

**Bedeutung und Regulation
von Apolipoprotein J
in atherosklerotischen Läsionen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades „Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Margarethe Schwarz
geboren in Ludwigshafen am Rhein
Mainz, 2006

Inhaltsverzeichnis	Seite	
1.	Einleitung	
1.1.	Atherosklerose	1
1.1.1.	Morphologie der Atherosklerose	1
1.1.2.	Lipidstoffwechsel im Blut	3
1.1.3.	Entstehung der Atherosklerose	5
1.1.4.	Die Mainzer Hypothese	8
1.1.5.	Induktion von Apoptose in atherosklerotischen Läsionen	10
1.2.	ApoJ (Clusterin)	11
1.2.1.	Struktur von ApoJ	12
1.2.2.	Expression und mögliche Funktion der sekretierten Form von ApoJ	14
1.2.2.1.	Mögliche Funktion von ApoJ in der Atherosklerose	15
1.2.2.2.	Funktion von ApoJ bei degenerativen Prozessen	16
1.3.	Die Familie der Toll-like Rezeptoren	18
1.3.1.	Struktur und Expression von Toll-like Rezeptoren	18
1.3.2.	Überblick über die Signaltransduktion von Toll-like Rezeptoren	21
1.3.3.	TLR3	23
1.4.	Zielsetzung der Arbeit	24
2.	Material und Methoden	
2.1.	Materialien	25
2.1.1.	Geräte	25
2.1.2.	Chemikalien und Kits	26
2.1.2.1.	Chemikalien	26
2.1.2.2.	Kits	26
2.1.3.	Enzyme	27
2.1.4.	Antikörper	27
2.1.5.	Primer	27
2.1.6.	Verbrauchsmaterialien	28
2.2.	Methoden	
2.2.1.	Zellkultur	29
2.2.1.1.	Zelllinien	29
2.2.1.2.	Einfrieren der Zellen für Dauerkulturen	29
2.2.1.3.	Auftauen von Zellen	30
2.2.1.4.	Zellen passagieren	30
2.2.1.5.	Bestimmung der Zellzahl	30
2.2.1.6.	Transfektion von 10A Zellen und Herstellung stabiler Klone	30
2.2.1.6.1.	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation von Bakterien	31
2.2.1.6.2.	Transiente Transfektion	32
2.2.1.6.3.	Herstellung stabiler Klone	33
2.2.1.7.	Herstellung von konditioniertem MDCK-Medium	34
2.2.1.8.	Präparation von nekrotischen Zellen und 100.000g Überstand	35
2.2.1.9.	Stimulierung der Zellen	36

2.2.1.10.	Zellvitalitätsbestimmung mittels MTS-Assay	37
2.2.1.11.	Untersuchungen zum Transfer von freien Fettsäuren	38
2.2.1.12.	Kulturmedien und Lösungen	38
2.2.2.	LDL-Präparation	39
2.2.2.1.	Präparation von LDL aus humanen Plasma	39
2.2.2.2.	Herstellung von E-LDL	40
2.2.2.3.	Cholesterinbestimmung	41
2.2.2.4.	Herstellung von E-LDL/ApoJ mittels Flotation	41
2.2.3.	Isolierung von Monozyten aus Buffy Coats	42
2.2.4.	SDS-Page	43
2.2.4.1.	Probenvorbereitung	43
2.2.4.2.	TCA-Fällung	43
2.2.4.3.	Coomassiefärbung	43
2.2.5.	Western-Blot	44
2.2.6.	Caspase-Messung	46
2.2.7.	IL-6 Elisa	47
2.2.8.	RNA-Präparation und Northern-Blot Analyse	48
2.2.8.1.	RNA-Präparation	49
2.2.8.2.	Konzentrationsbestimmung der RNA	49
2.2.8.3.	Northern-Blot-Analyse	49
2.2.8.3.1.	Herstellung des Agarosegels zur RNA-Analyse	50
2.2.8.3.2.	RNA-Probenvorbereitung	50
2.2.8.3.3.	RNA-Detektion mit Ethidiumbromid	51
2.2.8.3.4.	Kapillarblot	51
2.2.8.3.5.	Prähybridisierung	52
2.2.8.3.6.	Markierung der cDNA-Sonde und Hybridisierung	52
2.2.8.3.7.	Rehybridisierung der Membran	53
2.2.8.3.8.	Auswertung der Northern-Blots	53
3.	Ergebnisse	
3.1.	Bedeutung von ApoJ in der Atherosklerose	54
3.1.1.	Untersuchungen zur Bindung von ApoJ an LDL und enzymatisch verdautes LDL (E-LDL)	55
3.1.2.	Die Bindung von ApoJ an enzymatisch verdautes LDL verhindert die Apoptose von glatten Muskelzellen	61
3.1.2.1.	Morphologische Analyse	61
3.1.2.2.	Annexinfärbung	62
3.1.2.3.	Messung der Caspaseaktivität	64
3.1.3.	Untersuchungen zum Transfer von freien Fettsäuren in glatten Muskelzellen	65
3.1.6.	Kolokalisation von ApoJ und E-LDL in atherosklerotischen Läsionen	66
3.2.	Regulation der ApoJ-Expression durch LDL und E-LDL	67
3.3.	Regulation ApoJ-Expression durch nekrotische Zellen	70
3.4.	Induktion der ApoJ-Expression über TLR3	72
3.4.1.	Untersuchungen zum intrazellulären Signaltransduktionsweg der ApoJ-Regulation über TLR	74
3.4.2.	Inkubation von glatten Muskelzellen mit Interferon- β	80

3.4.3.	Charakterisierung der aktivierenden Komponente aus nekrotischen Zellen	82
3.4.4.	Exogene Expression von TLR3 in TLR3-negativen 10A Zellen	85
3.4.4.1.	Transiente Expression des humanen TLR3 in 10A Zellen	85
3.4.4.2.	Stabile Expression des humanen TLR3 in 10A Zellen	87
4.	Diskussion	
4.1.	Untersuchungen zur Funktion von ApoJ bei Atherosklerose	89
4.1.2.	ApoJ bindet an E-LDL	89
4.1.2.	Bindung von ApoJ an E-LDL verhindert die E-LDL induzierte Apoptose in glatten Muskelzellen	90
4.2.	Untersuchungen zur Regulation der ApoJ-Genexpression bei Atherosklerose	93
4.2.1.	Regulation durch LDL und E-LDL	94
4.2.2.	Regulation durch nekrotische Zellen	96
4.2.3.	Regulation von ApoJ über TLR3-vermittelte Signaltransduktion	97
4.2.3.1.	Charakterisierung der TLR3-aktivierenden Komponente	97
4.2.3.1.	Charakterisierung des ApoJ-induzierenden Signalweges	99
4.3.	Mögliche Funktionen von ApoJ in atherosklerotischen Läsionen	104
4.4	Bedeutung von Toll-like Rezeptoren in atherosklerotischen Läsionen	105
4.5.	Mögliche Funktion von ApoJ in entzündlichen Läsionen	107
4.5.	Zusammenfassung	110
5.	Literaturverzeichnis	111
6.	Abkürzungsverzeichnis	121

1. Einleitung

1.1. Atherosklerose

Der Begriff Atherosklerose leitet sich aus dem Griechischen ab (athära=Grütze und skleros=hart). Man versteht darunter eine krankhafte Veränderung der Arterienwand als Folge von Lipid- und Cholesterineinlagerungen sowie fibrösen Elementen in den Wänden von Arterien. Dadurch kommt es zur Bildung von so genannten atherosklerotischen Plaques. Durch Plaqueruptur und Thrombosebildungen kommt es zu Folgekrankheiten wie Schlaganfall (zerebrale Ischämie) und Herzinfarkt (Myokardinfarkt). Diese sind die häufigste Todesursache in westlichen Industrieländern. Auch in Deutschland starben im Jahr 2005 die meisten Menschen an Herz-Kreislaufkrankungen, zu denen auch der Herzinfarkt zählt (Statistisches Bundesamt Wiesbaden, 2005). Von den vielen Risikofaktoren, die zu einer Begünstigung der Atherosklerose beitragen, seien nur die Wichtigsten genannt:

- Erhöhter LDL-Cholesterinspiegel (wenn LDL > 160mg/dL)
- Geringe HDL-Mengen
- Hypertonie (Bluthochdruck)
- Diabetes Mellitus
- Bewegungsmangel
- Rauchen
- fettreiche Ernährung und Übergewicht

1.1.1. Morphologie der Atherosklerose

Wie der schematische Querschnitt in Abb. 1a zeigt, besteht eine Arterie aus drei Schichten. Im Innern befindet sich die Intima, bestehend aus einer Endothelzellschicht und einer dünnen Membran aus Kollagen, die das umliegende Gewebe vom Blutstrom abgrenzt. Danach folgt die Media, welche hauptsächlich aus glatten Muskelzellen und elastischen Faserlamellen (Fibrinogen) besteht. Die Adventitia bildet den Übergang in das umliegende Bindegewebe und besteht hauptsächlich aus Fibroblasten, aber auch Adipozyten und Mastzellen, die in ein Kollagengitter eingebettet sind.

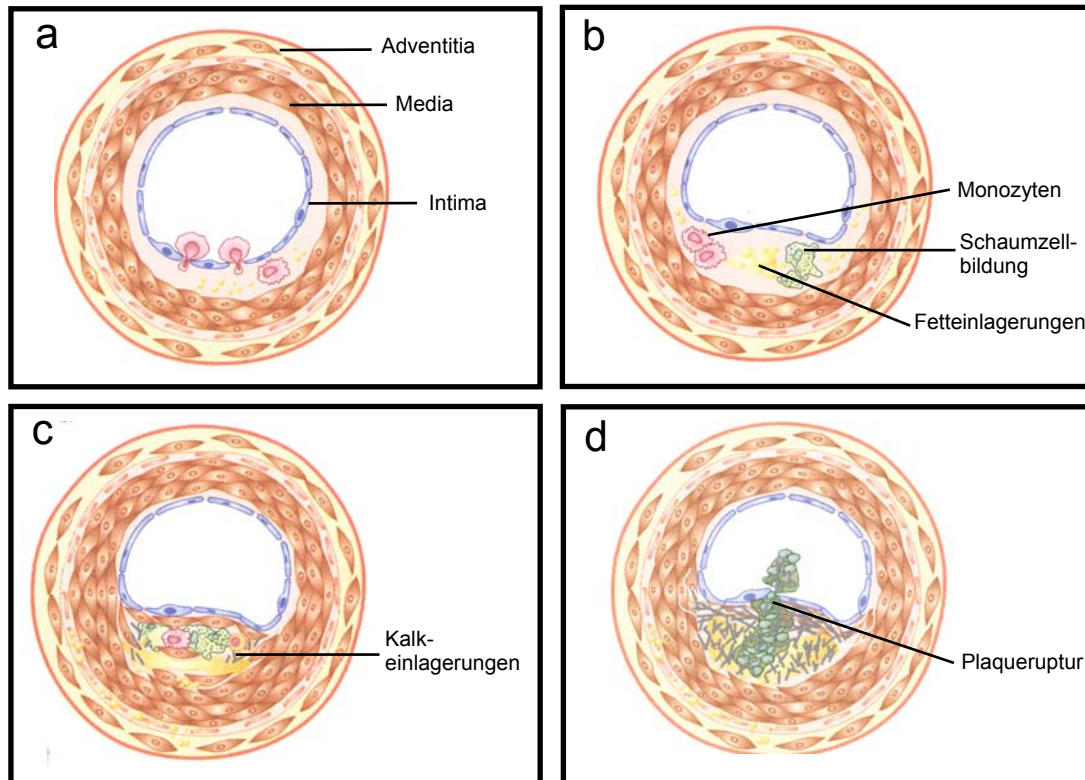


Abb. 1: Schematische Darstellung der Entstehung von Atherosklerose: In Abb. a kann man bereits eine undichte Stelle im Endothel sehen, durch welche Plasmabestandteile eingedrungen sind. Als Folge kommt es daraufhin zu einer Einwanderung von Monozyten und T-Zellen. Durch weitere Einlagerung von LDL und Schaumzellbildung kommt es zur Bildung von so genannten Fettstreifen (b). In Abb. 1c ist ein bereits verkalkter atherosklerotischer Plaque dargestellt. Wenn sich dieser als instabil herausstellt, kann es zur Plaque-ruptur kommen, bei der sich der Plaqueinhalt ins Arterienlumen ergießt (d) (nach Kreuzer und Tiefenbacher, Atherosklerose, Thieme 2003).

Werden Arterienwände durch z.B. besonders schnellen Blutstrom stark beansprucht, werden sie instabil, womit sich die Permeabilität für Plasmabestandteile erhöht. LDL (low density lipoprotein) kann aus dem Blut in die Arterienwand eindringen, wo es zu verschiedenen Modifikationen kommt (siehe 1.1.3.). Monozyten aus dem Blut wandern in die Arterienwände ein, um das LDL zu entsorgen. Sie differenzieren nach dem Eintritt in das Gewebe zu Makrophagen. Durch die unkontrollierte Aufnahme von modifiziertem LDL werden sie zu Schaumzellen. Als erste morphologische Veränderung entstehen in der Arterienwand dadurch so genannte Fettstreifen, die aus Lipiden, Makrophagen und glatten Muskelzellen bestehen (Abb. 1b). Sie sind klinisch noch nicht von Bedeutung und können bereits in der ersten Lebensdekade entstehen (Stary *et al.*, 1987). Mit dem Fortschreiten dieses Prozesses entstehen atherosklerotische Läsionen oder auch Plaques (Abb.1c). Sie sind gekennzeichnet durch einen Kern, der hauptsächlich aus Lipiden und nekrotischen Zelltrümmern besteht, einer fibrösen Kappe aus glatten Muskelzellen und Bestandteilen der

extrazellulären Matrix, welche den Plaque außen überziehen. Entscheidend ist nun, ob es sich um einen stabilen oder einen instabilen Plaque handelt. Durch eine Plaqueruptur (Abb. 1d) treten die Bestandteile des Plaques aus. So kommt es zur Aktivierung der Blutgerinnungskaskade und zur Adhäsion von Thrombozyten. Häufig kommt es so zu Arterienverschluss, was je nach Lage der Arterie zu den oben genannten Folgen führt. Ob ein Plaque stabil ist oder ruptiert, hängt maßgeblich von seiner Zusammensetzung ab. Stabile Plaques besitzen einen relativ kleinen Lipidkern im Vergleich zu einer großen Kappe. Bei instabilen Plaques ist dieses Verhältnis zu Gunsten des Lipidkerns verschoben (Libby 2002).

1.1.2. Lipidstoffwechsel im Blut

Lipide werden im Blut aufgrund ihrer Wasserunlöslichkeit verpackt in Lipoprotein-Komplexen transportiert. Diese bestehen aus einem lipidhaltigen, hydrophoben Kern und einer Hülle aus Apoproteinen. Im Blut kommen fünf verschiedene Klassen von Lipoproteinen vor, die sich in ihrer Lipid-Protein-Zusammensetzung und somit in ihrer Dichte unterscheiden. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die verschiedenen Lipoprotein- Klassen und ihre Zusammensetzung.

Lipoprotein	Chylomikronen	VLDL (very low density lipoproteins)	IDL (intermediary density lipoproteins)	LDL (low density lipoproteins)	HDL (high density lipoproteins)
Größe (Å°)	750-12,000	300-800	250-350	180-250	50-120
Dichte (g/ml)	0,93	0,93-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1-1,21
Proteinanteil [%]	1,5-2,5	5-10	15-20	20-25	40-55
Phospholipide [%]	7-9	15-20	22	15-20	20-35
Freies Cholesterin [%]	1-3	5-10	8	7-10	3-4
Cholesterinester [%]	3-5	10-15	30	35-40	12
Triacylglycerine [%]	84-89	50-60	22	7-10	3-5
Apoproteine	AI/II, E, B48, CI/II/III	B-100,CII,E	CII,E	B-100	AI/II, CI/II/III, D, E

Tab.1: Zusammensetzung der in Blut vorkommenden Lipoproteine (nach Voeth D. und Voeth J., Biochemistry 2004).

Man unterscheidet zwischen endogenem und exogenem Lipidstoffwechsel. Beim exogenen Lipidstoffwechsel werden Nahrungsfette und Cholesterin im Dünndarm resorbiert und gelangen als Chylomikronen ins Blut. Dort erfolgt eine Übertragung

der Apolipoproteine E und CII auf die Chylomikronen. ApoCII (Apolipoprotein CII) ist ein Cofaktor der Lipoprotein-Lipase, die den Abbau von Triacylglyceriden in den peripheren Blutgefäßen und andern Geweben katalysiert. Sie hydrolysiert Triacylglyceride zu freien Fettsäuren und Glycerin. Die freien Fettsäuren werden von den umliegenden Geweben direkt aufgenommen, wohingegen die Monoglyceride vom Fettgewebe, Muskelzellen und der Leber aufgenommen werden, wo sie weiter verstoffwechselt werden. Die im Blut zurückbleibenden Lipidvesikel nennt man Chylomikronen-Remnants. Über ApoA und den ApoA-Rezeptor gelangen sie wieder in die Leber, wo sie weiter abgebaut werden.

Beim endogenen Lipidstoffwechsel werden Lipide in der Leber synthetisiert und in VLDL-Partikel verpackt. Diese zeichnen sich ähnlich wie die Chylomikronen durch einen hohen Anteil an Triacylglyceriden und einen geringen Proteinanteil aus. Auch sie werden in den peripheren Blutgefäßen durch die Lipoprotein-Lipase abgebaut und es entstehen IDL-Partikel.

LDL (Abb.2) ist hauptsächlich für den Cholesterintransport von der Leber in die restlichen Gewebe verantwortlich und besitzt somit auch den höchsten Cholesterinanteil. Cholesterin und Cholesterinester werden in die Gewebe transportiert, und dienen nach Integration in die Zellmembranen der Zielorgane zur Aufrechterhaltung der Fluidität. Aber auch für viele Hormone und Vitamine dient Cholesterin als Grundbaustein. LDL wird durch die Interaktion von ApoB₁₀₀ mit dem LDL-Rezeptor in die Zellen endocytisiert (Brown 1985). Dort wird es in den Lysosomen mit Hilfe der sauren Lipase abgebaut. Der LDL-Rezeptor hingegen gelangt wieder an die Zelloberfläche. Das freie intrazelluläre Cholesterin reguliert zwei Enzyme des Cholesterinstoffwechsels: Zum einen hemmt es ab einer bestimmten Konzentration die HMG-CoA-Reduktase (3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase), das Schlüsselenzym der intrazellulären Cholesterinbiosynthese. Zum anderen erfolgt eine Aktivierung der Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase, welche Cholesterin mit freien Fettsäuren verestert und so Cholesterinester für die Speicherung in Fetttröpfchen produziert. Ein Cholesterinüberschuss in der Zelle führt zudem zu einer Herunterregulation der LDL-Rezeptorsynthese und damit ebenfalls zu einer verminderten Cholesterinaufnahme. Reguliert werden diese Gene über den Transkriptionsfaktor SREBP (sterol regulatory element binding protein), welcher die Expression des LDL-Rezeptors und anderer an der Cholesterinsynthese beteiligten Proteinen reguliert (Brown und Goldstein, 1997). So wird gewährleistet, dass die

Zellen nur so viel Cholesterin aufnehmen, wie sie verarbeiten können. Im Gegenzug dazu steigt der Cholesteringehalt im Blut an, da nur so viel Cholesterin in die Zellen aufgenommen wird, wie benötigt wird. Dies ist ein entscheidender Faktor bei der Entstehung der Atherosklerose.

Für den Abtransport von überschüssigem Cholesterin ist HDL verantwortlich. Es nimmt freies Cholesterin aus den Geweben auf und transportiert es zurück zur Leber, wo es entweder zur Produktion von Gallensäuren verwendet wird oder bei einem Überschuss sogar ausgeschieden werden kann.

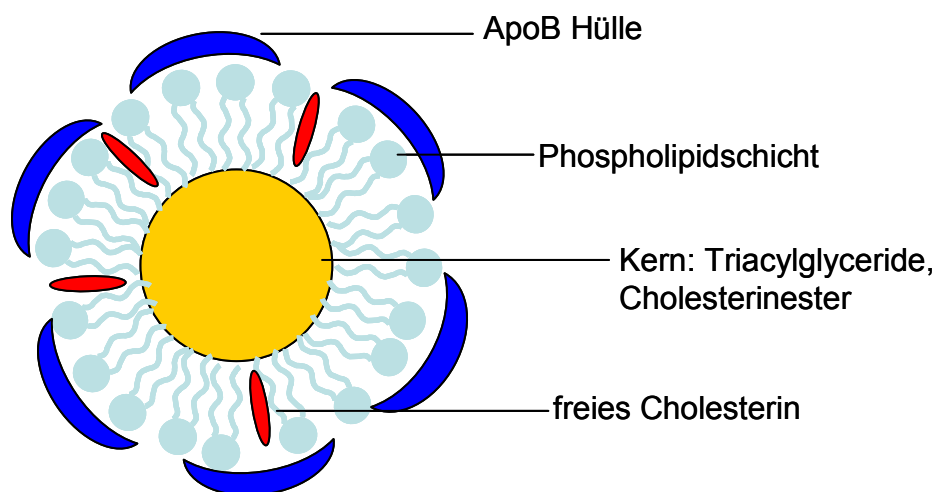


Abb.2: Schematische Darstellung der Zusammensetzung eines LDL-Partikels

1.1.3. Entstehung der Atherosklerose

Atherosklerose entsteht, wenn an undichten Stellen im Endothel LDL ins subendotheliale Bindegewebe eindringt und es dadurch nachfolgend zu einer Entzündung kommt. Als Antwort auf LDL-Einlagerungen wandern Monozyten und T-Lymphozyten ins Subendothel ein. Dafür ist eine Anheftung der im Blut zirkulierenden Zellen an die Endothelzellen nötig. Dies geschieht über Adhäsionsmoleküle, wie VCAM-1, PCAM, ICAM und P/E-Selektine, welche von den Endothelzellen exprimiert werden. An sie binden die Monozyten aus dem Blutstrom und können dann zwischen den Endothelzellen hindurch ins umliegende Gewebe einwandern.

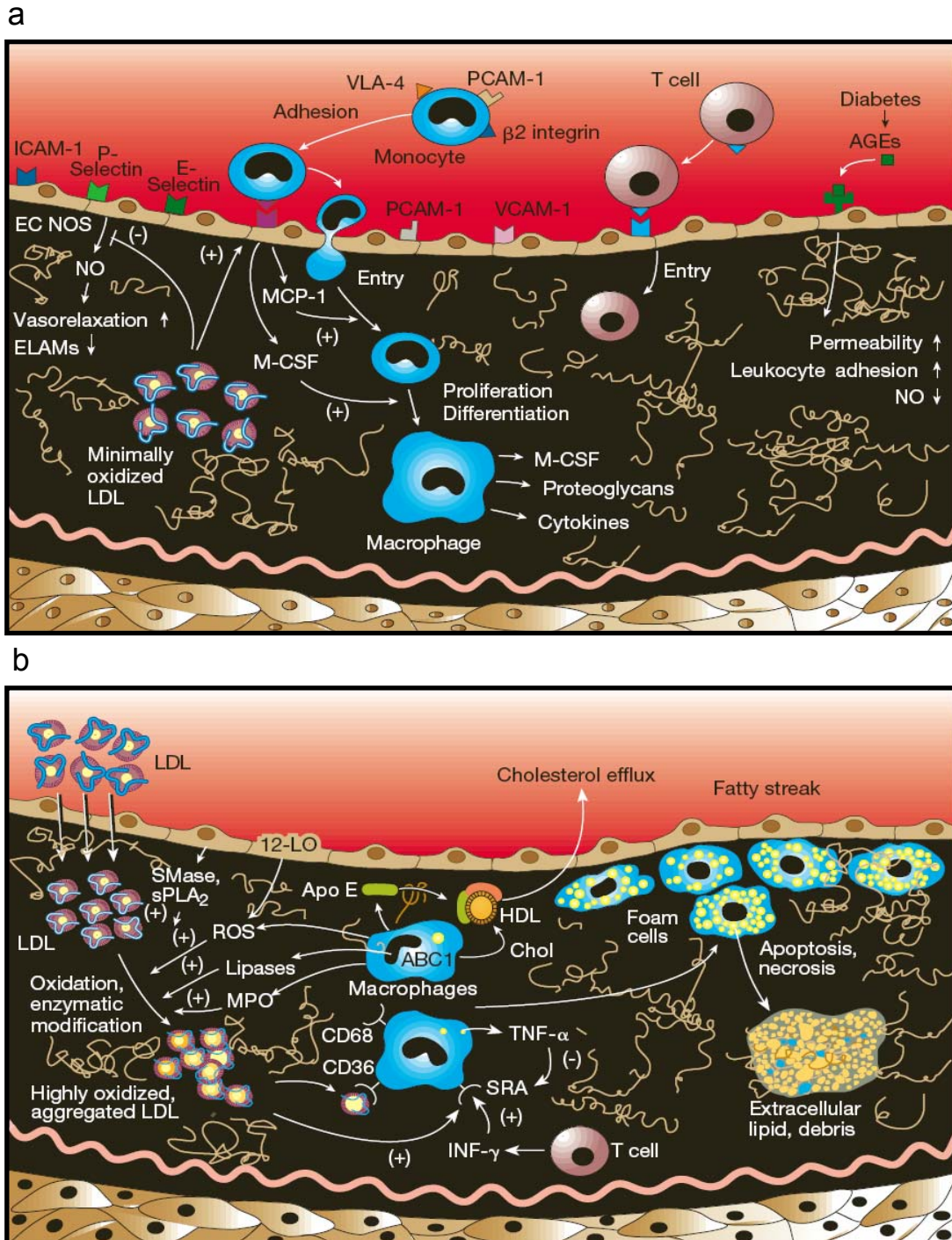


Abb.3: Entstehung von Atherosklerose: Abb. a zeigt das Eindringen von Monozyten und T-Zellen ins subendotheliale Gewebe vermittelt durch Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1; PCAM-1, E-/P-Selektine. Durch die Sekretion von M-CSF durch Endothelzellen differenzieren die Monozyten zu Makrophagen aus und werden durch die unkontrollierte Aufnahme von oxidiertem oder modifiziertem LDL über die Scavenger-Rezeptoren CD36, CD68 und SRA zu Schaumzellen (b). Diese sterben und Lipide und Zelltrümmer lagern sich im Gewebe ein (aus Lusis 2002).

1991 zeigten Ergebnisse von Cybulsky *et al.*, dass Endothelzellen in Zellkultur vermehrt VCAM-1 exprimieren, wenn sie mit Cholesterin behandelt werden. Eine Induktion von VCAM-1 wird aber auch durch die proinflammatorischen Cytokine

IL-1 β (Interleukin-1 β), INF- γ (Interferon- γ) und TNF- α (Tumor nekrosis Faktor- α) über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B hervorgerufen. TNF- α wird von Schaumzellen und IL-1 β von T-Lymphozyten in atherosklerotische Läsionen sekretiert. Weitere Chemokine, die an der Entstehung von Atherosklerose beteiligt sind, werden durch Endothelzellen sekretiert: MCP-1 (Monozyten chemotaktisches Protein-1), IL-8 (Interleukin-8) und M-CSF-1 (Makrophagen kostimulierender Faktor - 1). MCP-1 und IL-8 sorgen für eine verstärkte Einwanderung von T-Zellen und Monozyten in die Läsionen. M-CSF-1 unterstützt die Bildung von Schaumzellen, da es bei Makrophagen zur vermehrten Expression der zwei Scavenger-Rezeptoren (dt: Aasfresser-Rezeptoren) SR-A 1 und CD96 führt (Smith *et al.*, 1995).

Scavenger-Rezeptoren sind ausschlaggebend für die Bildung von Schaumzellen. Sie gehören zu einer ganzen Familie von Rezeptoren und wurden als am Lipidstoffwechsel beteiligte Rezeptoren beschrieben (Goldstein *et al.*, 1979). Im Gegensatz zu den klassischen Rezeptoren, die nur einen Liganden binden, können die Scavenger-Rezeptoren eine Vielzahl von verschiedenen Liganden binden. Ihre Rezeptordomäne bindet an anionische Liganden, dazu gehören Fettsäuren, Phospholipide, LPS (Lipopolysaccharid) und oxidiertes LDL. Scavenger-Rezeptoren werden allerdings, anders als der LDL-Rezeptor, unabhängig vom Cholesteringehalt der Zelle auf der Zelloberfläche exprimiert. Durch sie wird modifiziertes LDL unablässig in die Zellen aufgenommen, so dass diese zu Schaumzellen werden. Diese Schaumzellen sekretieren eine ganze Reihe von proinflammatorischen Cytokinen wie IL-6, TNF α , MCP-1, IL-1 β und TGF- β (transforming growth factor- β), was zu einer Entzündung in den Arterienwänden führt. Durch absterbende Schaumzellen kommt es zur Anhäufung von toten Zellen und Lipiden in der Arterienwand. Es kommt zu Bildung der so genannten Fettstreifen.

Die heute gängige Lehrbuchmeinung zur Entstehung von Atherosklerose geht davon aus, dass es sich bei dem modifizierten LDL um oxidiertes LDL handelt. Diese Theorie wurde 1981 von Steinberg entwickelt. Oxidiertes LDL entsteht zum Beispiel durch ROS (reactive oxygen species), welche von den Endothelzellen abgesondert werden. Des Weiteren können verschiedene Enzyme, die von Makrophagen und Endothelzellen in atherosklerotischen Läsionen sezerniert werden, wie z.B. Sphingomyelinase, sekretorische Phospholipase und Myloperoxidase, zu einer Oxidation beitragen (Lusis 2000).

Oxidiertes LDL konnte bereits vor der Einwanderung von Monozyten in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden (Napoli *et al.*, 1997). Außerdem konnte gezeigt werden, dass es Monozyten aus dem Blutstrom anlockt (Steinberg, 1989).

Im Gegensatz dazu steht das Konzept der Arbeitsgruppe von Prof. Bhakdi (die Mainzer Hypothese), welches davon ausgeht, dass es sich um enzymatisch modifiziertes LDL (E-LDL) handelt, welches in atherosklerotischen Läsionen die entscheidende Rolle spielt und dort zur Inflammation führt (Bhakdi 2002).

1.1.4. Die Mainzer Hypothese

Die Arbeitsgruppe von Prof. Bhakdi hat in den letzten Jahren zu den Vorgängen bei der Entstehung der Atherosklerose eine neue Theorie entwickelt. Sie geht davon aus, dass LDL in seiner nativen Form durch die Endothelschicht dringt und im Subendothel enzymatisch umgebaut wird. LDL wird hier durch Proteasen und Cholesterinesterasen verdaut und erhält so seine inflammatorischen Eigenschaften. Die Enzyme, die für den Umbau nötig sind, können z.B. aus den Lysosomen der umliegenden Zellen stammen oder aktiv sekretiert werden. Proteinase wie Plasmin, CathepsinH und Matrixmetalloproteasen verdauen den Proteinanteil und ermöglichen dem zweiten Enzym, einer Cholesterinesterase, wie z.B. sPLA₂, die Spaltung von Cholesterinestern, wodurch freie Fettsäuren entstehen (Han *et al.*, 2003). Dieses enzymatisch verdaute LDL (E-LDL) ist nun in der Lage CRP (C-reaktives Protein) zu binden (Bhakdi *et al.* 1999), wodurch der klassische Weg des Komplementsystems aktiviert wird und es zum Einwandern von Monozyten kommt, die das enzymatisch verdaute LDL aufnehmen. Unter normalen physiologischen Bedingungen wird das LDL so durch die Makrophagen wieder ins Bindegewebe abtransportiert und auf HDL übertragen. Es findet keine Anhäufung von LDL im Gewebe statt und es kommt somit auch nicht zu einer Inflammation. Krankhafte Veränderungen der Gefäßwände entstehen erst, wenn der Abtransport durch einen zu hohen LDL-Gehalt im Blut nicht mehr gewährleistet werden kann. Dann kommt es zu einer Anhäufung von E-LDL im subendothelialen Gewebe. Makrophagen werden zu Schaumzellen und sekretieren proinflammatorische Moleküle wie IL-6 (Interleukin-6) und MCP-1 (Makrophagen chemotatisches Protein-1) (Klouché *et al.*, 1998). Wenn die zu Schaumzellen angewachsenen Makrophagen mit Lipiden überladen sind, platzen sie und ihre

intrazellulären Lipide werden wieder frei. So wird der Prozess der Plaquebildung immer weiter gefördert.

Mehrere Befunde unterstützen diese Theorie. In atherosklerotischen Läsionen sind große Mengen an aktiviertem Komplement nachgewiesen worden. Während oxidiertes LDL nicht in der Lage ist das Komplementsystem zu aktivieren, führen aus Läsionen isolierte cholesterinhaltige Vesikel zu einer Induktion der Komplementkaskade (Seifert *et al.*, 1990). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass E-LDL durch Makrophagen aufgenommen wird (Bhakdi *et al.*, 1995) und zur Produktion von MCP-1 führt (Klouche *et al.*, 1998). Der endgültige Nachweis, dass sich E-LDL in atherosklerotischen Läsionen befindet, konnte durch Immunfluoreszenzuntersuchungen mit E-LDL-spezifischen Antikörpern erbracht werden (Torzewski *et al.*, 1998). In der gleichen Veröffentlichung konnte eine Kolokalisation von E-LDL mit C5b-9, dem terminalen, membranangreifenden Komplex des Komplementsystems, gezeigt werden. Nachfolgende Versuche zeigten, dass E-LDL weitere grundlegende Eigenschaften erfüllt, die zur Entstehung von Atherosklerose beiträgt. So stimuliert E-LDL Monozyten zur Transmigration und Adhäsion an Endothelzellen (Klouche *et al.*, 1999) und führt in primären VSMC (vascular smooth muscle cells) zur Proliferation und Schaumzellbildung (Klouche *et al.*, 1999). Ein von Monozyten sekretiertes Enzym (Cathepsin H) ist zusammen mit Cholesterinesterase, z.B. sPLA₂, in der Lage E-LDL zu generieren. Beide Enzyme werden in Monozyten durch Behandlung mit E-LDL vermehrt sekretiert (Han *et al.*, 2003).

Die beiden oben erwähnten Hypothesen zur Entstehung der Atherosklerose, die Oxidationstheorie und die Mainzer Hypothese, widersprechen sich nicht grundsätzlich, sie setzen nur unterschiedliche Modifikationen des LDL als Grundlage für die Entstehung von Atherosklerose voraus. Beide Formen sowohl oxidiertes als auch enzymatisch modifiziertes LDL, kommen in atherosklerotischen Läsionen vor und werden so beide zur Entstehung der Atherosklerose beitragen.

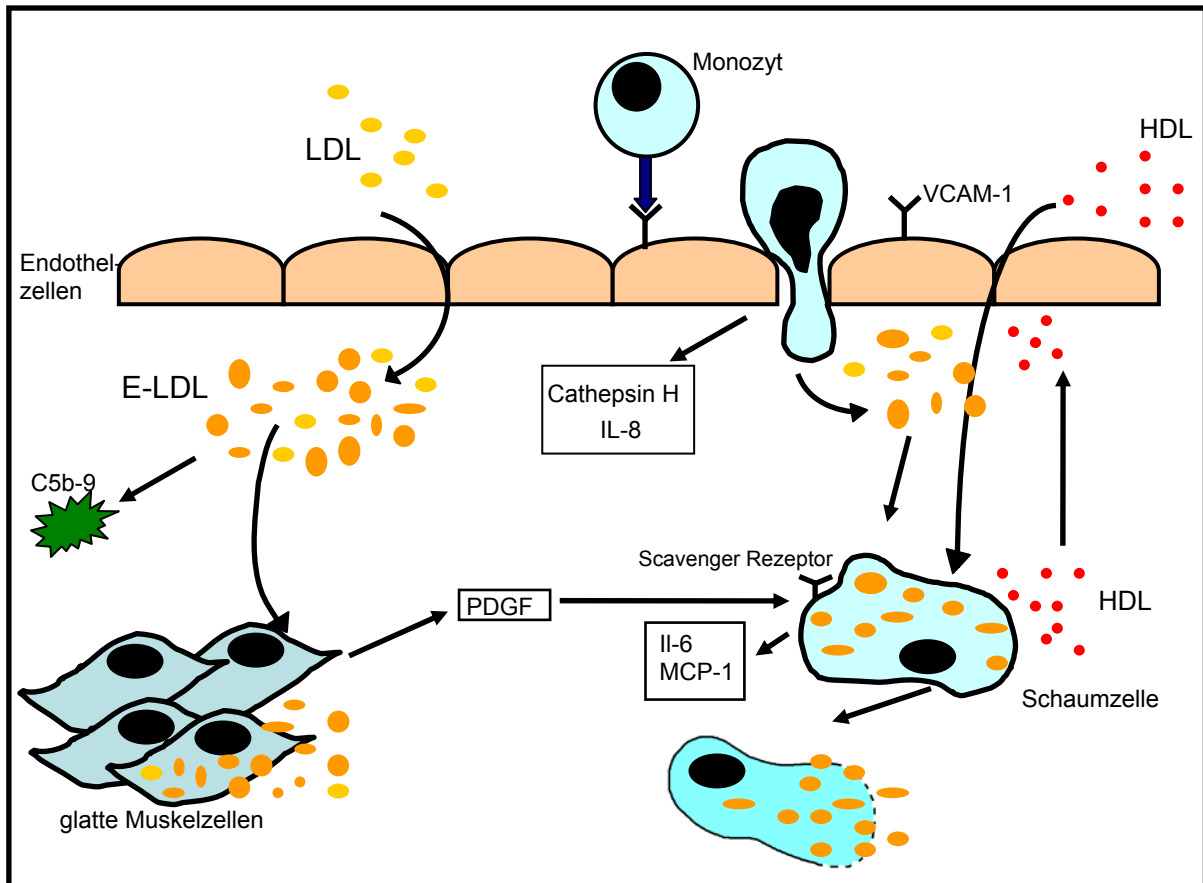


Abb. 4: Entstehung der Atherosklerose nach der Mainzer Hypothese: Demnach führt der durch einen erhöhten LDL-Gehalt im Blut überlastete Abtransport von Cholesterin über HDL zu einer Anhäufung von LDL im subendothelialen Gewebe. Dort wird das LDL durch Proteasen und Cholesterinesterasen enzymatisch verdaut und erhält dadurch seine inflammatorischen Eigenschaften (verändert nach Bhakdi, Deutsche Mediziner Wochenschrift 2002).

1.1.5. Induktion von Apoptose in atherosklerotischen Läsionen

Unter Apoptose versteht man den programmierten Zelltod. Sie steht im Gegensatz zur Nekrose, bei der eine Zelle aufplatzt und die cytosolischen Komponenten und Zelltrümmer in den intrazellulären Raum gelangen. Die Zelltrümmer werden hauptsächlich von Makrophagen, aber auch von umliegenden nicht professionell phagozytierenden Nachbarzellen entsorgt. Dadurch kommt es zu einer Ausschüttung von Cytokinen und somit zu einer Entzündungsreaktion. Bei der Apoptose vernichtet sich eine Zelle kontrolliert selbst. Alle Zellbestandteile werden in so genannte apoptotische Vesikel verpackt, die dann von den umliegenden Zellen aufgenommen werden können, wodurch eine Inflammation im Gewebe verhindert wird. Die Apoptose einer Zelle ist gekennzeichnet durch die Kondensation und Fragmentierung des Chromatins, einer Verkleinerung des Cytoplasmas und einer Auflösung der Membranasymmetrie. Ausgelöst wird Apoptose durch einen

komplexen Signaltransduktionsmechanismus, induziert durch die Bindung eines Liganden an einen Oberflächenrezeptor, einen so genannten "Todesrezeptor" (wie z.B. CD95, Fas oder den TNF-Rezeptor).

Aus früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe Bhakdi ist bereits bekannt, dass eine Behandlung mit E-LDL für Zellen toxisch ist. Die Aufnahme von E-LDL führt in Makrophagen und primären vaskulären Muskelzellen zur Schaumzellbildung und zum Tod (Klouche *et al.*, 1998 und Klouche *et al.*, 2000). Neueste Arbeiten von Kathrin Dersch zeigen, über welchen Signaltransduktionsweg es in Endothelzellen durch E-LDL zur Auslösung der Apoptose kommt (Dersch *et al.*, 2005). Des Weiteren zeigt diese Arbeit, dass es sich bei der Apoptose induzierenden Komponente aus E-LDL um freie Fettsäuren handelt, welche die Apoptose in Endothelzellen auslösen. Freie Fettsäuren führen zur Aktivierung von ASK-1 (apoptosis signal-regulating kinase-1), einer Kinase, die zur Familie der MAPKKKs gehört. Diese Aktivierung führt wiederum zur Phosphorylierung der MAP-Kinase p38, welche zur Induktion der Caspase-Kaskade führt. Caspasen sind Cysteinproteasen, die im Cytosol in einer Proform vorliegen und durch eine Proteinspaltung an immer demselben Aspartatrest aktiviert werden. In der Zelle sind viele Caspasen hintereinander geschaltet. Die erste in dieser Hierarchie ist die Caspase-8. Wird sie aktiviert, kommt es durch die Spaltung der anderen Caspasen zur Spaltung von verschiedensten Substraten, die dazu beitragen, dass die Zelle in die Apoptose geht. Zu diesen Substraten gehören z.B. CAD (caspaseactivated DNase) und Poly(ADP-Ribose) -Polymerase (Cohen 1997; Grethe *et al.*, 2004).

1.2. ApoJ (Clusterin)

ApolipoproteinJ (ApoJ) wurde erstmals 1982 von Kissinger *et al.* als Hauptsekretionsprodukt von Sertolizellen in Zellkultur beschrieben. In vitro veranlasst ApoJ Zellen zur Aggregation, woher auch der Name Clusterin (engl.: clustering) (Blaschuk *et al.*, 1983) abgeleitet wurde. Was es allerdings für eine Funktion erfüllt, ist bis heute nicht geklärt. Dem ApoJ, das in fast allen Säugetiergeweben nachgewiesen worden ist, sind viele verschiedene Namen, Eigenschaften und Funktionen zugeschrieben worden, auf die nachfolgend noch näher eingegangen wird.

Name	charakterisiert als	Spezies	Literatur
Clusterin	Protein aus der Testisflüssigkeit mit zellaggregierender Wirkung	Schaf	Fritz <i>et al.</i> , 1983 Blaschuk <i>et al.</i> , 1983
CLI (<u>cytolysis inhibitor</u>)	Teil des terminalen Komplement-Komplexes	Mensch	Jenne und Tschopp, 1989; Krizbaum <i>et al.</i> , 1989
ApoJ NA1/NA2	Apolipoprotein	Mensch	De Silva <i>et al.</i> , 1990 Hochstrasser <i>et al.</i> , 1988 ; James <i>et al.</i> , 1991
TRPM-2 (<u>testosteron-repressed prostatic messenger 2</u>)	m-RNA, die nach Androgenentzug in der Prostata vermehrt gebildet wird	Ratte	Buttayan <i>et al.</i> , 1989
T64	mRNA, die in neuroepithelialen Zellen nach Infektion mit Rous Sarcoma Virus vermehrt exprimiert wird	Wachtel	Michael <i>et al.</i> , 1989
SGP-2 (<u>sulfated glycoprotein 2</u>)	Sekretionsprodukt von Sertolizellen	Ratte	Collard und Griswold, 1987
Gp-III	Bestandteil von chromaffinen Granula der adrenalen Medulla	Rind	Palmer und Christie, 1990
Gp-80	Glycoprotein, das von Nierenepithelzellen apikal sekretiert wird	Hund	Hartmann <i>et al.</i> , 1991
pADHC-9	Vermehrte Expression bei M. Alzheimer	Mensch	May <i>et al.</i> , 1990

Tab.2: Übersicht über die verschiedenen Namen und Eigenschaften von ApoJ in verschiedenen Spezies.

1.2.1. Struktur von ApoJ

Die zuerst entdeckte und auch am besten untersuchte Form von ApoJ ist die sekretorische Form, die in allen Gewebsflüssigkeiten gefunden wird. Beim Menschen befindet sich das ApoJ-Gen in einer Kopie auf Chromosom 8 und umfasst 9 Exons. Die 2kb große mRNA codiert für ein Protein aus 442 Aminosäuren, welches in seiner unglycosylierten Form 46kDa groß ist. Das Protein wird direkt ins Endoplasmatische Retikulum synthetisiert, wo es als 56-60kDa großes Vorläuferprotein vorkommt (Urban *et al.*, 1987; de Silva 1990, Burkey *et al.*, 1991). Durch die anschließende N-Glycosylierung im Golgi-Apparat entsteht daraus ein 75-80kDa großes Vorläuferprotein (Urban *et al.*, 1987; Burkey *et al.*, 1991). Nach intrazellulärer Spaltung dieses Vorläufers ergibt sich ein heterodimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 75-80kD. Es besteht aus einer α - und einer β -Kette, die

antiparallel zueinander verlaufen und durch fünf Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (siehe Abb.5). Des Weiteren weist es zwei coiled-coil-Strukturen und drei amphipatische α -Helices auf, die wichtig für die verschiedenen Wechselwirkungen des Moleküls sind (Jones und Jomary, 2002). Die Sekretion erfolgt direkt nach der proteolytischen Spaltung über sekretorische Vesikel (Urban *et al.* 1987).

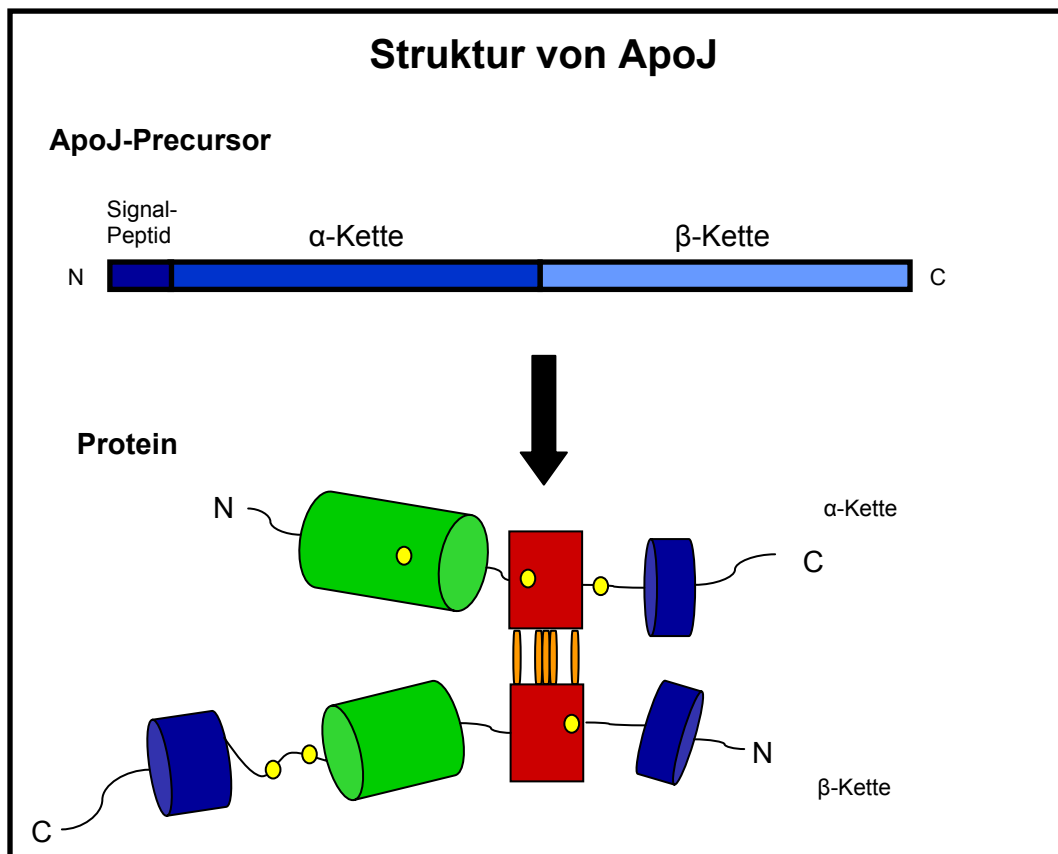


Abb.5: Schematische Darstellung von humanem ApoJ: Das Vorläuferprotein besteht aus einer 22 Aminosäuren umfassenden Signalsequenz, die für die Sekretion verantwortlich ist und den Abschnitten für die α - und die β -Kette. Das sekretierte Protein ist ein heterodimeres Glycoprotein, welches zwei cysteinreiche Regionen (rot) aufweist, an denen die beiden Ketten durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Ihnen benachbart befinden sich zwei coiled-coil α -Helices (grün) und drei amphipatische α -Helices (blau). Die gelben Punkte zeigen die Stellen der N-Glycosylierung (nach Jones und Jomary, 2002).

