowie die Expression von MMP-3 in Rat1-Fibroblasten induziert, könnte darauf hindeuten, dass geschädigte Zellen in verletzten Geweben die Genexpression umliegender vitaler Gewebezellen dahingehend beeinflussen, dass ein MMP-vermittelter Abbau der vorhandenen extrazellulären Matrix gefördert und zugleich eine durch CTGF-induzierte Synthese und Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen inhibiert wird. Dies wiederum könnte während der frühen inflammatorischen Phase der Wundheilung die Migration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in die verletzten Gewebe unterstützen und somit die Wundheilung beschleunigen. Weiterhin wäre denkbar, dass nekrotische Zellen während der nachfolgenden proliferativen Phase der Wundheilung (Granulationsphase) durch Suppression der CTGF-Expression in umliegenden Gewebezellen zur Regulation einer durch CTGF induzierten Synthese und Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen beitragen und auf diese Weise der Entstehung lokaler chronischer Fibrosen entgegenwirken.

Interessant ist, dass CTGF auch ein Substrat für verschiedene Matrix-Metalloproteinasen darstellt. Wie Hashimoto et al. zeigen konnten, sind MMP-1, MMP-3, MMP-7 und MMP-13 in der Lage, eine proteolytische Spaltung von CTGF zwischen der vWFC- und der TSP-1-Domäne (Position Met¹⁹⁴-Ile¹⁹⁵) zu katalysieren, wobei zwei Proteinfragmente mit einem Molekulargewicht von jeweils etwa 20kDa entstehen (Hashimoto et al. 2002). Diese Proteolyse scheint jedoch zu keinem Funktionsverlust von CTGF zu führen, da sowohl die N-terminalen als auch die C-terminalen Bereiche unabhängig voneinander die diversen biologischen Effekte von CTGF vermitteln können (Brigstock et al. 1997, Ball et al. 2003, Grotendorst und Duncan 2005). Die physiologische Bedeutung dieser MMP-vermittelten Reaktion scheint vielmehr darin zu bestehen, den angiogenen Wachstumsfaktor VEGF (vascular endothelial growth factor) durch Proteolyse von CTGF aus inaktiven VEGF-CTGF-Proteinkomplexen freizusetzen. Wie gezeigt werden konnte, ist CTGF in der Lage, über seine TSP-1-Domäne an VEGF zu binden und auf diese Weise die Bindung von VEGF an den Rezeptor VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptor-2) zu blockieren (Inoki et al. 2002). Zudem wird eine durch VEGF induzierte Tubulibildung humaner Endothelzellen *in vitro* durch CTGF inhibiert (Inoki et al. 2002, Hashimoto et al. 2002). Durch Inkubation der inaktiven VEGF-CTGF-Komplexe mit den Matrix-Metalloproteinasen MMP-1, MMP-3 und MMP-13 lässt sich jedoch die angiogene Wirkung von VEGF rekonstituieren, wobei die spezifische proteolytische Modifikation von CTGF zur Freisetzung von bioaktivem VEGF führt. VEGF selbst ist kein Substrat dieser Matrix-Metalloproteinasen und wird während der Proteolyse der VEGF-CTGF-Komplexe nicht verdaut (Hashimoto et al. 2002). Dass die Inkubation mit nekrotischen Zellen sowohl zu einer Induktion der MMP-3-Genexpression in Fibroblasten (Abb. 3.3.1, Abb. 3.3.2, Abb. 3.3.4, Abb. 3.3.5.1, Abb. 3.4.7, Li et al. 2001) als auch zu einer Repression der CTGF-Expression in Fibroblasten und glatten Gefäßmuskelzellen führt (Abb. 3.3.4, Abb. 3.3.5.1) und darüber hinaus die VEGF-Expression in embryonalen Mausfibroblasten induziert (Li et al. 2001), könnte darauf hindeuten, dass geschädigte Zellen durch Modulation der Genexpression in umliegenden vitalen Zellen die Konzentration der angiogen wirksamen Form von VEGF in verletzten Geweben erhöhen. Hierbei könnten die vermehrte Synthese von VEGF und die verminderte Synthese von CTGF der Ausbildung angiogen

unwirksamer VEGF-CTGF-Komplexe entgegenwirken und eine erhöhte Expression von MMP-3 zugleich die Freisetzung von aktivem VEGF aus bestehenden VEGF-CTGF-Komplexen begünstigen. Nekrotische Zellen könnten somit durch Induktion der VEGF- und MMP-3-Genexpression sowie durch Repression der CTGF-Expression in lebenden Zellen zur lokalen Erhöhung der Menge an angiogen wirksamen VEGF beitragen und auf diese Weise die Neovaskularisation geschädigter Gewebe fördern.

Zusammenfassend zeigt sich, dass nekrotische Zellen in vielfältiger Weise die Genexpression in lebenden Zellen beeinflussen können, wobei eine Induktion der Expression von Zytokinen und Chemokinen in dendritischen Zellen (IL-12, IL-8, IFN- α , KC/GRO α), Makrophagen (KC/GRO α , MIP-2/GRO β) und Fibroblasten (IL-6, IL-8, KC/GRO α , MIP-2/GRO β , IP-10, RANTES, IFN- α , IFN- β) zur Initiation lokaler Entzündungsreaktionen beizutragen scheint (Li et al. 2001, Kariko et al. 2004a, Brentano et al. 2005, Abb. 3.4.8). Dass unter diesen Bedingungen in Fibroblasten die Genexpression von MMP-3 und VEGF induziert wird sowie in Fibroblasten und glatten Gefäßmuskelzellen die CTGF-mRNA-Expression supprimiert wird (Li et al. 2001, Abb. 3.3.1, Abb. 3.3.2, Abb. 3.3.4, Abb. 3.3.5.1, Abb. 3.4.7), zeigt, dass nekrotische Zellen darüber hinaus in der Lage sind, in lebenden Zellen die Expression von Proteinen zu modulieren, welche eine Rolle in der Regulation nachfolgender inflammatorischer Prozesse, der Reorganisation der extrazellulären Matrix sowie der Neovaskularisation spielen und somit an der Heilung bzw. Regeneration geschädigter Gewebe beteiligt sein könnten. Die *in vivo* beschriebenen Eigenschaften von ApoJ, dessen potentielle Funktionen als Komplementinhibitor, Proteaseinhibitor und NF- κ B-Inhibitor sowie seine zellschützende Wirkung gegenüber oxidativem Stress und TNF- α deuten darauf hin, dass ApoJ unter diesen Bedingungen Teil eines Schutzmechanismus peripherer Gewebe ist. In verletzten und degenerierenden Geweben könnten hierbei zusätzlich zu einer durch nekrotische Zellen induzierten ApoJ-Genexpression auch pathogenassoziierte Strukturen, inflammatorische Zytokine oder reaktive Sauerstoffverbindungen die lokale Expression dieses zytoprotektiven/antiinflammatorischen Proteins erhöhen. ApoJ könnte als Teil eines negativen Rückkopplungsmechanismus dazu beitragen, unkontrollierten Entzündungsreaktionen entgegenzuwirken und somit eine übermäßige Schädigung des Gewebes zu verhindern. Das multifunktionelle Glykoprotein könnte zudem als extrazelluläres Chaperon fungieren sowie an der lokalen Entsorgung von nekrotischem Zellmaterial beteiligt sein. Damit könnte Apolipoprotein J zur Heilung und Regeneration geschädigter Gewebe einen wesentlichen Beitrag leisten.

5 Zusammenfassung

Apolipoprotein J (ApoJ) ist ein sekretiertes heterodimeres 80kDa Glykoprotein mit zytoprotektiven und antiinflammatorischen Eigenschaften, dessen Expression in einer Vielzahl degenerierender und verletzter Gewebe stark erhöht ist. Eine vermehrte Expression dieses Proteins ist hierbei ausschließlich auf die intakten Bereiche der betroffenen Gewebe beschränkt. Die molekularen Mechanismen, die unter pathophysiologischen Bedingungen einer gesteigerten ApoJ-Genexpression zugrunde liegen, sind jedoch nicht vollständig geklärt. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass eine Inkubation mit nekrotischem Zellmaterial *in vitro* eine Akkumulation von ApoJ-mRNA in Fibroblasten der Zelllinie Rat1 induziert (Bach et al. 2001). Dies deutet darauf hin, dass von geschädigten Zellen exponierte bzw. freigesetzte Faktoren durch Induktion der ApoJ-Genexpression in umliegenden vitalen Zellen zu einer vermehrten Synthese dieses Proteins in verletzten Geweben beitragen können. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, nähere Informationen über die Identität der ApoJ-induzierenden Komponenten nekrotischer Zellen sowie der an der ApoJ-Regulation beteiligten Signalrezeptoren lebender Zellen zu erhalten.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass die Inkubation mit nekrotischen Zellen unter Verwendung von serumfreiem und mit N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin supplementiertem Kulturmedium zu einer starken Akkumulation von ApoJ-mRNA in vitalen Rat1-Fibroblasten führt und zugleich einem durch Serumentzug induzierten Zelltod dieser Fibroblasten entgegenwirkt. Eine Charakterisierung der ApoJ-induzierenden und zytoprotektiven Komponenten nekrotischer Zellen deutete darauf hin, dass beide Effekte durch ein lösliches zytosolisches 130-190kDa Protein vermittelt werden, welches als Folge des nekrotischen Zelltods in den extrazellulären Raum freigesetzt wird. In weiterführenden Experimenten ist es gelungen, dieses Protein mittels Ultrafiltration, Anionenaustauscher- und Gelpermeationschromatographie aus konditioniertem Medium postapoptotischer Rat1-Fibroblasten partiell zu reinigen und nach Polyacrylamidgelelektrophorese mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie als Acylpeptidhydrolase zu identifizieren. Anschließende Untersuchungen unter Verwendung verschiedener Glutaminsupplemente deuteten darauf hin, dass Rat1-Fibroblasten das dem Kulturmedium zugesetzte stabile Glutaminsupplement N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin ausschließlich in Gegenwart von fetalem Kälberserum verwerten können und sich die unter serumfreien Kulturbedingungen beobachteten zellschützenden Eigenschaften nekrotischer Zellen nahezu vollständig auf eine durch das Enzym Acylpeptidhydrolase katalysierte Hydrolyse von N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin und der damit einhergehenden Freisetzung von L-Glutamin zurückführen lassen. Dass freies L-Glutamin zudem eine Akkumulation von ApoJ-mRNA in Rat1-Fibroblasten induziert, ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass dieser Mechanismus unter den verwendeten Kulturbedingungen auch an der durch nekrotische Zellen induzierten ApoJ-Genexpression beteiligt ist und als physiologisch irrelevant angesehen werden muss.

In weiterführenden Experimenten zeigte sich, dass die Inkubation mit nekrotischen Zellen auch unter Verwendung von serumfreiem und mit L-Glutamin supplementiertem Kulturmedium zu einer Akkumulation von ApoJ-mRNA in Rat1-Fibroblasten führt, was ein deutlicher Hinweis darauf ist, dass noch weitere Komponenten nekrotischer Zellen in der Lage sind, eine Induktion der ApoJ-mRNA-Expression in vitalen Zellen zu induzieren. Unter diesen Kulturbedingungen werden die ApoJ-induzierenden Eigenschaften in etwa gleichem Maße durch sedimentierbare und lösliche Faktoren nekrotischer Zellen vermittelt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass bei Inkubation mit

nekrotischen Zellen in Rat1-Fibroblasten die Expression zweier an Wundheilungsprozessen beteiligter Proteine moduliert wird, wobei die mRNA-Expression des Enzyms Matrix-Metalloproteinase-3 (MMP-3) induziert und die des profibrotischen Wachstumsfaktors CTGF (connective tissue growth factor) reprimiert wird. Eine in ähnlicher Weise durch nekrotische Zellen induzierte Regulation der ApoJ- und CTGF-mRNA-Expression konnte auch in glatten Gefäßmuskelzellen der Zelllinie CRL2018 nachgewiesen werden. In embryonalen Dottersackzellen der Zelllinie 10A hingegen führt die Inkubation mit nekrotischen Zellen zu keiner deutlichen Akkumulation von ApoJ-mRNA. Eine mittels RT-PCR durchgeführte Genexpressionsanalyse zeigte, dass die drei verwendeten Zelllinien ein unterschiedliches Repertoire an Toll-like Rezeptoren (TLRs) exprimieren, wobei in CRL2018-Zellen TLR2, TLR3 und TLR4, in Rat1-Fibroblasten TLR3 und TLR4 und in embryonalen Dottersackzellen der Zelllinie 10A ausschließlich geringe Mengen an TLR4 exprimiert werden. Toll-like Rezeptoren (TLRs) besitzen als signaltransduzierende Rezeptoren eine zentrale Funktion in der Aktivierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems und werden sowohl durch pathogenassoziierte Strukturen (PAMPs) als auch durch körpereigene Komponenten wie z.B. Hitzeschockproteine, Nukleinsäuren und bislang nicht identifizierte Faktoren nekrotischer Zellen aktiviert. Mit Hilfe spezifischer TLR-Agonisten (Pam₃Cys-Ser-Lys₄, Poly(I:C), LPS) konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung aller drei Rezeptoren die ApoJ-mRNA-Expression in CRL2018-Zellen induziert, wobei die Inkubation mit dem TLR3-spezifischen Agonist Poly(I:C), einer synthetischen doppelsträngigen Ribonukleinsäure, zur stärksten Akkumulation von ApoJ-mRNA führt. In weiterführenden Experimenten stellte sich unter anderem heraus, dass neben nekrotischen Zellen auch Poly(I:C) ausschließlich in den beiden TLR3-exprimierenden Zelllinien CRL2018 und Rat1, nicht jedoch in TLR3-negativen 10A-Zellen, die ApoJ-mRNA-Expression induziert. Darüber hinaus führt auch die Inkubation mit nicht-synthetischer eukaryotischer RNA (Gesamt-RNA, t-RNA) zu einer Akkumulation von ApoJ-mRNA in CRL2018-Zellen. Diese Ergebnisse zeigen erstmals, dass die Expression von ApoJ-mRNA in TLR3-abhängiger Weise durch extrazelluläre Ribonukleinsäuren induziert wird und deuten darauf hin, dass aus nekrotischen Zellen freigesetzte Ribonukleinsäuren über eine Aktivierung von TLR3 zu einer vermehrten ApoJ-Genexpression in vitalen Zellen beitragen. Zugleich unterstützen diese Ergebnisse die Hypothese, dass neben synthetischer und viraler doppelsträngiger RNA auch aus nekrotischen Zellen freigesetzte Ribonukleinsäuren TLR3-aktivierende Eigenschaften besitzen (Kariko et al. 2004a, Brentano et al. 2005). Zur Überprüfung dieser Hypothese ist es im Rahmen weiterführender Arbeiten unter anderem notwendig zu untersuchen, ob sich durch die ektopische Expression von TLR3 in TLR3-defizienten 10A-Zellen eine durch nekrotische Zellen induzierte Erhöhung der ApoJ-Genexpression rekonstituieren lässt.

In ihrer Gesamtheit deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass in verletzten und/oder infizierten Geweben eine Aktivierung von Toll-like Rezeptoren durch endogene Agonisten und/oder pathogenassoziierte Strukturen zu einer Induktion der ApoJ-Genexpression in vitalen Gewebezellen führt. Aufgrund seiner antiinflammatorischen Eigenschaften könnte Apolipoprotein J hierbei an der Regulation TLR-induzierter Entzündungsreaktionen beteiligt sein und einer im Rahmen akuter inflammatorischer Prozesse auftretenden sekundären Schädigung intakter Gewebe entgegenwirken. Eine Aufklärung der Mechanismen, die nach Aktivierung von Toll-like Rezeptoren eine Induktion der Apolipoprotein J-Genexpression vermitteln, könnte auch für die Therapie von Erkrankungen von Nutzen sein, denen akute oder chronische Entzündungen zugrunde liegen.

6 Literaturverzeichnis

- Abraham, D.J., Shiwen, X., Black, C.M., Sa, S., Xu, Y. and Leask, A. (2000), "Tumor necrosis factor alpha suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor-beta in normal and scleroderma fibroblasts", *J Biol Chem*, 275 (20), 15220-15225
- Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K. and Akira, S. (1998), "Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function", *Immunity*, 9 (1), 143-150
- Agrawal, S., Agrawal, A., Doughty, B., Gerwitz, A., Blenis, J., Van Dyke, T. and Pulendran, B. (2003), "Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos", *J Immunol*, 171 (10), 4984-4989
- Ahmad-Nejad, P., Hacker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R.M. and Wagner, H. (2002), "Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments", *Eur J Immunol*, 32 (7), 1958-1968
- Akashi, S., Ogata, H., Kirikae, F., Kirikae, T., Kawasaki, K., Nishijima, M., Shimazu, R., Nagai, Y., Fukudome, K., Kimoto, M. and Miyake, K. (2000a), "Regulatory roles for CD14 and phosphatidylinositol in the signaling via toll-like receptor 4-MD-2", *Biochem Biophys Res Commun*, 268 (1), 172-177
- Akashi, S., Shimazu, R., Ogata, H., Nagai, Y., Takeda, K., Kimoto, M. and Miyake, K. (2000b), "Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages", *J Immunol*, 164 (7), 3471-3475
- Akira, S. and Takeda, K. (2004), "Toll-like receptor signalling", *Nat Rev Immunol*, 4 (7), 499-511
- Aksoy, E., Zouain, C.S., Vanhoutte, F., Fontaine, J., Pavelka, N., Thieblemont, N., Willems, F., Ricciardi-Castagnoli, P., Goldman, M., Capron, M., Ryffel, B. and Trottein, F. (2005), "Double-stranded RNAs from the helminth parasite *Schistosoma* activate TLR3 in dendritic cells", *J Biol Chem*, 280 (1), 277-283
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R. and Flavell, R.A. (2001), "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3", *Nature*, 413 (6857), 732-738
- Anders, H.J., Banas, B. and Schlondorff, D. (2004), "Signaling danger: toll-like receptors and their potential roles in kidney disease", *J Am Soc Nephrol*, 15 (4), 854-867
- Andreakos, E., Sacre, S.M., Smith, C., Lundberg, A., Kiriakidis, S., Stonehouse, T., Monaco, C., Feldmann, M. and Foxwell, B.M. (2004), "Distinct pathways of LPS-induced NF-kappa B activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP", *Blood*, 103 (6), 2229-2237
- Andrejeva, J., Childs, K.S., Young, D.F., Carlos, T.S., Stock, N., Goodbourn, S. and Randall, R.E. (2004), "The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (49), 17264-17269
- Appel, D. and Koch-Brandt, C. (1994), "Sorting of a secretory protein (gp80) to the apical surface of Caco-2 cells", *J Cell Sci*, 107 (Pt 2), 553-559
- Applequist, S.E., Wallin, R.P. and Ljunggren, H.G. (2002), "Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines", *Int Immunol*, 14 (9), 1065-1074
- Aronow, B.J., Lund, S.D., Brown, T.L., Harmony, J.A. and Witte, D.P. (1993), "Apolipoprotein J expression at fluid-tissue interfaces: potential role in barrier cytoprotection", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (2), 725-729
- Artwohl, M., Roden, M., Waldhausl, W., Freudenthaler, A. and Baumgartner-Parzer, S.M. (2004), "Free fatty acids trigger apoptosis and inhibit cell cycle progression in human vascular endothelial cells", *FASEB J*, 18 (1), 146-148
- Asea, A., Kraeft, S.K., Kurt-Jones, E.A., Stevenson, M.A., Chen, L.B., Finberg, R.W., Koo, G.C. and Calderwood, S.K. (2000), "HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine", *Nat Med*, 6 (4), 435-442
- Asea, A., Rehli, M., Kabingu, E., Boch, J.A., Bare, O., Auron, P.E., Stevenson, M.A. and Calderwood, S.K. (2002), "Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4", *J Biol Chem*, 277 (17), 15028-15034
- Athman, R. and Philpott, D. (2004), "Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins", *Curr Opin Microbiol*, 7 (1), 25-32
- Au, W.C. and Pitha, P.M. (2001), "Recruitment of multiple interferon regulatory factors and histone acetyltransferase to the transcriptionally active interferon promoters", *J Biol Chem*, 276 (45), 41629-41637
- Au, W.C., Yeow, W.S. and Pitha, P.M. (2001), "Analysis of functional domains of interferon regulatory factor 7 and its association with IRF-3", *Virology*, 280 (2), 273-282
- Babic, A.M., Chen, C.C. and Lau, L.F. (1999), "Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin alphavbeta3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo", *Mol Cell Biol*, 19 (4), 2958-2966
- Bach, U.C., Baiersdörfer, M., Klock, G., Cattaruzza, M., Post, A. and Koch-Brandt, C. (2001), "Apoptotic cell debris and phosphatidylserine-containing lipid vesicles induce apolipoprotein J (clusterin) gene expression in vital fibroblasts", *Exp Cell Res*, 265 (1), 11-20
- Bach, J.F. (2005), "A Toll-like trigger for autoimmune disease", *Nat Med*, 11 (2), 120-121
- Baiersdörfer, M. (1999), "Regulation des Clusterin-Gens durch Zelldebris und Phospholipide in serumfrei kultivierten Rat1-Zellen", *Diplomarbeit*, Universität Mainz

