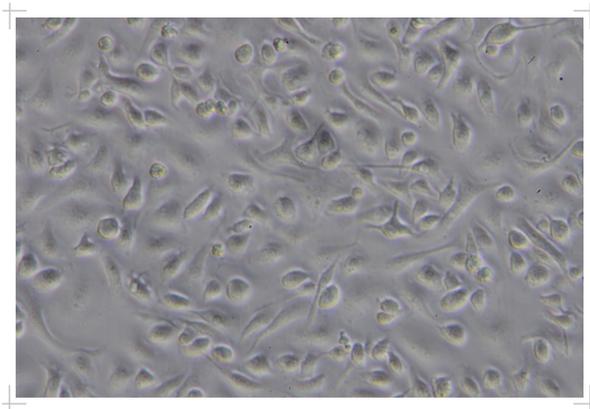


JONAS BEHNKE

Extrazelluläre Ribonukleinsäure als Induktor der
TACE-Aktivierung und TNF- α Freisetzung von
Makrophagen



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2017

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

***Extrazelluläre Ribonukleinsäure als Induktor der
TACE-Aktivierung und TNF- α Freisetzung von
Makrophagen***

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Jonas Behnke

aus Achim

Gießen 2016

Aus dem Biochemischen Institut
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. Lienhard Schmitz

Gutachter: Prof. Dr. Klaus T. Preissner
Gutachter: Prof. Dr. H. Hackstein

Tag der Disputation: 29.05.2017

Für meine Eltern



Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Makrophagen und deren Aktivierung bei Entzündungsreaktionen.....	1
1.1.1 Makrophagen als Komponenten des angeborenen Immunsystems des Menschen.....	1
1.1.2 Erkennung pathogener Alarmsignale via Toll-like-Rezeptoren und Aktivierung des NF- κ B-Signalweges.....	2
1.1.3 NF- κ B-abhängige Expression und Synthese von Zytokinen.....	4
1.2 Das extrazelluläre endogene Ribonukleinsäuresystem und seine Rolle bei Entzündungsreaktionen.....	5
1.2.1 Aufbau und Funktionen endogener Ribonukleinsäuren.....	5
1.2.2 Endogene, extrazelluläre Ribonukleinsäuren.....	5
1.2.2.1 Extrazelluläre RNA bei Tumorerkrankungen.....	6
1.2.2.2 Extrazelluläre RNA und Permeabilität.....	6
1.2.2.3 Extrazelluläre RNA und ihr Einfluss auf Transmigration und Zelldifferenzierung.....	7
1.2.2.4 Extrazelluläre RNA und die Rolle ihres Gegenspielers RNase1 in der Hämostase.....	7
1.2.2.5 Extrazelluläre RNA und Gerinnungsaktivierung.....	8
1.2.2.6 Extrazelluläre RNA als Initiator einer Immunantwort.....	8
1.3 Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α).....	9
1.3.1 TNF- α und seine Signalwege.....	9
1.3.2 Das TNF- α -konvertierende Enzym TACE (TNF- α -converting-enzyme)...	12
2. Zielsetzung der Arbeit	15
3. Material und Methoden	16
3.1 Material.....	16
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	16
3.1.2 Geräte und sonstige Materialien.....	18
3.1.3 Verwendete Kits und ELISA.....	20
3.1.4 Antikörper.....	20
3.1.5 Puffer und Zellkulturmedien.....	21
3.2 Zellkultur.....	23
3.2.1 Isolation und Kultur von Maus-Makrophagen.....	23
3.2.2 Kultur von THP-1 Monozyten.....	26
3.2.3 Differenzierung der THP-1 Zellen.....	26
3.2.4 Stimulation der Zellen.....	27

3.2.5 Kultur von NIH-Fibroblasten.....	27
3.2.6 Kryokonservierung von Zellen.....	27
3.2.7 Auftauen der Zellen.....	28
3.2.8 Bestimmung der Zellzahl.....	28
3.2.9 Zytotoxizitätstest.....	28
3.3 Molekularbiologische Methoden.....	29
3.3.1 RNA-Isolation aus Zelllysate.....	29
3.3.2 Charakterisierung der eRNA.....	29
3.3.3 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration.....	31
3.3.4 cDNA-Synthese aus RNA.....	31
3.3.5 Semi-Quantitative Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	32
3.3.6 Agarose-Gelelektrophorese der DNA.....	34
3.3.7 Agarose-Gelelektrophorese der RNA.....	34
3.3.8 Quantitative Real-time PCR.....	35
3.4 Proteinbiochemische Methoden.....	36
3.4.1 Aufbereitung des Zellüberstandes.....	36
3.4.2 Proteinbestimmung des Zellüberstandes.....	36
3.4.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	37
3.4.4 Endotoxin-Nachweis.....	39
3.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	39
3.4.6 Western-Blot-Analyse.....	40
3.5 Statistische Analyse.....	41
4. Ergebnisse.....	42
4.1 Extrazelluläre Ribonukleinsäure-induzierte Tumor-Nekrose-Faktor- α Freisetzung in Makrophagen.....	42
4.1.1 Analyse der extrazellulären RNA.....	42
4.1.2 RNA-induzierte TNF- α Freisetzung und mRNA-Expression in Makrophagen.....	44
4.1.3 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der eRNA-induzierten TNF- α Freisetzung und mRNA-Expression.....	45
4.1.4 ADAM17- und ADAM10-abhängige TNF- α Freisetzung.....	49
4.1.5 Sekundäre Effekte als Folge der TNF- α Freisetzung.....	50
4.2 Analyse der durch eRNA aktivierten Signaltransduktionswege in Makrophagen...51	51
4.2.1 Expression inflammatorischer Zytokine und Aktivierung der Caspase-1..51	51
4.2.2 Inhibition von Signaltransduktionswegen.....	52
4.2.3 Rolle des Proteins MyD88 in der eRNA induzierten TNF- α Freisetzung..55	55

4.2.4 Rolle von Toll-like-Rezeptoren bei der TNF- α Freisetzung von Makrophagen.....	55
5. Diskussion.....	58
5.1 Körper eigene RNA als Danger-associated molecular pattern (DAMP).....	58
5.2 TNF- α als schnelle, humorale Immunantwort	61
5.3 Regulation der TNF- α Freisetzung.....	63
5.4 Die Rolle von Toll-like-Rezeptoren in der Erkennung endogener Ribonukleinsäuren.....	65
5.5 Ausblick.....	67
6. Zusammenfassung.....	68
7. Abkürzungsverzeichnis.....	70
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	75
9. Literaturverzeichnis.....	77
10. Anhang.....	94
11. Publikationsverzeichnis.....	94
12. Ehrenwörtliche Erklärung.....	95
13. Danksagung.....	96

1. Einleitung

1.1 Makrophagen und deren Aktivierung bei Entzündungsreaktionen

1.1.1 Makrophagen als Komponenten des angeborenen Immunsystems des Menschen

Makrophagen sind zur Phagozytose befähigte Zellen des Immunsystems (Karrer 1960). Sie entwickeln sich aus ihren Vorläuferzellen, den Monozyten (Sutton und Weiss 1966). Monozyten stammen, wie alle Blutzellen, aus einer multipotenten hämatopoetischen Stammzelle des Knochenmarks ab. Aus myeloischen Progenitorzellen entwickeln sich unreife Myeloblasten, die wiederum zu Monozyten differenzieren und etwa einen Tag im Blut zirkulieren (Kaboth et al. 1977; Geissmann et al. 2010). Die Monozytopoese steht vor allem unter dem Einfluss des sogenannten *macrophage-colony-stimulating-factor*, dem M-CSF (Metcalf 1985).

Monozyten sind mit einem Durchmesser von etwa 20 µm die größten Leukozyten des menschlichen Körpers. Sie sind in der Lage das Gefäßsystem zu verlassen und in unterschiedliche Gewebe zu wandern. Dort können sie zu Gewebemakrophagen reifen und oft monatelang überleben (Sutton und Weiss 1966).

Makrophagen sind in der Lage körperfremde Merkmale, sogenannte *PAMP* (*pathogen-associated molecular pattern*), zu erkennen (Punkt 1.1.2), durch Phagozytose zu eliminieren oder auch andere Immunzellen durch Freisetzung von Zytokinen (Punkt 1.1.3) zu aktivieren (Mackaness 1960; Sawyer et al. 1954). Des Weiteren gehören Makrophagen neben dendritischen Zellen und B-Lymphozyten zu den antigenpräsentierenden Zellen. Endogen aufgenommene Antigene können auf ihrer Zelloberfläche auf MHC-II-Molekülen (*major histocompatibility complex*) anderen CD4⁺-T-Zellen dargeboten werden (Roche und Furuta 2015). Dieser Zusammenhang zeigt auch die enge Verknüpfung dieser Zellen mit der adaptiven Immunabwehr. Vice versa können Makrophagen beispielsweise durch T-Helfer-Zellen des Immunsystems aktiviert werden. Bei diesen Aktivierungsprozessen spielt unter anderem die Freisetzung des Zytokins Interferon-γ eine große Rolle (Nathan et al. 1983; Schultz 1987).

1.1.2 Erkennung pathogener Alarmsignale via Toll-like-Rezeptoren und Aktivierung des NF- κ B-Signalweges

Neben Mannose- und *Scavenger*-Rezeptoren, sowie NOD1- und RIG-like-Rezeptoren, sind vornehmlich Toll-like-Rezeptoren (TLR) an der Erkennung pathogener Strukturen (PAMPs) beteiligt (Srikrishna und Freeze 2009). Die Toll-like-Rezeptorfamilie umfasst sowohl extrazelluläre Rezeptoren (TLR-1,2,4,5,6,10), als auch endosomal lokalisierte Rezeptoren (TLR-3,7,8,9) (Verstak et al. 2007). Sie alle tragen mit ihrer unterschiedlichen Ligandenspezifität zur Immunantwort bei. Zur Gruppe der PAMP gehören virale oder bakterielle Bestandteile wie unmethylierte CpG-DNA, doppelsträngige RNA, Lipopolysaccharide, Peptidoglykane, Lipoteichonsäuren oder Flagellin (Alexopoulou et al. 2001; Gewirtz et al. 2001; Hemmi et al. 2000; Chow et al. 1999, Schwandner et al. 1999). Einige Toll-like-Rezeptoren erkennen auch sogenannte *danger-associated molecular pattern* (DAMP). Es handelt sich dabei um körpereigene Liganden, die in Stresssituationen in ähnlicher Weise das Immunsystem aktivieren können. Zu dieser Gruppe gehören endogene Bestandteile wie RNA, Fibrinogen, Fibronectin oder Hitzeschockproteine (Bernard et al. 2012; Brentano et al. 2005b; Vabulas et al. 2002; Smiley et al. 2001; Okamura et al. 2001; Ohashi et al. 2000).

Die Aktivierung aller Toll-like-Rezeptoren mit Ausnahme von TLR-3 mündet in einem *myeloid-differentiation factor 88* (MyD88)-abhängigen Signaltransduktionsweg mit anschließender Genexpression durch den nukleären Transkriptionsfaktor NF- κ B. Über TLR-3 und partiell auch über TLR-4 ist es möglich, einen TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*)-abhängigen Signalweg zu aktivieren (Yamamoto et al. 2003). Dieser Signalweg ist unabhängig von MyD88, kann aber ebenfalls über den Transkriptionsfaktor NF- κ B laufen (Yamamoto et al. 2002). MyD88 und TRIF gehören zu einer Gruppe von fünf Adaptermolekülen (*TIR-containing-proteins*), die an die TIR-Domänen des zytoplasmatischen Schwanzes der Toll-like-Rezeptoren binden können (Verstak et al. 2007). Auch Lipopolysaccharide (LPS) gram-negativer Bakterien können über Toll-like-Rezeptoren TLR-2 und -4 das Adaptermolekül MyD88 aktivieren. Die Deletion von MyD88 im Mausmodell zeigte den Verlust der LPS-induzierten Effekte, wie beispielsweise die Produktion proinflammatorischer Zytokine bei Makrophagen (Kawai et al. 1999).

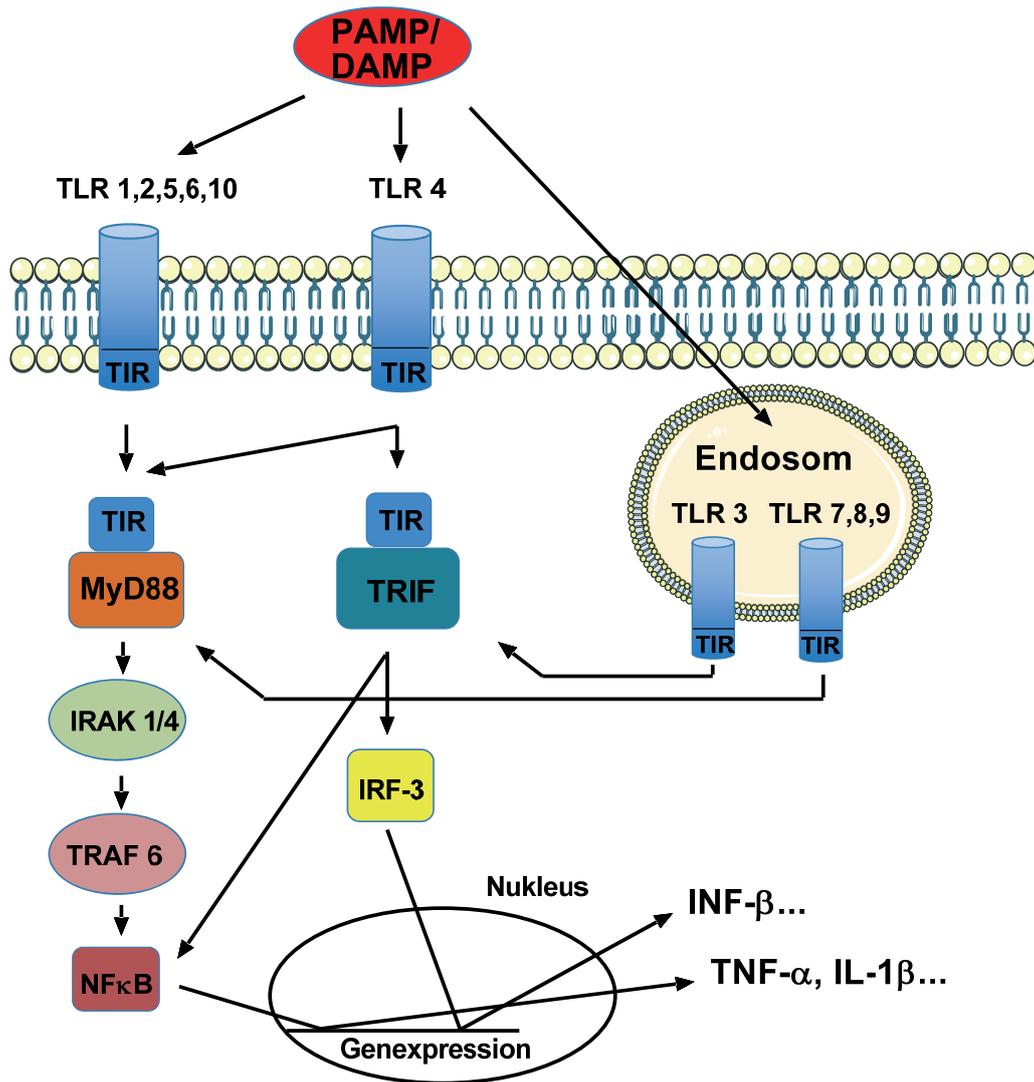


Abb. 1: Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren

Die Bindung der TIR-Domänen von TLR 1,2,5,6,7,8,9,10 an die TIR-Domäne von MyD88 führt über Aktivierung der IL-1R-assoziierten-Proteinkinasen 1 und 4 (IRAKs) und den TNFR-assoziierten Faktor 6 (TRAF6) zur inflammatorischen Genexpression via NF-κB. Im Gegensatz dazu kann der TRIF-abhängige Signalweg über den Transkriptionsfaktor IFN-regulierenden Faktor 3 (IRF-3) die Expression IFN-abhängiger Gene regulieren.

Neben Toll-like-Rezeptoren kann auch der Rezeptor Sialoadhesin (Siglec-1) über die Erkennung von Sialinsäuren Makrophagen aktivieren (Klaas et al. 2012; Hartnell et al. 2001). Polysialinsäure (*polysialic-acid*, PSA), ein negativ geladenes Kohlenhydratpolymer aus 5-N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), besitzt wegen seiner Ladungseigenschaften Ähnlichkeit zu RNA. Polysialinsäure ist jedoch nicht nur Bestandteil humaner Zelloberflächen, auch Bakterien wie *Escherichia coli* und *Neisseria meningitidis* können diese Oberflächenmoleküle produzieren (Lifely et al. 1986). Ihre Verwendung als weitere Positivkontrolle in dieser Arbeit ist daher unter dem Aspekt der Diversität ihres Aufbaus und möglicher Kontamination mit verschiedenen bakteriellen Endotoxinen zu werten.

1.1.3 NF- κ B-abhängige Expression und Synthese von Zytokinen

Die NF- κ B-induzierte Expression und Freisetzung inflammatorischer Zytokine, wie Interleukin 1 und 6 (IL-1, IL-6) oder TNF- α (Punkt 1.3) bewirken die Synthese von Akut-Phase-Proteine der Leber, die Differenzierung und Mobilisierung anderer Immunzellen aus dem Knochenmark und Endothel, die Erhöhung der Körpertemperatur im Hypothalamus und die Erhöhung des Stoffwechselumsatzes (Cozzolino et al. 1989; Castell et al. 1989). Anfänglich auch als endogenes Pyrogen bezeichnet, ist Interleukin 1 wesentlich an der Änderung des Temperatursollwertes im Hypothalamus und bei der Entstehung von Fieber beteiligt (LeMay et al. 1990). Es vermittelt seine Wirkung über die membrangebundene Form IL-1 α und die lösliche Form IL-1 β (Kilian et al. 1986; March et al. 1985). Die zytosolische Caspase-1 (IL-1 konvertierendes Enzym) schneidet dabei aus einer über NF- κ B vermittelten, exprimierten Proform pro-IL-1 β das aktive lösliche Peptid IL-1 β heraus (Howard et al. 1991; Kostura et al. 1989). Die dafür nötige proteolytische Aktivierung der Caspase-1 wird durch das sogenannte Inflammasom vermittelt. Es besteht neben Caspase-1 aus Mitgliedern der NLR-Familie und dem Adapterprotein ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*). Erst die zusätzliche Aktivierung dieses Proteinkomplexes kann die Freisetzung von IL-1 β bewirken (Denes et al. 2012). Somit ist für die IL-1 β Freisetzung auch der MyD88-abhängige NF- κ B-Signalweg von Bedeutung, während die Freisetzung von dem Caspase-1 abhängigen Interleukin 18 unabhängig von MyD88 erfolgt (Seki et al. 2001). Die oben beschriebene Wirkung von IL-1 β erfolgt dann vornehmlich durch Bindung an den Interleukin 1 Rezeptor Typ 1 (Sims et al. 1993).

Auch die Produktion von Chemokinen kann unter dem Einfluss der NF- κ B-Signalkaskade stehen (Kunsch et al. 1994; Matsushima et al. 1988; Yoshimura et al. 1987). Chemokine sind vor allem durch ihre Fähigkeit zur Initiierung von Zellmigration (Chemotaxis) bekannt. Die in dieser Arbeit erwähnten Chemokine CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CXCL8 (IL-8) sind Vertreter der CCL-Familie und der CXCL-Familie. Ihre Einordnung wird durch die Position der ersten beiden Cysteine bestimmt. Diese können entweder benachbart (CC) oder mit einer dazwischen liegenden Aminosäure (CXC) angeordnet sein (Zlotnik et al. 2006). Ihr Einfluss auf die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten und T-Lymphozyten ist unerlässlich für eine intakte Immunabwehr (Baggiolini 2001). Zusätzlich steigert Interleukin 8 die Proliferation endothelialer Zellen und hat somit einen entscheidenden Einfluss auf die Angiogenese (Li et al. 2005).

1.2 Das extrazelluläre endogene Ribonukleinsäuresystem und seine Rolle bei Entzündungsreaktionen

1.2.1 Aufbau und Funktionen endogener Ribonukleinsäuren

Polyanionische Ribonukleinsäure (RNA) ist aus einer Polynukleotidkette aufgebaut und kann einzel- oder doppelsträngig vorliegen. Diese Kette besteht aus einem Phosphatrest, dem Zucker Ribose und vier Basen (Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil). Phosphorsäure-diesterbindungen verknüpfen die an Zucker gebundenen Basen. Eine Hydroxygruppe an der 2'-Position des Riboserings macht die RNA aufgrund der Möglichkeit zur Hydrolyse instabiler als Desoxyribonukleinsäure (DNA). Einzelsträngige Nukleotidketten erhöhen die Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung dreidimensionaler Strukturen und Interaktionen mit anderen Reaktionspartnern. RNA kann durch gegenüberliegende Basenpaarungen ebenfalls einen Doppelstrang und unterschiedliche Sekundärstrukturen ausbilden.

Die vielfältigen RNA-Typen unterscheiden sich in ihrem Aufbau und ihrer Struktur und damit auch in ihren Funktionen. Bekannt ist vornehmlich ihre Rolle in der Umsetzung genetischer Informationen im Rahmen der Proteinbiosynthese. Das Enzym RNA-Polymerase II synthetisiert am DNA-Strang eine komplementäre Ribonukleinsäure. Durch posttranskriptionale Modifikationen, wie Polyadenylierung, RNA-Editing und Spleißen, entsteht aus der primären heteronukleären RNA (hnRNA) eine für die Translation gefertigte Boten-RNA (*messenger*RNA, mRNA). Diese überträgt als kodierende RNA ihre Informationen am Ribosom in eine bestimmte Peptidreihenfolge. Drei aufeinanderfolgende Nukleotide bilden dabei ein sogenanntes Codon, welches für eine spezifische Aminosäure kodiert. Dabei sind auch nicht-kodierende RNAs beteiligt. Die Transfer-RNAs (tRNA) fungieren als spezifischer Überträger der zum Codon gehörenden Aminosäure. Ribosomale RNAs (rRNA) sind am Aufbau des Ribosoms beteiligt und werden über das Sedimentationsverhalten (Maßeinheit Svedberg, S) charakterisiert. Die 60S-Untereinheit eukaryontischer Ribosomen setzt sich aus den basischen, ribosomalen Proteinen und den 5S, 5.8S und 28S rRNAs zusammen. Die 40S-Untereinheit besteht aus 18S rRNA (Montenarh und Löffler 2007). Kleinere RNAs, wie beispielsweise mikro-RNA (miRNA) oder *small-interfering* RNA (siRNA), sind vor allem an der Regulation der Translation beteiligt (Caplen et al. 2001; Lee et al. 1993).

1.2.2 Endogene, extrazelluläre Ribonukleinsäuren

Im Jahre 1948 wurde die Präsenz von Nukleinsäuren erstmals im menschlichen Plasma beschrieben (Mandel und Metais 1948). Darüber hinaus konnte gezeigt

werden, dass humane Lymphozyten unabhängig vom Zelltod extrazelluläre RNA (eRNA) freisetzen (Stroun et al. 1978). Auch neuere Arbeiten, die beispielsweise die aktive Freisetzung von RNA durch Mastzellen aufzeigen, bekräftigen die Bedeutung von endogenen RNAs im extrazellulären Milieu (Maurer 2014).

Mittlerweile konnten verschiedene Formen extrazellulärer endogener RNA, wie beispielsweise rRNA, lange nicht kodierende RNAs, miRNAs und mRNAs identifiziert werden (Zernecke und Preissner 2016). Häufig kommen sie auch als Proteinkomplexe in Form von freigesetzten Mikrovesikeln im extrazellulären Milieu vor. Die Präsenz freigesetzter eRNA kann dabei einerseits mit der Zusammensetzung intrazellulärer RNAs einer Zelle im Zusammenhang stehen, andererseits scheinen ebenso spezifische, zellabhängige RNA-Freisetzungen ein Signal zur Steuerung zellulärer Abläufe zu sein (Valadi et al. 2007). So konnte gezeigt werden, dass miRNA aus Makrophagen die Monozytendifferenzierung und deren Translokation die Induktion der Angiogenese beeinflussen kann (Ismail et al. 2013; Reich und Pisetsky 2009; Deregibus et al. 2007).

Veröffentlichungen unserer Arbeitsgruppe sehen die Bedeutung der eRNA vor allem im Kontext prokoagulatorischer und proinflammatorischer Prozesse im menschlichen Körper (Fischer und Preissner 2013; Deindl et al. 2009; Preissner 2007). Ihre Rolle als proinflammatorischer Mediator und Alarmsignal der Immunabwehr spiegelt sich dabei in verschiedenen Teilaspekten entzündlicher Prozesse wieder.

1.2.2.1 Extrazelluläre RNA bei Tumorerkrankungen

Die Präsenz von extrazellulärer mRNA bei Tumorpatienten lässt auf die biologische Aktivität extrazellulärer, endogener Nukleinsäuren schließen (Kopreski et al. 1999). Das Vorkommen in extrazellulären RNA-Lipid-Komplexen ist bei malignen Erkrankungen, wie dem Kolonkarzinom, beschrieben (Rosi et al. 1988; Wieczorek et al. 1985). Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass eRNA die Adhäsion von entarteten Kolonkarzinom- und Fibrosakromzellen an Endothelzellen steigert. Diese neoplastischen Zellen sind, ebenso wie Glioblastomzellen, in der Lage vermehrt extrazelluläre, ribosomale RNA freizusetzen. Die Behandlung von tumortragenden Mäusen mit dem RNA-abbauenden Enzym RNase1 kann dabei das Volumen und Gewicht des Tumors reduzieren (Fischer et al. 2013).