Neuere Untersuchungen beschreiben eine zweite Form von ApoJ, die so genannte nukleäre oder cytoplasmatische Form. Erstmals erwähnt wurde sie 1994, als ihr eine Rolle bei der Differenzierung von glatten Muskelzellen zugeschrieben wurde (Thomas-Salgar und Millis, 1994). Aufgrund von Immunfluoreszenzversuchen wurde ein Jahr später die Vermutung angestellt, dass sich ApoJ intrazellulär in zwei verschiedenen Zellkompartimenten befindet, da man Färbungen im Bereich der

Plasmamembran und der Kernmembran sehen konnte (Wilson *et al.*, 1995). Wenn man die Sequenz von ApoJ näher betrachtet, kann man eine Kernlokalisationssequenz im Bereich der Aminosäuren 52 bis 58 ausfindig machen, die der des Androgenrezeptors entspricht (LEEAKKK) (Wilson *et al.*, 1995). Die intrazelluläre Form von ApoJ wird nicht glykosyliert und entsteht vermutlich durch alternatives Splicing der mRNA im Exon III. Dadurch werden nur Exon I und II direkt miteinander verbunden. Diese kleinere mRNA ergibt ein 49kDa großes Protein, welches nach UV-Bestrahlung von Zellen oder TGF- β -Behandlung in den Kern wandert (Reddy *et al.*, 1996, Leskov *et al.*, 2003). Welche Funktion es dort übernimmt, ist noch ungeklärt, es wird aber diskutiert, dass es dort an der Induktion von Apoptose beteiligt sein könnte (Reddy *et al.*, 1996).

1.2.2. Expression und mögliche Funktion der sekretierten Form von ApoJ

ApoJ ist in fast allen Säugetiergeweben und Körperflüssigkeiten nachgewiesen worden und es werden ihm viele verschiedene Funktionen zugeschrieben (Tab.2). In der Embryonalentwicklung ist eine organspezifische Regulation von ApoJ zu beobachten, wobei in fast allen Organen zu einem bestimmten Zeitpunkt ApoJ nachweisbar ist. Die stärkste Expression ist dabei immer in sich differenzierenden, proliferierenden Zellen zu sehen (French *et al.*, 1993; Calvo *et al.*, 1998). Eine entscheidende Rolle kann ApoJ bei der Embryonalentwicklung allerdings nicht einnehmen, da ApoJ knock out Mäuse sich während ihrer Embryogenese normal entwickeln und lebensfähig sind.

Im männlichen Reproduktionstrakt ist ApoJ erstmals nachgewiesen worden in der Testesflüssigkeit von Schafen (Fritz *et al.*, 1983; Blaschuk *et al.*, 1983). Es ist das Hauptsekretionsprodukt von Sertolizellen, welche ApoJ in das Seminalplasma sezernieren (Kissinger *et al.*, 1982). So ist ApoJ an späten Spermatischen und testikularen Spermien nachzuweisen, wobei sowohl die Schwänze als auch die Köpfe von ApoJ bedeckt sind. Dadurch wurde die Vermutung angestellt, dass ApoJ bei der Reifung von Spermien oder der Entsorgung von defekten Spermien beteiligt sein könnte (Sylvester *et al.*, 1991; Baily und Grisworld 1999). Im weiblichen Reproduktionstrakt ist ApoJ beim Menschen im Uterus und im Ovar nachgewiesen worden, wobei die Expression stark vom weiblichen Zyklus abhängig ist (Kaynart *et*

al., 1992; Aronow *et al.*, 1993). ApoJ wird vor allem in der Sekretionsphase des weiblichen Zyklus von den Uterusepithelzellen sekretiert (Brown *et al.*, 1995).

Als Apolipoprotein ist es beim Menschen in hohen Konzentrationen (101+/- 42mg/ml) im Blut nachgewiesen worden, wobei ein großer Anteil an HDL-Partikeln (high-density lipoprotein) assoziiert ist (Morrissey *et al.*, 2000; Calero *et al.*, 1999). Es wird von Hepatocyten sezerniert und kann *in vitro* den Ausstrom von Cholesterin aus lipidbeladenen Makrophagen unterstützen, weshalb ihm eine Rolle im Lipidstoffwechsel und bei der Entstehung von Atherosklerose zugeschrieben wurde (Gelisson *et al.*, 1998).

1.2.2.1. Mögliche Funktion von ApoJ in der Atherosklerose

Da die Entstehung von Atherosklerose eng mit dem Lipidstoffwechsel verbunden ist und ApoJ in seiner Eigenschaft als Apolipoprotein von HDL-Partikeln ebenfalls am Lipidstoffwechsel beteiligt ist, stellt sich die Frage nach der Bedeutung von ApoJ in der Atherosklerose. HDL ist für den Cholesterinabtransport aus den verschiedenen Geweben zur Leber verantwortlich, wo überschüssiges Cholesterin entsorgt wird. Da es den Ausstrom von Cholesterin aus lipidbeladenen Makrophagen unterstützt (Gelissen *et al.*, 1998), könnte so eine Schaumzellbildung verhindert werden. Glatte Muskelzellen (VSMC) migrieren im Verlauf der Atherosklerose in die Plaques ein und werden dort ebenfalls zu Schaumzellen. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass ApoJ an der Differenzierung und Transformation von VSMC beteiligt ist (Diemer *et al.*, 1992) und dass exogenes ApoJ zumindest *in vitro* die Migration von VSMC inhibiert (Sivamurthy *et al.*, 2001). 1993 wurde ApoJ erstmals in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen (Witte *et al.*, 1993). Genauere Untersuchungen mittels Immunhistochemie zeigten, dass ApoJ zwischen der Media und der Intima kolokalisiert mit Lipiden vorkommt. In gesunden Arterienwänden ist ApoJ hingegen nicht nachgewiesen worden (Ishikawa *et al.*, 1998; Jordan-Starck *et al.*, 1994). Das in atherosklerotischen Plaques lokalisierte ApoJ könnte z.B. aus Schaumzellen stammen, von denen nachgewiesen worden ist, dass es bei ihnen zu einer vermehrten ApoJ mRNA Expression kommt (Jordan-Starck *et al.*, 1994). Auch Thrombozyten, die bei einer starken Verletzung des Endothels oder nach einer Plaqueruptur einwandern, können zur ApoJ-Anhäufung in atherosklerotischen Plaques beitragen. Sie speichern ApoJ in ihren α -Granula und entlassen es nach der Aktivierung durch Thrombin oder Kollagen (Palmer und Christie, 1990).

Ob ApoJ noch weitere Funktionen bei der Atherosklerose zukommen könnte, ist bislang jedoch ungeklärt. Dahingehende Untersuchungen sollen Bestandteil dieser Arbeit sein.

1.2.2.2. Funktion von ApoJ bei degenerativen Prozessen

Die erhöhte Expression von ApoJ bei degenerativen und apoptotischen Prozessen, die während der Differenzierung oder der Neustrukturierung von Geweben auftritt, führte zu der Annahme, dass ApoJ eine Beteiligung an den zum Zelltod führenden Prozessen hat. Untersuchungen von French und Mitarbeitern aus dem Jahr 1992 haben aber gezeigt, dass ApoJ nicht von den apoptotischen Zellen selber, sondern von den umliegenden Nachbarzellen sekretiert wird. Auch die Expression von rekombinanter ApoJ-cDNA in Fibroblasten und Epithelzellen hatte keine Apoptose zur Folge (Appel *et al.*, 1994). Diese Ergebnisse führten zu einem neuen Funktionsmodell von ApoJ (Koch-Brandt und Morgans, 1996). ApoJ könnte ein Bestandteil des Reparatursystems des Organismus sein, das die intakten Zellen vor einer Schädigung durch Zellfragmente schützen soll. Es wurde ein Modell erstellt, welches im ApoJ ein Adaptermolekül für die Entsorgung von Zellüberresten sieht. Es bindet dabei sowohl an Zelltrümmer als auch an spezifische Rezeptoren. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen eine ApoJ-vermittelte Aufnahme von Zelltrümmern über die Rezeptoren der LDL-Rezeptorfamilie Megalin und LRP (LDL receptor related protein) (Bartl *et al.*, 2001).

Eine erhöhte ApoJ Expression ist bei vielen pathophysiologischen Veränderungen in Geweben aufgezeigt worden. Es scheint eine Rolle bei Krankheiten wie M. Alzheimer und Creutzfeldt-Jakob zu spielen (May *et al.*, 1990; Lindstrom *et al.*, 1998; Freixes *et al.*, 2004). Dabei gilt im Gehirn wie in allen anderen Geweben auch, dass ApoJ nicht von allen Zellen exprimiert wird, sondern in diesem Fall nur von Astrozyten und Neuronen. Mikrogliazellen hingegen sind nicht in der Lage ApoJ zu synthetisieren (Pasinetti *et al.*, 1994). Bei M. Alzheimer ist ApoJ zum einen kolokalisiert mit den amyloiden Plaques und zum anderen ist es in der Gehirnflüssigkeit an die lösliche Form von A β assoziiert. Untersuchungen an ApoJ-defizienten Mäusen haben gezeigt, dass es in diesem Fall neurotoxische Eigenschaften besitzt, da es in den ApoJ-defizienten Mäusen zu deutlich weniger A β -Ablagerungen kommt als bei den Wildtyp-Mäusen (DeMattos *et al.*, 2002). Ähnlich ist es bei der Creutzfeldt-Jakob Krankheit: Auch hier wird ApoJ komplexiert mit dem Prion Protein vorgefunden

(Freixes *et al.*, 2004). Im Herz wird ApoJ von Myozyten gebildet, allerdings auch nur unter pathophysiologischen Situationen, nicht im gesunden Herzen (MC Laughlin *et al.*, 2000). Bei autoimmuner Myocarditis kommt es zu einer vermehrten ApoJ Expression. Untersuchungen an ApoJ-defizienten Mäusen zeigen eine deutlich stärkere Ausprägung an Gewebsschäden als sie bei Wildtyp-Mäusen bei dieser Krankheit auftreten. Gesunde ApoJ^{-/-} Mäuse hingegen zeigen keinen ausgeprägten Phänotyp. Diese Beobachtungen stützen die Annahme, dass dem ApoJ bei inflammatorischen Gewebsschäden eine zytoprotektive Funktion zukommt und dass es für einen gesunden Organismus nicht lebensnotwendig ist. Viele neuere Veröffentlichungen befassen sich mit der ApoJ-Expression in verschiedenen Tumoren. Dabei ist zu beobachten, dass ApoJ in einer Vielzahl von Tumoren verstärkt exprimiert wird. Unter anderem wird es in Tumoren der Gebärmutter, der Ovarien und Brustkarzinomen hochreguliert, aber auch bei Leber-, Prostata- und Pankreastumoren (Rosenberg und Silkenson, 1995; Hough *et al.*, 2000; Redondo *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2004; Steinberg *et al.*, 1997; Xie *et al.*, 2002).

Eine mögliche Erklärung für die Funktion von ApoJ zeigen die Arbeiten von Poon *et al.* 2000 und 2002 auf. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ApoJ Funktionen eines Hitzeschock-Proteins haben könnte. In der ersten Veröffentlichung von 2000 wurde herausgefunden, dass ApoJ die Präzipitation von einem breiten Spektrum partiell denaturierter Proteine verhindert. Durch diese Bindung entsteht ein hochmolekularer Komplex. ApoJ ist jedoch nicht in der Lage Proteine zurückzufalten, sondern hält Proteine so lange in Lösung, bis sie von Hsp70 zurückgefaltet werden können. Außerdem besitzt das ApoJ-Gen eine hochkonservierte Promotorsequenz, an die der Transkriptionsfaktor HSF1 (heat shock factor1) bindet. Dieser Faktor induziert die Expression vieler Hsp's (heat shock proteins). Arbeiten aus dem Jahr 2002 von Poon *et al.* zeigen, dass ApoJ nur an langsam aggregierende Formen von Proteinen im Entfaltungsweg bindet. Diese Theorie unterstützt auch die etwas ältere Erkenntnis, dass ApoJ eine entscheidende Rolle bei der Gewebserneuerung zukommt, indem es Proteine durch seine Bindung am vollständigen Denaturieren hindert und sie somit vor dem Abbau schützt (Wilson und Easterbrook-Smith 2000). Die Entsorgung dieser Proteine kann dann über die Rezeptoren Megalin und LRP erfolgen (Bartl *et al.*, 2001).

Neue Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass Bestandteile nekrotischer Zellen in vitalen Zellen zu einer vermehrten Expression von ApoJ führen (Bach *et al.*,

2001; Baiersdörfer, Dissertation). Ergebnisse von Markus Baiersdörfer zeigen außerdem einen Zusammenhang zwischen der Expression von Toll-like Rezeptoren (TLR) und der Regulation von ApoJ auf. Diese Ergebnisse sollen in dieser Arbeit untermauert werden. Darüber hinaus soll untersucht werden, über welchen Mechanismus die Regulation von ApoJ erfolgt und ob aus nekrotischen Zellen freigesetzte Faktoren die ApoJ-Expression möglicherweise über TLRs regulieren.

1.3. Die Familie der Toll-like Rezeptoren

1.3.1. Struktur und Expression von Toll-like Rezeptoren

Das Molekül Toll wurde ursprünglich 1985 in *Drosophila* entdeckt und spielt dort eine entscheidende Rolle bei der Dorsoventral-Entwicklung des Embryos (Anderson *et al.*, 1985). 1991 wurde gezeigt, dass dieses Molekül Homologien zum IL-1 (Interleukin-1) Rezeptor aufweist (Gay *et al.*, 1991). Daraufhin wurden in Säugetieren mehrere Rezeptoren mit solchen Homologien gefunden, die in der Familie der Toll-like Rezeptoren (TLR) zusammengefasst wurden. Diese Familie umfasst bis heute 11 Mitglieder, aber es ist anzunehmen, dass noch weitere Mitglieder folgen werden. TLRs sind integrale Membranproteine und weisen ein Molekulargewicht von ca. 90-120kDa auf. Alle Rezeptoren dieser Familie besitzen eine intrazelluläre und eine extrazelluläre Domäne, die durch eine einzige membrandurchspannende Domäne miteinander verbunden sind. Die intrazelluläre Domäne gleicht der des IL-1-Rezeptors und wird als TIR-Domäne (Toll/IL-1 receptor-domain) bezeichnet. Deshalb werden die TLRs zusammen mit den Interleukin-1-Rezeptoren (IL-1R) zur TLR/IL-1R-Superfamilie zusammengefasst (Dune und O'Neill 2003). In der TIR-Domäne befinden sich drei hochkonservierte Bereiche, welche Box 1, 2 und 3 genannt werden. Diese Bereiche der TIR-Domäne bilden die Grundlage für die Bindung verschiedener Adaptermoleküle, die für die Signalweiterleitung zuständig sind (Slack *et al.*, 2000). Die extrazelluläre Domäne hingegen unterscheidet sich deutlich von der des IL-1R. Im Gegensatz zum IL-1R, dessen extrazelluläre Domäne aus drei Wiederholungen von Immunoglobulin-ähnlichen Domänen zusammensetzt ist, ist die extrazelluläre Domäne der TLRs durch 19-25 Wiederholungen einer leucinreichen Sequenz charakterisiert (XLXXLXLXX; X= beliebige Aminosäure, L=Leucin), welche als LRRs (leucine-rich repeats) bezeichnet werden. Die

extrazellulären Domänen der TLRs bilden eine gekrümmte Struktur aus. Diese räumliche Struktur ist wahrscheinlich an der Erkennung der TLR-Liganden beteiligt (Akira und Takeda 2004).

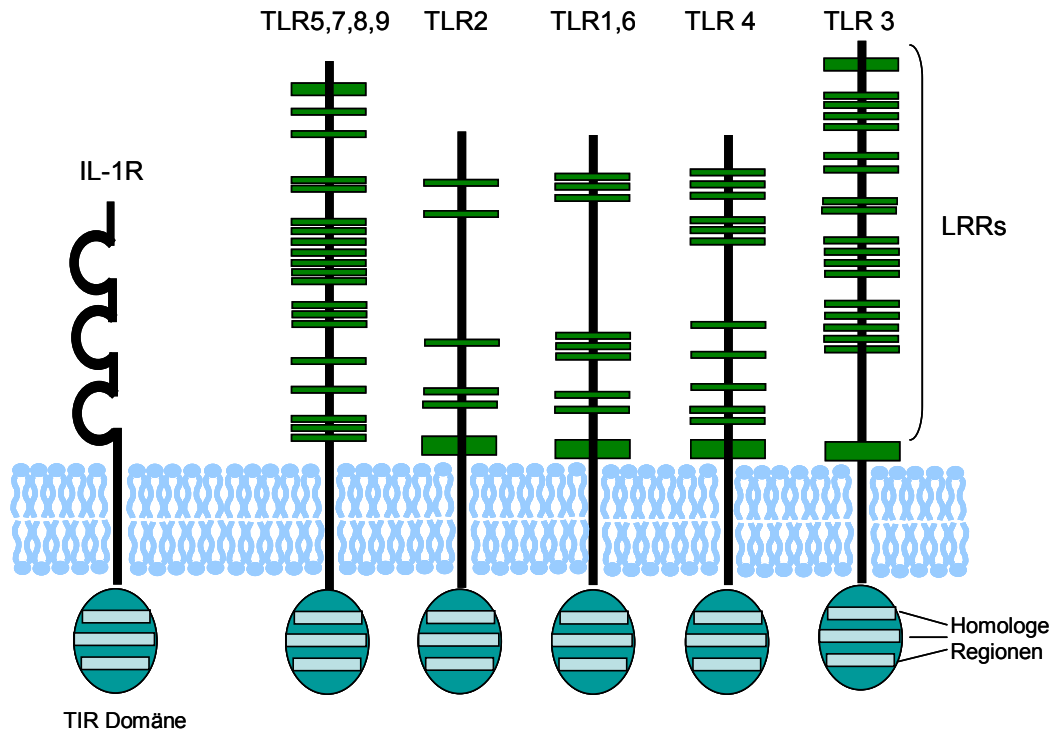


Abb. 6: Struktur der Toll-like Rezeptoren (TLR): TLRs bestehen aus einer extrazellulären Domäne, die 19-25 leucinreiche Wiederholungen (LRRs) besitzen, gekennzeichnet durch die grünen Balken. Intrazellulär weisen sie eine so genannte TIR(Toll/IL-1R)-Domäne auf, die homolog ist zur intrazellulären Domäne des Interleukin-1 Rezeptors. In dieser Domäne finden sich drei stark konservierte Regionen (hellblaue Balken), die Box 1, 2 und 3 genannt werden und entscheidend sind für das Binden von verschiedenen Adapterproteinen. Nach Akira und Takea 2004; Beutler 2004.

Toll-like Rezeptoren sind ein unerlässlicher Bestandteil bei der Abwehr von Pathogenen. Jeder Rezeptor erkennt spezifisch eine konservierte Sequenz oder ein Motiv eines Pathogens. Der zuerst entdeckte und am besten untersuchte Rezeptor dieser Familie ist der TLR4. Er wird auf Monozyten, Mastzellen, Neutrophilen und Endothelzellen exprimiert und dient der Erkennung von gram-negativen Bakterien, da er unter anderem LPS (Lipopolysaccharid) bindet. Zu den an der Zelloberfläche exprimierten Rezeptoren gehören neben TLR4 auch TLR1/2/5 und 6. Andere Rezeptoren hingegen sind fast ausschließlich intrazellulär zu finden. Dabei handelt es sich um die Nukleinsäure-bindenden Rezeptoren TLR3/7/8 und 9. Ihre extrazellulären Domänen befinden sich im Innern von Endosomen. Von TLR3 ist allerdings gezeigt, dass er auf Fibroblasten auch zu einem geringen Anteil an der

Zelloberfläche exprimiert wird (Matsumoto *et al.*, 2002). Als Rezeptoren der angeborenen Immunantwort sind TLRs zuerst auf Zellen des Immunsystems lokalisiert worden.

	Expression	Natürliche Liganden
TLR1	Ubiquitär	Lösliche Faktoren aus Bakterien (Mycoplasmen usw.)
TLR2	Monozyten, Makrophagen, B und T-Zellen, dendritische Zellen, Mastzellen, NK-Zellen, Mikrogliazellen	Bakterien: Lipoproteine Viren: CMV, HSV-1 usw. Pilzen: Zymosan
TLR3	NK-Zellen, dendritische Zellen, Mikrogliazellen, B- und T-Zellen, Astrozyten, Fibroblasten	virale, doppelsträngige RNA, mRNA
TLR4	Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, Neutrophilen, B- und T-Zellen, Endothelzellen	Bakterien:LPS Viren: RSV F Protein, MMTV Endogen: Fibronectin, Heparin usw.
TLR5	Monozyten, NK-Zellen, dendritische Zellen	Flagellin
TLR6	B-Zellen, Mastzellen	Diacyllipopeptide (Mycoplasmen)
TLR7	B-Zellen, Eosinophile, Fibroblasten	virale, einzelsträngige RNA (HIV, VSV)
TLR8	NK-Zellen, myeloiden Zellen, Fibroblasten	virale, einzelsträngige RNA
TLR9	B-Zellen, NK-Zellen, Tonsillarzellen, Astrozyten, Fibroblasten	bakterielle und virale DNA
TLR10	B-Zellen, dendritische Zellen	Unbekannt
TLR11	Ureoepithel der Maus	Unbekannt

Tab. 3: Expression von Toll-like Rezeptoren. Überblick über die TLR Expression und deren natürliche Liganden.

In den letzten Jahren hat sich allerdings gezeigt, dass TLRs auch in anderen Geweben exprimiert werden. Untersuchungen mittels RT (reverse Transkriptase)-PCR an primären Zellen des zentralen Nervensystems zeigen, dass Mikrogliazellen, die TLRs 1-9 exprimieren (Bsibsi *et al.*, 2002). Astrozyten und Oligodendrozyten hingegen exprimieren nur die Rezeptoren 2 und 3 (Bsibsi *et al.*, 2002; Farina *et al.*, 2005). Auch in atherosklerotischen Läsionen zeigen immunhistologische Untersuchungen, dass TLR1/2 und 4 in relativ hohem Maße exprimiert werden und

TLR3 und 6 in geringerem Ausmaß. Tabelle 3 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Zellen, die TLRs exprimieren und deren natürliche Liganden.

1.3.2. Überblick über die Signaltransduktion von Toll-like Rezeptoren

Von einigen TLRs ist bekannt, dass sie mit anderen Proteinen interagieren müssen, um eine Signaltransduktion auszulösen. TLR4 benötigt das sekretierte Glykoprotein MD-2 zur Induktion einer LPS induzierten Signaltransduktion (Shimazu *et al.*, 1999). TLR2 hingegen bildet Dimere mit TLR1 oder TLR6 aus. Nach der Bindung des Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung der intrazellulären TIR-Domäne, so dass verschiedene Adaptermoleküle binden können. In Bezug auf ihre Signalweiterleitung können die Toll-like Rezeptoren in zwei bzw. drei Gruppen eingeteilt werden (siehe Abb. 7). Die zentralen Adaptermoleküle der TLR Signaltransduktion sind MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88) und TRIF (TIR domain-containing adapter inducing interferon). Die große Gruppe der TLRs (1/2/4/5/6/7/8/9) leitet die Signale über MyD88 weiter (MyD88 abhängiger Weg). Das Adapterprotein MyD88 führt zu einer Aktivierung mehrerer Kinasen. Eine der wichtigsten ist TRAF-6 (TNF-receptor associated factor 6), die dann über weitere Schritte zum einen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt und zum anderen den MAP-Kinase Weg aktiviert. Dieser Weg führt unter anderem zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (aktivierendes Protein-1). Die Aktivierung des MyD88-abhängigen Wege führt zur Produktion vieler proinflammatorischer Cytokine und Chemokine wie TNF- α , IL-1 und IL-6.

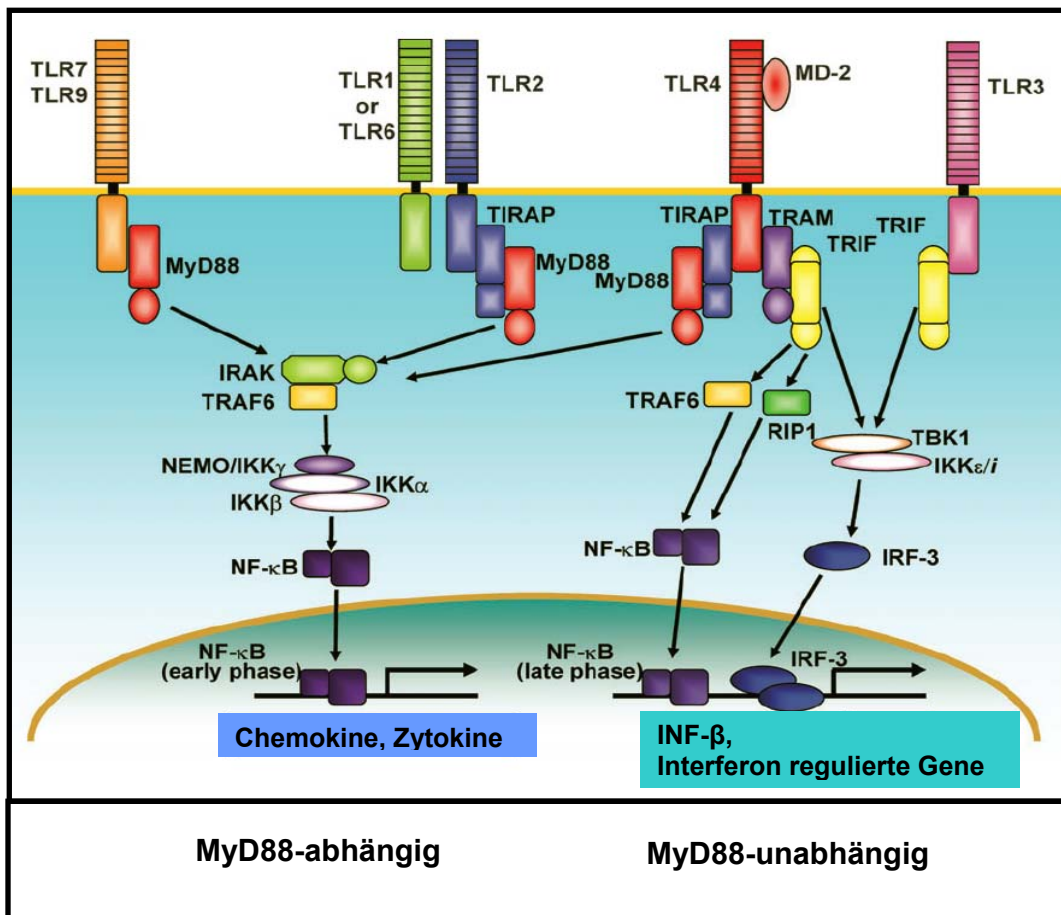


Abb.7: TLR-vermittelte Signaltransduktion: Diese Abbildung gibt einen Überblick über die primäre Signalweiterleitung die durch die Aktivierung von TLRs in der Zelle ausgelöst wird. Dabei unterscheidet man die Signalweiterleitung in zwei verschiedene Wege: den MyD88-abhängigen und den MyD88-unabhängigen Weg. Beide Wege führen zu einer Induktion NF-κB induzierter Gene. Allerdings kommt es beim MyD88-abhängigen Weg zu einer schnellen Antwort, durch die Zytokine und Chemokine induziert werden. Bei der MyD88-unabhängigen Antwort, welche über das Adapterprotein TRIF vermittelt wird, kommt es zu einer verzögerten Aktivierung von NF-κB und IRF-3 (aus Takeda und Akira, 2005).

TLR3/10/11 hingegen leiten die Signale über den MyD88-unabhängigen Weg über das Adapterprotein TRIF weiter. Durch die Aktivierung von TRIF können in der Zelle mehrere Dinge geschehen. Hauptsächlich kommt es zur Sekretion von Typ-1 Interferonen über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 (Interferon regulating factor-3). Dieser führt zu einer Aktivierung von Typ-1 Interferongenen, zu denen unter anderem Interferon-α und -β gehören. Interferone ihrerseits können auf der Zelloberfläche an den Interferon-Rezeptor-1 binden und so in einem zweiten Schritt über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT1 und 2 zur Expression von IRF-1/7 führen. Über das Adapterprotein TRIF kann aber auch eine Verbindung zum MyD88-abhängigen Weg der Signaltransduktion erfolgen, da es in der Lage ist TRAF-6 zu aktivieren und somit den „NF-κB-Weg“ in Gang zu setzen. Der Rezeptor TLR4 ist als einziges Mitglied der TLR-Familie keiner dieser Gruppen zuzuordnen,

denn von ihm ist bekannt, dass er über die Adaptermoleküle TIRAP und TRAM Signale sowohl über den MyD88-unabhängigen als auch den MyD88-abhängigen Weg weiterleiten kann. Da eine Korrelation zwischen der TLR3- und der ApoJ-Expression gezeigt worden war (Baiersdörfer, Dissertation), soll auf diesen Rezeptor noch einmal näher eingegangen werden.

1.3.3. TLR3

Der TLR3 gehört zu den Nucleinsäure-bindenden Rezeptoren und ist hauptsächlich endosomal lokalisiert. Seine physiologische Funktion ist die Immunabwehr von viralen Infektionen. Er erkennt dsRNA (doppelstängige RNA) aus Viren (Alexopoulou et al., 2001). Als synthetischer Induktor von TLR3 ist poly (I:C) (p I:C) beschrieben worden, das zu einer wesentlich stärkeren Geninduktion führt als virale dsRNA. Als natürliche Induktoren von TLR3 sind neben Rheo- und Rotaviren auch Influenzaviren und MCMV (muriner Cytomegalovirus) bekannt (Guillot et al., 2005; Tabeta et al., 2004). Aber auch nicht virale dsRNA ist in der Lage TLR3 zu aktivieren. RNA isoliert aus Eiern von *Schistosoma mansoni* und RNA aus nekrotischen Zellen führen ebenfalls zu einer TLR3 vermittelten Geninduktion (Aksoy et al., 2005; Brentano et al., 2005). Die Expression von TLR3 ist wie bei allen andern TLRs zelltypspezifisch. Er wird auf vielen Epithelien exprimiert, wie auf vaskulären, bronchialen und uterinen Endothelzellen, aber auch auf Astrozyten und Fibroblasten (Hopkins und Sriskandan 2005; Schaefer et al., 2004; Farina et al., 2004; Brentano et al., 2005). Bei den Zellen des Immunsystems ergeben sich unterschiedliche Expressionsmuster bei Menschen und Mäusen. Bei Mäusen wird TLR3 hauptsächlich auf Makrophagen exprimiert, beim Menschen hingegen hauptsächlich auf DC (Dendritischen Zellen) (Sen und Sarkar 2005).

Da es sich um einen endosomal exprimierten Rezeptor handelt, werden Mechanismen benötigt, wie dsRNA in die Endosomen gelangt. Ganz neue Untersuchungen zeigen eine Abhängigkeit der poly (I:C)-vermittelten TLR3 Induktion von CD14 (Lee et al., 2006). Von CD14 war bislang nur bekannt, dass es an den Komplex aus LPS und LBP (LPS bindendes Protein) bindet und dann mit TLR4 in Wechselwirkung tritt. Anscheinend ist CD14 aber auch an der Internalisierung von poly (I:C) beteiligt, ein genauer Mechanismus ist allerdings noch nicht bekannt.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Da bekannt ist, dass ApoJ unter vielen pathophysiologischen Bedingungen und speziell in atherosklerotischen Läsionen vermehrt exprimiert wird, sollte in dieser Arbeit eine mögliche Funktion für ApoJ bei Atherosklerose erarbeitet werden. In Kooperation mit Prof. Bhakdi (Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinik Mainz) sollte die Rolle von ApoJ bei der Atherosklerose untersucht werden, wobei die Theorie der „Mainzer Hypothese“ zu Grunde gelegt werden sollte. Sie geht davon aus, dass enzymatisch modifiziertes LDL (E-LDL) das entscheidende Molekül ist, das zur Entstehung von atherosklerotischen Läsionen führt. Da bereits gezeigt worden ist, dass ApoJ in atherosklerotischen Läsionen kolokalisiert mit Lipiden vorkommt, sollte untersucht werden, ob ApoJ in der Lage ist an E-LDL zu binden. Von vielen Arbeitsgruppen wird diskutiert, dass es sich bei ApoJ um ein Molekül mit antiapoptotischen Eigenschaften handelt. Daran anknüpfend sollte untersucht werden, ob ApoJ in der Atherosklerose eventuell ebenfalls eine antiapoptotische Funktion aufzeigt. Des Weiteren sollte die Regulation von ApoJ in glatten Gefäßmuskelzellen durch nekrotische Zellen und E-LDL untersucht werden und mögliche Wege der Signalweiterleitung aufgezeigt werden. Beide Komponenten, nekrotische Zellen und E-LDL, sind nachweislich in großen Mengen in atherosklerotischen Läsionen vorhanden. Arbeiten unserer Arbeitsgruppe haben bereits gezeigt, dass eine Inkubation von nekrotischen Zellen in Rattenfibroblasten und glatten Muskelzellen der Ratte zu einer vermehrten ApoJ-mRNA Expression führt (M. Baidersdörfer, Dissertation). Die Ergebnisse von M. Baidersdörfer zeigen außerdem eine Korrelation zwischen der ApoJ-mRNA-Expression und der Expression von Toll-like Rezeptoren bei verschiedenen Zelllinien auf. Des Weiteren konnte mit TLR-spezifischen Liganden gezeigt werden, dass eine besonders starke ApoJ-mRNA Expression durch den TLR3 spezifischen Liganden poly (I:C) erzielt werden kann. Darauf aufbauend sollte durch Gentransfer in rezeptornegative Zellen untersucht werden, ob die ApoJ-mRNA Induktion durch nekrotische Zellen auch eine TLR3 vermittelte Regulation ist. Weiter sollte untersucht werden, über welchen intrazellulären Signaltransduktionsweg diese Regulation erfolgt und ob die Erhöhung der mRNA-Expression durch nekrotische Zellen auch eine vermehrte Sekretion des Proteins zur Folge hat.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

Zentrifugen	Hettich-Universal 16R Sigma 3K15 Bioblock Scientific Ultrazentrifugen (Beckmann) Eppendorf
Speed Vac- Konzentrator	Univapor UVC 150 H
Spektralphotometer	U-2000 Spectrophotometer, Hitachi
Quarzküvetten	
Spannungsgerät	Elektrophorese-Powerpack P24, Biometra
Elektrophoresekammern	SDS-Gele: Bio-Rad (Mini-Protean II mit Zubehör) AGS, Heidelberg / RNA-Gele
Mikrowelle	Micro-Chef FM 2910 Q, Moulinex
Schütteltisch	GFL 3018
Geldokumentation	Hitachi MG 5/93 Video Copy Processor, Mitsubishi Cybertech CS 1 Kamera: Faichild AX-0051 Digital: raytest, Isotopenmessgeräte GmbH, Staubenhardt
Waagen	Sartorius AG Göttingen
Mikroskop	Hund Wilovert S, Wetzlar Leitz, LaboluxS Kamera: Digitalkamera Olympus
Wasserbäder	GFL 1003 Julaboc F20
PCR-Prozessor	Uno-Thermoblock , Biometra Perkin Elmer Cetus, DNA Thermal Cycler
Heizblock	Fischer Bioblock Sincetific
Hybridisierungsöfen	Bachofer
Hybridisierungsröhren	Bachofer
UV-Crosslinker	UV Stratalinker 1800, Stratagene
BAS-Reader	BAS-1800, Fujifilm
Expositionskassetten	U Cassette, Cavo

Phosphoimagingsscreens	Imaging Plate Bas-Mp 2025, Fujifilm
Eraser	Raytest
Brutschrank (Zellkultur)	Binder
Laminar-Flow-Bank	BDK UVF 6.12S
Pipettierhilfe (elektrisch)	Pipetus-Akku, Hirschmann Pipetus-classic, Hirschmann
Vortexer	VF2, Janke&Kunkel
Röntgenkassetten	Kodak X-Omatic Cassette
Elisareader	Titertak Muliskan
Semidry-Blotter	Schleicher und Schüll
Luminometer	Micro Lumat 96P (Berthold Technologies)

2.1.2. Chemikalien und Kits

2.1.2.1. Chemikalien

Agarose	Agarose MP, Roche
Bicoll	Biochrom
¹⁴ C Linolsäure	Perkin Elmer
α- ³² P-dCTP	Perkin Elmer
CAPE	Alexis
DEPC	Roth
Hyp-Puffer	Rapid hyp Puffer, Amersham
Interferon-β (Ratte, rekombinant)	Sigma
Methimazole	Sigma
PCR- Wax	MJ Research
Percoll	Amersham Biosciences AB
Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol	AppliChem
poly (I:C)	Calbiochem
Protein-A-Sepharose	Amersham
Transfektionsreagenz	Fugene, Roche
Zellkultur	Alle Medien und Medienzusätze wurden von Biochrom bezogen

Alle übrigen Chemikalien, wie Salze oder Puffer, wurden von Roth oder Sigma bezogen.

2.1.2.2. Kits

Annexin-V	BD ApoAlert-Annexin-V-EGF Apoptosis Kit, BD Biosciences
Caspasemessung	Caspase-Glo 3/7-Reagenz, Promega
Cholesterinmessung	Cholesterin CHOD-PAP, Roche
Coomassie	Coloidal Blue staining Kit, Invitrogen/Novex
Il-6 Elisa	Immunotools
Plasmidisolierung	Plasmid midi und mini Kit, Quiagen
Proliferationsassay	CellTiter 96 Aqueous, Promega
Sondenmarkierung	High prime Kit, Roche

2.1.3. Enzyme

Cholesterinesterase	Roche
Plasmin	Calbiochem
Reverse Transkriptase	Superscript II, Invitrogen
Taq Polymerase	Hot start mix, Quiagen
RNaseA	Roche

2.1.4. Antikörper

Anti-ApoJ recomb. Rate	Hergestellt von M. Bartel, Bleed 2/2 oder 1/2
Anti-ApoJ/MDCK	Hergestellt von Frau Prof. Koch-Brandt (302)
Anti-rabbit-AP-gekoppelt	Sigma
Anti-rabbit-HP-gekoppelt	Cell signaling, Technology
Anti-FLAG M2	Sigma

2.1.5. Primer

Bezeichnung	Sequenz	Firma
TLR3-Forward	5'GGAGGGTCTTGAGAATCTAG 3'	MWG
hTLR3-Reverse	5'TCCTTATCTTTATAGGCATG 3'	MWG
hGAPDH-Forward	5'GAAGGGCTCATGACCACA 3'	MWG
hGAPDH-Reverse	5'TCATTGTCGTACCAGGAAATG 3'	MWG

2.1.6. Verbrauchsmaterialien

Eppendorf-Reaktionsgefäße 0.2ml, 0.5ml, 1.5ml, 2.0ml	Eppendorf
Filterpapier 3MM	Schleicher und Schüll
Kryoröhrchen	Greiner, Solingen
Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schüll
Nylonmembran, positiv geladen	Roche
Pipettenspitzen	Greiner, Solingen
Plastikröhrchen 15ml, 50ml	Greiner, Solingen
Röntgenfilme	Amersham Hyperfilm
Sephadex G-25M	Amersham
Sterilfilter	Schleicher und Schüll
Sterilspitzen	Biochrom
Ultrafilter: 50kDa	Amicon/Milipore
Ultrazentrifugenröhrchen 40ml geschlossen und 5ml offen	Konrad Beranek Laborgeräte
Zellkulturflaschen: mittel (250ml) Groß (600ml)	Greiner, Solingen
Zellkulturschalen	Greiner, Solingen

2.2. Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar-Flow-Bank durchgeführt, um eine Kontamination durch Pilze oder Bakterien zu verhindern. Alle Lösungen und Pipetten wurden vor Gebrauch sterilisiert. Die Medien wurden nur unter der Sterilbank geöffnet und vorher mit 70% Ethanol abgewischt. Ebenso wurden die Einweghandschuhe vor Arbeitsbeginn mit 70% Ethanol desinfiziert.

Die Zellen wurden in Kulturflaschen in Kulturmedium (große Kulturflasche 25ml, 182cm²; mittlere Kulturflasche 20ml, 75cm²), bei 37°C und einem CO₂-Partialdruck von 5% kultiviert. Wenn die Zellen eine Konfluenz von 100% erreicht hatten wurden sie in neue Kulturgefäße passagiert. Die Zellen wurden alle 3-5 Tage 1:10 passagiert. Da das Medium an Wachstumsfaktoren verarmte, erfolgte alle 2-3 Tage ein Mediumwechsel. Dafür wurde das alte Medium komplett abgezogen, die Zellen 2x mit 10ml PBS gewaschen und anschließend neues Medium hinzugefügt.

2.2.1.1. Zelllinien

Rat-1: embryonale Fibroblasten-Zelllinie aus der Fischer-Ratte; Sie wurden für die Untersuchungen zur ApoJ Regulation verwendet.

CRL-2018: Glatte Muskelzellen aus der Aorta der Ratte; Alle Experimente, die im Rahmen der Untersuchungen zur Bedeutung von ApoJ bei Atherosklerose durchgeführt wurden, wurden an diesen Zellen untersucht.

MDCK: (Madine Darby Canine Kidney) epitheliale Nierentubuluszellen; MDCK-Zellen wurden zur Herstellung von konditioniertem Medium verwendet.

10A-Zellen: murine embryonale Dottersackzellen; TLR3-negative Zelllinie, sie wurde zur Untersuchung der TLR3 abhängigen ApoJ Regulation verwendet.

2.2.1.2. Einfrieren der Zellen für Dauerkulturen:

Zum Einfrieren wurden die Zellen in einer großen Kulturflasche kultiviert, bis sie zu 100% konfluent waren. Das Kulturmedium wurde komplett entfernt und die Zellen 3x mit PBS gewaschen, trypsinisiert mit einem Gemisch aus Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraacetat) in 10ml Kulturmedium aufgenommen und 10min bei 800Upm sedimentiert. Das Sediment wurde in 6ml Einfriermedium aufgenommen und in 6 Kryoröhrchen aufgeteilt. Damit möglichst wenige Zellen beim Einfrieren beschädigt wurden, war es nötig den Temperaturabfall so langsam wie möglich zu gewährleisten. Deshalb wurden die Zellen in eine mit Eis gefüllte Styroporbox gegeben und über Nacht in die -80°C-Truhe gestellt. Am darauf folgenden Tag wurden sie ausgepackt und auf -80°C oder Stickstoff gelagert.

2.2.1.3. Auftauen von Zellen:

Die Zellen wurden so schnell wie möglich aufgetaut und in 10ml Kulturmedium aufgenommen. Um das für die Zellen giftige DMSO zu entfernen, wurden die Zellen sedimentiert in 10ml frischem Medium resuspendiert und in eine mittlere Kulturflasche überführt. Nach dem Auftauen wurde das Medium schon nach 24 Stunden gewechselt.

2.2.1.4. Zellen passagieren:

Wenn die Zellen zu 100% konfluent sind und sich deshalb nicht mehr uneingeschränkt teilen können, müssen sie gesplittet werden, da sie sonst ihre Form verändern und ihre Teilungsfähigkeit verlieren. Je nach Zelllinie war dies alle 4-6 Tag der Fall.

Zum Passagieren wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 5ml einer 0,05%igen Trypsin/EDTA-Lösung trypsinisiert. Die Trypsinlösung wird nach einer kurzen Einwirkzeit wieder abgezogen und die Zellen so lange bei 37°C in den Brutschrank gestellt, bis sich die Zellen vom Boden gelöst haben (ca.2-5min). Die Zellen werden in 10ml Medium durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Zum Weiterkultivieren werden 1ml Zellsuspension mit 20ml Kulturmedium in eine neue mittlere Kulturflasche überführt (1:10 gesplittet).

Für die Versuche zur Untersuchung der ApoJ-Genregulation wurden die Zellen in Kulturschalen ausgesät. Dazu wurden die Zellen nach dem Vereinzeln in ein Greinerröhrchen gegeben und anschließend 5min bei 800Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und die Zellen in 10ml Kulturmedium aufgenommen.

2.2.1.5. Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer:

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden die Zellen nach Entfernen des Mediums 2x mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Anschließend wurden sie in 5ml Kulturmedium aufgenommen und bei 800Upm 5min zentrifugiert. Je nach Pelletgröße wurde das Pellet in PBS aufgenommen und 10µl in die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen von vier großen Quadraten ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Der Mittelwert mal 10000 ergibt die Zellzahl pro ml.

2.2.1.6. Transfektion von 10A Zellen und Herstellung stabiler Klone

Zur Untersuchung der ApoJ Regulation über TLR3 wurden 10A Zellen mit einem TLR3 Expressionsvektor transfiziert. Dieser Vektor wurde mir freundlicherweise von Herrn Dr. Kirschning (LMU, München) zur Verfügung gestellt. Da dieser Vektor nur über eine Ampizillenresistenz verfügt, die zur Vermehrung in Bakterien notwendig ist, wurden die Zellen zusätzlich mit einem weiteren Vektor, der zur Selektion positiver Zellklone nötig war,

transfiziert. Dieser Selektionsvektor (pTER von Clontech) verleiht den Zellen nach der Integration ins Genom eine Resistenz für das Antibiotikum Zeocin.