- Bailey, R.W., Aronow, B., Harmony, J.A. and Griswold, M.D. (2002), "Heat shock-initiated apoptosis is accelerated and removal of damaged cells is delayed in the testis of clusterin/ApoJ knock-out mice", *Biol Reprod*, 66 (4), 1042-1053
- Ball, D.K., Rachfal, A.W., Kemper, S.A. and Brigstock, D.R. (2003), "The heparin-binding 10 kDa fragment of connective tissue growth factor (CTGF) containing module 4 alone stimulates cell adhesion", *J Endocrinol*, 176 (2), R1-7
- Bartl, M.M., Luckenbach, T., Bergner, O., Ullrich, O. and Koch-Brandt, C. (2001), "Multiple receptors mediate apoJ-dependent clearance of cellular debris into nonprofessional phagocytes", *Exp Cell Res*, 271 (1), 130-141
- Basu, S., Binder, R.J., Suto, R., Anderson, K.M. and Srivastava, P.K. (2000), "Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway", *Int Immunol*, 12 (11), 1539-1546
- Basu, S., Binder, R.J., Ramalingam, T. and Srivastava, P.K. (2001), "CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin", *Immunity*, 14 (3), 303-313
- Bausinger, H., Lipsker, D., Ziylan, U., Manie, S., Briand, J.P., Cazenave, J.P., Muller, S., Haeuw, J.F., Ravanat, C., de la Salle, H. and Hanau, D. (2002), "Endotoxin-free heat-shock protein 70 fails to induce APC activation", *Eur J Immunol*, 32 (12), 3708-3713
- Beg, A.A. (2002), "Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses", *Trends Immunol*, 23 (11), 509-512
- Bell, J.K., Mullen, G.E., Leifer, C.A., Mazzoni, A., Davies, D.R. and Segal, D.M. (2003), "Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors", *Trends Immunol*, 24 (10), 528-533
- Bellander, B.M., Singhrao, S.K., Ohlsson, M., Mattsson, P. and Svensson, M. (2001), "Complement activation in the human brain after traumatic head injury", *J Neurotrauma*, 18 (12), 1295-1311
- Beppu, M., Inoue, M., Ishikawa, T. and Kikugawa, K. (1994), "Presence of membrane-bound proteinases that preferentially degrade oxidatively damaged erythrocyte membrane proteins as secondary antioxidant defense", *Biochim Biophys Acta*, 1196 (1), 81-87
- Berge, V., Johnson, E. and Hogasen, K. (1997), "Clusterin and the terminal complement pathway synthesized by human umbilical vein endothelial cells are closely linked when detected on co-cultured agarose beads", *APMIS*, 105 (1), 17-24
- Berwin, B., Reed, R.C. and Nicchitta, C.V. (2001), "Virally induced lytic cell death elicits the release of immunogenic GRP94/gp96", *J Biol Chem*, 276 (24), 21083-21088
- Berwin, B., Hart, J.P., Rice, S., Gass, C., Pizzo, S.V., Post, S.R. and Nicchitta, C.V. (2003), "Scavenger receptor-A mediates gp96/GRP94 and calreticulin internalization by antigen-presenting cells", *EMBO J*, 22 (22), 6127-6136
- Berwin, B., Delneste, Y., Lovingood, R.V., Post, S.R. and Pizzo, S.V. (2004), "SREC-I, a type F scavenger receptor, is an endocytic receptor for calreticulin", *J Biol Chem*, 279 (49), 51250-51257
- Bethke, K., Staib, F., Distler, M., Schmitt, U., Jonuleit, H., Enk, A.H., Galle, P.R. and Heike, M. (2002), "Different efficiency of heat shock proteins (HSP) to activate human monocytes and dendritic cells: superiority of HSP60", *J Immunol*, 169 (11), 6141-6148
- Beutler, B. and Rietschel, E.T. (2003), "Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin", *Nat Rev Immunol*, 3 (2), 169-176
- Beutler, B. (2004), "Innate immunity: an overview", *Mol Immunol*, 40 (12), 845-859
- Binder, R.J., Anderson, K.M., Basu, S. and Srivastava, P.K. (2000a), "Cutting edge: heat shock protein gp96 induces maturation and migration of CD11c+ cells in vivo", *J Immunol*, 165 (11), 6029-6035
- Binder, R.J., Han, D.K. and Srivastava, P.K. (2000b), "CD91: a receptor for heat shock protein gp96", *Nat Immunol*, 1 (2), 151-155
- Binder, R.J. and Srivastava, P.K. (2004), "Essential role of CD91 in re-presentation of gp96-chaperoned peptides", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (16), 6128-6133
- Biragyn, A., Ruffini, P.A., Leifer, C.A., Klyushnenkova, E., Shakhov, A., Chertov, O., Shirakawa, A.K., Farber, J.M., Segal, D.M., Oppenheim, J.J. and Kwak, L.W. (2002), "Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2", *Science*, 298 (5595), 1025-1029
- Blalock, T.D., Duncan, M.R., Varela, J.C., Goldstein, M.H., Tuli, S.S., Grotendorst, G.R. and Schultz, G.S. (2003), "Connective tissue growth factor expression and action in human corneal fibroblast cultures and rat corneas after photorefractive keratectomy", *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44 (5), 1879-1887
- Blander, J.M. and Medzhitov, R. (2004), "Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors", *Science*, 304 (5673), 1014-1018
- Boehme, K.W. and Compton, T. (2004), "Innate sensing of viruses by toll-like receptors", *J Virol*, 78 (15), 7867-7873
- Bonnard, A.S., Chan, P. and Fontaine, M. (1997), "Expression of clusterin and C4 mRNA during rat peripheral nerve regeneration", *Immunopharmacology*, 38 (1-2), 81-86
- Bowman, C.C., Rasley, A., Tranguch, S.L. and Marriott, I. (2003), "Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products", *Glia*, 43 (3), 281-291
- Bradford, M.M. (1976), "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal Biochem*, 72, 248-254
- Bradham, D.M., Igarashi, A., Potter, R.L. and Grotendorst, G.R. (1991), "Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10", *J Cell Biol*, 114 (6), 1285-1294
- Brentano, F., Schorr, O., Gay, R.E., Gay, S. and Kyburz, D. (2005), "RNA released from necrotic synovial fluid cells activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via toll-like receptor 3", *Arthritis Rheum*, 52 (9), 2656-2665

- Brigstock, D.R., Steffen, C.L., Kim, G.Y., Vegunta, R.K., Diehl, J.R. and Harding, P.A. (1997), "Purification and characterization of novel heparin-binding growth factors in uterine secretory fluids. Identification as heparin-regulated Mr 10,000 forms of connective tissue growth factor", *J Biol Chem*, 272 (32), 20275-20282
- Brown, A.R., Webb, J., Rebus, S., Williams, A. and Fazakerley, J.K. (2004), "Identification of up-regulated genes by array analysis in scrapie-infected mouse brains", *Neuropathol Appl Neurobiol*, 30 (5), 555-567
- Bsibsi, M., Ravid, R., Gveric, D. and van Noort, J.M. (2002), "Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system", *J Neuropathol Exp Neurol*, 61 (11), 1013-1021
- Bullard, K.M., Lund, L., Mudgett, J.S., Mellin, T.N., Hunt, T.K., Murphy, B., Ronan, J., Werb, Z. and Banda, M.J. (1999), "Impaired wound contraction in stromelysin-1-deficient mice", *Ann Surg*, 230 (2), 260-265
- Bulut, Y., Faure, E., Thomas, L., Karahashi, H., Michelsen, K.S., Equils, O., Morrison, S.G., Morrison, R.P. and Arditi, M. (2002), "Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway", *J Immunol*, 168 (3), 1435-1440
- Burkey, B.F., deSilva, H.V. and Harmony, J.A. (1991), "Intracellular processing of apolipoprotein J precursor to the mature heterodimer", *J Lipid Res*, 32 (6), 1039-1048
- Bursch, W., Gleeson, T., Kleine, L. and Tenniswood, M. (1995), "Expression of clusterin (testosterone-repressed prostate message-2) mRNA during growth and regeneration of rat liver", *Arch Toxicol*, 69 (4), 253-258
- Buttke, T.M., McCubrey, J.A. and Owen, T.C. (1993), "Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines", *J Immunol Methods*, 157 (1-2), 233-240
- Buttayan, R., Olsson, C.A., Pintar, J., Chang, C., Bandyk, M., Ng, P.Y. and Sawczuk, I.S. (1989), "Induction of the TRPM-2 gene in cells undergoing programmed death", *Mol Cell Biol*, 9 (8), 3473-3481
- Calero, M., Rostagno, A., Matsubara, E., Zlokovic, B., Frangione, B. and Ghiso, J. (2000), "Apolipoprotein J (clusterin) and Alzheimer's disease", *Microsc Res Tech*, 50 (4), 305-315
- Calvo, E.L., Mallo, G.V., Fiedler, F., Malka, D., Vaccaro, M.I., Keim, V., Morisset, J., Dagorn, J.C. and Iovanna, J.L. (1998), "Clusterin overexpression in rat pancreas during the acute phase of pancreatitis and pancreatic development", *Eur J Biochem*, 254 (2), 282-289
- Caramalho, I., Lopes-Carvalho, T., Ostler, D., Zelenay, S., Haury, M. and Demengeot, J. (2003), "Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide", *J Exp Med*, 197 (4), 403-411
- Carpentier, P.A., Begolka, W.S., Olson, J.K., Elhofy, A., Karpus, W.J. and Miller, S.D. (2005), "Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli", *Glia*, 49 (3), 360-374
- Cervellera, M., Raschella, G., Santilli, G., Tanno, B., Ventura, A., Mancini, C., Sevigani, C., Calabretta, B. and Sala, A. (2000), "Direct transactivation of the anti-apoptotic gene apolipoprotein J (clusterin) by B-MYB", *J Biol Chem*, 275 (28), 21055-21060
- Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A. and Chakraborti, T. (2003), "Regulation of matrix metalloproteinases: an overview", *Mol Cell Biochem*, 253 (1-2), 269-285
- Chambers, R.C., Leoni, P., Blanc-Brude, O.P., Wembridge, D.E. and Laurent, G.J. (2000), "Thrombin is a potent inducer of connective tissue growth factor production via proteolytic activation of protease-activated receptor-1", *J Biol Chem*, 275 (45), 35584-35591
- Chen, W., Syldath, U., Bellmann, K., Burkart, V. and Kolb, H. (1999), "Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system", *J Immunol*, 162 (6), 3212-3219
- Chen, C.C., Chen, N. and Lau, L.F. (2001), "The angiogenic factors Cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts", *J Biol Chem*, 276 (13), 10443-10452
- Chen, X., Halberg, R.B., Ehrhardt, W.M., Torrealba, J. and Dove, W.F. (2003), "Clusterin as a biomarker in murine and human intestinal neoplasia", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (16), 9530-9535.
- Chiang, K.C., Goto, S., Chen, C.L., Lin, C.L., Lin, Y.C., Pan, T.L., Lord, R., Lai, C.Y., Tseng, H.P., Hsu, L.W., Lee, T.H., Yokoyama, H., Kunimatsu, M., Chiang, Y.C. and Hashimoto, T. (2000), "Clusterin may be involved in rat liver allograft tolerance", *Transpl Immunol*, 8 (2), 95-99
- Chin, J.R., Murphy, G. and Werb, Z. (1985), "Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. Biosynthesis, isolation, characterization, and substrates", *J Biol Chem*, 260 (22), 12367-12376
- Choi, N.H., Tobe, T., Hara, K., Yoshida, H. and Tomita, M. (1990), "Sandwich ELISA assay for quantitative measurement of SP-40,40 in seminal plasma and serum", *J Immunol Methods*, 131 (2), 159-163
- Choi-Miura, N.H., Ihara, Y., Fukuchi, K., Takeda, M., Nakano, Y., Tobe, T. and Tomita, M. (1992), "SP-40,40 is a constituent of Alzheimer's amyloid", *Acta Neuropathol (Berl)*, 83 (3), 260-264
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987), "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction", *Anal Biochem*, 162 (1), 156-159
- Chongcharoen, K. and Sharma, K.K. (1998), "Characterization of trypsin-modified bovine lens acylpeptide hydrolase", *Biochem Biophys Res Commun*, 247 (1), 136-141
- Christie, A. and Butler, M. (1994), "Glutamine-based dipeptides are utilized in mammalian cell culture by extracellular hydrolysis catalyzed by a specific peptidase", *J Biotechnol*, 37 (3), 277-290
- Chung, J., Kwak, C., Jin, R.J., Lee, C.H., Lee, K.H. and Lee, S.E. (2004), "Enhanced chemosensitivity of bladder cancer cells to cisplatin by suppression of clusterin in vitro", *Cancer Lett*, 203 (2), 155-161
- Clark, A.M. and Griswold, M.D. (1997), "Expression of clusterin/sulfated glycoprotein-2 under conditions of heat stress in rat Sertoli cells and a mouse Sertoli cell line", *J Androl*, 18 (3), 257-263
- Collard, M.W. and Griswold, M.D. (1987), "Biosynthesis and molecular cloning of sulfated glycoprotein 2 secreted by rat Sertoli cells", *Biochemistry*, 26 (12), 3297-3303
- Cook, D.N., Pisetsky, D.S. and Schwartz, D.A. (2004), "Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease", *Nat Immunol*, 5 (10), 975-979

- Cooper, H.L. and Black, P.H. (1963), "Cytogenetic studies of hamster kidney cell cultures transformed by the simian vacuolating virus (SV40)", *J Natl Cancer Inst*, 30, 1015-1043
- Correa-Rotter, R., Hostetter, T.H., Manivel, J.C., Eddy, A.A. and Rosenberg, M.E. (1992), "Intrarenal distribution of clusterin following reduction of renal mass", *Kidney Int*, 41 (4), 938-950
- Crean, J.K., Finlay, D., Murphy, M., Moss, C., Godson, C., Martin, F. and Brady, H.R. (2002), "The role of p42/44 MAPK and protein kinase B in connective tissue growth factor induced extracellular matrix protein production, cell migration, and actin cytoskeletal rearrangement in human mesangial cells", *J Biol Chem*, 277 (46), 44187-44194
- Criswell, T., Beman, M., Araki, S., Leskov, K., Cataldo, E., Mayo, L.D. and Boothman, D.A. (2005), "Delayed activation of insulin-like growth factor-1 receptor/Src/MAPK/Egr-1 signaling regulates clusterin expression, a pro-survival factor", *J Biol Chem*, 280 (14), 14212-14221
- Cursio, R., Mari, B., Louis, K., Rostagno, P., Saint-Paul, M.C., Giudicelli, J., Bottero, V., Anglard, P., Yiotakis, A., Dive, V., Gugenheim, J. and Auberger, P. (2002), "Rat liver injury after normothermic ischemia is prevented by a phosphinic matrix metalloproteinase inhibitor", *FASEB J*, 16 (1), 93-95
- Cursson-Hermance, N., Khurana, S., Lee, T.H., Fitzgerald, K.A., and Kelliher, M.A. (2005), "RIP1 mediates the TRIF-dependent Toll-like receptor 3- and 4-induced NF- κ B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation", *J Biol Chem*, 280 (44), 36560-36566
- Cvetanovic, M. and Ucker, D.S. (2004), "Innate immune discrimination of apoptotic cells: repression of proinflammatory macrophage transcription is coupled directly to specific recognition", *J Immunol*, 172 (2), 880-889
- da Silva Correia, J., Soldau, K., Christen, U., Tobias, P.S. and Ulevitch, R.J. (2001), "Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex: transfer from CD14 to TLR4 and MD-2", *J Biol Chem*, 276 (24), 21129-21135
- Danik, M., Chabot, J.G., Mercier, C., Benabid, A.L., Chauvin, C., Quirion, R. and Suh, M. (1991), "Human gliomas and epileptic foci express high levels of a mRNA related to rat testicular sulfated glycoprotein 2, a purported marker of cell death", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (19), 8577-8581
- Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M. and Stark, G.R. (1994), "Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins", *Science*, 264 (5164), 1415-1421
- de Silva, H.V., Harmony, J.A., Stuart, W.D., Gil, C.M. and Robbins, J. (1990a), "Apolipoprotein J: structure and tissue distribution", *Biochemistry*, 29 (22), 5380-5389
- de Silva, H.V., Stuart, W.D., Duvic, C.R., Wetterau, J.R., Ray, M.J., Ferguson, D.G., Albers, H.W., Smith, W.R. and Harmony, J.A. (1990b), "A 70-kDa apolipoprotein designated ApoJ is a marker for subclasses of human plasma high density lipoproteins", *J Biol Chem*, 265 (22), 13240-13247
- de Silva, H.V., Stuart, W.D., Park, Y.B., Mao, S.J., Gil, C.M., Wetterau, J.R., Busch, S.J. and Harmony, J.A. (1990c), "Purification and characterization of apolipoprotein J", *J Biol Chem*, 265 (24), 14292-14297
- Dean, R.G., Balding, L.C., Candido, R., Burns, W.C., Cao, Z., Twigg, S.M. and Burrell, L.M. (2005), "Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis after myocardial infarction", *J Histochem Cytochem*, 53 (10), 1245-1256
- Debacq-Chainiaux, F., Borlon, C., Pascal, T., Royer, V., Eliaers, F., Ninane, N., Carrard, G., Friguier, B., de Longueville, F., Boffe, S., Remacle, J. and Toussaint, O. (2005), "Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway", *J Cell Sci*, 118 (Pt 4), 743-758
- Delneste, Y., Magistrelli, G., Gauchat, J., Haeuw, J., Aubry, J., Nakamura, K., Kawakami-Honda, N., Goetsch, L., Sawamura, T., Bonnefoy, J. and Jeannin, P. (2002), "Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation", *Immunity*, 17 (3), 353-362
- DeMattos, R.B., O'Dell, M. A., Parsadanian, M., Taylor, J.W., Harmony, J.A., Bales, K.R., Paul, S.M., Aronow, B.J. and Holtzman, D.M. (2002), "Clusterin promotes amyloid plaque formation and is critical for neuritic toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (16), 10843-10848
- Diebold, S.S., Montoya, M., Unger, H., Alexopoulou, L., Roy, P., Haswell, L.E., Al-Shamkhani, A., Flavell, R., Borrow, P. and Reis e Sousa, C. (2003), "Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers", *Nature*, 424 (6946), 324-328
- Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. and Reis e Sousa, C. (2004), "Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA", *Science*, 303 (5663), 1529-1531
- Diel, P. (1993), "Untersuchungen zur phylogenetischen Verbreitung gp80-homologer Gene; Isolierung und Charakterisierung des gp80-Gens aus der Maus", *Dissertation*, Universität Frankfurt/M
- Doyle, S., Vaidya, S., O'Connell, R., Dadgostar, H., Dempsey, P., Wu, T., Rao, G., Sun, R., Haberland, M., Modlin, R. and Cheng, G. (2002), "IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program", *Immunity*, 17 (3), 251-263
- Doyle, S.E., O'Connell, R., Vaidya, S.A., Chow, E.K., Yee, K. and Cheng, G. (2003), "Toll-like receptor 3 mediates a more potent antiviral response than Toll-like receptor 4", *J Immunol*, 170 (7), 3565-3571
- Doyle, S.E., O'Connell, R.M., Miranda, G.A., Vaidya, S.A., Chow, E.K., Liu, P.T., Suzuki, S., Suzuki, N., Modlin, R.L., Yeh, W.C., Lane, T.F. and Cheng, G. (2004), "Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38", *J Exp Med*, 199 (1), 81-90
- Duguid, J.R., Bohmont, C.W., Liu, N.G. and Tourtellotte, W.W. (1989), "Changes in brain gene expression shared by scrapie and Alzheimer disease", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (18), 7260-7264
- Dumont, P., Burton, M., Chen, Q.M., Gonos, E.S., Frippiat, C., Mazarati, J.B., Eliaers, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2000), "Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast", *Free Radic Biol Med*, 28 (3), 361-373