1.2.2.2 Extrazelluläre RNA und Permeabilität

Extrazelluläre RNA konnte auch als potenter Permeabilitätsfaktor endothelialer Zellen identifiziert werden (Fischer et al. 2007). Die Bindung von eRNA an Wachstumsfaktoren mit Heparin-bindender Domäne, wie beispielsweise VEGF₁₆₅

(*Vascular endothelial growth factor*), kann als Kofaktor über Aktivierung VEGF-abhängiger Signalwege zur gesteigerten Permeabilität führen. Diese über VEGF-Rezeptor 2/Neuropilin-1 vermittelte Permeabilitätssteigerung kann eine entscheidende Rolle in der Ödembildung zum Beispiel im Rahmen von ischämischen Zuständen, wie dem Apoplex, einnehmen (Fischer et al. 2009). Auch in diesem Fall konnte die Behandlung mit RNase1 die Bildung von Ödemen und Thromben im Gehirn von Ratten reduzieren (Fischer et al. 2007).

1.2.2.3 Extrazelluläre RNA und ihr Einfluss auf Transmigration und Zelldifferenzierung

In embryonalen Stammzellen erhöht eRNA die Expression proangiogenetischer Gene, wie *hypoxia-inducible factor-1 α* (HIF-1 α), VEGF₁₆₅, sowie Neuropilin1 und hat einen entscheidenden Einfluss auf die Leukozytendifferenzierung (Sharifpanah et al. 2015). Zusätzlich vermittelt eRNA die Extravasation und Transmigration von Leukozyten und Monozyten durch venöse Endothelzellen im Cremastermuskel der Maus (Fischer et al. 2012). Die durch eRNA ausgelöste Aktivierung von Monozyten und Makrophagen ist Zeichen der inflammatorischen Komponente der eRNA. Unter diesem Einfluss differenzieren Monozyten und Makrophagen eher zu einem proinflammatorischen Phänotyp M1 mit einer gesteigerten Expression inflammatorischer Zytokine, wie TNF- α oder Interleukin 6 (Cabrera-Fuentes et al. 2015). Die Beteiligung des NF- κ B-Signalweges steht dabei stets im Mittelpunkt der durch eRNA vermittelten Immunantwort (Fischer und Preissner 2013; Fischer et al. 2012).

1.2.2.4 Extrazelluläre RNA und die Rolle ihres Gegenspielers RNase1 in der Hämostase

Ergänzend konnte gezeigt werden, dass die Genexpression und Aktivität von RNase1 durch den Einfluss proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α und IL-1 β , in Endothelzellen reduziert wird (Gansler et al. 2014). RNase1 ist als Enzym des exokrinen Pankreas nicht nur im Verdauungstrakt aktiv, sondern auch in vielen anderen Geweben und im Blut nachweisbar (Futami et al. 1997). Endothelzellen produzieren, sezernieren und speichern RNase1 in den Weibel-Palade-Körperchen. Diese können nach Aktivierung durch verschiedene inflammatorische Stimuli, wie eRNA, die Konzentration von RNase1 im Blut erhöhen (Fischer et al. 2011). Auch eine organferne, ischämische Präkonditionierung (*remote ischemic preconditioning*) des Herzens kann die Plasmakonzentrationen freier RNA und TNF- α durch Freisetzung von RNase1 aus dem Endothel verringern (Cabrera-Fuentes et al. 2015). In atherosklerotisch verändertem Endothel konnte RNase1 im Mausmodell die

Plaquetformation reduzieren und den Plasmaspiegel von eRNA nach Intimaverletzung signifikant senken (Simseyilmaz et al. 2014).

1.2.2.5 Extrazelluläre RNA und Gerinnungsaktivierung

Körpereigene eRNA kann als Koaktivator an die Faktor VII-aktivierenden Protease (FSAP) binden und deren Auto-Aktivierung bewirken (Kannemeier et al. 2007). Des Weiteren ist eRNA in der Lage den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-I) durch Bindung zu stabilisieren, der dadurch die Inhibierung von FSAP im Rahmen von inflammatorischen Vorgängen in der Lunge verstärkt (Wygrecka et al. 2007). Auch die Kontaktaktivierung über die Gerinnungsfaktoren XI/XII wird durch eRNA signifikant beeinflusst (Kannemeier et al. 2007). Ebenso sind doppelsträngige Nukleinsäuren in der Lage über die negativ geladenen Phosphatgruppen an PF4 (*platelet factor 4*) zu binden und dadurch die Immunogenität des basischen Proteins zu ändern, was als Auslöser von Autoantikörpern im Rahmen der Heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT-II) interpretiert wird. Die Gabe von Heparin kann bei diesem Patientenkollektiv zu einem späteren Zeitpunkt zum Anstieg der HIT-Antikörper führen und kann als Komplexbildung zusammen mit Thrombozyten zu einer gefährlichen Thromboseneigung führen (Jaax et al. 2013).

1.2.2.6 Extrazelluläre RNA als Initiator einer Immunantwort

Im Insektenmodell lösen endogene Nukleinsäuren (vor allem rRNA und mRNA) nicht nur die Blutgerinnung aus, die Koinjektion von Bakterienbestandteilen kann nur zusammen mit RNA eine effektive Immunantwort durch Freisetzung antimikrobieller Peptide auslösen. In diesem Zusammenhang wurden auch Apolipoproteine als RNA-bindende Blutbestandteile identifiziert (Altincicek et al. 2008).

Insgesamt zeigen die oben genannten Punkte die Wirkung von eRNA als körpereigenes Alarmsignal im Kontext inflammatorischer Prozesse in Vertebraten und Invertebraten auf. Dabei scheint vor allem die Bindung und das Zusammenspiel anderer extrazellulärer Proteine und Zellbestandteile mit eRNA eine wichtige Funktion und Grundvoraussetzung ihrer Wirkung zu sein. In der Diskussion (Kapitel 5) wird auf den Aspekt der RNA-Protein-Interaktion noch genauer eingegangen.

Einen Überblick über die verschiedenen Wirkungen von eRNA in Gefäßbereichen soll Abbildung 2 geben. In der folgenden Arbeit soll der Fokus auf die durch eRNA induzierte TNF- α Freisetzung bei Makrophagen (Unterpunkt 4 in Abb. 2) gerichtet werden.

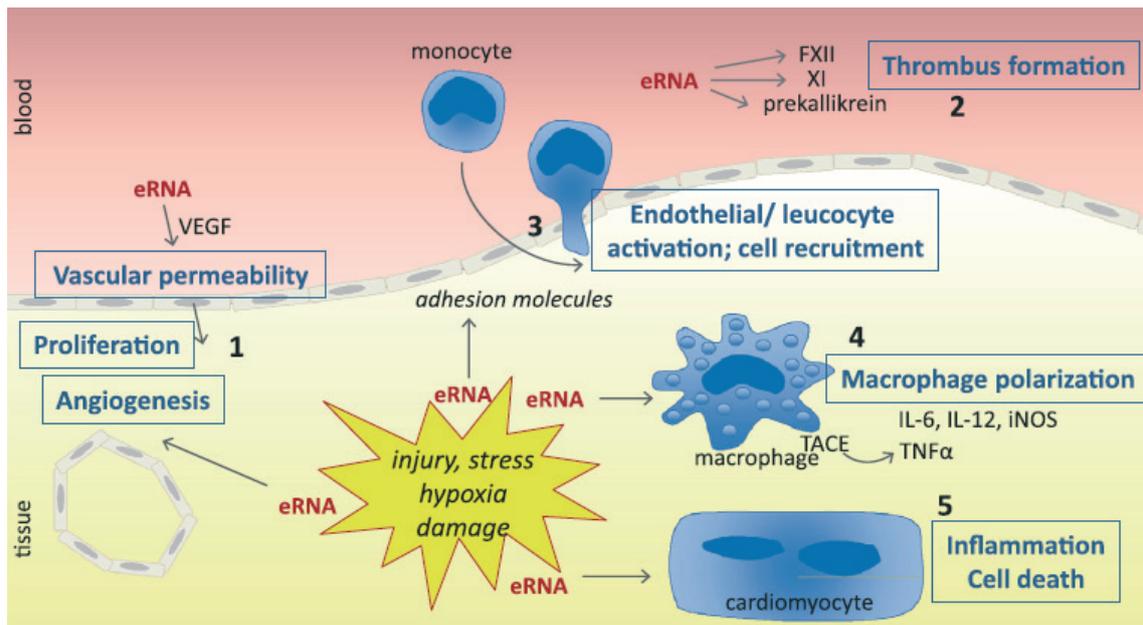


Abb. 2: Das extrazelluläre endogene RNA/RNase-System (Zernecke und Preissner 2016)

eRNA wird im Rahmen inflammatorischer Prozesse wie Hypoxie, Zellstress oder Nekrose freigesetzt und entfaltet ihre Wirkung im Gewebe oder Blut. **(1)** Dabei kann eRNA die Angiogenese und Permeabilität von Gefäßen u.a. durch Bindung an VEGF steigern. **(2)** Die Bindung an Proteine des Gerinnungssystems hat einen entscheidenden Einfluss auf die Thrombusformation von Blutplättchen. **(3)** eRNA steigert die Chemotaxis von Leukozyten. **(4)** Der Einfluss auf Makrophagen mit Freisetzung inflammatorischer Zytokine, wie TNF- α , trägt wesentlich zur Funktion der eRNA als körpereigenes Alarmsignal bei. **(5)** Auch der Zelltod von Kardiomyozyten durch Ischämie-vermittelte eRNA-Freisetzung ist beschrieben.

1.3 Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α)

1.3.1 TNF- α und seine Signalwege

Das 1975 identifizierte Zytokin Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) ist ein Zytokin des Immunsystems mit einer Vielzahl von (patho-)physiologischen Wirkungen (Carswell et al. 1975). TNF- α wird hauptsächlich von Makrophagen, aber auch von Mastzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Lymphozyten, Mikroglia und Astrozyten gebildet und freigesetzt (Tracey et al. 1989; Kriegler et al. 1988). Das membranständige, homotrimer TNF- α , bestehend aus 233 Aminosäuren, wird bei entsprechendem Stimulus durch die Metalloprotease TNF- α -konvertierendes Enzym (TACE) als homotrimeres TNF- α abgegeben (Black 2002; Tang et al. 1996; Camussi et al. 1991; Smith und Baglioni 1987). Die Schnittstelle von löslichem, 157 Aminosäuren langem TNF- α , befindet sich zwischen den Aminosäuren Alanin 76 und Valin 77 (Kriegler et al. 1988). Vor allem körperfremde, bakterielle Bestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS) können über diesen Mechanismus zu einer gesteigerten TNF- α Freisetzung führen (Sayers et al. 1987). Über die Bindung von TNF- α an TNF- α -Rezeptoren 1 und 2

(TNFR1, TNFR2) anderer Zielzellen können diese stimuliert werden. Die als Trimer aufgebauten Transmembranrezeptoren bestehen aus einer cysteinreichen, extrazellulären Domäne und einem intrazellulärem Carboxyterminus mit einer assoziierten sogenannten „Todesdomäne“ DD (*Death Domain*) (Naismith und Sprang, SR 1998; Hehlhans und Pfeffer 2005). Der TNFR1 wird konstitutiv im Gewebe exprimiert, der TNFR2 ist auf Zellen des Immunsystems lokalisiert und wird nur durch membranständiges TNF- α aktiviert oder durch „*Shedding*“ in löslicher Rezeptorform abgegeben (Wajant et al. 2003; Peschon et al. 1998; Grell et al. 1995).

Die intrazellulären Domänen der Rezeptoren können Adaptermoleküle binden und den nukleären Transkriptionsfaktor κ B aktivieren (Gaeta et al. 2000). Die Aktivierung der NF- κ B-Signalkaskade versetzt Zellen in einen „Alarmzustand“ und führt zu einer gesteigerten Expression weiterer inflammatorischer Gene (Im Verma et al. 1995). Die Beeinflussung des NF- κ B-Signaltransduktionsweges ist daher oft Ziel der Behandlung vieler Erkrankungen (Pierce et al. 1997, Mizushima et al. 2010). So zeigt die erfolgreiche Therapie von Autoimmunkrankheiten wie der rheumatoiden Arthritis oder von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mittels TNF- α -Blocker beispielhaft die Schlüsselrolle dieses Signalweges auf (Huang et al. 2011; Weaver 2004).

NF- κ B liegt als Homo- oder Heterodimer der Proteine p50, p52, p65, RelB, ν -Rel und c-Rel im Zytosol vor und wird durch seinen Inhibitor I κ -B stabilisiert (Im Verma et al. 1995; Read et al. 1994). Die Bindung von TNF- α an TNFR bewirkt die Aktivierung TNFR-assoziiierter Faktoren (TRAF) und MAP-Kinasen (*mitogen activated protein*) mit anschließender Phosphorylierung von I- κ B (Rahman und McFadden 2006; Liu 2005; Wajant et al. 2003; Traenckner et al. 1994; Beg et al. 1993). Der dadurch induzierte Abbau von I- κ B im Proteasom bewirkt die Translokation von NF- κ B in den Zellkern (Carlotti et al. 2000; Traenckner et al. 1994). Nicht nur die anti-apoptotische Programmierung von Zellen durch TNF- α , auch die Induktion der Apoptose über TNFR1 ist ein beschriebener, namensgebender Wirkmechanismus von TNF- α (Hsu et al. 1996). Bei entsprechender Stimulation über TNFR1 kann es zur Rekrutierung intrazellulärer Moleküle wie TRADD (TNFR-1-assoziiertes-DD-Protein), RIP (Rezeptor-interagierendes-Protein-1) und FADD (Fas-assoziiertes-Protein-mit-Death-Domäne) mit Aktivierung von Caspase 8 kommen, die dann wiederum die Aktivierung anderer proteolytischer Caspasen auslösen können (Sánchez et al. 1999; Varfolomeev et al. 1998; Am Chinnaiyan et al. 1995). Die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c kann ebenfalls die Caspasen 9 und 3 aktivieren und Apoptose induzieren oder verstärken (Wang 2001; Luo et al. 1998).

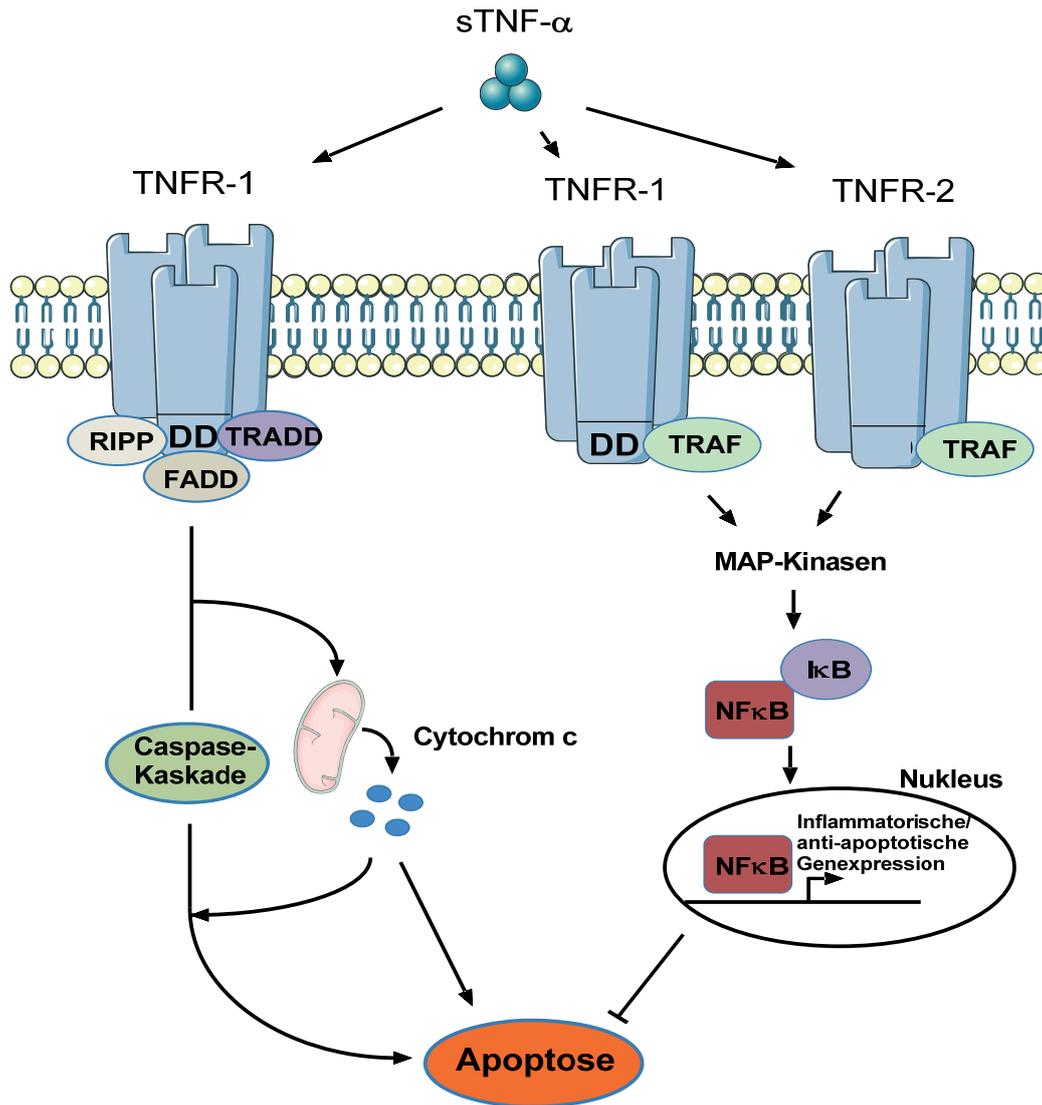


Abb. 3: TNF- α vermittelte Signaltransduktionswege via TNF- α -Rezeptor 1 und 2 (entworfen nach einer Vorlage von Rahman/Mc Fadden 2006) Löslicher Tumor-Nekrose-Faktor- α (sTNF- α) bindet an Tumor-Nekrose-Faktor- α -Rezeptoren 1 und 2. Die über TNFR-1 ausgelöste Apoptose wird durch Aktivierung der Caspase-Kaskade ausgelöst. Die Trimerisierung des Rezeptors bewirkt eine Bindung der *Death-Domain* (DD) an TRADD (TNFR-1-assoziiertes-DD-Protein), RIP (Rezeptor-interagierendes-Protein-1) und FADD (Fas-assoziiertes-Protein-mit-Death-Domäne). Auch die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c kann so Apoptose induzieren. Der NF- κ B-Signalweg führt durch Aktivierung von TRAFs (TNFR-assoziierte-Faktoren) und MAP-Kinasen zur Expression inflammatorischer und anti-apoptischer Gene. Voraussetzung für diesen Vorgang ist die Dissoziation des NF- κ B-Inhibitors I- κ B und die Translokation von NF- κ B in den Zellkern (Rahman und McFadden 2006).

1.3.2 Das TNF- α -konvertierende Enzym TACE (TNF- α -converting-enzyme)

Für die Freisetzung des Zytokins TNF- α ist die proteolytische Wirkung von Tumor-Nekrose-Faktor- α -konvertierendem Enzym TACE erforderlich. Dieses Enzym ist für das „*Shedding*“ der membrangebundenen Form des TNF- α in die lösliche, aktive, trimere Form von TNF- α verantwortlich (Black 2002). TACE gehört zur Familie der Disintegrin- und Metalloproteasen (*A Disintegrin And Metalloprotease*, ADAM) und wird auch als ADAM17 bezeichnet, dessen Name in der folgenden Arbeit für TACE verwendet wird. Von diesen zinkabhängigen Transmembranproteinen sind unterschiedliche ADAM-Proteasen mit zahlreichen Substraten bekannt. Neben ADAM17 spielt auch das strukturell verwandte ADAM10 für die TNF- α -Freisetzung eine Rolle (Moss et al. 2001). Nicht nur inflammatorische Zytokine, wie TNF- α , auch Rezeptoren, Wachstumsfaktoren und Adhäsionsproteine können durch ADAM17 proteolytisch gespalten werden (Gooz 2010). Insgesamt sind 824 Aminosäuren (AS) am Aufbau von TACE beteiligt, dessen Gen auf Chromosom 2p25 lokalisiert ist (Gooz 2010). ADAM17 ist aus einer als Inhibitor wirkenden Prodomäne aufgebaut. Es folgt eine katalytische Zinkdomäne mit der für die spezifischen Substraterkennung wichtigen Position von Valin 440 in der S1' Tasche des Enzyms (Li et al. 2009; Caescu et al. 2009). Ebenfalls extrazellulär liegt die disintegrin- und cysteinreiche Domäne von ADAM17. Der disintegrinreichen Domäne konnte die Bindung an $\alpha 5\beta 1$ -Integrin nachgewiesen werden (Bax et al. 2004). Über eine transmembranäre Domäne schließt sich der zytosolische Teil des Enzyms an (Abb. 4).

Die Genexpression von ADAM17 in unterschiedlichen menschlichen Geweben (Herz, Lunge, Gehirn usw.) und die Bandbreite an Substraten macht dieses Enzym zu einer Schlüsselkomponente in der Pathogenese vieler Erkrankungen. So spielt die Freisetzung der Liganden der Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Familie ErbB/HER, wie EGF (*epidermal growth factor*), TGF- α (*transforming growth factor alpha*) oder Amphiregulin durch ADAM17 eine wesentliche Rolle in der Kanzerogenese vieler Tumore (Duffy et al. 2009; Katakowski et al. 2009; Ali und Knaüper 2007; Franovic et al. 2006). Durch die Interaktion mit der VEGF-vermittelten Angiogenese hat ADAM17 zusätzlich einen wesentlichen Einfluss auf die Regenerationsfähigkeit von Gewebe und Organen (Fan et al. 2015; Chikaraishi et al. 2009; Chen et al. 2009; Swendeman et al. 2008). Die hohe Expression von ADAM17 in atherosklerotischen Plaques und die gesteigerte Sekretion von TNF- α von glatten Gefäßmuskelzellen unter Beteiligung kardiovaskulärer Risikofaktoren zeigt aber auch die Bedeutung dieser Protease in der Genese chronisch entzündlicher Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Reddy et al. 2009; Satoh et al. 2008; Canault et al. 2006; Togashi et al. 2002).

Bei chronisch entzündlichen neuronalen Erkrankungen, wie der Multiplen Sklerose, konnte ebenfalls die Beteiligung von ADAM17 und TNF- α nachgewiesen werden (Kieseier et al. 2003). Des Weiteren ist ADAM17, neben ADAM10, als α -Sekretase ebenfalls an der Bildung des löslichen, neuroprotektiven Amyloid-Vorläuferproteins APPs- α beteiligt (Allinson et al. 2003; Buxbaum et al. 1998).

Weitere Faktoren beeinflussen die Aktivität des Enzyms, sodass allgemeingültige Aussagen zur Wirkung von ADAM17 nicht leicht zu treffen sind. So gehört nicht nur die posttranslationale, Furin-vermittelte Entfernung der Prodomäne im trans-Golgi zu wichtigen intrazellulären Aktivierungsschritten von ADAM17. Verschiedene Studien weisen auf die Bedeutung von Phosphorylierungen der zytosolischen Domäne für die Aktivierung von ADAM17 hin, so an Threonin 735 (Soond et al. 2005) oder Serin 819 (Fan et al. 2003) durch den ERK/MAP-Kinaseweg (Yin und Yu 2009). Dabei spielt besonders die MAP-Kinase p38 eine wichtige Rolle in der TNF- α Freisetzung (Xu et al. 2012). Auch die Phosphorylierung von ADAM17 durch 3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-1 (PKC-1) in Tumorzellen ist beschrieben (Zhang et al. 2006). Schwarz et al. zeigten, dass die Phosphorylierung durch Polo-like-kinase-2 (PLK-2) an Serin 794 die Freisetzung von TNF- α und TNFR in mit LPS stimulierten Makrophagen verursacht (Schwarz et al. 2014b).

Eine Reihe intrazellulärer Bindungsproteine, wie beispielsweise TIMP3 (*human tissue inhibitor of metalloproteinase 3*), SAP97 (*synapse associated Protein 97*), MAD2 (*mitotic arrest deficient 2*) oder Protein-Tyrosin-Phosphatase 1 (PTPH1) können die Aktivität von ADAM17 ebenfalls beeinflussen (Xu et al. 2012; Peiretti et al. 2003; Nelson et al. 1999; Zheng et al. 2002). Weiterhin sind Membraneigenschaften der Zelle für die ADAM17-Aktivität von Bedeutung. So können sogar *lipid rafts*, cholesterinreiche Membranabschnitte, das „*Shedding*“ verschiedener Substrate regulieren (Tellier et al. 2006).