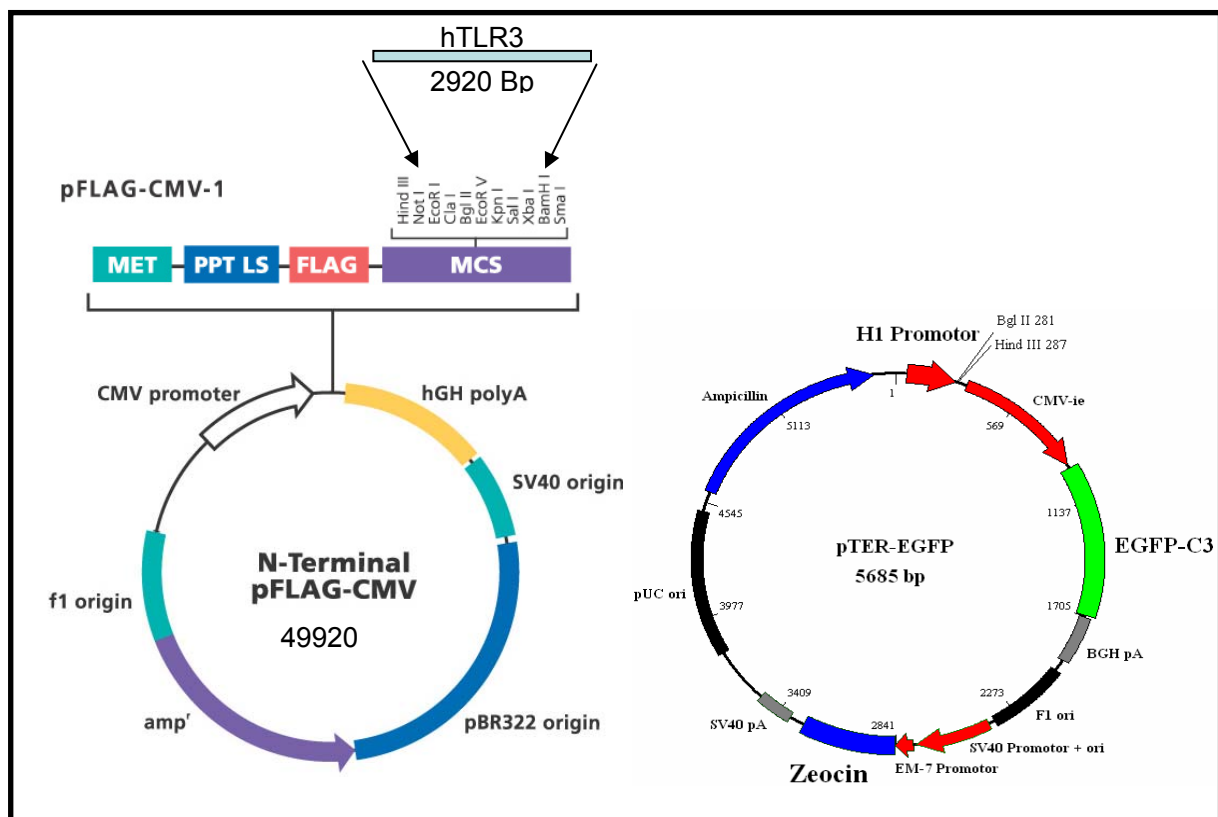


Abb.8: Vektorkarten

2.2.1.6.1. Herstellung kompetenter Zellen und Transformation von Bakterien

Die für die Transfektion erforderlichen Vektoren wurden zur Vermehrung in *E. coli* Bakterien des Stammes xl1-blue transformiert. Dazu wurden die Bakterien mittels der CaCl_2 Methode kompetent gemacht. Mit den Bakterien einer Übernachtskultur wurde ein 10ml Kolben mit LB-Medium angeimpft. Die Bakterien wurden bis zu einer OD 0.5-0,7 bei 600nm wachsen gelassen. Danach wurden sie in 1,5ml Eppis verteilt und schonend bei 2000upm und 4°C abzentrifugiert. Das Medium wurde verworfen und das Pellet in 1ml kalten 0,1M CaCl_2 vorsichtig resuspendiert. Die Bakterien wurden wiederum abzentrifugiert und der Vorgang wiederholt. Danach wurden sie mindestens 30min auf Eis gestellt. Zur Transformation wurden sie wieder abzentrifugiert und in 200 μl CaCl_2 aufgenommen und in ein vorgekühltes 15ml Greiner überführt. Nun wurde der Vektor (1 μg DNA) zugegeben und wieder 30min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42°C . Die Bakterien wurden sofort wieder für 5min auf Eis gestellt und danach 1ml vorgewärmtes SOC- Medium zugegeben. Der Transformationsansatz wurde 1h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert und in 300 μl LB-Medium wieder aufgenommen. Sie wurden in zwei unterschiedlichen Konzentrationen auf LB/Amp-Platten ausgesät und über

Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit einzelnen Klonen eine Übernachtkultur angeimpft. Aus dieser Kultur wurden eine Mini-Plasmid Präparation mit einem Kit von Quiagen (Plasmid Mini Kit) nach Angaben des Herstellers durchgeführt und die Plasmide zur Sequenzierung zur Firma Genterprise (Mainz) gegeben. Nach einem positiven Ergebnis der Sequenzierung wurde von einem Klon eine Midi-Plasmid Präparation gemacht. Dazu wurde ebenfalls ein Kit der Firma Quiagen verwendet (Plasmid Midi Kit).

Lösungen:

- LB Medium:

Trypton	10g/l
Hefe Extrakt	5g/l
NaCl	10g/l
- LB-Platten:

Wie LB Medium mit	
15g Agar/l	
- SOC Medium

Trypton	20g/l
Hefe Extrakt	5g/l
NaCl	0,5g/l
KCl (250mM)	10ml/l
MgCl ₂ (2M)	5ml/l
Glucose (1M)	20ml/l

2.2.1.6.2. Transiente Transfektion

Für die Versuche mit transient transfizierten Zellen wurden die Zellen in 6cm Schalen ausgesät und 24h wachsen gelassen, bis sie ca. 40% konfluent waren. Die Zellen wurden für 24h mit 1µg DNA in serumhaltigem Medium mit dem Transfektionsreagenz Fugene (Roche) transfiziert und anschließend für 12h serumfrei gesetzt. Die Behandlung mit den verschiedenen Proben (poly (I:C) und nekrotische Zellen) erfolgte für 16h. Um das Vorhandensein von TLR3 zu überprüfen, wurden die Zellen mittels RT-PCR (reverse Transkriptase) untersucht. Dazu wurde 5µg der für die Northern-Blot Analysen isolierten RNA (Siehe Abschnitt: 3.8.1.) für eine RT-PCR eingesetzt. Sie wurde mit dem Enzym SuperscriptII von Invitrogen unter der Verwendung von Hexanucleotiden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die anschließende PCR wurde mit Primern für den humanen TLR und GAPDH als interne Kontrolle der PCR durchgeführt. Für die PCR wurde der Hot start Mix von Quiagen verwendet.

Für die darauf folgende Gelelektrophorese wurden 1%ige Agarosegele gegossen und 0,5xTBE-Puffer (Tris Borsäure EDTA) verwendet.

PCR-Programm:**PCR-Ansatz:**

Time Delay File	15 min bei 94°C	GAPDH-Primer F	1,5 µl (10pmol)
Step Cycle File	50 sec bei 94°C 50 sec annealing Temp. (56°C) 1 min 72 °C	GAPDH-Primer R	1,5 µl (10pmol)
		hTLR3-Primer F	1,5 µl (10pmol)
		hTLR3-Primer R	1,5 µl (10pmol)
		Hot start Mix	12,5µl
Time Delay File	10 min bei 72°C	Erststrang (cDNA)	2,5µl
Soak File	4°C bis zum Ausschalten	ddH ₂ O	5µl

Es wurden noch 35µl PCR-Wachs auf jede Probe gegeben.

Lösungen und Chemikalien:

- TBE-Puffer: Tris Borsäure EDTA
Zusammensetzung der 10x Stammlösung:
Tris HCL 108g/
Borsäure 55g/l
0,5M EDTA, pH 8,0 20ml/l
- Agarose Roche
- Ethidiumbromid
- Wax
- Hexanucleotide GenTech, Mainz
- SuperscriptII Invitrogen
- Hot start Mix Quiagen

2.2.1.6.3. Herstellung stabiler Zellklone

Die Transfektion der Zellen mit den beiden Vektoren, dem Selektionsvektor und dem TLR3-Expressionsvektor erfolgte im Verhältnis 1:10. Der Expressionsvektor für TLR3 wurde also 10mal mehr zugegeben. Damit sollte gewährleistet werden, dass alle Zellen, die eine Resistenz gegen Zeozin aufweisen (also den Selektionsvektor aufgenommen haben), sehr wahrscheinlich auch den TLR3-Vektor aufgenommen haben. Die Transfektion erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Fugene von Roche nach Angaben des Herstellers. Dafür wurden die Zellen in 10cm Schalen ca. 60% konfluent wachsen gelassen und für 24h mit dem Transfektionsansatz behandelt. Danach wurden die Zellen auf Kulturmedium mit 800µg/ml Zeozin zu Selektion gesetzt. Das Medium wurde jeden Tag gewechselt, da am Anfang sehr viele Zellen abstarben. Nach ungefähr 9 Tagen veränderte sich die Zellzahl nicht mehr und es wurden Einzelkolonien sichtbar, die mit Hilfe von Klonierungsringen (kleine Metallringe,

die über die Kolonien gestülpt wurden) geerntet und in eine 96 Well Platte überführt. Die Zellen wurden weiterhin auf Selektionsmedium gehalten und die Zellen, die sich nach ungefähr 2 Wochen vermehrt hatten, wurden in eine 6 Well Platte überführt. Die Konzentration von Zeozin wurde verringert auf 200µg, damit sich die Zellen besser teilen können. Am Schluss wurden 6 Klonen auf ihre TLR3 Expression hin untersucht.

Da TLR3 in den Zellen nur in geringem Maße expremiert wird, wurde vorher eine Immunpräzipitation (IP) mit einem anti-FLAG-Antikörper (α -Flag-M2, Sigma) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen einer konfluenten 6cm Schale in Lysis-Puffer geerntet und jeweils 1000µg Protein für die IP eingesetzt. Die Proben wurden mit Lysis-Puffer auf 1ml Volumen aufgefüllt und mit 3µl Antikörper versetzt. Die Präzipitation erfolgte bei dauernder Rotation über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Antikörper-Protein-Komplexe an Protein-A-Sepharose-Kügelchen gebunden (Rotation bei 4°C für eine Stunde). Diese bindet an die schwere Kette von Antikörpern. Die Protein-Antikörper-Sepharose-Komplexe lassen sich nun ganz einfach durch Zentrifugation gewinnen. Die Komplexe wurden einmal mit Lysis-Puffer und zweimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend in 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Durch Erhitzen auf 95°C wurden die Proteinkomplexe von den Sepharose-Kügelchen getrennt und direkt auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen und geblottet (siehe Abschnitt: 3.4.3.).

Materialien und Lösungen:

- Lysis-Puffer

10mM	Tris-HCl, pH7,4
150mM	NaCl
1mM	EDTA
1%	NP-40
- SDS-Probenpuffer

siehe Abschnitt :3.4.3.	
-------------------------	--
- IP-Puffer:

50mM	Tris, pH7,5
150mM	NaCl
1mM	MgCl ₂
1mM	CaCl ₂
1%	Triton
- Wasch-Puffer

Lysis-Puffer+0,1% Triton	
--------------------------	--

2.2.1.7. Herstellung von konditioniertem MDCK-Medium:

MDCK-Zellen sezernieren ungewöhnlich viel ApoJ in das Medium (ca.80%). Für die Bindung von ApoJ an E-LDL wurde ApoJ aus konditionierten Überstand verwendet. Eine konfluente Flasche Zellen wurde zweimal mit PBS gewaschen und 1\2 Stunde mit serumfreiem Medium inkubiert, um möglichst alle Serumrückstände zu entfernen. Anschließend wurde das

Medium abgenommen und durch 12ml neues serumfreies Medium ersetzt. Das Medium wurde für 24h konditioniert. Danach wurde das Medium durch einen 50kDa Ultrafilter fünfmal aufkonzentriert, wodurch auch das zweite Protein, welches MDCK Zellen in großen Mengen sezernieren, abgetrennt wurde. Es handelt sich hierbei um Osteopontin (ca. 20kDa). Das Konzentrat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C weggefroren.

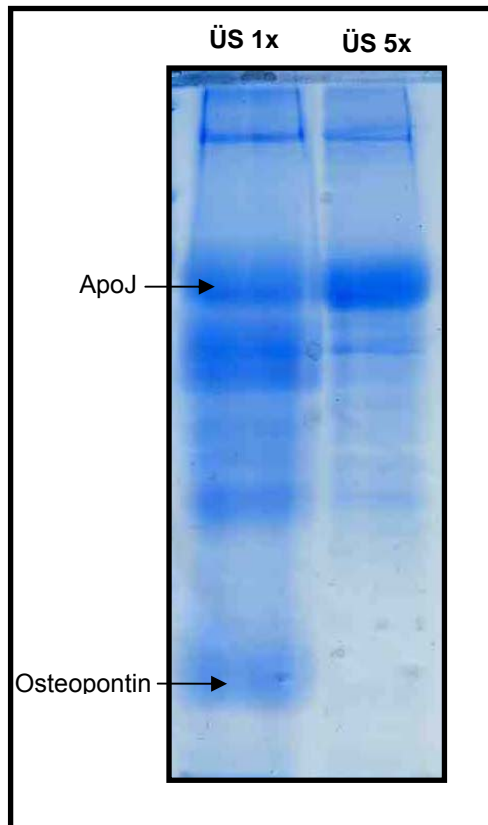


Abb.9: SDS-PAGE von konditioniertem MDCK-Überstand vor und nach der Ultrazentrifugation über einen 50kDa Filter. Der Zellkulturüberstand wurde durch die Ultrazentrifugation fünfmal aufkonzentriert und gleichzeitig von dem zweiten, stark sekretierten Protein Osteopontin befreit ; ÜS= Überstand.

Materialien und Lösungen:

- Serumfreies MDCK-Medium: Zusammensetzung siehe Abschnitt Zellkultur MDCK-Medium nur ohne Serum
- PMSF: Phenylmethylsulfonylfluorid
- Ultrafilter 50kDa Ausschlussgröße von Millipore

2.2.2.8. Präparation von nekrotischen Zellen und zytoplasmatischen Komponenten (100.000g Überstand):

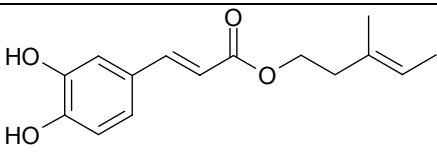
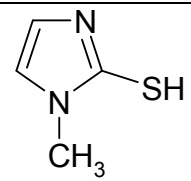
Zur Herstellung von nekrotischen Zellen wurden Rat-1 Zellen in große Kulturschalen ausgesät und wachsen gelassen, bis sie zu 100% konfluent waren. Die Zellen wurden gewaschen, trypsinisiert und in serumfreiem Medium aufgenommen. Um letzte Rückstände von FKS zu beseitigen, wurden die Zellen noch einmal abzentrifugiert und wieder in serumfreiem Medium aufgenommen. Anschließend wurden sie ausgezählt, die Zellzahl auf

$1 \cdot 10^7$ Zellen/ml eingestellt und aliquotiert. Die Zellen wurden durch fünfmaliges Einfrieren in Stickstoff aufgebrochen und dann bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Für die Präparation von 100.000g Überstand wurden die Zellen nach dem Aufbrechen noch für eine Stunde bei 100.000g und 4°C zentrifugiert und der Überstand bei -80°C eingefroren. Bei 100.000g pelletieren alle Membranfragmente und Organellen und man erhält im Überstand alle im Zytosol befindlichen Bestandteile.

2.2.1.9. Stimulierung der Zellen :

Für die Versuche zur Untersuchung der ApoJ-Regulation mittels Northern Blot Analyse wurden die Zellen wie folgt behandelt: Sie wurden in ein 10cm Kulturschale ausgesät und 24h bis zu einer Konfluenz von ca. 70% wachsen gelassen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden sie für weitere 24h auf serumfreies Medium gesetzt und danach stimuliert. Die Inkubation der Zellen erfolgte mit Ausnahme der CAPE-Versuche für 16h.

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick, in welchen Konzentrationen die verschiedenen Substanzen eingesetzt wurden.

	Konzentration	Struktur	Funktion
poly(I:C)	50 $\mu\text{g/ml}$		Spez. Ligand für TLR3
CAPE	12,5 $\mu\text{g/ml}$		Inhibitor von NF- κB
Methimazole	10 $\mu\text{g/ml}$		Inhibiert TLR3-induzierte Signaltransduktion über IRF-3
Interferon- β	500 units		induziert INF-Rezep.
Nekrotische Zellen	1×10^6 Zellen/ml		
100.000g Überstand	aus 1×10^6 Zellen/ml		
LDL/E-LDL	50 $\mu\text{g/ml}$		

2.2.3.10. Zellvitalitätsbestimmung mittels MTS-Assay

Da für die Bestimmung der ApoJ-Sekretion mittels Western Blot gewährleistet werden musste, dass sich die Zellzahl zwischen den verschiedenen Ansätzen während des

Versuches nicht verändert, wurde ein Zellvitalitätsassay durchgeführt. Dafür wurde ein Reagenz (CellTiter 96 AQueous) der Firma Promega verwendet. Es beruht auf dem Prinzip, dass metabolisch aktive Zellen das Substrat MTS([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfphenyl)-2H-tetrazolium]) umsetzen. Dieses Substrat wird durch die zelleigenen Reduktionsäquivalente NADH und NADPH zu wasserlöslichem Formazan umgesetzt. Dieses kann dann in einem Plattenreader bei 492nm gemessen werden. Die gemessene Extinktion ist direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen. Für den Versuch wurden die Zellen in 96 Well-Platten ausgesät. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach den Angaben der Firma.

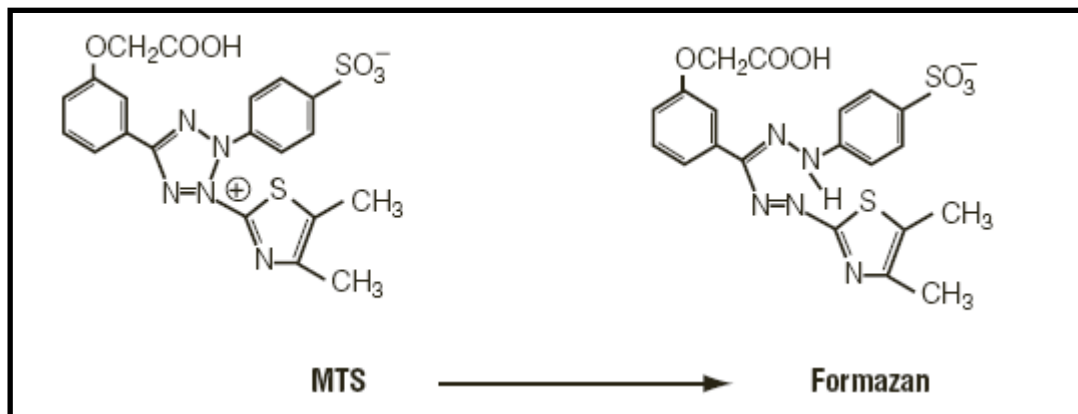


Abb. 10: Prinzip des MTS-Assays von Promega

2.2.1.11. Untersuchungen zum Transfer von freien Fettsäuren mittels ¹⁴C-markierter Linolsäure

Für die Untersuchungen zum Fettsäuretransfer in glatte Muskelzellen wurden 100-200µl E-LDL für 30 Minuten mit 10µl ¹⁴C-markierter Linolsäure inkubiert. Um die überschüssige, nicht E-LDL-assoziierte Linolsäure abzutrennen, wurde die Probe, wie in 3.2.4. beschrieben, über einen Dichtegradienten aufgereinigt. Die CRL-2018 Zellen wurden in eine 96-Well Platte ausgesät und bis zu 70% Konfluenz wachsen gelassen. Die Inkubation mit dem markierten E-LDL erfolgte für 5-60min. Danach wurde die Probe abgenommen, 2mal mit PBS gewaschen und die Zellen in SDS-Lysis-Puffer lysiert. Die Probe wurde komplett in ein Szintilisationsröhrchen mit 5ml Szintilisationsflüssigkeit überführt und gemessen.

2.2.1.12. Kulturmedien und Lösungen:Kulturmedium für Rat-1-Zellen:

385ml	ddH ₂ O
50ml	10x DEMEM mit 4,5g/l Glucose
10ml	L- Glutamin (200 mM)
25ml	FKS
5ml	Penicillin / Streptomycin 10000U/ml
25ml	7,5% NaHCO ₃

Kulturmedium für CRL 2018 Zellen:

370ml	ddH ₂ O
50ml	Dulbecco's MEM
50ml	ΔFKS
20ml	7,5% NaHCO ₃
5ml	Penicillin / Streptomycin U/ml
10ml	L-Glutamin (200 mM)

Kulturmedium für MDCK-Zellen:

390ml	ddH ₂ O
5ml	HPES-Puffer, pH7,5
5ml	L- Glutamin (200 mM)
50ml	10x MEM Earl's
25ml	FKS
5ml	Penicillin / Streptomycin 10000 U/ml
5ml	100x NEA (Non Essential Aminoacids)
15ml	7,5% NaHCO ₃

Trypsin/EDTA-Lösung:

0,5%	Trypsin
0,2%	EDTA in PBS

PBS (1000ml):

8g	NaCl
0,20g	KCl
115g	Na ₂ HPO ₄
0,20g	KH ₂ PO ₄

Einfriermedium:

FKS mit 10% (v/v) DMSO

2.2.2. LDL-Präparation**2.2.2.1 Präparation von LDL aus humanem Plasma**

Das LDL wurde aus humanem Plasma, welches von der Blutbank der Uni-Klinik Mainz zur Verfügung gestellt wurde, isoliert. Die Präparation erfolgte über einen Kaliumbromid Dichtegradienten und anschließender Dialyse zur Entfernung des KBr. Diese Aufreinigung folgt nach der von Havel *et al.* 1955 veröffentlichten Prozedur.

Die Aufreinigung dauerte ungefähr eine Woche. Drei Tage für die Isolierung und 4 Tage Dialyse der Probe.

Am ersten Tag wurde das Volumen der Plasmakonserven bestimmt und nach nachstehender Formel die Menge an KBr berechnet, die hinzugegeben werden musste.

$$\text{Volumen (Plasma)} * 0,3265 = \text{KBr-Menge (g)}$$

Das KBr wurde vollständig im Plasma gelöst und die Probe auf 16 Ultrazentrifugenröhrchen verteilt. Die Ultrazentrifugenröhrchen wurden erst mit der KBr-Lösung 1 befüllt und anschließend das Plasma mittels einer langen Kanüle langsam unten auf den Boden laufen lassen, so dass die KBr-Lösung 1 nach oben verdrängt wurde. Die Zentrifugation erfolgte für mindestens 16 Stunden bei 45.000 rpm bei 4°C.

Am zweiten Tag erhielt man einen Gradienten, in dem sich ganz oben das LDL befindet. Diese Fraktion wurde von allen Zentrifugenröhrchen mit einer 5ml Spritze vorsichtig abgenommen und vereinigt.

Zur Berechnung der KBr-Menge, die am zweiten Tag hinzugefügt werden musste, wurde am ersten Tag ein Aliquot der unbehandelten Plasmakonserven (1), des Plasmas mit KBr (2) und ein Aliquot der am zweiten Tag gewonnenen Probe (3) aufgehoben und die jeweilige Probendichte bestimmt. Mit folgender Formel wurde die neue Menge an KBr, die zugegeben werden musste, berechnet:

$$1-2=Z$$

$$2-3=Y$$

$$(0,3265 \text{ g/ml} * Y) / Z = \dots \text{g/ml total} * \text{Volumen der neuen Probe} = \dots \text{g KBr}$$

1= Plasma, 2= Plasma+ KBr, 3= Probe nach der Zentrifugation.

Wie am Vortag wurde das KBr in der Probe gelöst und nach demselben Verfahren auf 8 Ultrazentrifugenröhrchen verteilt und zentrifugiert.

Am dritten Tag wurde wieder die oberste (dunkelgelbe) Fraktion abgezogen und vereinigt.

Die Dichte der Probe wurde gemessen und auf 1,15 eingestellt mit folgender Formel:

$$\frac{(1,15\text{-gemessene Dichte}) \cdot 0,3265 \text{ g/ml}}{\text{Probendichte(Vortag)} - \text{neue LDL-Dichte}} = \dots \text{g/ml total} \cdot \text{Volumen der neuen Probe} = \dots \text{g KBr}$$

Die Probe wurde nun mit bekanntem Verfahren auf 4 Ultrazentrifugenröhrchen verteilt, nur dass diesmal die KBr-Lösung-2 zum Aufbau des Gradienten verwendet wurde.

Am vierten Tag wurde die Probe wie gehabt gesammelt und in einen Dialyseschlauch gefüllt. Die Dialyse erfolgte in 5l Dialysepuffer bei 4°C. Am ersten und zweiten Tag wurde der Puffer zweimal gewechselt und am dritten und vierten Tag nur noch einmal.

Zur Überprüfung auf LPS-Kontaminationen wurden Monozyten aus Buffy Coats isoliert und diese über Nacht mit LDL behandelt. Eine Probe wurde als Positivkontrolle mit 1ng LPS/ml behandelt. Am folgenden Tag wurden die Überstände gesammelt, abzentrifugiert und ein IL-6 Elisa durchgeführt (siehe unten). Da Monozyten auf LPS sehr sensitiv mit IL-6 Sekretion reagieren, wurde das LDL nur weiter verwendet, wenn das Signal nicht höher war als bei den unbehandelten Zellen.

Materialien und Lösungen:

- KBr-Lösung-1: 9g/l KBr
 20ml verwerfen
 20ml 5% EDTA
- KBr-Lösung-2: 38,4g/l KBr
 5ml verwerfen
- EDTA-Lösung: 5% EDTA, pH 7
- Dialysepuffer : 3g Tris
 44g NaCl
 0,468g EDTA, pH 7,3-7,4
- Ultrazentrifugenröhrchen für Festwinkelrotor, Volumen 40ml

2.2.2.2. Herstellung von E-LDL

E-LDL ist mit einer Proteinase und Cholesterinesterase verdautes LDL. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit Plasmin hergestelltes E-LDL verwendet. Zu 1ml LDL (Cholesteringehalt (5-9,5mg/ml) wurden 5µl Plasmin (19,3U/ml) gegeben und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 10µl Cholesterinesterase (2mg/ml) zugegeben

und solange bei 37°C geschüttelt, bis eine Trübung erfolgte. Je nach Alter des LDL war dies nach 24-48h der Fall. Die Probe wurde bei 4°C bis zu zwei Wochen gelagert.

Materialien und Lösungen:

- Cholesterinesterase (2mg/ml)
- Plasmin (19,3units/ml)

2.2.2.3 Cholesterinbestimmung

Die Cholesterinbestimmung erfolgte mittels eines Reagenz der Firma Roche. Das Prinzip beruht auf einem Enzym Farbstest, bei dem Cholesterin mittels drei verschiedenen Enzymen zu 4-(p-Benzochinon-monoimino)-phenazon welches rot ist, umgesetzt wird. Der Farbumschlag wird dann bei 546nm im Photometer bestimmt. Nimmt man die Extinktion, wie im Firmenprotokoll angegeben, mal 8,35, erhält man die Menge an Cholesterin in mg/ml.

2.2.2.4. Herstellung von E-LDL/ApoJ mittels Flotation

Für eine Bindung von ApoJ an E-LDL wurde je nach Versuch ApoJ aus humanem Serum (NHS) oder aus konditioniertem Medium von MDCK Zellen verwendet. Das NHS war ein Pool von mehreren Spendern und wurde uns freundlicherweise von der Blutbank der Universitätsklinik Mainz zu Verfügung gestellt. Wurde ApoJ aus NHS verwendet, erfolgte vorher eine Aufreinigung über eine „blue Sepharose“ Säule, dadurch wurde das im Serum befindliche Albumin abgetrennt. Um ApoJ an E-LDL zu binden, wurden 800µl fünffach konzentriertes konditioniertes Medium oder NHS mit 200µl E-LDL inkubiert. Bei diesem Mengenverhältnis war ApoJ auf jeden Fall im Überschuss vorhanden, das wurde vorher ausgetestet. Die Proben wurden für 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das überschüssige, ungebundene ApoJ mittels Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt. Der Dichtegradient wurde mit Saccharose in Veronalpuffer (VBS) aufgebaut. In 1ml Probe wurden 0,8g Saccharose zu Erhöhung der Dichte aufgenommen. Die Probe wurde mit 25% Saccharose und 4% Saccharoselösung überschichtet.

Die Proben wurden in einem „Swing out“ Rotor bei 10°C und 30.000Upm für 3 ½ Stunden zentrifugiert. Anschließend befand sich das E-LDL ganz oben auf dem Gradienten und das ApoJ ganz unten. Die Fraktion mit dem E-LDL wurde mit einer Pipette vorsichtig von oben abgenommen.

Die Proben wurden bei 4°C maximal vier Tage bis zur Verwendung gelagert.

2.2.4. SDS-Page

Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. SDS lagert sich an die hydrophoben Bereiche der Proteine und denaturiert diese so. Dadurch hebt es ihre Eigenladung auf und gibt ihnen eine negative Ladung, wodurch sie sich in der Elektrophorese nach ihrer Größe auftrennen lassen.

Zuerst wurde ein Trenngel gegossen und mit Wasser überschichtet. Nachdem es ausgehärtet war, wurde das Wasser vollständig abgegossen und mit dem Sammelgel übergeschichtet. In das Sammelgel wurde der Kamm vorsichtig eingeschoben.

2.2.4.1. Probenvorbereitung:

Zellkulturüberstände wurden entweder direkt mit 5x Probenpuffer versehen oder es erfolgte vorher eine Aufkonzentration mittels TCA Fällung.

2.2.4.2. TCA-Fällung:

Mittels Tri-Chlor-Essigsäure wurden Proteine aus 1ml Zellkulturüberstand gefällt. 1ml Überstand wurde mit 200µl TCA (72%) versetzt, gemischt und 15min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Proteine bei 14.000Upm und 4°C pellettiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet noch mal mit 1ml Aceton gewaschen. Danach wurde das Pellet in 20µl 1X Proteinprobenpuffer aufgenommen und vor dem Auftragen für 5min bei 95°C erhitzt. Wenn sich der blaue Probenpuffer gelb verfärbte, wurde 1µl 1M NaOH zur Neutralisierung zugegeben.

Die Zellkulturüberstände von CRL-2018-Zellen, die für einen Western-Blot verwendet wurden, sind nicht aufkonzentriert worden. Es wurden 20µl Überstand mit 5µl 5xPPP (Proteinprobenpuffer) versehen und nach dem Aufkochen direkt aufgetragen.

2.2.4.3. Coomassiefärbung:

Wurden die Gele nicht für einen Western Blot verwendet, dann wurden sie anschließend mit Coomassie gefärbt. Coomassie bildet mit den Proteinen im Gel Komplexe und färbt sie so blau an. Um möglichst geringe Mengen an Protein im Gel nachweisen zu können, wurden die Gele mit einem Kolloidal-Coomassie-Kit (Invitrogen/Novex) angefärbt. Die Nachweisgrenze liegt bei diesem Kit bei ca. 15ng Protein. Die Färbung erfolgte in der Regel über Nacht auf dem Schütteltisch. Am nächsten Tag wurden die Gele für ca. 3-5h in Wasser entfärbt.

Materialien und Lösungen:

- Coomassie-Färbelösung: Colodal Blue staining Kit (Invitrogen/ Novex):
 - 27,5ml ddH₂O
 - 10ml Methanol
 - 2,5ml Färbelösung B
 - 10ml Färbelösung A

- 5x Proteinprobenpuffer
 - 0,225M Tris/HCL, pH 6,8
 - 50% Glycerin
 - 0,05% Bromphenolblau
 - 5% SDS

- 5x SDS- Laufpuffer:
 - 1g/l Tris
 - 72g/l Glycin
 - 5g/l SDS

- Molekulargewichtsstandard: Roti-Mark Prestaind (Roth)

Trenngel 10%	Sammelgel 4%
5,3ml H ₂ O	6,9ml H ₂ O
1,25ml 1,5M Tris-HCl, pH8,8	1,25ml 5,5M Tris-HCl, pH 6,8
3,3ml Acyl-Bis (30%)	1,7ml Arcyl-Bis (30% ⁹)
100µl 10%SDS	50µl 10%SDS
80µl 10%APS	50µl 10% APS
10µl TEMED	10µl TEMED

3.5. Western-Blot

Bei allen Western-Blots wurde das „semi-dry“ Verfahren angewandt. Der Aufbau ist schematisch in Abb.8 zu sehen. Die Wathmann-Papiere und die Nitrocellulosemembran wurden vor dem Aufbau in Transferpuffer eingelegt. Bevor der Blot mit der Anode zugedeckt wurde, wurde der Blot noch einmal mit einem Glasstab vorsichtig glattgerollt, um eventuell vorhandene Luftblasen zu entfernen.

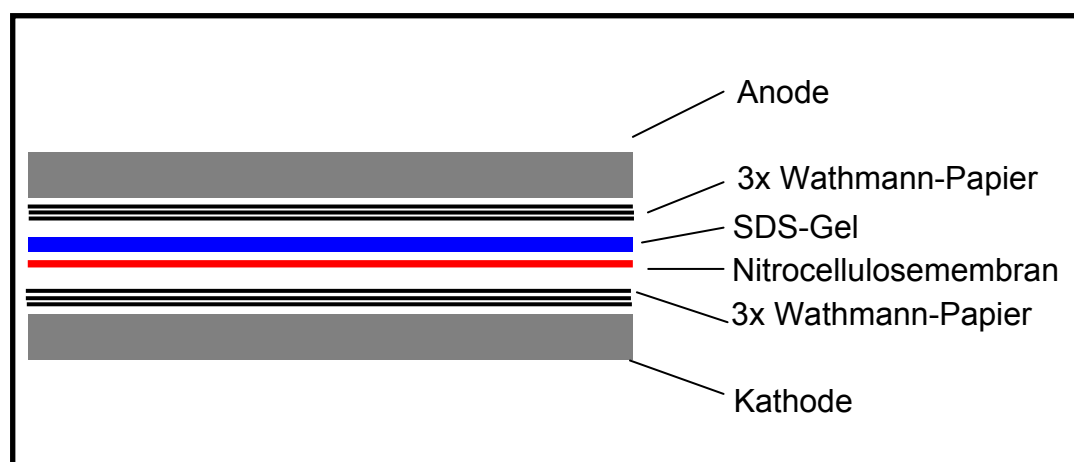


Abb.11: Schematische Darstellung des für die Western Blots angewendeten Semidry-Blots Verfahren.

Für die Untersuchung der ApoJ Sekretion mittels Western Blots wurden 5×10^5 Zellen pro Well in eine 6-Well Platte ausgesät und 24h wachsen gelassen. Die Zellen waren dann ca. 80% konfluent. Vor Versuchsbeginn wurden sie zweimal mit PBS gewaschen und für 24h auf 1ml serumfreies Medium gesetzt. Danach wurden die Stimulanzen wie z.B. nekrotischen Zellen oder poly (1:C) dazugegeben und für 12-16h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und die Zelltrümmer für 10 min bei 13.000 upm und 4°C abzentrifugiert. $25\mu\text{l}$ Überstand wurde zusammen mit $5\mu\text{l}$ 6xPPP für 5min auf 95°C erhitzt und auf ein 10%iges SDS Gel aufgetragen.

Der Transfer erfolgte für 90min bei $1,5\text{ mA/cm}^2$ auf Nitrozellulose. Geblockt wurde der Blot mit 5% Magermilchpulver in TBST für 1h bei Raumtemperatur auf dem Schütteltisch. Die Inkubation mit dem Erst-Antikörper erfolgte für 1h bei Raumtemperatur. Der Antikörper wurde mit TBST mit 2,5% Milchpulver verdünnt. Danach wurde dreimal 15min mit TBST gewaschen und anschließend der Zweitantikörper ebenfalls in TBST mit 2,5% Milchpulver für 45min bei Raumtemperatur inkubiert.

Verwendete Antikörper und deren eingesetzte Konzentration:

Antikörper	Verdünnung	Firma
Anti-ApoJ recomb. Rate	1:1000	Hergestellt von M. Bartel Bleed 2/2 oder 1/2
Anti-ApoJ/MDCK	1:500	Hergestellt von Prof. Koch-Brandt (302)
Anti-Flag-M2	1:1000	Sigma
Anti-rabbit-AP-gekoppelt	1:10000	Sigma
Anti-rabbit-HP-gekoppelt	1:1000	Cell signaling

Verwendete Lösungen und Materialien:

- Blotting-Buffer:
 - 84mM Tris
 - 39mM Glycin
 - 0,037% SDS
 - 20% Methanol

- TBS (10x stock):
 - 100mM Tris,HCl
 - 1,5mM NaCl

- Blocking Puffer:
 - 5% Milchpulver in TBST

- Alkalische Phosphatase Puffer:
 - 100nM Tris, HCl
 - 100mM NaCl
 - 5mM MgCl₂

- Peroxidase Entwicklung:
 - BM Chemiluminescence Blotting Substrat von Roche

- Nitrocellulose Membran
 - Protran (Schleicher& Schuell)

- Wattmann- Papier
 - Schleicher & Schuell

2.2.6. Caspase-Messung

Der Caspase-Assay wurde verwendet, um die E-LDL induzierte Apoptose in VSMC zu untersuchen. Die Zellen wurden hierzu in eine 96 well Platte ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 70% wachsen gelassen. Die Behandlung der Zellen erfolgte für eine Stunde in serumfreiem Medium. Danach wurden die Proben abgenommen und es folgte eine Erholungsphase für vier Stunden.

Für die Caspasemessung wurde ein Assay der Firma Promega verwendet. Dieser beinhaltet ein spezifisches prälumineszierendes Substrat für Caspase 3 und 7. Das Produkt dieser Umsetzung ist Aminoluciferin. Dieses dient als Substrat für Luciferase, wodurch es zu einem chemilumineszierenden Produkt umgesetzt werden kann.

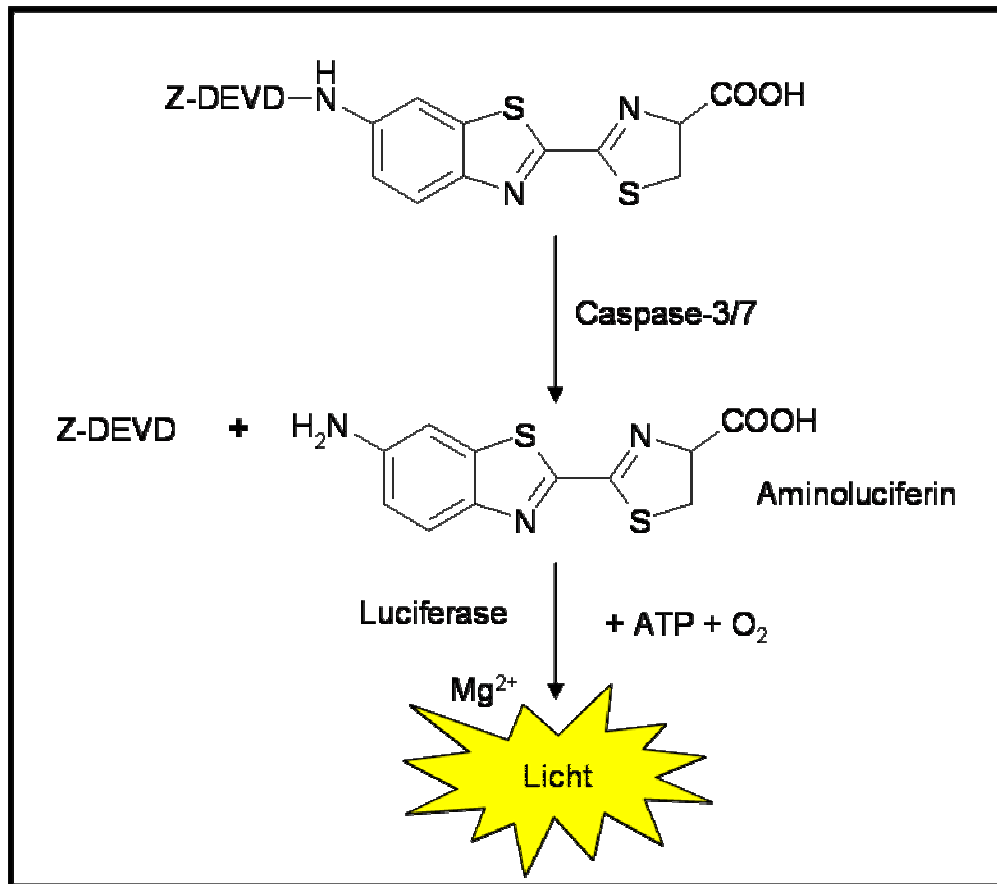


Abb.12: Prinzip des Caspase-Assays

2.2.7. IL-6 ELISA

Mit dem ELISA soll die Sekretion von IL-6 in humanen, primären Monozyten untersucht werden.

Dazu wurden die Monozyten aus Buffy Coats isoliert und wie oben beschrieben ausgesät. Da die Monozyten nach dem Aussähen sehr gestresst sind und deshalb sehr viel IL-6 produzieren, wurden sie 3 Stunden ruhen gelassen; nach der Hälfte der Zeit erfolgte ein Mediumwechsel. Danach wurden die Zellen mit den entsprechenden Proben behandelt und über Nacht im Brutschrank stehen gelassen. In dieser Zeit sekretieren sie IL-6 in das Medium. Am nächsten Morgen wird der Überstand gesammelt und die toten Zellen und Zelltrümmer abzentrifugiert. Die Kulturüberstände werden entweder gleich verwendet oder bis zum ELISA bei -20°C eingefroren. Für den ELISA wurde ein System von der Firma Immunotools verwendet, bei der man die verschiedenen Antikörper einzeln bestellt und die Platten selbst beschichtet. Es wurde nach dem von der Firma vorgeschlagenen Protokoll verfahren. Die Überstände wurden 1:10 verdünnt, bevor sie mittels ELISA gemessen wurden.

Materialien und Lösungen:

Antikörper: Coating Antikörper
 Biotinylierter sekundärer Antikörper
 Streptavidin-poly-HRP

Alle verwendeten Antikörper wurden von der Firma Immunotools bezogen

Verwendete Lösungen

- Beschichtungs-Puffer 100mM Na₂CO₃
- PBS PBS, pH 7,3
- Blockierlösung PBS mit 5%BSA, steril filtriert
- Wasch-Puffer PBS mit 0,01% TX-100
- Verdünnungs-Puffer PBS mit 1% BSA und 0,05% TX-100
- Substrat TMB (Calbiochem)
- Stop-Lösung 0,25M HCl

2.2.8. RNA-Präparation und Northern-Blot Analyse

Bei den Arbeiten mit RNA muss darauf geachtet werden, dass die Proben nicht mit RNasen verunreinigt werden, die z.B. in der Haut vorhanden sind. Deshalb wurden bei allen Arbeiten mit RNA immer Handschuhe getragen und alle Verbrauchsmaterialien für 60min autoklaviert. Außerdem wurden alle Lösungen mit DEPC-Wasser (Diethylenpyrcarbonat) angesetzt. Zur Herstellung von DEPC-Wasser wurde 1 Liter ddH₂O mit 100µl DEPC versetzt, kräftig geschüttelt und nach einer Stunde für 60min autoklaviert.

Lösungen und Puffer:

- ddH₂O_{DEPC}: DEPC-behandeltes Wasser
- PCI-Mix: Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) pH5,2
- Chloroform-Isoamylalkohol (24:1)
- 2M Natriumacetat, pH 4

- GTC-Puffer: 4M Guanidinthiocyanat
 25mM Natrium-Citrat, pH7
 0,5% (w/v) Natrium-Lauryl-Sarkrosin
 7,2µl/ml β-Mercaptoethanol: wurde dem GTC-Puffer kurz vor Gebrauch zugesetzt
- Isopropanol p.a.
- 70% Ethanol in ddH₂O_{DEPC}

2.2.8.1. RNA-Präparation:

Die in Kulturschalen kultivierten Zellen wurden nach Abziehen des Kulturmediums 2x mit 5ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit einem Gemisch aus GTC-Puffer und β -Mercaptoethanol lysiert, mit einem Zellschaber vom Schalenboden zusammengetragen und komplett in ein 15ml Greinerröhrchen überführt. Dem Zelllysate wurden 280 μ l 2M Natriumacetat pH4 und 3ml PCI-Mix (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol) hinzugefügt und nach gründlichem Vortexen für ca. 15min auf Eis gestellt. Danach wurde das Zelllysate mindestens für 15min bei 4°C und 5000Upm zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren kann man zwei Phasen erkennen: oben eine wässrige Phase, die die RNA enthält und unten eine Phenol-Phase. An der Phasengrenze kann man die ausgefällten Proteine als einen weißen Niederschlag erkennen. Die wässrige Phase wurde abgezogen und in ein neues 15ml Greiner-Röhrchen überführt. Zur kompletten Entfernung der Proteine wurde sie nochmals mit PCI-Mix extrahiert. Um das Phenol zu entfernen, wurde die wässrige Phase mit 3ml Chloroform-Isoamylalkohol versetzt und nach gründlichem Vortexen wieder 15min bei 4°C und 5000Upm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abermals abgenommen und mit 0,7 Volumen Isopropanol gemischt. Die Fällung der RNA geschah über Nacht bei -20°C.

Am folgenden Tag wurde die gefällte RNA für eine Stunde bei 4°C und 5000upm sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellett mit 1ml 70% Ethanol gewaschen. Danach wurde die RNA wieder bei 4°C und 5000Upm für 30min zentrifugiert. Das Ethanol wurde komplett abgenommen und das Pellett ca. 15min an der Luft getrocknet. Je nach Größe des Pelletts wurde die RNA in 100-400 μ l ddH₂O_{DEPC} aufgenommen. Diese Lösung wurde bei -20°C gelagert.

2.2.8.2. Konzentrationsbestimmung der RNA:

Um die Konzentration der RNA zu bestimmen, wurde eine 1:100-Verdünnung der RNA-Lösung hergestellt und die OD in einer 1ml Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260nm im Spektrometer gemessen.

OD_{260 nm}=1 entspricht 40 μ g /ml RNA (einzelsträngig)

2.2.8.3. Northern-Blot-Analyse

Zur RNA-Analyse wurde ein 1% Agarose-Gel gegossen, auf dem jede Probe zweimal aufgetragen wird. Der eine Teil des Gels wird anschließend geblottet, der andere Teil wird mit Ethidiumbromid angefärbt, um die Qualität der RNA und die Mengenverhältnisse zwischen den einzelnen Proben zu überprüfen.