- Dumont, P., Chainiaux, F., Eliaers, F., Petropoulou, C., Remacle, J., Koch-Brandt, C., Gonos, E.S. and Toussaint, O. (2002), "Overexpression of apolipoprotein J in human fibroblasts protects against cytotoxicity and premature senescence induced by ethanol and tert-butylhydroperoxide", *Cell Stress Chaperones*, 7 (1), 23-35
- Duncan, M.R., Frazier, K.S., Abramson, S., Williams, S., Klapper, H., Huang, X. and Grotendorst, G.R. (1999), "Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP", *FASEB J*, 13 (13), 1774-1786
- Dunne, A. and O'Neill, L.A. (2003), "The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense", *Sci STKE*, 2003 (171), re3.
- Dvergsten, J., Manivel, J.C., Correa-Rotter, R. and Rosenberg, M.E. (1994), "Expression of clusterin in human renal diseases", *Kidney Int*, 45 (3), 828-835
- Dybdahl, B., Wahba, A., Lien, E., Flo, T.H., Waage, A., Qureshi, N., Sellevold, O.F., Espevik, T. and Sundan, A. (2002), "Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4", *Circulation*, 105 (6), 685-690
- Eaves-Pyles, T., Murthy, K., Liaudet, L., Virag, L., Ross, G., Soriano, F.G., Szabo, C. and Salzman, A.L. (2001), "Flagellin, a novel mediator of Salmonella-induced epithelial activation and systemic inflammation: I kappa B alpha degradation, induction of nitric oxide synthase, induction of proinflammatory mediators, and cardiovascular dysfunction", *J Immunol*, 166 (2), 1248-1260
- Edfeldt, K., Swedenborg, J., Hansson, G.K. and Yan, Z.Q. (2002), "Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation", *Circulation*, 105 (10), 1158-1161
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S. (1998), "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD", *Nature*, 391 (6662), 43-50
- Erlandsson, R., Boldog, F., Persson, B., Zabarovsky, E.R., Allikmets, R.L., Sumegi, J., Klein, G. and Jornvall, H. (1991), "The gene from the short arm of chromosome 3, at D3F15S2, frequently deleted in renal cell carcinoma, encodes acylpeptide hydrolase", *Oncogene*, 6 (7), 1293-1295
- Fadeel, B. (2003), "Programmed cell clearance", *Cell Mol Life Sci*, 60 (12), 2575-2585
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y. and Henson, P.M. (1998), "Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF", *J Clin Invest*, 101 (4), 890-898
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Rose, D.M., Pearson, A., Ezekewitz, R.A. and Henson, P.M. (2000), "A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells", *Nature*, 405 (6782), 85-90
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Guthrie, L. and Henson, P.M. (2001), "Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases", *J Immunol*, 166 (11), 6847-6854
- Farina, C., Krumbholz, M., Giese, T., Hartmann, G., Aloisi, F. and Meinl, E. (2005), "Preferential expression and function of Toll-like receptor 3 in human astrocytes", *J Neuroimmunol*, 159 (1-2), 12-19
- Faure, E., Equils, O., Sieling, P.A., Thomas, L., Zhang, F.X., Kirschning, C.J., Polentarutti, N., Muzio, M. and Arditi, M. (2000), "Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells", *J Biol Chem*, 275 (15), 11058-11063
- Fitzgerald, K.A., Palsson-McDermott, E.M., Bowie, A.G., Jefferies, C.A., Mansell, A.S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M.T., McMurray, D., Smith, D.E., Sims, J.E., Bird, T.A. and O'Neill, L.A. (2001), "Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction", *Nature*, 413 (6851), 78-83
- Fitzgerald, K.A., McWhirter, S.M., Faia, K.L., Rowe, D.C., Latz, E., Golenbock, D.T., Coyle, A.J., Liao, S.M. and Maniatis, T. (2003a), "IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway", *Nat Immunol*, 4 (5), 491-496
- Fitzgerald, K.A., Rowe, D.C., Barnes, B.J., Caffrey, D.R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P.M. and Golenbock, D.T. (2003b), "LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF", *J Exp Med*, 198 (7), 1043-1055
- Fitzgerald, K.A., Rowe, D.C. and Golenbock, D.T. (2004), "Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex", *Microbes Infect*, 6 (15), 1361-1367
- Flach, R., Cattaruzza, M. and Koch-Brandt, C. (1995), "Clusterin gene expression in apoptotic MDCK cells is dependent on the apoptosis-inducing stimulus", *Biochim Biophys Acta*, 1268 (3), 325-328
- Flohe, S.B., Bruggemann, J., Lendemans, S., Nikulina, M., Meierhoff, G., Flohe, S. and Kolb, H. (2003), "Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype", *J Immunol*, 170 (5), 2340-2348
- Frantz, S., Kobzik, L., Kim, Y.D., Fukazawa, R., Medzhitov, R., Lee, R.T. and Kelly, R.A. (1999), "Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium", *J Clin Invest*, 104 (3), 271-280
- Frantz, S., Kelly, R.A. and Bourcier, T. (2001), "Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor kappaB by oxidative stress in cardiac myocytes", *J Biol Chem*, 276 (7), 5197-5203
- Frazier, K., Williams, S., Kothapalli, D., Klapper, H. and Grotendorst, G.R. (1996), "Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor", *J Invest Dermatol*, 107 (3), 404-411
- Freixes, M., Puig, B., Rodriguez, A., Torrejon-Escribano, B., Blanco, R. and Ferrer, I. (2004), "Clusterin solubility and aggregation in Creutzfeldt-Jakob disease", *Acta Neuropathol (Berl)*, 108 (4), 295-301
- French, L.E., Chonn, A., Ducrest, D., Baumann, B., Belin, D., Wohlwend, A., Kiss, J.Z., Sappino, A.P., Tschopp, J. and Schifferli, J.A. (1993), "Murine clusterin: molecular cloning and mRNA localization of a gene associated with epithelial differentiation processes during embryogenesis", *J Cell Biol*, 122 (5), 1119-1130
- French, L.E., Sappino, A.P., Tschopp, J. and Schifferli, J.A. (1992), "Distinct sites of production and deposition of the putative cell death marker clusterin in the human thymus", *J Clin Invest*, 90 (5), 1919-1925

- French, L.E., Sappino, A.P., Tschopp, J. and Schifferli, J.A. (1994a), "Clusterin gene expression in the rat thymus is not modulated by dexamethasone treatment", *Immunology*, 82 (2), 328-331
- French, L.E., Wohlwend, A., Sappino, A.P., Tschopp, J. and Schifferli, J.A. (1994b), "Human clusterin gene expression is confined to surviving cells during in vitro programmed cell death", *J Clin Invest*, 93 (2), 877-884
- Frippiat, C., Chen, Q.M., Zdanov, S., Magalhaes, J.P., Remacle, J. and Toussaint, O. (2001), "Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts", *J Biol Chem*, 276 (4), 2531-2537
- Fritz, I.B., Burdzy, K., Setchell, B. and Blaschuk, O. (1983), "Ram rete testis fluid contains a protein (clusterin) which influences cell-cell interactions in vitro", *Biol Reprod*, 28 (5), 1173-1188
- Fujihara, M., Ito, N., Pace, J.L., Watanabe, Y., Russell, S.W. and Suzuki, T. (1994), "Role of endogenous interferon-beta in lipopolysaccharide-triggered activation of the inducible nitric-oxide synthase gene in a mouse macrophage cell line, J774", *J Biol Chem*, 269 (17), 12773-12778
- Fujino, T., Ishikawa, T., Inoue, M., Beppu, M. and Kikugawa, K. (1998), "Characterization of membrane-bound serine protease related to degradation of oxidatively damaged erythrocyte membrane proteins", *Biochim Biophys Acta*, 1374 (1-2), 47-55
- Fujino, T., Kojima, M., Beppu, M., Kikugawa, K., Yasuda, H. and Takahashi, K. (2000a), "Identification of the cleavage sites of oxidized protein that are susceptible to oxidized protein hydrolase (OPH) in the primary and tertiary structures of the protein", *J Biochem (Tokyo)*, 127 (6), 1087-1093
- Fujino, T., Tada, T., Hosaka, T., Beppu, M. and Kikugawa, K. (2000b), "Presence of oxidized protein hydrolase in human cell lines, rat tissues, and human/rat plasma", *J Biochem (Tokyo)*, 127 (2), 307-313
- Fujino, T., Watanabe, K., Beppu, M., Kikugawa, K. and Yasuda, H. (2000c), "Identification of oxidized protein hydrolase of human erythrocytes as acylpeptide hydrolase", *Biochim Biophys Acta*, 1478 (1), 102-112
- Fumarola, C., Zerbini, A. and Guidotti, G.G. (2001), "Glutamine deprivation-mediated cell shrinkage induces ligand-independent CD95 receptor signaling and apoptosis", *Cell Death Differ*, 8 (10), 1004-1013
- Funami, K., Matsumoto, M., Oshiumi, H., Akazawa, T., Yamamoto, A. and Seya, T. (2004), "The cytoplasmic 'linker region' in Toll-like receptor 3 controls receptor localization and signaling", *Int Immunol*, 16 (8), 1143-1154
- Furlong, E.E., Keon, N.K., Thornton, F.D., Rein, T. and Martin, F. (1996), "Expression of a 74-kDa nuclear factor 1 (NF1) protein is induced in mouse mammary gland involution. Involution-enhanced occupation of a twin NF1 binding element in the testosterone-repressed prostate message-2/clusterin promoter", *J Biol Chem*, 271 (47), 29688-29697
- Gade, W. and Brown, J.L. (1981), "Purification, characterization and possible function of alpha-N-acylamino acid hydrolase from bovine liver", *Biochim Biophys Acta*, 662 (1), 86-93
- Galis, Z.S., Sukhova, G.K., Lark, M.W. and Libby, P. (1994), "Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques", *J Clin Invest*, 94 (6), 2493-2503
- Gao, J.J., Filla, M.B., Fultz, M.J., Vogel, S.N., Russell, S.W. and Murphy, W.J. (1998), "Autocrine/paracrine IFN-alpha/beta mediates the lipopolysaccharide-induced activation of transcription factor Stat1alpha in mouse macrophages: pivotal role of Stat1alpha in induction of the inducible nitric oxide synthase gene", *J Immunol*, 161 (9), 4803-4810
- Gao, B. and Tsan, M.F. (2003a), "Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages", *J Biol Chem*, 278 (1), 174-179
- Gao, B. and Tsan, M.F. (2003b), "Recombinant human heat shock protein 60 does not induce the release of tumor necrosis factor alpha from murine macrophages", *J Biol Chem*, 278 (25), 22523-22529
- Garcia-Calvo, M., Peterson, E.P., Leiting, B., Ruel, R., Nicholson, D.W. and Thornberry, N.A. (1998), "Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors", *J Biol Chem*, 273 (49), 32608-32613
- Gebbia, J.A., Coleman, J.L. and Benach, J.L. (2004), "Selective induction of matrix metalloproteinases by *Borrelia burgdorferi* via toll-like receptor 2 in monocytes", *J Infect Dis*, 189 (1), 113-119.
- Gelissen, I.C., Hochgrebe, T., Wilson, M.R., Easterbrook-Smith, S.B., Jessup, W., Dean, R.T. and Brown, A.J. (1998), "Apolipoprotein J (clusterin) induces cholesterol export from macrophage-foam cells: a potential anti-atherogenic function?" *Biochem J*, 331 (Pt 1), 231-237
- Gelman, A.E., Zhang, J., Choi, Y. and Turka, L.A. (2004), "Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4+ T cell survival", *J Immunol*, 172 (10), 6065-6073
- Gewirtz, A.T., Navas, T.A., Lyons, S., Godowski, P.J. and Madara, J.L. (2001), "Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression", *J Immunol*, 167 (4), 1882-1885
- Ghiso, J., Matsubara, E., Koudinov, A., Choi-Miura, N.H., Tomita, M., Wisniewski, T. and Frangione, B. (1993), "The cerebrospinal-fluid soluble form of Alzheimer's amyloid beta is complexed to SP-40,40 (apolipoprotein J), an inhibitor of the complement membrane-attack complex", *Biochem J*, 293 (Pt 1), 27-30
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R. (1977), "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5", *J Gen Virol*, 36 (1), 59-74
- Graichen, R., Losch, A., Appel, D. and Koch-Brandt, C. (1996), "Glycolipid-independent sorting of a secretory glycoprotein to the apical surface of polarized epithelial cells", *J Biol Chem*, 271 (27), 15854-15857
- Grotendorst, G.R., Okochi, H. and Hayashi, N. (1996), "A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene", *Cell Growth Differ*, 7 (4), 469-480
- Grotendorst, G.R. (1997), "Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts", *Cytokine Growth Factor Rev*, 8 (3), 171-179

- Grotendorst, G.R. and Duncan, M.R. (2005), "Individual domains of connective tissue growth factor regulate fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation", *FASEB J*, 19 (7), 729-738
- Guillot, L., Le Goffic, R., Bloch, S., Escriou, N., Akira, S., Chignard, M. and Si-Tahar, M. (2005), "Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus", *J Biol Chem*, 280 (7), 5571-5580
- Gutacker, C., Klock, G., Diel, P. and Koch-Brandt, C. (1999), "Nerve growth factor and epidermal growth factor stimulate clusterin gene expression in PC12 cells", *Biochem J*, 339 (Pt 3), 759-766
- Guzhova, I.V., Arnholdt, A.C., Darieva, Z.A., Kinev, A.V., Lasunskaja, E.B., Nilsson, K., Bozhkov, V.M., Voronin, A.P. and Margulis, B.A. (1998), "Effects of exogenous stress protein 70 on the functional properties of human promonocytes through binding to cell surface and internalization", *Cell Stress Chaperones*, 3 (1), 67-77
- Gwon, J.S., Kim, I.B., Lee, M.Y., Oh, S.J. and Chun, M.H. (2004), "Expression of clusterin in Muller cells of the rat retina after pressure-induced ischemia", *Glia*, 47 (1), 35-45
- Hardardottir, I., Kunitake, S.T., Moser, A.H., Doerrler, W.T., Rapp, J.H., Grunfeld, C. and Feingold, K.R. (1994), "Endotoxin and cytokines increase hepatic messenger RNA levels and serum concentrations of apolipoprotein J (clusterin) in Syrian hamsters", *J Clin Invest*, 94 (3), 1304-1309
- Hardardottir, I., Sipe, J., Moser, A.H., Fielding, C.J., Feingold, K.R. and Grunfeld, C. (1997), "LPS and cytokines regulate extra hepatic mRNA levels of apolipoproteins during the acute phase response in Syrian hamsters", *Biochim Biophys Acta*, 1344 (3), 210-220
- Hartmann, K., Rauch, J., Urban, J., Parczyk, K., Diel, P., Pilarsky, C., Appel, D., Haase, W., Mann, K., Weller, A. and et al. (1991), "Molecular cloning of gp 80, a glycoprotein complex secreted by kidney cells in vitro and in vivo. A link to the reproductive system and to the complement cascade", *J Biol Chem*, 266 (15), 9924-9931
- Hasan, U.A., Trinchieri, G. and Vlach, J. (2005), "Toll-like receptor signaling stimulates cell cycle entry and progression in fibroblasts", *J Biol Chem*, 280 (21), 20620-20627
- Hashimoto, C., Hudson, K.L. and Anderson, K.V. (1988), "The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein", *Cell*, 52 (2), 269-279
- Hashimoto, G., Inoki, I., Fujii, Y., Aoki, T., Ikeda, E. and Okada, Y. (2002), "Matrix metalloproteinases cleave connective tissue growth factor and reactivate angiogenic activity of vascular endothelial growth factor 165", *J Biol Chem*, 277 (39), 36288-36295
- Hassell, T., Gleave, S. and Butler, M. (1991), "Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia", *Appl Biochem Biotechnol*, 30 (1), 29-41
- Hawn, T.R., Verbon, A., Lettinga, K.D., Zhao, L.P., Li, S.S., Laws, R.J., Skerrett, S.J., Beutler, B., Schroeder, L., Nachman, A., Ozinsky, A., Smith, K.D. and Aderem, A. (2003), "A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease", *J Exp Med*, 198 (10), 1563-1572
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M. and Aderem, A. (2001), "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5", *Nature*, 410 (6832), 1099-1103
- Hayashi, F., Means, T.K. and Luster, A.D. (2003), "Toll-like receptors stimulate human neutrophil function", *Blood*, 102 (7), 2660-2669
- Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., Dietrich, H., Lipford, G., Takeda, K., Akira, S., Wagner, H. and Bauer, S. (2003), "The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily", *Eur J Immunol*, 33 (11), 2987-2997
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. and Bauer, S. (2004), "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8", *Science*, 303 (5663), 1526-1529
- Heinz, S., Haehnel, V., Karaghiosoff, M., Schwarzfischer, L., Muller, M., Krause, S.W. and Rehli, M. (2003), "Species-specific regulation of Toll-like receptor 3 genes in men and mice", *J Biol Chem*, 278 (24), 21502-21509
- Heitmeier, M.R., Scarim, A.L. and Corbett, J.A. (1998), "Double-stranded RNA-induced inducible nitric-oxide synthase expression and interleukin-1 release by murine macrophages requires NF-kappaB activation", *J Biol Chem*, 273 (24), 15301-15307
- Heller, A.R., Fiedler, F., Braun, P., Stehr, S.N., Bodeker, H. and Koch, T. (2003), "Clusterin protects the lung from leukocyte-induced injury", *Shock*, 20 (2), 166-170.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. and Akira, S. (2000), "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA", *Nature*, 408 (6813), 740-745
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K. and Akira, S. (2002), "Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway", *Nat Immunol*, 3 (2), 196-200
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeda, K. and Akira, S. (2003), "The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets", *J Immunol*, 170 (6), 3059-3064
- Henney, A.M., Wakeley, P.R., Davies, M.J., Foster, K., Hembry, R., Murphy, G. and Humphries, S. (1991), "Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridization", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (18), 8154-8158
- Herrmann, M., Lorenz, H.M., Voll, R., Grunke, M., Woith, W. and Kalden, J.R. (1994), "A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments", *Nucleic Acids Res*, 22 (24), 5506-5507