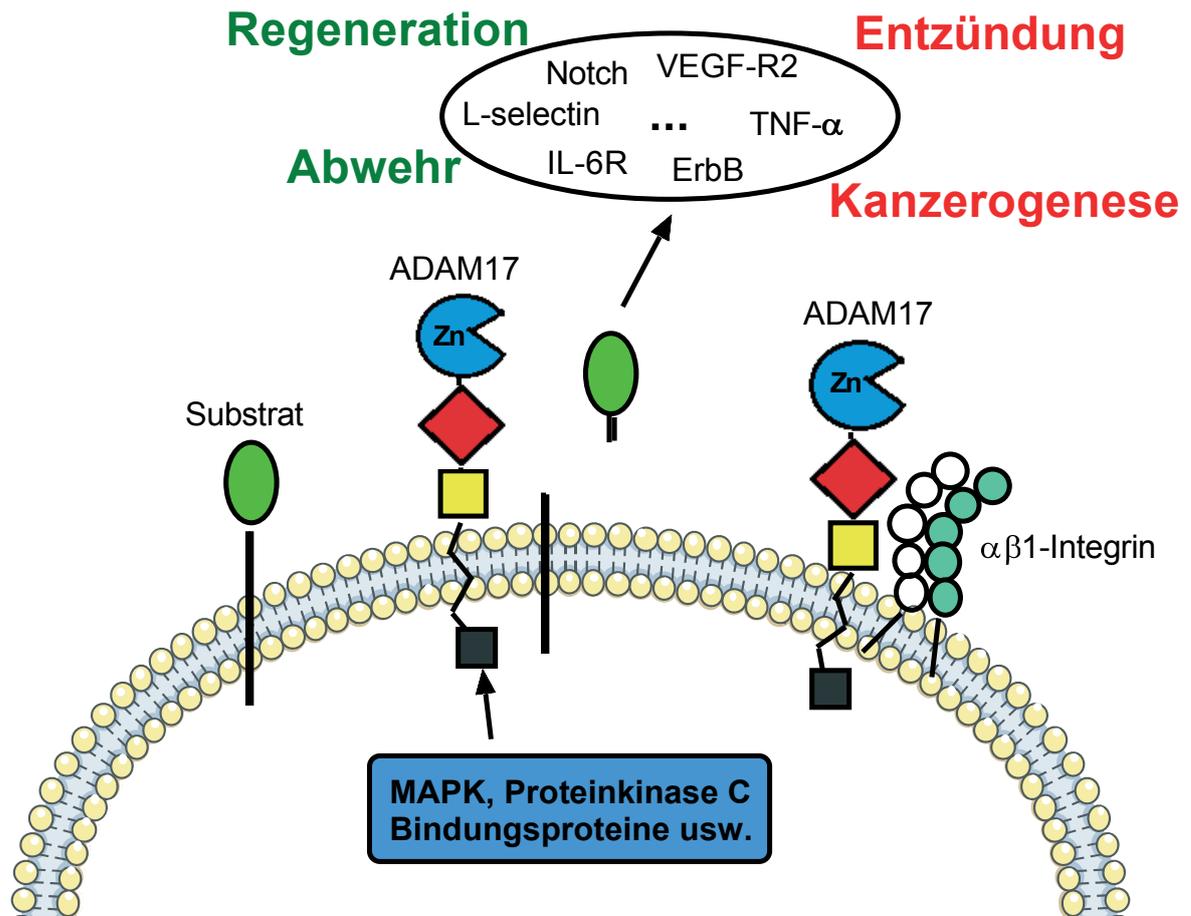


Abb. 4: Aktivierung von ADAM17 mit Freisetzung verschiedener Substrate

Mehr als 70 Substrate können durch ADAM17 freigesetzt werden. Diese Diversität zeigt die Bandbreite an Funktionen und Aufgaben des Enzyms ADAM17 in verschiedenen (patho-)physiologischen Vorgängen im menschlichen Körper auf. Das Zink- 2^+ -Ion ist fester Bestandteil der Metalloprotease. Aufbau: Signaldomäne 1-17 AS, Prodomäne 18-214 AS (beide in der Abb. nicht eingezeichnet), katalytische Domäne 215-473 AS (blau), disintegrinreiche Domäne 474-572 AS (rot), cysteinreiche Domäne 603-671 AS (gelb), Transmembrandomäne 672-694 AS und die zytosolische Domäne 695-824 AS (schwarz). Die disintegrinreiche Domäne kann mit $\beta 1$ -Integrin der Zellmembran interagieren und so die Funktion des Enzyms beeinflussen.

2. Zielsetzung der Arbeit

Bisher ist wenig über die Mechanismen der Aktivierung von Immunzellen durch extrazelluläre RNA bekannt. Diese Arbeit verfolgt das Ziel, die Wirkung von eRNA auf Makrophagen zu charakterisieren und mechanistisch zu klären. Dabei steht das durch ADAM17 freigesetzte Zytokin TNF- α im Mittelpunkt der experimentellen Untersuchungen. Es wird postuliert, dass die getriggerte Freisetzung und Expression von TNF- α dazu beiträgt, die Immunantwort der Makrophagen zu verstärken und im Kontext einer endogenen durch das DAMP eRNA ausgelösten Entzündungskaskade einzuordnen.

Folgende Teilaspekte wurden in diesem Zusammenhang experimentell untersucht:

- Die Analyse des Aufbaus und der Bestandteile der eRNA sollen Aufschluss darüber geben, unter welchen Umständen und Voraussetzungen eRNA in der Lage ist, auf Makrophagen stimulierend zu wirken.
- Die TNF- α Freisetzung und mRNA-Expression von Makrophagen soll durch Stimulation mit eRNA konzentrations- und zeitabhängig verglichen werden.
- Es soll geklärt werden, inwiefern ADAM17 für die TNF- α Freisetzung durch eRNA verantwortlich ist und welche Rolle das verwandte Enzym ADAM10 spielt.
- Es sollen Aktivierungsmechanismen und beteiligte Signalkaskaden der RNA-induzierten TNF- α Freisetzung identifiziert werden.
- Die Identifizierung von Rezeptoren und Regulatorproteinen der in diesem Versuchsansatz durch eRNA ausgelösten Immunantwort können als Ansatzpunkte dienen, die TNF- α Freisetzung und mRNA-Expression (therapeutisch) zu beeinflussen.

Die aus diesen Ansätzen zu erwartenden Ergebnisse sollen helfen, die Wirkung der eRNA auf das Immunsystem des Menschen weiter zu klären. Erkenntnisse über den Ablauf der durch eRNA ausgelösten Entzündungsreaktionen können dazu beitragen, die Rolle und Wirkung der Verwendung von RNasen als spezifische Gegenspieler von eRNA deutlich zu machen. Kenntnisse über Wechselwirkungen und Angriffspunkte des eRNA/RNase-Systems können dann auch einen Beitrag zu möglichen Interventionen bei systematischen Entzündungsreaktionen im Rahmen einer Sepsis liefern und haben daher auch translationalen Bezug zur praktischen Medizin.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Substanzen	Firma	Firmensitz
2x RNA Probenpuffer	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
Albumin (BSA)	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
Ammoniumpersulfat	Roth	Karlsruhe (D)
Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth	Karlsruhe (D)
Aqua ad iniectabilia	Braun	Melsungen (D)
Bay11-7082	Enzo	Lörrach (D)
Bromphenolblau	Roth	Karlsruhe (D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth	Karlsruhe (D)
Cellstripper®	Corning	New York (USA)
Cli-095	InvivoGen	Toulouse (FRA)
Clo75	InvivoGen	Toulouse (FRA)
DNA-Marker (GeneRuler 100bp DNA Ladder)	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth	Karlsruhe (D)
Essigsäure	Roth	Karlsruhe (D)
Ethanol	Roth	Karlsruhe (D)
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich	Taufkirchen (D)
Fetales Rinderserum (FBS)	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
GI 254023	Iris Biotech	Marktredwitz (D)
Glutamin 200mM	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
Glycerin	Roth	Karlsruhe (D)
Glycin	Roth	Karlsruhe (D)
GoTaq® Green Mastermix	Promega	Madison (USA)
GW 208264	Iris Biotech	Marktredwitz (D)
Hairpin-1, DNA-Oligo F:GGGAATGGGTATTCCCATCCC	Biomers	Ulm (D)
Hairpin-3, DNA-Oligo F:AGTCTCAGTTGCGACTGAGAC	Biomers	Ulm (D)
Isopropanol	Roth	Karlsruhe (D)
Kaliumchlorid	Roth	Karlsruhe (D)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth	Karlsruhe (D)
Linear-6, DNA-Oligo F:AAGAATACGACCACCTAGCTC	Biomers	Ulm (D)
Lipopolysaccharinsäure (LPS)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen (D)
Magermilchpulver	Sigma Aldrich	Taufkirchen (D)

Methanol	Roth	Karlsruhe (D)
N-acetyl-Cystein (NAC)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen (D)
N-acetyl-Neuraminsäure (Neu5Ac)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen (D)
Natriumchlorid	Roth	Karlsruhe (D)
Natriumdihydrogendihydrat	Roth	Karlsruhe (D)
Natriumorthovanadat	Sigma Aldrich	Taufkirchen (D)
Oligonukleotide (Primer)	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
Pam2CSK4	InvivoGen	Toulouse (FRA)
PD 98059	Calbiochem	Darmstadt (D)
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich	Taufkirchen (D)
Phorbol-12-myristat-13-acetat	Sigma Aldrich	Taufkirchen (D)
Poly(I:C)	InvivoGen	Toulouse (FRA)
Polysialinsäure (PSA)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen (D)
Protease Inhibitor Cocktail Tbl.	Roche	Grenzach-Wyhlen (D)
Proteinmarker (Prestained Protein Ladder)	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
RNase1	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
R848	InvivoGen	Toulouse (FRA)
Salzsäure 1 mol/l 1N Lösung	Roth	Karlsruhe (D)
SB 203580 1 mg	Calbiochem	Darmstadt (D)
Schwefelsäure	Roth	Karlsruhe (D)
SensiMix™ Sybr® Reagenz	Bioline GmbH	Luckenwalde (D)
Sodiumdodecylsulfat ultra rein	Roth	Karlsruhe (D)
TAPI-2 1 mg	Enzo	Lörrach (D)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth	Karlsruhe (D)
TNF-α Antagonist, sc358755	Santa Cruz	Dallas (USA)
Tris	Roth	Karlsruhe (D)
Triton-X-100	Roth	Karlsruhe (D)
Tween-20®	Roth	Karlsruhe (D)
Wasserstoffperoxid	Roth	Karlsruhe (D)
Wortmannin 1 mg	Calbiochem	Darmstadt (D)
Zellkulturmedium RPMI 1640	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
Zellkulturmedium RPMI 1640 (Phenolrot-frei)	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
Zellkulturmedium D-MEM (1x)	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
Zellkulturmedium EMEM	ATCC	Wesel (D)
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich	Taufkirchen (D)

Tab. 1: Verwendete chemische Substanzen, Reagenzien und Kulturmedien

3.1.2 Geräte und sonstige Materialien

Geräte/Materialien	Firma	Firmensitz
96-Well Platten für ELISA (MaxiSorp®)	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
96-Well Platten für qPCR (Thermo-Fast 96 PCR Detection Plate)	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
96-Well Zellkulturplatten (steril)	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
ECL Hyperfilme	GE Healthcare	Frankfurt (D)
Eismaschine	Scotsman	Vernon Hills (USA)
Elektrophoresekammern für SDS-Gele	BioRad	München (D)
Flüssigstickstoff	Linde	Pullach (D)
Flüssigstickstofftank	Messer	Bad Soden (D)
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
Gel-Dokumentationsgerät mit Software LapImage 1D 2006	Intas	Göttingen (D)
Gelelektrophoresekammer	Peqlab	Erlangen (D)
Glasgefäße	Schott	Mainz (D)
KC4 Version 3.0 Power Reporter Software	BioTek Instruments	Bad Friedrichshall (D)
Kreisschüttler (Rotamax120)	Heidolph	Schwabach (D)
Kryoröhrchen (KryoTube Vials)	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
Kühlbox für PCR-Platten	Roth	Karlsruhe (D)
Kühl- und Gefrierschränke	Bosch	Gerlingen (D)
LaminAir Sterilbank	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
Messzylinder	Vitlab GmbH	Grossostheim (D)
Mikroplattenreader (EL808i)	BioTek Instruments	Bad Friedrichshall (D)
Mikroskop Zellkultur	Hund	Wetzlar (D)
Mikrowelle	Clatronic	Kempen (D)
Multipipette	Eppendorf	Hamburg (D)
Nitril-Handschuhe (Peha-Soft)	Hartmann	Oslo (NOR)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging	Chicago (USA)
Pasteurpipetten aus Glas	VWR Collection	Darmstadt (D)
PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf	Hamburg (D)
PCR-Thermocycler (T3000)	Biometra	Göttingen (D)
Perfusorspritze	Braun	Melsungen (D)
Photometer NanoDrop2000™	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
Pipetboy	Integra Bioscience	Fernwald (D)
Pipettensatz Pipetman Classic™	Gilson	Middleton (USA)
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	Greiner Bio-one	Frickenhausen (D)

Reagiergefäße (1,5; 2 ml)	Sarstedt	Nümbrecht (D)
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 ml)	Eppendorf	Hamburg (D)
Reinstwasseraufbereitungssystem (Milli-Q®-Direct 8)	Millipore	Billerica (USA)
Röhrchen	Greiner Bio-one	Frickenhausen (D)
Röhren Flow Cytometry	Sarstedt	Nümbrecht (D)
SafeGuard Filterspitzen	Peqlab	Erlangen (D)
Skalpell	Braun	Melsungen (D)
Spritzen (10, 30, 50 ml)	Braun	Melsungen (D)
Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,22 µm und 0,45 µm)	Millipore	Billerica (USA)
TC10 Automatisierter Zellzähler	Bio-Rad	München (D)
Thermoshaker	Biometra	Göttingen (D)
Tischzentrifuge Qik-spin microcentrifuge	Edwards	Sydney (AUS)
Ultraschall	Branson	Dietzenbach (D)
Vakuum-Absaugpumpe	KNF Neuberger	Freiburg (D)
Vakuum-Absaugpumpe Zellkultur	Medela	Dietersheim (D)
Vakuum-Zentrifuge speed-vac	Jouan	Saint-Nazaire (FRA)
Voltmeter Consort E863	Consort	Turnhout (BEL)
Vortexer (Charley2)	Süd-Laborbedarf GmbH	Gauting (D)
Waage	Kern	Balingen (D)
Wasserbad	Memmert	Schwabach (D)
Zellkulturflaschen Cellstar®	Greiner Bio-one	Frickenhausen (D)
Zellkulturschalen (six-well)	Greiner Bio-one	Frickenhausen (D)
Zellkulturschalen (Cellstar®, 10cm Durchmesser)	Greiner Bio-one	Frickenhausen (D)
Zellschaber klein	Sarstedt	Nümbrecht (D)
Zellsieb Cell Strainer 70 µm	BD Biosciences	Heidelberg (D)
Zentrifuge (Labofuge 400R)	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
Zentrifuge (Rotina 46R)	Hettich	Tuttlingen (D)

Tab. 2: Verwendete Geräte und Materialien

3.1.3 Verwendete Kits und ELISA

Kit	Firma	Firmensitz
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/ Permeabilization Kit	BD Biosciences	Heidelberg (D)
ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare	Frankfurt (D)
High capacity reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
PCR Mycoplasma Test Kit I/C	PromoCell GmbH	Heidelberg (D)
peqGOLD Total RNA Kit	Peqlab	Erlangen (D)
Pierce™ LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
RNA 6000 Nano LapChip Kit	Agilent Technologies	Santa Clara (USA)
Zytotoxizitätstest (LDH)	Roche	Grenzach-Wyhlen (D)

Tab. 3: Verwendete Kits

Proteine	Firma
hIL-1β	<i>Human IL-1 beta ELISA Ready-SET-Go!</i> ® eBioscience
hTNF-α	<i>Human TNF-alpha ELISA Ready-SET-Go!</i> ® eBioscience
mTNF-α	<i>Mouse TNF-alpha ELISA Ready-SET-Go!</i> ® eBioscience

Tab. 4: Verwendete ELISA

3.1.4 Antikörper

Bezeichnung	Firma
APC Anti-mouse CD 68, Clone: FA-11	BioLegend (USA)
APC Rat IgG2a, κ Isotype Ctrl, Clone: RTK2758	BioLegend (USA)
Goat polyclonal anti-mouse IgG-HRP	Dako (D)
IκBα, Rabbit polyclonal IgG sc371	Santa-Cruz (USA)
Pacific Blue™ anti-mouse F4/80, Clone: BM8	BioLegend (USA)
PE Anti-mouse/human CD11b, Clone: M1/70	BioLegend (USA)
p44/42 MAPK (ERK1/2) Antibody, 9182S	Cell-Signaling (USA)
Phospho-IκBα (S32/36) 9246S, mouse	Cell-Signaling (USA)
Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2), 9101S	Cell-Signaling (USA)
Swine polyclonal-anti-rabbit IgG HRP	Dako (D)

Tab. 5: Verwendete Antikörper

3.1.5 Puffer und Zellkulturmedien

PBS (Phosphate-buffered saline): pH 7,4

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	8,2 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM

Tab. 6: Zusammensetzung von PBS-Puffer

RIPA-Puffer (Radio-immunoprecipitation-assay)

Tris/HCl (pH 7,4)	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
Triton-X-100	1% (w/v)
Sodiumdeoxycholate	1% (w/v)
SDS 10%	0,1% (v/v)
Protease Inhibitor Cocktail	1 Tabl. pro 10 ml Puffer

Tab. 7: Zusammensetzung von RIPA-Puffer

Direkt vor der Verwendung des RIPA-Puffers werden 1 mM Natriumorthovanadat und 0,5 mM PMSF hinzugegeben.

Sammelgelpuffer: pH 8,8

Tris	1,5 M
SDS	0,4% (w/v)

Tab. 8: Zusammensetzung von Sammelgelpuffer

SDS-Laufpuffer

Tris	25 mM
Glycin	250 mM
SDS	0,1%

Tab. 9: Zusammensetzung von SDS-Laufpuffer

TAE (Tris-Acetat-EDTA): pH 8,5

Tris	40 mM
EDTA	1 mM

Tab. 10: Zusammensetzung von Tris-Acetat-EDTA

TBS (Tris-buffered saline): pH 7,4

Tris	25 mM
NaCl	150 mM
KCl	3 mM
Tween-20	0.1% (w/v)

Tab. 11: Zusammensetzung von TBS (Tris-buffered saline)

Trenngelpuffer: pH 6,8

Tris	1,5 M
SDS	0,4% (w/v)

Tab. 12: Zusammensetzung von Trenngelpuffer

Vierfach-konzentrierter Probenpuffer

Sammelgelpuffer	25% (v/v)
SDS	5% (v/v)
Glycerin	40% (w/v)
Bromphenolblau	eine Spatelspitze

Tab. 13: Zusammensetzung von vierfach-konzentriertem Probenpuffer

Western-Blot-Puffer

Tris	0,02 M
Glycin	0,15 M
Methanol	20% (v/v)

Tab. 14: Zusammensetzung von Western-Blot-Puffer

Kulturmedium	Firma
RPMI Medium 1640	Thermo Fisher Scientific
10% Fetal Bovine Serum	Thermo Fisher Scientific
1% L-Glutamine 200 mM	Thermo Fisher Scientific
1% Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific

Tab. 15: Zellkulturmedium von THP-1 Makrophagen

Kulturmedium	Firma
D-MEM (1x)	Thermo Fisher Scientific
20% Medium EMEM Zelllinie L929	ATCC®
10% Fetal Bovine Serum	Thermo Fisher Scientific
1% Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific

Tab. 16: Zellkulturmedium muriner Makrophagen

Kulturmedium	Firma
D-MEM (1x)	Thermo Fisher Scientific
10% Fetal Bovine Serum	Thermo Fisher Scientific
1% Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific

Tab. 17: Zellkulturmedium von murinen NIH-Fibroblasten

3.2 Zellkultur

3.2.1 Isolation und Kultur von Maus-Makrophagen

Murine Makrophagen wurden aus dem Knochenmark langer Röhrenknochen der Maus isoliert (Versuchstiermeldung 481_M und 474_M nach §4 Abs. 3 Tierschutzgesetz). Das Knochenmark wurde mit Zellmedium D-MEM ausgespült, durch ein 70 µm Zellsieb gereinigt und zentrifugiert (200g, 5 min). Nach dem Ausspülen wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in frischen Medium resuspendiert. Dem Kulturmedium D-MEM wurden Zellüberstände der Zelllinie L929 (Medium EMEM) im Verhältnis 1:5 hinzugegeben. Dann wurden die Zellen ausgezählt, 5×10^5 Zellen in 10 ml Kulturmedium (siehe Punkt 3.1.5) pro Zellkulturschale ausgesät und eine Woche im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) kultiviert. Unter dem Einfluss von M-CSF der Zelllinie L929 entwickelten sich aus Vorläuferstammzellen adhärente Makrophagen.

Die Differenzierung der Maus-Makrophagen wurde durch Durchflusszytometrie, der sogenannten FACS-Analyse (*Fluorescence activated cell sorting*), überprüft. Durch Verwendung von an Antikörpern (Punkt 3.1.4) gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen gegen CD-11b, CD-68 (*Cluster of differentiation*) und F4/80 Oberflächenproteine von Makrophagen konnten die Zellpopulationen analysiert werden. Als Negativkontrolle diente eine Markierung mit einem Isotyp-Antikörper. Das Prinzip der Durchflusszytometrie ist in Abbildung 5 beschrieben.

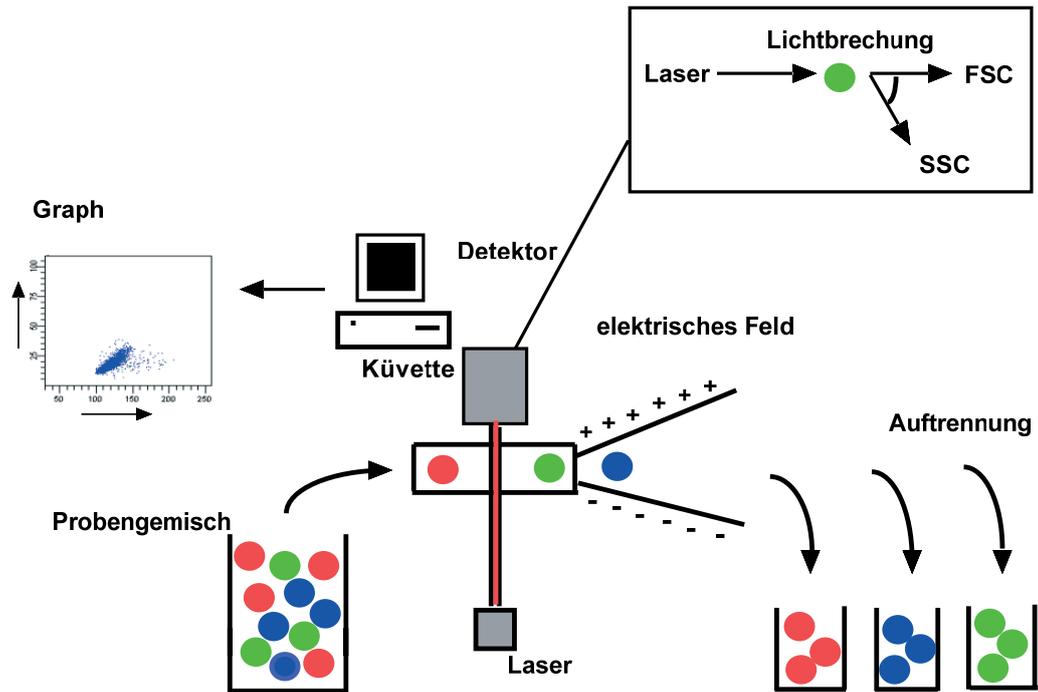


Abb. 5: Prinzip der Durchflusszytometrie

In einer Messküvette wird jede einzelne Zelle des Probengemisches mit einem Laser bestrahlt. Je nach Markierung durch den Antikörper und Eigenschaft der Zelle entstehen so verschiedene Fluoreszenzsignale. Das Vorwärtsstrellicht ($FSC=Forward\ Scatter$) ist ein Maß für die Beugung des Lichts und ist vor allem vom Volumen der Zelle abhängig. Die Granularität und Größe des Zellkerns bestimmt die Brechung des Lichtes und somit das Seitwärtsstrellicht ($SSC=Side\ Scatter$). Durch Anlegen eines elektrischen Feldes können die analysierten Zellen schließlich aufgetrennt werden.

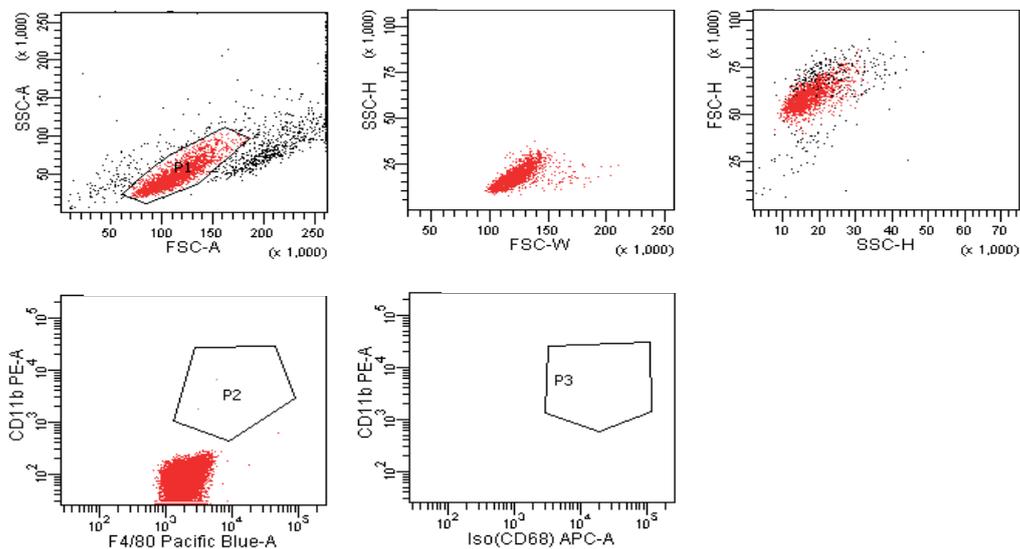


Abb. 6: FACS-Analyse ungefärbter Maus-Makrophagen

Analyse von 20000 Zählungen, Charakterisierung der Makrophagen durch Analyse von FSC ($Forward\ Scatter$) und SSC ($Side\ Scatter$) und Bildung der Population P1 mit Anteil von 75.5% aller Zählungen. Es folgt ebenfalls die Bildung des Verhältnisses der Markierung der Oberflächenproteine CD11b und F4/80 (Population P2) und des Verhältnisses der Markierung der Oberflächenproteine CD11b und CD68 (Population P3). Die Populationen P2 und P3 beträgt bei ungefärbten Makrophagen folglich 0% an der Gesamtpopulation.