Materialien und Lösungen:

- 10X MOPS/EDTA, pH7:
 - 0,4 M MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
 - 0,1 M Natriumacetat
 - 0,01 M EDTA
- Elektrophoresepuffer: 1X MOPS/EDTA
- Formaldehydgel-Ladepuffer
 - 1 mM EDTA, pH8
 - 0,25% Bromphenolblau
 - 50% Glycerin
- Foramid, p.a.
- Ethidiumbromid-Färbegad 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in ddH₂O_{DEPC}

2.2.8.3.1. Herstellung des Agarosegels zur RNA-Analyse:

Das Gesamtvolumen des Gels betrug 250ml. In einem Erlenmeyerkolben wurden 2,5g (1%) Agarose abgewogen und in 184ml ddH₂O_{DEPC} so lange aufgeköcht, bis die Lösung schlierenfrei war. Das durch das Aufkochen verloren gegangene Wasservolumen wurde hinterher wieder hinzugefügt. Nach kurzem Abkühlen wurden 25ml MOPS/EDTA und 41ml Formaldehyd (37%) hinzugegeben und das Gemisch sofort in die Gelkammer gegossen. Das Gel ließ man ca. 2 Stunden aushärten.

Nach 2 Stunden wurde die Gelkammer mit 2500ml Laufpuffer gefüllt und ein Vorlauf für ca. 15min bei 180V gestartet.

2.2.8.3.2. RNA-Probenvorbereitung:

Es wurden idealerweise 15µg RNA auf das Gel aufgetragen; wenn zu wenig RNA vorhanden war, wurden nur 10µg aufgetragen. Dazu wurden 15µg RNA unter Vakuum eingedampft und anschließend in 7µl ddH₂O_{DEPC} aufgenommen. Danach wurde ein Mix aus 3µl 10X MOPS/EDTA, 5µl Formaldehyd und 15µl Formamid hinzugegeben. Die Proben wurden ca. 10sec. gevortext, abzentrifugiert und anschließend für 20 Minuten bei 65°C im Wasserbad denaturiert. Zu jeder Probe wurde danach 6µl Formaldehydgelladepuffer gegeben und die Proben komplett auf das Gel aufgetragen.

Das Gel wurde anschließend bei 130V ca. 3 Stunden laufen gelassen. Danach wurde das Gel in ein Färbegel und ein Blot-Gel geteilt.

2.2.8.3.3. Färben mit Ethidiumbromid:

Das Gel wurde zuerst 2mal 15min in ddH₂O_{DEPC} auf einem Schüttler gewaschen. Anschließend wurde es zum Anfärben 30min in ein Ethidiumbromidbad gegeben und dann nochmals 30min in ddH₂O gewaschen.

Das Gel wurde zur Dokumentation unter UV-Licht fotografiert.

2.2.8.3.4. Kapillarblott:

Die RNA soll nach der elektrophoretischen Auftrennung auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen werden. Hierzu wurde die Methode des Kapillarblotts angewandt, bei der mittels Saugpapier Puffer durch das Gel und die darauf befindliche Nylonmembran geleitet wird. Daher der Name Kapillarblott, da dieser Vorgang durch Kapillarkräfte angetrieben wird.

Materialien und Lösungen:

- Denaturierungspuffer: 50mM NaOH
 1,5M NaCl
- Neutralisierungspuffer: 0,5M Tris/HCL, pH7,4
 1,5M NaCl
- Transferpuffer (20xSSC): 3,0M NaCl
 0,3M Natriumacetat
- Nylonmembran, positiv geladen; Roche
- 3MM Whatmann-Papier
- Saugpapier
- Plastikfolie

Die Gelhälfte, die für den Kapillarplott verwendet werden soll, wurde für 30 Minuten in Denaturierungspuffer eingelegt, um die RNA-Transkripte, die größer als 2kb waren, durch den alkalischen pH-Wert der Lösung partiell zu hydrolysieren, um somit einen vollständigen Transfer zu gewährleisten. Anschließend wurde das Gel für 20 Minuten in Neutralisationspuffer inkubiert und danach 45 Minuten in Transferpuffer (20xSSC) äquilibriert. Alle diese Schritte wurden auf dem Schüttler durchgeführt.

Der Kapillarplott wurde auf einem Sockel in einer Plastikwanne aufgebaut. Zuerst drei Lagen 3MM Filterpapier. Das oberste wurde mit Transfer-Puffer angefeuchtet und das Gel darauf gelegt. Unten in die Plastikwanne wurde ca. ein halber Liter Transferpuffer gefüllt. Die Ränder des Gels wurden mit Frischhaltefolie abgeklebt, damit der Puffer nur durch das Gel laufen konnte. Auf das Gel wurde die mit H₂O_{DEPC} angefeuchtete Nylonmembran gelegt und

mit einem Glasstab blasenfrei gerollt. Darauf kamen wiederum drei Lagen Filterpapier. Auf das Filterpapier wurde noch ein Stapel Saugpapier gelegt und das Ganze mit einem Gewicht beschwert. Der Transfer erfolgte über Nacht.

Am darauf folgenden Tag wurde der Blot abgebaut und die Membran für eine Stunde bei 40°C im Wärmeschrank getrocknet. Die Immobilisierung der RNA erfolgte durch Bestrahlung mit einer Energiemenge von 0.24J/cm². Hierbei wurde die RNA kovalent an die Nylonmembran gebunden. Bis zur Hybridisierung wurde die Membran bei 4°C gelagert.

2.2.8.3.5. Prähybridisierung:

Zuerst wurden die Blots in der Hybridisierungsröhre in ddH₂O_{DEPC} gewaschen. Danach wurde 15ml Hybridisierungspuffer zugegeben. Die Prähybridisierung erfolgte unter Rotation im Hybridisierungsofen bei 63°C für 2 Stunden.

2.2.8.3.6. Markierung der cDNA-Sonde und Hybridisierung

100ng der cDNA wurden in ein 0,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß abgefüllt und das Volumen mit ddH₂O_{DEPC} auf 11µl aufgefüllt. Die cDNA wurde anschließend für 10min bei 100°C denaturiert, kurz abzentrifugiert und sofort auf ein Eis-Salz-Gemisch gestellt. Es wurden 4µl High-prime-kit und 5µl P³² dCTP (50µCi) hinzugegeben und zur neuen Strang –Synthese 10min bei 37 °C in die PCR-Maschine gestellt. Um die Reaktion zu stoppen, wurden auf Eis 2µl 0,2M EDTA (pH8) hinzupipettiert, wodurch die für die Polymeraseaktivität notwendigen 2-wertigen Kationen komplexiert wurden.

Damit die Sonde einzelsträngig vorliegt, wurde vor deren Zugabe nochmals 10min bei 100°C denaturiert. Anschließend wurde die Sonde vorsichtig in die Hybridisierungsröhre gegeben, ohne dabei die Nylonmembran zu berühren. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht im Hybridisierungsofen unter Rotation bei 63°C.

Am nächsten Tag wurde die Nylonmembran gewaschen.

Der Waschvorgang erfolgte in folgenden Schritten:

2x	50ml Waschpuffer 1	5min	49°C
1x	150ml Waschpuffer 2	45min	53°C

Alle diese Schritte wurden unter Rotation im Hybridisierungsofen durchgeführt. Während des Waschens wurde die Strahlung mit dem Handmonitor überprüft und bei geeigneter Reststrahlung der Waschvorgang abgebrochen.

Nach dem Waschen wurde auf die Membran ein Phosphorimager-Screen aufgelegt. Die Exposition erfolgte für 5min bis 24 Stunden bei RT. Nach der Auswertung wurde ein Röntgenfilm auf die Blots gelegt und in einer Röntgenkassette mit Doppelverstärkerfolie für ca. 30min bis 5 Tage in der -80°C Truhe exponiert.

Materialien und Lösungen:

- 20xSSC, pH 7: 3.0 M NaCl
 0.3 M Natriumcitrat
 10% (w/v) SDS
- Hybridisierungspuffer: Rapid Hyb-Puffer (Amersham)
- High Prime Kit (Roche): Klenow-Enzym, 5xReaktionspuffer,
 Oligonukleotid-Gemisch, Desoxyribonukleotide
- A-³²P-dCTP(3000Ci/mmol)
- 0.2M EDTA, pH8

- Waschpuffer 1: 2x SSC in H₂O_{DEPC}
 0,1% SDS in H₂O_{DEPC}
- Waschpuffer 2: 0,2x SSC in H₂O_{DEPC}
 0,1% SDS in H₂O_{DEPC}

2.2.8.3.7. Rehybridisierung der Membran:

Die ApoJ-Sonde musste entfernt werden, um eine zweite Sonde (GAPDH oder 18s) als internen Standard auf der Membran zu hybridisieren. Hierzu wurde die Membran für 30min bei 67°C mit 250ml Stripping-Puffer unter Rotation im Hybridisierungssofen inkubiert und danach kurz mit ddH₂O_{DEPC} gewaschen. Die Hybridisierung mit der 18s-Sonde erfolgte wie oben.

Lösungen:

Stripping-Puffer:	50mM	Tris/HCL, pH8
	1% (w/v)	SDS
	50% (v/v)	Formamid

2.2.8.3.8. Auswertung der Northern-Blots:

Um die Menge an Sonde auf dem Blot zu bestimmen, wurde dem Blot über Nacht ein Phospho-Imager-Screen aufgelegt. Nach 5min (bei 18s) bis 24 (bei GAPDH und ApoJ) Stunden wurde der Screen mit dem Scan Reader eingelesen. Die Bestimmung der Intensität der Banden erfolgte mit dem Computerprogramm AIDA 2.0. Um das Ausmaß der Stimulierung zu ermitteln, wurden die Werte von ApoJ zu denen von GAPDH oder 18s-RNA in Verhältnis zueinander gesetzt. Der daraus resultierende Wert für die unstimulierte Probe wurde gleich 100% gesetzt und errechnet, um wie viel höher der Wert der stimulierten Probe lag.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit werden zwei Aspekte von ApoJ näher betrachtet. Der erste Teil beschäftigt sich mit der Bedeutung von ApoJ bei der Atherosklerose. Dabei werden Untersuchungen zu möglichen Funktion von ApoJ in der Entwicklung von Atherosklerose aufgezeigt. Des Weiteren wird untersucht, ob ApoJ in atherosklerotischen Läsionen eine zytoprotektive Funktion aufweist.

Im zweiten Teil wird die Regulation von ApoJ durch in atherosklerotischen Läsionen vorkommenden Stimuli untersucht. Dabei handelt es sich zum einen um enzymatisch verändertes und natives LDL und zum anderen um nekrotische Zellen. Anknüpfend an die Arbeit von Markus Baierdörfer, in der ein Zusammenhang zwischen der Toll-like Rezeptor Expression und der ApoJ-Regulation durch nekrotische Zellen aufgezeigt werden konnte, wird in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob diese Regulation abhängig ist von Toll-like Rezeptor 3 und die induzierende Komponente aus nekrotischen Zellen näher charakterisiert. Außerdem wird mittels Western Blot Analysen aufgezeigt, dass es nicht nur zu einer Induktion der ApoJ-mRNA kommt, sondern auch zu einer vermehrten Sekretion von ApoJ.

3.1. Bedeutung von ApoJ in der Atherosklerose

Atherosklerose entsteht durch eine Störung des Lipidstoffwechsels, hervorgerufen durch einen erhöhten LDL-Cholesteringehalt im Blut. Durch die Einlagerung von modifizierten LDL in die Intima von Arterien kommt es zu einer Entzündungsreaktion, die zur Bildung von atherosklerotischen Plaques führt. Als Grundlage dieser Arbeit dient die Mainzer Hypothese, die davon ausgeht, dass es sich bei der inflammatorischen Form von LDL um enzymatisch modifiziertes LDL (E-LDL) handelt. Die Modifikation erfolgt durch eine Proteinase, in diesem Fall Plasmin und einer Cholesterinesterase. Vor dem Hintergrund dieser Hypothese werden alle Versuche mit enzymatisch modifizieren LDL durchgeführt.

3.1.1. Untersuchungen zu Bindung von ApoJ an LDL und enzymatisch verdautes LDL (E-LDL)

Da ApoJ in atherosklerotischen Läsionen mit LDL kolokalisiert vorliegt (Jordan-Starck *et al.*, 1994), stellte sich zuerst die Frage, ob ApoJ eventuell an enzymatisch verdautes LDL (E-LDL) bindet. Das in atherosklerotischen Läsionen befindliche ApoJ kann zum einen aus dem Serum stammen oder von den umliegenden Zellen (z.B. glatten Muskelzellen) sekretiert werden. Deshalb sollte zuerst untersucht werden, ob ApoJ aus normal-human-Serum (NHS) und Lipid defizientem Serum (LPDS) an E-LDL bindet. Dazu wurde E-LDL mit NHS und LPDS für 30min bei 37 °C inkubiert. Um die übrigen Serumproteine abzutrennen, wurden die Proben anschließend über einen Saccharosedichtegradienten aufgereinigt. Nach der Flotation wurde der Dichtegradient von unten ausgelassen und fünf Fraktionen gesammelt. In der obersten Fraktion befanden sich die Lipide und die daran assoziierten Proteine und am Boden des Dichtegradienten die meisten Serumproteine, unter anderem ApoJ und Albumin. Die oberste und die unterste Fraktion wurden nun über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Interessant war nun zu sehen, ob sich nach der Inkubation von E-LDL mit NHS in der Lipidfraktion neue Banden befinden. Die Proben wurden zweimal aufgetragen, einmal mit und einmal ohne DTT (Dithioerytol). Da ApoJ aus zwei Untereinheiten besteht, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Abb.4), zerfällt es nach der Behandlung mit DTT in seine zwei Untereinheiten, wodurch es im SDS-Gel leichter zu identifizieren ist. In der untersten Fraktion des Gradienten befinden sich alle Serumproteine, in der obersten aber nur die an LDL/E-LDL assoziierten Proteine. Deshalb wurde von den Fraktionen unterschiedlich viel auf die Gele aufgetragen. Vor allem der große Albuminanteil in der untersten Fraktion hätte sonst dazu geführt, dass die Gele nicht mehr auszuwerten wären. Deshalb wurde von der obersten Fraktion immer 20µl und von der untersten nur 5µl aufgetragen.

Die Gele dieser Bindungsversuche sind in Abb. 10 zu sehen. Auf den ersten Blick sieht man keinen großen Unterschied zwischen den Proben, die mit NHS und denen, die mit LPDS inkubiert worden sind. Trotz der geringen Menge in den unteren Fraktionen sieht man überall deutlich eine dicke Bande bei ca. 60kDa, die aller Wahrscheinlichkeit nach auf Albumin zurückzuführen ist. Die untere Fraktion der Flotation von LDL bzw. E-LDL ist, wie zu erwarten war, proteinfrei. Wenn man nun die beiden oberen Fraktionen von LDL und E-LDL miteinander vergleicht, dann kann

man erkennen, dass durch den enzymatischen Verdau von LDL durch Plasmin und Cholesterinesterase weitere Proteinbanden entstehen. Plasmin verdaut den Proteinanteil des LDL-Partikels, wodurch die weiteren Proteinbanden im Gel zu sehen sind.

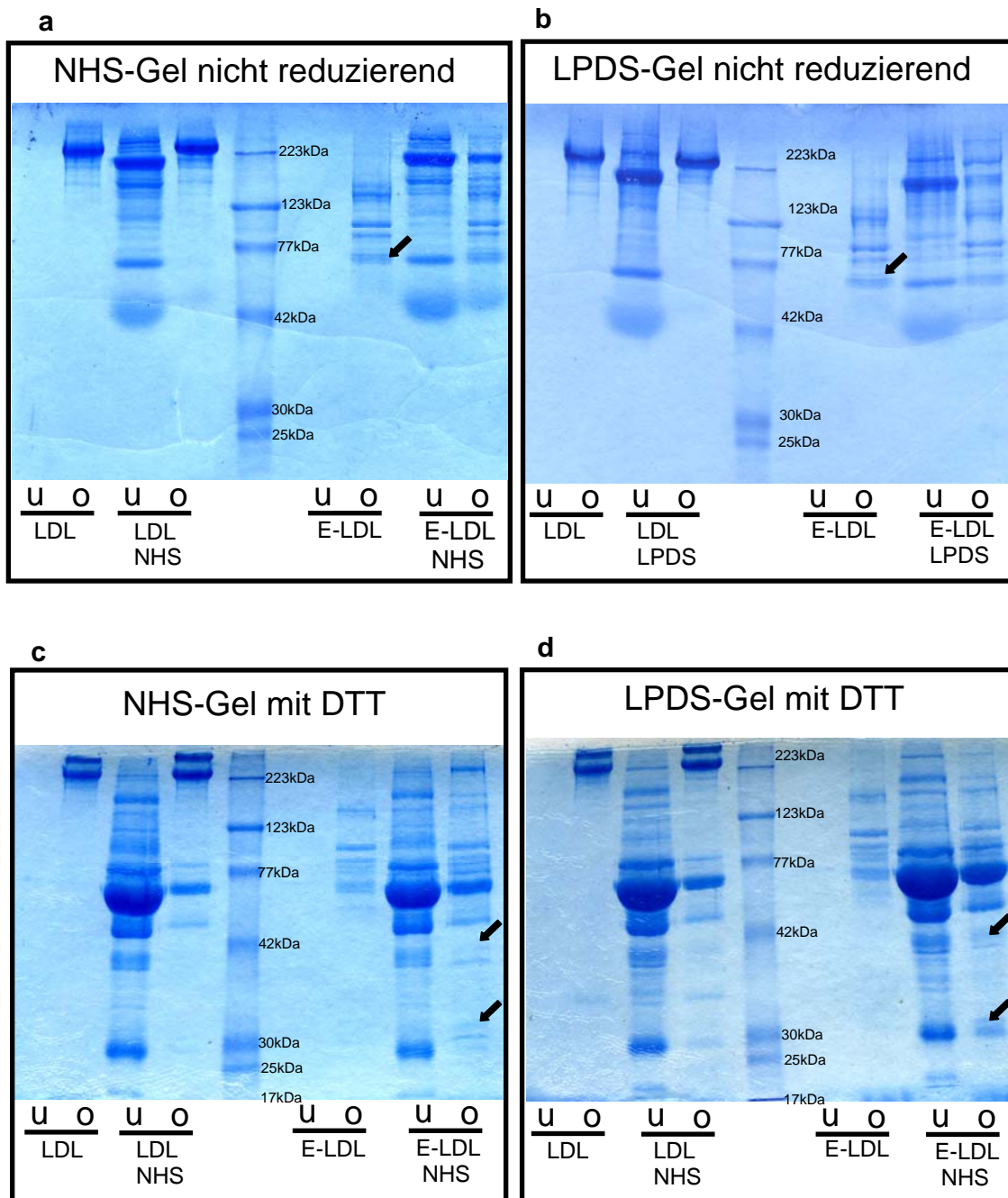


Abb.13: Inkubation von NHS und LPDS mit LDL und E-LDL: LDL und E-LDL wurden für 30min mit NHS und LPDS inkubiert und anschließend über einen Saccharosedichtegradienten aufgetrennt. Jeweils die oberste und die unterste Fraktion wurden auf ein SDS Gel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. Die Proben wurden einmal unbehandelt aufgetragen (a/b) und einmal reduzierend mit DTT (c/d). Die Pfeile markieren die Bereiche, in denen eine ApoJ Bande zu erwarten ist. (O= oberste Fraktion, U= unterste Fraktion)

In den Gelen ohne DTT (Abb.13a/b) kann man im Bereich von 80kDa bei der Probe E-LDL/NHS keine weitere Bande sehen. Hier würde man ApoJ erwarten. Dies ist aber darauf zurückzuführen, dass auch ohne die Inkubation mit NHS bei E-LDL in diesem Bereich eine sehr dominante Bande zu sehen ist (schwarzer Pfeil), die immer im E-LDL vorkommt. Eine mögliche Bande von ApoJ wird in diesem Bereich also überlagert.

Nach einer DTT-Behandlung der Proben (Abb.13c/d) kann man allerdings sehr schön im Bereich zwischen 30 und 45kDa zwei Banden in der obersten Fraktion der NHS/E-LDL und LPDS/E-LDL Proben sehen (markiert durch Pfeile). Sie sind in der reinen E-LDL Probe nicht zu sehen und liegen in dem Bereich, in dem die beiden Untereinheiten von ApoJ zu erwarten wären. Diese beiden Banden kann man bei der Inkubation von LDL mit NHS nicht sehen, woraus man schließen könnte, dass ApoJ nicht an LDL, sondern nur an E-LDL bindet. Diese Beobachtungen kann man analog in den mit LPDS behandelten Proben machen. Dadurch kann man davon ausgehen, dass das in der obersten Fraktion lokalisierte ApoJ nicht ausschließlich an HDL gebundenes ApoJ ist, da es sich um lipidfreies Serum handelt, in dem sich kein HDL befindet.

Um nun zu überprüfen, ob es sich bei diesem Protein wirklich um ApoJ handelt, wurden Western Blot Analysen von den relevanten Proben durchgeführt. Auch hier wurden die Proben mit und ohne DTT aufgetragen. Der hier verwendete Antikörper ist von der Arbeitsgruppe Koch-Brandt gegen canines ApoJ aus MDCK Zellen hergestellt worden, bindet aber auch an humanes ApoJ. Die beiden Western Blots in Abb. 14 zeigen eindeutige Ergebnisse. Trägt man wieder jeweils die unterste und die oberste Fraktion der Flotation der mit NHS/LPDS inkubierten Proben auf, dann kann man in der untersten Fraktion immer ApoJ finden. Dies war auch zu erwarten, da sich im Serum sehr viel ApoJ befindet, was nicht vollständig an E-LDL bindet. Vergleicht man aber nun die obersten Fraktionen von LDL mit denen von E-LDL, kann man sehen, dass nur beim E-LDL ApoJ in der obersten Fraktion zu finden ist. Dies bedeutet, dass ApoJ tatsächlich nur an E-LDL bindet, nicht aber an natives LDL.

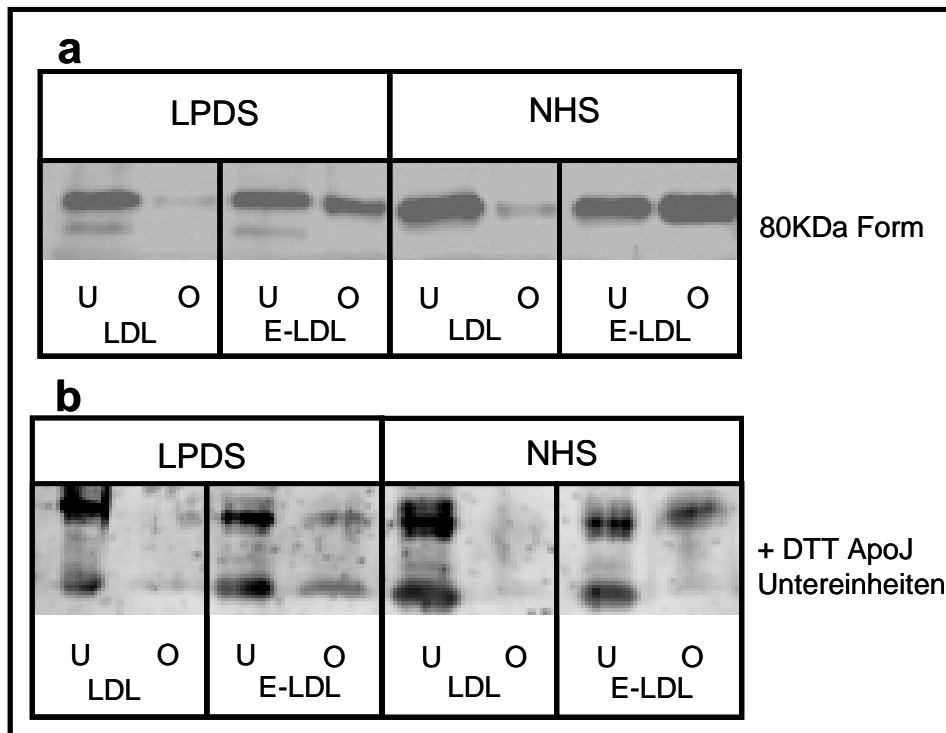


Abb.14: ApoJ bindet an E-LDL: Western Blots gegen humanes ApoJ. E-LDL und LDL wurden mit NHS und LPDS für 30min inkubiert, so dass eine Bindung von ApoJ an E-LDL/LDL stattfinden konnte. Anschließend wurden die Proben über einen Saccharose Dichtegradienten aufgetrennt. Nach der Flotation wurden von der obersten 20µl und von der untersten Fraktion 5µl aufgetragen und geblottet. In der obersten Fraktion befinden sich die Lipoproteine und daran assoziierte Proteine und in der untersten alle freien Proteine. Man kann erkennen, dass sich in der obersten Fraktion nur bei den Proben mit E-LDL ApoJ nachweisen lässt, bei LDL nur sehr, sehr schwach. Abb. a zeigt die 80kDa Form von ApoJ und in b wurden die Proben mit DTT behandelt, wodurch ApoJ in seine beiden Untereinheiten zerfällt.

Um diese Beobachtung näher zu untersuchen, wurden Bindungstests mit verschiedenen Formen von LDL mit ApoJ aus NHS und mit ApoJ aus MDCK Zellen durchgeführt. MDCK Zellen sind canine Nierenepithelzellen. Sie sekretieren fast ausschließlich zwei Proteine: ApoJ und Osteopontin (Losch und Koch-Brandt, 1995). Aus diesen Zellkulturüberständen wurde ApoJ mit einem 50kDa Ultrafilter angereichert. Da Osteopontin ca. 20kDa groß ist, wird es durch die Ultrafiltration entfernt (siehe 3.1.7.).

Um zu sehen, ob der Verdau mit der Proteinase Plasmin oder Cholesterinesterase die entscheidende Modifizierung ist, die eine Bindung von ApoJ ermöglicht, wurde LDL einmal nur mit Plasmin, einmal nur mit Cholesterinesterase bzw. mit beiden Enzymen verdaut. Diese unterschiedlichen LDL-Formen wurden anschließend mit NHS und ApoJ aus konditioniertem Medium inkubiert. Analog zu den obigen Experimenten wurden die Proben anschließend floriert, um alles nicht gebundene

ApoJ abzutrennen. Die Proben wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und geblottet.

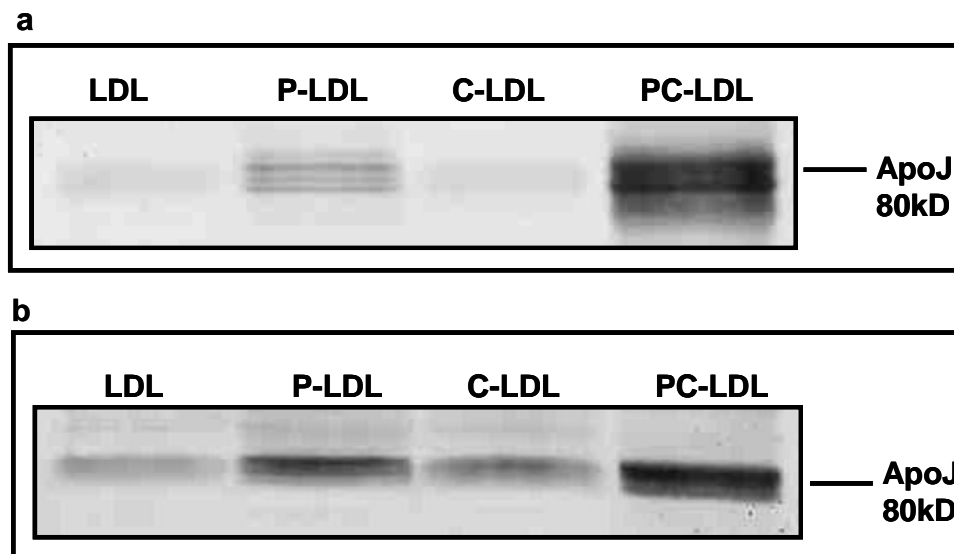


Abb. 15: Bindung von ApoJ an verschiedene Formen von LDL: Western Blot gegen ApoJ. In Abb. a wurden die LDL Proben mit konditioniertem Medium von MDCK Zellen inkubiert, in Abb. b mit NHS. **P-LDL**= Plasmin verdautes LDL, **C-LDL**= Cholesterinesterase verdautes LDL, **PC-LDL** = E-LDL (mit beiden Enzymen behandelt).

An der Abb.15 ist eindeutig zu erkennen, dass die Behandlung von LDL mit Plasmin entscheidend ist für die Bindung von ApoJ an E-LDL. Eine noch stärkere Bindung wird jedoch durch die Behandlung mit Plasmin und Cholesterinesterase erreicht. Eine alleinige Behandlung mit Cholesterinesterase hingegen führt zu fast keiner vermehrten Bindung im Vergleich zu nativem LDL.

Es stellt sich nun die Frage, welche physiologische Bedeutung diese Bindung von ApoJ an enzymatisch verdautes LDL in der Atherosklerose haben könnte.

Um diese Frage zu beantworten, wurden zuerst Untersuchungen zur Internalisierung von E-LDL gemacht. Wir vermuteten, dass die Bindung von ApoJ an E-LDL eine bessere bzw. vermehrte Entsorgung von E-LDL durch Makrophagen oder andere umliegende nicht professionell phagozytierende Zellen wie glatte Muskelzellen oder Fibroblasten vermitteln könnte. Diese Endozytose könnte über die ApoJ bindenden Rezeptoren LRP (low density lipoprotein receptor related protein) oder Megalin führen. Dahingehende Untersuchungen, bei denen sowohl der internalisierte ApoJ-Gehalt als auch der Cholesteringehalt der Zellen untersucht wurde, konnten diese Hypothese aber nicht bestätigen, weshalb diese Daten hier auch nicht gezeigt werden. Unter dem Mikroskop (Abb.16) konnte man jedoch sehr gut sehen, dass E-LDL von den Zellen aufgenommen wird und sich intrazellulär in kleinen Vesikeln

sammelt, auch wenn die Zugabe von ApoJ in Form von konditioniertem Medium keinen Einfluss auf die Menge der E-LDL Aufnahme zu haben scheint.

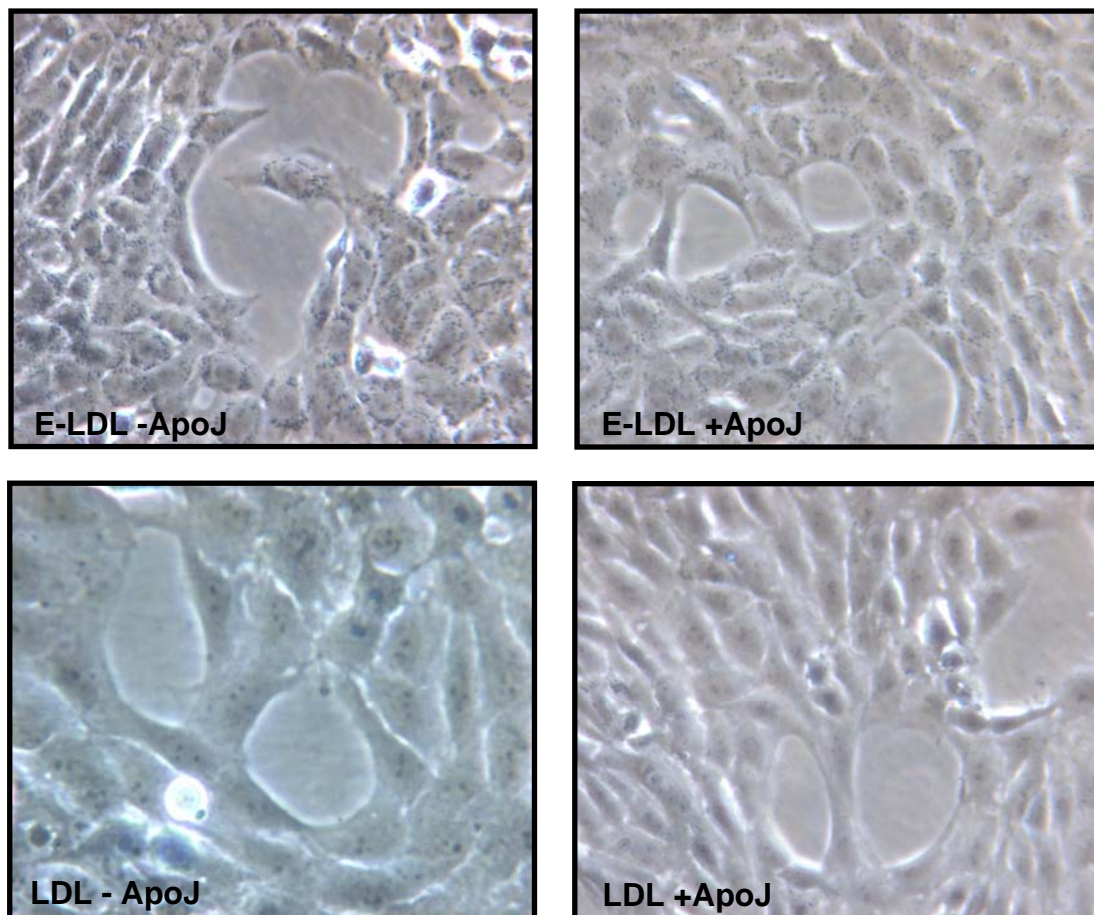


Abb. 16: Internalisierung von E-LDL/LDL in Rat-1 Zellen: Die Rat-1 Zellen wurden über einen Zeitraum von 30min mit 50 $\mu\text{g/ml}$ LDL bzw. E-LDL behandelt. In den mit E-LDL behandelten Zellen kann man kleine dunkle Lipidtröpfchen sehen, die man bei der Behandlung nur mit LDL nicht sehen kann. Die Zugabe von ApoJ (in Form von konditioniertem MDCK Medium) lässt in diesen Abbildungen keinen Einfluss auf die E-LDL Aufnahme erkennen.

Für die hier gezeigten Aufnahmen wurde eine Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ E-LDL gewählt, da eine höhere Konzentration toxisch ist. Bei diesen Untersuchungen konnte jedoch eine andere erstaunliche Beobachtung gemacht werden. Erhöht man die Konzentration von E-LDL, überleben die mit E-LDL/ApoJ behandelten Zellen diese Behandlung über einen längeren Zeitraum als die nur mit E-LDL behandelten.

3.1.2. Die Bindung von ApoJ an enzymatisch verdautes LDL verhindert die Apoptose von glatten Muskelzellen

3.1.2.1. Morphologische Analyse

In den folgenden Experimenten wurden glatte Muskelzellen (VSMC) für 24h serumfrei gesetzt und anschließend über einen Zeitraum von einer Stunde mit den verschiedenen Lipoproteinen behandelt. Die Inkubation erfolgte mit 100µg/ml E-LDL, E-LDL/ApoJ und LDL. Nach einer Stunde wurde der Versuch abgebrochen und die Zellen fotografiert. In Abb. 17 sind die Phasenkontrastaufnahmen dieses Versuches zu sehen.

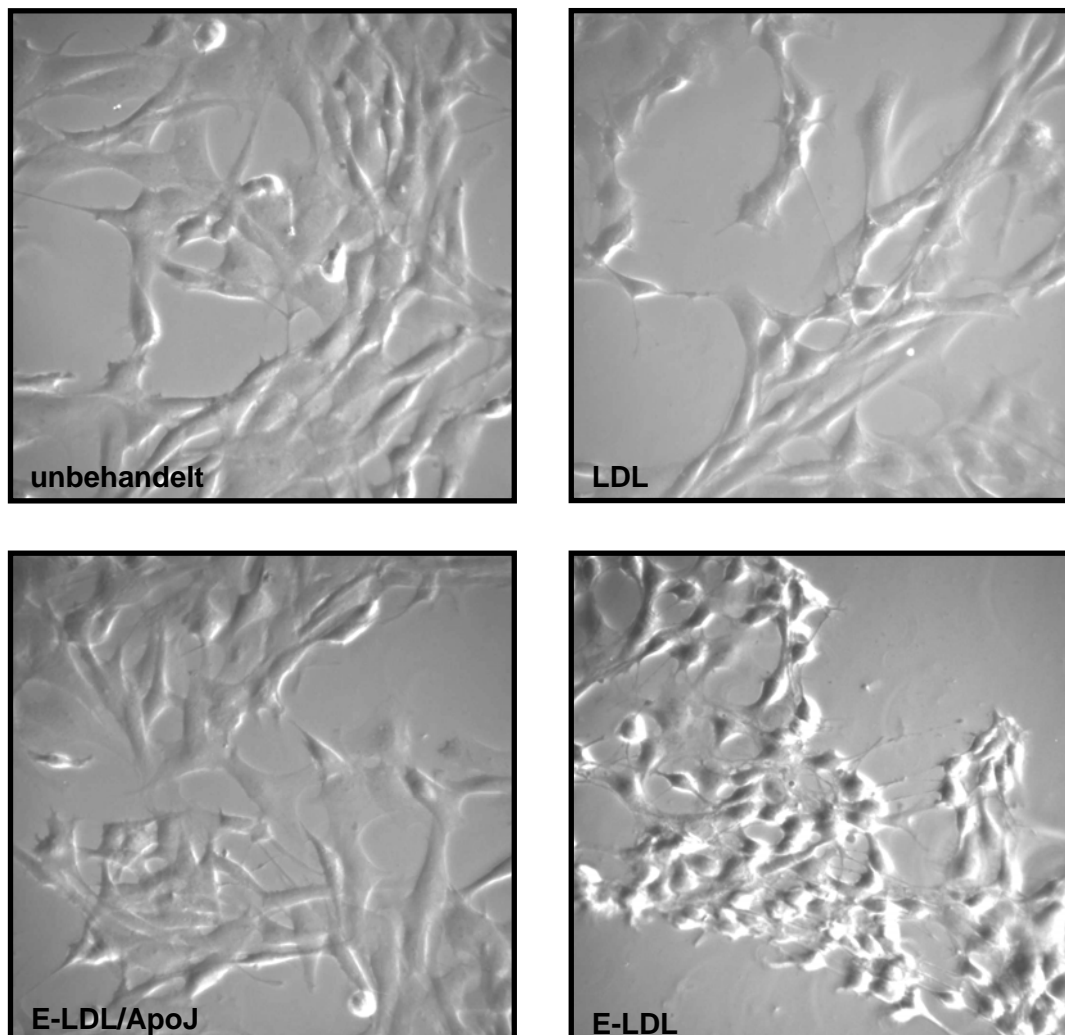


Abb.17: Behandlung von CRL 2018 Zellen mit verschiedenen Lipoproteinen: Phasenkontrastaufnahmen von glatten Muskelzellen, die für 1h mit 100µg/ml E-LDL, E-LDL/ApoJ und zur Kontrolle mit LDL behandelt wurden. Dabei handelt es sich um ApoJ aus konditioniertem MDCK-Überstand. Die E-LDL behandelten Zellen haben sich zu diesem Zeitpunkt schon abgekugelt und sind kurz davor, sich vom Schalenboden zu lösen, was ein typisches Anzeichen für ein Absterben der Zellen ist. Im Gegensatz dazu sehen die E-LDL/ApoJ behandelten Zellen aus wie die unbehandelten Zellen und die LDL Kontrolle.

Schon an der deutlich unterschiedlichen Morphologie der Zellen ist zu erkennen, welche Zellen sich demnächst vom Schalenboden ablösen. Die unbehandelten Zellen sehen aus, wie man es von glatten Muskelzellen erwarten würde, sie bilden durch ihre langen Zellfortsätze zu den Nachbarzellen ein Netzwerk aus. Diese Wuchsform ist auch bei den zur Kontrolle mit LDL behandelten Zellen zu beobachten. Die mit E-LDL behandelten Zellen hingegen sind klein und haben sich schon abgekugelt. Sie befinden sich kurz davor sich vom Schalenboden abzulösen, was ein typisches Erscheinungsbild für Zellen ist, die sich in der Apoptose befinden. Die Bindung von ApoJ an E-LDL dagegen verhindert, dass sich die Zellen abkugeln, sie sehen genauso gesund aus wie die Kontrollzellen.

3.1.2.2. Annexinbindung

Zur Verifizierung der Untersuchungen der Apoptose in VSMC wurden Färbungen mit Annexin V durchgeführt, welches Zellen markiert, die sich in einem frühen Apoptosestadium befinden. Eine der ersten molekularen Veränderungen einer Zelle, in der die Apoptose ausgelöst worden ist, dass sich die natürliche Membranasymmetrie auflöst. Das Membranlipid Phosphatidylserin befindet sich in einer gesunden Zelle nur auf der Innenseite der Membran. Wird in einer Zelle nun Apoptose ausgelöst und die Membransymmetrie löst sich auf, dann gelangen einige dieser Kopfgruppen nach außen. Annexin V kann nun an Phosphatidylserin binden. In dem von uns verwendeten Assay ist Annexin mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (Fluoresceinisothiocyanat) gekoppelt und so kommt es zu einer grünen Färbung der Membran von apoptotischen Zellen, nicht aber von normalen Zellen.

Die Ergebnisse dieser Färbung sind in Abb.18 dargestellt. Zu sehen sind zwei Färbungen, zum einen die oben erläuterte Annexinfärbung, zum anderen eine Kernfärbung mit DAPI (4,6 Diamino-2-phenylindol) in blau. DAPI ist ein gängiger Fluoreszenzfarbstoff, der zur Kernfärbung eingesetzt wird, da er nach Interkalierung mit der DNA blau fluoresziert. Er wurde zur Lokalisation der Zellen verwendet.

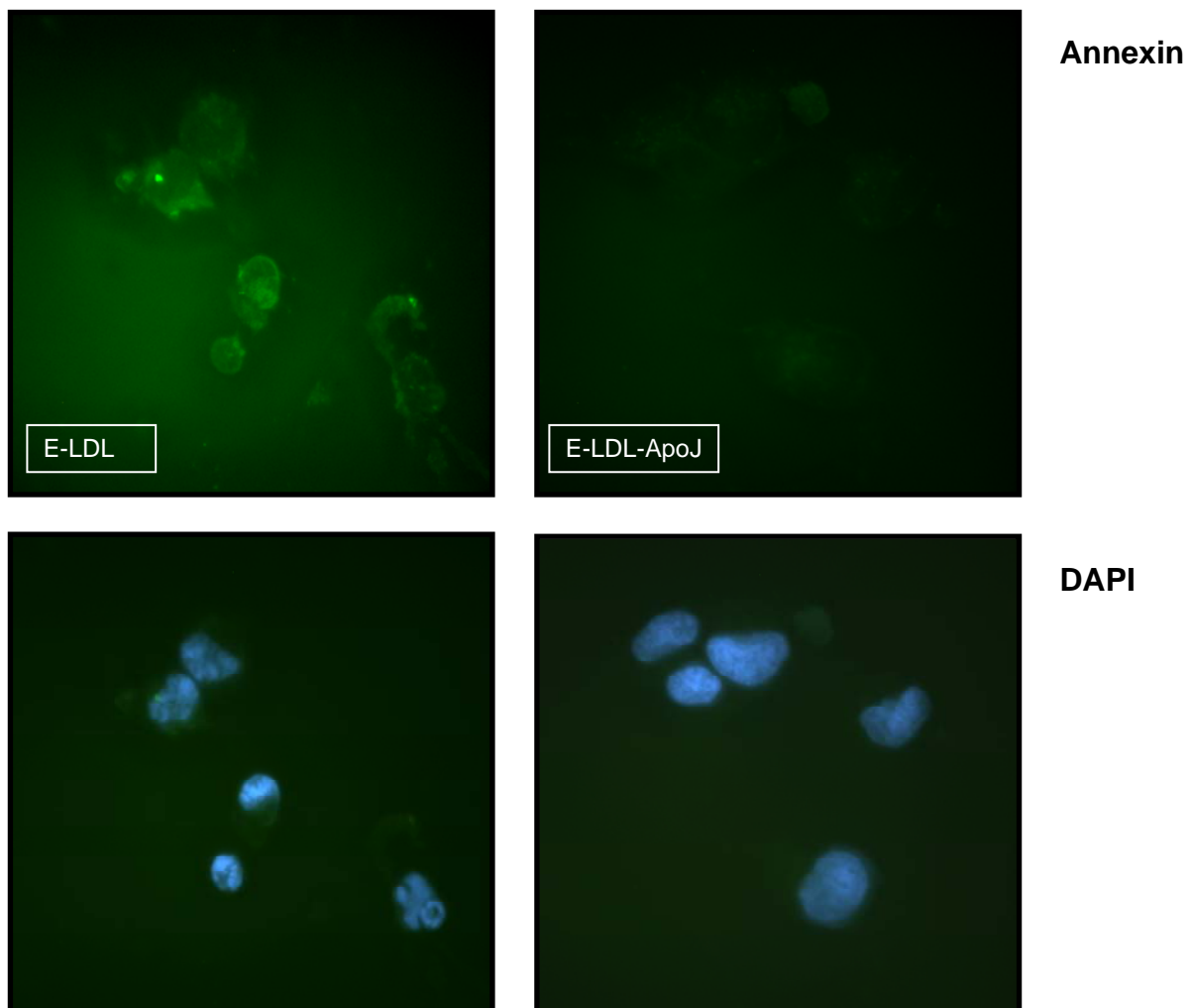


Abb.18: Die ApoJ-Bindung an E-LDL verhindert die Apoptose in CRL-2018 Zellen: Immunfluoreszenzaufnahmen von VSMC. Die Zellen wurden für 30min mit E-LDL und E-LDL/ApoJ behandelt und anschließend mit Annexin und DAPI gefärbt. DAPI färbt DNA und Annexin bindet an die Phosphatidylserinkopfgruppen von Membranlipiden. Diese gelangen bei Apoptose auf die Zellmembranaußenseite, wodurch Annexin gebunden werden kann. Bei einer Bindung von ApoJ an E-LDL kann die Apoptose also verhindert werden. Hier ist keine Grünfärbung der Membran zu sehen.

Die Aufnahmen in Abb. 18 zeigen ganz eindeutig eine grüne Färbung der Membran bei den mit E-LDL behandelten Proben. Ist nun ApoJ an das E-LDL gebunden, so ist diese Membranfärbung nicht mehr zu erkennen. Die Kernfärbung durch DAPI zeigt eine ungleichmäßige Kernfärbung bei den mit E-LDL behandelten Zellen auf, die auf eine Kondensation der DNA zurückzuführen ist. Die mit ApoJ/E-LDL behandelten Zellen hingegen zeigen keine DNA Kondensation auf, die Kernfärbung ist hier sehr gleichmäßig.

3.1.2.3. Messung der Caspaseaktivität

Um diese Ergebnisse zu untermauern, wurde eine Caspasemessung durchgeführt. Diese Messungen wurden von meiner Kollegin Lena Spath durchgeführt und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

In Zellen, die in die Apoptose gehen, kommt es zur Aktivierung der Caspasekaskade, die letzten Endes dazu führt, dass zellabbauende Enzyme aktiviert werden. Als Schlüsselenzyme dieser Caspasekaskade gelten die Caspasen 3 und 7, für die somit zahlreiche Assays zu deren Messung entwickelt wurden. Der von uns verwendete Assay von Promega beruht auf der Umsetzung eines Caspase 3/7 spezifischen Substrates. Das Produkt dieser Umsetzung dient in einem zweiten Schritt als Substrat für das Enzym Luziferase. Die so frei werdende Luminiszenz kann nun gemessen werden und ist proportional zur Höhe der Caspaseaktivität (Abb.19).