- Hertz, C.J., Wu, Q., Porter, E.M., Zhang, Y.J., Weismuller, K.H., Godowski, P.J., Ganz, T., Randell, S.H. and Modlin, R.L. (2003), "Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2", *J Immunol*, 171 (12), 6820-6826
- Hoebe, K., Janssen, E.M., Kim, S.O., Alexopoulou, L., Flavell, R.A., Han, J. and Beutler, B. (2003), "Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways", *Nat Immunol*, 4 (12), 1223-1229
- Hoebe, K., Janssen, E. and Beutler, B. (2004), "The interface between innate and adaptive immunity", *Nat Immunol*, 5 (10), 971-974
- Hoebe, K., Georgel, P., Rutschmann, S., Du, X., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Shamel, L., Hartung, T., Zahringer, U. and Beutler, B. (2005), "CD36 is a sensor of diacylglycerides", *Nature*, 433 (7025), 523-527
- Hoffman, R.W., Gazitt, T., Foecking, M.F., Ortmann, R.A., Misfeldt, M., Jorgenson, R., Young, S.L. and Greidinger, E.L. (2004), "U1 RNA induces innate immunity signaling", *Arthritis Rheum*, 50 (9), 2891-2896
- Honda, K., Yanai, H., Takaoka, A. and Taniguchi, T. (2005), "Regulation of the type I IFN induction: a current view", *Int Immunol*, 17 (11), 1367-1378
- Hopkins, P.A. and Sriskandan, S. (2005), "Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond", *Clin Exp Immunol*, 140 (3), 395-407
- Hornig, T. and Medzhitov, R. (2001), "Drosophila MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (22), 12654-12658
- Hornig, T., Barton, G.M. and Medzhitov, R. (2001), "TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway", *Nat Immunol*, 2 (9), 835-841
- Hornig, T., Barton, G.M., Flavell, R.A. and Medzhitov, R. (2002), "The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors", *Nature*, 420 (6913), 329-333
- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S. and Hartmann, G. (2002), "Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides", *J Immunol*, 168 (9), 4531-4537
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K. and Akira, S. (1999), "Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product", *J Immunol*, 162 (7), 3749-3752
- Hoshino, K., Kaisho, T., Iwabe, T., Takeuchi, O. and Akira, S. (2002), "Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation", *Int Immunol*, 14 (10), 1225-1231
- Hough, C.D., Sherman-Baust, C.A., Pizer, E.S., Montz, F.J., Im, D.D., Rosenshein, N.B., Cho, K.R., Riggins, G.J. and Morin, P.J. (2000), "Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer", *Cancer Res*, 60 (22), 6281-6287
- Howell, D.C., Goldsack, N.R., Marshall, R.P., McNulty, R.J., Starke, R., Purdy, G., Laurent, G.J. and Chambers, R.C. (2001), "Direct thrombin inhibition reduces lung collagen, accumulation, and connective tissue growth factor mRNA levels in bleomycin-induced pulmonary fibrosis", *Am J Pathol*, 159 (4), 1383-1395
- Huang, Q., Yang, J., Lin, Y., Walker, C., Cheng, J., Liu, Z.G. and Su, B. (2004), "Differential regulation of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor signaling by MEKK3", *Nat Immunol*, 5 (1), 98-103
- Hubl, W., Druml, W., Langer, K. and Lochs, H. (1989), "Influence of molecular structure and plasma hydrolysis on the metabolism of glutamine-containing dipeptides in humans", *Metabolism*, 38 (8, Suppl 1), 59-62
- Humphreys, D., Hochgrebe, T.T., Easterbrook-Smith, S.B., Tenniswood, M.P. and Wilson, M.R. (1997), "Effects of clusterin overexpression on TNFalpha- and TGFbeta-mediated death of L929 cells", *Biochemistry*, 36 (49), 15233-15243
- Humphreys, D.T., Carver, J.A., Easterbrook-Smith, S.B. and Wilson, M.R. (1999), "Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins", *J Biol Chem*, 274 (11), 6875-6881
- Hunter, A.K. and Carta, G. (2001), "Effects of bovine serum albumin heterogeneity on frontal analysis with anion-exchange media", *J Chromatogr A*, 937 (1-2), 13-19
- Igarashi, A., Okochi, H., Bradham, D.M. and Grotendorst, G.R. (1993), "Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair", *Mol Biol Cell*, 4 (6), 637-645
- Igarashi, A., Nashiro, K., Kikuchi, K., Sato, S., Ihn, H., Fujimoto, M., Grotendorst, G.R. and Takehara, K. (1996), "Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid, and other fibrotic skin disorders", *J Invest Dermatol*, 106 (4), 729-733
- Igarashi, A., Hayashi, N., Nashiro, K. and Takehara, K. (1998), "Differential expression of connective tissue growth factor gene in cutaneous fibrohistiocytic and vascular tumors", *J Cutan Pathol*, 25 (3), 143-148
- Inoki, I., Shiomi, T., Hashimoto, G., Enomoto, H., Nakamura, H., Makino, K., Ikeda, E., Takata, S., Kobayashi, K. and Okada, Y. (2002), "Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis", *FASEB J*, 16 (2), 219-221
- Ishikawa, Y., Akasaka, Y., Ishii, T., Komiyama, K., Masuda, S., Asuwa, N., Choi-Miura, N.H. and Tomita, M. (1998), "Distribution and synthesis of apolipoprotein J in the atherosclerotic aorta", *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18 (4), 665-672
- Ito, A., Mukaiyama, A., Itoh, Y., Nagase, H., Thogersen, I.B., Enghild, J.J., Sasaguri, Y. and Mori, Y. (1996), "Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases", *J Biol Chem*, 271 (25), 14657-14660
- Ito, Y., Aten, J., Bende, R.J., Oemar, B.S., Rabelink, T.J., Weening, J.J. and Goldschmeding, R. (1998), "Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis", *Kidney Int*, 53 (4), 853-861
- Ivkovic, S., Yoon, B.S., Popoff, S.N., Safadi, F.F., Libuda, D.E., Stephenson, R.C., Daluiski, A. and Lyons, K.M. (2003), "Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development", *Development*, 130 (12), 2779-2791
- Iwasaki, A. and Medzhitov, R. (2004), "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses", *Nat Immunol*, 5 (10), 987-995

Literaturverzeichnis

- Jacobs, A.T. and Ignarro, L.J. (2001), "Lipopolysaccharide-induced expression of interferon-beta mediates the timing of inducible nitric-oxide synthase induction in RAW 264.7 macrophages", *J Biol Chem*, 276 (51), 47950-47957
- Janeway, C.A., Jr. and Medzhitov, R. (2002), "Innate immune recognition", *Annu Rev Immunol*, 20, 197-216
- Jenne, D.E. and Tschopp, J. (1989), "Molecular structure and functional characterization of a human complement cytolysis inhibitor found in blood and seminal plasma: identity to sulfated glycoprotein 2, a constituent of rat testis fluid", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (18), 7123-7127
- Jenne, D.E. and Tschopp, J. (1992), "Clusterin: the intriguing guises of a widely expressed glycoprotein", *Trends Biochem Sci*, 17 (4), 154-159
- Jenne, D.E., Lowin, B., Peitsch, M.C., Bottcher, A., Schmitz, G. and Tschopp, J. (1991), "Clusterin (complement lysis inhibitor) forms a high density lipoprotein complex with apolipoprotein A-I in human plasma", *J Biol Chem*, 266 (17), 11030-11036
- Jiang, Z., Zamanian-Daryoush, M., Nie, H., Silva, A.M., Williams, B.R. and Li, X. (2003), "Poly(I-C)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NF-kappa B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-independent pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR", *J Biol Chem*, 278 (19), 16713-16719
- Jiang, Z., Mak, T.W., Sen, G. and Li, X. (2004), "Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (10), 3533-3538
- Jimenez, R., Belcher, E., Sriskandan, S., Lucas, R., McMaster, S., Vojnovic, I., Warner, T.D. and Mitchell, J.A. (2005), "Role of Toll-like receptors 2 and 4 in the induction of cyclooxygenase-2 in vascular smooth muscle", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (12), 4637-4642
- Jin, G. and Howe, P.H. (1997), "Regulation of clusterin gene expression by transforming growth factor beta", *J Biol Chem*, 272 (42), 26620-26626
- Jin, G. and Howe, P.H. (1999), "Transforming growth factor beta regulates clusterin gene expression via modulation of transcription factor c-Fos", *Eur J Biochem*, 263 (2), 534-542
- Johnson, G.B., Brunn, G.J., Kodaira, Y. and Platt, J.L. (2002), "Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4", *J Immunol*, 168 (10), 5233-5239
- Jones, S.E. and Jomary, C. (2002), "Clusterin", *Int J Biochem Cell Biol*, 34 (5), 427-431
- Jones, S.E., Meerabux, J.M., Yeats, D.A. and Neal, M.J. (1992), "Analysis of differentially expressed genes in retinitis pigmentosa retinas. Altered expression of clusterin mRNA", *FEBS Lett*, 300 (3), 279-282
- Jones, W.M. and Manning, J.M. (1988), "Substrate specificity of an acylaminopeptidase that catalyzes the cleavage of the blocked amino termini of peptides", *Biochim Biophys Acta*, 953 (3), 357-360
- Jones, W.M., Manning, L.R. and Manning, J.M. (1986), "Enzymic cleavage of the blocked amino terminal residues of peptides", *Biochem Biophys Res Commun*, 139 (1), 244-250
- Jones, W.M., Scalconi, A., Bossa, F., Popowicz, A.M., Schneewind, O. and Manning, J.M. (1991), "Genetic relationship between acylpeptide hydrolase and acylase, two hydrolytic enzymes with similar binding but different catalytic specificities", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (6), 2194-2198
- Jordan-Starck, T.C., Lund, S.D., Witte, D.P., Aronow, B.J., Ley, C.A., Stuart, W.D., Swertfeger, D.K., Clayton, L.R., Sells, S.F., Paigen, B. and et al. (1994), "Mouse apolipoprotein J: characterization of a gene implicated in atherosclerosis", *J Lipid Res*, 35 (2), 194-210
- Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A.M., Wagner, H., Lipford, G. and Bauer, S. (2002), "Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848", *Nat Immunol*, 3 (6), 499
- Kakimura, J., Kitamura, Y., Takata, K., Umeki, M., Suzuki, S., Shibagaki, K., Taniguchi, T., Nomura, Y., Gebicke-Haerter, P.J., Smith, M.A., Perry, G. and Shimohama, S. (2002), "Microglial activation and amyloid-beta clearance induced by exogenous heat-shock proteins", *FASEB J*, 16 (6), 601-603
- Kalka, K., Ahmad, N., Criswell, T., Boothman, D. and Mukhtar, H. (2000), "Up-regulation of clusterin during phthalocyanine 4 photodynamic therapy-mediated apoptosis of tumor cells and ablation of mouse skin tumors", *Cancer Res*, 60 (21), 5984-5987
- Kamijo, R., Harada, H., Matsuyama, T., Bosland, M., Gerecitano, J., Shapiro, D., Le, J., Koh, S.I., Kimura, T., Green, S.J. and et al. (1994), "Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages", *Science*, 263 (5153), 1612-1615
- Kang, Y.K., Hong, S.W., Lee, H. and Kim, W.H. (2004), "Overexpression of clusterin in human hepatocellular carcinoma", *Hum Pathol*, 35 (11), 1340-1346
- Kariko, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M. and Weissman, D. (2004a), "mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3", *J Biol Chem*, 279 (13), 12542-12550
- Kariko, K., Bhuyan, P., Capodici, J. and Weissman, D. (2004b), "Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3", *J Immunol*, 172 (11), 6545-6549
- Kariko, K., Bhuyan, P., Capodici, J., Ni, H., Lubinski, J., Friedman, H. and Weissman, D. (2004c), "Exogenous siRNA mediates sequence-independent gene suppression by signaling through toll-like receptor 3", *Cells Tissues Organs*, 177 (3), 132-138
- Kaufmann, S.H. (1998), "Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs: more questions than answers", *Biochim Biophys Acta*, 1400 (1-3), 195-211
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S. (1999), "Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin", *Immunity*, 11 (1), 115-122

- Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J., Muhlradt, P.F., Sato, S., Hoshino, K. and Akira, S. (2001), "Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes", *J Immunol*, 167 (10), 5887-5894
- Kawai, T., Sato, S., Ishii, K.J., Coban, C., Hemmi, H., Yamamoto, M., Terai, K., Matsuda, M., Inoue, J., Uematsu, S., Takeuchi, O. and Akira, S. (2004), "Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6", *Nat Immunol*, 5 (10), 1061-1068
- Kawasaki, K., Akashi, S., Shimazu, R., Yoshida, T., Miyake, K. and Nishijima, M. (2000), "Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol", *J Biol Chem*, 275 (4), 2251-2254
- Kempster, S., Collins, M.E., Aronow, B.J., Simmons, M., Green, R.B. and Edington, N. (2004), "Clusterin shortens the incubation and alters the histopathology of bovine spongiform encephalopathy in mice", *Neuroreport*, 15 (11), 1735-1738
- Kida, E., Pluta, R., Lossinsky, A.S., Golabek, A.A., Choi-Miura, N.H., Wisniewski, H.M. and Mossakowski, M.J. (1995), "Complete cerebral ischemia with short-term survival in rat induced by cardiac arrest. II. Extracellular and intracellular accumulation of apolipoproteins E and J in the brain", *Brain Res*, 674 (2), 341-346
- Kirszbaum, L., Sharpe, J.A., Murphy, B., d'Apice, A.J., Classon, B., Hudson, P. and Walker, I.D. (1989), "Molecular cloning and characterization of the novel, human complement-associated protein, SP-40,40: a link between the complement and reproductive systems", *EMBO J*, 8 (3), 711-718
- Kitamura, M. (1998), "TGF-beta1 as an endogenous defender against macrophage-triggered stromelysin gene expression in the glomerulus", *J Immunol*, 160 (10), 5163-5168
- Klimaschewski, L., Obermuller, N. and Witzgall, R. (2001), "Regulation of clusterin expression following spinal cord injury", *Cell Tissue Res*, 306 (2), 209-216
- Kobayashi, K. and Smith, J.A. (1987), "Acyl-peptide hydrolase from rat liver. Characterization of enzyme reaction", *J Biol Chem*, 262 (24), 11435-11445
- Kobayashi, K., Lin, L.W., Yeaton, J.E., Klickstein, L.B. and Smith, J.A. (1989), "Cloning and sequence analysis of a rat liver cDNA encoding acyl-peptide hydrolase", *J Biol Chem*, 264 (15), 8892-8899
- Koch, S., Donarski, N., Goetze, K., Kreckel, M., Stuerenburg, H.J., Buhmann, C. and Beisiegel, U. (2001), "Characterization of four lipoprotein classes in human cerebrospinal fluid", *J Lipid Res*, 42 (7), 1143-1151
- Kol, A., Bourcier, T., Lichtman, A.H. and Libby, P. (1999), "Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages", *J Clin Invest*, 103 (4), 571-577
- Kol, A., Lichtman, A.H., Finberg, R.W., Libby, P. and Kurt-Jones, E.A. (2000), "Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells", *J Immunol*, 164 (1), 13-17
- Kollisch, G., Kalali, B.N., Voelcker, V., Wallich, R., Behrendt, H., Ring, J., Bauer, S., Jakob, T., Mempel, M. and Ollert, M. (2005), "Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes", *Immunology*, 114 (4), 531-541
- Kondor-Koch, C., Bravo, R., Fuller, S.D., Cutler, D. and Garoff, H. (1985), "Exocytotic pathways exist to both the apical and the basolateral cell surface of the polarized epithelial cell MDCK", *Cell*, 43 (1), 297-306
- Kothapalli, D., Frazier, K.S., Welply, A., Segarini, P.R. and Grotendorst, G.R. (1997), "Transforming growth factor beta induces anchorage-independent growth of NRK fibroblasts via a connective tissue growth factor-dependent signaling pathway", *Cell Growth Differ*, 8 (1), 61-68
- Krieg, A.M. (2002), "A role for Toll in autoimmunity", *Nat Immunol*, 3 (5), 423-424
- Krug, A., French, A.R., Barchet, W., Fischer, J.A., Dzionek, A., Pingel, J.T., Orihuela, M.M., Akira, S., Yokoyama, W.M. and Colonna, M. (2004), "TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function", *Immunity*, 21 (1), 107-119
- Kumagai, N., Fukuda, K., Fujitsu, Y., Lu, Y., Chikamoto, N. and Nishida, T. (2005), "Lipopolysaccharide-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 and chemokines in cultured human corneal fibroblasts", *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46 (1), 114-120
- Kuppner, M.C., Gastpar, R., Gelwer, S., Nossner, E., Ochmann, O., Scharner, A. and Issels, R.D. (2001), "The role of heat shock protein (hsp70) in dendritic cell maturation: hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors", *Eur J Immunol*, 31 (5), 1602-1609
- Kurt-Jones, E.A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L.M., Jones, L.P., Tripp, R.A., Walsh, E.E., Freeman, M.W., Golenbock, D.T., Anderson, L.J. and Finberg, R.W. (2000), "Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus", *Nat Immunol*, 1 (5), 398-401
- Kurt-Jones, E.A., Sandor, F., Ortiz, Y., Bowen, G.N., Counter, S.L., Wang, T.C. and Finberg, R.W. (2004), "Use of murine embryonic fibroblasts to define Toll-like receptor activation and specificity", *J Endotoxin Res*, 10 (6), 419-424
- Kyburz, D., Rethage, J., Seibl, R., Lauener, R., Gay, R.E., Carson, D.A. and Gay, S. (2003), "Bacterial peptidoglycans but not CpG oligodeoxynucleotides activate synovial fibroblasts by toll-like receptor signaling", *Arthritis Rheum*, 48 (3), 642-650
- Kyprianou, N., Alexander, R.B. and Isaacs, J.T. (1991), "Activation of programmed cell death by recombinant human tumor necrosis factor plus topoisomerase II-targeted drugs in L929 tumor cells", *J Natl Cancer Inst*, 83 (5), 346-350
- LaDu, M.J., Shah, J.A., Reardon, C.A., Getz, G.S., Bu, G., Hu, J., Guo, L. and van Eldik, L.J. (2000), "Apolipoprotein E receptors mediate the effects of beta-amyloid on astrocyte cultures", *J Biol Chem*, 275 (43), 33974-33980
- Laemmli, U.K. (1970), "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, 227 (5259), 680-685