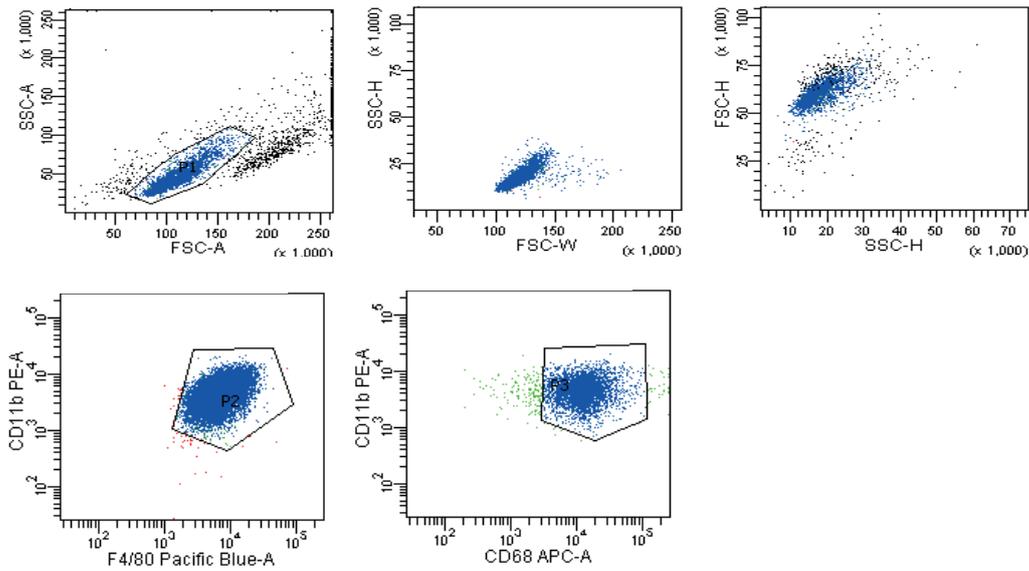


Abb. 7: FACS-Analyse mit CD11b, CD68 und F4/80 gefärbten Maus-Makrophagen

Analyse von 20000 Zählungen, Markierung mit PE Anti-mouse/human CD11b, APC Anti-mouse CD68 und Pacific Blue™ anti-mouse F4/80. Charakterisierung der Makrophagen durch Analyse von *FSC* (*Forward Scatter*) und *SSC* (*Side Scatter*). Es folgt die Bildung der Population P1 aus dem Verhältnis aus *FSC* und *SSC* mit 77.4% der Gesamtpopulation. Die Population P2 bildet sich durch das Verhältnis aus Markierung der Oberflächenproteine CD11b und F4/80 mit 99.7%. Population P3 bildet sich durch das Verhältnis der Markierung der Oberflächenproteine CD11b und CD68 mit 94.7%.

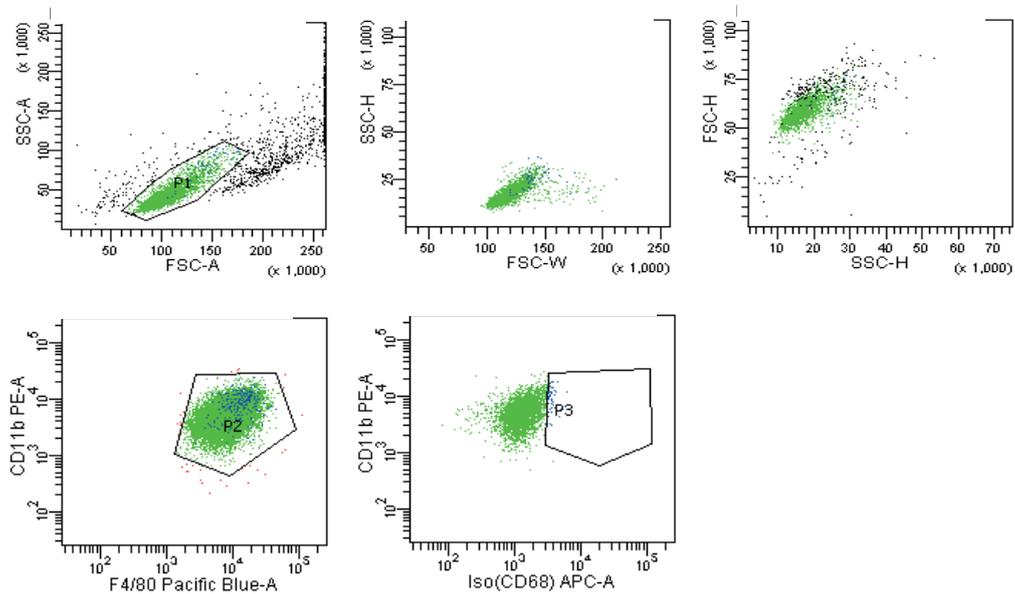


Abb. 8: FACS-Analyse mit Isotyp-Kontrollantikörper

Analyse von 20000 Zählungen und Markierung mit APC Rat IgG2a κ Isotype Ctrl, CD11b und F4/80. Charakterisierung der Makrophagen durch Analyse von *FSC* (*Forward Scatter*) und *SSC* (*Side Scatter*). Die Population P1 wird gebildet durch das Verhältnis von *FSC* und *SSC* mit 76.9% der Gesamtpopulation, die Population P2 durch das Verhältnis der Markierung der Oberflächenproteine CD11b und F4/80 von 99.8%, die Population P3 von 1.5% bildet sich durch das Verhältnis der Markierung der Oberflächenproteine CD11b und CD68.

3.2.2 Kultur von THP-1 Monozyten

Monozyten der Zelllinie THP-1 stammen aus dem Blut von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (Auwerx 1991). Es handelt sich um Zellen, die sich unter optimalen Bedingungen (37°C, 5% CO₂) im Kulturmedium ständig teilen und daher alle zwei bis drei Tage auf neue Kulturflaschen aufgeteilt werden müssen. Die Zellen wurden in RPMI-Medium (siehe Punkt 3.1.5) kultiviert.

Zum Splitten der Zellen wurde die Zellsuspension aus den Kulturflaschen in 50 ml-Röhrchen pipettiert und zentrifugiert (200g, 5 min). Das alte Medium wurde abgesaugt, das Zellpellet in neuem Medium resuspendiert und auf zwei oder drei Kulturflaschen verteilt. Während der Kultivierung wurden die Zellen im Hinblick auf deren Morphologie, Zelluntergang und Kontamination durch die Lichtmikroskopie kontrolliert. Die Kultur wurde regelmäßig mit dem PCR Mycoplasma Test Kit I/C auf eine Mykoplasmenkontamination überprüft.

3.2.3 Differenzierung der THP-1 Zellen

Um Makrophagen stimulieren zu können, wurden die THP-1 Monozyten aus der Kultur (Punkt 3.2.2) auf *six-well* Platten ausgesät. Das Kulturmedium wurde hierfür in 50 ml-Röhrchen pipettiert, zentrifugiert (200g, 5 min) und das Zellpellet in neuem Kulturmedium gelöst. Es wurden zwei Millionen Zellen pro Milliliter in 2 ml RPMI-Medium pro *well* unter Zugabe von Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA in DMSO gelöst, 5 ng/ml) bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank für zwei Tage kultiviert. PMA aktiviert die Proteinkinase C und fördert somit die Differenzierung der THP-1-Monozyten zu adhärenenten THP-1-Makrophagen (Daigneault et al. 2010; Smith et al. 1998).

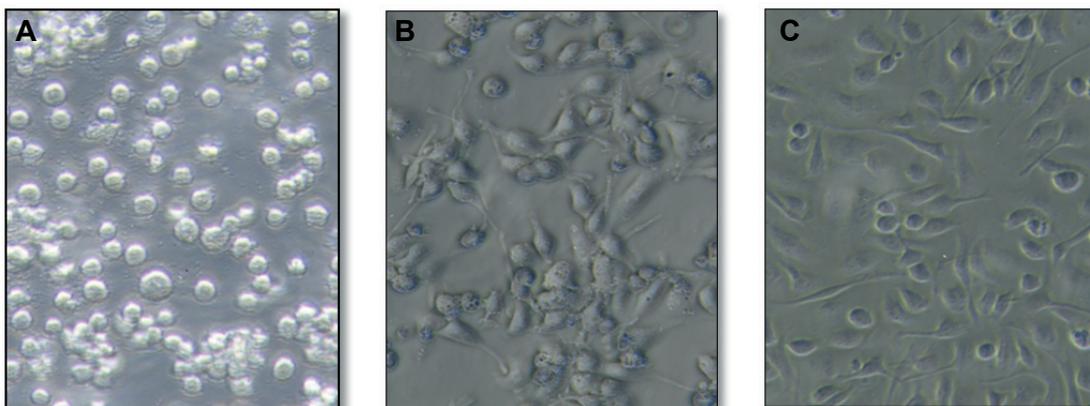


Abb. 9: Verwendete Zellen im Vergleich

(A) THP-1 Zelllinie, hier erkennbar als lose Zellen in Suspension. (B) Sie können sich nach Stimulation mit PMA (5 ng/ml) zu gewebständigen, adhärenenten Makrophagen differenzieren. (C) Rechts zum Vergleich: adhärenente Maus-Makrophagen. Die Differenzierung erfolgte mit M-CSF. Vergrößerung 200-fach.

3.2.4 Stimulation der Zellen

Vor der Stimulation wurde das Nährmedium der Zellen abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend für 2 h in 1 ml Phenolrot-freiem RPMI-Medium pro *well* inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation über die jeweils angegebene Zeit. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurde der Überstand zur Proteinanalyse (Punkt 3.4.2) von den Zellen getrennt. Die verbleibenden Zellen in der *six-well* Platte wurden zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend in 400 µl *RNA-Lysis Buffer* gelöst (Punkt 3.3.1) oder für die Proteinanalyse in 100 µl RIPA-Puffer (*Radio-immunoprecipitation-assay*) gelöst.

3.2.5 Kultur von NIH-Fibroblasten

Die NIH-Fibroblasten wurden im D-MEM-Medium bei 37°C und 5% CO₂ in Kulturschalen kultiviert (Punkt 3.1.5). Die adhärennten Zellen wurden etwa alle vier Tage vom Medium getrennt und mit TrypLE™ Express von der Platte gelöst. Die gelösten Fibroblasten wurden abzentrifugiert (200g, 5 min), der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in neuem Medium gelöst. Die Zellen wurden dann im Verhältnis 1:20 auf neue Kulturschalen ausgesät.

3.2.6 Kryokonservierung von Zellen

Durch Kryokonservierung werden Zellen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und können so für lange Zeit aufbewahrt werden. Sie können daher jederzeit in Kultur genommen werden.

Zur Kryokonservierung wurden zwei Lösungen steril hergestellt:

Lösung A: Wachstumsmedium mit 20% DMSO

Lösung B: Wachstumsmedium mit 40% FCS

Die Zellen wurden aus den Kulturflaschen in 50 ml-Röhrchen überführt, abzentrifugiert (200g, 5 min) und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde nun mit PBS-Puffer erneut gewaschen und abzentrifugiert (200g, 5 min). Das gewonnene Zellpellet wurde in 1 ml gekühlter Lösung B suspendiert und davon 500 µl in bereitgestellte Kryoröhrchen abgefüllt. Die Kryoröhrchen wurden zuvor mit 500 µl von Lösung A befüllt. Die Kryoröhrchen enthielten nun eine Suspension mit Medium aus 10% DMSO und 20% FCS. Mit Isopropanol gefüllte Gefrierbehälter wurden anschließend mit den Kryoröhrchen bestückt und schonend auf -80°C heruntergekühlt (1°C/min), um sie dann auf Stickstoff lagern zu können.

3.2.7 Auftauen der Zellen

Die Kryoröhrchen mit den tiefgefrorenen Zellen wurden im Wasserbad zügig auf 37°C erwärmt und die Zellen anschließend in ein Röhrchen mit 10 ml RPMI-Medium überführt. Dieses wurde bei 200g 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in neuem Wachstumsmedium resuspendiert. Die Zellen konnten nun nach Punkt 3.2.2 in Kulturflaschen ausgesät werden.

3.2.8 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit dem Zellzähler der Firma *biorad*. Hierzu wurden die im Nährmedium gelösten Zellen entnommen, mit Trypanblau (*Trypan Blue Dye 0.40%*) im Verhältnis 1:1 vermischt, auf einen Objektträger (*Counting Slides*) gegeben und dann ausgezählt. Abgestorbene und nicht intakte Zellen nehmen vermehrt den Farbstoff Trypanblau auf und verfärben sich. Somit ist die genaue Detektion und Unterscheidung möglich (Strober 2001). Die Zellkonzentration wurde in Zellzahl pro Milliliter angegeben.

3.2.9 Zytotoxizitätstest

Zur Messung der Zytotoxizität von Stimulanzien auf Makrophagen wurde das *LDH-Cytotoxicity Detection Kit* von *Roche* verwendet. Die Laktat-Dehydrogenase (LDH) ist ein Enzym, welches bei Zellschädigung freigesetzt wird und ist daher ein geeigneter Marker für Zelluntergang nach Stimulation. Sie katalysiert die Oxidation von Lactat zu Pyruvat bei gleichzeitiger Reduktion von NAD^+ zu NADH/H^+ . Der im Substratmix enthaltene Katalysator Diaphorase reduziert dabei das Tetrazoliumsalz Iodonitrotetrazoliumchlorid zu Formazan bei gleichzeitiger Oxidation des NADH/H^+ (Decker und Lohmann-Matthes 1988). Die Menge des gebildeten Formazans korreliert daher mit der LDH-Aktivität.

Die Zellen wurden auf einer 96-well-Mikrotiterplatte ausgesät, mit PMA (5 ng/ml) differenziert und für 48 h kultiviert. Die Stimulation erfolgte in Phenolrot-freiem Medium (Punkt 3.2.4). Als Positivkontrolle diente 0,1% Triton-X-100 (v/v) und als Negativkontrolle unstimuliertes Medium. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurde die Platte 10 min bei 250g zentrifugiert und 50 µl des Überstandes entnommen, anschließend mit 50 µl LDH-Substratmix vermischt. Bei 500 nm wurde dann die Bildung des Formazans detektiert und nach folgender Formel berechnet:

Zytotoxizität (%): $((\text{Stimulanzien-Negativkontrolle})/(\text{Positivkontrolle-Negativkontrolle}))$

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA-Isolation aus Zelllysat

Zur RNA-Isolation aus Makrophagen und NIH-Fibroblasten wurde das RNA-Isolationskit *peqGOLD Total RNA Kit* der Firma *peqlab* verwendet. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend in 400 µl *Lysis-Puffer T* gelöst. Das Lysat wurde schließlich auf eine DNA-bindende Säule (*DNA Removing Column*) gegeben und abzentrifugiert (1 min, 12.000g). Die Säule mit der gebundenen DNA wurde dann verworfen, der Durchfluss mit 400 µl 70%-Ethanol gemischt und auf die RNA-bindende Säule (*PerfectBind RNA Column*) pipettiert. Bei einer Zentrifugation von 10.000g (1 min) wurde die RNA an der Säule gebunden. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule zunächst mit *Waschpuffer 1* (500 µl) und anschließend zweimal mit *Waschpuffer 2* (600 µl) gewaschen. Auch hier wurden die Durchflüsse verworfen. Nach der zweiminütigen Trockenzentrifugation (10.000g) wurde die RNA mit 25 µl aufgereinigtem Ribonuklease-freiem Wasser aus der Säule eluiert und abzentrifugiert (1 min, 5000g).

3.3.2 Charakterisierung der eRNA

Die zur Stimulation verwendete extrazelluläre RNA wurde durch Kapillarelektrophorese am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim analysiert. Anhand der Fragmentgröße und Laufzeit im elektrischen Feld konnte die eRNA durch Laserbestrahlung per Fluoreszenzdetektor erfasst und in Form eines Elektropherogramms dargestellt werden (Abb. 10). Mit dem *RNA 6000 Nano LapChip Kit* wurde dazu am Agilent-2100-Bioanalyzer die RNA-Qualität bestimmt. Mit Hilfe der Bestimmung der sogenannten RNA *integrity Number* (RIN) durch Anwendung eines RIN Software Algorithmus konnte die RNA auch bezüglich ihrer Degradation beurteilt werden (Mueller, Lightfoot, Schroeder 2004).

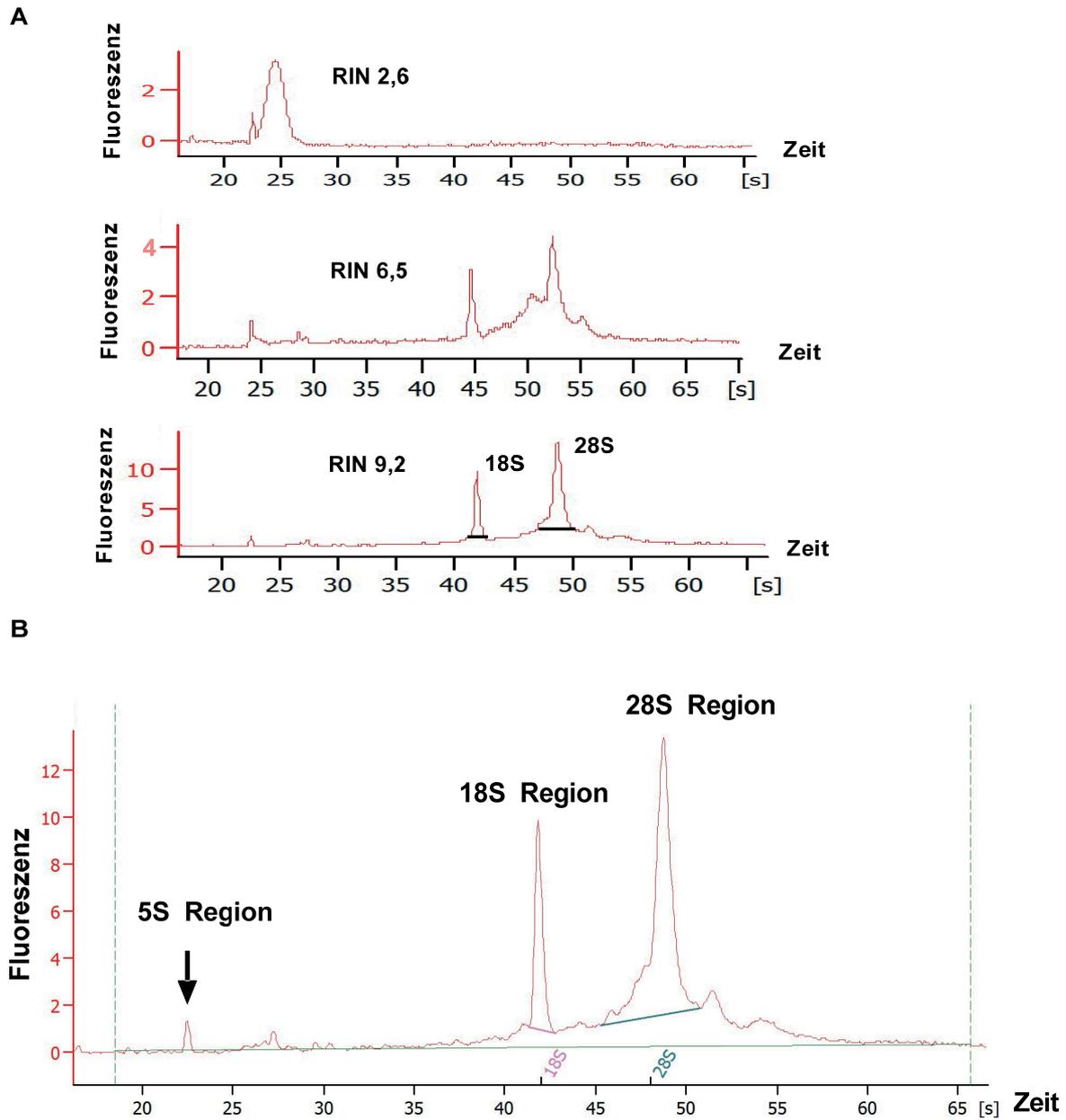


Abb. 10: RNA-Elektropherogramme

(A) Die RNA *integrity Number* beschreibt durch eine Zahl von 1 bis 10 die Qualität der RNA. Je höher ihre Zahl, desto intakter ist die Beschaffenheit der RNA. Niedrige RIN-Zahlen gehen mit einem Verlust der 18 S und 28 S Banden und Zunahme von Degradationsprodukten einher. (B) zeigt die Bezeichnungen und Zuordnungen spezifischer Banden einer RNA-Probe. Dabei stellen die zwei mittleren großen Banden die 18 S und die 28 S Einheit der ribosomalen RNA dar.

3.3.3 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung der unter Punkt 3.3.1 gewonnenen RNA erfolgte mit einem UV-Spektralphotometer *NanoDrop2000* der Firma *Thermo Fisher Scientific* und dem dazugehörigen Computerprogramm *NanoDrop2000*. Hierfür wurde das Photometer zu Beginn mit destilliertem Wasser kalibriert, dann die zu untersuchende Probe eingesetzt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und gegen den Referenzwert von Wasser verrechnet.

Für die Reinheit wurde der Quotient $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ gebildet. Ein Quotient zwischen 1,8-2 spricht für eine qualitativ hochwertige Probe ohne Verunreinigungen, da Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm besitzen, die RNA bei 260 nm.

Die Konzentration wurde aus folgender Formel berechnet:

$$\text{RNA-Konzentration: } A_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{MF}$$

Der MF (Multiplikationsfaktor) wurde bei einem pH-Wert von 7,0 errechnet und der $A_{260\text{nm}}=1$ ergab für RNA 40 µg/ml.

3.3.4 cDNA-Synthese aus RNA

Die cDNA (*complementary-DNA*) wurde aus der gewonnenen RNA (Punkt 3.3.1) synthetisiert. Hierzu wurde das *High Capacity Reverse Transcription Kit* der Firma *Thermo Fisher Scientific* verwendet. Das Enzym *Reverse Transkriptase* synthetisierte aus der isolierten RNA einen komplementären DNA-Strang. Dafür benötigte sie kurze DNA-Sequenzen, die *Random Primer* mit zufälliger Basenabfolge. Diese lagerten sich der RNA per Zufall an und die *Reverse Transkriptase* verlängerte an ihrem 3'-OH-Ende durch Einbau der Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP) den komplementären cDNA-Strang. Der *RNase Inhibitor* schützte die RNA vor vorzeitigem Abbau durch RNasen. Die gewonnene cDNA war wesentlich stabiler als die RNA.

Um die RNA-Expression verschiedener Zellen vergleichen zu können, wurde 1000 ng RNA eingesetzt. Die RNA-Lösung mit 1000 ng RNA wurde mit destilliertem Wasser auf 10 µl aufgefüllt, mit 10 µl Reaktionsreagenz vermischt und dann im Thermocycler (10 min bei 25°C, 60 min bei 42°C und 15 min bei 72°C) inkubiert.

Reagenzien	Volumen
H ₂ O	5,2 µl
Buffer	2 µl
Random Primer	1 µl
dNTP	0,8 µl
Reverse Transkriptase	0,5 µl
RNase-Inhibitor	0,5 µl
Endvolumen	10 µl

Tab. 18: Für cDNA-Synthese verwendete Reagenzien und Volumen

3.3.5 Semi-Quantitative Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) ist eine Methode zur exponentiellen Vervielfältigung der in Punkt 3.3.4 hergestellten cDNA, um diese anschließend auf einem Agarose-Gel (Punkt 3.3.6) sichtbar machen zu können. Je nach Wahl des Primerpaares lassen sich unterschiedliche Gene der cDNA untersuchen und quantifizieren. Bei 95°C (3 min) wurde die doppelsträngige DNA aufgespalten. Nun konnten sich die Primer an die einzelsträngigen DNA-Stränge anlagern („Annealing“). Dabei lagerte sich der Forward Primer an den *Antisense* (Minusstrang), der Reverse Primer an den *Sense*-Strang (Plusstrang) der DNA an. Je nach Basenabfolge der Primer wurden unterschiedliche Annealingtemperaturen gewählt (Tab. 19). Bei 72°C konnte die DNA-Polymerase dann den neuen doppelsträngigen DNA-Strang am freien 3'-OH-Ende der Primer synthetisieren („Elongation“). Die DNA-Polymerase war neben Puffer und dNTPs im *Mastermix* enthalten.

Die Auswertung der semi-quantitativen PCR erfolgte mit der Software *LabImage1D 2000-2008 Kaplan Bio-Imaging Solutions*. Die Agarose-Gele mit der markierten DNA (Punkt 3.3.6) wurden fotografiert, um die entsprechenden Bandensignale zu dokumentieren. Zur Analyse der Genexpression wurde schließlich die relative Genexpression berechnet. Dafür wurde der Quotient aus dem Bandensignal des zu untersuchenden Gens mit dem Bandensignal des „*House-keeping*“-Gens gebildet. Das errechnete Ergebnis wurde dann mit der Kontrolle einer jeden Stimulationsreihe in Verhältnis gesetzt und als Zahlenwert dargestellt.