Für die Messungen wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 70% kultiviert und anschließend mit den entsprechenden Proben behandelt. Die Zellen wurden in Anlehnung an die Beobachtungen in Abb. 17 eine Stunde unter serumfreien Bedingungen mit E-LDL bzw. E-LDL/ApoJ inkubiert. Da es bis zu einer messbaren Aktivierung der Caspasen jedoch etwas dauert, wurde den Zellen vier Stunden Zeit zur „Erholung“ in Medium mit 1% FKS gegeben. Die in Abb.19 zusammengefassten Ergebnisse zeigen einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Caspaseaktivität bei der Behandlung mit E-LDL (grüner Balken). Geringe Konzentrationen E-LDL bis zu 50µg/ml führen noch zu keiner nennenswerten Caspaseaktivierung. Bei 100µg/ml ist eine Aktivierung allerdings deutlich sichtbar. Höhere Konzentrationen von E-LDL halten die Zellen für einen so langen Zeitraum nicht aus. Schon bei leicht höheren Konzentrationen sterben die Zellen in dem Zeitraum der vierstündigen Erholung ab. Wenn allerdings ApoJ an E-LDL gebunden ist, ist die Caspaseaktivierung im Gegensatz zur LDL Kontrolle nur leicht erhöht.

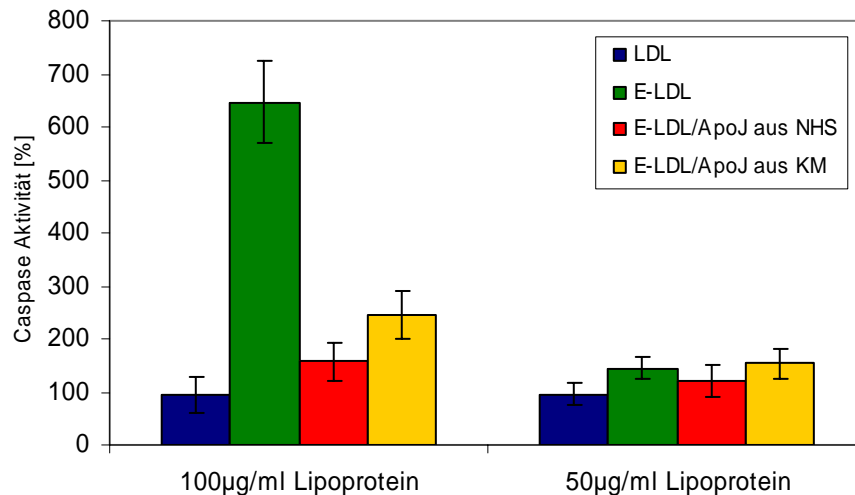


Abb.19: Die Bindung von ApoJ an E-LDL verhindert die E-LDL induzierte Caspaseaktivität: Caspaseaktivität in CRL2018 Zellen über einen Zeitraum von 5 Stunden. Gezeigt ist eine Zusammenfassung von 3 unabhängigen Messungen, die jeweils aus zwei Werten bestehen. Die absoluten Werte beziehen sich alle auf die gleich 100% gesetzte unbehandelte Kontrolle, die der Behandlung mit LDL gleich war und hier deshalb nicht aufgezeigt wird.

3.1.3. Untersuchungen zum Transfer von freien Fettsäuren in CRL 2018 Zellen

Nachdem alle Untersuchungen bestätigten, dass ApoJ die E-LDL induzierte Apoptose von glatten Muskelzellen zumindest verzögert, stellt sich die Frage, über welchen Mechanismus dies verläuft. E-LDL besteht zu einem großen Teil aus freien Fettsäuren. Die Zusammensetzung dieser Fettsäuren ist in der Veröffentlichung von Suriyaphol *et al.*, 2002 genau aufgeschlüsselt. Den größten Anteil nimmt dabei die zweifach ungesättigte Linolsäure ein. Freie Fettsäuren sind aufgrund ihrer polaren Eigenschaften in der Lage, Zellmembranen auch ohne Transporter zu durchdringen. Untersuchungen an Huvec Zellen (human umbilical vein endothelial cells) zeigen, dass eine Behandlung mit freien Fettsäuren (Linolsäure, Arachidonsäure, Sterinsäure und Ölsäure) zu einer Induktion der Apoptose über den Apoptosepromotor bak (BCL2 antagonist killer 1) führen (Artwohl *et al.*, 2003).

Daraufhin wurde untersucht, in welchem Maße Linolsäure aus E-LDL in glatte Muskelzellen eindringt. Dazu wurde E-LDL mit ^{14}C markierter Linolsäure 30min unter Schütteln inkubiert, so dass in dieser Zeit markierte Linolsäure in das E-LDL integrieren konnte. Die überschüssige Linolsäure wurde durch Flotation abgetrennt. Die Zellen wurden für diesen Versuch in eine 96 Well Platte ausgesät und mit markiertem E-LDL behandelt. Nach der Inkubationszeit und gründlichem Waschen wurden die Zellen lysiert und im Szintillationszähler gemessen. Es zeigte sich, dass

die Aufnahme von Linolsäure schon nach wenigen Minuten erfolgt und über eine Stunde hin stetig ansteigt (Abb.20). Zum Zeitpunkt (nach 1h) der Caspase-messung und der Annexinfärbung sind ca. 9% der freien markierten Linolsäure in die Zelle gelangt.

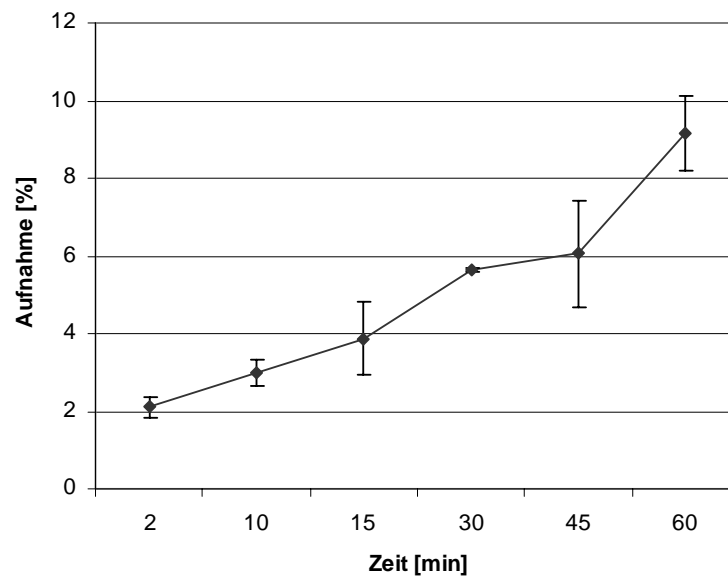


Abb. 20: Aufnahme von ^{14}C markierter Linolsäure in CRL 2018 Zellen: CRL 2018 Zellen wurden in einer 96 Wellplatte für 2-60min in serumfreiem Medium mit $50\mu\text{g/ml}$ E-LDL/ ^{14}C -markierter Linolsäure behandelt. Danach wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in SDS-Lysis Puffer aufgenommen und komplett in ein Szintillationsröhrchen überführt und gemessen.

Es könnte also sein, dass die Bindung von ApoJ an E-LDL den Transfer von freien Fettsäuren in die Zellen zum Teil verhindert. Diese Versuche wurden auch mit ^{14}C -markiertem E-LDL/ApoJ durchgeführt, um zu sehen, ob der Transfer von markierter Linolsäure durch die Bindung von ApoJ an E-LDL verringert wird. Leider konnten hier aufgrund der Eigenschaften von ApoJ keine überzeugenden Ergebnisse erzielt werden. ApoJ adhärirt sehr stark auf den Zelloberflächen und so war es in diesen Versuchen nicht möglich zwischen intrazellulärer und zelloberflächengebundener Linolsäure zu unterscheiden.

3.1.6. Kolokalisation von ApoJ und E-LDL in atherosklerotischen Läsionen

Bis zu diesem Zeitpunkt sind alle Versuche in *vitro* durchgeführt worden. Um zu sehen, ob sie auch in *vivo* eine Bedeutung spielen können, wurden im Rahmen einer Kooperation von Dr. M. Torzewski (Inst. für klinische Chemie und Labormedizin der Universitätsklinik Mainz) immunhistologische Untersuchungen an humanen frühen atherosklerotischen Läsionen gemacht. In diesen Versuchen konnte eine deutliche

Kolokalisation von ApoJ und E-LDL in der Intima von humanen Coronararterien nachgewiesen werden (Abb. 21).

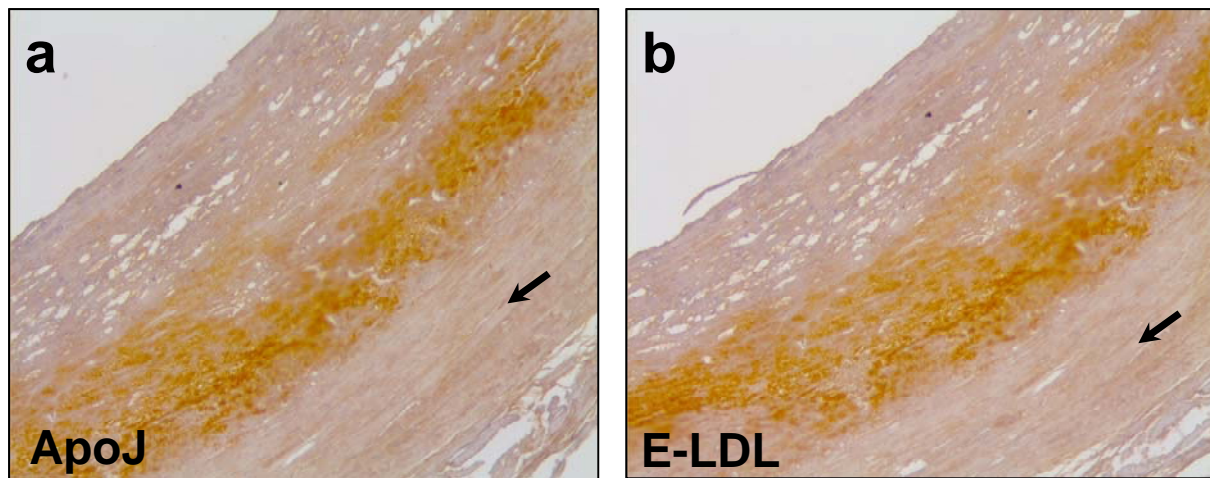


Abb. 21: Kolokalisation von ApoJ und E-LDL in humanen atherosklerotischen Läsionen: Dazu wurden Gewebsschnitte aus frühen atherosklerotischen Läsionen mit ApoJ-spezifischen Antikörpern (a) und E-LDL spezifischen Antikörpern (b) behandelt. Das Arterienlumen befindet sich links oben im Bild. Die schwarzen Pfeile markieren die Grenze zwischen der Intima und der Media.

Durch diese Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass es wahrscheinlich auch in vivo zu einer Bindung von ApoJ an E-DL kommt. Ob diese Bindung dort auch zu einer Verminderung der Apoptose von glatten Muskelzellen beiträgt, kann jedoch nicht abschließend gesagt werden.

3.2. Regulation von ApoJ durch LDL und E-LDL

Nachdem eine mögliche Bedeutung von ApoJ in atherosklerotischen Läsionen aufgezeigt werden konnte, sollte untersucht werden, ob das in den Plaques befindliche ApoJ möglicherweise von in den Plaques befindlichen Zellen sekretiert wird. Die andere Möglichkeit wäre, dass es aus dem Serum stammt. Da es im Verlauf von Atherosklerose zu einer Anhäufung von ApoJ in den Plaques kommt (Ishiwaka *et al.*, 1998), war es interessant zu sehen, ob E-LDL zu einer vermehrten ApoJ Sekretion führt. Für diese Versuche wurden glatte Muskelzellen (VSMC) verwendet, da von ihnen bekannt ist, dass sie ApoJ mRNA exprimieren (Ishiwaka *et al.*, 1998). Um die ApoJ Regulation in VSMC zu untersuchen, wurde sowohl die Expression der mRNA mittels Northern Blot als auch die Sekretion des Proteins mittels Western Blot analysiert.

Für diese Versuche wurden die Zellen in Schalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70% kultiviert. Die Behandlung mit den Proben erfolgte unter serumfreien Bedingungen für den angegebenen Zeitpunkt.

In Abb.18 sieht man eine Zeitkinetik über einen Zeitraum von 48 Stunden. Wie aus früheren Experimenten schon bekannt war, wird ApoJ schon über die Zeit hochreguliert.

Vergleicht man allerdings die unterschiedlichen Proben an den verschiedenen Zeitpunkten miteinander, kann man ganz deutlich sehen, dass sowohl eine Behandlung mit LDL als auch mit E-LDL zu einer Repression der ApoJ mRNA führt. Diese Repression ist nicht nur in VSMC zu beobachten. Eine Behandlung von Fibroblasten (Rat-1 Zellen) mit E-LDL und LDL führt ebenfalls zu einer Reduktion der ApoJ mRNA (ohne Abb.). Dadurch kann man allerdings davon ausgehen, dass es sich in den VSMC nicht um eine spezifische ApoJ mRNA Reduktion handelt, sondern eher um eine zellübergreifende Beobachtung.

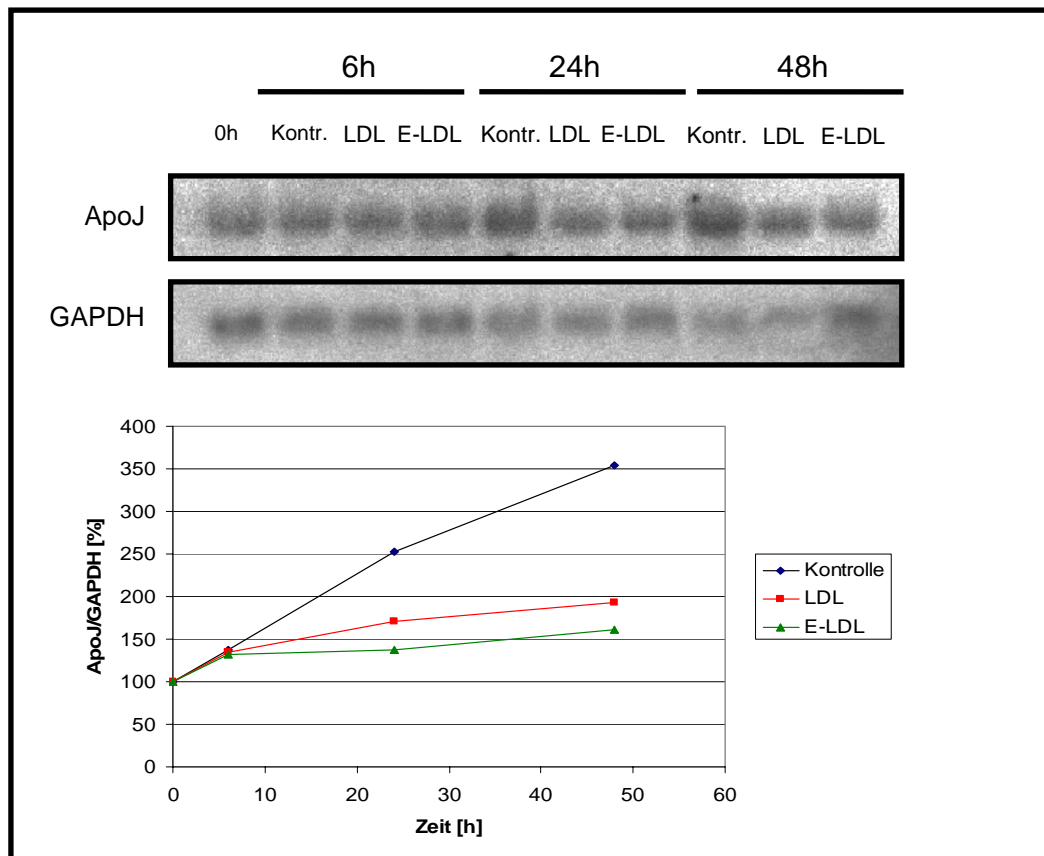


Abb. 22: Zeitkinetik der Regulation von ApoJ mRNA durch E-LDL und LDL: Northern Blot von 15µg gesamt RNA von CRL 2018. Nach Aussaat wurden die Zellen für 24h wachsen gelassen und anschließend 24h unter serumfreien Bedingungen gehalten. Die Behandlung erfolgte mit LDL(50µg/ml) und E-LDL(50µg/ml) über einen Zeitraum von 48 Stunden. Der Graph zeigt die densitometrische Auswertung des Northern Blot. Dabei wurden die Intensitäten der ApoJ-Banden und der GAPDH-Banden ins Verhältnis gesetzt.

Um zu sehen, ob diese starke Reduktion der mRNA sich auch auf die Sekretion des Proteins auswirkt, wurde ein Western Blot gemacht. Hierzu wurden die serumfreien Überstände von glatten Muskelzellen gesammelt und immer dasselbe Volumen aufgetragen. Bei einem sekretierten Protein ist es nicht einfach möglich ein unreguliertes Referenzprotein zu finden. Deshalb wurde immer exakt darauf geachtet, dass zu Versuchsbeginn immer die gleiche Anzahl von Zellen ausgesät wurde. Des Weiteren wurde vorher untersucht, ob die Behandlung der Zellen mit LDL und E-LDL nicht über den Zeitraum des Versuches zu einer Veränderung der Zellzahl führt. Dafür wurde ein Proliferationsassay von Promega verwendet. In Abb. 23 ist zu sehen, dass bei einer Konzentration von 50mg/ml E-LDL und LDL keine Veränderungen in der Zellzahl zu beobachten sind. Da dies die Konzentration ist, die für die Untersuchungen zur ApoJ Regulation verwendet wurde, kann also ausgeschlossen werden, dass die reduzierte Sekretion von ApoJ bei den mit E-LDL behandelten Proben auf eine verminderte Zellzahl zurückzuführen ist. Bei einer

höheren Konzentration von E-LDL (ab 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (gelbe Linie) sterben die Zellen wie erwartet sehr schnell ab, was auf die schon ausführlich besprochene Toxizität von E-LDL zurückzuführen ist.

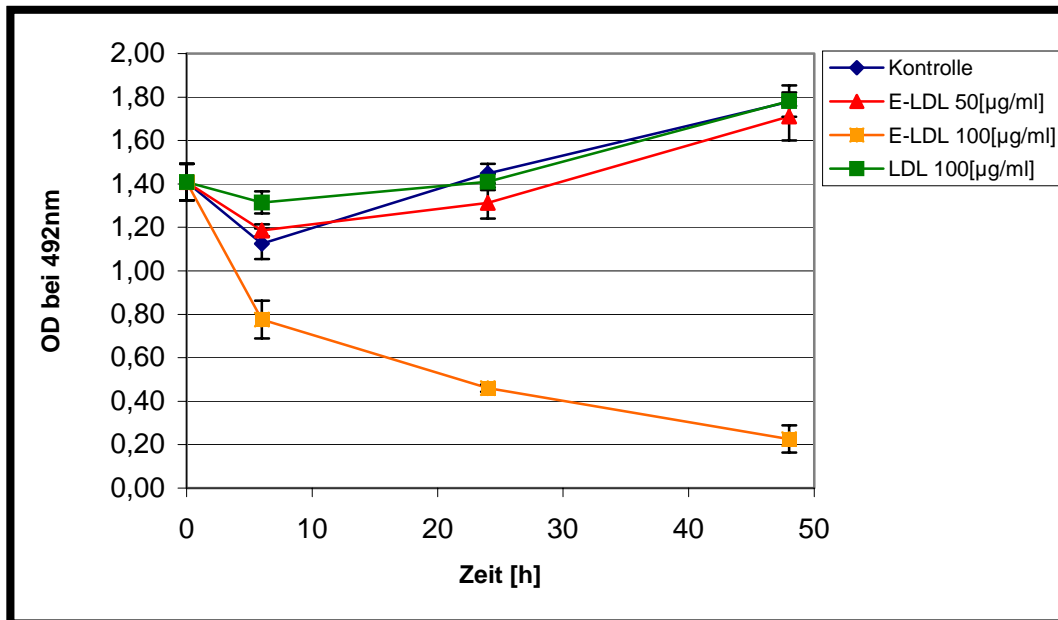


Abb. 23: Wachstumskinetik von CRL 2018 unter dem Einfluss von E-LDL/LDL: CRL2018 Zellen wurden in serumfreien Medium über einen Zeitraum von 48 Stunden mit LDL (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und E-LDL 50/100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert. Dabei wurde nach 6h, 24h und 48h der intrazelluläre NADP/NADPH-Gehalt der Zellen gemessen.

Für den Western Blot (Abb. 24) wurde ein von unserer Arbeitsgruppe hergestelltes polyklonales Antiserum aus Kaninchen verwendet. Es handelt sich dabei um ein Antiserum gegen rekombinantes Ratten-ApoJ, das in *Escherichia coli* überexprimiert wurde (Manfred Bartl Bleed 2/2).

Wenn man die Kontrollen miteinander vergleicht, dann kann man im Western Blot gut sehen, wie sich ApoJ über die Zeit hinweg im Medium ansammelt.

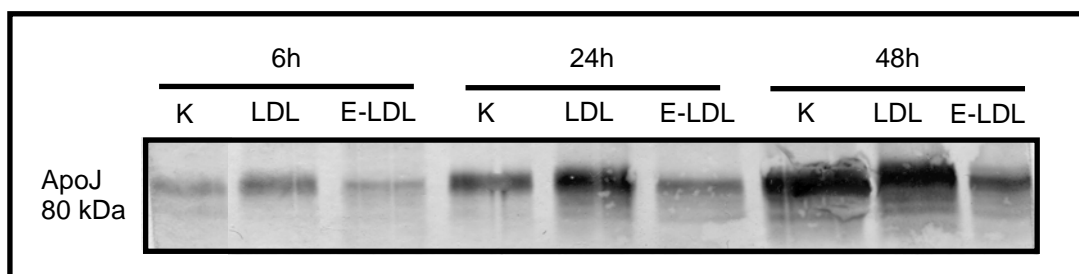


Abb. 24: Regulation von sekretiertem ApoJ durch E-LDL/LDL: Western Blot gegen ApoJ von Zellkulturüberständen von CRL 2018 Zellen. Die Zellen wurden mit LDL(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und E-LDL(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) über einen Zeitraum von 48 Stunden behandelt. Aufgetragen wurden 500 μl TCA-präzipitierter Zellkulturüberstand. Der Nachweis erfolgte mittels alkalischer Phosphatase-gekoppelter Antikörper.

Im Gegensatz zum Northern Blot kann man hier bei der Behandlung mit LDL so gut wie keine Reduktion der ApoJ Expression sehen. Die Reduktion durch E-LDL ist dafür umso deutlicher zu beobachten. Die Repression ist schon nach sechs Stunden deutlich erkennbar. Diese Unterschiede lassen sich eventuell auf die unterschiedlichen LDL Präparationen zurückführen, die den beiden Versuchen zugrunde liegen.

Die Vermutung, dass E-LDL ApoJ hochreguliert, hat sich also in diesem Versuchssystem nicht bestätigen lassen, sondern ein absolut gegenteiliges Ergebnis geliefert.

3.3. Regulation von ApoJ durch nekrotische Zellen

Ausgehend von den in vivo Befunden einer erhöhten ApoJ-Expression bei vielen pathophysiologischen Zuständen, darunter Atherosklerose, sollte die Regulation von ApoJ durch nekrotische Zellen im Zellkultursystem untersucht werden.

In der Dissertation von Markus Baiersdörfer wurde in Untersuchungen an Fibroblasten eine zweifache Induktion der ApoJ-mRNA durch die Behandlung mit nekrotischen Zellen aufgezeigt. Dadurch stellte sich die Frage, welche Bestandteile aus nekrotischen Zellen zu einer vermehrten Expression von ApoJ führen?

Um diese Fragen zu beantworten, wurden nekrotische Zellen durch fünfmaliges Einfrieren in Stickstoff hergestellt und bei 100.000g zentrifugiert. Bei dieser hohen Umdrehung pelletieren alle Membranfragmente und Zellorganellen und im Überstand erhält man die lösliche Fraktion mit den löslichen Zellbestandteilen. Mit diesen Proben wurden Fibroblasten über einen Zeitraum von bis zu 48h inkubiert.

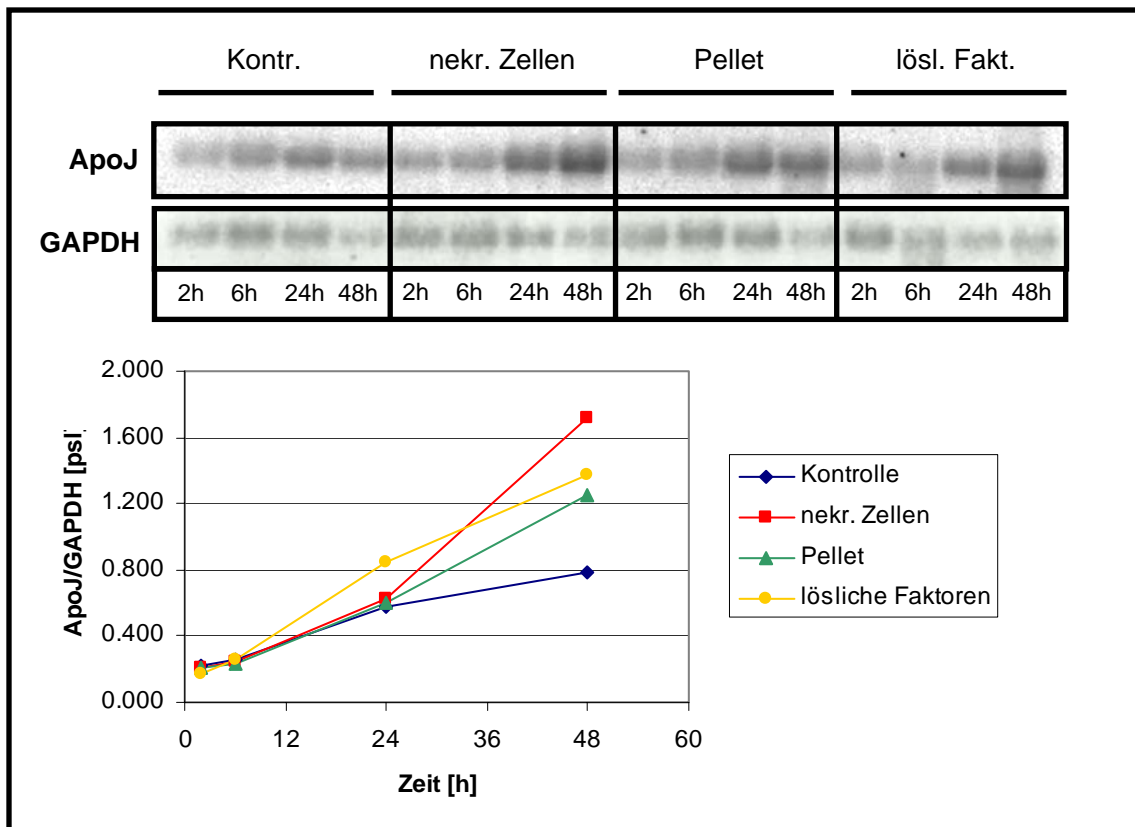


Abb. 25: Regulation der ApoJ mRNA durch nekrotische Zellen in Rat-1 Zellen: Northern Blot Analysen von 15µg gesamt RNA aus Rat-1 Zellen. Die Zellen wurden vor Versuchbeginn für 24h unter serumfreien Bedingungen kultiviert und anschließend für 48h mit gesamt nekrotischen Zellen ($1 \cdot 10^6$ Zellen/ml), Membranfragmenten (Pellet) und zytosolischen Faktoren (lösliche Faktoren) behandelt. Der Graph zeigt die densitometrische Auswertung des Northern Blot. Dabei wurden die Intensitäten der ApoJ-Banden und der GAPDH-Banden ins Verhältnis gesetzt.

Abb. 25 zeigt die Ergebnisse dieser Behandlung. Zum einen sieht man, wie schon in den Experimenten vorher, eine Hochregulation von ApoJ mRNA über den Zeitverlauf und zum anderen kann man sehen, dass beide Fraktionen (Pellet und Überstand) zu einer Erhöhung der mRNA Expression führen. Am stärksten ist die Expression allerdings nach der Behandlung mit gesamt nekrotischen Zellen. Der Effekt ist also additiv. Es befinden sich sowohl im Zytosol als auch in den Membranfragmenten Faktoren, die eine vermehrte Expression von ApoJ mRNA hervorrufen. Frühere Versuche, deren Ergebnisse hier nicht gezeigt werden, haben schon ergeben, dass sich auch durch die Behandlung von Zellen mit künstlich hergestellten Vesikeln, die Phosphatidylserin enthalten, eine leichte Stimulierung hervorrufen lässt. Dies deutet darauf hin, dass die durch Membranfragmente hervorgerufene Stimulierung durch Phosphatidylserin zustande kommen könnte.

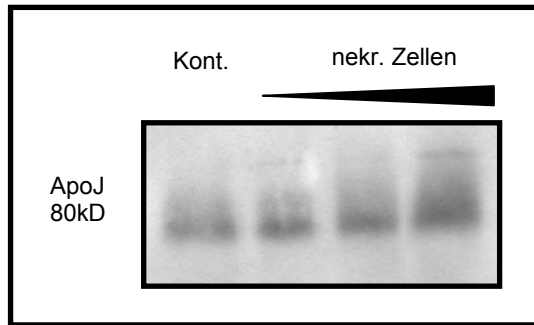


Abb. 25: Induktion der ApoJ-Sekretion durch nekrotische Zellen: Western Blot gegen ApoJ von Zellkulturüberständen von Rat-1 Zellen, die mit einer zunehmenden Anzahl von nekrotischen Zellen behandelt wurden. Maximal wurden $1 \cdot 10^7$ Z/ml eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 48 h. Der Nachweis erfolgte mittels Alkalischer Phosphatase-gekoppelter sekundär-Antikörper.

In Abb. 25 sind die Ergebnisse der Untersuchungen der Zellkulturüberstände mittels Western Blot zu sehen. Dieses Ergebnis bestätigt die Northern Blot Analysen. Die Anhäufung der ApoJ-mRNA im Zytosol führt tatsächlich auch zu einer vermehrten Sekretion des Proteins. Da man für ein sekretiertes Protein allerdings kein Referenzprotein finden kann, lässt sich der Western Blot nicht quantifizieren. Damit man trotzdem davon ausgehen kann, dass das Signal von der gleichen Anzahl von Zellen stammt, wurden gleiche Zellzahlen ausgesät und die Zellen zur Kontrolle nach der Behandlung noch mal ausgezählt.

3.4. Induktion von ApoJ über TLR3

In den Arbeiten von Markus Baiersdörfer wurde ein Zusammenhang zwischen der Induzierbarkeit von ApoJ durch nekrotischen Zellen und Expression von Toll-like Rezeptoren aufgezeigt. Durch die Verwendung von TLR-spezifischen Liganden konnte Markus Baiersdörfer zeigen, dass eine bis zu fünffache Stimulierung der ApoJ-mRNA Expression durch den TLR3-spezifischen Liganden poly(I:C) erzielt werden kann. Dabei handelt es sich um synthetische doppelsträngige RNA, bestehend aus den Basen Cytosin und Inosin. Auch mit LPS (TLR4-Ligand) konnte eine leichte, aber wesentlich geringere Stimulierung beobachtet werden. Dadurch lag die Vermutung sehr nahe, dass TLR3 eine entscheidende Rolle bei der ApoJ-Regulation zukommt. Dies zu untersuchen, sollte nun Bestandteil der vorliegenden Arbeit sein.

Aus diesen Befunden ergaben sich mehrere Fragen:

- Welcher intrazelluläre Signaltransduktionsweg ist für die Regulation von ApoJ verantwortlich?
- Welche Komponente aus nekrotischen Zellen könnte für die ApoJ Regulation verantwortlich sein?

- Reicht allein das Vorhandensein von TLR 3 aus, um eine ApoJ-Regulation durch nekrotische Zellen zu erzielen?

3.4.1. Untersuchungen zum intrazellulären Signaltransduktionsweg der ApoJ Regulation über TLR3

Die Signaltransduktion von TLR3 erfolgt über den MyD88-unabhängigen Weg über das intrazelluläre Adapterprotein TRIF (TIR domain-containing adapter). Über verschiedene Kinasen können von TLR3 ausgehend drei verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert werden:

- IRF-3
- NF- κ B
- AP1

Die verschiedenen Signalweiterleitungen sind in Abb. 26 zusammengefasst. Untersucht man den Ratten-ApoJ-Promotor mit dem Programm MatInspector 2.2. findet man für alle Transkriptionsfaktoren potentielle Bindestellen. Für die AP-1 Bindestelle kurz vor dem Transkriptionsstart ist bereits gezeigt worden, dass sie an der ApoJ Regulation beteiligt ist (Jin et al., 1997 und Gutacker et al., 1999).

Ziel war es nun zuerst, eine Möglichkeit zu finden, diese Signaltransduktionswege in Bezug auf die ApoJ-Regulation zu untersuchen.

In der Veröffentlichung von Harii *et al.* (2005) wird die Wirkung von Methimazole und einem Derivat „C10“ auf das TLR3 Signaling aufgezeigt. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass Methimazole zwar zu einer Inhibierung des Interferon- β -Signals führt, das NF- κ B Signal hingegen unbeeinflusst bleibt. Für das Methimazolederivat „C10“ wird auch gezeigt, dass es die Aktivierung von IRF3 durch poly (I:C) hemmt. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass Methimazole und seine Derivate spezifisch den Arm der TLR3- Signalweiterleitung hemmen, der zu einer Aktivierung von IRF3 führt. Die genaue Wirkung von Methimazole und an welcher Stelle die Signaltransduktion unterbrochen wird, ist allerdings noch nicht bekannt. Der zweite Weg der TLR3 Signalweiterleitung, der über TRIF und TRAF6 zu einer Aktivierung von NF- κ B führt, bleibt durch eine Behandlung mit Methimazole unbeeinflusst.

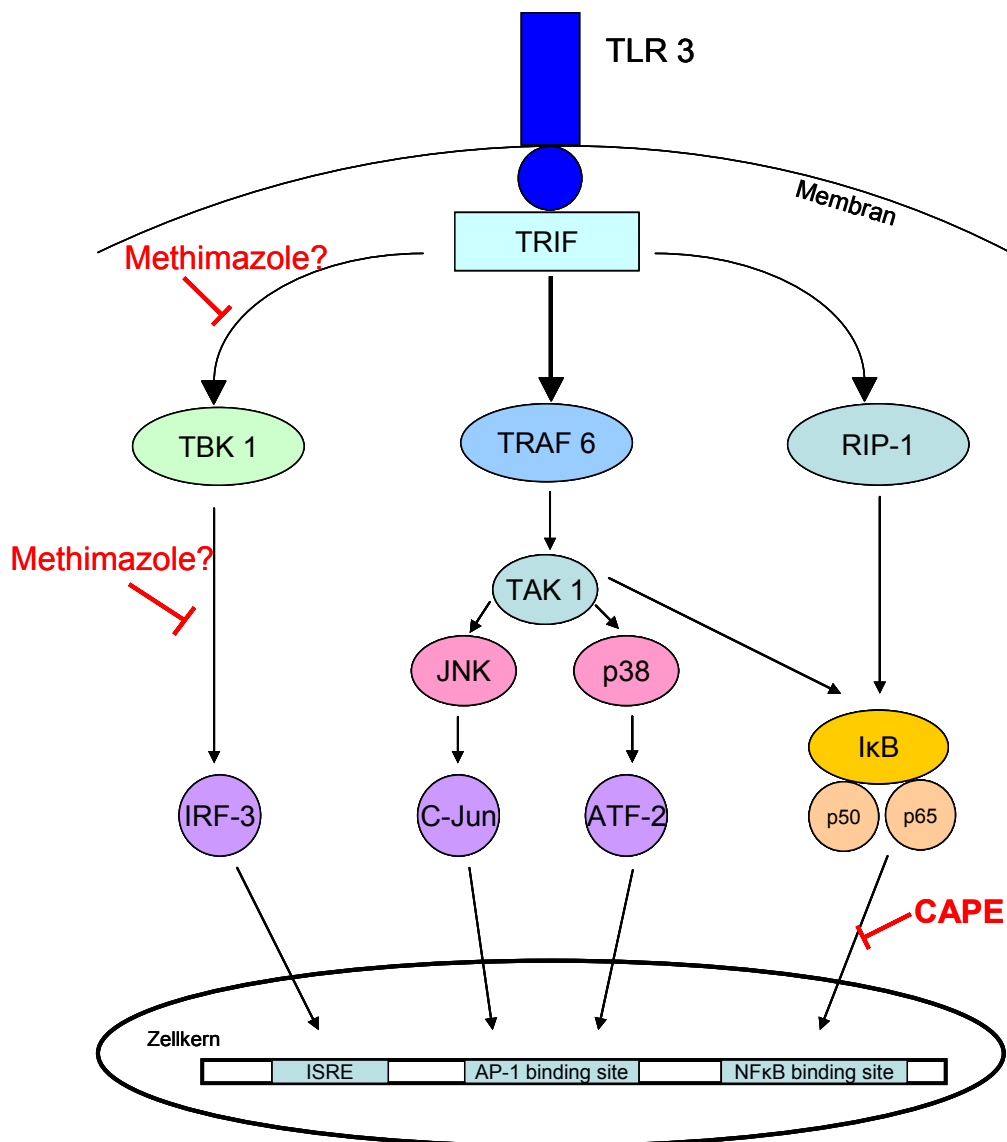


Abb. 26: Vereinfachte Darstellung des TLR3-Signalings: Die Aktivierung von TLR 3 führt immer zu einer Aktivierung von TRIF. Dort verzweigt sich die Signalweiterleitung in drei verschiedene Wege. Der eine führt letztendlich zur Bindung von Transkriptionsfaktoren an AP-1 und NFκB Bindestellen. Der andere zur Aktivierung von Typ-1 Interferonen durch ISRE Elemente.

Durch die Behandlung von VSMC mit Methimazole und einem NF-κB-Inhibitor sollte nun untersucht werden, ob sich das ApoJ Signal, ausgelöst durch poly (I:C) und nekrotischen Zellen, inhibieren lässt. In ersten Versuchen wurde der Konzentrationsbereich ausgetestet, den die Zellen gut vertragen, ohne dass eine Veränderung ihrer Morphologie zu erkennen war. Die Zellen wurden wie bei den vorherigen Experimenten in 10cm Schalen ausgesät und 24h wachsen gelassen. Für

weitere 24 Stunden wurden sie serumfrei adaptiert und dann für 16 Stunden mit den Proben behandelt.

In Abb.27 sieht man einen Northern und einen Western Blot von CRL 2018 Zellen, die mit Methimazole behandelt wurden. Es stellte sich heraus, dass eine Konzentration von wesentlich mehr als 10mM Methimazole für die Zellen toxisch ist, es sterben über 50% der Zellen ab. Deshalb wurden diese Daten nicht verwendet. Bei der Behandlung der Zellen mit 10mM Methimazole zeigen die Zellen hingegen keine morphologische Veränderung. Das ApoJ Basissignal lässt sich kaum inhibieren. Induziert man allerdings den TLR3-Signalweg mittels poly (I:C), kann man eine deutliche Reduktion der ApoJ-mRNA-Stimulation durch Methimazole erkennen, die sich konzentrationsabhängig verhält. Die Reduktion durch 10mM Methimazole liegt bei ca. 40%. Auch im Western Blot (Abb.27b) sieht man eine Inhibierung der ApoJ Sekretion durch Methimazole, wobei man hier kaum einen Unterschied zwischen den verschiedenen Konzentrationen erkennen kann. Man kann aufgrund der Western Blots davon ausgehen, dass es sich bei der hier regulierten Form von ApoJ um die sekretierte Form des Proteins handelt.

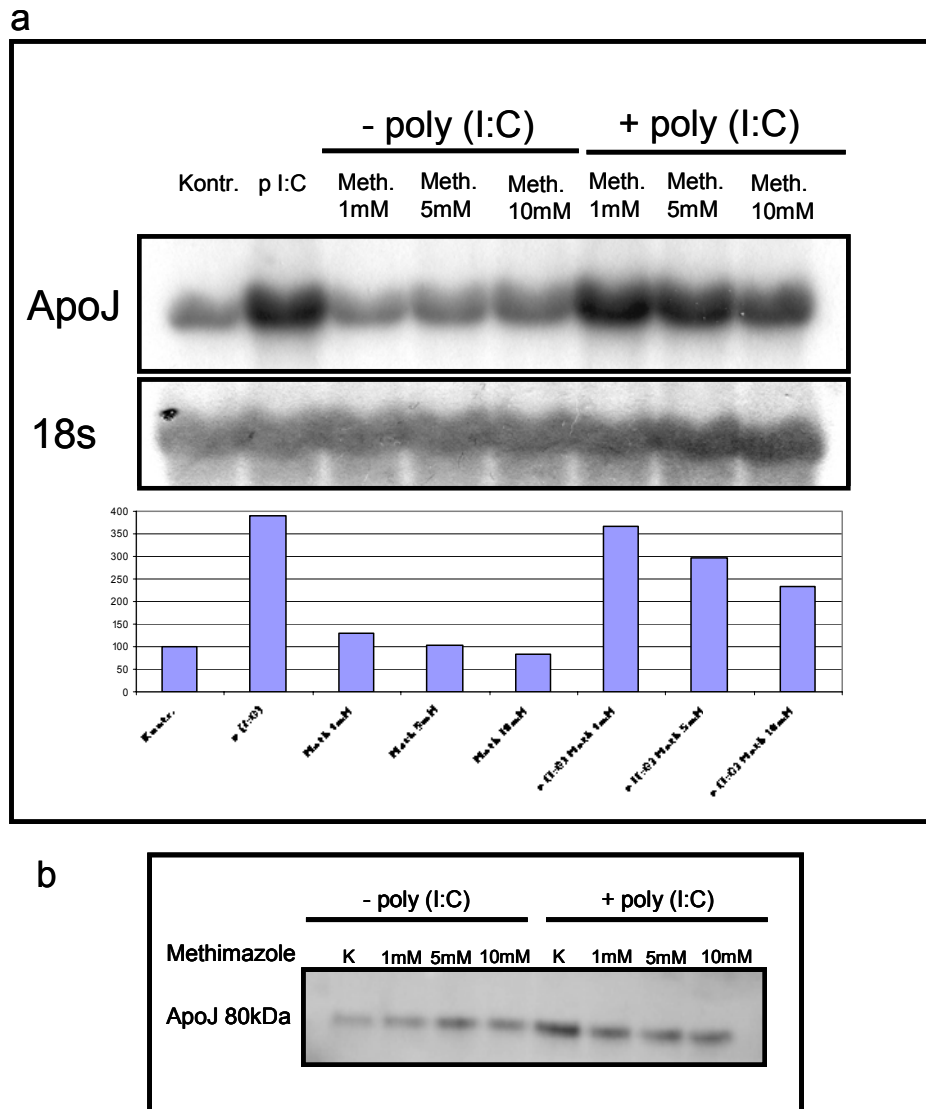


Abb. 27: Die Induktion der ApoJ-Expression durch poly (I:C) wird durch Methimazole inhibiert: CRL 2018 Zellen wurden nach Aussaat für 24h serumfrei gesetzt und anschließend gleichzeitig mit 50µg/ml poly (I:C) und verschiedenen Konzentrationen Methimazole für 16h behandelt. Abb. a zeigt den Northern Blot von 15µg gesamt RNA. Das Balkendiagramm zeigt die densitometrische Auswertung des Northern Blot. Dabei wurden die Intensitäten der ApoJ-Banden und der 18s-Banden ins Verhältnis gesetzt. Abb. b zeigt den Western Blot von 20µl Kulturüberständen. Der Nachweis erfolgte mittels HRP-gekoppelten sekundär-Antikörpern.

Da die stärkste Inhibierung der ApoJ-Induktion durch eine Konzentration von 10mM Methimazole erzielt werden konnte, wurde diese Konzentration verwendet um in einem weiteren Versuch zu untersuchen, ob auch die Induktion von ApoJ durch zytosolische Faktoren ebenfalls durch Methimazole inhibiert werden kann. Dazu wurde der Versuch mit 10mM Methimazole unter denselben Versuchsbedingungen wiederholt und zusätzlich eine Probe mit zytosolischen Faktoren (100.000g Überstand) behandelt, die wie oben beschrieben hergestellt wurden. In Abb.28 sieht man, dass sich auch die Induktion der ApoJ-mRNA durch zytosolische Faktoren durch Methimazole inhibieren lässt. Dieses Ergebnis gibt einen ersten Hinweis

darauf, dass die Induktion von ApoJ durch zytosolische Bestandteile auch über TLR3 laufen könnte.

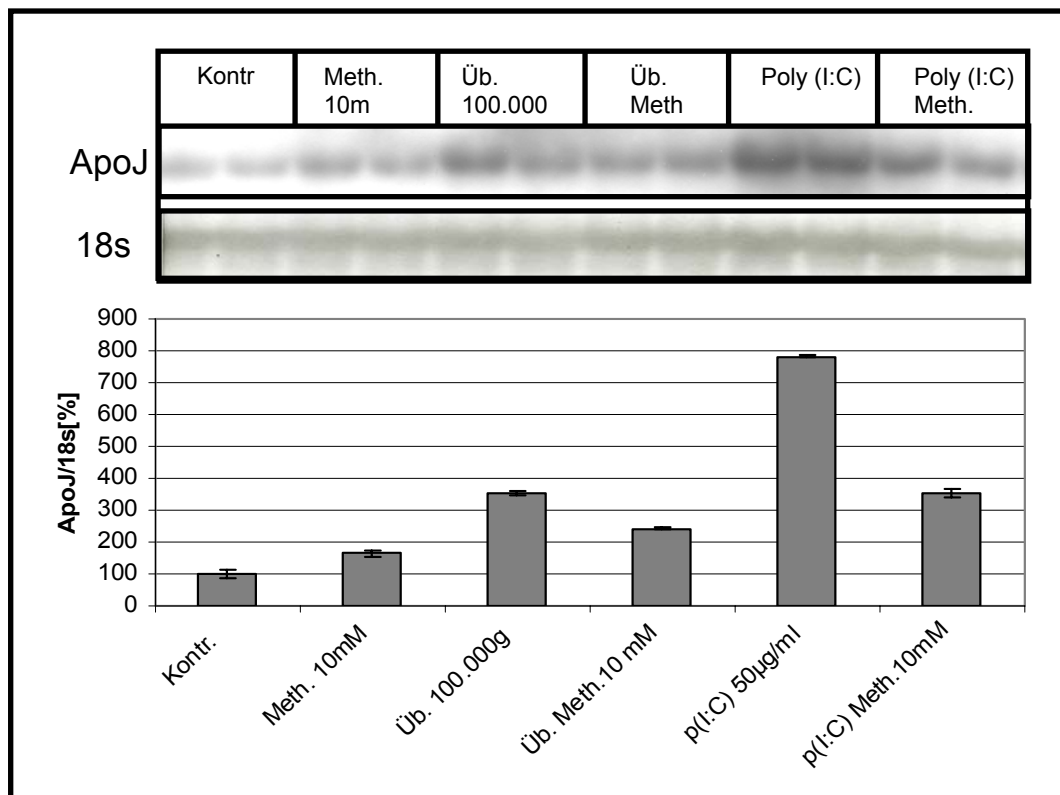


Abb. 28: Die Induktion der ApoJ-Expression durch zytosolische Komponenten wird durch Methimazole inhibiert: Northern Blot von 15µg gesamt RNA aus CRL 2018 Zellen. Die Zellen wurden nach Aussaat für 24h serumfrei gesetzt und anschließend mit 10mM Methimazole und poly (I:C) bzw. zytosolischen Komponenten (100.000 g Überstand) von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml für 16h behandelt. Das Balkendiagramm zeigt die densitometrische Auswertung des Northern Blots. Dabei wurden die Intensitäten der ApoJ-Banden und der 18s-Banden ins Verhältnis gesetzt.