Literaturverzeichnis

- Lasky, J.A., Ortiz, L.A., Tonthat, B., Hoyle, G.W., Corti, M., Athas, G., Lungarella, G., Brody, A. and Friedman, M. (1998), "Connective tissue growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis", *Am J Physiol*, 275 (2 Pt 1), L365-371
- Latz, E., Schoenmeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K.A., Monks, B.G., Knetter, C.F., Lien, E., Nilsen, N.J., Espevik, T. and Golenbock, D.T. (2004), "TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome", *Nat Immunol*, 5 (2), 190-198
- Lau, L.F. and Lam, S.C. (1999), "The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection", *Exp Cell Res*, 248 (1), 44-57
- Leadbetter, E.A., Rifkin, I.R., Hohlbaum, A.M., Beaudette, B.C., Shlomchik, M.J. and Marshak-Rothstein, A. (2002), "Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors", *Nature*, 416 (6881), 603-607
- Leask, A. and Abraham, D.J. (2003), "The role of connective tissue growth factor, a multifunctional matricellular protein, in fibroblast biology", *Biochem Cell Biol*, 81 (6), 355-363
- Lee, C.H., Jin, R.J., Kwak, C., Jeong, H., Park, M.S., Lee, N.K. and Lee, S.E. (2002), "Suppression of clusterin expression enhanced cisplatin-induced cytotoxicity on renal cell carcinoma cells", *Urology*, 60 (3), 516-520
- Lee, J., Chuang, T.H., Redecke, V., She, L., Pitha, P.M., Carson, D.A., Raz, E. and Cottam, H.B. (2003), "Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (11), 6646-6651
- Leemans, J.C., Stokman, G., Claessen, N., Rouschop, K.M., Teske, G.J., Kirschning, C.J., Akira, S., van der Poll, T., Weening, J.J. and Florquin, S. (2005), "Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney", *J Clin Invest*, 115 (10), 2894-2903
- Léger, J.G., Montpetit, M.L. and Tenniswood, M.P. (1987), "Characterization and cloning of androgen-repressed mRNAs from rat ventral prostate", *Biochem Biophys Res Commun*, 147 (1), 196-203
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M. and Hoffmann, J.A. (1996), "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults", *Cell*, 86 (6), 973-983
- Leskov, K.S., Klokov, D.Y., Li, J., Kinsella, T.J. and Boothman, D.A. (2003), "Synthesis and functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein", *J Biol Chem*, 278 (13), 11590-11600
- Li, M., Carpio, D.F., Zheng, Y., Bruzzo, P., Singh, V., Ouaz, F., Medzhitov, R.M. and Beg, A.A. (2001), "An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells", *J Immunol*, 166 (12), 7128-7135
- Li, X., Massa, P.E., Hanidu, A., Peet, G.W., Aro, P., Savitt, A., Mische, S., Li, J. and Marcu, K.B. (2002), "IKKalpha, IKKbeta, and NEMO/IKKgamma are each required for the NF-kappa B-mediated inflammatory response program", *J Biol Chem*, 277 (47), 45129-45140
- Li, K., Chen, Z., Kato, N., Gale, M., Jr. and Lemon, S.M. (2005), "Distinct poly(I-C) and virus-activated signaling pathways leading to interferon-beta production in hepatocytes", *J Biol Chem*, 280 (17), 16739-16747
- Lidstrom, A.M., Bogdanovic, N., Hesse, C., Volkman, I., Davidsson, P. and Blennow, K. (1998), "Clusterin (apolipoprotein J) protein levels are increased in hippocampus and in frontal cortex in Alzheimer's disease", *Exp Neurol*, 154 (2), 511-521
- Lin, J., Liliensiek, B., Kanitz, M., Schimanski, U., Bohrer, H., Waldherr, R., Martin, E., Kauffmann, G., Ziegler, R. and Nawroth, P.P. (1998), "Molecular cloning of genes differentially regulated by TNF-alpha in bovine aortic endothelial cells, fibroblasts and smooth muscle cells", *Cardiovasc Res*, 38 (3), 802-813
- Liu, L.F., Desai, S.D., Li, T.K., Mao, Y., Sun, M. and Sim, S.P. (2000), "Mechanism of action of camptothecin", *Ann N Y Acad Sci*, 922, 1-10
- Losch, A. and Koch-Brandt, C. (1995), "Dithiothreitol treatment of Madin-Darby canine kidney cells reversibly blocks export from the endoplasmic reticulum but does not affect vectorial targeting of secretory proteins", *J Biol Chem*, 270 (19), 11543-11548
- Lovgren, T., Eloranta, M.L., Bave, U., Alm, G.V. and Ronnblom, L. (2004), "Induction of interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells by immune complexes containing nucleic acid released by necrotic or late apoptotic cells and lupus IgG", *Arthritis Rheum*, 50 (6), 1861-1872
- Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R. and Iwasaki, A. (2003), "Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells", *J Exp Med*, 198 (3), 513-520
- Lund, J.M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N.C., Gale, N.W., Iwasaki, A. and Flavell, R.A. (2004), "Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (15), 5598-5603
- Lymar, E.S., Clark, A.M., Reeves, R. and Griswold, M.D. (2000), "Clusterin gene in rat sertoli cells is regulated by a core-enhancer element", *Biol Reprod*, 63 (5), 1341-1351
- Maaser, C., Heidemann, J., von Eiff, C., Luger, A., Spahn, T.W., Binion, D.G., Domschke, W., Luger, N. and Kucharzik, T. (2004), "Human intestinal microvascular endothelial cells express Toll-like receptor 5: a binding partner for bacterial flagellin", *J Immunol*, 172 (8), 5056-5062
- Madin, S.H. and Darby, N.B., Jr. (1958), "Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin", *Proc Soc Exp Biol Med*, 98 (3), 574-576
- Madlener, M. (1998), "Differential expression of matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors in acute murine skin wounds", *Arch Dermatol Res*, 290 (Suppl), S24-29
- Marks, N., Lo, E.S., Stern, F. and Danho, W. (1983), "Observations on N alpha-deacetylation of model amino acids and peptides: distribution and purification of a specific N-acyl amino acid releasing enzyme in rat brain", *J Neurochem*, 41 (1), 201-208
- Martin, E., Nathan, C. and Xie, Q.W. (1994), "Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase", *J Exp Med*, 180 (3), 977-984

- Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A.J., Rader, J.A., van Schie, R.C., LaFace, D.M. and Green, D.R. (1995), "Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl", *J Exp Med*, 182 (5), 1545-1556
- Matsuda, A., Itoh, Y., Koshikawa, N., Akizawa, T., Yana, I. and Seiki, M. (2003), "Clusterin, an abundant serum factor, is a possible negative regulator of MT6-MMP/MMP-25 produced by neutrophils", *J Biol Chem*, 278 (38), 36350-36357
- Matsumoto, M., Kikkawa, S., Kohase, M., Miyake, K. and Seya, T. (2002), "Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling", *Biochem Biophys Res Commun*, 293 (5), 1364-1369
- Matsumoto, M., Funami, K., Tanabe, M., Oshiumi, H., Shingai, M., Seto, Y., Yamamoto, A. and Seya, T. (2003), "Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells", *J Immunol*, 171 (6), 3154-3162
- Matsumura, T., Ito, A., Takii, T., Hayashi, H. and Onozaki, K. (2000), "Endotoxin and cytokine regulation of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 gene expression in murine liver and hepatocytes", *J Interferon Cytokine Res*, 20 (10), 915-921
- Matsushima, H., Yamada, N., Matsue, H. and Shimada, S. (2004), "TLR3-, TLR7-, and TLR9-mediated production of proinflammatory cytokines and chemokines from murine connective tissue type skin-derived mast cells but not from bone marrow-derived mast cells", *J Immunol*, 173 (1), 531-541
- May, P.C., Lampert-Etchells, M., Johnson, S.A., Poirier, J., Masters, J.N. and Finch, C.E. (1990), "Dynamics of gene expression for a hippocampal glycoprotein elevated in Alzheimer's disease and in response to experimental lesions in rat", *Neuron*, 5 (6), 831-839
- May, P.C., Robison, P., Fuson, K., Smalstig, B., Stephenson, D. and Clemens, J.A. (1992), "Sulfated glycoprotein-2 expression increases in rodent brain after transient global ischemia", *Brain Res Mol Brain Res*, 15 (1-2), 33-39
- McDonald, J.F. and Nelsestuen, G.L. (1997), "Potent inhibition of terminal complement assembly by clusterin: characterization of its impact on C9 polymerization", *Biochemistry*, 36 (24), 7464-7473
- McGeer, P.L., Kawamata, T. and Walker, D.G. (1992), "Distribution of clusterin in Alzheimer brain tissue", *Brain Res*, 579 (2), 337-341
- McLaughlin, L., Zhu, G., Mistry, M., Ley-Ebert, C., Stuart, W.D., Florio, C.J., Groen, P.A., Witt, S.A., Kimball, T.R., Witte, D.P., Harmony, J.A. and Aronow, B.J. (2000), "Apolipoprotein J/clusterin limits the severity of murine autoimmune myocarditis", *J Clin Invest*, 106 (9), 1105-1113
- McQuibban, G.A., Butler, G.S., Gong, J.H., Bendall, L., Power, C., Clark-Lewis, I. and Overall, C.M. (2001), "Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1", *J Biol Chem*, 276 (47), 43503-43508
- McQuibban, G.A., Gong, J.H., Wong, J.P., Wallace, J.L., Clark-Lewis, I. and Overall, C.M. (2002), "Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo", *Blood*, 100 (4), 1160-1167
- McWhirter, S.M., Fitzgerald, K.A., Rosains, J., Rowe, D.C., Golenbock, D.T. and Maniatis, T. (2004), "IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (1), 233-238
- Means, T.K., Hayashi, F., Smith, K.D., Aderem, A. and Luster, A.D. (2003), "The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells", *J Immunol*, 170 (10), 5165-5175
- Means, T.K., Latz, E., Hayashi, F., Murali, M.R., Golenbock, D.T. and Luster, A.D. (2005), "Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9", *J Clin Invest*, 115 (2), 407-417
- Meiss, G., Gast, F.U. and Pingoud, A.M. (1999), "The DNA/RNA non-specific Serratia nuclease prefers double-stranded A-form nucleic acids as substrates", *J Mol Biol*, 288 (3), 377-390
- Meylan, E., Burns, K., Hofmann, K., Blancheteau, V., Martinon, F., Kelliher, M. and Tschoop, J. (2004), "RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation", *Nat Immunol*, 5 (5), 503-507
- Michel, D., Chatelain, G., Hérault, Y. and Brun, G. (1995), "The expression of the avian clusterin gene can be driven by two alternative promoters with distinct regulatory elements", *Eur J Biochem*, 229 (1), 215-223
- Michel, D., Chatelain, G., North, S. and Brun, G. (1997), "Stress-induced transcription of the clusterin/apoJ gene", *Biochem J*, 328 (Pt 1), 45-50
- Mitta, M., Asada, K., Uchimura, Y., Kimizuka, F., Kato, I., Sakiyama, F. and Tsunasawa, S. (1989), "The primary structure of porcine liver acylamino acid-releasing enzyme deduced from cDNA sequences", *J Biochem (Tokyo)*, 106 (4), 548-551
- Mitta, M., Ohnogi, H., Mizutani, S., Sakiyama, F., Kato, I. and Tsunasawa, S. (1996), "The nucleotide sequence of human acylamino acid-releasing enzyme", *DNA Res*, 3 (1), 31-35
- Miyake, H., Gleave, M., Kamidono, S. and Hara, I. (2002), "Overexpression of clusterin in transitional cell carcinoma of the bladder is related to disease progression and recurrence", *Urology*, 59 (1), 150-154
- Miyake, H., Yamanaka, K., Muramaki, M., Hara, I. and Gleave, M.E. (2005), "Therapeutic efficacy of adenoviral-mediated p53 gene transfer is synergistically enhanced by combined use of antisense oligodeoxynucleotide targeting clusterin gene in a human bladder cancer model", *Neoplasia*, 7 (2), 171-179
- Miyata, M., Biro, S., Kaieda, H., Eto, H., Orihara, K., Kihara, T., Obata, H., Matsushita, N., Matsuyama, T. and Tei, C. (2001), "Apolipoprotein J/clusterin is induced in vascular smooth muscle cells after vascular injury", *Circulation*, 104 (12), 1407-1412
- Moreno, J.M., Sanchez-Montero, J.M., Ballesteros, A. and Sinisterra, J.V. (1991), "Hydrolysis of nucleic acids in single-cell protein concentrates using immobilized benzonase", *Appl Biochem Biotechnol*, 31 (1), 43-51

- Morgan, R.W., Sofer, L., Anderson, A.S., Bernberg, E.L., Cui, J. and Burnside, J. (2001), "Induction of host gene expression following infection of chicken embryo fibroblasts with oncogenic Marek's disease virus", *J Virol*, 75 (1), 533-539
- Mori, T., Kawara, S., Shinozaki, M., Hayashi, N., Kakinuma, T., Igarashi, A., Takigawa, M., Nakanishi, T. and Takehara, K. (1999), "Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model", *J Cell Physiol*, 181 (1), 153-159
- Morris, E.J. and Geller, H.M. (1996), "Induction of neuronal apoptosis by camptothecin, an inhibitor of DNA topoisomerase-I: evidence for cell cycle-independent toxicity", *J Cell Biol*, 134 (3), 757-770
- Moussad, E.E. and Brigstock, D.R. (2000), "Connective tissue growth factor: what's in a name?" *Mol Genet Metab*, 71 (1-2), 276-292
- Müller, M.R., Pfannes, S.D., Ayoub, M., Hoffmann, P., Bessler, W.G. and Mittenbuhler, K. (2001), "Immunostimulation by the synthetic lipopeptide P3CSK4: TLR4-independent activation of the ERK1/2 signal transduction pathway in macrophages", *Immunology*, 103 (1), 49-60
- Mullick, A.E., Tobias, P.S. and Curtiss, L.K. (2005), "Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptor 2", *J Clin Invest*, doi:10.1172/JCI25482. (PMID: 16211093), 1-8
- Murphy, B.F., Kirszbaum, L., Walker, I.D. and d'Apice, A.J. (1988), "SP-40,40, a newly identified normal human serum protein found in the SC5b-9 complex of complement and in the immune deposits in glomerulonephritis", *J Clin Invest*, 81 (6), 1858-1864
- Murphy, B.F., Davies, D.J., Morrow, W. and d'Apice, A.J. (1989a), "Localization of terminal complement components S-protein and SP-40,40 in renal biopsies", *Pathology*, 21 (4), 275-278
- Murphy, B.F., Saunders, J.R., O'Bryan, M.K., Kirszbaum, L., Walker, I.D. and d'Apice, A.J. (1989b), "SP-40,40 is an inhibitor of C5b-6-initiated haemolysis", *Int Immunol*, 1 (5), 551-554
- Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'Amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L.P., Allavena, P. and Mantovani, A. (2000), "Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells", *J Immunol*, 164 (11), 5998-6004
- Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Kosugi, A., Kimoto, M. and Miyake, K. (2002), "Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution", *Nat Immunol*, 3 (7), 667-672
- Nagase, H. and Woessner, J.F., Jr. (1999), "Matrix metalloproteinases", *J Biol Chem*, 274 (31), 21491-21494
- Nagase, H., Okugawa, S., Ota, Y., Yamaguchi, M., Tomizawa, H., Matsushima, K., Ohta, K., Yamamoto, K. and Hirai, K. (2003), "Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand", *J Immunol*, 171 (8), 3977-3982
- Nagata, S. (2000), "Apoptotic DNA fragmentation", *Exp Cell Res*, 256 (1), 12-18
- Napolitani, G., Rinaldi, A., Bertonni, F., Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (2005), "Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells", *Nat Immunol*, 6 (8), 769-776
- Nath, K.A., Dvergsten, J., Correa-Rotter, R., Hostetter, T.H., Manivel, J.C. and Rosenberg, M.E. (1994), "Induction of clusterin in acute and chronic oxidative renal disease in the rat and its dissociation from cell injury", *Lab Invest*, 71 (2), 209-218
- Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A. and et al. (1995), "Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis", *Nature*, 376 (6535), 37-43
- Niemeier, A., Willnow, T., Dieplinger, H., Jacobsen, C., Meyer, N., Hilpert, J. and Beisiegel, U. (1999), "Identification of megalin/gp330 as a receptor for lipoprotein(a) in vitro", *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19 (3), 552-561
- Nishiya, T. and DeFranco, A.L. (2004), "Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors", *J Biol Chem*, 279 (18), 19008-19017
- O'Bryan, M.K., Baker, H.W., Saunders, J.R., Kirszbaum, L., Walker, I.D., Hudson, P., Liu, D.Y., Glew, M.D., d'Apice, A.J. and Murphy, B.F. (1990), "Human seminal clusterin (SP-40,40). Isolation and characterization", *J Clin Invest*, 85 (5), 1477-1486
- Oemar, B.S., Werner, A., Garnier, J.M., Do, D.D., Godoy, N., Nauck, M., Marz, W., Rupp, J., Pech, M. and Luscher, T.F. (1997), "Human connective tissue growth factor is expressed in advanced atherosclerotic lesions", *Circulation*, 95 (4), 831-839
- Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S. and Kolb, H. (2000), "Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex", *J Immunol*, 164 (2), 558-561
- Ohlsson, M., Bellander, B.M., Langmoen, I.A. and Svensson, M. (2003), "Complement activation following optic nerve crush in the adult rat", *J Neurotrauma*, 20 (9), 895-904
- Okamura, Y., Watari, M., Jerud, E.S., Young, D.W., Ishizaka, S.T., Rose, J., Chow, J.C. and Strauss, J.F., 3rd (2001), "The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4", *J Biol Chem*, 276 (13), 10229-10233
- Olson, J.K. and Miller, S.D. (2004), "Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs", *J Immunol*, 173 (6), 3916-3924
- Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T. and Seya, T. (2003a), "TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction", *Nat Immunol*, 4 (2), 161-167
- Oshiumi, H., Sasai, M., Shida, K., Fujita, T., Matsumoto, M. and Seya, T. (2003b), "TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta", *J Biol Chem*, 278 (50), 49751-49762
- Oyama, J., Blais, C., Jr., Liu, X., Pu, M., Kobzik, L., Kelly, R.A. and Bourcier, T. (2004), "Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice", *Circulation*, 109 (6), 784-789