Gen	Primer (Sequenz 5'-3')	Ann.-temp.* ¹	Zyklen	DNA* ²
ADAM10	F: TGCCCAGATATCCAGTCATGT R: ACGGATTCCGGAGAAGTCTG	51,0	29	70
ADAM17	F: GAAGTGCCAGGAGGCGATTA R: CGGGCACTCACTGCTATTACC	53,0	30	73
β -actin	F: ATTGCCGACAGGATGCAGAA R: GCTGATCCACATCTGCTGGAA	56,4	25	150
CCL-3	F: AGCAGACAGTGGTCAGTCCT R: GCAGCAAGTGATGCAGAGAAC	60,0	25	151
CCL-4	F: GCTGTGGTATTCCAAACCAAAGAA R: AGGAACTGCGGAGAGGAGT	60,0	25	198
IL-1 β	F: TTGCTCAAGTGTCTGAAGCAGCCA R: AGATTCTAGCTGGATGCCGCC	57,0	25	180
IL-8	F: ACCACCGGAAGGAACCATCT R: AAAACTGCACCTTCACACAGAG	60,0	25	108
MyD88	F: TGCCAGCGAGCTAATTGAGAA R: CTGTTGGACACCTGGAGACAG	60,0	40	127
TNF- α	F: GCCCATGTTGTAGCAAACCC R: TATCTCTCAGCTCCACGCCA	60,0	25	97
m-IL-1 β	F: GTGGCAGCTACCTGTGTCTT R: CAGAGGATGGGCTCTTCTTCAA	52,0	26	93
m-TNF- α	F: ACTGAACTTCGGGGTGATCG R: TGGTTTGTGAGTGTGAGGGTC	53,0	28	99
m- β -actin	F: CGCGAGCACAGCTTCTTTG R: CGTCATCCATGGCGAACTGG	56,4	25	70

Tab. 19: Für semiquantitative PCR verwendete Primerpaare mit Primersequenz, Annealingtemperatur und Fragmentgröße

*¹Annealingtemperatur in °C, *² DNA-Fragmentgröße in bp

Reagenzien	Volumen
GoTaq® Mastermix (Promega)	5 μ l
Forward Primer	0,5 μ l
Reverse Primer	0,5 μ l
H ₂ O	3 μ l
cDNA	1 μ l
Endvolumen	10 μl

Tab. 20: Für die semiquantitative PCR verwendete Reagenzien und Volumina

PCR-Ablauf

3 min	bei 95°C	Denaturierung
X ₁ Zyklen:		
30 sek	bei 95°C	Denaturierung
30 sek	bei X ₂ °C	Annealing
30 sek	bei 72°C	Elongation
10 min	bei 72°C	Elongation
Pause		
	bei 4°C	

Tab. 21: Auflistung des zeitlichen PCR-Ablaufes im Thermocycler

X₁ wird bestimmt durch die jeweilige Zyklenzahl des eingesetzten Primers. Ein Zyklus besteht aus den aufgelisteten Schritten. X₂ wird bestimmt durch die jeweilige Annealingtemperatur des eingesetzten Primers.

3.3.6 Agarose-Gelelektrophorese der DNA

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese kann die vervielfältigte DNA (Punkt 3.3.4) unter UV-Licht analysiert und fotografiert werden. Dazu wurde ein 1,5-prozentiges Agarosegel aufgekocht (1,5 g Agarose mit 100 ml TAE-Puffer), 1 µl Ethidiumbromid hinzugegeben und die Mischung zum Aushärten in eine Gelvorrichtung gegossen.

Das Reaktionsgemisch konnte nun direkt nach Abschluss der PCR in die Lauftaschen des Gels aufgetragen werden (5 µl pro Tasche). Bei 100 Volt Spannung wanderte die negativ geladene DNA in Richtung der Anode des Feldes. Das hinzugegebene Ethidiumbromid interkalierte mit der gewanderten DNA, veränderte ihr Absorptionsspektrum und emittierte unter UV-Bestrahlung entsprechende Banden. Als Bandenmarker wurde der *GeneRuler 100 bp DNA-Ladder (Fermentas)* verwendet.

3.3.7 Agarose-Gelelektrophorese der RNA

Die Agarose-Gelelektrophorese der RNA gleicht dem unter Punkt 3.3.6 beschriebenen Prinzip. Auch hier wurde ein 1,5-prozentiges Agarosegel gegossen und in die vorher mit Wasserstoffperoxid gereinigte Vorrichtung gegeben. Die Reinigung verhinderte einen Abbau der RNA durch Ribonuklease. Die RNA wurde 1:1 mit zweifach konzentriertem *RNA Loading Dye* für 10 min bei 70°C erhitzt. Zur Herstellung degradierter RNA wurde noch *RNase* (1 µg/ml) hinzugefügt und die Probe 120 min bei 37°C verdaut. Anschließend wurden die Taschen des Gels beladen, als Bandenmarker diente *GeneRuler 100 bp DNA-Ladder, Fermentas*.

3.3.8 Quantitative Real-time PCR

Die Quantitative Real-time PCR (qPCR) ähnelt der unter Punkt 3.3.5 beschriebenen semi-quantitativen PCR, erlaubt jedoch eine präzisere Analyse der Genexpression in Echtzeit. Hierfür wurde der interkalierende Farbstoff *SybrGreen* benutzt. Dieser Farbstoff emittierte proportional zum gebildeten PCR-Produkt Fluoreszenzstrahlen. Zur Analyse wurde ebenfalls das konstant exprimierte Gen β -actin verwendet und mit dem zu untersuchenden Gen verglichen.

Es wurde der sogenannte Ct-Wert (*Cycle-Threshold*) ermittelt, also der Wert, ab dem eine signifikante Zunahme der Fluoreszenzstrahlen über einen Schwellenwert (*Threshold*) festzustellen war. Die Differenz zwischen dem Schwellenwert des konstanten „*House-keeping*“-Gen β -actin und dem zu untersuchendem Gen heißt Δ Ct-Wert. Dieser Wert gab den Unterschied in der Expression zweier Gene einer Probe an. Nun konnte mithilfe des Δ Ct-Wertes der $\Delta\Delta$ Ct-Wert errechnet werden, der die Differenz von Genexpressionen zwischen der Kontrollprobe und der Stimulationsprobe angibt und ein relativer Wert ist.

Die n-fache Änderung der Genexpression errechnet sich dann wie folgt:

$$\text{Relative Veränderung (Fold Change)} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Reagenzien	Volumen
2x <i>SensiMix</i> (<i>Bioline</i>)	10 μ l
Forward Primer	0,175 μ l
Reverse Primer	0,175 μ l
H ₂ O	8,625 μ l
cDNA	1 μ l
Endvolumen	20 μl

Tab. 22: Für die qPCR verwendete Reagenzien und Volumina

Die DNA-Polymerase und die dNTPs waren im *SensiMix*TM (*Bioline GmbH*) enthalten.

PCR-Ablauf

8,5 min	bei 95°C	Denaturierung
40 Zyklen:		
30 sek	bei 95°C	Denaturierung
30 sek	bei 60°C	Annealing
30 sek	bei 72°C	Elongation

Tab. 23: Auflistung des zeitlichen Ablaufes der qPCR

Gen	Primer (Sequenz 5'-3')	Ann.-temp.* ¹	Zyklen	DNA* ²
β-actin	F:ATTGCCGACAGGATGCAGAA R:GCTGATCCACATCTGCTGGAA	56,4	25	150
IL-1β	F:TTGCTCAAGTGTCTGAAGCAGCCA R:AGATTCTAGCTGGATGCCGCC	57,0	25	180
TNF-α	F:GCCCATGTTGTAGCAAACCC R:TATCTCTCAGCTCCACGCCA	60,0	25	97

Tab. 24: Für die qPCR verwendete Primerpaare mit Primersequenz, Annealingtemperatur und Fragmentgröße

*¹Annealingtemperatur in °C, *² DNA-Fragmentgröße in bp

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Aufbereitung des Zellüberstandes

Nach Ablauf der Stimulationszeit (Punkt 3.2.4) wurde der Überstand der *six-well* Platte abpipettiert und in ein Reaktionsgefäß abgefüllt. Die restlichen Zellbestandteile wurden abzentrifugiert (200g, 3 min) und der Überstand auf Eis gelegt. Anschließend erfolgte zur Erhöhung der Proteinkonzentration die Aufkonzentrierung der Überstände unter Vakuum in einer *speedvac*-Zentrifuge der Firma *Jouan*. Das Konzentrat wurde dann in 60 µl destilliertem Wasser resuspendiert und mit gepulstem Ultraschall zerkleinert und nochmals bei 10.000g für 10 min zentrifugiert.

3.4.2 Proteinbestimmung des Zellüberstandes

Um verschiedene Proben untereinander vergleichen und die Freisetzung von Zytokinen pro Pikogramm Protein mittels ELISA (Punkt 3.4.3) erfassen zu können, musste vorher eine Proteinbestimmung der Überstände erfolgen. Dazu wurde das *Pierce BCA Protein Assay Kit* der Firma *Thermo Fisher Scientific* verwendet. Das Prinzip der Proteinbestimmung beruht auf der Biuretreaktion, einer Komplexbildung von zweiwertigen Kupferionen mit Peptidbindungen in wässrig-alkalischer Lösung (Smith et al. 1985; Wiechelman et al. 1988). Unter Zugabe von Bicinchoninsäure (BCA) entstand ein violetter Farbumschlag, der bei 562 nm gemessen wurde.

5 µl der unter Punkt 3.4.1 gewonnenen, verdünnten Überstände wurden auf eine *96-well* Platte pipettiert, mit 100 µl des Reaktionsgemisches (10 ml *Reagent A* + 200 µl *Reagent B*) aufgefüllt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Herstellung einer Standardreihe dienten 5 µl eines Standards (Standardreihe: 0,125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 µg/ml) aus Bovine Serum Albumin (BSA).

3.4.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist eine immunologische, antikörpervermittelte Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von Proteinen. Zur Herstellung eines ELISA wurden eine 96-well ELISA-Platte verwendet und verschiedene Reaktionsschritte durchgeführt:

Im ersten Schritt wurde die ELISA-Platte mit einem Antikörper versehen (*Capture Antibody*), der fest an der ELISA-Platte haftete und das nachzuweisende Protein mit seinem F_{ab}-Teil binden konnte. Die ELISA-Platte wurde nach dem Auftragen des ersten Antikörpers bei 4°C auf einer Rüttlerplatte inkubiert. Nach 12 h wurde die ELISA-Platte mit Waschpuffer (PBS-Puffer + 0,05% Tween-20®) dreimal gewaschen, für 2 h mit 200 µl *Assay Diluent* geblockt und die nach Punkt 3.4.2 aufbereitete Probe zusammen mit *Assay Diluent* (Gesamtvolumen von 100 µl pro Well) auf die Platte gegeben. Für weitere 12 h wurde die Platte dann bei 4°C auf einem Rüttler inkubiert, wobei das nachzuweisende Protein vom ersten Antikörper gebunden wurde. Danach wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Auch eine Standardreihe (Standardreihe: 0; 7,825; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 pg/ml) des entsprechenden Proteins wurde nach diesem Prinzip auf die Platte aufgetragen.

Im zweiten Reaktionsschritt folgte nun die Bindung eines zweiten Antikörpers (*Detection antibody*) auf das durch den ersten Antikörper gebundene Protein. Die Platte wurde hierfür 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Dann erfolgte lichtgeschützt die Zugabe von *avidin horseradish peroxidase (Avidin HRP)*. Avidin konnte nun an den biotinylierten Teil des zweiten Antikörpers binden. Nach 30 min wurde die ELISA-Platte fünfmal gewaschen und 100 µl 3,3',5,5''-tetramethylbenzidin (TMB-Substrat) pro well hinzugefügt. Die gekoppelte Peroxidase des HRP-Komplexes konnte nun das TMB-Substrat umsetzen und einen blauen Farbumschlag generieren. Abgestoppt wurde diese Reaktion durch Zugabe von 50 µl Schwefelsäure (2 M H₂SO₄). Es entstand ein gelber Farbumschlag, der bei 450 nm im Photometer gemessen werden konnte (Josephy et al. 1982).

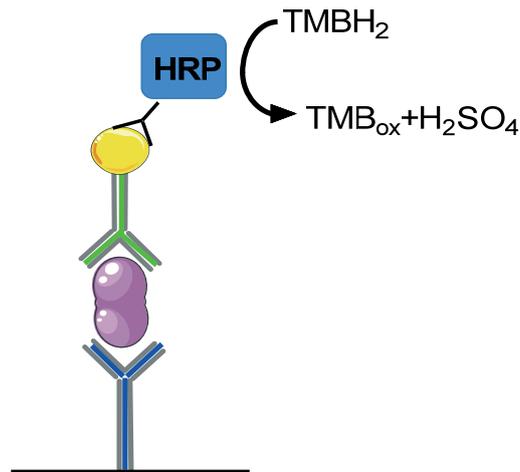
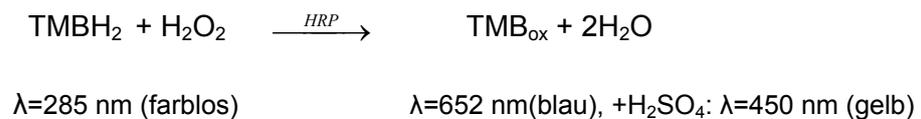


Abb. 11: Prinzip der Proteinquantifizierung durch ELISA

Die Bindung des Proteins (violett) auf der Platte erfolgte durch den Capture Antibody (blau). Ein zweiter Detection Antikörper (grün) mit gekoppeltem Biotinkomplex (gelb) konnte dann an das Protein binden. Nach Bindung des Streptavidins an den Biotinkomplex erfolgte die Zugabe des TMB-Substrates mit Farbreaktion.

Farbreaktion:



Reagenzien	Volumen (pro Vertiefung)
1. <i>Capture</i> Antikörper auftragen, Inkubation bei 4°C für 12 h	20 µl <i>Capture</i> Antikörper auf 5 ml 1xcoating Puffer, davon 50 µl
2. Waschen, mit 1x <i>Assay Diluent</i> für 2 h blocken	1x <i>Assay Diluent</i> 200 µl
3. Auftragen des Proteins und der Standardreihe, Inkubation bei 4°C für 12 h	Proben mit 1x <i>Assay Diluent</i> auf 100 µl verdünnt
4. Waschen, Aufbringen <i>Detection</i> Antikörper, Inkubation für 60 min	40 µl auf 10 ml 1x <i>Assay Diluent</i> verdünnt, davon 100 µl
5. Waschen, Aufbringen des <i>Avidin HRP</i> , Inkubation 30 min	40 µl auf 10 ml 1x <i>Assay Diluent</i> verdünnt, davon 100 µl
6. Waschen, Zugabe von TMB-Substrat	100 µl
7. Zugabe von 2M H ₂ SO ₄	50 µl

Tab. 25: Ablauf des ELISA mit verwendeten Reagenzien und Volumina

3.4.4 Endotoxin-Nachweis

Zum Nachweis von Endotoxin wurde das *Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit* von Thermo Fisher Scientific verwendet. 50 µl der zu untersuchenden Probe wurde auf eine 96-well-Platte aufgetragen, nach 5 min bei 37°C 50 µl des LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) hinzugegeben und nach 10 min 100 µl Substratlösung pro well hinzugefügt. Der Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus* enthält ein natürliches Enzymsystem gegen Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien (Morita et al. 1985). Die im LAL-Lysat enthaltene Protease Faktor C wird durch LPS aktiviert. Die Proteaseaktivität korreliert mit der Menge des vorhandenen LPS und setzt aus der Substratlösung durch Proteolyse p-Nitroanilin frei, welches bei 410 nm Absorptionsspektrum detektiert werden konnte. Nach 6 min wurde 50 µl Stopreagenz hinzugegeben und die Platte im Mikroplattenreader ausgelesen. Die Standardreihe (E.coli-Endotoxin) wurde nach dem gleichen Prinzip angefertigt.

3.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine anhand ihrer Masse auf einem Gel aufgetrennt, um sie anschließend in der Western-Blot-Analyse zu spezifizieren (Punkt 3.4.6). Dafür wurde das proteinhaltige Gemisch mit dem anionischen Detergenz SDS (Sodiumdodecylsulfat) versetzt. Die dadurch entstehende stark negative Ladung des Proteingemisches ermöglicht die Auftrennung nach ihrer Proteinmasse. Dabei bindet 1.4 g SDS etwa 1 g Protein (1% SDS-Lösung). Zusätzlich reduziert die Zugabe von 10% β-Mercaptoethanol die Anzahl von Disulfidbrücken. Die Wandergeschwindigkeit im Gel ist nun umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molmasse des Proteins.

Vierfach konzentrierter Probenpuffer wurde mit dem Proteingemisch für 10 min auf 95°C erhitzt. Die Gelelektrophorese (100 V im SDS-Laufpuffer) erfolgte in einem Tris-Glycin-Gel. Nach dieser von Ulrich Laemmli entwickelten Methode ist die Gelmatrix in ein Sammel- und Trenngel unterteilt, die sich sowohl in der Porengröße als auch bezüglich ihres pH-Wertes unterscheiden (Laemmli 1970). Im 5%-Sammelgel erfolgte bei gleicher Laufgeschwindigkeit erst die Aufkonzentrierung der Proteine, die dann im 12,5%-Trenngel nach ihrer Größe und unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten aufgetrennt wurden. Beim Auftragen auf das Gel wurde zusätzlich 7,5 µl des Proteinmarkers *Prestained Protein Ladder* aufgetragen.

	Trenngel 12,5%	Sammelgel 5%
Trenn-/Sammelgelpuffer	2,5 ml	2,5 ml
Acrylamid (30%)	4,2 ml	1,65 ml
Wasser	3,2 ml	5,7 ml
Ammoniumpersulfat	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl
Endvolumen	10 ml	10 ml

Tab. 26: Für Trenn- und Sammelgel verwendete Reagenzien und Volumina der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

3.4.6 Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse ist eine Methode zur Analyse von auf Trägermembranen aufgetragenen Proteinen mittels spezifischer Antikörper (Towbin et al. 1979; Renart et al. 1979). Dabei überträgt eine senkrecht angelegte Spannung (100 V über 90 min) die vorher im Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennten Proteine in einem Blot-Buffer auf Polyvinyliden-Fluoridmembranen. Ein anschließendes 90-minütiges Blocken mit 5% Milchpulver (w/v) in TBS-T führte zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. Dann erfolgte die Bindung mit einem Protein-spezifischen Antikörper (Verdünnung 1:1000, Milchpulver in TBS-T), der bei 4°C für etwa 12 h mit den Membranen inkubiert wurde. Nach der Bindung des ersten Antikörpers folgte nach viermaligem Waschen mit TBS-T die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Verdünnung 1:5000, Milchpulver oder BSA in TBS-T) für 1 h. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte *horseradish peroxidase* HRP emittiert bei Oxidation durch Zugabe von Luminol ein Signal, welches im Röntgenfilm detektiert werden konnte. Die Stärke des Signals ist proportional zur vorhandenen Proteinmenge. Luminol ist im *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* enthalten.

Primär-Antikörper	Sekundär-Antikörper
p44/42 MAPK (ERK1/2) Antibody, rabbit 1:1000 in 5% Milchpulver (w/v) in TBS-T	Swine polyclonal-anti-rabbit IgG HRP 1:5000 in 5% BSA (w/v) in TBS-T
Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/204), rabbit 1:1000 in 5% Milchpulver (w/v) in TBS-T	Swine polyclonal-anti-rabbit IgG HRP 1:5000 in 5% BSA (w/v) in TBS-T
IκBα, Rabbit polyclonal IgG 1:1000 in 5% Milchpulver (w/v) in TBS-T	Swine polyclonal-anti-rabbit IgG HRP 1:5000 in 5% BSA (w/v) in TBS-T
Phospho-IκBα (S32/36), mouse 1:1000 in 5% Milchpulver (w/v) in TBS-T	Goat polyclonal anti-mouse IgG-HRP 1:5000 in 5% Milchpulver (w/v) in TBS-T

Tab. 27: Für Western-Blot verwendete Primär- und Sekundär-Antikörper

3.5 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse der erworbenen Daten wurde das Computerprogramm *GraphPad Prism 5* (Version 5.02) verwendet.

Um die statistische Signifikanz von mehr als zwei Gruppen zu überprüfen, wurde die ein- bzw. zweifaktorielle Varianzanalyse (*Analysis of variance*, ANOVA) verwendet und durch den Bonferroni-Test geprüft. Der Wert $P < 0.05$ wurde als signifikant definiert ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$) und die Daten mit Mittelwert und Standardabweichung mit $n \geq 3$ angegeben.

4. Ergebnisse

4.1 Extrazelluläre Ribonukleinsäure-induzierte Tumor-Nekrose-Faktor- α Freisetzung in Makrophagen

4.1.1 Analyse der extrazellulären RNA

Zur Stimulation von Makrophagen wurde RNA aus NIH-Fibroblasten isoliert (Punkt 3.3.1). Die gewonnene RNA und deren Degradation durch RNase wurde mittels Kapillarelektrophorese (Punkt 3.3.2) analysiert. Das Elektropherogramm und die Gelelektrophorese aus Abbildung 12 zeigen, dass die eRNA vor allem aus den ribosomalen 18S und 28S Untereinheiten besteht. Die eRNA induzierte die Freisetzung von TNF- α aus THP-1 Makrophagen, während nach Abbau der eRNA keine signifikante Stimulation der TNF- α Freisetzung gemessen werden konnte.

Zum Nachweis von Endotoxin als mögliche Kontamination der eRNA wurde das Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit eingesetzt (Punkt 3.4.4). Erst in der fünffachen Menge der sonst für Stimulationen verwendeten Menge von 10 $\mu\text{g/ml}$ RNA konnten im Mittel 4,82 pg/ml Endotoxin nachgewiesen werden (Tab. 28). Die Menge von 5 pg/ml LPS induzierte jedoch weder eine Genexpression, noch eine Freisetzung von TNF- α in Maus-Makrophagen. Erst eine Stimulation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS konnte eine signifikante Freisetzung und Expression von TNF- α induzieren (Abb. 13).

eRNA ($\mu\text{g/ml}$)	10	50	100
LPS (pg/ml)	0	0	0
	0	18,94	48,58
	0	0	0,26
	0	4,27	34,92
	0	5,73	40,41
	0	0	0,50
<LPS> (pg/ml)	0	4,82	20,78
SD (pg/ml)	0	6,71	20,91

Tab. 28: Endotoxin-Nachweis von eRNA-Proben

Jeweils 6 Proben unterschiedlich konzentrierter eRNA (10, 50 und 100 $\mu\text{g/ml}$) wurden auf LPS untersucht. Die Messwerte sind mit Mittelwert <LPS> und Standardabweichung (SD) in pg/ml angegeben.

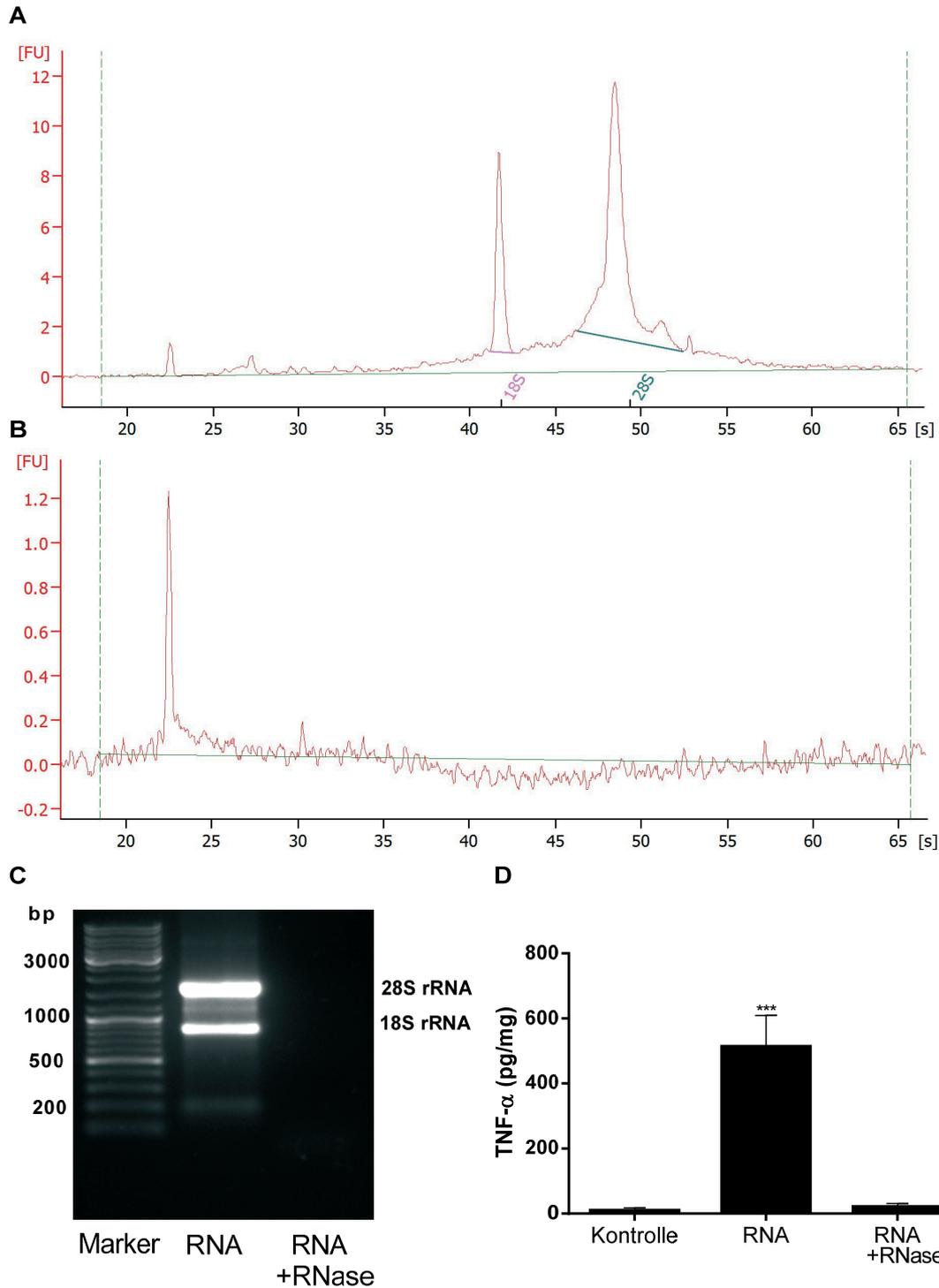


Abb. 12: Analyse der eRNA

(A) zeigt das Elektropherogramm der verwendeten eRNA mit den sichtbaren Banden für die 18S und 28S Untereinheiten. Die RIN beträgt 9,1. (B) zeigt das Elektropherogramm der verdauten eRNA durch RNase1 (1 µg/ml) nach 2 h Inkubation. (C) In der Gelelektrophorese wurde die verwendete eRNA und durch RNase1 (1 µg/ml) verdaute eRNA im 1,5%-Agarosegel nebeneinander aufgetragen. Als Bandenmarker diente *GeneRuler 100bp DNA-Ladder*, *Fermentas* (D) zeigt die TNF-α Freisetzung von THP-1 Makrophagen nach Stimulation mit eRNA (25 µg/ml) und durch RNase1 (1 µg/ml) verdaute eRNA nach 2h; n=3, ***P≤0,001.