Um zu überprüfen, inwiefern ApoJ über den zweiten durch TLR3 vermittelten Signalweg, der zu einer Aktivierung von NF-κB führt, sollten analoge Experimente mit einem NF-κB-Inhibitor durchgeführt werden. Dieser Weg führt über die Kinase TRAF6 zu Aktivierung von NF-κB. Dieser Weg wird ebenfalls aktiviert, wenn man TLR4 mittels LPS induziert. Da die Ergebnisse von M. Baiersdörfer gezeigt haben, dass auch eine Behandlung mit LPS zu einer leicht erhöhten ApoJ Expression führt, wurde die Vermutung angestellt, dass auch an einer ApoJ-Regulation beteiligt ist.

Für NF-κB sind zahlreiche Inhibitoren kommerziell erhältlich. Sie unterscheiden sich in ihrer Wirkungsweise und damit ganz entscheidend in ihrer Spezifität. Für die Experimente wurde der Inhibitor CAPE (Caffeic acid phenethyl ester) verwendet. Er kommt in der Natur in den Pollensäcken von Bienen vor und gilt als besonders spezifischer Inhibitor, da er die Translokation der p65 Untereinheit von NF-κB in den Zellkern verhindert (Natarajan *et al.*, 1996). Die Verwendung eines NF-κB-Inhibitors

für die Untersuchung der ApoJ-Regulation stellte sich als sehr schwierig heraus. NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Regulation von sehr vielen Genen beteiligt ist. Dazu zählen unter anderem Zellzyklusgene wie Cyclin D1, welche die Zellproliferation regulieren, aber auch antiapoptotische Proteine und solche, die für die Immunantwort von großer Bedeutung sind, wie Cytokine und Chemokine. Durch einen NF- κ B-Inhibitor wird nun die Aktivierung all dieser Gene unterdrückt, weshalb alle Inhibitoren für die Zellen toxisch sind. Die meisten Zellen lassen sich deshalb nur über einen kurzen Zeitraum mit diesen Inhibitoren behandeln, bevor sie sterben. Nun erfolgt die Induktion von ApoJ allerdings relativ langsam. Die Induktion durch nekrotische Zellen oder zytosolische Faktoren kann man erst nach 16 bis 24 Stunden gut erkennen. Die Behandlung mit poly (I:C) führt allerdings schon nach 8 Stunden zu einer sichtbaren Stimulierung. Deshalb wurde in zahlreichen Experimenten bestimmt, wie lange und in welcher Konzentration VSMC eine Behandlung mit CAPE vertragen ohne sich morphologisch zu verändern. Es stellte sich heraus, dass maximal eine Konzentration von 12,5 μ g/ml verwendet werden kann, und das auch nur über einen Zeitraum von 8 Stunden.

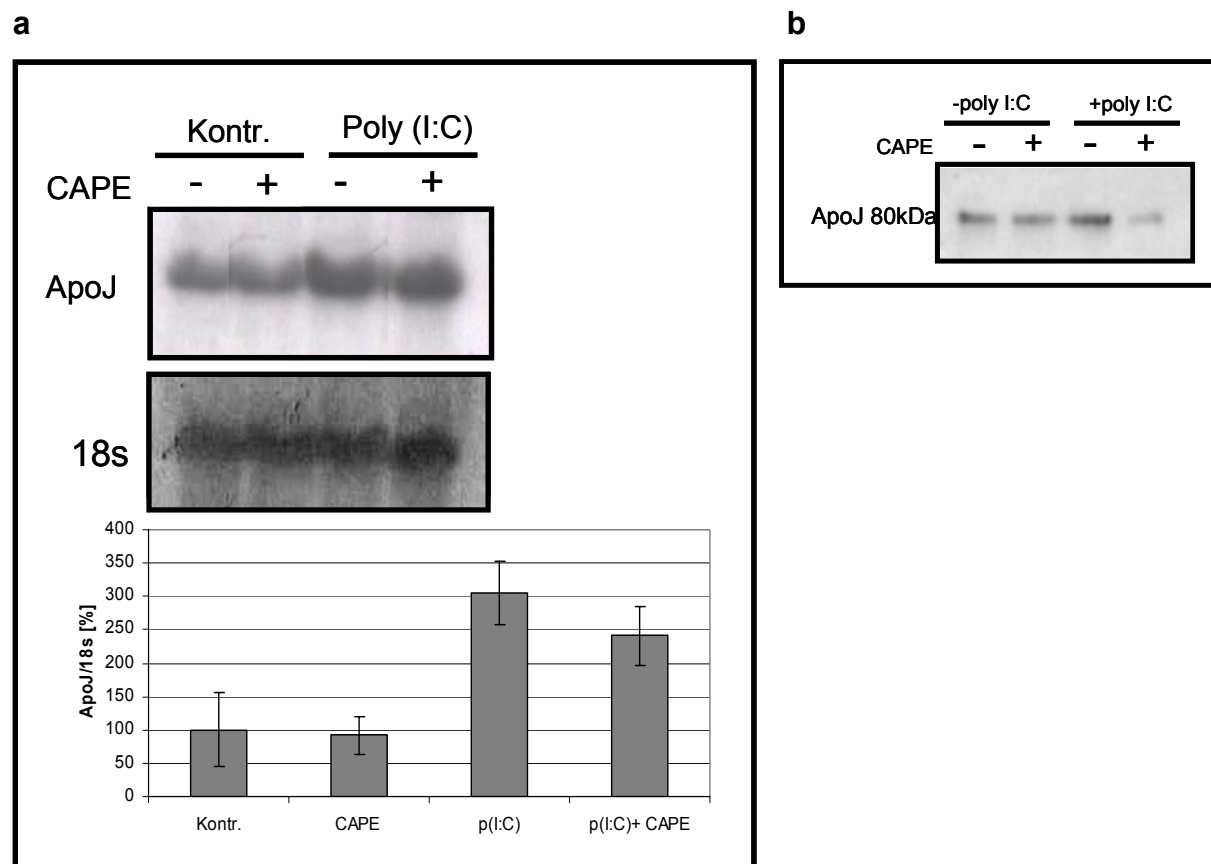


Abb. 29: Inhibierung der poly (I:C) vermittelten ApoJ-Induktion durch CAPE: CRL 2018 Zellen wurden nach Aussaat für 24h serumfrei kultiviert und anschließend über 8h mit CAPE (12,5 μ g/ml) und poly(I:C) (50 μ g/ml) behandelt. Abb. a Northern Blot-Analysen. Das Balkendiagramm zeigt die densitometrische Auswertung von 3 unabhängigen Experimenten. Dabei wurden die Intensitäten der

ApoJ-Banden und der GAPDH-Banden ins Verhältnis gesetzt. Abb. b zeigt einen Western Blot von 20µl CRL2018 Zellkulturüberständen. Der ApoJ-Nachweis erfolgte mittels HRP-gekoppelter sekundär-Antikörper.

In Abb. 29 werden die Ergebnisse der Northern und der Western Blot Analyse für die oben genannten Bedingungen gezeigt. Man kann eine leichte Reduktion der ApoJ mRNA durch den NF-κB-Inhibitor erkennen. Genauso wie bei den Experimenten mit Methimazole ist diese Reduktion allerdings nur bei einer Aktivierung von TLR3 zu erkennen, die Basisexpression bleibt gleich.

Diese Ergebnisse stützen die Vermutung, dass beide Wege der TLR3 Signalweiterleitung aktiviert werden, der Weg, der zu einer Aktivierung von IRF-3 führt, aber wohl der bedeutsamere ist.

3.4.2. Inkubation von glatten Muskelzellen mit Interferon-β

Da die Induktion von ApoJ auch nach poly (I:C) Behandlung erst nach 8h zu sehen ist, lag die Vermutung nahe, dass es sich um ein sekundär induziertes Gen handelt. Bei primär regulierten Genen geht man davon aus, dass eine Antwort spätestens nach 1-2 Stunden erfolgt.

Die Aktivierung von TLR3, führt wie oben ausführlich erläutert, zur Aktivierung von IRF-3. Dieser Transkriptionsfaktor bindet nach Dimerisierung im Kern an so genannten ISRE-Regionen (interferon stimulated response elements) an die DNA. Durch IRF-3 kommt es insbesondere zur Induktion des Typ-1 Interferons IFN-β. Außer Typ-1 Interferonen kommt es noch zur Aktivierung einer ganzen Reihe von Genen der VSIG (viral stress-inducible genes), die für die Abwehr von Viren eine große Rolle spielen, auf die hier aber nicht näher eingegangen werden soll. Interferon-β bindet an der Zelloberfläche an den Interferon- Typ-1 Rezeptor. Nach einer Dimerisierung können sich die Intrazellulär gekoppelten Januskinasen (JAK) gegenseitig aktivieren und es kommt über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STATs (signal transducers and activators of transcription). unter anderem zu Regulation von TLR3 und iNOS (induzierbare NO-Synthase) So führt ein Binden von doppelstängiger RNA an TLR3 auch zu einem autokrinen Loop, der unter anderem eine Hochregulation des Rezeptors zu Folge hat. Von iNOS wurde in der Arbeit von M. Baidersdörfer schon gezeigt, dass sie in unserem System ebenfalls hochreguliert wird.

Daher wurde vermutet, dass ApoJ vielleicht sekundär durch Interferone induziert werden könnte. Versuche in diese Richtung zeigten allerdings, dass eine alleinige

Inkubation mit rekombinantem Interferon- β der Ratte in verschiedenen Konzentrationen nicht zu einer Stimulierung der mRNA von ApoJ führt Abb. 30.

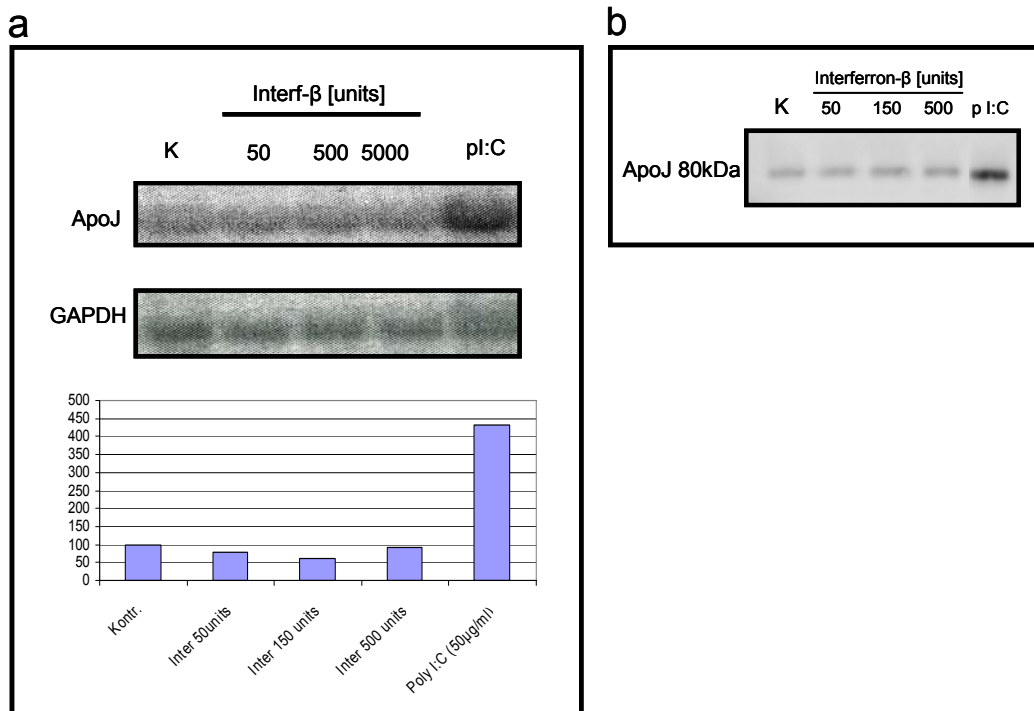


Abb. 30: Eine Inkubation von Interferon- β führt in CRL 2018 Zellen nicht zu einer ApoJ-Regulation: CRL2018 Zellen wurden nach Aussaat für 24h serumfrei gesetzt und anschließend für 16h mit verschiedenen Konzentrationen rekombinanten Ratten Interferon - β behandelt. Abb. a zeigt den Northern Blot von 15 μ g gesamt RNA aus CRL2018 Zellen. Das Balkendiagramm zeigt die densitometrische Auswertung des Blots. Dafür wurden die Intensitäten der ApoJ-Banden und der GAPDH-Banden ins Verhältnis gesetzt. Abb. b zeigt einen Western Blot von 20 μ l der Kulturüberstände dieser Experimente. Der Nachweis erfolgte mittels HRP-gekoppelter sekundär-Antikörper. In beiden Blots ist keine Regulation durch Interferon- β zu erkennen. Als Kontrolle wurde eine Probe mit poly (I:C) (50 μ g/ml) behandelt.

Um zu untersuchen, ob eine Vorinkubation mit Interferon- β , gefolgt von einer Stimulierung mit poly (I:C) oder nekrotischen Zellen, eine signifikante Steigerung der ApoJ-Expression zu Folge hat, wurden die Zellen nach Aussaat für 24h serumfrei gesetzt, gefolgt von einer vierstündigen Vorinkubation mit 500 Units rekombinanten Interferon- β der Ratte. Anschließend wurden die Zellen entsprechend den anderen Versuchen für 16h mit poly (I:C) bzw. nekrotischen Zellen behandelt.

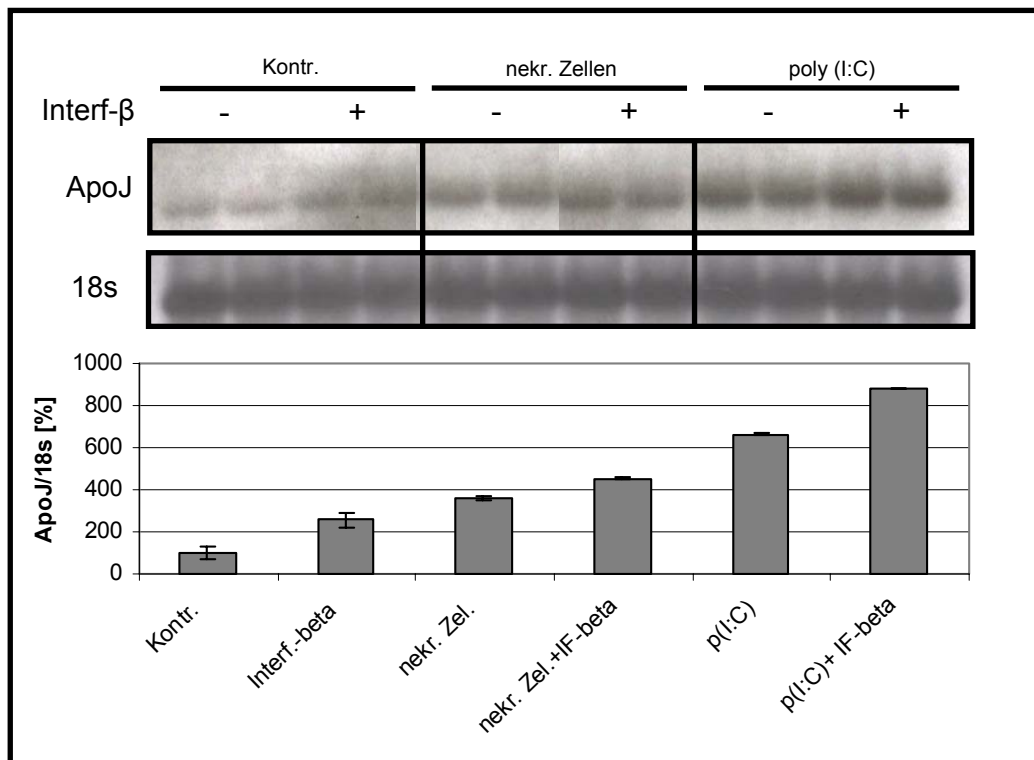


Abb. 31: Eine Vorinkubation mit Interferon-β führt zu einer gesteigerten ApoJ-mRNA Expression durch nekrotische Zellen und poly (I:C): CRL2018 Zellen wurden nach Aussaat für 24h serumfrei gesetzt und anschließend mit 500 Units rekombinatem Interferon-β der Ratte für 4h inkubiert. Danach wurden die Zellen für 16h mit poly (I:C) (50µg/ml) bzw. nekrotischen Zellen inkubiert. Northern Blot von 15µg gesamt RNA aus CRL 2018 Zellen. Das Balkendiagramm zeigt die densitometrische Auswertung des Northern Blot. Dabei wurden die Intensitäten der ApoJ-Banden und der 18s-Banden ins Verhältnis gesetzt.

In Abb. 31 kann man sehen, dass sowohl bei der Behandlung mit poly (I:C) als auch mit nekrotischen Zellen durch die Vorinkubation mit Interferon-β eine Steigerung der ApoJ mRNA Expression von ca. 20% erzielt werden kann. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass an der Regulation von ApoJ über TLR3 noch weitere Elemente beteiligt sind, die nicht ausschließlich über TLR3, sondern auch sekundär über Interferon-Rezeptor-Typ-1 aktiviert werden.

3.4.3. Charakterisierung der aktivierenden Komponente aus nekrotischen Zellen

Noch nicht beantwortet war auch die Frage, durch welche Komponente aus nekrotischen Zellen bzw. cytosolischem Extrakt eine Induktion von ApoJ über TLR3 erfolgen könnte. Von TLR3 ist der einzig beschriebene Ligand doppelsträngige RNA (dsRNA). Von Alexopoulou *et al.* wurde 2001 erstmals gezeigt, dass virale doppelsträngige RNA TLR3 aktiviert. 2004 Kariko *et al.* zeigten, dass mRNA, entlassen aus nekrotischen Zellen, ein Ligand für TLR3 ist. Ein Jahr später wurde

gezeigt, dass dsRNA isoliert aus Eiern des Parasiten *Schistosoma* ebenfalls TLR3 aktivieren kann (Aksoy *et al.*, 2005).

Die einfachste Annahme war also, dass es sich bei dem aktivierenden Faktor um eine Form von RNA handeln könnte, die, freigesetzt aus nekrotischen Zellen, über TLR3 ApoJ aktiviert. Dazu sollte zum einen untersucht werden, ob gesamt RNA isoliert aus eukaryotischen Zellen in der Lage ist, die ApoJ-Expression zu stimulieren und zum anderen, ob eine RNaseA-Behandlung von nekrotischen Zellen und zytosolischen Komponenten die ApoJ Induktion vermindert.

Um zu testen, ob RNA aus eukaryotischen Zellen zu einer ApoJ Induktion führt, wurde gesamt RNA aus Rat-1 Zellen nach dem Standardprotokoll isoliert und in einer Konzentration von 350µg/ml auf die Zellen gegeben.

Die RNaseA-Behandlung von nekrotischen Zellen und zytosolischem Extrakt erfolgte über Nacht bei 37°C. Zur Kontrolle wurden auch die Proben, die kein Enzym beinhalteten, mitinkubiert, um auszuschließen, dass der stimulierende Faktor allein durch die Temperaturbehandlung zerstört wird. Abb. 32a zeigt die Ergebnisse dieser Versuche. Zunächst ist zu sehen, dass eine Behandlung mit eukaryotischer RNA zu einer 2fachen Induktion von ApoJ führt, was bedeutet, dass sehr wohl RNA aus nekrotischen Zellen ApoJ-induzierende Eigenschaften besitzen könnte. Diese Beobachtung wird durch die Ergebnisse des RNaseA-Verdau bestätigt. Alle Stimuli von poly (I:C), welches als Kontrolle eingesetzt wurde, über nekrotische Zellen, cytosolische Komponenten und RNA aus eukaryotischen Zellen verlieren durch den RNaseA Verdau ihre Fähigkeit ApoJ zu induzieren. Das heißt, wenn man in nekrotischen Zellen die RNA zerstört, dann kann man nur eine deutlich reduzierte Aktivierung des Signals sehen. Die Restaktivität wird aus den Membranfragmenten der nekrotischen Zellen stammen. Bei cytosolischem Überstand hingegen ist nach RNaseA-Verdau gar keine Aktivierung der ApoJ-mRNA zu sehen. Dies zeigt, dass es sich bei dem Stimulus aus nekrotischen Zellen auch um RNA handelt.

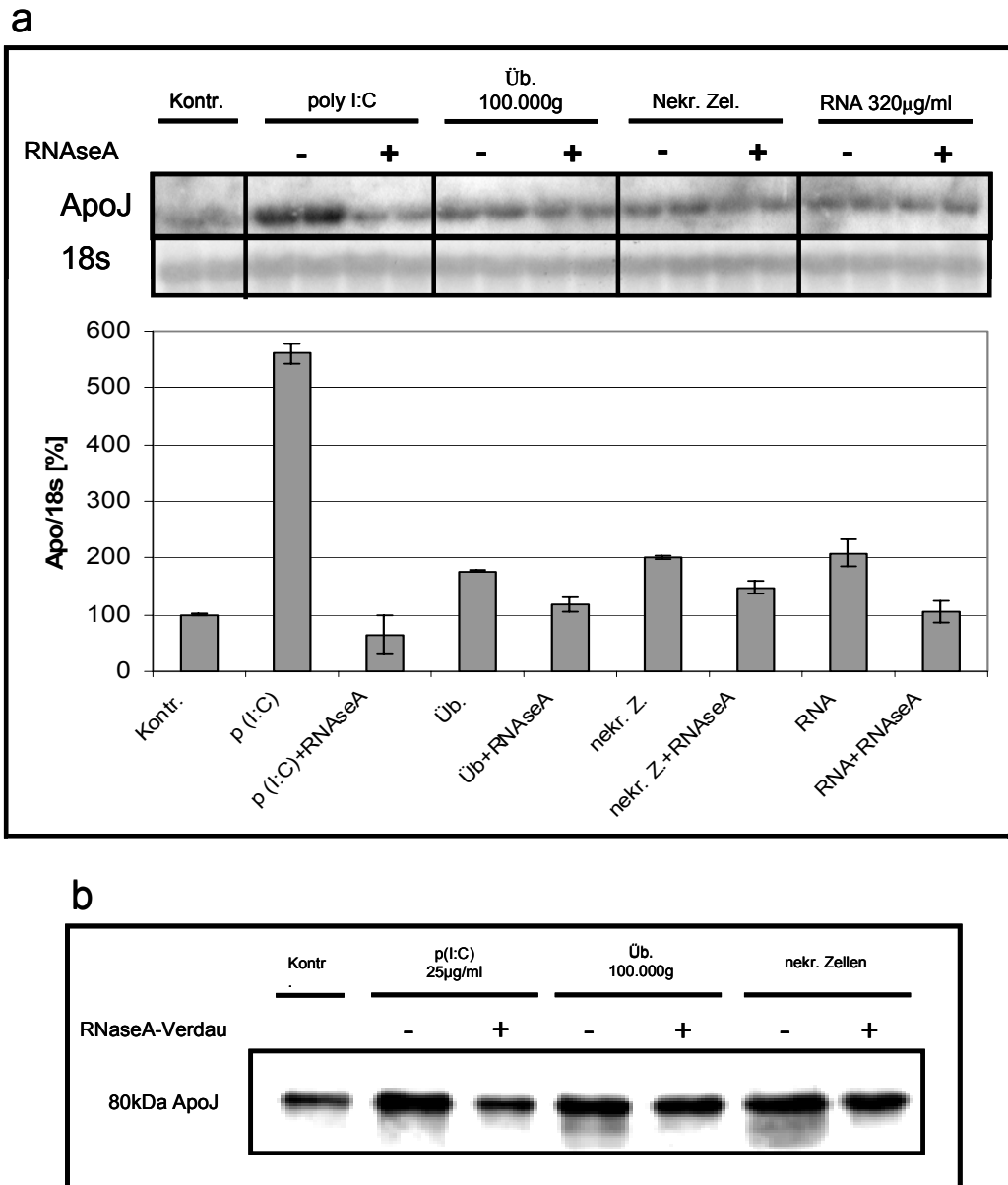


Abb. 32: RNA aus eukaryotischen Zellen induziert ApoJ-Regulation: Die verwendeten Stimuli poly (I:C) (50µg/ml), zytosolische Extrakte (100.000g Überstand) von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml, nekrotische Zellen ($1 \cdot 10^6$ Zellen/ml) und RNA (320µg/ml) isoliert aus Rat-1 Zellen wurden über Nacht mit RNaseA bei 37°C behandelt. Auch die Kontrollen ohne RNaseA wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden CRL 2018 Zellen mit diesen Proben für 16h behandelt. Abb. a zeigt den Northern Blot von 15µg gesamt RNA. Das Balkendiagramm zeigt die densitometrische Auswertung des Northern Blot. Dabei wurden die Intensitäten der ApoJ-Banden und der 18s-Banden ins Verhältnis gesetzt. Abb. b zeigt den Western Blot von 20µl der Zellkulturüberstände. Der ApoJ-Nachweis erfolgte mittels HRP-gekoppelter sekundär-Antikörper.

Die Ergebnisse des dazugehörigen Western Blots 32b der entsprechenden Zellkulturüberstände bestätigen die Ergebnisse des Northern Blots und zeigen zusätzlich, dass die Regulation der Transkription auch zu einer vermehrten Sekretion von ApoJ führt.

3.4.4. Expression von TLR3 in TLR3-negativen 10A-Zellen

Wie bereits erwähnt, zeigte sich in den Untersuchungen von M. Baiersdörfer, dass 10A-Zellen (Dottersackzellen aus der Maus) zwar ein relativ gutes ApoJ Basissignal aufweisen, sich die ApoJ Expression aber nicht durch nekrotische Zellen oder poly (I:C) induzieren lässt. Außerdem zeigte sich in RT-PCR Experimenten, dass sie keine Expression von TLR3 aufweisen. Diese Ergebnisse machen sie dadurch zu einem idealen Kandidaten für die Charakterisierung der Rolle vom TLR3 in der Regulation der ApoJ-Expression.

Dazu wurden diese Zellen mit einem TLR3-Expressions Vektor (pFLAG-CMV-1), in den der gesamte humane TLR3 hinter einen CMV-Promotor (Cytomegalovirus) inkloniert wurde transfiziert. Da dem Rezeptor durch den Vektor eine Aminosäuresequenz (FLAG-Tag) an den C-Terminus von TLR3 angehängt wird, lässt sich die Expression in den Zellen mit einem universellen Antikörper gegen diesen FLAG nachweisen.

3.4.4.1. Transiente Expression des humanem TLR3 in 10A Zellen

Um möglichst schnell eine erste Antwort zu erhalten, wurden 10A Zellen mit dem hTLR3-Expressions Vektor für 12h transfiziert, für 24h serumfrei kultiviert und danach mit sowohl mit poly (I:C) als auch mit nekrotischen Zellen für 16h inkubiert.

Zur Überprüfung, ob diese transient transformierten Zellen auch wirklich TLR3 exprimieren, wurde eine RT-PCR mit Primern für den humanen TLR3 durchgeführt. Abb.29a zeigt die Ergebnisse dieser PCR. Man sieht in jeder Spur eine Bande für GAPDH, welche als interne Kontrolle mitgeführt wurde, aber nur bei den mit hTLR3 transient transfizierten Zellen eine weitere Bande, die auf die Expression des TLR3 zurückzuführen ist.

In Abb. 33b sieht man einen Northern Blot von Wildtyp 10A Zellen und solchen, die mit dem hTLR3 Vektor transfiziert wurden. Bei den nicht-transfizierten Zellen sieht man wie erwartet keine Induktion der ApoJ mRNA, bei den transfizierten Zellen jedoch eine bis zu 3fache Stimulierung mit poly (I:C). Die Induktion durch nekrotische Zellen ist allerdings nicht sehr deutlich, was auch an dem kurzen Zeitintervall von 16 Stunden gelegen haben könnte.

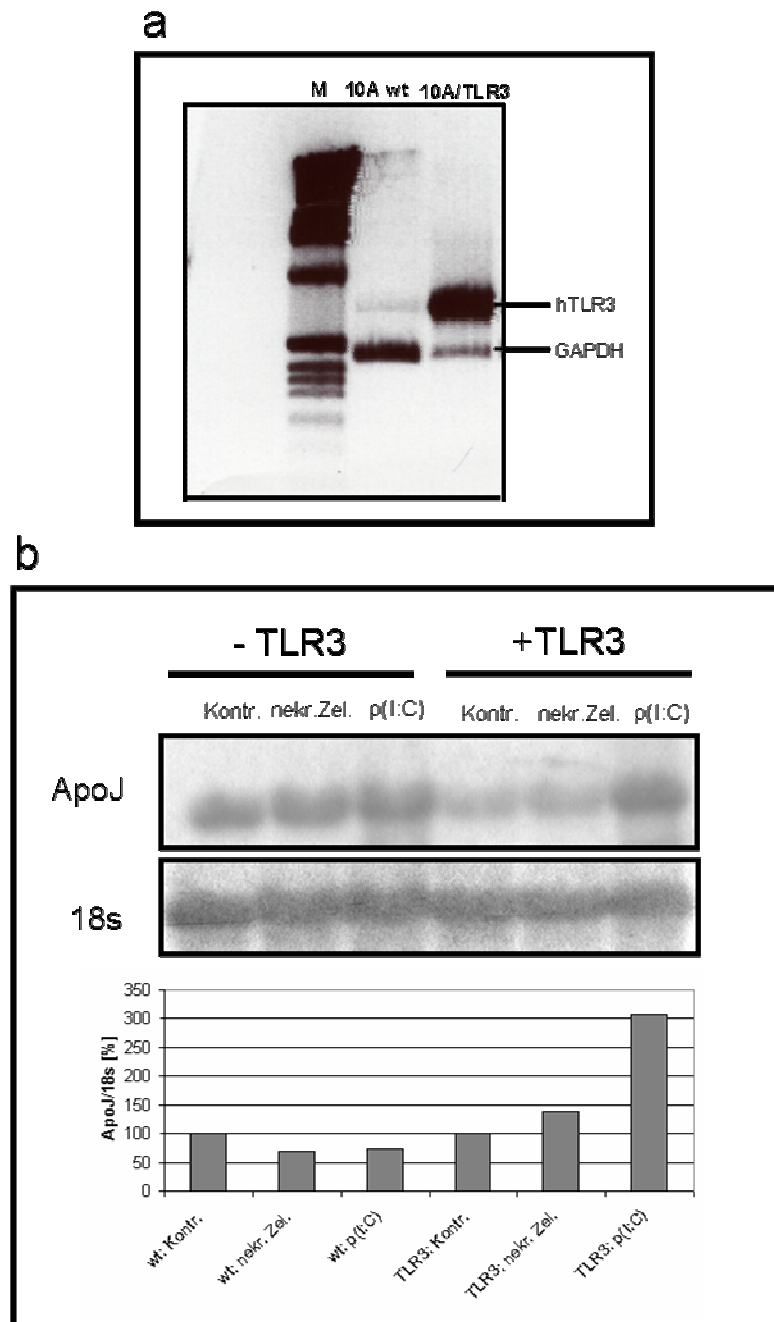


Abb. 33: Tansiente Transfektion von 10A Zellen mit hTLR3: Abb. a zeigt eine RT-PCR (30 Zyklen) mit humanen TLR3 Primern zur Überprüfung der Expression von hTLR3. Abb. b zeigt den Northern Blot von 15µg gesamt RNA von nicht-transfizierten und mit einem hTLR3 Plasmid transfizierten 10A Zellen. Die Zellen wurden bis ca. 40% Konfluenz wachsen gelassen und für 24h mit 1µg DNA unter serumhaltigen Bedingungen transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 12h serumfrei kultiviert und danach für 16h mit poly (I:C) und nekrotischen Zellen inkubiert (wt=Wildtyp). Das Balkendiagramm zeigt die densitometrische Auswertung des Northern Blot. Dabei wurden die Intensitäten der ApoJ-Banden und der 18s-Banden ins Verhältnis gesetzt.

3.4.4.2. Stabile Transfektion von 10A Zellen mit humanem TLR3

Um diese Ergebnisse weiter ausbauen zu können, wurden 10A Zellen stabil mit dem Expressionsvektor für den humanen TLR3 (hTLR3) transfiziert. Die Zellen wurden zur Herstellung der stabilen Klone zusätzlich mit einem Selektionsvektor transfiziert, der den Zellen eine Resistenz für das Antibiotikum Zeozin verleiht. Die Vektoren wurden im Verhältnis 1:10 (Selektionsvektor zu Expressionsvektor) eingesetzt, wodurch die Wahrscheinlichkeit erhöht werden sollte, dass die Zellen, die den Selektionsvektor besitzen, auch den hTLR3-Expressionsvektor aufgenommen haben. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit 1µg DNA behandelt und danach auf Selektionsmedium mit 800µg/ml Zeozin gesetzt. Nach der Selektion wurden sechs Klone auf die Expression von TLR3 hin überprüft. Dazu wurde eine Immunopräzipitation mit einem Antikörper gegen FLAG-Tag des Rezeptors durchgeführt und die Proben anschließend mittels Western Blot analysiert. In Abb. 35a sieht man bei allen sechs Klonen eine deutliche Bande bei ca. 130kDa, die der Größe von TLR3 entspricht und in der Spur, in der Protein von untransfizierten 10A Zellen aufgetragen wurde, nicht zu sehen ist. Die ganz dicke Bande oben im Bild ist eine Hintergrundbande, die durch den Antikörper entsteht, was man daran erkennen kann, dass sie in der Kontrollspur, in der nur Antikörper aufgetragen wurde, auch zu sehen ist.

Zur Untersuchung der ApoJ-Regulation wurde der Klon 14 verwendet. Die Zellen wurden analog zu den anderen Experimenten davor ausgesät und mit poly (I:C) und löslichen Faktoren (100.000g Überstand) für 16h behandelt. Der Northern Blot in Abb. 34b zeigt eindeutig, dass in den TLR3 transfizierten 10A Zellen eine Induktion von ApoJ möglich ist, wohingegen im Wildtyp keine Induktion von ApoJ zu erzielen ist. Durch poly (I:C) ist eine 60%ige Steigerung der ApoJ-mRNA Expression möglich. Diese Induktion ist geringer als in den glatten Muskelzellen, die für die übrigen Experimente verwendet wurden. Die lässt sich dadurch erklären, dass in diesen Zellen eventuell andere Proteine der TLR3 Signaltransduktion nur schwach exprimiert werden, da sie normalerweise nicht benötigt werden. Die Ergebnisse der Transfektionsexperimente zeigen, dass das Vorhandensein von TLR3 notwendig ist, um eine Induktion von ApoJ zu erreichen.

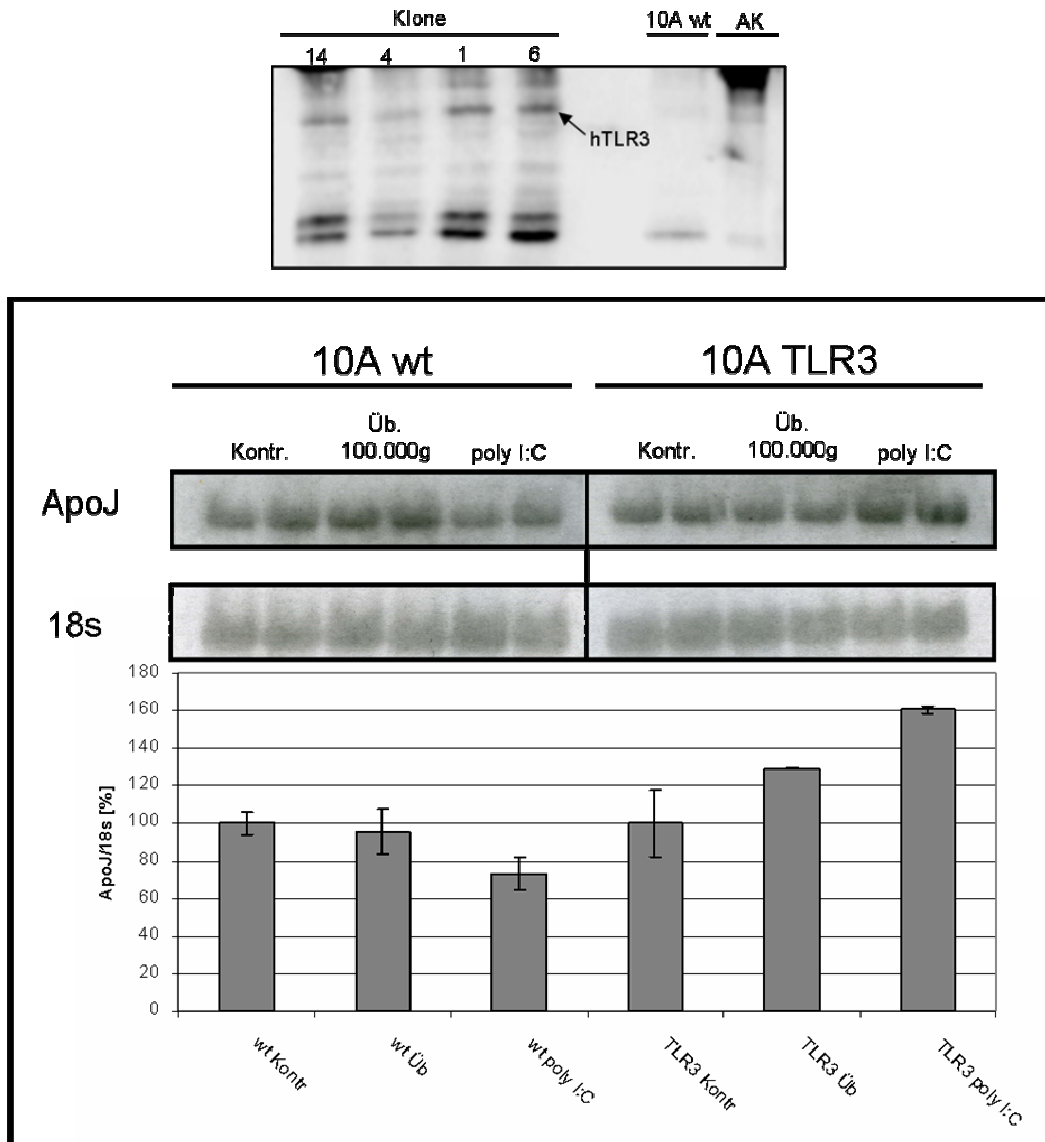


Abb. 34: Stabile Transfektion von 10A Zellen mit hTLR3: Abb a: Western Blot zum Nachweis von hTLR3 in stabil transformierten Zellklonen. Für den Western Blot wurden 1000µg Zelllysate mit einem α-Flag AK immunoprecipitiert und komplett aufgetragen. Der Western Blot wurde mit dem gleichen α-Flag AK entwickelt. Der Nachweis erfolgte über HRP-gekoppelte sekundäre-Antikörper. Abb. b zeigt einen Northern Blot von 15µg gesamt RNA aus Klon14. Die Zellen wurden nach Aussaat für 24h serumfrei gesetzt und anschließend für 16h mit poly (I:C) (50µg/ml) und löslichen Faktoren (100.000g Überstand) behandelt. Es ist zu sehen, dass eine Behandlung mit diesen Stimuli in den TLR3 transfizierten stabilen Zellen zu einer Induktion der ApoJ-mRNA kommt, wohingegen dies in den Wildtyp Zellen (10A) nicht der Fall ist. Das Balkendiagramm zeigt die densitometrische Auswertung des Northern Blot. Dabei wurden die Intensitäten der ApoJ-Banden und der 18s-Banden ins Verhältnis gesetzt.

4. Diskussion

ApoJ ist ein ubiquitär exprimiertes Glycoprotein, dessen genaue Funktion und Bedeutung noch nicht geklärt ist. Es wird in allen Körperflüssigkeiten vorgefunden und immer dann vermehrt exprimiert, wenn es zu einer pathophysiologischen Veränderung im Gewebe kommt. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Funktion ApoJ in atherosklerotischen Läsionen zukommen könnte und durch welche dort vorkommenden Faktoren seine Expression reguliert wird. Den Untersuchungen wurde das Atherosklerose-Modell der Arbeitsgruppe von Prof. Bhakdi die „Mainzer Hypothese“ zugrunde gelegt.

4.1. Untersuchungen zur Funktion von ApoJ bei Atherosklerose

4.1.1 ApoJ bindet an E-LDL

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass ApoJ *in vitro* an enzymatisch modifiziertes LDL bindet, nicht aber an natives LDL (Abb. 13). E-LDL wird *in vitro* durch die Behandlung von LDL mit einer Proteinase (in diesem Fall Plasmin) und anschließend mit Cholesterinesterase hergestellt. Es stellte sich heraus, dass die Behandlung von LDL mit Plasmin der entscheidende Schritt ist, der eine ApoJ-Bindung ermöglicht (Abb.15). Wesentlich höher ist die Bindung allerdings, wenn außerdem noch mit Cholesterinesterase verdaut wird. Bei der Behandlung von LDL mit einer Proteinase wird die den LDL-Partikel umgebende ApoB-Hülle abgebaut. Dem ApoJ wird somit Zugang zu dem im Innern befindlichen Cholesterin ermöglicht. Durch die anschließende Behandlung mit Cholesterinesterase wird der Anteil an freiem Cholesterin erhöht. Der freie Cholesteringehalt in einem normalen LDL Partikel liegt bei ca. 25%. Durch die Behandlung mit Cholesterinesterase steigt dieser Gehalt auf 85% an (Syriaphol *et al.*, 2002). Es wäre also möglich, dass die Bindung von ApoJ an E-LDL über freies Cholesterin stattfindet. Aufgrund seiner amphipathischen Helices (Abb.4) werden ApoJ lipidbindende Eigenschaften zugeschrieben (Bailey *et al.*, 2001). Dass die Bindung über Cholesterin oder eine andere Lipidkomponente verläuft, ist jedoch nur eine Vermutung, die durch genauere Untersuchungen belegt werden müsste. Eine andere Möglichkeit wäre natürlich auch, dass ApoJ an Proteinbestandteile bindet, die durch die Behandlung mit Plasmin entstehen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese Bindung von ApoJ an E-LDL auch *in vivo* stattfindet. Schon 1998 wurde gezeigt, dass ApoJ in atherosklerotischen Läsionen kolokalisiert

mit Lipiden vorliegt (Ishikawa *et al.*, 1998). In einer Kooperation mit Dr. M. Torzewski und der Arbeitsgruppe Prof. Bhakdi konnte gezeigt werden, dass ApoJ in atherosklerotischen Läsionen kolokalisiert mit E-LDL vorkommt (Abb.21). Man kann also davon ausgehen, dass die *in vitro* aufgezeigte Bindung auch *in vivo* vorkommt. Die Bindung von ApoJ an E-LDL könnte somit ein Grund sein, weshalb sich ApoJ im Verlauf der Atherosklerose in den Läsionen ansammelt und in ausgeprägten Atheromen mit der höchsten Anreicherung zu finden ist.

4.1.2. Bindung von ApoJ an E-LDL verhindert die E-LDL induzierte Apoptose in glatten Muskelzellen.

E-LDL induziert in glatten Muskelzellen Apoptose. Dies konnte durch mehrere Methoden wie z.B. Caspase-Messung und Annexinfärbung nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis war allerdings auch zu erwarten, da der hohe Anteil an freien Fettsäuren im E-LDL toxisch wirkt. Arbeiten von Dersch *et al.*, 2005 zeigen, dass E-LDL in Endothelzellen Apoptose induziert. In dieser Arbeit wird außerdem gezeigt, dass die freien Fettsäuren im E-LDL über die Kinase ASK-1 zur Apoptoseinduktion führen. Freie Fettsäuren können aus Phospholipiden durch das Enzym sPLA₂ freigesetzt werden. Dieses Enzym wird durch Makrophagen sekretiert und ist in atherosklerotischen Läsionen nachzuweisen (Han *et al.*, 2003). Der Hauptanteil an Fettsäuren eines E-LDL Partikels liegt jedoch in Form von Cholesterinestern vor. Der Cholesteringehalt eines LDL-Partikels liegt bei ungefähr 1700 Molekülen (Baumstark *et al.*, 1991). In atherosklerotischen Läsionen sind von vielen Arbeitsgruppen große Mengen an freiem Cholesterin nachgewiesen worden (Simionescu *et al.*, 1986; Kruth und Fry 1984 Chao *et al.*, 1988 Seifert *et al.*, 1990), was zu der Annahme führt, dass sich dort durch den Abbau von Cholesterinestern auch viele freie Fettsäuren befinden müssten. Diese Beobachtungen stützen die These, dass LDL im subendothelialen Gewebe durch Proteasen und Cholesterinesterasen modifiziert wird. Der Anteil an freien Fettsäuren im LDL liegt bei 7,7µg/mg Cholesterin und in E-LDL bei 600µg/mg Cholesterin. Den größten Anteil unter den freien Fettsäuren nimmt dabei die Linolsäure ein. Ölsäure, Arachidonsäure, Palmitinsäure und Stearinsäure sind in geringerem Maße vertreten. Dies deutet darauf hin, dass in atherosklerotischen Läsionen sehr viele freie Fettsäuren vorhanden sind, die dazu führen, dass die dort befindlichen Zellen in die Apoptose gehen. Die Versuche mit ¹⁴C-markierter Linolsäure haben gezeigt, dass freie Fettsäuren schon nach wenigen

Minuten in die Zelle gelangen können (Abb.20). Diese Ergebnisse werden unterstützt durch Arbeiten von Artwohl *et al.*, 2003. In dieser Veröffentlichung werden die Auswirkungen von Fettsäuren auf humane vaskuläre Endothelzellen beschrieben. Sie zeigen, dass eine Behandlung der Zellen mit der gesättigten Stearinsäure schon bei geringen Konzentrationen (ab 120µmol/l) proapoptotisch wirkt. Ungesättigte Fettsäuren hingegen wirken erst ab höheren Konzentrationen (ab 200µmol/l) proapoptotisch. Den größten Anteil der Fettsäuren im E-LDL nimmt die 3fach ungesättigte Linolsäure ein, die ab ca. 150µmol/l eine apoptotische Wirkung auf die Zellen ausübt. Die stärker proapoptotisch wirkende Stearinsäure ist in E-LDL zwar nur in geringem Maße vorhanden, aber im Prinzip führt die Gesamtheit der freien Fettsäuren zur Induktion von Apoptose.