- Panjwani, N.N., Popova, L. and Srivastava, P.K. (2002), "Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs", *J Immunol*, 168 (6), 2997-3003
- Pankhurst, G.J., Bennett, C.A. and Easterbrook-Smith, S.B. (1998), "Characterization of the heparin-binding properties of human clusterin", *Biochemistry*, 37 (14), 4823-4830
- Papaconstantinou, H.T., Chung, D.H., Zhang, W., Ansari, N.H., Hellmich, M.R., Townsend, C.M., Jr. and Ko, T.C. (2000), "Prevention of mucosal atrophy: role of glutamine and caspases in apoptosis in intestinal epithelial cells", *J Gastrointest Surg*, 4 (4), 416-423
- Paquette, J.C., Guerin, P.J. and Gauthier, E.R. (2005), "Rapid induction of the intrinsic apoptotic pathway by L-glutamine starvation", *J Cell Physiol*, 202 (3), 912-921
- Paradis, V., Perlemuter, G., Bonvoust, F., Dargere, D., Parfait, B., Vidaud, M., Conti, M., Huet, S., Ba, N., Buffet, C. and Bedossa, P. (2001), "High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: a potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis", *Hepatology*, 34 (4 Pt 1), 738-744
- Parczyk, K. and Koch-Brandt, C. (1991), "The role of carbohydrates in vectorial exocytosis: The secretion of the gp 80 glycoprotein complex in a ricin-resistant mutant of MDCK cells", *FEBS Lett*, 278 (2), 267-270
- Parczyk, K., Pilarsky, C., Rachel, U. and Koch-Brandt, C. (1994), "Gp80 (clusterin; TRPM-2) mRNA level is enhanced in human renal clear cell carcinomas", *J Cancer Res Clin Oncol*, 120 (3), 186-188
- Park, I.S., Che, Y.Z., Bendayan, M., Kang, S.W. and Min, B.H. (1999), "Up-regulation of clusterin (sulfated glycoprotein-2) in pancreatic islet cells upon streptozotocin injection to rats", *J Endocrinol*, 162 (1), 57-65
- Park, J.S., Svetkauskaite, D., He, Q., Kim, J.Y., Strassheim, D., Ishizaka, A. and Abraham, E. (2004), "Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein", *J Biol Chem*, 279 (9), 7370-7377
- Pasare, C. and Medzhitov, R. (2004), "Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity", *Microbes Infect*, 6 (15), 1382-1387
- Pasinetti, G.M., Johnson, S.A., Oda, T., Rozovsky, I. and Finch, C.E. (1994), "Clusterin (SGP-2): a multifunctional glycoprotein with regional expression in astrocytes and neurons of the adult rat brain", *J Comp Neurol*, 339 (3), 387-400
- Patel, N.V., Wei, M., Wong, A., Finch, C.E. and Morgan, T.E. (2004), "Progressive changes in regulation of apolipoproteins E and J in glial cultures during postnatal development and aging", *Neurosci Lett*, 371 (2-3), 199-204
- Pedersen, G., Andresen, L., Matthiessen, M.W., Rask-Madsen, J. and Brynskov, J. (2005), "Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium", *Clin Exp Immunol*, 141 (2), 298-306
- Pendurthi, U.R., Allen, K.E., Ezban, M. and Rao, L.V. (2000), "Factor VIIa and thrombin induce the expression of Cyr61 and connective tissue growth factor, extracellular matrix signaling proteins that could act as possible downstream mediators in factor VIIa x tissue factor-induced signal transduction", *J Biol Chem*, 275 (19), 14632-14641
- Petronini, P.G., Urbani, S., Alfieri, R., Borghetti, A.F. and Guidotti, G.G. (1996), "Cell susceptibility to apoptosis by glutamine deprivation and rescue: survival and apoptotic death in cultured lymphoma-leukemia cell lines", *J Cell Physiol*, 169 (1), 175-185
- Pilarsky, C. and Koch-Brandt, C. (1992), "Acidification slows the transport but does not influence the polarity of secretion of gp80 in the polarized epithelial cell MDCK", *Eur J Cell Biol*, 59 (2), 275-279
- Pilarsky, C., Haase, W. and Koch-Brandt, C. (1993), "Stable expression of gp80 (TRPM-2, clusterin), a secretory protein implicated in programmed cell death, in transfected BHK-21 cells", *Biochim Biophys Acta*, 1179 (3), 306-310
- Polgar, L. (2002), "The prolyl oligopeptidase family", *Cell Mol Life Sci*, 59 (2), 349-362
- Polihronis, M., Paizis, K., Carter, G., Sedal, L. and Murphy, B. (1993), "Elevation of human cerebrospinal fluid clusterin concentration is associated with acute neuropathology", *J Neurol Sci*, 115 (2), 230-233
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. and Beutler, B. (1998), "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene", *Science*, 282 (5396), 2085-2088
- Poon, S., Easterbrook-Smith, S.B., Rybchyn, M.S., Carver, J.A. and Wilson, M.R. (2000), "Clusterin is an ATP-independent chaperone with very broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in a folding-competent state", *Biochemistry*, 39 (51), 15953-15960
- Poon, S., Rybchyn, M.S., Easterbrook-Smith, S.B., Carver, J.A., Pankhurst, G.J. and Wilson, M.R. (2002a), "Mildly acidic pH activates the extracellular molecular chaperone clusterin", *J Biol Chem*, 277 (42), 39532-39540
- Poon, S., Treweek, T.M., Wilson, M.R., Easterbrook-Smith, S.B. and Carver, J.A. (2002b), "Clusterin is an extracellular chaperone that specifically interacts with slowly aggregating proteins on their off-folding pathway", *FEBS Lett*, 513 (2-3), 259-266
- Prinz, M., Garbe, F., Schmidt, H., Mildner, A., Gutcher, I., Wolter, K., Piesche, M., Schroers, R., Weiss, E., Kirschning, C.J., Rochford, C.D., Bruck, W. and Becher, B. (2006), "Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis", *J Clin Invest*, 116 (2), 456-464
- Punturieri, A., Alviani, R.S., Polak, T., Copper, P., Sonstein, J. and Curtis, J.L. (2004), "Specific engagement of TLR4 or TLR3 does not lead to IFN-beta-mediated innate signal amplification and STAT1 phosphorylation in resident murine alveolar macrophages", *J Immunol*, 173 (2), 1033-1042

Literaturverzeichnis

- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E. and Werner, T. (1995), "MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data", *Nucleic Acids Res*, 23 (23), 4878-4884
- Qureshi, S.T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K.J., Gros, P. and Malo, D. (1999), "Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)", *J Exp Med*, 189 (4), 615-625
- Radhakrishna, G. and Wold, F. (1989), "Purification and characterization of an N-acylaminoacyl-peptide hydrolase from rabbit muscle", *J Biol Chem*, 264 (19), 11076-11081
- Radsak, M.P., Hilf, N., Singh-Jasuja, H., Braedel, S., Brossart, P., Rammensee, H.G. and Schild, H. (2003), "The heat shock protein Gp96 binds to human neutrophils and monocytes and stimulates effector functions", *Blood*, 101 (7), 2810-2815
- Ralph, P. and Nakoinz, I. (1975), "Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line", *Nature*, 257 (5525), 393-394
- Ralph, P. and Nakoinz, I. (1977), "Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by macrophage-related cell lines: enhancement by PPD and LPS", *J Immunol*, 119 (3), 950-954
- Raphel, V., Lupi, N., Dupuis, L. and Puigserver, A. (1993), "The N-acylpeptide hydrolase from porcine intestine: isolation, subcellular localization and comparative hydrolysis of peptide and isopeptide bonds", *Biochimie*, 75 (10), 891-897
- Raphel, V., Giardina, T., Guevel, L., Perrier, J., Dupuis, L., Guo, X.J. and Puigserver, A. (1999), "Cloning, sequencing and further characterization of acylpeptide hydrolase from porcine intestinal mucosa", *Biochim Biophys Acta*, 1432 (2), 371-381
- Rassa, J.C., Meyers, J.L., Zhang, Y., Kudravalli, R. and Ross, S.R. (2002), "Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (4), 2281-2286
- Re, F. and Strominger, J.L. (2001), "Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells", *J Biol Chem*, 276 (40), 37692-37699
- Redecke, V., Hacker, H., Datta, S.K., Fermin, A., Pitha, P.M., Broide, D.H. and Raz, E. (2004), "Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma", *J Immunol*, 172 (5), 2739-2743
- Redondo, M., Villar, E., Torres-Munoz, J., Tellez, T., Morell, M. and Petito, C.K. (2000), "Overexpression of clusterin in human breast carcinoma", *Am J Pathol*, 157 (2), 393-399
- Reed, R.C., Berwin, B., Baker, J.P. and Nicchitta, C.V. (2003), "GRP94/gp96 elicits ERK activation in murine macrophages: A role for endotoxin contamination in NF-kappa B activation and nitric oxide production", *J Biol Chem*, 278 (34), 31853-31860
- Reilly, C.F. (1990), "Rat vascular smooth muscle cells immortalized with SV40 large T antigen possess defined smooth muscle cell characteristics including growth inhibition by heparin", *J Cell Physiol*, 142 (2), 342-351
- Rhoads, J.M., Argenzio, R.A., Chen, W., Rippe, R.A., Westwick, J.K., Cox, A.D., Berschneider, H.M. and Brenner, D.A. (1997), "L-glutamine stimulates intestinal cell proliferation and activates mitogen-activated protein kinases", *Am J Physiol*, 272 (5 Pt 1), G943-953
- Rhoads, J.M., Argenzio, R.A., Chen, W., Graves, L.M., Licato, L.L., Blikslager, A.T., Smith, J., Gatzky, J. and Brenner, D.A. (2000), "Glutamine metabolism stimulates intestinal cell MAPKs by a cAMP-inhibitable, Raf-independent mechanism", *Gastroenterology*, 118 (1), 90-100
- Ricupero, D.A., Rishikof, D.C., Kuang, P.P., Poliks, C.F. and Goldstein, R.H. (1999), "Regulation of connective tissue growth factor expression by prostaglandin E(2)", *Am J Physiol*, 277 (6 Pt 1), L1165-1171
- Rifkin, I.R., Leadbetter, E.A., Busconi, L., Viglianti, G. and Marshak-Rothstein, A. (2005), "Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease", *Immunol Rev*, 204, 27-42
- Rishikof, D.C., Ricupero, D.A., Kuang, P.P., Liu, H. and Goldstein, R.H. (2002), "Interleukin-4 regulates connective tissue growth factor expression in human lung fibroblasts", *J Cell Biochem*, 85 (3), 496-504
- Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R.A. and Bazan, J.F. (1998), "A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (2), 588-593
- Rosemblit, N. and Chen, C.L. (1994), "Regulators for the rat clusterin gene: DNA methylation and cis-acting regulatory elements", *J Mol Endocrinol*, 13 (1), 69-76
- Rosemblit, N., Feng, Z.M. and Chen, C.L. (1996), "Analysis of the rat clusterin gene promoter and cyclic AMP-regulated mRNA stability in testicular cells", *J Mol Endocrinol*, 16 (3), 287-296
- Rosenberg, M.E. and Paller, M.S. (1991), "Differential gene expression in the recovery from ischemic renal injury", *Kidney Int*, 39 (6), 1156-1161
- Rosenberg, M.E. and Silkensen, J. (1995), "Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations", *Int J Biochem Cell Biol*, 27 (7), 633-645
- Rosenberg, M.E., Girton, R., Finkel, D., Chmielewski, D., Barrie, A., 3rd, Witte, D.P., Zhu, G., Bissler, J.J., Harmony, J.A. and Aronow, B.J. (2002), "Apolipoprotein J/clusterin prevents a progressive glomerulopathy of aging", *Mol Cell Biol*, 22 (6), 1893-1902
- Rudd, B.D., Burstein, E., Duckett, C.S., Li, X. and Lukacs, N.W. (2005), "Differential role for TLR3 in respiratory syncytial virus-induced chemokine expression", *J Virol*, 79 (6), 3350-3357
- Sacre, S.M., Andreaskos, E., Feldmann, M. and Foxwell, B.M. (2004), "Endotoxin signaling in human macrophages: signaling via an alternate mechanism", *J Endotoxin Res*, 10 (6), 445-452
- Sakahira, H., Enari, M. and Nagata, S. (1998), "Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis", *Nature*, 391 (6662), 96-99
- Sanfeliu, A. and Stephanopoulos, G. (1999), "Effect of glutamine limitation on the death of attached Chinese hamster ovary cells", *Biotechnol Bioeng*, 64 (1), 46-53
- Santilli, G., Aronow, B.J. and Sala, A. (2003), "Essential requirement of apolipoprotein J (clusterin) signaling for IkkappaB expression and regulation of NF-kappaB activity", *J Biol Chem*, 278 (40), 38214-38219

- Sasaki, K., Doh-ura, K., Ironside, J.W. and Iwaki, T. (2002), "Increased clusterin (apolipoprotein J) expression in human and mouse brains infected with transmissible spongiform encephalopathies", *Acta Neuropathol (Berl)*, 103 (3), 199-208
- Sasu, S., LaVerda, D., Qureshi, N., Golenbock, D.T. and Beasley, D. (2001), "Chlamydia pneumoniae and chlamydial heat shock protein 60 stimulate proliferation of human vascular smooth muscle cells via toll-like receptor 4 and p44/p42 mitogen-activated protein kinase activation", *Circ Res*, 89 (3), 244-250
- Sato, S., Sugiyama, M., Yamamoto, M., Watanabe, Y., Kawai, T., Takeda, K. and Akira, S. (2003), "Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling", *J Immunol*, 171 (8), 4304-4310
- Saunders, J.R., Aminian, A., McRae, J.L., O'Farrell, K.A., Adam, W.R. and Murphy, B.F. (1994), "Clusterin depletion enhances immune glomerular injury in the isolated perfused kidney", *Kidney Int*, 45 (3), 817-827
- Saura, J., Petegnief, V., Wu, X., Liang, Y. and Paul, S.M. (2003), "Microglial apolipoprotein E and astroglial apolipoprotein J expression in vitro: opposite effects of lipopolysaccharide", *J Neurochem*, 85 (6), 1455-1467
- Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C. and Haslett, C. (2002), "A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses", *Nat Rev Immunol*, 2 (12), 965-975
- Sawczuk, I.S., Hoke, G., Olsson, C.A., Connor, J. and Buttyan, R. (1989), "Gene expression in response to acute unilateral ureteral obstruction", *Kidney Int*, 35 (6), 1315-1319
- Scaffidi, P., Misteli, T. and Bianchi, M.E. (2002), "Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation", *Nature*, 418 (6894), 191-195
- Scaloni, A., Jones, W., Pospischil, M., Sassa, S., Schneewind, O., Popowicz, A.M., Bossa, F., Graziano, S.L. and Manning, J.M. (1992), "Deficiency of acylpeptide hydrolase in small-cell lung carcinoma cell lines", *J Lab Clin Med*, 120 (4), 546-552
- Scaloni, A., Barra, D., Jones, W.M. and Manning, J.M. (1994), "Human acylpeptide hydrolase: Studies on its thiol groups and mechanism of action", *J Biol Chem*, 269 (21), 15076-15084
- Schaefer, T.M., Desouza, K., Fahey, J.V., Beagley, K.W. and Wira, C.R. (2004), "Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated cytokine/chemokine production by human uterine epithelial cells", *Immunology*, 112 (3), 428-436
- Schaefer, L., Babelova, A., Kiss, E., Hausser, H.J., Baliova, M., Krzyzankova, M., Marsche, G., Young, M.F., Mihalik, D., Gotte, M., Malle, E., Schaefer, R.M. and Grone, H.J. (2005), "The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages", *J Clin Invest*, 115 (8), 2223-2233
- Scherer, W.F. and Hoogasian, A.F. (1954), "Preservation at subzero temperatures of mouse fibroblasts (strain L) and human epithelial cells (strain HeLa)", *Proc Soc Exp Biol Med*, 87 (2), 480-487
- Schmidt, K.N., Leung, B., Kwong, M., Zarembek, K.A., Satyal, S., Navas, T.A., Wang, F. and Godowski, P.J. (2004), "APC-independent activation of NK cells by the Toll-like receptor 3 agonist double-stranded RNA", *J Immunol*, 172 (1), 138-143
- Schonberger, O.L. and Tschesche, H. (1981), "N-Acetylalanine aminopeptidase, a new enzyme from human erythrocytes", *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 362 (7), 865-873
- Schulz, O., Diebold, S.S., Chen, M., Naslund, T.I., Nolte, M.A., Alexopoulou, L., Azuma, Y.T., Flavell, R.A., Liljestrom, P. and Reis e Sousa, C. (2005), "Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells", *Nature*, 433 (7028), 887-892
- Schwarz, K., Storni, T., Manolova, V., Didierlaurent, A., Sirard, J.C., Rothlisberger, P. and Bachmann, M.F. (2003), "Role of Toll-like receptors in costimulating cytotoxic T cell responses", *Eur J Immunol*, 33 (6), 1465-1470
- Schwochau, G.B., Nath, K.A. and Rosenberg, M.E. (1998), "Clusterin protects against oxidative stress in vitro through aggregative and nonaggregative properties", *Kidney Int*, 53 (6), 1647-1653
- Sciavolino, P.J., Lee, T.H. and Vilcek, J. (1994), "Interferon-beta induces metalloproteinase mRNA expression in human fibroblasts: Role of activator protein-1", *J Biol Chem*, 269 (34), 21627-21634
- Sen, G.C. and Sarkar, S.N. (2005), "Transcriptional signaling by double-stranded RNA: role of TLR3", *Cytokine Growth Factor Rev*, 16 (1), 1-14
- Sensibar, J.A., Sutkowski, D.M., Raffo, A., Buttyan, R., Griswold, M.D., Sylvester, S.R., Kozlowski, J.M. and Lee, C. (1995), "Prevention of cell death induced by tumor necrosis factor alpha in LNCaP cells by overexpression of sulfated glycoprotein-2 (clusterin)", *Cancer Res*, 55 (11), 2431-2437
- Senthilkumar, R. and Sharma, K.K. (2002), "Effect of chaotropic agents on the structure-function of recombinant acylpeptide hydrolase", *J Protein Chem*, 21 (5), 323-332
- Sharma, K.K. and Ortwerth, B.J. (1993), "Bovine lens acylpeptide hydrolase: Purification and characterization of a tetrameric enzyme resistant to urea denaturation and proteolytic inactivation", *Eur J Biochem*, 216 (2), 631-637
- Sharma, S., tenOever, B.R., Grandvaux, N., Zhou, G.P., Lin, R. and Hiscott, J. (2003), "Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway", *Science*, 300 (5622), 1148-1151
- Shi, Y., Evans, J.E. and Rock, K.L. (2003), "Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells", *Nature*, 425 (6957), 516-521
- Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K. and Kimoto, M. (1999), "MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4", *J Exp Med*, 189 (11), 1777-1782
- Shimizu, K., Fujino, T., Ando, K., Hayakawa, M., Yasuda, H. and Kikugawa, K. (2003), "Overexpression of oxidized protein hydrolase protects COS-7 cells from oxidative stress-induced inhibition of cell growth and survival", *Biochem Biophys Res Commun*, 304 (4), 766-771