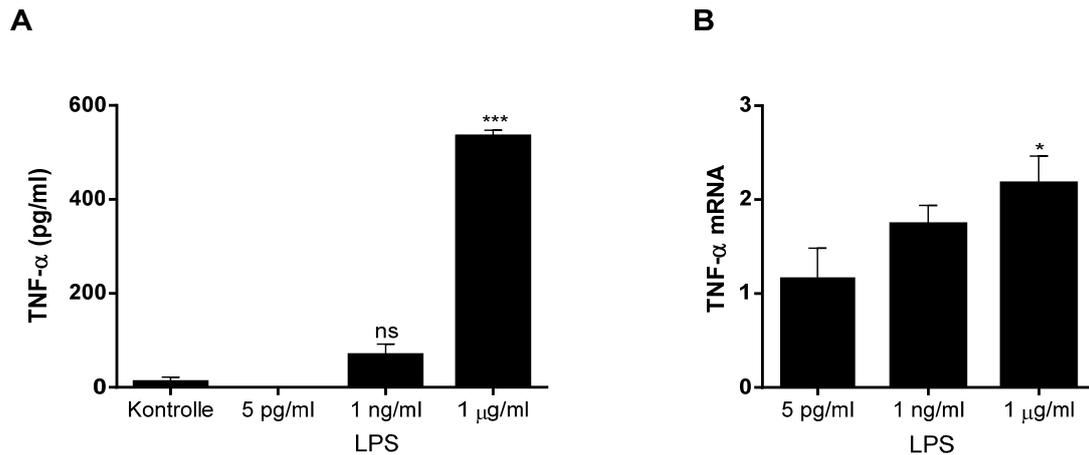


Abb. 13: LPS induzierte TNF- α Freisetzung und mRNA-Expression von Maus-Makrophagen

(A) zeigt die TNF- α Freisetzung von Maus-Makrophagen nach Stimulation mit LPS (5 pg/ml, 1 ng/ml, 1 μ g/ml) nach 2 h; n=4, ns=nicht signifikant, ***P \leq 0,001. (B) zeigt die relative Genexpression (TNF- α mRNA) von TNF- α bei Maus-Makrophagen nach Stimulation mit LPS (5 pg/ml, 1 ng/ml, 1 μ g/ml) nach 2 h; n=3, *P \leq 0,05.

4.1.2 RNA-induzierte TNF- α Freisetzung und mRNA-Expression in Makrophagen

Unsere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass eRNA die Adhäsion und Transmigration von Monozyten durch das Gefäßendothel ins Gewebe fördert und eRNA damit einen wichtigen inflammatorischen Faktor der humoralen Immunabwehr darstellt (Fischer et al. 2013). Dabei führt die Stimulation der Makrophagen durch eRNA zu einer Aktivierung des NF- κ B- Signaltransduktionsweges mit Freisetzung von TNF- α .

Aus zirkulierenden Monozyten können sich gewebsständige Makrophagen entwickeln (Punkt 1.1.1). Um die Aktivierung der Makrophagen näher zu charakterisieren, wurde neben eRNA auch DNA, N-acetyl-Neuraminsäure und künstlich hergestellte Nukleinsäurefragmente zur Stimulation eingesetzt. Bei den Nukleinsäurefragmenten handelt es sich um kurze, aus 21 Basen aufgebaute DNA-Oligonukleotide (Punkt 3.1.1). Diese bilden entweder eine lineare Sekundärstruktur (linear) oder eine sogenannte Haarnadelstruktur (hairpin). Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit LPS und Polysialinsäure (PSA).

Neben LPS und PSA induzierte eRNA eine deutliche TNF- α Freisetzung. Auch die relative Genexpression von TNF- α war in den mit eRNA stimulierten THP-1 Makrophagen erhöht. Die Stimulation mit DNA aus NIH-Fibroblasten konnte keine signifikante TNF- α - Freisetzung und Expression induzieren. Das gleiche Ergebnis konnte bei einer Stimulation mit den Oligonukleotiden Hairpin-1, Hairpin-3 und Linear-6 aufgezeigt werden. Auch N-Acetyl-Neuraminsäure, das Monomer der Polysialinsäure, aktivierte die Makrophagen auf diese Weise nicht (Abb. 14).

Die Ergebnisse bekräftigen, dass eRNA, wie auch LPS und PSA, ein potentes inflammatorisches Signal für Makrophagen darstellt. DNA und DNA-Fragmente konnten die TNF- α Freisetzung und mRNA-Expression nicht beeinflussen.

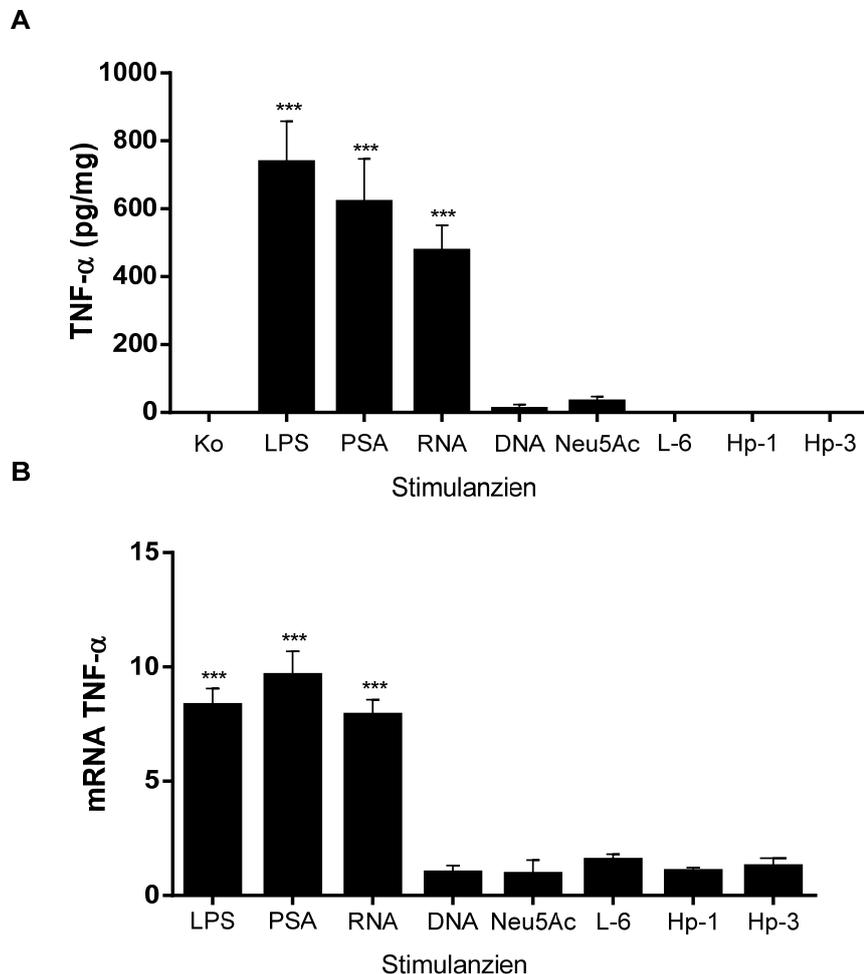


Abb. 14: TNF- α Freisetzung und mRNA-Expression im Vergleich

THP-1 Makrophagen wurden mit LPS (1 μ g/ml), PSA (10 μ g/ml), RNA (10 μ g/ml), Neu5Ac (10 μ g/ml), DNA (10 μ g/ml) und den DNA-Oligonukleotiden Linear-6 (10 μ g/ml), Hairpin-1 (10 μ g/ml), sowie Hairpin-3 (10 μ g/ml) für 2 h stimuliert. Anschließend wurde die **(A)** TNF- α Freisetzung im ELISA und **(B)** die relative Genexpression von TNF- α durch semiquantitative PCR gemessen; n=3-5, ***P \leq 0,001.

4.1.3 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der eRNA-induzierten TNF- α Freisetzung und mRNA-Expression

Um die eRNA induzierte Freisetzung von TNF- α bei Makrophagen näher zu charakterisieren, wurden konzentrationsabhängige und zeitabhängige Stimulationsreihen durchgeführt.

Für die Konzentrationsreihe wurden folgende Konzentrationen von eRNA gewählt: 1, 5, 10, 15 und 20 μ g/ml. Nach 2 h wurden die mRNA-Expression und die Freisetzung von TNF- α gemessen. Mittels ELISA konnte ein Maximum in der Freisetzung von TNF- α

bei der Stimulation von 15 µg/ml eRNA gefunden werden. In der qPCR zeigte sich das Maximum schon bei einer Stimulation mit 5 µg/ml eRNA (Abb. 15). Für weitere Versuche wurde eine Stimulationskonzentration von 10 µg/ml eRNA gewählt. Mit dieser Konzentration wurde sowohl eine signifikante Freisetzung, als auch eine erhöhte mRNA-Expression von TNF-α erreicht.

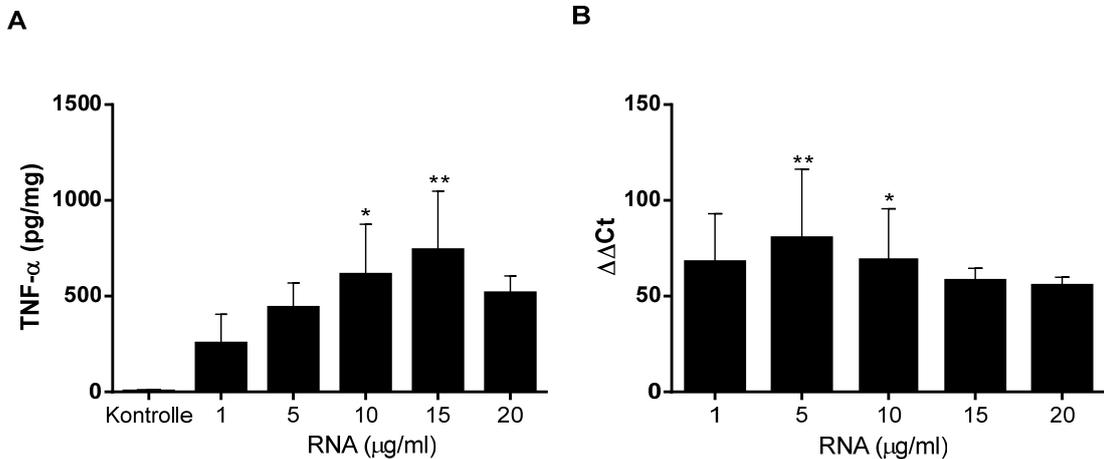


Abb. 15: Konzentrationsabhängigkeit der TNF-α Freisetzung

(A) THP-1 Makrophagen wurden mit eRNA (1, 5, 10, 15, 20 µg/ml) stimuliert und die TNF-α Freisetzung nach 2 h gemessen; n=3, *P≤0,05, **P≤0,001. (B) zeigt die mRNA-Expression von TNF-α nach Stimulation mit gleichen Konzentrationen für 2h gemessen in der qPCR; n=3, *P<0,05, **P≤0,001.

Für die zeitabhängigen Stimulationsreihen wurden die Zeitpunkte 15, 30, 45, 60 und 120 min untersucht. Im ELISA konnte nach eRNA-Stimulation zwischen der 45. und 60. Minute eine signifikante Erhöhung der TNF-α Konzentration im Überstand gemessen werden. Nach 120 min stieg das TNF-α nicht mehr signifikant an und blieb annähernd konstant. Bei der Stimulation mit PSA und LPS wurde erst ab dem Zeitpunkt von 120 min eine signifikante, messbare TNF-α-Freisetzung erreicht (Abb. 16).

Die TNF-α Expression hingegen stieg bei RNA-Stimulation schon nach 30 min an. Bei Stimulationen mit PSA und LPS war eine Erhöhung der TNF-α Expression ab dem Zeitpunkt 60 min bzw. 45 min messbar. Abbildung 17 zeigt die Darstellung der TNF-α Expression als relative Genexpressionsänderung von TNF-α (Punkt 3.3.5).

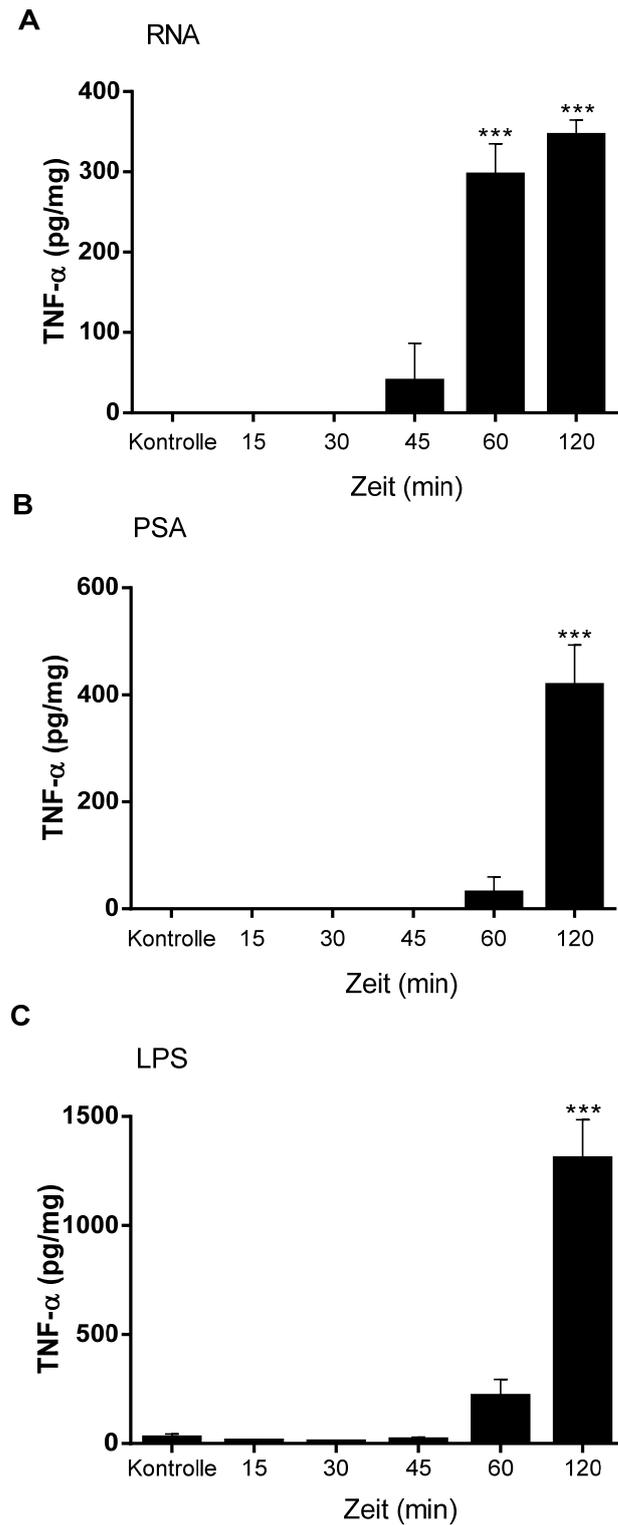


Abb. 16: Zeitabhängigkeit der TNF- α Freisetzung

Stimulation von THP-1 Makrophagen mit (A) 10 μ g/ml RNA, (B) 10 μ g/ml PSA und (C) 1 μ g/ml LPS im angegebenen Zeitintervall und Messung der TNF- α Freisetzung per ELISA; n=3, ***P \leq 0,001.

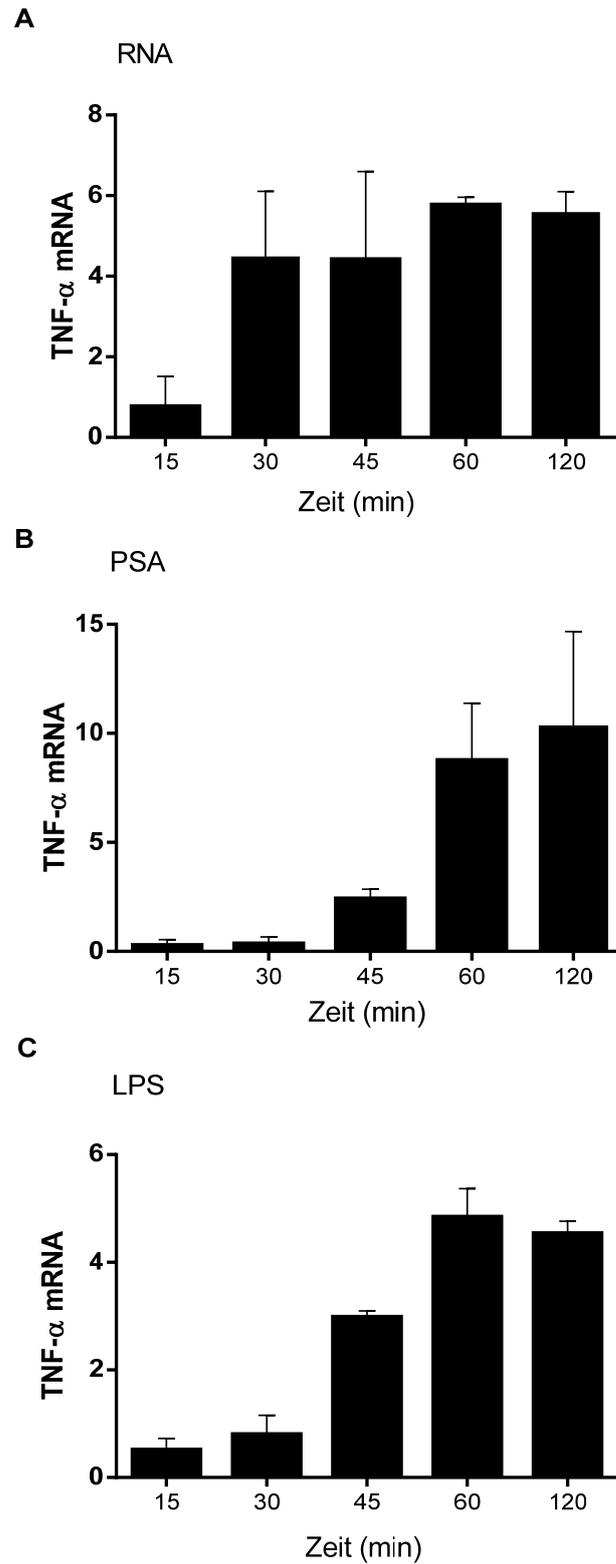


Abb. 17 : Zeitabhängigkeit der TNF-α Expression

Stimulation von THP-1 Makrophagen mit (A) 10 µg/ml RNA, (B) 10 µg/ml PSA und (C) 1 µg/ml LPS im angegebenen Zeitintervall und Darstellung der relativen Genexpression von TNF-α (TNF-α mRNA); n=3.

4.1.4 ADAM17 und ADAM10-abhängige TNF- α Freisetzung

ADAM-Metalloproteasen sind Transmembranproteine zu deren Familie verschiedene ADAM-Varianten gehören (Punkt 1.3.2). Die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 haben einen entscheidenden Einfluss auf die TNF- α Freisetzung bei Makrophagen und dendritischen Zellen der Maus. Diese Tatsache konnte durch Stimulationen mit LPS nachgewiesen werden (Schwarz et al. 2014). Dabei wurde ADAM17 als vorrangig verantwortliche Metalloprotease der LPS-induzierten TNF- α Freisetzung identifiziert. Um zu klären, welche Bedeutung ADAM10 und ADAM17 für die durch eRNA ausgelöste TNF- α Freisetzung haben, wurde bei THP-1 Makrophagen der kombinierte ADAM10/17-Inhibitor GW 208264 und der spezifische ADAM10-Inhibitor GI 254023 eingesetzt. Durch Verwendung des spezifischen ADAM10 Inhibitors GI 254023 konnte zwar eine Minderung, jedoch keine signifikante Reduktion der TNF- α Freisetzung im ELISA gemessen werden. Im Gegensatz dazu reduzierte der Inhibitor GW 208264 die TNF- α Freisetzung von Makrophagen signifikant. Gleiche Ergebnisse mit beiden Inhibitoren wurden auch bei der Stimulation der Makrophagen mit PSA erzielt (Abb. 18).

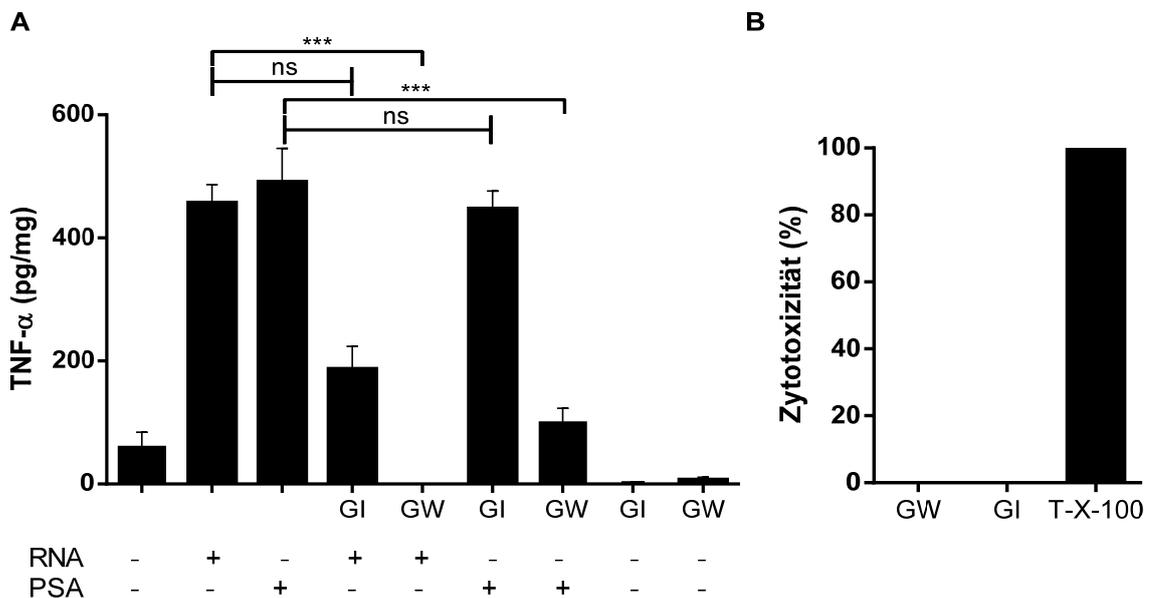


Abb. 18: Einfluss von ADAM 10 und ADAM17 auf die TNF- α Freisetzung

(A) zeigt die TNF- α Freisetzung von THP-1 Makrophagen bei Stimulation mit eRNA (10 μ g/ml) und PSA (10 μ g/ml), sowie der Verwendung des spezifischen ADAM10-Inhibitors GI 254023 (3 μ M, 30 min Vorinkubation) und des kombinierten ADAM10/17-Inhibitors GW 208264 (3 μ M, 30min Vorinkubation); n=3-4, ***P \leq 0,001, ns=nicht signifikant. (B) zeigt die Zytotoxizität beider Inhibitoren gemessen nach 2 h, n=3.

Um die Wirkung von eRNA auf die Genexpression beider Enzyme in Makrophagen festzustellen, wurde eine semiquantitative PCR zur Analyse der mRNA-Expression eingesetzt. Eine Ab- oder Zunahme der mRNA-Expression von ADAM10 und ADAM17 in THP-1 Makrophagen konnte durch Stimulation mit eRNA nach 2 h und Berechnung der relativen Genexpression nicht nachgewiesen werden (Abb. 19).