Die aufgezeigte Bindung von ApoJ an E-LDL schützt VSMC für einen gewissen Zeitraum vor der Apoptose. Die Toxizität von E-LDL wird also durch die ApoJ-Bindung verringert. Diese Beobachtungen unterstützen die mehrfach aufgestellte These, dass es sich bei ApoJ um ein Protein mit antiapoptotischer Funktion handelt. Ein allgemeingültiger Mechanismus, der die Wirkungsweise von ApoJ beschreibt, ist allerdings nicht bekannt. In diesem Fall ist es die Bindung an die Apoptose induzierende Substanz E-LDL, die zu einem zeitweisen Schutz vor Apoptose führt. ApoJ bindet an ein breites Spektrum von Liganden (A-β, Lipide, Immunoglobuline, ApoAI usw.). Dieser Mechanismus könnte in anderen Situationen auch zu einer Unterdrückung der Apoptose beitragen, aber eben nicht in allen, hier liegt eine auf die Situation der Atherosklerose zutreffende Funktion vor. Dabei ist natürlich noch zu klären inwiefern sich diese in der Zellkultur gefundene Beobachtung auch *in vivo* von Bedeutung ist. Unumstritten ist jedoch, dass ApoJ und E-LDL in atherosklerotischen Plaques kolokalisiert sind.

Es bedarf in zukünftigen Experimenten einer genauen Klärung des Mechanismus der zur Verzögerung der Apoptose in den VSMC führt. Die Toxizität des E-LDL ist auf die darin enthaltenen freien Fettsäuren zurückzuführen. Die einfachste Vermutung ist deshalb, dass ApoJ den Transfer von freien Fettsäuren aus dem E-LDL in die umliegenden Zellen verhindert, indem es sich wie ein Käfig außen an den E-LDL-Partikel anlagert und so das Austreten der freien Fettsäuren verlangsamt. Bewiesen werden kann dies aber nur, wenn man eine Methode zu Verfügung hat, mit der man den Gehalt an freien Fettsäuren in einer Zelle bestimmen kann. Ein anderer Mechanismus könnte auch sein, dass durch die ApoJ Bindung E-LDL leichter oder

schneller in die Zellen aufgenommen und damit entsorgt werden kann. Dahingehende Untersuchungen waren zwar in diesem Fall nicht erfolgreich. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass wir hier aufgrund von sicherheitstechnischen/methodischen Problemen keine eindeutigen Ergebnisse erzielen konnten.

Vorstellbar wäre jedoch auch, dass ApoJ intrazellulär zu Inhibierung der Apoptose beiträgt. ApoJ kann über die Rezeptoren Megalin und LRP in Zellen gelangen (Bartl *et al.*, 2001). Arbeiten von Zhang *et al.*, 2005 zeigen, dass ApoJ intrazellulär mit aktiviertem Bax (Bcl-2-assoziiertes Protein x) interagiert und so die c-Myc vermittelte Apoptose, ausgelöst durch eine Camptothecin Behandlung, verhindert. Allerdings wird in dieser Arbeit auch vermutet, dass es sich hierbei um die intrazelluläre Form von ApoJ handelt, die diese Funktion einnimmt. Durch die sekretierte Form konnte keine Verminderung der Apoptose in diesen Experimenten nachgewiesen werden.

In Bezug zu den oben genannten Ergebnissen, die sich mit der Bedeutung von ApoJ in der Atherosklerose befassen, gibt es viele unbeantwortete Fragen, die in weiteren Experimenten zu untersuchen wären. Dazu ist es unerlässlich ApoJ aus humanem Serum aufzureinigen, um die Art der Bindung genauer zu untersuchen.

Um die Untersuchungen weiterzuführen, sollten die dargestellten Ergebnisse zuerst an primären humanen glatten Muskelzellen mit aufgereinigtem ApoJ reproduziert werden. Interessant wäre es dann Untersuchungen in einem Tiermodell zu machen. Als gängiges Tiermodell für Atherosklerose dienen ApoE-knock out Mäuse, bei denen es durch eine fettreiche Diät (western diet) sehr schnell zur Entstehung von atherosklerotischen Läsionen kommt (Meir und Leitersdorf, 2003). In diesem Tiermodell sind noch keine Untersuchungen bezüglich der Expression und einer möglichen Funktion von ApoJ bei Atherosklerose gemacht worden. Es gibt lediglich eine Arbeit, die sich in Bezug auf Alzheimer mit der ApoJ Expression im Gehirn beschäftigt (Stone *et al.*, 1998). Zumindest im Gehirn konnten in dieser Arbeit bei ApoE-knock out Mäusen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der ApoJ Expression gemacht werden. Hier wäre es in Zukunft sehr interessant zu wissen, wie sich in diesen Mäusen die ApoJ-Expression nach einer fettreichen Diät in glatten Muskelzellen und vaskulären Endothelzellen verhält. In der Arbeit von Navab *et al.*, 2005 wurden synthetische Peptide hergestellt, deren Sequenz aus den amphipatischen Helices von ApoJ entnommen wurden. Diese Peptide wurden an ApoE-knock out Mäusen und Affen verfüttert. In beiden Fällen führte diese

Verabreichung zu einer deutlich reduzierten Plaquebildung. Frühere Arbeiten dieser Gruppe haben gezeigt, dass in der Gegenwart von ApoJ keine Induktion von MCA (monocyte chemotactic activity) durch LDL möglich ist (Navab *et al.*, 1997). Die Autoren stellten die These auf, dass ApoJ die „inflammatorischen Lipide“, die zu dieser Induktion führen, bindet. Diese These wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützt. Eine Bindung von ApoJ an Lipide wird allerdings in der Arbeit von Navab nicht gezeigt. Die synthetisch hergestellten Peptide sollen an diese inflammatorischen Lipide binden und sie so unschädlich machen, wodurch ein Fortschreiten der Plaquebildung verhindert wird.

Man sollte bei solchen Experimenten allerdings beachten, dass es sich hierbei um nur sehr kurze Sequenzen des Proteins handelt, was so *in vivo* nicht vorkommt. Wenn man diesen Effekt also auf das komplette Protein ApoJ übertragen möchte, so müssen die Versuche mit dem kompletten aufgereinigten Protein gemacht werden.

Im Zusammenhang mit Atherosklerose wäre es auch interessant zu untersuchen, wie die Plaquebildung bei ApoJ^{-/-} Mäusen nach einer Western Diät verläuft. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit könnte man vermuten, dass es in den ApoJ^{-/-} Mäusen im Gegensatz zu Wild Typ Mäusen zu einer vermehrten Plaquebildung kommt.

4.2. Untersuchungen zur Regulation der ApoJ-Genexpression bei Atherosklerose

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Regulation von ApoJ. Dabei wurde zum einen untersucht, wie sich die Behandlung von Zellen mit E-LDL auf die ApoJ-Expression auswirkt und zum andern wurde die ApoJ-Expression durch nekrotische Zellen an glatten Muskelzellen charakterisiert. Beide Komponenten kommen in atherosklerotischen Läsionen nachweislich vor. E-LDL entsteht durch den enzymatischen Verdau von LDL. Nekrotische Zellbestandteile sind von vielen verschiedenen Zellen in den Läsionen zu finden. Durch Schaumzellbildung sterben vor allem Makophagen und glatte Muskelzellen ab und bleiben als Zelltrümmer in der Läsion vorhanden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die beiden Komponenten E-LDL/LDL und nekrotische Zellen einen gegensätzlichen Einfluss auf die ApoJ Regulation ausüben. Durch die E-LDL-Behandlung wird ApoJ in VSMC deutlich runterreguliert, durch Behandlung mit nekrotischen Zellen jedoch hochreguliert. Im nachfolgenden Abschnitt wird zuerst ein Einblick in einen möglichen

Mechanismus der Regulation durch E-LDL/LDL gegeben und anschließend die Regulation durch nekrotische Zellen genauer diskutiert.

4.2.1. Regulation durch LDL und E-LDL

Sowohl E-LDL als auch ApoJ sind in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen worden. Da der ApoJ Gehalt im Verlauf der Atherosklerose leicht ansteigt, lag die Vermutung nahe, dass E-LDL zu einer vermehrten ApoJ-Expression in VSMC führt. Die Behandlung von glatten Muskelzellen und Fibroblasten mit LDL und E-LDL führte jedoch in beiden Fällen zu einer Repression sowohl der ApoJ-mRNA als auch der Proteinsekretion (Abb.22). Die Repression durch die Behandlung mit LDL fiel allerdings wesentlich schwächer aus als bei der Behandlung mit E-LDL. Wenn man die Zusammensetzung von LDL/E-LDL betrachtet, ergibt sich eine mögliche Erklärung für diesen Befund. Die oben bereits zitierten Arbeiten von Artwohl *et al.* zeigen nicht nur die Auswirkung von Fettsäuren hinsichtlich ihrer proapoptotischen Wirkung, sondern auch, welche Gene durch die Behandlung mit Fettsäuren reguliert werden. Bei einem der Gene handelt es sich um ApoJ, dessen Expression durch die Behandlung mit freien Fettsäuren um 54% reprimiert wird. Sowohl E-LDL als auch LDL enthalten freie Fettsäuren. Der Anteil an freien Fettsäuren ist im E-LDL, wie oben bereits erläutert, allerdings viel höher. Anscheinend ist die geringe Menge an Fettsäuren aus dem LDL ausreichend, um die Regulation von ApoJ negativ zu beeinflussen. Die Repression von ApoJ durch E-LDL ist also wahrscheinlich deshalb größer, da es über einen größeren Anteil an freien Fettsäuren verfügt.

Betrachtet man den ApoJ Promotor der Ratte mit Hilfe des Programms matinspector V2.2, welches potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen ausfindig macht, dann findet man natürlich eine Vielzahl von potentiellen Bindestellen. Unter anderem findet sich ein sehr guter Treffer für eine AP-1 (activator protein-1) Bindestelle und eine NF- κ B –Bindestelle.

Die Regulation des ApoJ-Gens über AP-1 wurde mehrfach untersucht. Eine Behandlung von Lungenepithelzellen mit TGF- β führt zur ApoJ Induktion. Dabei wurde durch Mutationen im ApoJ-Promotor nachgewiesen, dass diese Induktion AP-1 abhängig ist (Jin und Howe, 1997). Ähnliche Untersuchungen an PC12 Zellen zeigen, dass auch die NGF und EGF induzierte ApoJ-Regulation über AP-1 vermittelt wird (Gutacker *et al.*, 1999)

Für den Transkriptionsfaktor NF- κ B gibt es bezüglich des ApoJ-Gens noch keine so detaillierten Promotoruntersuchungen. Einige Arbeiten mit NF- κ B-Inhibitoren zeigen allerdings einen Zusammenhang zwischen der ApoJ-Regulation und der NF- κ B Aktivierung auf. Es gibt jedoch auch Befunde, die darauf hindeuten, dass NF- κ B nicht an der ApoJ Regulation beteiligt ist (Nuutinen *et al.*, 2005). Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten abhängig vom Zellkultursystem und dem verwendeten Induktor sein. TNF- α z.B. induziert das ApoJ-Gen über den Transkriptionsfaktor NF- κ B (Li *et al.*, 2002). Auch die Behandlung von Astrozyten mit LPS (Lipopolysaccharid) führt zu einer ApoJ-Induktion, die vermutlich über NF- κ B verläuft, da sie sich durch die, allerdings relativ unspezifischen NF- κ B-Inhibitoren, Aspirin und MG-123 unterdrücken lässt (Saura *et al.*, 2003). Die Unspezifität dieser Inhibitoren ist darauf zurückzuführen, dass sie das Proteasom inhibieren und somit den proteasomalen Abbau des intrazellulären NF- κ B-Repressors I κ B verhindern. Im Gegensatz dazu stehen die Arbeiten von Nuutinen und Mitarbeitern 2005. In dieser Veröffentlichung werden ähnliche Untersuchungen zur ApoJ-Regulation in Microgliazellen durchgeführt. In diesen Zellen führt eine Inkubation mit LPS nicht zu einer ApoJ Induktion. Außerdem lässt sich die durch Histondeacetylase-Inhibitoren hervorgerufene ApoJ Induktion nicht durch NF- κ B-Inhibitoren (hier CAPE und MG-123) reduzieren. Dies zeigt, dass die ApoJ Regulation zelltypspezifisch ist und dass unterschiedliche Stimulanzen über verschiedene Wege zu einer ApoJ-Regulation führen.

Arbeiten aus der Arbeitsgruppe von Prof. Bhakdi zeigen eine Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch die Behandlung von Zellen mit E-LDL (K. Dersch 2005, Dissertation und D. Freske 2004 Dissertation). In der Dissertation von D. Freske zeigen Versuche mit NF- κ B-Reporterkonstrukten, dass diese Hemmung vermutlich auf die freien Fettsäuren zurückzuführen ist, da diese Hemmung nicht zu beobachten war, wenn man dem E-LDL die freien Fettsäuren mit Albumin entzog. So könnte man die Vermutung anstellen, dass die ApoJ-Repression in VSMC und Fibroblasten eventuell auf eine Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch die freien Fettsäuren des E-LDL zurückzuführen ist. Allerdings inhibieren freie Fettsäuren nicht die Aktivierung von NF- κ B durch TNF- α (Kaharroubi *et al.*, 2004), die bekanntermaßen auch zu einer vermehrten ApoJ Expression führt (Li *et al.*, 2002).

Ein Zusammenhang zwischen freien Fettsäuren und AP-1 ist bis jetzt von noch keiner Arbeitsgruppe untersucht worden, zumindest gibt es bis jetzt keine

Veröffentlichungen, die das aufzeigen. Auch mit reinem E-LDL sind bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Untersuchungen in diese Richtung gemacht worden. Dies wären auf jeden Fall interessante Fragestellungen für weiterführende Experimente, in denen man untersucht, wie freie Fettsäuren oder auch E-LDL die Aktivierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren beeinflussen.

Warum genau E-LDL bzw. die darin enthaltenen freien Fettsäuren die ApoJ-Expression hinunterregulieren, kann also momentan nicht hinreichend erklärt werden. Es kann nur die Vermutung angestellt werden, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B hierbei eine Rolle spielt. Zur Beantwortung dieser Fragen bedarf es weiterführender Untersuchungen bezüglich der ApoJ-Regulation. So müsste untersucht werden, welchen Einfluss freie Fettsäuren auf die verschiedenen Moleküle der intrazellulären Signalweiterleitung ausüben, die zu einer ApoJ-Regulation führen können.

Es stellt sich auch die Frage, inwiefern die durch E-LDL reprimierte ApoJ-Expression physiologisch relevant ist, da ApoJ in atherosklerotischen Läsionen vermehrt exprimiert wird.

4.2.2. Regulation durch nekrotische Zellen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nekrotische Zellbestandteile die ApoJ-mRNA und Protein-Expression in embryonalen Fibroblasten der Ratte (Rat-1) und in glatten Muskelzellen von Ratten (CRL2018) induzieren. Dabei zeigte sich in den Untersuchungen mit Rat-1 Zellen, dass sowohl die sedimentierbaren Bestandteile (Membranfragmente und Zelltrümmer) als auch lösliche, cytosolische Zellbestandteile eine ApoJ-Induktion hervorrufen können (Abb.24). Die Induktion durch lösliche/cytosolische Faktoren war allerdings etwas höher. Es gibt also eventuell zwei Komponenten aus nekrotischen Zellen, die in der Lage sind eine ApoJ-Induktion hervorzurufen. Bei der sedimentierbaren Komponente könnte es sich um Phosphatidylserin (PS) handeln. Dafür spricht, dass künstlich hergestellte PS-Vesikel eine leichte ApoJ-Induktion hervorrufen (Bach *et al.*, 2001). Bei der Induktion durch lösliche Faktoren handelt es sich um RNA aus nekrotischen Zellen, die zu einer ApoJ-Expression führt, was durch eine Behandlung von nekrotischen Zellen und löslichen Faktoren durch RNaseA gezeigt werden konnte (Abb. 32.) Die ApoJ-mRNA-induzierende Wirkung dieser Stimuli lässt sich durch RNaseA fast auf Kontrollniveau reprimieren.

In der Literatur wird, wie oben bereits diskutiert, eine mögliche Beteiligung von NF- κ B an der ApoJ-Regulation beschrieben. In diesem Zusammenhang war bekannt, dass eine Induktion von ApoJ durch den TLR4-spezifischen Liganden LPS erzielt werden kann und diese Regulation vermutlich auf die Aktivierung von NF- κ B zurückzuführen ist (Saura *et al.*, 2003). Unabhängig davon wurde gezeigt, dass auch nicht bakterielle, virale oder fungale Bestandteile in der Lage sind eine Signalweiterleitung über Toll-like Rezeptoren hervorzurufen. Es wurde gezeigt, dass auch nekrotische Zellen in der Lage sind, über TLR2 eine Aktivierung von NF- κ B hervorzurufen (Li *et al.*, 2001). Diese Daten führten zu Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe hinsichtlich einer möglichen Beteiligung von Toll-like Rezeptoren an der ApoJ-Regulation. Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind wichtige Rezeptoren des Immunsystems und zuständig für die Erkennung von PAMPs (Pathogen-associated molecular pattern). Eine Aktivierung von TLRs führt über eine intrazelluläre Signaltransduktion letztlich zur Aktivierung einer Immunabwehr. Deshalb sind diese Rezeptoren auch zuerst auf Zellen des Immunsystems wie z.B. Monozyten, Neutrophilen T- und B-Zellen gefunden worden. Es zeigt sich aber, dass ihre Expression nicht auf Immunzellen beschränkt ist, sondern sich auf vielen anderen Zellen in verschiedenen Geweben nachweisen lassen. Dazu zählen unter anderem das Gehirn, Arterienwände und Epithelzellen in verschiedenen Geweben (Bsibsi *et al.*, 2002; Edfeld *et al.*, 2002; Schaefer *et al.*, 2004; Hopkins und Sriskandan 2005)

4.2.3. Regulation von ApoJ über TLR3-vermittelte Signaltransduktion

4.2.3.1. Charakterisierung der TLR3-aktivierenden Komponente

Untersuchungen von Markus Baiersdörfer (Dissertation) zeigen einen Zusammenhang auf zwischen der ApoJ-Regulation und der Toll-like Rezeptorexpression. Er untersuchte die drei Zelllinien 10A (Dotterzellen der Maus), Rat-1 (embryonale Rattenfibroblasten) und CRL2018 (glatte Muskelzellen der Ratte) hinsichtlich der Expression der Toll-like Rezeptoren 2, 3 und 4. Anhand dieser verschiedenen Zelllinien konnte er zeigen, dass eine ApoJ-Induktion ausschließlich in CRL2018 und Rat-1 Zellen erfolgte, welche die Toll-like Rezeptoren TLR3 und 4 exprimieren. In murinen Dotterzellen (10A), die weder TLR3 noch TLR2 und nur geringe Mengen an TLR4 exprimieren, lässt sich keine Induktion der ApoJ-mRNA Expression nach Inkubation mit nekrotischen Zellen nachweisen. Rattenfibroblasten (Rat-1) Zellen zeigen ebenfalls eine Induktion des ApoJ-Genes

nach der Behandlung mit nekrotischen Zellen, sie exprimieren die Toll-like Rezeptoren 3 und 4. Daraufhin konnte in weitergehenden Versuchen mit TLR-spezifischen Antagonisten gezeigt werden, dass sich die größte Induktion des ApoJ-Gens erzielen ließ, wenn man mit dem TLR3-spezifischen Antagonisten poly (I:C) stimulierte. ApoJ wird also unter anderem durch eine TLR3-vermittelte Signaltransduktion reguliert. Durch dieses Ergebnis stellt sich nun die Frage, ob die ApoJ-Induktion durch nekrotische Zellen auch durch TLR3 vermittelt wird und welche Komponente aus nekrotischen Zellen diesen Rezeptor aktivieren könnte. Der erste entdeckte natürliche Ligand von TLR3 ist virale dsRNA (Alexopoulou *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 2001). Neuere Untersuchungen zeigen, dass sich eine Induktion der TLR3-Signaltransduktion auch durch eukaryotische RNA induzieren lässt. RNA, isoliert aus Schistosoma Eiern, führt in stabil transfizierten HEK/TLR3-Zellen zu einer Induktion von NF- κ B (Aksoy *et al.*, 2005). In dem gleichen Zellsystemen zeigen Arbeiten von Kariko *et al.*, 2004, dass sich eine Induktion von NF- κ B und eine Produktion von IL-8 durch die Behandlung mit *in vitro* synthetisierter mRNA erzielen lässt. Des Weiteren ist eine Induktion von IL-8, IL-12 und IFN- α durch nekrotische Zellen zu sehen, die sich durch eine Inkubation mit Benzonase reprimieren lässt (Kariko *et al.*, 2004). In Fibroblasten ist gezeigt worden, dass eine Behandlung mit nekrotischen Zellen zu einer Induktion von IFN- β und IL-6 führt, die ebenfalls durch einen Benzonaseverdau unterbleibt (Brentano *et al.*, 2005). Es mehren sich also die Hinweise, dass TLR3 nicht ausschließlich als Folge von einem Virusbefall aktiviert wird und somit nicht ausschließlich für die Pathogenerkennung zuständig ist, sondern eben möglicherweise auch bei einer Inflammation durch nekrotische Zellen bzw. durch deren RNA induziert werden kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es sich um RNA aus nekrotischen Zellen handelt, die zur Induktion von ApoJ führt. Wenn man nekrotische Zellen und zytosolische Komponenten einer RNaseA-Behandlung unterzieht, bleibt eine Induktion des ApoJ-Gens aus (Abb. 32). Die Ergebnisse der RNaseA-Behandlung werden unterstützt von dem Befund, dass auch gesamt RNA isoliert aus eukaryotischen Zellen in der Lage ist eine ApoJ-Induktion hervorzurufen (Abb.32). Somit ist erstmals gezeigt, dass RNA zumindest eine Komponente aus nekrotischen Zellen ist, die zu einer Induktion des ApoJ-Gens führt. Welche der verschiedenen RNA-Formen aus eukaryotischen Zellen letztendlich zu einer Aktivierung von TLR3 führt, ist nach dieser Versuchsreihe noch nicht zu sagen. Für t-RNA als TLR3 Ligand

sprechen Ergebnisse von M. Baiersdörfer (Dissertation), die zeigen, dass eine Induktion von ApoJ in CRL 2018 Zellen auch durch eine Behandlung mit t-RNA aus Hefe zu erzielen ist. Es konnte in dieser Arbeit eindeutig gezeigt werden, dass die ApoJ-Regulation durch nekrotische Zellen durch den Rezeptor TLR3 vermittelt wird. Dies zeigen die Ergebnisse der transienten und stabilen Transfektion mit einem Expressionsvektor für TLR3 in Dottersackzellen (10A) (s. Abb.33/34). 10A Zellen besitzen eine ApoJ-Basisexpression, die sich allerdings nicht durch nekrotische Zellen induzieren lässt. Transfiziert man sie aber mit TLR3, kann man die ApoJ-Expression genauso durch nekrotische Zellen und poly (I:C) induzieren wie in den anderen untersuchten Zellen, den VSMC (CRL2018) und den Rattenfibroblasten (Rat-1). Die Induktion ist hier allerdings deutlich geringer (1,7fach). Man muss dabei berücksichtigen, dass evtl. nicht alle für die Signaltransduktion benötigten Proteine in dem Maße vorhanden sind wie in den anderen Zelllinien.

4.2.3.2. Charakterisierung des ApoJ-induzierenden Signalweges

Die Bindung von dsRNA an TLR3 führt intrazellulär zu einer MyD88-unabhängigen Signalweiterleitung, deren zentrales Adapterprotein TRIF (TIR domain-containing adapter inducing interferon) ist (Yamamoto et al., 2002 und Oshiumi et al., 2003). Die Signalweiterleitung teilt sich danach in mehrere Wege auf (Abb.26). Dadurch kommt es zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, IRF-3, cJun und ATF-2. Diese binden nach ihrer Translokation in den Zellkern an die Promotoren der verschiedenen Gene. Außer der Vermutung dass die Regulation von ApoJ durch eine Beteiligung von NF- κ B vermittelt werden könnte, gab es bislang keine Hinweise darauf, welcher dieser intrazellulären Wege der TLR3 vermittelten Signalweiterleitung zu einer Regulation von ApoJ führt, weshalb nach einer Möglichkeit gesucht wurde die intrazellulären Signaltransduktionswege zu inhibieren.

Eine Behandlung von FRTL-5 Zellen mit Methimazole, einem Medikament, welches zu Unterdrückung der Immunantwort verabreicht wird, führt zu einer Inhibierung der durch poly (I:C) induzierten IFN- β Sekretion dieser Zellen, nicht jedoch zu einer verminderten NF- κ B Antwort (Harui *et al.*, 2005). Dies deutet darauf hin, dass diese Substanz ausschließlich die Signalweiterleitung über die Proteinkinasen TBK1 und I κ k ϵ , die zu einer Phosphorylierung von IRF-3 führen, inhibiert. Die durch nekrotische Zellen und poly (I:C) induzierte ApoJ-Regulation lässt sich durch Methimazole konzentrationsabhängig hemmen (Abb.27). Die Induktion von ApoJ lässt sich mit

10mM Methimazole bis zu 40% unterdrücken. Höhere Konzentrationen Methimazole führen zu einer noch deutlicheren Unterdrückung der Expression, es sterben dann allerdings eine Vielzahl von Zellen ab und die überlebenden Zellen unterscheiden sich in ihrer Morphologie deutlich von den unbehandelten Zellen. Aus diesem Grund wurde auf die Darstellung dieser Ergebnisse verzichtet. Es ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass dieser Weg der Signalweiterleitung, der zu einer Phosphorylierung von IRF-3 führt, zu einem großen Anteil an der ApoJ-Regulation durch TLR3 beteiligt ist. Wie oben schon erwähnt, deuten einige Arbeiten auf eine Beteiligung von NF- κ B an der Regulation des ApoJ-Gens hin. Auch in dem von mir verwendeten Zellkultursystem scheint NF- κ B an der ApoJ Regulation beteiligt zu sein. Werden VSMC, die mit nekrotischen Zellen oder poly (I:C) behandelt werden, gleichzeitig mit dem NF- κ B-Inhibitor CAPE (Caffeic acid phenethyl ester) behandelt, kommt es zu einer leichten Reduktion des ApoJ Signals (Abb.29). Dass diese Reduktion nicht so deutlich ist, ist auf experimentelle Schwierigkeiten zurückzuführen. Eine Inkubation mit NF- κ B-Inhibitoren ist für eine Zelle über einen längeren Zeitraum immer toxisch, da dieser Transkriptionsfaktor für die Regulation einer Vielzahl an Genen verantwortlich ist. Unter anderen sind es Gene, die für die Proliferation benötigt werden (Cyclin D1 und c-Myc), aber auch anti-apoptotische Gene (BCL-X_L, A1 und cIAPs) und Gene des Immunsystems (z.B. Chemokine, Cytokine und Adhäsionsmoleküle). Eine Induktion von ApoJ ist allerdings erst nach 8 Stunden zu sehen. Deutlichere Unterschiede sind erst nach mindestens 16 Stunden zu beobachten. CRL2018 Zellen können jedoch maximal 8 Stunden mit CAPE behandelt werden, danach verändern sie ihre Morphologie. Sie kugeln sich ab und sterben. Deshalb wurde für diese Versuche der 8h Wert gewählt. Die Inhibierung der ApoJ Expression ist zwar nach dieser Zeit ziemlich schwach (ca. 18%), das Ergebnis lässt sich allerdings sehr gut reproduzieren. Außerdem handelt es sich bei dem hier verwendeten Inhibitor um einen sehr spezifischen NF- κ B-Inhibitor, der die Translokation der p65 Untereinheit von NF- κ B in den Zellkern verhindert (Natarajan *et al.*, 1996).

Die Annahme, dass NF- κ B an der ApoJ-Regulation beteiligt ist, wird unterstützt durch Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, die zeigen, dass eine ApoJ-Induktion auch durch weitere TLR-Antagonisten zu erzielen ist. LPS, ein TLR4 spezifischer Ligand, und Pam3Cys, ein TLR2 spezifischer Ligand, sind ebenfalls in der Lage eine ApoJ Induktion hervorzurufen. Allerdings ist diese bei weitem nicht so stark, wie die durch

poly (I:C) hervorgerufene Aktivierung. Eine Aktivierung von TLR2 führt intrazellulär zu einer MyD88-abhängigen Signalweiterleitung, die zur Aktivierung von NF- κ B und AP-1 bindenden Transkriptionsfaktoren führt. Durch TLR4 hingegen kann es sowohl zu einer MyD88-abhängigen als auch zu einer MyD88-unabhängigen Antwort kommen, da in Monozyten gezeigt worden ist, dass auch LPS zu einer Aktivierung von INF- β und interferonregulierten Genen wie iNOS kommen kann (Gao *et al.*, 1998; Toshchakov *et al.*, 2002). Eine Aktivierung von IRF-3 und IRF-7 kann über diese Rezeptoren nicht erzielt werden. Deshalb ist anzunehmen, dass die TLR4/2 vermittelte ApoJ Induktion über die beiden Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 verläuft und die TLR3-vermittelte ApoJ-Induktion im wesentlichen über den Transkriptionsfaktor IRF3 verläuft. Eine Beteiligung von AP-1 an der ApoJ-Regulation ist in mehreren Veröffentlichungen bereits nachgewiesen worden und wurde oben bereits diskutiert.

Der Weg, der zu einer IRF-3/7 Phosphorylierung führt, scheint allerdings stärker an der ApoJ-Induktion beteiligt zu sein, da eine Inhibierung dieses Weges durch Methimazole zu einer deutlich verminderten ApoJ Induktion führt.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann man also davon ausgehen, dass die Wege, die zu einer IRF-3/7 und einer NF- κ B Aktivierung führen, beide an der TLR3-vermittelten ApoJ-Regulation beteiligt sind.

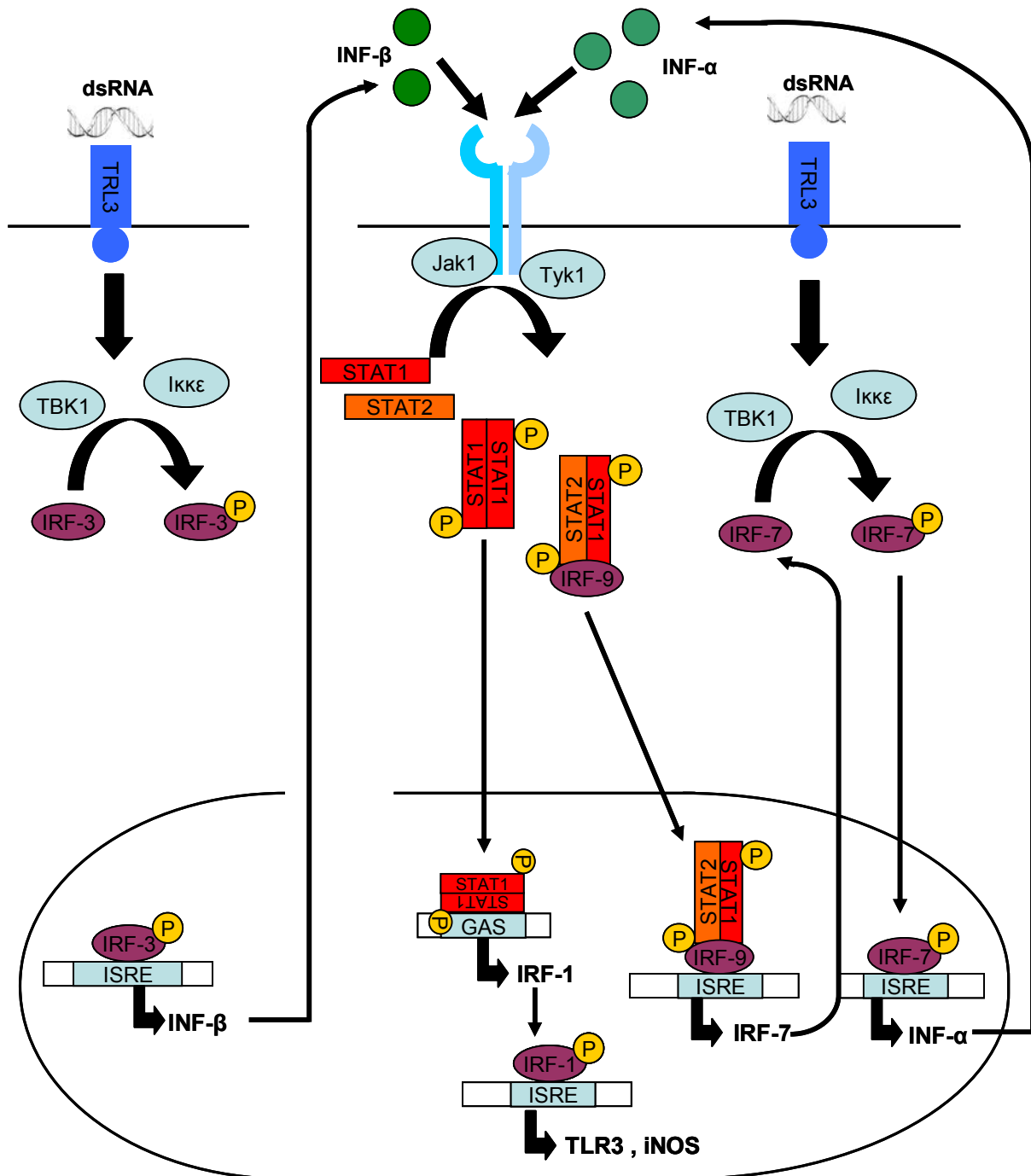


Abb. 35: Die Aktivierung von TLR3 durch dsRNA führt in einer Zelle primär zur Aktivierung von TBK1 und Ikkε. Diese beiden Kinasen phosphorylieren den Transkriptionsfaktor IRF-3, wodurch dieser in der Lage ist die INF-β Sekretion über ISRE Elemente zu induzieren. INF-β bindet nun auto/parakrin an den Interferonrezeptor, wodurch eine kreuzweise Aktivierung der beiden Januskinasen Jak1 und Tyk1 hervorgerufen wird. Diese phosphorylieren die beiden Transkriptionsfaktoren STAT1/2. STAT1/2 Heterodimere können IRF-9 binden und dann zur Induktion von IRF-7 führen. Abbildung nach Dissertation von M.Baiersdörfer.

Die Aktivierung von NF-κB über TLR3 durch den MyD88-unabhängigen Weg ist, im Vergleich zur MyD88-abhängigen Signalweiterleitung anderer TLR-Rezeptoren, leicht verzögert. So kommt es erst nach 1-2h zu einer Induktion von NF-κB, bei einer

Aktivierung von TLR4 hingegen schon nach weniger als einer Stunde. Ein zweiter Weg führt über die beiden zytosolischen Proteinkinasen Ikkε und TBK1 zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 (Fitzgerald *et al.*, 2003 und Sharma *et al.*, 2003). Durch die Bindung von IRF-3 an ISRE Elemente kommt es unter anderem zur Sekretion von IFN-β und so zu einer autokrinen und parakrinen Regulation Interferon-β-induzierter Gene (Akira und Takeda 2004). Da ein Anstieg der ApoJ-mRNA erst nach 8 Stunden deutlich zu sehen ist, ist zu vermuten, dass es sich bei ApoJ ebenfalls um ein sekundär induziertes Gen handelt. IFN-β könnte eventuell autokrin/parakrin wirken und an den IFN-α/β-Rezeptorkomplex (IFNAR1/2) binden, wodurch es zu einer Kreuzaktivierung der beiden Januskinasen Jak1 und Tyk2 kommt. Diese beiden phosphorylieren die Transkriptionsfaktoren STAT1 und 2. Diese Transkriptionsfaktoren bilden entweder STAT1/1 Homodimere, AAF (IFN-α activated factor) oder STAT1/2 Heterodimere, die anschließend IRF-9 binden und dann als ISGF3 (Interferon stimulated gen factor 3) bezeichnet werden. Durch STAT1/1 Homodimere kommt es zu einer Induktion von IRF-1 und dadurch sekundär zu einer Aktivierung von TLR3 und iNOS. Die ISGF3 Komplexe führen unter anderem zu einer Induktion von IRF-7. IRF-7 kann nun intrazellulär wiederum wie IRF-3 durch die TLR3 aktivierten Proteinkinasen Ikkε und TBK1 phosphoryliert werden und nach seiner Translokation in den Kern zu einer Induktion der IFN-α Gene führen. IFN-α kann nun genauso wie IFN-β auto/parakrin an den IFN-α/β-Rezeptorkomplex binden und so in einem autokrinen Loop zur Induktion Interferon-induzierter Gene beitragen. Durch eine Inkubation von VSMC mit bis zu 5000units IFN-β konnte keine deutliche, reproduzierbare Induktion von ApoJ erzielt werden. Dies bedeutet, dass die TLR3-vermittelte ApoJ-Regulation nicht ausschließlich auf eine sekundäre Regulation durch die Bindung von IFN-α an den IFN-α/β-Rezeptorkomplex zurückzuführen ist. IFN-β ist jedoch auf jeden Fall an der ApoJ-Regulation beteiligt, denn die Induktion von ApoJ durch poly (I:C) oder nekrotische Zellen kann deutlich erhöht werden, wenn die Zellen vorher für vier Stunden mit IFN-β vorinkubiert wurden (Abb.31). IFN-β alleine ist also nicht ausreichend um eine ApoJ-Induktion hervorzurufen, es unterstützt allerdings die durch poly (I:C) oder nekrotische Zellen induzierte ApoJ-Expression. Die Vorinkubation mit IFN-β führt vermutlich dazu, dass in den Zellen vermehrt IRF-7 gebildet wird, welches anschließend durch eine TLR3-induzierte Antwort durch die Proteinkinasen Ikkε und TBK1 phosphoryliert wird und durch Bindung an ISRE

Elemente zur Induktion von $\text{INF-}\alpha$ führt. Die $\text{INF-}\alpha$ Sekretion wiederum führt autokrin/parakrin zur Bildung von IRF-7. Die IRF-7 Produktion kann also auch durch die Aktivierung von TLR3 erfolgen, es dauert nur etwas länger, da es sich um ein sekundär induziertes Gen handelt. Es könnte also sein, dass IRF-7 bei der ApoJ-Regulation durch TLR3 eine entscheidende Rolle spielt. Möglich wäre auch, dass ApoJ primär durch IRF-3 leicht induziert wird und es nachfolgend durch die Produktion von IRF-7 zu einer verstärkten Antwort kommt. Diese Antwort erfolgt allerdings stärker, wenn schon IRF-7 durch eine Vorinkubation mit $\text{INF-}\alpha$ vorhanden ist. Es gibt allerdings noch keine Arbeiten, die eine mögliche Beteiligung von IRF-7/3 an der ApoJ Regulation aufzeigen.

Untersucht man den Promotor der Ratte von ApoJ mittels dem Programm MatInspector 2.2, findet man eine ISRE/IRF-7 und vier ISRE/IRF-3 Bindestellen. Es ist also durchaus wahrscheinlich, dass diese Elemente an der ApoJ-Regulation, vermittelt durch TLR3, beteiligt sind.

Um die Beteiligung dieser Elemente an der Regulation nachzuweisen, könnte man z.B. von ApoJ Promotorreporterkonstrukte mit den verschiedenen Bindestellen anfertigen und mit einem Reporterassay messen. Hierfür bietet sich ein System an, mit der sich die Promotoraktivität anhand eines Luciferasesignals nachweisen lässt. Eine weitere Möglichkeit wäre, eine Interaktion zwischen IRF-3/7 und dem ApoJ-Promotor zu untersuchen, indem man EMSAs (electrophoretic mobility shift assay) durchgeführt, mit denen man eine Bindung von IRF-3/7 an den ApoJ Promotor zeigen könnte. Um zu überprüfen, in welchem Maße der auto/parakrine Loop von $\text{INF-}\alpha$ einen Einfluss auf die ApoJ Regulation hat, könnte auch versucht werden, ins Medium sekretiertes $\text{INF-}\alpha/\beta$ durch Antikörper zu komplexieren oder man versucht den $\text{INF-}\alpha/\beta$ -Rezeptorkomplex mit einem blockierenden Antikörper zu inhibieren, so dass keine Signalweiterleitung mehr stattfinden kann. Bis zur Beendigung dieser Arbeit standen allerdings noch keine blockierenden Antikörper für Ratte zur Verfügung. Es wäre auch möglich Untersuchungen zur ApoJ-Regulation an Typ1- INF knock out Zellen zu machen, wodurch geklärt werden könnte, inwiefern die auto/parakrine Induktion durch $\text{INF-}\alpha/\beta$ an der ApoJ Regulation beteiligt ist.

4.3. Mögliche Bedeutung von ApoJ in atherosklerotischen Läsionen

In dieser Arbeit konnte die Regulation von ApoJ in glatten Muskelzellen durch zwei verschiedene Stimuli gezeigt werden. Die Behandlung von glatten Muskelzellen mit

E-LDL zeigte, wie oben bereits besprochen, eine deutliche Reduktion der ApoJ-Expression. Im Gegensatz dazu konnte durch die Behandlung mit nekrotischen Zellen eine bis zu zweifache Induktion der ApoJ- Sekretion in glatten Muskelzellen erzielt werden. Dabei konnte in der vorliegenden Arbeit RNA als induzierende Komponente aus nekrotischen Zellen identifiziert werden. Beide Stimuli (E-LDL und nekrotische Zellen) sind in atherosklerotischen Läsionen nachweislich in großem Maße vorhanden (Torzewski *et al.*, 1998) Nekrotische Zelltrümmer entstehen überall in Geweben, in denen eine Entzündungsreaktion stattfindet, was bei Atherosklerose in hohem Maße der Fall ist (Libby, 2002). Durch die Einwanderung von Makrophagen und T-Lymphozyten kommt es zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β und TNF- α .

Es stellt sich also die Frage, inwiefern die hier erzielten Ergebnisse auf den Zustand der Atherosklerose übertragen werden können.

Es ist in einem Zellkultursystem nicht möglich, die komplexen Vorgänge bei der Entstehung der Atherosklerose zu untersuchen, man kann nur wie in vorliegender Arbeit geschehen, die Wirkung von einzelnen, an der Atherosklerose beteiligten, Komponenten untersuchen. Sowohl die reprimierende Wirkung von E-LDL als auch die induzierende Wirkung von nekrotischen Zellen bezüglich der ApoJ-Regulation lässt sich, wie oben erläutert, im Einzelnen gut erklären. In atherosklerotischen Plaques wirken allerdings sehr viele Faktoren gleichzeitig auf die Zellen ein, ein Zustand, der im Zellkultursystem nicht erreicht werden kann.

Die reprimierende Wirkung von E-LDL auf die ApoJ-Regulation wird aber *in vivo* wohl eher eine untergeordnete Rolle spielen, da es bereits bekannt ist, dass ApoJ in Läsionen vermehrt exprimiert wird. Des Weiteren ist die ApoJ Konzentration im Serum bei Menschen mit Atherosklerose erhöht (Trogakos *et al.*, 2002).

4.4. Bedeutung von Toll-like Rezeptoren in atherosklerotischen Läsionen

In Bezug auf das Ergebnis, dass RNA aus nekrotischen Zellen über den Rezeptor TLR-3 in der Lage ist ApoJ hochzuregulieren, stellt sich die Frage nach dem Vorhandensein von Toll-like Rezeptoren und deren Bedeutung in atherosklerotischen Läsionen.

Da Toll-like Rezeptoren erst einmal der Erkennung von Pathogenen dienen und es daraufhin zu einer Aktivierung des Immunsystems kommt, wurden erste Untersuchungen zu TLRs in atherosklerotischen Läsionen gemacht, da sich dort

einige Bakterien und Viren wie z.B. *Helocobacter pylori*, Cytomegalovirus und *Chlamydia pneumoniae* nachweisen lassen (Byrne und Kalayoglu, 1999; Chiu *et al.*, 1997; Rassa *et al.*, 2001). *C. Pneumoniae* z.B. beschleunigt den Verlauf der Atherosklerose in Mäusen (Moazed *et al.*, 1999). Aufgrund dieser Beobachtungen wurden erste Untersuchungen zur Expression von TLRs in atherosklerotischen Läsionen von Edfeldt *et al.*, 2003 gemacht. Hier wurde mittels Immunhistochemie die Expression von Toll-like Rezeptoren in atherosklerotischen Läsionen untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass alle untersuchten Toll-like Rezeptoren (1-6) in Läsionen nachzuweisen sind, allerdings TLR1, 2, 4 und 5 deutlich stärker als TLR3 und 6.

Untersuchungen an ApoE^{-/-} Mäusen, die mit MyD88^{-/-} Mäusen gekreuzt wurden, zeigen, dass zumindest die MyD88-abhängige Signalweiterleitung einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung von Atherosklerose hat. Diese Mäuse haben im Gegensatz zu den normalen ApoE^{-/-} Mäusen, 40-65% weniger Atherosklerose und die Produktion des Chemokins MCP-1 ist deutlich reduziert (Vink *et al.*, 2004). Als weiteres Tiermodell für Atherosklerose werden LDL-Rezeptor knock out Mäuse verwendet. Untersuchungen an LDL^{-/-} Mäusen haben gezeigt, dass es durch eine verminderte NF-κB Aktivierung zu einer Steigerung der Plaquebildung um 62% kommt. Diese Verminderung der NF-κB Aktivierung wird in diesen Versuchen durch eine Deletion von IKK2 (IκB Kinase 2) hervorgerufen, welche essentiell für die Aktivierung von NF-κB durch den MyD88-abhängigen Weg ist (Kanters *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse scheinen konträr zu den Ergebnissen mit den MyD88^{-/-} Mäusen zu sein, denn auch ein knock out von MyD88 führt zu einer verminderten NF-κB-Aktivierung. Allerdings kommt es durch die Unterdrückung der NF-κB-Aktivierung in den Makrophagen auch zu einer Reduktion der Sekretion des antiinflammatorischen Cytokins IL-10 (Kanters *et al.*, 2003). Somit scheint die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Mediatoren in diesem System gestört.

Eine Aktivierung von NF-κB ist allerdings nicht allein durch die Aktivierung von Toll like Rezeptoren hervorzurufen, weshalb auch in atherosklerotischen Läsionen die Aktivierung von NF-κB über andere Rezeptoren laufen kann. NF-κB kann unter anderem auch durch den Interleukinrezeptor(IL-1R), den Rezeptor für TNF-α (TNFR-1) und CD40, aktiviert werden.

Durch die Aktivierung von TLR3 und 4 kommt es zu einer Inhibierung des nukleären Rezeptors LXR. Dieser ist unter anderem an der Regulation des

Cholesterintransporters ABCA1 und ApoE beteiligt. ABCA1 ist notwendig um Cholesterin aus beladenen Makrophagen wieder abzutransportieren und Cholesterin auf HDL zu übertragen. Wird die Bildung dieses Transporters nun durch die Aktivierung von TLR3/4 inhibiert, kommt es durch eine vermehrte Schaumzellbildung zu einem Anstieg von atherosklerotischen Läsionen. Diese Inhibierung wird durch die von TLR3/4 hervorgerufene Aktivierung von IRF-3 ausgelöst (Castrillo *et al.*, 2003). Diese Untersuchungen sind allerdings auch nur *in vitro* durchgeführt worden und die Bedeutung dieser Ergebnisse *in vivo* muss also noch untersucht werden. Welche Bedeutung TLRs in Bezug auf Atherosklerose haben, ist noch ungeklärt. Es wird allerdings schon deutlich, dass die durch TLRs ausgelösten Signalkaskade auf jeden Fall einen Einfluss bei der Entstehung von Atherosklerose hat. Dies wird unterstützt durch Untersuchungen an Mäusen, die mit einer cholesterinreichen Diät gefüttert wurden. Ihnen wurde zusätzlich einmal pro Woche intravenös ein bakterielles Endotoxin (LPS) verabreicht, was zu einer deutlichen Steigerung der Bildung von Läsionen führte (Lehr *et al.*, 2001). Bakterielle Toxine führen bekanntlich über die Aktivierung von TLRs zu einer Aktivierung des Immunsystems über den Transkriptionsfaktor NF- κ B. Somit führt jede Art von Infektion zu einer Beschleunigung der Atherosklerose. Durch die Inhibierung von NF- κ B-induzierten Genen könnte ApoJ somit entscheidend dazu beitragen, dass die Krankheit nicht so schnell voranschreitet (Santilli *et al.* 2003).