Literaturverzeichnis

- Shimizu, K., Kiuchi, Y., Ando, K., Hayakawa, M. and Kikugawa, K. (2004), "Coordination of oxidized protein hydrolase and the proteasome in the clearance of cytotoxic denatured proteins", *Biochem Biophys Res Commun*, 324 (1), 140-146
- Shimo, T., Nakanishi, T., Nishida, T., Asano, M., Kanyama, M., Kuboki, T., Tamatani, T., Tezuka, K., Takemura, M., Matsumura, T. and Takigawa, M. (1999), "Connective tissue growth factor induces the proliferation, migration, and tube formation of vascular endothelial cells in vitro, and angiogenesis in vivo", *J Biochem (Tokyo)*, 126 (1), 137-145
- Shi-wen, X., Pennington, D., Holmes, A., Leask, A., Bradham, D., Beauchamp, J.R., Fonseca, C., du Bois, R.M., Martin, G.R., Black, C.M. and Abraham, D.J. (2000), "Autocrine overexpression of CTGF maintains fibrosis: RDA analysis of fibrosis genes in systemic sclerosis", *Exp Cell Res*, 259 (1), 213-224
- Shishido, T., Nozaki, N., Yamaguchi, S., Shibata, Y., Nitobe, J., Miyamoto, T., Takahashi, H., Arimoto, T., Maeda, K., Yamakawa, M., Takeuchi, O., Akira, S., Takeishi, Y. and Kubota, I. (2003), "Toll-like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction", *Circulation*, 108 (23), 2905-2910
- Silkensen, J.R., Agarwal, A., Nath, K.A., Manivel, J.C. and Rosenberg, M.E. (1997), "Temporal induction of clusterin in cisplatin nephrotoxicity", *J Am Soc Nephrol*, 8 (2), 302-305
- Silkensen, J.R., Hirsch, A.T., Lunzer, M.M., Chmielewski, D., Manivel, J.C., Muellerleile, M.R. and Rosenberg, M.E. (1998), "Temporal induction of clusterin in the peri-infarct zone after experimental myocardial infarction in the rat", *J Lab Clin Med*, 131 (1), 28-35
- Singh-Jasuja, H., Scherer, H.U., Hilf, N., Arnold-Schild, D., Rammensee, H.G., Toes, R.E. and Schild, H. (2000), "The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor", *Eur J Immunol*, 30 (8), 2211-2215
- Sintich, S.M., Steinberg, J., Kozlowski, J.M., Lee, C., Pruden, S., Sayeed, S. and Sensibar, J.A. (1999), "Cytotoxic sensitivity to tumor necrosis factor-alpha in PC3 and LNCaP prostatic cancer cells is regulated by extracellular levels of SGP-2 (clusterin)", *Prostate*, 39 (2), 87-93
- Sivori, S., Falco, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Vitale, M., Moretta, L. and Moretta, A. (2004), "CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (27), 10116-10121
- Slack, J.L., Schooley, K., Bonnert, T.P., Mitcham, J.L., Qvarnstrom, E.E., Sims, J.E. and Dower, S.K. (2000), "Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways", *J Biol Chem*, 275 (7), 4670-4678
- Smiley, S.T., King, J.A. and Hancock, W.W. (2001), "Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4", *J Immunol*, 167 (5), 2887-2894
- Smith, K.D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M.A., Barrett, S.L., Cookson, B.T. and Aderem, A. (2003), "Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility", *Nat Immunol*, 4 (12), 1247-1253
- Sokolik, C.W., Liang, T.C. and Wold, F. (1994), "Studies on the specificity of acetylaminocyl-peptide hydrolase", *Protein Sci*, 3 (1), 126-131
- Somersan, S., Larsson, M., Fonteneau, J.F., Basu, S., Srivastava, P. and Bhardwaj, N. (2001), "Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells", *J Immunol*, 167 (9), 4844-4852
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H. and Schreiber, R.D. (1998), "How cells respond to interferons", *Annu Rev Biochem*, 67, 227-264
- Steinberg, J., Oyasu, R., Lang, S., Sintich, S., Rademaker, A., Lee, C., Kozlowski, J.M. and Sensibar, J.A. (1997), "Intracellular levels of SGP-2 (Clusterin) correlate with tumor grade in prostate cancer", *Clin Cancer Res*, 3 (10), 1707-1711
- Stratton, R., Shiwen, X., Martini, G., Holmes, A., Leask, A., Haberberger, T., Martin, G.R., Black, C.M. and Abraham, D. (2001), "Iloprost suppresses connective tissue growth factor production in fibroblasts and in the skin of scleroderma patients", *J Clin Invest*, 108 (2), 241-250
- Stratton, R., Rajkumar, V., Ponticos, M., Nichols, B., Shiwen, X., Black, C.M., Abraham, D.J. and Leask, A. (2002), "Prostacyclin derivatives prevent the fibrotic response to TGF-beta by inhibiting the Ras/MEK/ERK pathway", *FASEB J*, 16 (14), 1949-1951
- Stuart, W.D., Krol, B., Jenkins, S.H. and Harmony, J.A. (1992), "Structure and stability of apolipoprotein J-containing high-density lipoproteins", *Biochemistry*, 31 (36), 8552-8559
- Swertfeger, D.K., Witte, D.P., Stuart, W.D., Rockman, H.A. and Harmony, J.A. (1996), "Apolipoprotein J/clusterin induction in myocarditis: A localized response gene to myocardial injury", *Am J Pathol*, 148 (6), 1971-1983
- Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., Alexopoulou, L., Flavell, R.A. and Beutler, B. (2004), "Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (10), 3516-3521
- Takaoka, A., Hayakawa, S., Yanai, H., Stoiber, D., Negishi, H., Kikuchi, H., Sasaki, S., Imai, K., Shibue, T., Honda, K. and Taniguchi, T. (2003), "Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence", *Nature*, 424 (6948), 516-523
- Takaoka, A. and Taniguchi, T. (2003), "New aspects of IFN-alpha/beta signalling in immunity, oncogenesis and bone metabolism", *Cancer Sci*, 94 (5), 405-411
- Takeda, A. and Samejima, T. (1977), "On the specific association of porcine erythrocyte catalase caused by formation of disulfide cross-links", *Biochim Biophys Acta*, 481 (2), 420-430
- Takeda, K. and Akira, S. (2005), "Toll-like receptors in innate immunity", *Int Immunol*, 17 (1), 1-14
- Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S. (2003), "Toll-like receptors", *Annu Rev Immunol*, 21, 335-376

- Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P.F., Morr, M., Radolf, J.D., Zychlinsky, A., Takeda, K. and Akira, S. (2001), "Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6", *Int Immunol*, 13 (7), 933-940
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R.L. and Akira, S. (2002), "Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins", *J Immunol*, 169 (1), 10-14
- Tanabe, M., Kurita-Taniguchi, M., Takeuchi, K., Takeda, M., Ayata, M., Ogura, H., Matsumoto, M. and Seya, T. (2003), "Mechanism of up-regulation of human Toll-like receptor 3 secondary to infection of measles virus-attenuated strains", *Biochem Biophys Res Commun*, 311 (1), 39-48
- Taniguchi, T. and Takaoka, A. (2002), "The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors", *Curr Opin Immunol*, 14 (1), 111-116
- Tapiero, H., Mathe, G., Couvreur, P. and Tew, K.D. (2002), "II. Glutamine and glutamate", *Biomed Pharmacother*, 56 (9), 446-457
- Tapping, R.I., Akashi, S., Miyake, K., Godowski, P.J. and Tobias, P.S. (2000), "Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is a signaling receptor for Escherichia and Salmonella lipopolysaccharides", *J Immunol*, 165 (10), 5780-5787
- Taylor, K.R., Trowbridge, J.M., Rudisill, J.A., Termeer, C.C., Simon, J.C. and Gallo, R.L. (2004), "Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4", *J Biol Chem*, 279 (17), 17079-17084
- Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J., Fieber, C., Voith, U., Ahrens, T., Miyake, K., Freudenberg, M., Galanos, C. and Simon, J.C. (2002), "Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4", *J Exp Med*, 195 (1), 99-111
- Thamotharan, M., Bawani, S.Z., Zhou, X. and Adibi, S.A. (1998), "Mechanism of dipeptide stimulation of its own transport in a human intestinal cell line", *Proc Assoc Am Physicians*, 110 (4), 361-368
- Tinto, A., Gabernet, C., Vives, J., Prats, E., Cairo, J.J., Cornudella, L. and Godia, F. (2002), "The protection of hybridoma cells from apoptosis by caspase inhibition allows culture recovery when exposed to non-inducing conditions", *J Biotechnol*, 95 (3), 205-214
- Todryk, S., Melcher, A.A., Hardwick, N., Linardakis, E., Bateman, A., Colombo, M.P., Stoppacciaro, A. and Vile, R.G. (1999), "Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake", *J Immunol*, 163 (3), 1398-1408
- Toshchakov, V., Jones, B.W., Perera, P.Y., Thomas, K., Cody, M.J., Zhang, S., Williams, B.R., Major, J., Hamilton, T.A., Fenton, M.J. and Vogel, S.N. (2002), "TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages", *Nat Immunol*, 3 (4), 392-398
- Tritsch, G.L. and Moore, G.E. (1962), "Spontaneous decomposition of glutamine in cell culture media", *Exp Cell Res*, 28, 360-364
- Trougakos, I.P., So, A., Jansen, B., Gleave, M.E. and Gonos, E.S. (2004), "Silencing expression of the clusterin/apolipoprotein j gene in human cancer cells using small interfering RNA induces spontaneous apoptosis, reduced growth ability, and cell sensitization to genotoxic and oxidative stress", *Cancer Res*, 64 (5), 1834-1842
- Tsan, M.F. and Gao, B. (2004), "Cytokine function of heat shock proteins", *Am J Physiol Cell Physiol*, 286 (4), C739-744
- Tschopp, J., Chonn, A., Hertig, S. and French, L.E. (1993), "Clusterin, the human apolipoprotein and complement inhibitor, binds to complement C7, C8 beta, and the b domain of C9", *J Immunol*, 151 (4), 2159-2165
- Tsuboi, N., Yoshikai, Y., Matsuo, S., Kikuchi, T., Iwami, K., Nagai, Y., Takeuchi, O., Akira, S. and Matsuguchi, T. (2002), "Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells", *J Immunol*, 169 (4), 2026-2033
- Tsunasawa, S., Narita, K. and Ogata, K. (1975), "Purification and properties of acylamino acid-releasing enzyme from rat liver", *J Biochem (Tokyo)*, 77 (1?), 89-102
- Tsuruta, J.K., Wong, K., Fritz, I.B. and Griswold, M.D. (1990), "Structural analysis of sulphated glycoprotein 2 from amino acid sequence: Relationship to clusterin and serum protein 40,40", *Biochem J*, 268 (3), 571-578
- Uematsu, S., Sato, S., Yamamoto, M., Hirotsu, T., Kato, H., Takeshita, F., Matsuda, M., Coban, C., Ishii, K.J., Kawai, T., Takeuchi, O. and Akira, S. (2005), "Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- α induction", *J Exp Med*, 201 (6), 915-923
- Ujike, K., Shinji, T., Hirasaki, S., Shiraha, H., Nakamura, M., Tsuji, T. and Koide, N. (2000), "Kinetics of expression of connective tissue growth factor gene during liver regeneration after partial hepatectomy and D-galactosamine-induced liver injury in rats", *Biochem Biophys Res Commun*, 277 (2), 448-454
- Urban, J., Parczyk, K., Leutz, A., Kayne, M. and Kondor-Koch, C. (1987), "Constitutive apical secretion of an 80-kD sulfated glycoprotein complex in the polarized epithelial Madin-Darby canine kidney cell line", *J Cell Biol*, 105 (6 Pt 1), 2735-2743
- Urbich, C., Fritzenwanger, M., Zeiher, A.M. and Dimmeler, S. (2000), "Laminar shear stress upregulates the complement-inhibitory protein clusterin: a novel potent defense mechanism against complement-induced endothelial cell activation", *Circulation*, 101 (4), 352-355
- Vabulas, R.M., Ahmad-Nejad, P., da Costa, C., Miethke, T., Kirschning, C.J., Hacker, H. and Wagner, H. (2001), "Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells", *J Biol Chem*, 276 (33), 31332-31339
- Vabulas, R.M., Ahmad-Nejad, P., Ghose, S., Kirschning, C.J., Issels, R.D. and Wagner, H. (2002a), "HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway", *J Biol Chem*, 277 (17), 15107-15112
- Vabulas, R.M., Braedel, S., Hilf, N., Singh-Jasuja, H., Herter, S., Ahmad-Nejad, P., Kirschning, C.J., Da Costa, C., Rammensee, H.G., Wagner, H. and Schild, H. (2002b), "The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway", *J Biol Chem*, 277 (23), 20847-20853

Literaturverzeichnis

- Vabulas, R.M., Wagner, H. and Schild, H. (2002c), "Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors", *Curr Top Microbiol Immunol*, 270), 169-184
- Väkevä, A., Laurila, P. and Meri, S. (1993), "Co-deposition of clusterin with the complement membrane attack complex in myocardial infarction", *Immunology*, 80 (2), 177-182
- Van Beek, J., Chan, P., Bernardin, M., Petit, E., MacKenzie, E.T. and Fontaine, M. (2000), "Glial responses, clusterin, and complement in permanent focal cerebral ischemia in the mouse", *Glia*, 31 (1), 39-50
- van Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B. and Reutelingsperger, C.P. (1998), "Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure", *Cytometry*, 31 (1), 1-9
- Van Lenten, B.J., Wagner, A.C., Navab, M. and Fogelman, A.M. (2001a), "Oxidized phospholipids induce changes in hepatic paraoxonase and ApoJ but not monocyte chemoattractant protein-1 via interleukin-6", *J Biol Chem*, 276 (3), 1923-1929
- Van Lenten, B.J., Wagner, A.C., Nayak, D.P., Hama, S., Navab, M. and Fogelman, A.M. (2001b), "High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory properties during acute influenza a infection", *Circulation*, 103 (18), 2283-2288
- Van Roy, F.M., Messiaen, L., Liebaut, G., Gao, J., Dragonetti, C.H., Fiers, W.C. and Mareel, M.M. (1986), "Invasiveness and metastatic capability of rat fibroblast-like cells before and after transfection with immortalizing and transforming genes", *Cancer Res*, 46 (9), 4787-4795
- Viard, I., Wehrli, P., Jornot, L., Bullani, R., Vechietti, J.L., Schifferli, J.A., Tschopp, J. and French, L.E. (1999), "Clusterin gene expression mediates resistance to apoptotic cell death induced by heat shock and oxidative stress", *J Invest Dermatol*, 112 (3), 290-296
- Viglianti, G.A., Lau, C.M., Hanley, T.M., Miko, B.A., Shlomchik, M.J. and Marshak-Rothstein, A. (2003), "Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA", *Immunity*, 19 (6), 837-847
- Villacorta, L., Graca-Souza, A.V., Ricciarelli, R., Zingg, J.M. and Azzi, A. (2003), "Alpha-tocopherol induces expression of connective tissue growth factor and antagonizes tumor necrosis factor-alpha-mediated downregulation in human smooth muscle cells", *Circ Res*, 92 (1), 104-110
- Vink, A., de Kleijn, D.P. and Pasterkamp, G. (2004), "Functional role for toll-like receptors in atherosclerosis and arterial remodeling", *Curr Opin Lipidol*, 15 (5), 515-521
- Voll, R.E., Herrmann, M., Roth, E.A., Stach, C., Kalden, J.R. and Girkontaite, I. (1997), "Immunosuppressive effects of apoptotic cells", *Nature*, 390 (6658), 350-351
- Vora, P., Youdim, A., Thomas, L.S., Fukata, M., Tesfay, S.Y., Lukasek, K., Michelsen, K.S., Wada, A., Hirayama, T., Arditi, M. and Abreu, M.T. (2004), "Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells", *J Immunol*, 173 (9), 5398-5405
- Wagner, M., Morgans, C. and Koch-Brandt, C. (1995), "The oligosaccharides have an essential but indirect role in sorting gp80 (clusterin, TRPM-2) to the apical surface of MDCK cells", *Eur J Cell Biol*, 67 (1), 84-88
- Walker, D., Thwaites, D.T., Simmons, N.L., Gilbert, H.J. and Hirst, B.H. (1998), "Substrate upregulation of the human small intestinal peptide transporter, hPepT1", *J Physiol*, 507 (Pt 3), 697-706
- Wallin, R.P., Lundqvist, A., More, S.H., von Bonin, A., Kiessling, R. and Ljunggren, H.G. (2002), "Heat-shock proteins as activators of the innate immune system", *Trends Immunol*, 23 (3), 130-135
- Walton, M., Young, D., Sirimanne, E., Dodd, J., Christie, D., Williams, C., Gluckman, P. and Dragunow, M. (1996), "Induction of clusterin in the immature brain following a hypoxic-ischemic injury", *Brain Res Mol Brain Res*, 39 (1-2), 137-152
- Wang, M., Qin, X., Mudgett, J.S., Ferguson, T.A., Senior, R.M. and Welgus, H.G. (1999), "Matrix metalloproteinase deficiencies affect contact hypersensitivity: stromelysin-1 deficiency prevents the response and gelatinase B deficiency prolongs the response", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (12), 6885-6889
- Wang, X., Zhang, Z., Louboutin, J.P., Moser, C., Weiner, D.J. and Wilson, J.M. (2003), "Airway epithelia regulate expression of human beta-defensin 2 through Toll-like receptor 2", *FASEB J*, 17 (12), 1727-1729
- Warner, R.L., Bhagavathula, N., Nerusu, K.C., Lateef, H., Younkin, E., Johnson, K.J. and Varani, J. (2004), "Matrix metalloproteinases in acute inflammation: induction of MMP-3 and MMP-9 in fibroblasts and epithelial cells following exposure to pro-inflammatory mediators in vitro", *Exp Mol Pathol*, 76 (3), 189-195
- Watanabe, N., Sakakibara, J., Hovanessian, A.G., Taniguchi, T. and Fujita, T. (1991), "Activation of IFN-beta element by IRF-1 requires a posttranslational event in addition to IRF-1 synthesis", *Nucleic Acids Res*, 19 (16), 4421-4428
- Watts, M.J., Dankert, J.R. and Morgan, E.P. (1990), "Isolation and characterization of a membrane-attack-complex-inhibiting protein present in human serum and other biological fluids", *Biochem J*, 265 (2), 471-477
- Wehrli, P., Charnay, Y., Vallet, P., Zhu, G., Harmony, J., Aronow, B., Tschopp, J., Bouras, C., Viard-Leveugle, I., French, L.E. and Giannakopoulos, P. (2001), "Inhibition of post-ischemic brain injury by clusterin overexpression", *Nat Med*, 7 (9), 977-979
- Wellmann, A., Thieblemont, C., Pittaluga, S., Sakai, A., Jaffe, E.S., Siebert, P. and Raffeld, M. (2000), "Detection of differentially expressed genes in lymphomas using cDNA arrays: identification of clusterin as a new diagnostic marker for anaplastic large-cell lymphomas", *Blood*, 96 (2), 398-404
- Wen, L., Peng, J., Li, Z. and Wong, F.S. (2004), "The effect of innate immunity on autoimmune diabetes and the expression of Toll-like receptors on pancreatic islets", *J Immunol*, 172 (5), 3173-3180
- Weston, B.S., Wahab, N.A. and Mason, R.M. (2003), "CTGF mediates TGF-beta-induced fibronectin matrix deposition by upregulating active alpha5beta1 integrin in human mesangial cells", *J Am Soc Nephrol*, 14 (3), 601-610
- Whitmore, M.M., DeVeer, M.J., Edling, A., Oates, R.K., Simons, B., Lindner, D. and Williams, B.R. (2004), "Synergistic activation of innate immunity by double-stranded RNA and CpG DNA promotes enhanced antitumor activity", *Cancer Res*, 64 (16), 5850-5860