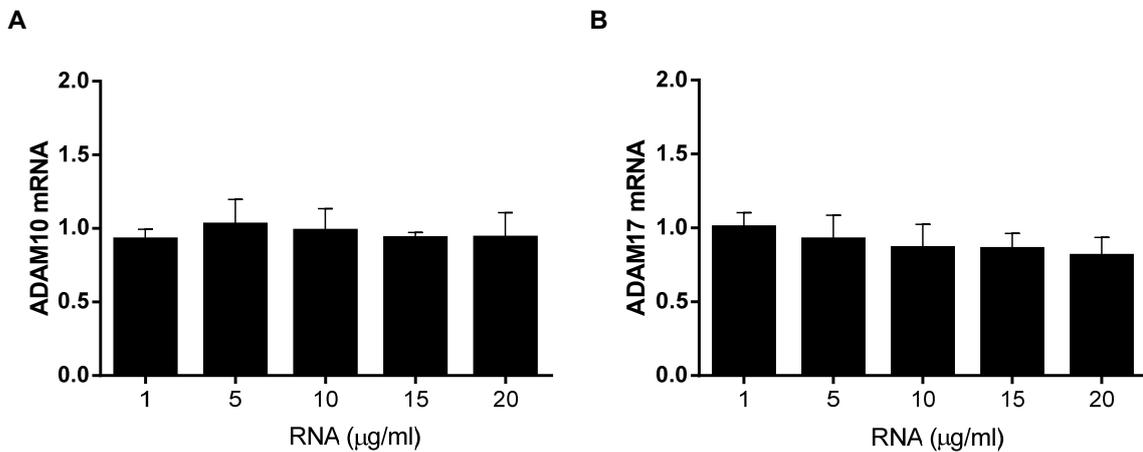


Abb. 19: Einfluss von eRNA auf die Genexpression von ADAM10 und ADAM17

Die relative Genexpression von (A) ADAM10 und (B) ADAM17 in THP-1 Makrophagen wurde bei Stimulation mit eRNA nach 2 h in der semiquantitativen PCR gemessen; n=3.

4.1.5 Sekundäre Effekte als Folge der TNF- α Freisetzung

Um festzustellen, ob es sich bei der eRNA-induzierten TNF- α Freisetzung um einen selbstverstärkenden, autokrinen Freisetzungsmechanismus über Rezeptoren der TNF- α Superfamilie selbst handelt (Punkt 1.3.1), wurden die THP-1 Makrophagen in Gegenwart eines Antagonisten mit eRNA oder PSA stimuliert. Nach zweistündiger Stimulation waren keine signifikanten Abnahmen von TNF- α mittels ELISA festzustellen (Abb. 20).

Um einen zytotoxischen Effekt durch freigesetztes TNF- α auszuschließen, wurden die THP-1 Makrophagen mit TNF- α (1 ng/ml) für 2 h stimuliert und die LDH-Freisetzung gemessen. Die gewählte Konzentration von 1 ng/ml TNF- α liegt wesentlich höher als die durch Makrophagen freigesetzte Menge an TNF- α im Pikogrammbereich (1 ng=1000 pg, Abb. 20).

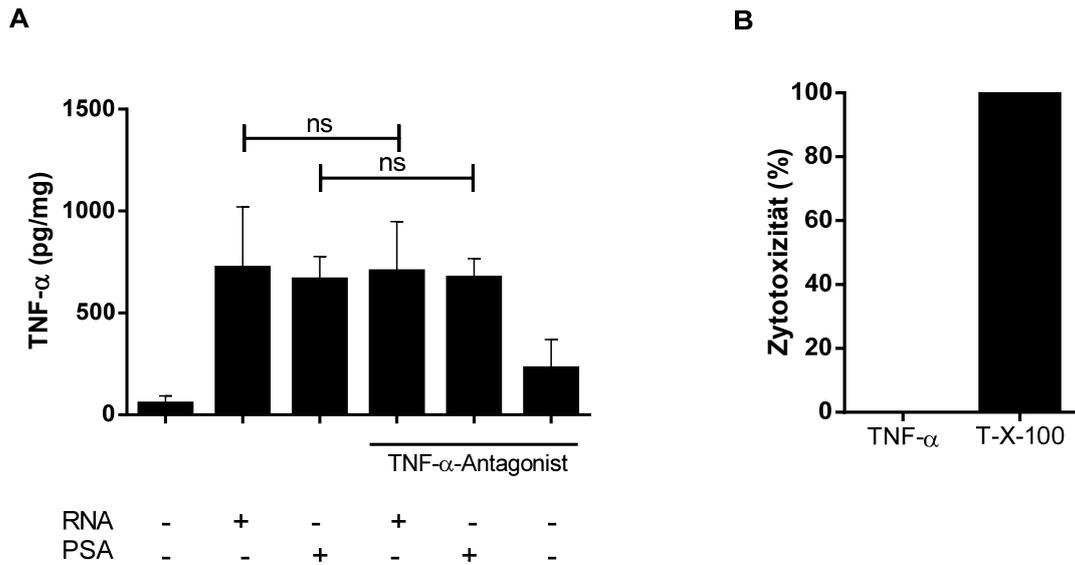


Abb. 20: Sekundäre Effekte der TNF- α Freisetzung

(A) zeigt die TNF- α Freisetzung von THP-1 Makrophagen bei Stimulation mit eRNA (10 μ g/ml) und PSA (10 μ g/ml) für 2 h und unter Präsenz des TNF- α -Antagonisten (100 μ M, Vorinkubation 30 min); n=3, ns=nicht signifikant. (B) zeigt die Zytotoxizität bei der Stimulation von THP-1 Makrophagen mit TNF- α (1 ng/ml) im Vergleich zur Stimulation mit 2%-igem Triton-X-100; n=3.

4.2 Analyse der durch eRNA aktivierten Signaltransduktionswege in Makrophagen

4.2.1 Expression inflammatorischer Zytokine und Aktivierung der Caspase-1

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist an der Genexpression verschiedener inflammatorischer Gene beteiligt (Punkt 1.1.3). Dabei beeinflusst die Stimulation mit eRNA auch die Expression der Zytokine IL-1 β , IL-8, CCL3 und CCL4 in THP-1 Makrophagen (Abb. 21 und 22).

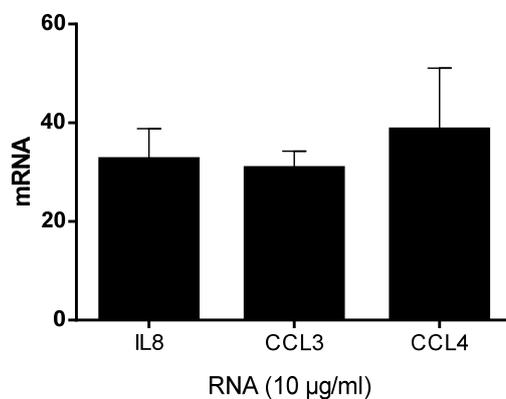


Abb. 21: RNA-induzierte mRNA-Expression weiterer Zytokine

Relative Genexpression (mRNA) der Zytokine IL-8, CCL3 und CCL4 in THP-1 Makrophagen nach 2 h durch eRNA-Stimulation (10 μ g/ml) im Vergleich; n=3.

Am Beispiel des Entzündungsmediators IL-1 β wurde zusätzlich durch Stimulation von eRNA in der Konzentrationsreihe (1, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{g/ml}$) die Erhöhung der IL-1 β Expression nach 2 h nachgewiesen. Mittels qPCR konnte eine signifikante Erhöhung der Expression bei Stimulation mit 5 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ eRNA gemessen werden (Abb. 22).

Um auch die Freisetzung von IL-1 β mit dem schnellen „Shedding“ von TNF- α vergleichen zu können, wurde ein Messzeitpunkt von 24 h festgelegt und die IL-1 β Freisetzung per ELISA gemessen. Als Positivkontrolle für eine suffiziente Caspase-1 Aktivierung wurde die kombinierte Stimulation von N-Acetyl-Cystein (NAC) und LPS gewählt. Beide Stimulantien induzieren zusammen sowohl die Expression von IL-1 β , als auch dessen Freisetzung (Parmentier et al. 2000).

Die Kostimulation mit LPS und NAC induzierte auch in diesem Versuchsansatz nach 24 h eine signifikante IL- β Freisetzung. eRNA konnte nach 24 h keine signifikante IL-1 β Freisetzung induzieren.

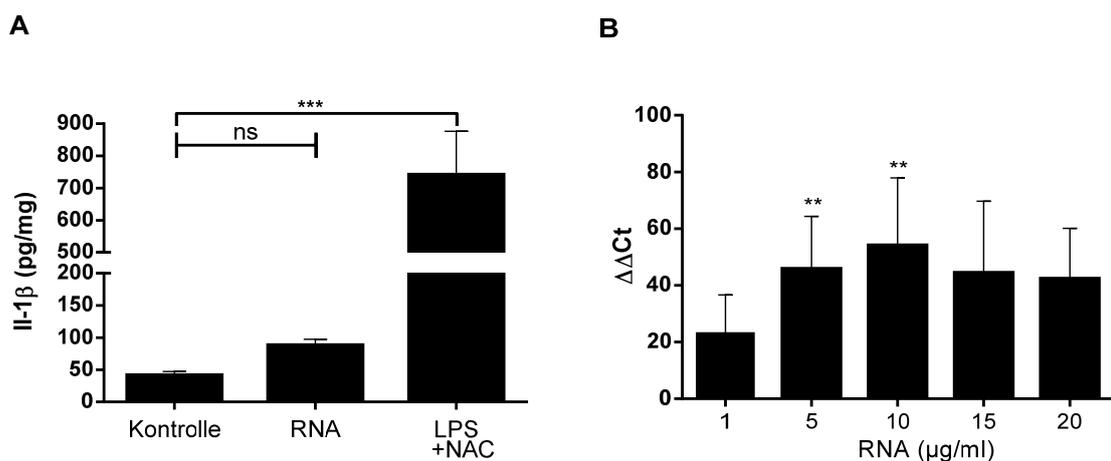


Abb. 22: Einfluss von RNA auf die IL-1 β Freisetzung und mRNA-Expression

(A) zeigt die IL-1 β Freisetzung von THP-1 Makrophagen nach 24 h bei einer Stimulation mit eRNA (10 $\mu\text{g/ml}$) und LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) + NAC (5 mM); n=3, ***P \leq 0,001, ns=nicht signifikant. (B) zeigt die mRNA-Expression von IL-1 β nach 2 h in THP-1 Makrophagen bei Stimulation mit 5 und 10 $\mu\text{g/ml}$ eRNA in der qPCR; n=5, **P \leq 0,01.

4.2.2 Inhibition von Signaltransduktionswegen

Zur Bestimmung der durch eRNA aktivierten Signaltransduktionswege wurden die THP-1 Makrophagen zusammen mit verschiedenen Inhibitoren von intrazellulären Regulatorproteinen und dem Enzym ADAM17 inkubiert, mit eRNA stimuliert und anschließend die mRNA-Expression und die TNF- α Freisetzung gemessen (Abb. 23).

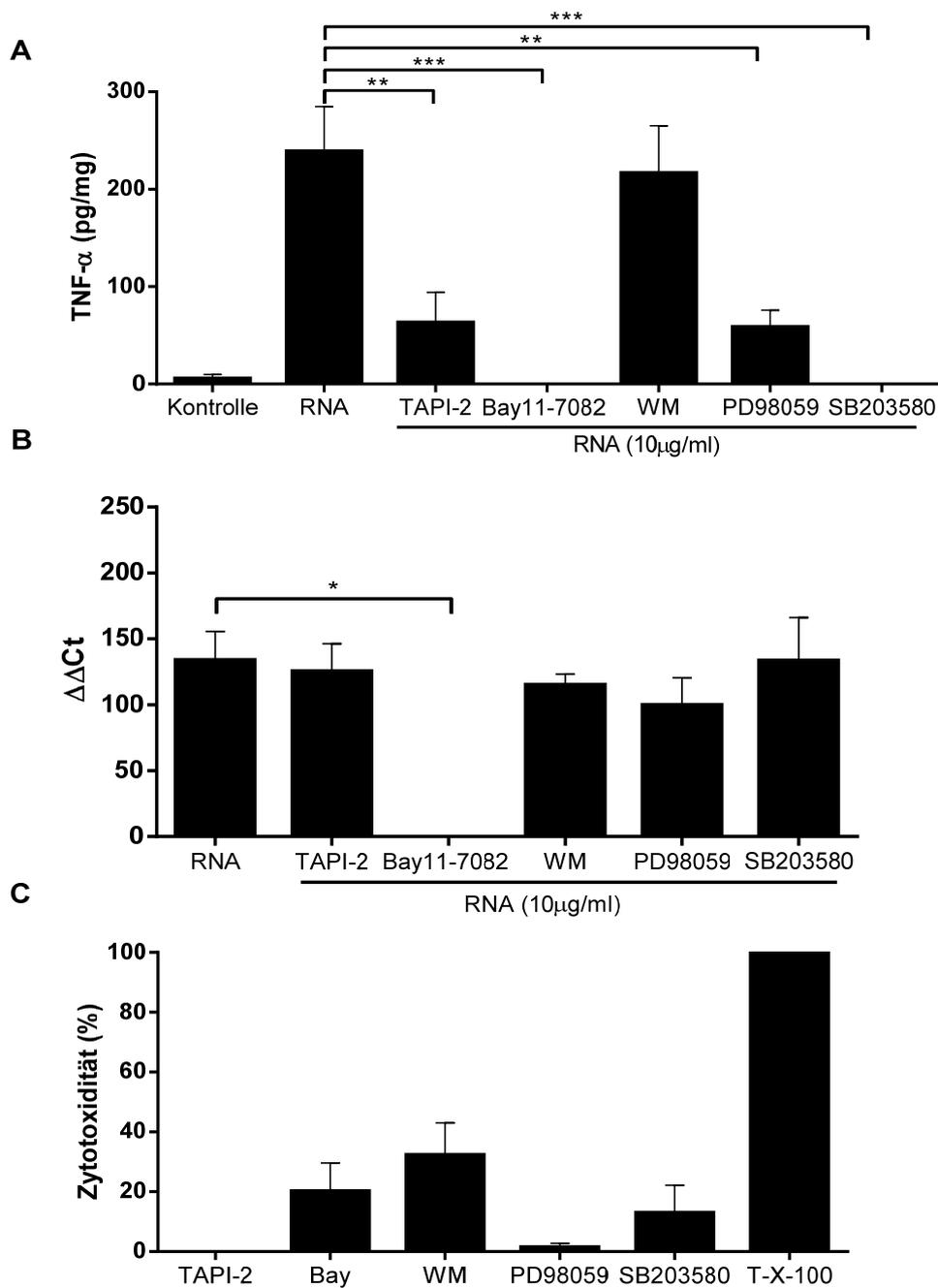


Abb. 23: TNF- α Freisetzung und Expression verschiedener Inhibitoren im Vergleich

THP-1 Makrophagen wurden 30 min mit den Inhibitoren TAPI-2 (10 μ g/ml), Bay 11-7082 (10 μ M), Wortmannin (100 μ M) und den MAP-Kinase Inhibitoren PD 98059 (20 μ M), SB 203580 (10 μ M) vorinkubiert und anschließend mit eRNA (10 μ g/ml) für 2 h stimuliert. **(A)** zeigt die durch Stimulation mit den Inhibitoren gemessene TNF- α Freisetzung; n=3-5, **P \leq 0,01, ***P \leq 0,001. **(B)** zeigt die mRNA-Expression von TNF- α in der qPCR; n=3,*P \leq 0,05. **(C)** zeigt die Zytotoxizität der verwendeten Inhibitoren nach 2 h im Vergleich zu Triton-X-100 2%; n=3.

Als ADAM17-Inhibitor wurde der TNF-protease-inhibitor-2 (TAPI-2) verwendet. TAPI-2 beeinflusst nicht die mRNA-Expression des Tumor-Nekrose-Faktors α , reduzierte jedoch signifikant die durch eRNA induzierte TNF- α Freisetzung. Der irreversible κ B-Kinase-Inhibitor Bay 11-7082 hemmte in diesem Modell fast vollständig sowohl die mRNA-Expression von TNF- α , als auch dessen Freisetzung. Ebenfalls wurde die Freisetzung von TNF- α durch den MAP-Kinase-Inhibitor SB 203580 signifikant blockiert und damit die MAP-Kinase p38 unterdrückt. Die mRNA-Expression von TNF- α wurde hingegen durch diesen Inhibitor nicht signifikant gehemmt. Auch der MAP-Kinase-MEK1-Inhibitor PD 98059 führte zur Reduktion des „Sheddings“ von TNF- α durch eRNA, jedoch zu keiner signifikanten Reduktion der Genexpression von TNF- α . Der Phosphoinositid-3-Kinase-(PI3K)-Inhibitor Wortmannin hatte keinen signifikanten Einfluss auf die TNF- α Expression und Freisetzung der RNA-Stimulation. Mittels LDH-Messung konnte der Einfluss der Inhibitoren auf die Zellvitalität festgestellt werden, wobei Wortmannin die stärkste zytotoxische Wirkung auf die Makrophagen ausübte. Durch Stimulation mit eRNA wurde auch die Phosphorylierung von Proteinen des NF- κ B Signaltransduktionsweges, wie der MAP-Kinase p42 und des NF- κ B-Inhibitors I κ B α , durch Western-Blot Analyse untersucht (Abb. 24). Dabei waren die Phosphorylierungsprodukte schon zu einem frühen Zeitpunkt (30 min) nachweisbar.

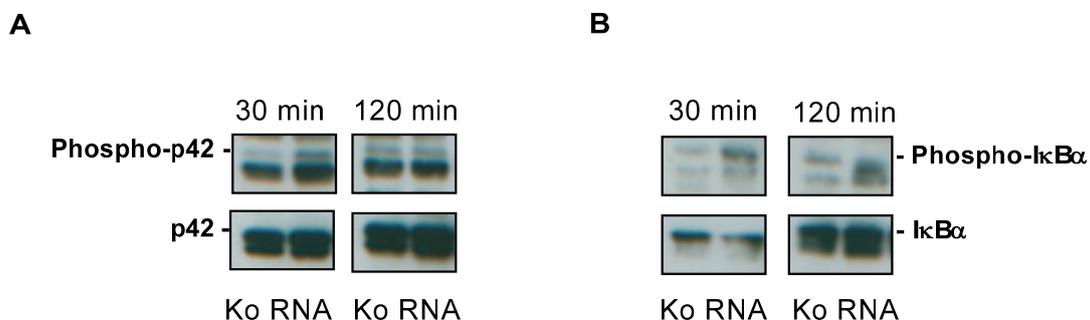


Abb. 24: Durch eRNA induzierte Phosphorylierungsreaktionen

(A) zeigt die Phosphorylierung der MAP-Kinase p42 (obere Bande) von THP-1 Makrophagen durch Stimulation mit eRNA (25 μ g/ml) nach 30 und 120 min. (B) zeigt die Phosphorylierung von I κ B α von THP-1 Makrophagen (obere Bande) durch Stimulation mit eRNA (25 μ g/ml) nach 30 und 120 min.

4.2.3 Rolle des Proteins MyD88 in der eRNA induzierten TNF- α Freisetzung

Auch Maus-Makrophagen reagieren auf Stimulation von eRNA aus murinen NIH-Zellen (*self*-RNA) mit einer TNF- α Freisetzung und Expression (Abb. 25). Durch Stimulation von MyD88^{-/-}-Makrophagen der Maus wurde die Rolle des MyD88-Regulatorproteins in der Erkennung von eRNA untersucht. Als Vergleich dienten Makrophagen von Wildtypmäusen (wt). Die Stimulationszeit für alle Zellen betrug 2 h. Die Differenzierung der Zellen wurde in der FACS-Analyse verifiziert (Punkt 3.2.1).

Im Vergleich zu den stimulierten Zellen vom Wildtyp induzierte eRNA bei den MyD88^{-/-}-Makrophagen keine signifikante TNF- α Freisetzung und Expression. Die TNF- α Freisetzung durch LPS war bei den MyD88^{-/-}-Zellen im Vergleich zu Zellen des Wildtyps ebenfalls signifikant reduziert (Abb. 25).

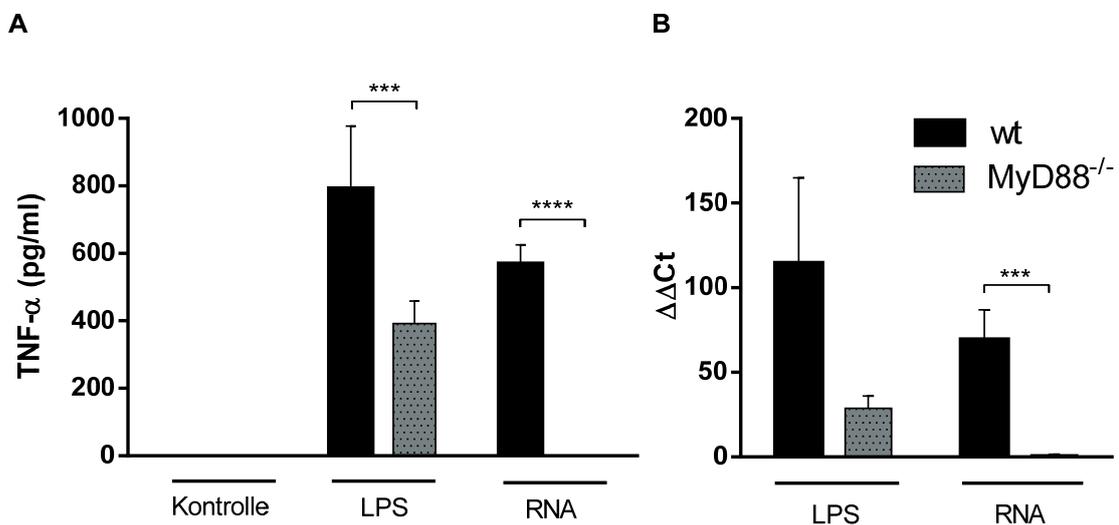


Abb. 25: Durch eRNA induzierte TNF- α Freisetzung und Expression von Maus-Makrophagen

Maus-Makrophagen von wt- und MyD88^{-/-}-Mäusen wurden mit LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) und RNA (10 $\mu\text{g/ml}$) für 2 h stimuliert und (A) die TNF- α Freisetzung und (B) TNF- α Expression beider Mauslinien verglichen; n=3, ****P \leq 0,0001, ***P \leq 0,001.

4.2.4 Rolle von Toll-like-Rezeptoren bei der TNF- α Freisetzung von Makrophagen

Die Ergebnisse aus Punkt 4.2.3 rücken den Einfluss von Toll-like-Rezeptoren in der eRNA-Erkennung in den Vordergrund. Initiale Versuche mit dem TLR-4 Antagonisten Cli-095 zeigten ebenfalls eine Reduzierung der TNF- α Freisetzung und mRNA-Expression (Abb. 26).

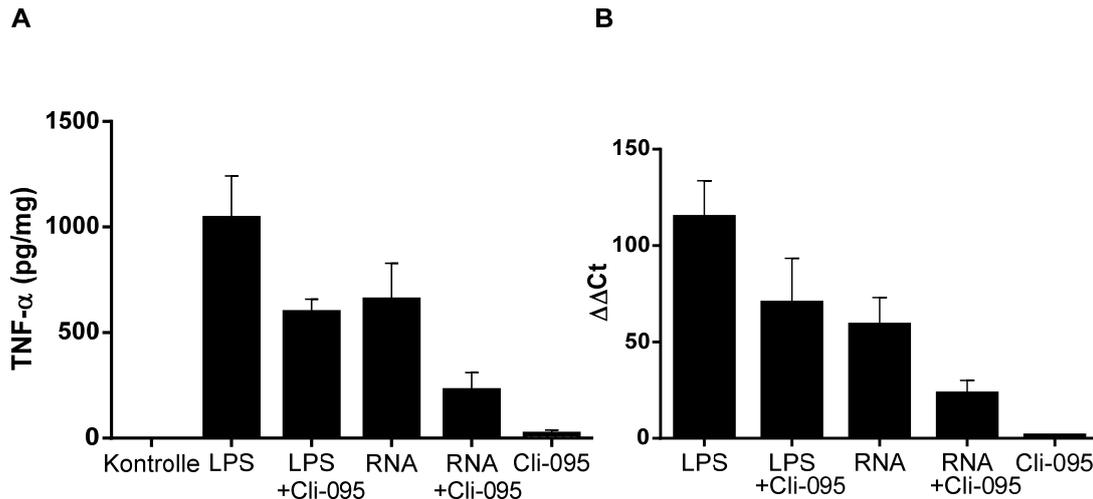


Abb. 26: Rolle des TLR-4 bei der TNF- α Freisetzung und mRNA-Expression

(A) zeigt die Freisetzung von TNF- α in THP-1 Makrophagen bei Stimulation für 2 h mit LPS (1 μ g/ml) und RNA (10 μ g/ml), sowie der Verwendung des TLR-4-Antagonisten Cli-095 (20 μ M, Vorinkubation 30 min); n=3. (B) zeigt die TNF- α Expression der THP-1 Makrophagen gemessen in der qPCR bei gleicher Stimulationsreihe; n=3.

Um den Einfluss verschiedener Toll-like-Rezeptoren der Makrophagen auf die TNF- α Freisetzung zu vergleichen, wurden die THP-1 Makrophagen mit verschiedenen Toll-like-Rezeptor-Agonisten stimuliert. Neben LPS als TLR-4 Agonist wurden die Zellen mit dem TLR-3 Agonisten Poly(I:C) und den TLR-7/8 Agonisten Clo75 und R848 inkubiert. Zur Untersuchung des Toll-like-Rezeptors 2 wurde der Agonist Pam2CSK4 verwendet. Da die Toll-like-Rezeptoren 3,7,8 in den Endosomen der Zellen lokalisiert sind und eine mögliche Aktivierung durch eRNA deren Aufnahme erfordert, wurden längere Stimulationszeitpunkte gewählt.

Die Verwendung der Rezeptor-Agonisten LPS (TLR-4) und PAM2CSK4 (TLR-2) zeigte schon nach 2 h sowohl eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression von TNF- α , als auch eine signifikante Freisetzung von TNF- α . Die Stimulation mit endosomalen Toll-like-Rezeptor-Agonisten konnte in diesem Versuchsansatz keine signifikante Erhöhung der TNF- α -Freisetzung und Expression induzieren (Abb. 27). Weitere Untersuchungen bezüglich des Einflusses der membranständigen TLR-2 und TLR-4 in der eRNA-Erkennung wurden ausgehend von diesen Ergebnissen intensiviert und sind Gegenstand weiterer Forschungsfelder unserer Arbeitsgruppe geworden.