Es ist also möglich, dass die Anreicherung von ApoJ in Läsionen und im Serum von Atherosklerosepatienten (Trogakos *et al.*, 2002, Ishikawa *et al.*, 1998) auf eine durch nekrotische Zellen induzierte Expression hin zustande kommt. Ebenfalls an der Induktion beteiligt sein könnte TNF- α , welches auch zu einer Induktion des ApoJ-Gens führt (Li *et al.*, 2002) und in atherosklerotischen Läsionen von Schaumzellen sekretiert wird.

4.5. Mögliche Funktionen von ApoJ in entzündlichen Läsionen

Die Induktion von ApoJ durch nekrotische Zellen wird nicht nur bei Atherosklerose von Bedeutung sein, sondern auch bei anderen Krankheiten, bei denen es zu einer Gewebsschädigung durch Nekrose kommt. Hier wären unter andern neurodegenerative Krankheiten wie M. Alzheimer zu nennen, aber auch bei Nierenkrankheiten und Krebs kommt es zu einer vermehrten ApoJ Expression (s. 1.2.2.). Auch im Rahmen einer autoimmunen Myokarditis und einer lokalen Ischämie

in ventrikulären Myozyten kommt es zu einer vermehrten ApoJ-Expression (Schwertfeger *et al.*, 1996). An ApoJ^{-/-} Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese Mäuse eine deutlich stärkere Ausprägung der Krankheit haben als wildtyp Mäuse, was die These unterstützt, dass ApoJ gewebesprotektive Eigenschaften hat (McLaughlin *et al.*, 2000). Auch nach einer mechanischen Verletzung der Aorta, hervorgerufen durch eine Ballondilatation, kommt es bereits nach 6 Stunden zu einer vermehrten ApoJ Expression in den glatten Muskelzellen in diesem Bereich (Miyata *et al.*, 2001). Des Weiteren wurde ein erhöhter Gehalt an ApoJ in myocardialen Läsionen von Patienten festgestellt, die einen Herzinfarkt erlitten hatten (Väkevä *et al.*, 1993). ApoJ ist von vielen Arbeitsgruppen als ein antiapoptotisches Protein beschrieben worden (Koch-Brandt und Morgen, 1996). ApoJ inhibiert z.B. die NF-κB abhängige Genexpression (Santilli *et al.*, 2003). Dadurch könnte es zum Schutz des umliegenden Gewebes bei entzündlichen Läsionen beitragen, indem es durch die Inhibierung von NF-κB eine übermäßige Aktivierung der lokalen Immunantwort verhindert. Extrazelluläres ApoJ schützt in dosisabhängiger Weise humane Fibroblasten vor TNF-α induziertem Zelltod (Sensibar *et al.*, 1995; Sintich *et al.*, 1999; Humphreys *et al.*, 1997). Des Weiteren inhibiert extrazelluläres ApoJ die Migration von VSMC in Migrationsplatten (Sivamurthy *et al.*, 2001). Diese Beobachtungen könnten ebenfalls auf eine Inhibierung von NF-κB durch ApoJ zurückzuführen sein. ApoJ ist außerdem in der Lage bei verschiedenen Zelltypen die durch H₂O₂ induzierte Apoptose zu verhindern (Schwochau *et al.*, 1998; Vivard *et al.*, 1999; Dumont *et al.*, 2002; Trougaskos *et al.*, 2004). Auch für die intrazelluläre, nukleäre Form von ApoJ ist schon eine antiapoptotische Funktion aufgezeigt worden. Nukleäres ApoJ inhibiert die durch Camptothecin ausgelöste Apoptose durch Interaktion mit dem Apoptose Induktor Bax (Bcl-2-assoziiertes Protein x) (Zhang *et al.*, 2005).

Wie in der Einleitung (Abschnitt 1.2.2.) ausführlich erläutert, fungiert ApoJ als eine Art extrazelluläres Hitzeschockprotein (Hsp) (Poon *et al.*, 2000), indem es an langsam aggregierende Formen von Proteinen bindet (Poon *et al.*, 2002). Auf diese Art und Weise könnte ApoJ eine vollständige Denaturierung und Aggregation von Proteinen, freigesetzt aus nekrotischen Zellen, verhindern. So kann es evtl. zu einer besseren Entsorgung von umliegenden, noch intakten Zellen kommen. ApoJ könnte die Funktion als Adapterprotein einnehmen und die Proteine über Rezeptoren der LDL Rezeptorfamilie (Megalin und LRP) entsorgen (Bartl *et al.*, 2001). Weitere Arbeiten

unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass durch einen 30minütigen Hitzeschock denaturierte Proteine durch die Zugabe von ApoJ besser in nicht professionell phagozytierende Zellen (Dottersack, 10A) endozytiert werden (Bergner, noch unveröffentlicht).

ApoJ ist bereits 1989 als Teil des terminalen Komplexes des Komplementsystems identifiziert worden (Jenne und Tschopp, 1989; Kirzbaum *et al.*, 1989). Es verhindert die Einlagerung des terminalen Komplexes C5b-9 in die Zellmembran und wurde deshalb CLI (cytolysis inhibitor) genannt. Auch in atherosklerotischen Läsionen ist bereits mehrfach aktiviertes Komplement nachgewiesen worden (Niculescu *et al.*, 1987; Seifert *et al.*, 1989; Seifert *et al.*, 1990). E-LDL ist in der Lage das Komplementsystem zu aktivieren, wodurch es zur Bildung von C5b-9 kommt (Bhakdi *et al.*, 1995). Durch die Bindung von CRP (C-reaktives Protein) aktiviert es das Komplementsystem über den klassischen Weg (Bhakdi *et al.*, 1998). Eine Hemmung des Komplementsystems wirkt der Atherosklerose entgegen, da die Entzündungsreaktion, ausgelöst durch die Komplementkomponenten C5a und C3a, reduziert wird. ApoJ kann allerdings nur die Einlagerung des terminalen Komplexes in die Zellmembran verhindern, dies ist allerdings ein wichtiger Punkt, da so verhindert wird, dass Zellen lysieren und es zu einer weiteren Einlagerung von nekrotischen Zellen in der Gefäßwand kommt.

Als „anti-atherosklerotisches“ Molekül wird ApoJ in Arbeiten von Gelisson *et al.*, 1998 bezeichnet. Hier wird gezeigt, dass ApoJ, extrazellulär auf Schaumzellen gegeben, zu einem gesteigerten Cholesterin Efflux aus diesen Zellen führt. Bis jetzt sind allerdings noch keine Versuche gemacht worden, die Aufschluss darüber geben, wie ApoJ diesen Abtransport unterstützt. Ein weiterer entscheidender Schritt bei der Entstehung von Atherosklerose ist die Proliferation von glatten Muskelzellen in die Läsion. Untersuchungen an LNCaP (humane Prostata Zelllinie) und VSMC zeigen, dass eine Zugabe von ApoJ zum Kulturmedium eine Proliferation bzw. eine Migration von glatten Muskelzellen reduzierte (Zhou *et al.*, 2002; Sivamurthy *et al.*, 2001).

Es gibt also viele verschiedene Möglichkeiten, in welcher Weise ApoJ in entzündlichen Läsionen aber auch speziell bei Atherosklerose, zu einem Schutz des umliegenden noch intakten Gewebes beitragen kann. Der Schutz reicht von der Inhibierung von NF- κ B über eine Interaktion mit Bax bis zu einer verbesserten Entsorgung von denaturierten Proteinen. Der in dieser Arbeit aufgezeigte

Apoptoseschutz durch die Bindung an E-LDL zeigt eine weitere Möglichkeit der Apoptoseverminderung auf.

4.5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur möglichen Bedeutung von ApoJ in der Atherosklerose gemacht. In diesem Zusammenhang wurde zuerst aufgezeigt, dass ApoJ an das in atherosklerotischen Läsionen vorkommende, toxische E-LDL binden kann. An natives LDL hingegen bindet ApoJ nicht.

Diese Bindung von ApoJ an E-LDL verhindert die durch E-LDL induzierte Apoptose in der stabilen Zelllinie CRL2018, einer glatten Muskelzelllinie aus Ratte. Dies konnte unter anderem durch Annexinfärbung und Messung der Caspaseaktivität gezeigt werden.

Des Weiteren wurde untersucht, inwiefern Komponenten aus atherosklerotischen Läsionen einen Einfluss auf die ApoJ-Regulation in dieser Zelllinie haben. Zum einen wurde der Einfluss von E-LDL und LDL auf die ApoJ-Regulation untersucht und zum anderen wurde untersucht, welchen Einfluss nekrotische Zellen haben. Bei der Behandlung mit E-LDL und LDL zeigte sich, dass beide zu einer Repression der ApoJ Sekretion führen, E-LDL allerdings in viel stärkerem Maße. Nekrotische Zellen hingegen induzieren die ApoJ Sekretion in glatten Muskelzellen. Bei der Induktion durch nekrotische Zellen konnte gezeigt werden, dass mindestens zwei Bestandteile von nekrotischen Zellen zu dieser Induktion führen. Eine Komponente ist vermutlich membranassoziiert, da sie bei 100.000g pelletiert. Die andere Komponente befindet sich nach dieser Zentrifugation im Überstand und ist somit eine cytosolische Komponente. Weitere Untersuchungen zeigten, dass es sich bei dieser Komponente um RNA handelt, die in der Lage ist, die ApoJ-Expression zu induzieren. Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass diese Stimulierung durch ein Mitglied der Toll-like Rezeptor Familie den TLR3-vermittelt wird. Dies konnte durch transiente und stabile Expression von TLR3 in TLR3 negativen 10A Zellen gezeigt werden. Dieser Rezeptor bindet doppelsträngige RNA und führt über verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege unter anderem zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und IRF-3. Untersuchungen dieser Signaltransduktionswege mit spezifischen Inhibitoren lassen vermuten, dass beide Transkriptionsfaktoren an der ApoJ-Regulation beteiligt sind. Der Weg, der über IRF-3 vermittelt wird, spielt dabei allerdings wohl eine größere Rolle.

5. Literaturverzeichnis

Anderson, K.V., Jurgens, G. und Nusslein-Volhard, C. (1985): Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell*. 42(3):779-89.

Akira, S. and Takeda, K. (2004): "Toll-like receptor signalling". *Nat Rev Immunol*, 4 (7): 499-511.

Aksoy, E., Zouain, C., Vanhoutte, F., Kontaine, J., Pavelka, N., Tiebmont, N., Willems, F., Goldmann, M., Carpon, M., Ryffel, B. und Trottein, F. (2005): Double-stranded RNAs from Helminth Parasite *Schistosoma* Activate TLR3 in Dendritic Cells. *JBC* 280: 277-283.

Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R. und Flavell, R.A. (2001): Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 413 (6857): 732-738.

Appel, D. und Koch-Brandt, C. (1994): Sorting of a secretory protein (gp80) to the apical surface of Caco.2.cells. *J Cell Sci*. 107: 553-9.

Aronow, B.J., Lund, S.D., Brown, T.L., Harmony, J.A. und Witte, D.P. (1993): Apolipoprotein J expression at fluid-tissue interfaces: potential role in barrier cytoprotection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90(2):725-9.

Artwohl, M., Roden, M., Waldhausl, W., Freudenthaler, A. und Baumgartner-Parzer S. (2003): Free fatty acids trigger apoptosis and inhibit cell cycle progression in human vascular endothelial cells. *FASEB Journal*. 18(1):146-8.

Bach, U., Baiersdörfer, M., Klock, D., Cattaruzza, M., Post, A. und Koch-Brandt C. (2001): Apoptotic Cell Debris and Phosphatidylserin-Containing Lipid Vesicles Induce apolipoprotein J (Clusterin) Gene Expression in Vital Fibroblasts. *Exp.Cell Res*. 265:11-20.

Baiersdörfer, M. (2006): Charakterisierung der Apolipoprotein J-Genregulation in Fibroblasten und glatten Gefäßmuskelzellen durch nekrotische Zellen und Toll-like Rezeptoren. Dissertation im Fach Biologie, Johannes Gutenberg Universität Mainz

Bailey, R.W., Dunker, A.K., Brown, C.J., Garner, E.C. und Griswold, M.D. (2001): Clusterin, a binding protein with a molten globule-like region. *Biochemistry*. 2001 40(39):11828-40.

Bailey, R.W. und Griswold, M.D. (1999): Clusterin in the male reproductive system: localization and possible function. *Mol Cell Endocrinol*. 151:17-23.

Bartel, M., Luckenbach, T., Bergner, O., Ullrich, O. und Koch-Brandt, C. (2001): Multiple Receptors Mediate Apo-J-Dependent Clearance of Cellular Debris into Nonprofessional Phagocytes. *Exp.Cell Res*. 271:130-141.

Baumstark, M.W., Kreutz, W., Berg, A. und Keul, J.(1991): Symmetry of the surface, and structure of the central core of human LDL particles, analyzed by X-ray small angle scattering. *Adv Exp Med Biol*. 285:123-30.

Beutler, B. (2004): Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*. 430(6996):257-63.

Bhakdi, S. (2002): Immunpathogenese der Atherosklerose; Die Mainzer Hypothese. *Dtsch Med Wochenschr*. 127:390-394.

Bhakdi, S., Dorweiler, B., Kirchmann, R., Torzewski, M., Weise, E., Tranum-Jensen, J., Walev, I. und Wieland, E. (1995): On the pathogenesis of atherosclerosis: enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety. *J Exp Med*. 182: 1959-1971.

Bhakdi, S., Torzewski, M., Klouche, M. und Hemmes, M. (1999): Complement and atherogenesis: binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 19: 2348-2354.

- Blaschuk, O., Burdzy, K. und Fritz, I.B.** (1983): Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *J Biol Chem.* 12:7714-7720.
- Brentano., F., Schorr, O., Gay, R.E., Gay, S. und Kyburz, D.** (2005): RNA released from necrotic synovial fluid cells activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via Toll-like receptor 3. *Arthritis Rheum.* 52(9):2656-65.
- Brown, M.S. und Goldstein, J.L.** (1997): The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.* 89: 331-340.
- Brown, T.L., Moulton, B.C., Baker, V.V., Mira, J. und Harmony, J.A.** (1995): Expression of apolipoprotein J in the uterus is associated with tissue remodeling. *Biol Reprod.* 52(5).
- Bsibsi, M., Ravid, R., Gveric, D. und van Noort, J.M.** (2002): Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 61(11):1013-21.
- Burkey, B.F., deSilva, H.V., Harmony, J.A.** (1991): Intracellular processing of apolipoprotein J precursor to the mature heterodimer. *J Lipid Res.* 32(6):1039-48.
- Buttayan, R., Olsson, C.A., Pintar, J., Chang, C., Bandyk, M., Ng P.Y. und Sawczuk, I.S.** (1989): Induction of the TRPM- gene in cells undergoing programmed death. *Mol Cell Biol.* 9(8):3473-81.
- Byrne, G.I. und Kalayoglu, M.V.** (1999): Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis: links to the disease process. *Am Heart J.* 138(5 Pt 2):S488-90.
- Calero, M., Tokuda, T., Rostango, A., Kumar, A., Zlokovic, B., Frangione, B. und Ghiso, J.** (1999): Functional and structural properties of lipid-associated apolipoprotein J (Clusterin). *Biochem J.* 344:375-383.
- Castrillo, A., Joseph, S.B., Vaidya, S.A., Haberland, M., Fogelman, A.M., Cheng, G. und Tontonoz, P.** (2003): Crosstalk between LXR and toll-like receptor signalling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Mol Cell.* 12(4):805-16.
- Chao, F.F., Amende, L.M., Blanchette-Mackie, E.J., Skarlatos, S.I., Gamble, W., Resau, J.H., Mergner, W.T. und Kruth, H.S.** (1988): Unesterified cholesterol-rich lipid particles in atherosclerotic lesions of human and rabbit aortas. *Am J Pathol.* 131(1):73-83.
- Chiu, B., Viira, E., Tucker, W., Fong, I.W.** (1997): Chlamydia pneumoniae, cytomegalovirus, and herpes simplex virus in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation.* 96(7):2144-8.
- Cohen, G.M.** (1997): Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 326 (15):1-16.
- Collard, M.W. und Griswold, M.D.** (1987): Biosynthesis and molecular cloning of sulfatad glycoprotein 2 secreted by rat Sertoli cells. *Biochemistry.* 26: 3297-303.
- Cybulsky, M.I. und Gimborne, M.A.** (1991): Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science.* 251: 788-791.
- De Silva, H.V., Harmony, J.A., Stuart, W.D. Gil, C.M. und Robbins, J.** (1990): Apolipoprotein J: structure und tissue distribution. *Biochemistry.* 29(22):5380-5389.
- DeMattos, R.B., O'Dell, M.A., Parsadanian, M., Taylor, J.W., Harmony, J.A., Bales, K.R., Paul, S.M., Aronow, B.J. und 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.
- Dersch, K.** (2005): Atherosklerose und Apoptose: Identifizierung von freien Fettsäuren aus enzymatisch verändertem LDL als Auslöser der Apoptose in humanen Endothelzellen. Dissertation im Fach Pharmazie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz

- Dersch, K., Ichijo, H., Bhakdi, S., Husmann, M.** (2005): Fatty acids liberated from low-density lipoprotein trigger endothelial apoptosis via mitogen-activated protein kinases. *Cell Death Differ.*8:1107-14
- Diemer, V., Hoyle, M., Baglioni, C. und Millis, A.J.** (1992): Expression of porcine complement cytotoxicity inhibitor mRNA in cultured aortic smooth muscle cells. Changes during differentiation in vitro. *J Biol Chem.*267(8):5257-64.
- Dumont, P., Chainiaux, F., Eliaers, F., Petropoulou, C., Remacle, J., Koch-Brandt, C., Gonos, E.S. und 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.
- Dunne, A. und 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.
- Edfeldt, K., Swedenborg, J., Hansson, G.K. und Yan ZQ.** (2002): Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation.*105(10):1158-61.
- Farina, C., Krumbholz, M., Giese, T., Hartmann, G., Aloisi, F. und Meinel, E.** (2005): Preferential expression and function of Toll-like receptor 3 in human astrocytes. *J Neuroimmunol*, 159 (1-2):12-19.
- Fitzgerald, K.A., Rowe, D.C., Barnes, B.J., Caffrey, D.R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P.M. und Golenbock, D.T.** (2003): LPS-TLR4 signalling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med.* 198(7):1043-55.
- French, L.E., Sappino, A.P., Tschopp, J. und Schifferli, J.A.** (1992): Distinct sites of deposition of the putative cell death marker clusterin in the human thymus. *J Clin Invest.* 90:1919-1925.
- French, L.E., Wohlwend, A., Sappino, A.P., Tschopp, J. und Schifferli, J.A.** (1994): Human clusterin gene expression is confined to surviving cells during in vitro programmed cell death. *J Clin Invest.* 93: 877-884.
- Fenske, D.** (2001): Enzymatisch modifiziertes LDL induziert IL-8 in Endothelzellen bei Hemmung von NF-κB und Induktion von AP-1. Dissertation im Fachbereich Medizin, Joh. Gutenberg Universität Mainz.
- Freixes, M., Puig, B., Rodriguez, A., Torrejon-Escribano, B., Blanco, R. und Ferrer, I.** (2004): Clusterin solubility and aggregation in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol (Berl).* 108 (4): 295-301.
- Fritz, I.B., Burdzy, K., Setchell, B. und Blaschuk, O.** (1983): Ram rete testis fluid contains a protein (clusterin) which influences cell-cell interactions in vitro. *Biol Reprod.* 28(5):1173-88.
- Gao, J.J., Filla, M.B., Fultz, M.J., Vogel, S.N., Russell, S.W. und 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.
- Gay, N.J. und Keith, F.J.** (1991): Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature.*30;351(6325):355-6.
- Gelissen, I., Hochgrebe, T., Wilson, M., Easterbrook-Smith, S., Jessup, W., Dean, R.T. und Brown, A.J.** (1998): Apolipoprotein J (Clusterin) induces cholesterol export from macrophage-foam cells: a potential anti-atherogenic function? *Biochem.J.* 321:231-237.
- Goldstein, J. und Brown, M.** (1977): Atherosclerosis: the low-density lipoprotein receptor hypothesis. *Metabolism.* 26:1257-1275.
- Grethe, S., Are, M.P. Andersson, T. und Prom-Ares, M.I.** (2004): p38 MAK mediates TNF-induced apoptosis in endothelial cells via phosphorylation and downregulation of Bcl-x(L). *Exp Cell Res.* 298:632-642.

- Guillot, L., Le, Goffic, R., Bloch, S., Escriou, N., Akira, S., Chignard, M. und 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. und Koch-Brandt, C.** (1999): Nerve growth factor and epidermal growth factor stimulate clusterin gene expression in PC12 cells. *Biochem J.* 1;339 (Pt 3):759-66.
- Hakala, J.K., Oksjoki, R., Laine, P., Du, H., Grabowski, G.A., Kovanen, P.T. und Pentikainen, M.O.** (2003): Lysosomal enzymes are released from cultured human macrophages, hydrolyze LDL in vitro, and are present extracellularly in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:1403-1436.
- Han, S.R., Momeni, A., Strach, K., Suriyaphol, P., Fenske, D., Paprotka, K., Hashimoto, S.I., Torzewski, M., Bhakdi, S. und Husmann M.** (2003): Enzymatically modified LDL induces cathepsin H in human monocytes: potential relevance in early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:661-667.
- Harii, N., Lewis, C.J., Vasko, V., McCall, K., Benavides-Peralta, U., Sun, X., Ringel, M.D., Saji, M., Giuliani, C., Napolitano, G., Goetz, D.J., Kohn, L.D.** (2005): Thyrocytes express a functional toll-like receptor 3: overexpression can be induced by viral infection and reversed by phenylmethimazole and is associated with Hashimoto's autoimmune thyroiditis. *Mol Endocrinol.* 19(5):1231-50.
- Hartmann, K., Rauch, Urban, J., Parccyk, K., Diel, P., Pilarsky, C., Appel, D., Haase, W., Mann, K., Weller, A.** (1991): Molecular cloning of gp80, 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: 9924-31.
- Havel, R.J., Eder, H.A. und Bragdon, J.H.** (1955): The description and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest.* 34:1345-1353.
- Hochstasser, A.C., James, R.W., Martin, B.M., Harrington, M., Hochstrasser, D., Pometta, D. und Merrill, C.R.** (1988): HDL particle associated proteins in plasma and cerebrospinal fluid: identification and partial sequencing. *Appl Theor Electrophor.* 1: 73-76.
- Hopkins, P.A. und Sriskandan** (2005): Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clinical and Exp. Immunology.* 140:395-407.
- 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. und Morin, P.J.** (2000): Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. *Cancer Res.* 60 (22): 6281-6287.
- Humphreys, D., Hochgrebe, T.T., Easterbrook-Smith, S.B., Tenniswood, M.P. und Wilson, M.R.** (1997): Effects of clusterin overexpression on TNF α - and TGF β -mediated death of L929 cells. *Biochemistry.* 36 (49):15233-15243.
- Ishikawa, Y., Akasaka, Y., Ishii, T., Komiyama, K., Masuda, S., Asuwa, N., Choi-Miura, N.H. und Tomita, M.** (1998): Distribution and synthesis of apolipoprotein J in the atherosclerotic aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18 :665-72.
- James, R.W., Hochstrasser, A.C., Borgiani, I., Martin, B., Pometta, D. und Hochstrasser, D.** (1991): Characterization of human high density lipoprotein-associated protein, NA1/NA2. Identity with SP-40,40, an inhibitor of complement-mediated cytotoxicity. *Arterioscler Thromb.* 11: 645-652.
- Jenne, D.E. und Tschopp, J.** (1989): Molecular structure and functional characterization of human complement cytotoxicity inhibitor found in blood and seminal plasma: identity to sulphated glycoprotein 2, a constituent of rat testis fluid. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (18):7123-7127.
- Jin, G. und Howe, P.H.** (1997): Regulation of clusterin gene expression by transforming growth factor beta. *J Biol Chem.* 272(42):26620-6.
- Jones, S.E. und Jomary, C.** (2001): Molecules in focus Clusterin. *Int J Biochem cell Biol.* 34: 427-431.

- Jordan- Starck, T.C., Lund, S.D., Witt, D.P., Aronow, B.J., Ley, C.A., Stuard, W.D., Swertfeger, D.K., Calyton, L.R., Sells, S.F., Paigen, B .** (1994): Mouse apolipoprotein J: characterization of a gene implicated in atherosclerosis. *J Lipid Res.* 35: 194-210.
- Kang, Y.K., Hong, S.W., Lee, H. und Kim, W.H.** (2004): Overexpression of clusterin in human hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol.* 35 (11): 1340-1346.
- Kanters, E., Pasparakis, M., Gijbels, M.J., Vergouwe, M.N., Partouns-Hendriks, I., Fijneman, R.J., Clausen, B.E., Forster, I., Kockx, M.M., Rajewsky, K., Kraal, G., Hofker, M.H. und de Winther, M.P.** (2003): Inhibition of NF-kappaB activation in macrophages increases atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest.* 112(8):1176-85.
- Kariko, K., Ni, H., Capodci, J. und Weissmann, D.** (2004): mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *JBC.* 279:12542-50.
- Keynard, A., Periman, I. und Simart, J.** (1992): Ovarian 3 β -hydrosteroid dehydrogenase and sulfated glycoprotein-2 gene expression are differentially regulated by induction of ovulation pseudopregnancy and luteolysis in the immature rat. *Endocrinol.* 130 (4):2192-200 .
- Kharroubi, I., Ladriere, L., Cardozo, A.K., Dogusan, Z., Cnop, M. und Eizirik, D.L.** (2004): Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology.* 145(11):5087-96.
- Kirszbaum, L., Sharpe, J.A., Murphy, B., d'Ápice, A.J.F. Classon, B., Hudson, P. und Walker, I.D.** (1989): Molecular cloning and characterization of the novel, human complement-associated protein SV40,40:a link between the complement and reproductive systems *EMBO J.* 8(3):711-718.
- Kissinger, C., Skinner, M.K. und Griswold, M.D.** (1982): Analysis of sertoli cell-secreted proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Biol Reprod Vol.* 50: 233-240.
- Klouche, M., Gottschling, S., Gerl, V., Hell, W., Husmann, M., Dorweiler, B., Messner, M., Bhakdi, S.** (1998): Atherogenetic properties of enzymatically degraded LDL: selective induction of MCP-1 and cytotoxic effects on human macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18:1376-1385
- Klouche, M., May, A.E., Hemmes, M., Messner, M., Kanse, S.M., Preissner, K.T., Bhakdi, S.** (1999): Enzymatically modified, nonoxidized LDL induces selective adhesion and transmigration of monocytes and T-lymphocytes through human endothelial cell monolayers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19(3):784-93.
- Klouche, M., Rose-John, S., Schmiedt, W. und Bhakdi, S.** (2000): Enzymatically degraded nonoxidized LDL induced human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation. *Circulation.* 101(15): 1799-1805.
- Koch-Brandt, C. und Morgans, C.** (1996): Clusterin: a role in cell survival in the face of apoptosis? *Prog Mol Subcell Biol.* 16: 130-49.
- Kreuzer, J. und Tiefenbacher, C.H.** (2003): *Atherosklerose. Taschenatlas spezial*; Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Kruth, H.S., Fry, D.L.** (1984): Histochemical detection and differentiation of free and esterified cholesterol in swine atherosclerosis using filipin. *Exp Mol Pathol.* 40:288-94.
- LaDu, M.J., Shah, J.A., Reardon, C.A., Getz, G.S., Bu, G., Hu, J., Guo, L. und van Eldik, L.J.** (2000): Apolipoprotein E receptors mediate the effects of beta-amyloid on astrocyte cultures. *J Biol Chem,* 275 (43), 33974-33980.
- Lee, H.K., Dunzenhofer, S., Soldau, K. und Tobias, P.S.** (2006): Double-Stranded RNA-Mediated TLR3 Activation Is Enhanced by CD14. *Immunity.* 24:153-163.
- Lehr, H.A., Sagban, T.A., Ihling, C., Zahringer, U., Hungerer, K.D., Blumrich, M., Reifenberg, K. und Bhakdi, S.** (2001): Immunopathogenesis of atherosclerosis: endotoxin accelerates atherosclerosis in rabbits on hypercholesterolemic diet. *Circulation.* 104(8):914-20.

- Leskov, K.S., Klokov, D.Y., Li, J., Kinsella, T.J. und Boothman, D.A.** (2003): Synthesis and functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein. *J Biol Chem.* 278(13):11590-600.
- Li, M., Carpio, D.F., Zheng, Y., Bruzzo, P., Singh, V., Ouaz, F., Medzhitov, R.M. und 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. und 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):45129-40.
- Libby, P.** (2002): Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 420(6917):868-74.
- Lidstrom, A.M., Bogdanovic, N., Hesse, C., Volkman, I., Davidsson, P. und 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.
- Lofuns, I.M., Naylor, A.R., Goodall, S., Crowther, M., Jones, L., Bell, P.R. und Thompson, M.M.** (2000): Increased matrix metalloproteases-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption. *Stroke.* 31: 40-47.
- Lorsch, A. und 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):11543-8.
- Lusis, A.J.** (2000): Atherosclerosis. *Nature.* 407(6801):233-41.
- Matsumoto, M., Kikkawa, S., Kohase, M., Miyake, K., Seya, T.** (2002): Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signalling. *Biochem Biophys Res Commun.* 24; 293(5):1364-9.
- May, P.C., Lampert-Etchells, M., Johnson, S.A., Poirier, J., Masters, J.N. und 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.
- McLaughlin, L., Zhu, G., Mistry, M., Ley-Ebert, C., Stuart, W., Florio, C., Groen, P., Witt, S., Kimball, T., Witte, D., Harmony, J. und Aronow, B.** (2000): ApolipoproteinJ/Clusterin limits the severity of murine autoimmune myocarditis. *J Clin Invest.*106:1105-1113.
- Meir, K.S. und Leitersdorf, E.** (2004): Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(6):1006-14.
- Michel, D., Gillet, G., Volovitch, M., Pessac, B., Calothy, G. und Burn, G.** (1989): Expression of a novel gene encoding a 51.5 kD precursor protein is induced by different retroviral oncogenes in neuroretinal cells. *Oncogene Res.*3:127-36.
- Miyata, M., Biro, S., Kaieda, H., Eto, H., Orihara, K., Kihara, T., Obata, H., Matsushita, N., Matsuyama, T. und Tei, C.** (2001): Apolipoprotein J/clusterin is induced in vascular smooth muscle cells after vascular injury. *Circulation.* 104 (12): 1407-1412.
- Moazed, T.C., Campbell, L.A., Rosenfeld, M.E., Grayston, J.T. und Kuo, C.C.** (1999): Chlamydia pneumoniae infection accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Infect Dis.* 180(1):238-41.
- Morrissey, C., Lakis, J., Moquin, A., Hussain, M. und Tenniswood, M.** (2001): An antigen capture assay for the measurement of serum clusterin concentrations. *J Biochem Biophys Methods.* 48:13-21.
- Murakami, M. und Kudo, I.** (2003): A new phospholipase A(2) isozymes with a potential role in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.*14: 431-436.

- Napoli, C., D'Armiento, F.P., Mancini, F.P., Postiglione, A., Witztum, J.L., Palumbo, G. und Palinski, W.** (1997): Fatty streak formation occurs in humal fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 100: 2680-2690.
- Natarajan, K., Singh, S., Burke, T.R., Grunberger, D. und Aggarwal B.B.** (1996): Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(17):9090-5.
- Navab, M., Anantharamaiah, G.M., Reddy, S.T., Van Lenten, B.J., Wagner, A.C., Hama, S., Hough, G., Bachini, E., Garber, D.W., Mishra, V.K., Palgunachari, M.N. und Fogelman, A.M.** (2005): An oral apoJ peptide renders HDL anti-inflammatory in mice and monkeys and dramatically reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25(9):1932-7.
- Navab, M., Hama-Levy, S., Van Lenten, B.J., Fonarow, G.C., Cardinez, C.J., Castellani, L.W., Brennan, M.L., Lusis, A.J., Fogelman, A.M. und La Du, B.N.** (1997): Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *J Clin Invest.* 99(8):2005-19.
- Niculescu, F., Rus, H.G. und Vlaicu, R.** (1987): Activation of the human terminal complement pathway in atherosclerosis. *Clin Immunol Immunopathol.* 45(2):147-55.
- Nuutinen, T., Suuronen, T., Kyrölenko, S., Huuskonen, J. und Salminen, A.** (2005): Induction of clusterin/apoJ expression by histone deacetylase inhibitors in neural cells. *Neurochem Int.* 47(8):528-38.
- Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T. und Seya, T.** (2003): TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol.* 4 (2), 161-16.
- Palmer, D.J. und Christie, D.L.** (1990): The primary structure of glycoprotein III from bovine adrenal medullary chromaffin granules. Sequence similarity with human serum protein-40,40 and rat Sertoli cell glycoprotein. *J Biol Chem.* 265: 6617-23.
- Pasinetti, G.M., Johnson, S.A., Oda, T., Rozovsky, I. und 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.
- Pasterkamp, G., Schoeveld, A.H. Hijen, D.J., de Kleijn, D.P., Teepen, H., van der Wal, A.C. und Borst, C.** (2000): Atherosclerotic arterial remodelling and the localization of macrophages and matrix metalloproteases 1,2, and 9 in the human coronary artery. *Atherosclerosis.* 150: 245-253.
- Poon, S., Easterbook-Smith, S., Rybchyn, M., Caver, J. und Wilson, M.** (2000): Clusterin is an ATP-independent chaperone with very broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in folding-competent state. *Biochem.* 39:1593-15960.
- Poon, S., Treweek, T., Wilson, M., Easterbrook-Smith, S. und Carver, J.** (2002): Clusterin is an extracellular chaperon that specifically interacts with slowly aggregating proteins on their off-folding pathway. *FEBS letters.* 513: 259-266.
- Rassu, M., Cazzavillan, S., Scagnelli, M., Peron, A., Bevilacqua, P.A., Facco, M., Bertoloni, G., Lauro, F.M., Zambello, R. und Bonoldi, E.** (2001): Demonstration of Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic arteries from various vascular regions. *Atherosclerosis.* 158(1):73-9.
- Reddy, K.B., Jin, G., Karode, M.C., Harmony, J.A. und Howe, P.H.** (1996): Transforming growth factor β (TGF- β)-induced nuclear localization of apolipoprotein J/clusterin in epithelial cells. *Biochemistry.* 35: 6157-6163.
- Redondo, M., Villar, E., Torres-Munoz, J., Tellez, T., Morell, M. und Petito, C.K.** (2000): Overexpression of clusterin in human breast carcinoma. *Am J Pathol.* 157 (2): 393-399.
- Rosenberg, M.E. und Silkensen, J.** (1995): Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations. *Int J Biochem Cell Biol.* 27 (7): 633-645.

- Santilli, G., Aronow, B.J. und Sala, A.** (2003): Essential requirement of apolipoprotein J (clusterin) remodelling for IkappaB expression and regulation of NF-kappaB activity. *J Biol Chem.* 278 (40): 38214-38219.
- Saura, J., Petegnief, V., Wu, X., Liang, Y. und Paul, S.M.** (2003): Microglial apolipoprotein E and astroglial apolipoprotein J expression in vitro: opposite effects of lipopolysaccharide *J Neurochem.* 85(6):1455-67.
- Schaefer, T.M., Desouza, K., Fahey, J.V., Beagley, K.W. und 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.
- Schwertfeger, D.K., Witte, D.P., Stuart, W.D., Rockmann, H.A. und Harmony, J.A.** (1996): Apolipoprotein J/ Clusterin induction in myocarditis: A localized response gene to myocardial injury. *Am J Pathol.* 148(6):1971-83.
- Schwochau, G.B., Nath, K.A. und Rosenberg, M.E.** (1998): Clusterin protects against oxidative stress in vitro through aggregative and nonaggregative properties", *Kidney Int.* 53 (6): 1647-1653.
- Seifert, P.S., Hugo, F., Hansson, G.K., Bhakdi, S.** (1989): Prelesional complement activation in experimental atherosclerosis. Terminal C5b-9 complement deposition coincides with cholesterol accumulation in the aortic intima of hypercholesterolemic rabbits *Lab Invest.* 60(6):747-54.
- Seifert, P.S., Hugo, F., Trantum-Jensen, J., Zahringer, U., Muhly, M. und Bhakdi, S.** (1990): Isolation and characterization of a complement-activating lipid extracted from human atherosclerotic lesions. *J Exp Med.* 172: 547-57.
- Sen, G.C. und Sakar, S.N.** (2005): Transcriptional signalling by double-stranded RNA: role of TLR3. *Cytokine und Groth Factor reviews* 16: 1-14
- Sensibar, J.A., Sutkowski, D.M., Raffo, A., Buttyan, R., Griswold, M.D., Sylvester, S.R., Kozlowski, J.M., 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.
- Sharma, S., tenOever, B.R., Grandvaux, N., Zhou, G.P., Lin, R. und Hiscott, J.** (2003): Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science.* 300 (5622): 1148-1151.
- Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K. und Kimoto, M.** (1999): MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med.* 189(11):1777-82.
- Simionescu, N., Vasile, E., Lupu, F., Popescu, G. und Simionescu, M.** (1986): Prelesional modifications of vessel wall in hyperlipidemic atherogenesis. Accumulation of extracellular cholesterol-rich liposomes in the arterial intima and cardiac vessels of the hyperlipidemic rabbit. *Am J Pathol.* 123: 109-125.
- Sintich, S.M., Steinberg, J., Kozlowski, J.M., Lee, C., Pruden, S., Sayeed, S. und 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.
- Sivamurthy, N., Stone, D.H., Logerfo, F.W. und Quist, W.C.** (2001): Apolipoprotein J inhibits the migration, adhesion, and proliferation of vascular smooth muscle cells. *J Vasc Surg.* 34(4):716-23.
- Slack, J.L., Schooley, K., Bonnert, T.P., Mitcham, J.L., Qwarnstrom, E.E., Sims, J.E. und Dower, S.K.** (2000): Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signalling pathways *J Biol Chem.* 18;275(7):4670-8.
- Smith, J.D., Trogan, E., Ginsberg, M., Grigaux, C., Tian, J. und Miyata, M.** (1995): Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(18):8264-8.

- Stary, H.C.** (1987): Macrophages, macrophage foam cells, and eccentric intimal thickening in the coronary arteries of young children. *Atherosclerosis*. 64:91-108.
- Statistisches Bundesamt** (2005): Herzkreislauferkrankung wieder häufigste Todesursache. Pressemitteilung vom 2. November
- Steinberg, D.** (1981): Underlying mechanisms in atherosclerosis. *Pathol.* 133:75-78.
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C. und Witztum, J.L.** (1989): Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increases its atherogenicity. *N Engl J Med*. 320: 915-924.
- Steinberg, J., Oyasu, R., Lang, S., Sintich, S., Rademaker, A., Lee, C., Kozlowski, J.M. und Sensibar, J.A.** (1997): Intracellular levels of SGP-2 (Clusterin) correlate with tumor grade in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 3 (10): 1707-1711.
- Stone, J., Rozovsky, I., Morgan, T.E., Anderson, C.P. und Finch, C.E.** (1998): Increased Synaptic Sprouting in response to Estrogen via an Apolipoprotein E-Dependent Mechanism: Implications for Alzheimer's Disease. *J Neurosci*. 18(9):3180-3185.
- Suriyaphol, P., Fenske, D., Zahringer, U., Han, S.R., Bhakdi, S. und Husmann M.** (2002): Enzymatically modified nonoxidized low-density lipoprotein induces interleukin-8 in human endothelial cells: role of free fatty acids. *Circulation*. 106:2581-7.
- Sylvester, S., Skinner, M. und Griswold, M.** (1984): A sulfated glycoprotein synthesised by Sertoli cells and by Epididyma cells is a component of the sperm membrane. *Biol Reprod*. 31: 1087-1101.
- 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. und 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.
- Takeda, K. und Akira, S.** (2005): Toll-like in innate immunity. *Int Immunology*. 17(1):1-14.
- Thomas-Salgar, S., Millis, A.J.** (1994): Clusterin expression in differentiating smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 269(27):17879-85.
- Torzewski, M., Klouche, M., Hock, J., Messner, M., Dorweiler, B., Torzewski, J., Gabbert HE. und Bhakdi S.** (1998): Immunohistochemical demonstration of enzymatically modified human LDL and its colocalization with the terminal complement complex in the early atherosclerotic lesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 18(3):369-78.
- 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. und 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
- Trougakos, I.P. und Gonos, E.S.** (2002): Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 34(11):1430-48.
- Trougakos, I.P., So, A., Jansen, B., Gleave, M.E. und 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.
- Urban, J., Parczyk, K., Leutz, A., Kayne, M. und Kondor-Koch, C.** (1987): Constitutive apical secretion of an 80 kD sulfated glycoprotein complex in the polarized epithelial cell, MDCK. *J. Cell Biol*. Vol.105: 2735-2743.
- Väkevä, A., Laurila, P. und Meri, S.** (1993): Co-deposition of clusterin with the complement membrane attack complex in myocardial infarction. *Immunology*. 80 (2): 177-182.

- Viard, I., Wehrli, P., Jornot, L., Bullani, R., Vechietti, J.L., Schifferli, J.A., Tschopp, J. und 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.
- Vink, A., de Kleijn, D.P. und Pasterkamp, G.** (2004): Functional role for toll-like receptors in atherosclerosis and arterial remodeling. *Curr Opin Lipidol*. 15(5):515-21.
- Voeth, D. und Voeth, J.** (2004): *Biochemistry*, Wiley Verlag, USA
- Willnow, T.E., Nykjaer, A. und Herz, J.** (1999): Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nat Cell Biol* Vol.1
- Wilson, M. und Easterbook-Smith, S. B.** (2000): Clusterin is a secreted mammalian chaperone. *TIBS* 25 Bailey r. und Griswold M. (1999). *Molecular and Cellular Endocrinology*. 151 17-23.
- Wilson, M.R., Easterbrook-Smith, S.B., Taillefer, D., Lakins, J. und Tenniswood M.P.R.** (1995): Clusterin: Role in Vertebrate Development, Function and Adaption (Harmony, JAK) RG Landes Company Biomedical Publishers, Austin, TX
- Witte, D.P., Aronow, B.J., Stauderman, M.L., Stuart, W.D., Clay, M.A., Gruppo, R.A., Jenkins, S.H. und Harmony, J.A.** (1993): Platelet activation releases megakaryocyte-synthesized apolipoprotein J, a highly abundant protein in atheromatous lesions. *Am J Pathol*. 143(3):763-73.
- Witte, D.P., Aronow, B.J., Stauderman, M.L., Stuart, W.D., Clay, M.A., Gruppo, R.A., Jenkins, S.H., und Harmony, J.A.** (1993): Platelet activation releases megakaryocyte-synthesized apolipoprotein J, a highly abundant protein in atheromatous lesions. *Am J Pathol*. 143(3):763-73.
- Xie, M.J., Motoo, Y., Su, S.B., Mouri, H., Ohtsubo, K., Matsubara, F. und Sawabu, N.** (2002): Expression of clusterin in human pancreatic cancer. *Pancreas*. 25 (3): 234-238.
- Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K. und Akira, S.** (2002): 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.
- Zhang, H., Kim, J.K., Edwards, C.A., Xu, Z., Taichman, R. und Wang, C.Y.** (2005): Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax. *Nat Cell Biol*. 7(9):909-15.
- Zhou, W., Janulis, L., Park, I.I. und Lee, C.** (2002): A novel anti-proliferative property of clusterin in prostate cancer cells. *Life Sci*. 72(1):11-21.

6. Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Aktivierendes Protein-1
ABC 1	ATP-bindungs-Cassette
AGE	advanced glycosylation endproduct
APO	Apolipoprotein
ASK-1	apoptosis signal-regulating kinase 1
A β	β -Amyloid-Peptid
BAX	Bcl-2-assoziiertes Protein x
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumine
CAPE	Caffeic acid phenethyl ester
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA
CRP	C-reaktives protein
D'MEM	Dulbecos's MEM
DAPI	4,6 Diamidino-2-phenylindol
dd H ₂ O	Millipore –reinst – Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleotid -5'- trisphosphate
dsRNA	Doppelsträngige RNA
DTT	Dithioerythrol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELAM	Endotheliales Leukozyten Adhäsionsmolekül
E-LDL	Enzymatisch verdautes LDL
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälber Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Gp	Glycoprotein
GTC	Guanidinthiocyanat
HDL	high density Lipoprotein
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase
Huvec	human umbilical vein endothelial cells
HRP	horseradish peroxidase
IL	Interleukin

INF	Interferon
IRF	interferon regulating factor
ISRE-	interferon signaling responding elements
JAK	Januskinasen
LDL	low density Lipoprotein
LPDS	Lipid defizientes Serum
LPS	Lipopolysaccharid
LRP	LDL Receptor Related Protein
LRR	leucin-rich repeat
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP-1	Macrophage chemotactive protein-1
M-CSF	Macrophage costimulating factor-1
MDCK	Madine Darby Canine Kidney
MEM	Minimal Essential Medium
MMP	Matrix -Metalloproteinase
MOPS	3-(N-Morpholino-)-propansulfonsäure
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger RNA
MyD88	myeloid differentiation factor 88
NF-kb	nuclear factor kb
NEA	non essential aminoacids
NHS	Normal human Serum
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PCI	Phenol Chloroform Isoamylalkohol
PCR	Polymerase - Ketten - Reaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly (I:C)	Poly (Inosin:Cytidin), dopplsträngige RNA
Rat1	Embryonale Fibroblasten aus der Fischer - Ratte
RIP	receptor interacting protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNaseA	Ribonuklease A
ROS	Reaktive Sauerstoffverbindungen
SDS	Sodiumdodecyl Sulfate
sPLA ₂	sekretorische Phospholipase A2
SR	Scavenger Rezeptor

SREBP	sterol regulatory element binding protein
SSC	Standard - Salz - Citrat
STATs	signal transducers and activators of transcription
TANK	TRAF-family member –associated NF-κ b-activator
TBE	Tris - Borat - EDTA
TBK1	TANK-binding-kinase 1
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor Domäne
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	tumor nekrosis factor
TRAF	TNFR-associated factor
TRIF	TIR domain-containig adapter inducing interferon
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VBS	Veronal Puffer
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VLDL	very low density lipoprotein
VSIG	viral stress-inducible genes
VSMC	vascular smooth muscle Cells
ΔFKS	dekomplementiertes Fötales Kälber Serum