- Wiessner, C., Back, T., Bonnekoh, P., Kohno, K., Gehrmann, J. and Hossmann, K.A. (1993), "Sulfated glycoprotein-2 mRNA in the rat brain following transient forebrain ischemia", *Brain Res Mol Brain Res*, 20 (4), 345-352
- Wiggins, A.K., Shen, P.J. and Gundlach, A.L. (2003), "Delayed, but prolonged increases in astrocytic clusterin (ApoJ) mRNA expression following acute cortical spreading depression in the rat: evidence for a role of clusterin in ischemic tolerance", *Brain Res Mol Brain Res*, 114 (1), 20-30
- Wilhelm, S.M., Collier, I.E., Kronberger, A., Eisen, A.Z., Marmer, B.L., Grant, G.A., Bauer, E.A. and Goldberg, G.I. (1987), "Human skin fibroblast stromelysin: structure, glycosylation, substrate specificity, and differential expression in normal and tumorigenic cells", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84 (19), 6725-6729
- Willnow, T.E. and Herz, J. (1994), "Genetic deficiency in low density lipoprotein receptor-related protein confers cellular resistance to Pseudomonas exotoxin A. Evidence that this protein is required for uptake and degradation of multiple ligands", *J Cell Sci*, 107 (Pt 3), 719-726
- Wilson, M.R. and Easterbrook-Smith, S.B. (1992), "Clusterin binds by a multivalent mechanism to the Fc and Fab regions of IgG", *Biochim Biophys Acta*, 1159 (3), 319-326
- Wilson, M.R. and Easterbrook-Smith, S.B. (2000), "Clusterin is a secreted mammalian chaperone", *Trends Biochem Sci*, 25 (3), 95-98
- Witek-Zawada, B. and Koj, A. (2003), "Regulation of expression of stromelysin-1 by proinflammatory cytokines in mouse brain astrocytes", *J Physiol Pharmacol*, 54 (4), 489-496
- Witheiler, J. and Wilson, D.B. (1972), "The purification and characterization of a novel peptidase from sheep red cells", *J Biol Chem*, 247 (7), 2217-2221
- Witzgall, R., Brown, D., Schwarz, C. and Bonventre, J.V. (1994), "Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells", *J Clin Invest*, 93 (5), 2175-2188
- Wong, P., Pineault, J., Lakins, J., Taillefer, D., Leger, J., Wang, C. and Tenniswood, M. (1993), "Genomic organization and expression of the rat TRPM-2 (clusterin) gene, a gene implicated in apoptosis", *J Biol Chem*, 268 (7), 5021-5031
- Wong, P., Taillefer, D., Lakins, J., Pineault, J., Chader, G. and Tenniswood, M. (1994), "Molecular characterization of human TRPM-2/clusterin, a gene associated with sperm maturation, apoptosis and neurodegeneration", *Eur J Biochem*, 221 (3), 917-925
- Wu, E., Brosnan, C.F. and Raine, C.S. (1993), "SP-40,40 immunoreactivity in inflammatory CNS lesions displaying astrocyte/oligodendrocyte interactions", *J Neuropathol Exp Neurol*, 52 (2), 129-134
- Xie, M.J., Motoo, Y., Su, S.B. and Sawabu, N. (2001), "Expression of clusterin in pancreatic acinar cell injuries in vivo and in vitro", *Pancreas*, 22 (2), 126-134
- Xie, M.J., Motoo, Y., Su, S.B., Mouri, H., Ohtsubo, K., Matsubara, F. and Sawabu, N. (2002), "Expression of clusterin in human pancreatic cancer", *Pancreas*, 25 (3), 234-238
- Yamada, K., Hori, Y., Hanafusa, N., Okuda, T., Nagano, N., Choi-Miura, N.H., Couser, W.G., Miyata, T., Kurokawa, K., Fujita, T. and Nangaku, M. (2001), "Clusterin is up-regulated in glomerular mesangial cells in complement-mediated injury", *Kidney Int*, 59 (1), 137-146
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T., Takeda, K. and Akira, S. (2002a), "Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4", *Nature*, 420 (6913), 324-329
- Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K. and Akira, S. (2002b), "Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling", *J Immunol*, 169 (12), 6668-6672
- Yamanaka, K., Gleave, M., Muramaki, M., Hara, I. and Miyake, H. (2005a), "Enhanced radiosensitivity by inhibition of the anti-apoptotic gene clusterin using antisense oligodeoxynucleotide in a human bladder cancer model", *Oncol Rep*, 13 (5), 885-890
- Yamanaka, K., Gleave, M.E., Hara, I., Muramaki, M. and Miyake, H. (2005b), "Synergistic antitumor effect of combined use of adenoviral-mediated p53 gene transfer and antisense oligodeoxynucleotide targeting clusterin gene in an androgen-independent human prostate cancer model", *Mol Cancer Ther*, 4 (2), 187-195
- Yamashita, K., Vogel, P., Fritze, K., Back, T., Hossmann, K.A. and Wiessner, C. (1996), "Monitoring the temporal and spatial activation pattern of astrocytes in focal cerebral ischemia using in situ hybridization to GFAP mRNA: comparison with sgp-2 and hsp70 mRNA and the effect of glutamate receptor antagonists", *Brain Res*, 735 (2), 285-297
- Yang, C.R., Leskov, K., Hosley-Eberlein, K., Criswell, T., Pink, J.J., Kinsella, T.J. and Boothman, D.A. (2000), "Nuclear clusterin/XIP8, an x-ray-induced Ku70-binding protein that signals cell death", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (11), 5907-5912
- Yang, X., Coriolan, D., Schultz, K., Golenbock, D.T. and Beasley, D. (2005), "Toll-like receptor 2 mediates persistent chemokine release by Chlamydia pneumoniae-infected vascular smooth muscle cells", *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25 (11), 2308-2314
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J.F., Bannenberg, G.L., Serhan, C.N., Hayden, M.S., Hieny, S., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., Ghosh, S. and Sher, A. (2005), "TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein", *Science*, 308 (5728), 1626-1629
- Yokoi, H., Sugawara, A., Mukoyama, M., Mori, K., Makino, H., Suganami, T., Nagae, T., Yahata, K., Fujinaga, Y., Tanaka, I. and Nakao, K. (2001), "Role of connective tissue growth factor in profibrotic action of transforming growth factor-beta: a potential target for preventing renal fibrosis", *Am J Kidney Dis*, 38 (4 Suppl 1), S134-138

Literaturverzeichnis

- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S. and Fujita, T.** (2004), "The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses", *Nat Immunol*, 5 (7), 730-737
- Yoshida, T., Kurella, M., Beato, F., Min, H., Ingelfinger, J.R., Stears, R.L., Swinford, R.D., Gullans, S.R. and Tang, S.S.** (2002), "Monitoring changes in gene expression in renal ischemia-reperfusion in the rat", *Kidney Int*, 61 (5), 1646-1654
- Young, S.L., Lyddon, T.D., Jorgenson, R.L. and Misfeldt, M.L.** (2004), "Expression of Toll-like receptors in human endometrial epithelial cells and cell lines", *Am J Reprod Immunol*, 52 (1), 67-73
- Zarembek, K.A. and Godowski, P.J.** (2002), "Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines", *J Immunol*, 168 (2), 554-561
- Zetterberg, A. and Engstrom, W.** (1981), "Glutamine and the regulation of DNA replication and cell multiplication in fibroblasts", *J Cell Physiol*, 108 (3), 365-373
- Zhai, Y., Shen, X.D., O'Connell, R., Gao, F., Lassman, C., Busuttill, R.W., Cheng, G. and Kupiec-Weglinski, J.W.** (2004), "Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway", *J Immunol*, 173 (12), 7115-7119
- Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M.S., Greenblatt, M.B., Bussey, C., Flavell, R.A. and Ghosh, S.** (2004), "A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria", *Science*, 303 (5663), 1522-1526
- Zhao, Y., Azam, S. and Thorpe, R.** (2005), "Comparative studies on cellular gene regulation by HIV-1 based vectors: implications for quality control of vector production", *Gene Ther*, 12 (4), 311-319
- Zlokovic, B.V., Martel, C.L., Matsubara, E., McComb, J.G., Zheng, G., McCluskey, R.T., Frangione, B. and Ghiso, J.** (1996), "Glycoprotein 330/megalin: probable role in receptor-mediated transport of apolipoprotein J alone and in a complex with Alzheimer disease amyloid beta at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (9), 4229-4234
- Zwain, I.H., Grima, J. and Cheng, C.Y.** (1994), "Regulation of clusterin secretion and mRNA expression in astrocytes by cytokines", *Mol Cell Neurosci*, 5 (3), 229-237
- Zwain, I.H. and Amato, P.** (2001), "cAMP-induced apoptosis in granulosa cells is associated with up-regulation of P53 and bax and down-regulation of clusterin", *Endocr Res*, 27 (1-2), 233-249

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

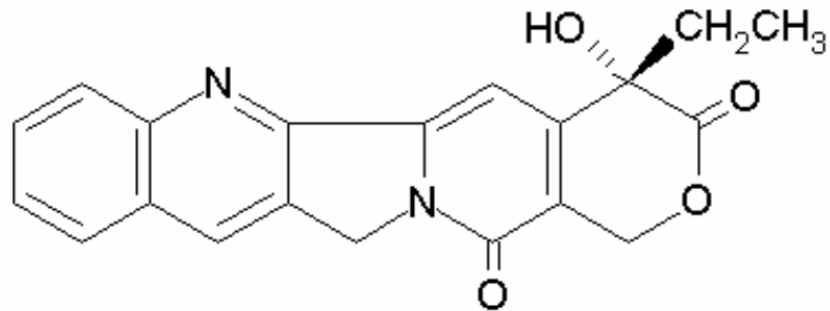
18S	ribosomale 18S-RNA
∅	Durchmesser
°C	Grad Celsius
AAF	IFN-α-activated factor
Aβ	β-Amyloid-Peptid
Abs	Absorption
ACPH	Acylpeptidhydrolase
ApoJ	Apolipoprotein J
AP-1	activator protein 1
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CD	cluster of differentiation
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA
Ci	Curie
cm	Zentimeter (10 ⁻² Meter)
cm ²	Quadratcentimeter
CpG	Desoxycytidylatphosphat-Desoxyguanylat
CTGF	connective tissue growth factor
D	Dalton
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
FKS	fetales Kälberserum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse I	Desoxyribonuklease I
dsRNA	doppelsträngige RNA
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FPLC	fast performance liquid chromatography
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
GAS	IFN-γ-activated sequence
gp	Glykoprotein
h	Stunde
HDL	high density lipoprotein
HMGB1	high mobility group box 1 protein
Hsp	Hitzeschockprotein
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
IκB	Inhibitor von NF-κB
IKK	IκB-Kinase
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
IRAK	IL-1R-assoziierte Kinase
IRF	interferon-regulatory factor
ISGF3	interferon stimulated gene factor 3
ISRE	interferon-stimulated response element
ITS	Insulin-Transferrin-Natriumselenit-Supplement
k	Kilo (10 ³)
kb	Kilobasen (10 ³ bp)
kD	Kilodalton (10 ³ D)
keV	Kiloelektronenvolt
l	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
LDL	low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
LRP	LDL-receptor-related protein
LRR	leucine-rich repeat
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
m	Milli (10 ⁻³)
M	molar (mol/l)
MAL	MyD88-adaptor like protein
MALDI-TOF	matrix-assisted-laser-desorption-ionization-time-of-flight

Abkürzungsverzeichnis

MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
μCi	Mikrocurie (10^{-6} Ci)
min	Minute
μl	Mikroliter (10^{-6} Liter)
ml	Milliliter (10^{-3} Liter)
μM	Mikromolar (10^{-6} M)
mM	Millimolar (10^{-3} M)
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA
MT-MMP	membranverankerte Matrix-Metalloproteinase
MTS	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]
MWCO	Molekulargewichtsausschlussgrenze (molecular weight cut-off)
MyD88	myeloid differentiation primary-response protein 88
NF- κB	nuclear factor κB
ng	Nanogramm (10^{-9} Gramm)
nm	Nanometer (10^{-9} Meter)
nM	Nanomolar (10^{-9} M)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pam ₃ Cys-Ser-Lys ₄	[(S)-[2,3-Bis(palmitoyloxy)-(2-RS)-propyl]-N-palmitoyl-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys ₄ -OH]
PAMP	pathogenassoziierte molekulare Muster (pathogen associated molecular pattern)
PBS ^{-/-}	Phosphat-gepufferte Salzlösung ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺
PCR	Polymerasekettenreaktion
pI	isoelektrischer Punkt
PNS	kernfreier Überstand (postnuclear supernatant)
Poly(A:U)	Polyadenosin-Polyuridin
Poly(C)	Polycytidin
Poly(dI:dC)	Polydesoxyinosin-Polydesoxycytidin
Poly(I)	Polyinosin
Poly(I:C)	Polyinosin-Polycytidin
PRR	Mustererkennungsrezeptor (pattern recognition receptor)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse A	Ribonuklease A
RT	reverse Transkription
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SSC	Standard-Salz-Citrat
STAT	signal transducers and activators of transcription
TAK1	TGF- β -aktivierte Kinase 1
TBK1	TRAF-family-member-associated NF- κB activator (TANK)-binding kinase
TGF- β	transforming growth factor- β
TIR	Toll/IL-1R
TIRAP	TIR-domain containing adaptor protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF α	tumor necrosis factor α
TRAF	TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- β
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

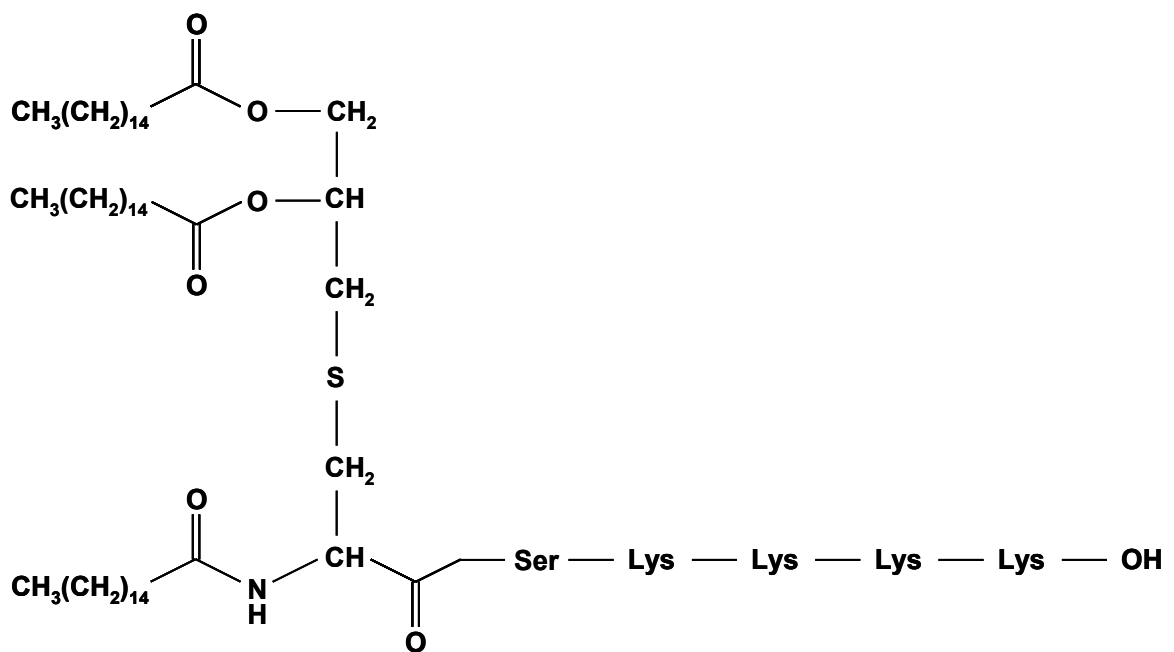
7.2 Strukturformeln verwendeter Substanzen

Camptothecin



Pam₃Cys-Ser-Lys₄ (Pam₃CSK₄)

(S)-[2,3-Bis(palmitoyloxy)-(2-RS)-propyl]-N-palmitoyl-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys₄-OH



Auszüge dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

Poster Präsentation:

Baiersdörfer, M., Schwarz, M., Bergner, O., Koch-Brandt, C. (2005), "Necrotic cells induce apolipoprotein J gene expression in vital fibroblasts and VSMCs: Possible involvement of Toll-like receptor-mediated signalling", *28th Annual Meeting of the DGZ, Heidelberg*

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation „Charakterisierung der Apolipoprotein J-Genregulation in Fibroblasten und glatten Gefäßmuskelzellen durch nekrotische Zellen und Toll-like Rezeptoren“ selbstständig verfasst und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe und dass ich noch keinen Promotionsversuch an einer anderen Universität oder in einem anderen Fachbereich unternommen habe.

Markus Baiersdörfer

Datum