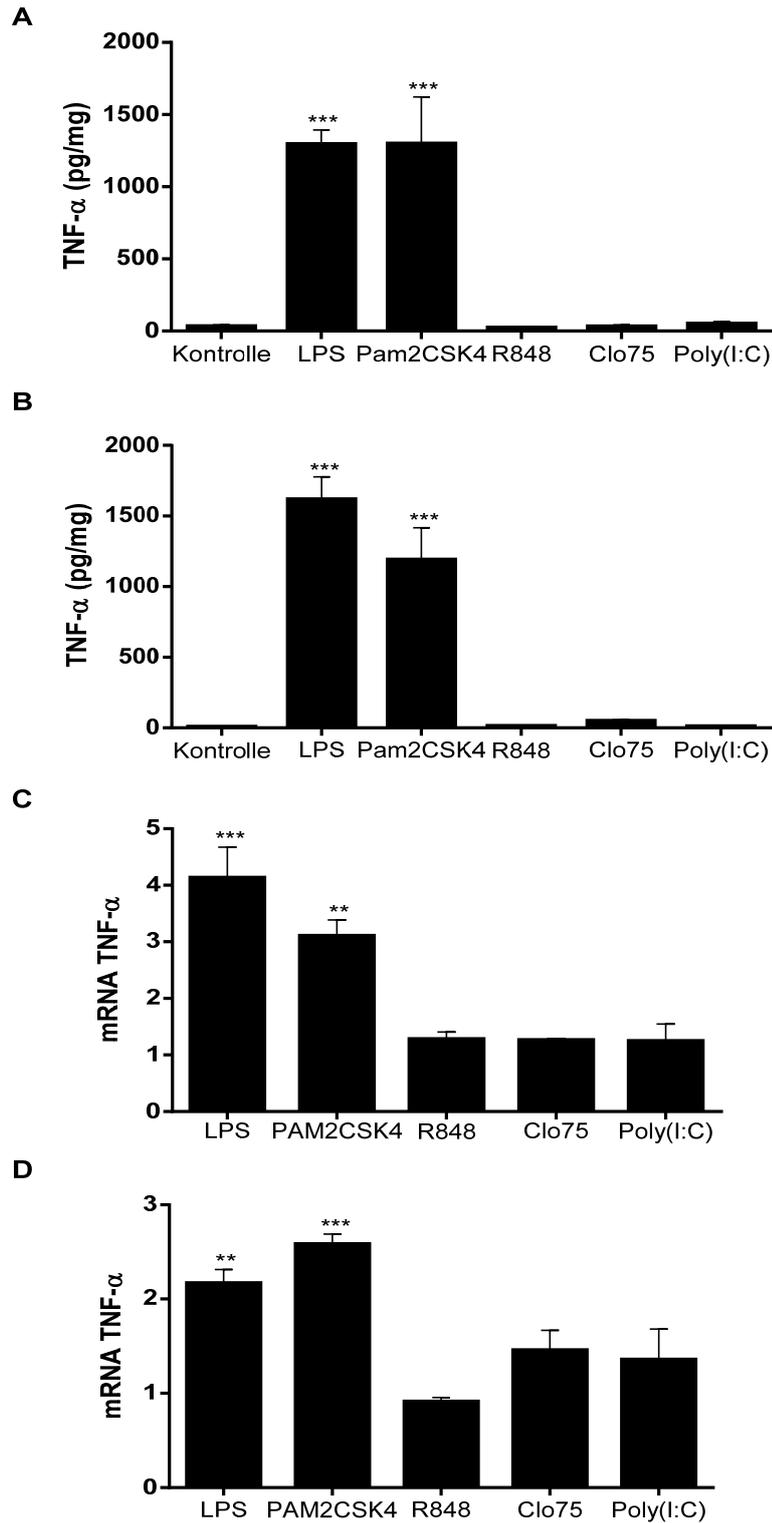


Abb. 27 : Rolle der Toll-like-Rezeptoren bei der TNF-α Freisetzung und mRNA-Expression

THP-1 Makrophagen wurden mit den Agonisten LPS (1 µg/ml), Pam2CSK4 (1 µg/ml), R848 (1 µg/ml), Clo75 (1 µg/ml), und Poly(I:C) (5 µg/ml) für **(A)** 2 h und **(B)** 24 h stimuliert und deren TNF-α Freisetzung per ELISA gemessen; n=3-4, ***P≤0,01. Mittels semi-quantitativer PCR konnte die relative Genexpression von TNF-α unter Einfluss der Agonisten nach **(C)** 2 h und **(D)** 24 h gemessen werden; n=3-4, **P≤0,01, ***P≤0,001.

5. Diskussion

Die Funktionen von Nukleinsäuren sind vielfältig und lassen sich längst nicht mehr nur auf die Regulation intrazellulärer Prozesse oder die Prozessierung der Erbinformationen reduzieren. Ribonukleinsäuren sind seit mehr als 60 Jahren als Bestandteil des extrazellulären Milieus identifiziert (Mandel und Métais 1948). Zunehmend rückt ihre Bedeutung als extrazellulärer, humoraler Mediator in das Blickfeld wissenschaftlichen Interesses in der Biomedizin.

Das extrazelluläre Kompartiment und der interzelluläre Informationsaustausch tragen wesentlich zur Integrität und Funktionalität von Geweben bei. Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen den Einfluss von eRNA auf die TNF- α Freisetzung und mRNA-Expression von Makrophagen. Die Tatsache, dass auch körpereigene RNA im extrazellulären Milieu proinflammatorisch wirken kann, eröffnet dabei einen neuen Blickwinkel auf die Funktionsweise unseres Immunsystems und bekräftigt die Rolle von eRNA als Alarmsignal in unserem Körper.

In den dargestellten Ergebnissen wurde eRNA aus murinen NIH-Fibroblasten verwendet. Makrophagen wurden anschließend mit der vorwiegend aus ribosomalen Bestandteilen bestehenden eRNA stimuliert und reagierten mit einer TNF- α Freisetzung. Es handelt sich daher um einen Versuchsansatz, welcher aufzeigt, dass eRNA ohne vorherige Vorbehandlung von Zielzellen *in vitro* wirken kann. Damit steht die Arbeit im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Veröffentlichungen, bei denen für den Nachweis der Aktivität von eRNA häufig eine Änderung der Kulturbedingungen von Donorzellen durch Hypoxie, Stimulation mit Zytokinen oder eine Veränderung der Zielzellen beispielsweise durch Behandlung mit *Lipofectamine* nötig ist (Cabrera-Fuentes et al. 2015; Feng et al. 2015; Karikó et al. 2004). Bei *Lipofectamine* handelt es sich um ein Transfektionsreagenz, welches das endosomale Einschleusen von Nukleinsäuren in die Zelle vermitteln kann. Daher ist in diesen Veröffentlichungen der Fokus auf die intrazelluläre RNA-Zell-Interaktion gerichtet. Unter Punkt 5.4 wird auf die endosomale Rezeptoraktivierung durch eRNA noch genauer eingegangen werden. Die in dieser Dissertation erhobenen Ergebnisse können im Unterschied dazu wichtige Erkenntnisse für die Untersuchung von extrazellulärer RNA-Zell-Interaktion bieten.

5.1 Körpereigene RNA als Danger-associated molecular pattern (DAMP)

Körpereigene oder endogene Proteine, die eine Immunantwort des Körpers generieren können, werden zu der Gruppe der DAMP gezählt (siehe Punkt 1.1.2). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eRNA ebenso wie LPS und PSA die Freisetzung und mRNA-Expression von TNF- α in Makrophagen initiiert (Abb. 14). Das Enzym RNase1 stellte

dabei in diesem experimentellen Ansatz einen potenten antiinflammatorischen Gegenspieler dar, der die TNF- α Freisetzung signifikant reduzierte (Abb. 12). DNA und kurze DNA-Nukleinsäuresequenzen konnten keine TNF- α Freisetzung oder Expression des Zytokins hervorrufen (Abb. 14).

Über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B kann das Zytokin TNF- α andere Immunzellen stimulieren und Entzündungsprozesse regulieren (siehe Punkt 1.3.1). Dieser Zusammenhang bekräftigt die Rolle von eRNA als proinflammatorischen Aktivator im menschlichen Immunsystem.

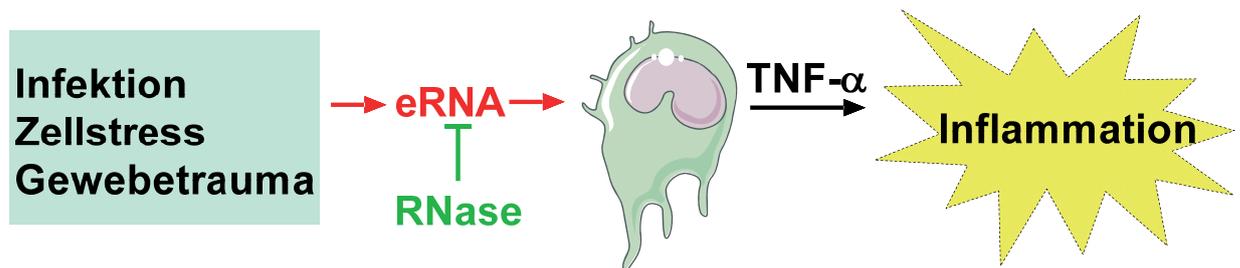


Abb. 28: eRNA vermittelte TNF- α Freisetzung von Makrophagen

Die Freisetzung von eRNA führt zur Aktivierung von Makrophagen mit Freisetzung des Zytokins TNF- α .

eRNA wird in der Literatur meist als totale, extrazelluläre RNA angegeben und ihr Aufbau und ihre Zusammensetzung sind folglich nur unzureichend beschrieben. Daher folgte zunächst eine Analyse der verwendeten eRNA (Punkt 4.1.1). eRNA ist aus unterschiedlichen intrazellulären Ribonukleinsäuren und assoziierten Komponenten zusammengesetzt. Sie kann verschiedene extrazelluläre Proteine binden und deren Wirkung beeinflussen (Punkt 1.2.2). Dabei scheint ihr polyanionischer Charakter und vermutlich auch ihre Größe wichtig für die Bindungsfähigkeit zu Proteinen zu sein (Fischer et al. 2007). RNA-Wechselwirkungen mit Proteinen oder Zelloberflächen könnten die funktionellen Wirkungen der eRNA signifikant verändern. Die Gel- und Kapillarelektropherogramme dieser Arbeit zeigen, dass die isolierte RNA aus NIH-Zellen vor allem aus ribosomalen 18S und 28S Untereinheiten besteht (Abb. 12) und belegen frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe (Cabrera-Fuentes et al. 2015; Fischer et al. 2013). Auch eine für die TNF- α Freisetzung relevante Verunreinigung durch Endotoxine konnte zuvor ausgeschlossen werden (Tab. 28 und Abb. 13). Diese Daten schließen jedoch die Beteiligung anderer, quantitativ untergeordneter Ribonukleinsäure-Typen nicht aus. In einem Versuchsmodell wurde beispielsweise die durch Hypoxie induzierte Freisetzung von miRNAs aus Kardiomyozyten nachgewiesen (Chen et al. 2014). Doch auch in diesem Fall stehen die Ergebnisse mit direkter Beteiligung der freigesetzten RNA-Bestandteile aus, zumal miRNAs ihre Wirkung vor

allem intrazellulär entfalten. Die Heterogenität von eRNA macht die Zuordnung zu einem bestimmten Molekül und einem spezifischen Erkennungsmechanismus schwierig. Welche Bestandteile der eRNA aktiv sind und ob dabei bestimmte Nukleotidsequenzen die Voraussetzung für die Aktivierung von Immunzellen sind, ist nicht geklärt. Zwar zeigten schon Kariko et al., dass die Stimulation mit doppelsträngigen mRNAs wichtig für die Rezeptoraktivierung von Nierenzellen via TLR-3 sein kann, jedoch wurden auch in diesem Ansatz artifiziell veränderte Transkripte unter Gebrauch von *Lipofectamine* verwendet, was auf die endosomale Funktion der mRNA hinweist (Karikó et al. 2004).

Weitere experimentelle Untersuchungen müssen klären, ob ribosomale Untereinheiten mit ihren Strukturelementen in der Makrophagen-Aktivierung eine Rolle spielen oder eine RNA-Protein-Interaktion in Betracht zu ziehen ist. Fest steht, dass die hier verwendete eRNA durch einen signifikanten proinflammatorischen Stimulus die TNF- α Freisetzung induzierte. Die Zuordnung von körpereigener eRNA zu den *damage-associated-molecular-pattern* (DAMP) ist daher unter den genannten Umständen zulässig, obwohl die Zuordnung zu Erkennungsmechanismen divers diskutiert werden kann (Punkt 5.4).

Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Einordnung sind die Bedingungen, unter denen eRNA ein Alarmsignal im Körper darstellt. In dieser Arbeit wurde aus Kulturzellen gewonnenes Zellysate als RNA-Quelle verwendet. Die Freisetzung von eRNA kann jedoch auch durch Nekrose induziert werden. Cabrera et al. konnten am Herzen nachweisen, dass eine durch Ischämie bedingte Nekrose in einer endogenen Freisetzung von eRNA resultierte (Cabrera-Fuentes et al. 2015b). Die Wirkung von eRNA auf Rezeptoren des Immunsystems kann sich dabei erst unter den erwähnten Umständen entfalten, beispielsweise bei Zellzerfall mit Freisetzung des Zellinhaltes, während dies unter physiologischen Bedingungen nicht geschieht. Ein Kontakt von endogener RNA aus Fibroblasten, die als Produzenten extrazellulärer Matrix in menschlichen Geweben vorhanden sind, mit Makrophagen wäre daher in vivo durchaus denkbar. Körpereigene eRNA induziert dabei die TNF- α Freisetzung von Makrophagen in das extrazelluläre Milieu. Das Zytokin TNF- α stellt dann wiederum selbst einen effektiven Stimulus für die Monozyten-Transmigration im Sinne einer Verstärkung der Immunantwort dar. Außerdem ist bekannt, dass eRNA die Adhäsion von Monozyten durch Erhöhung der Expression von Oberflächenproteinen wie beispielsweise ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule 1*) erhöht. Dadurch wird die Transmigration von Leukozyten in das extravasale Gewebe gesteigert (Fischer et al. 2012). Dieser Mechanismus der durch eRNA ausgelösten Migration von Zellen bekräftigt daher, wie wichtig die Integrität von Zellmembranen sein kann. Die

Aufrechterhaltung von Zellbarrieren kann daher eine wichtige Grundvoraussetzung für ein antiinflammatorisches Milieu sein. Zudem zeigten Cabreras et al. den Einfluss von eRNA auf die Polarisierung und Genexpression in Makrophagen auf. Dabei nimmt eRNA Einfluss auf die Entwicklung von Makrophagen zu einem proinflammatorischen Phänotyp M1 (Cabrera-Fuentes et al. 2015). Cabrera untermauert mit diesen Ergebnissen, dass Makrophagen nicht nur in Form einer TNF- α Freisetzung und Expression aktiviert werden können, sondern dass eRNA ein umfassendes Alarmsignal im Sinne eines klassischen DAMP von Immunzellen ist.

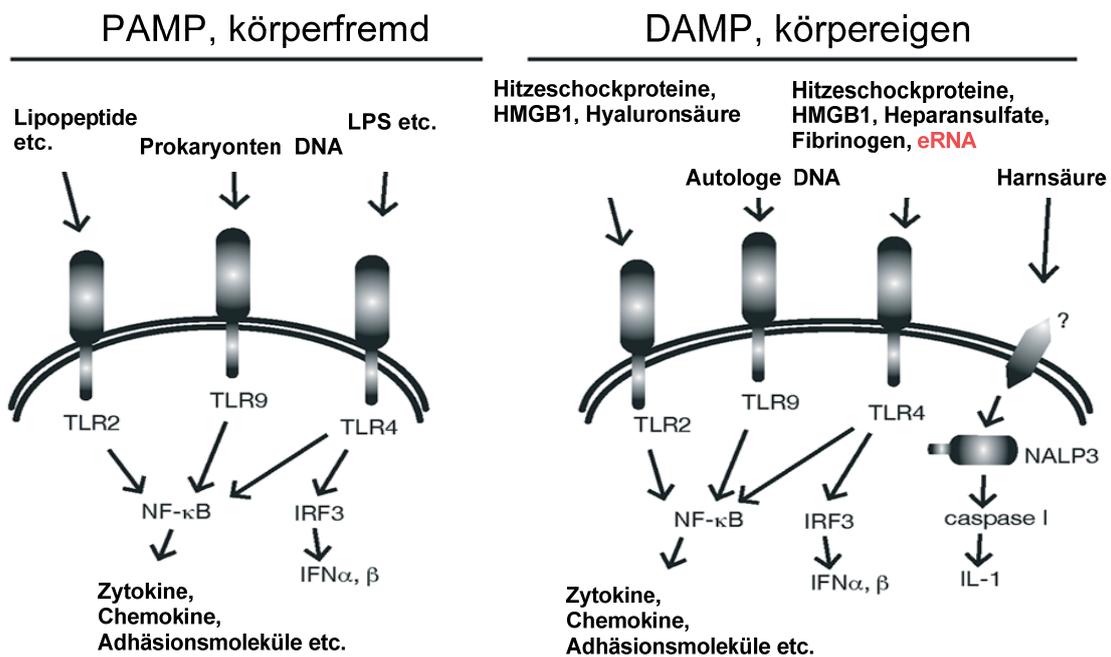


Abb. 29: Wirkung von körperfremden und körpereigenen Alarmsignalen (modifiziert nach Rock und Kono 2008)

Sowohl die Erkennung körperfremder (PAMPs), als auch körpereigener Bestandteile (DAMPs) vermittelt die proinflammatorische Aktivierung von Immunzellen. Ein weiterer Vertreter der körpereigenen Immunaktivierung ist extrazelluläre RNA (eRNA).

5.2 TNF- α als schnelle, humorale Immunantwort

Die Ergebnisse aus Punkt 4.1.3 zeigen, dass der Zeitpunkt der Freisetzung von TNF- α eine rasche Immunantwort widerspiegelt. Schon nach 30 min war eine Expression der TNF- α -mRNA und nach 60 min eine Freisetzung von TNF- α -Protein messbar (Abb. 16 und 17). eRNA aktivierte die Makrophagen im direkten Vergleich sogar am schnellsten. Die Daten zeigen zudem, dass die durch eRNA erzielten Reaktionen durchaus mit anderen Immunstimulanzen wie LPS in Ausmaß und Kinetik der TNF- α Freisetzung vergleichbar sind (Abb. 14). Auch die RNA-Konzentrationsreihe lässt einen

biphasischen Verlauf mit einem Maximum in der mRNA-Expression und Freisetzung von TNF- α erkennen (Abb. 15). Cabrera et al. dagegen konnte eine erhöhte TNF- α Freisetzung von Monozyten erst nach etwa 3 h messen. Auch Stimulationen mit höheren Konzentrationen bis 50 $\mu\text{g/ml}$ zeigten in seiner Arbeit keinen Abfall in der TNF- α Freisetzung (Cabrera-Fuentes et al. 2015). Cabrera et al. verwendete in seinem Modell eRNA aus mit TNF- α behandelten Monozyten und Makrophagen. In diesem Modell ist letztendlich ebenfalls ungeklärt, welche zusätzlichen Faktoren zusammen mit der eRNA zu einer Immunantwort führen. Die Stimulation von Zellen zur Gewinnung von eRNA mit inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α oder IL-6 kann beispielsweise die Produktion weiterer Immunstimulantien, wie Hitzeschockproteine, initiieren (Köller et al. 1993). Deren Einfluss ist durch RNA-Bindung nicht auszuschließen, eine proteolytische Vorbehandlung erfolgte nicht.

Die schnelle Freisetzung von TNF- α aus einem an der Zelloberfläche vorgehaltenen membrangebundenen TNF- α -Pool durch ADAM17 unterscheidet sich grundlegend von der Freisetzung des Zytokins IL-1 β . eRNA allein war in den Ergebnissen dieser Arbeit nicht in der Lage die Caspase-1 in signifikanter Form zu aktivieren und IL-1 β freizusetzen, obwohl sie schon nach 2 h eine signifikante Genexpression von IL-1 β induzieren konnte (Abb. 22). Die Freisetzung von IL-1 β dauerte bei entsprechender Kostimulation auch zeitlich länger.

Es handelt sich bei der IL-1 β Freisetzung um einen bis dato wenig verstandenen Mechanismus. So konnte die Sekretion von IL-1 β via Exozytose und „*Shedding*“ von in Mikrovesikeln gepacktem IL-1 β nachgewiesen werden. Zusätzlich könnte auch die Aufnahme von zytosolischem Interleukin in Autophagolysosomen einen weiteren Freisetzungsmechanismus darstellen (Lopez-Castejon und Brough 2011). Die IL-1 β Freisetzung mit Aktivierung des Inflammasoms spielt auch bei Autoimmunerkrankungen wie dem Lupus erythematoses eine wichtige Rolle. Bei diesem Krankheitsbild kann doppelsträngige, körpereigene DNA zusammen mit ihren Auto-Antikörpern die IL-1 β Freisetzung von Monozyten aktivieren (Shin et al. 2013). eRNA beeinflusste in diesem Versuchsansatz maßgeblich die Freisetzung von TNF- α , nicht aber die von IL-1 β . Erst eine simultane Stimulation mit LPS und N-Acetyl-Cystein (NAC) konnte eine ausreichende IL-1 β Freisetzung mit Aktivierung des Inflammasoms bei THP-1 Zellen auslösen (Parmentier et al. 2000). Ob bei Nekrose oder Inflammation andere endogene Aktivatoren der Caspase-1 freigesetzt werden und dann zusammen mit der eRNA die IL-1 β Freisetzung induzieren könnten, ist jedoch offen. Insgesamt bekräftigt der Vergleich der Freisetzung von TNF- α und IL-1 β nocheinmal die Rolle des Zytokins TNF- α als frühes Alarmsignal im Rahmen entzündlicher Zellprozesse.

Es konnte auch die Erhöhung der Genexpression weiterer Zytokine, wie CCL3, CCL4 und IL-8 nachgewiesen werden (Abb. 21). Dabei ist eine erhöhte Expression und Freisetzung von CCL3 und CCL4 durch eRNA schon bei Monozyten gezeigt worden (Cabrera-Fuentes et al. 2015).

5.3 Regulation der TNF- α Freisetzung

TNF- α kann aus der membrangebundenen Form direkt enzymatisch in eine lösliche Form überführt werden. Dabei war die Stimulation mit eRNA vor allem von ADAM17, aber auch von ADAM10 abhängig (Abb. 18). Ein ähnliches Ergebnis konnte auch bei der Stimulation von Makrophagen mit LPS gezeigt werden (Schwarz et al. 2014). Das nach 60 min keine weitere Erhöhung der TNF- α Freisetzung durch eRNA erfolgte, kann darauf hindeuten, dass der primäre Membranpool an TNF- α erschöpft war oder es zu keiner weiteren Aktivierung von ADAM17 kam (Abb. 16). Inwiefern Exozytose bzw. ein Transport der Membranproteine ADAM17 und pro-TNF- α zwischen Golgi-Apparat und Zellmembran die Höhe der TNF- α Freisetzung beeinflusst, kann Gegenstand weiterer Untersuchungen mit längeren Zeitpunkten sein. Die Expression von ADAM17 und ADAM10 wurde nach 2 h jedenfalls nicht signifikant durch die Konzentration an eRNA beeinflusst (Abb. 19). Auch die Wirkung des freigesetzten TNF- α im Sinne einer auto- oder parakrinen Aktivierung scheint im untersuchten Zeitintervall vernachlässigbar, sodass hier von einem direkten eRNA-Effekt ausgegangen werden kann (Abb. 20).

Interessanterweise lag bei der Stimulation mit eRNA schon etwa 30 min vor der Aktivierung von ADAM17 eine erhöhte Genexpression von TNF- α vor (vergleiche Abb. 16 und 17). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B scheint ein wichtiger Regulator für die Aktivierung dieses Enzyms zu sein. Bei seiner Inhibierung war keine mRNA-Expression, aber auch kein „*Shedding*“ von TNF- α messbar (Abb. 23). Auch die Phosphorylierung des NF- κ B-Inhibitors I κ B lässt auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors schließen (Abb. 24). Posttranslational verminderte die Hemmung der MAP-Kinase p38 die Freisetzung von TNF- α ebenfalls, nicht aber seine Genexpression (Abb. 23). Zudem schien auch die Phosphorylierung der MAP-Kinase p42 eine wichtige Rolle bei dieser Immunaktivierung zu spielen (Abb. 24). Die Beteiligung von MAP-Kinasen bei der Regulation von ADAM17 ist jedenfalls schon länger wissenschaftlich belegt (Black 2002).

Zukünftige Untersuchungen sollten ebenfalls klären, ob eRNA ein ubiquitärer Aktivator von ADAM17 sein kann und bei bestimmten Zelltypen und Konditionen ein bestimmtes Substrat des Enzyms mit spezifischer Wirkung freisetzt. Mittlerweile sind über 70 Substrate von ADAM17 mit Einfluss auf Entzündungsvorgänge, Tumorwachstum, aber

auch Regeneration und Immunabwehr identifiziert (Punkt 1.3.2). So könnte die Freisetzung weiterer Proteine mit dann spezifischen Folgen für Organe und Gewebe verbunden sein und eRNA als ein situationsabhängiges DAMP wirken. In der folgenden Abbildung sind die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die intrazelluläre Aktivierung der Makrophagen durch eRNA detaillierter dargestellt.

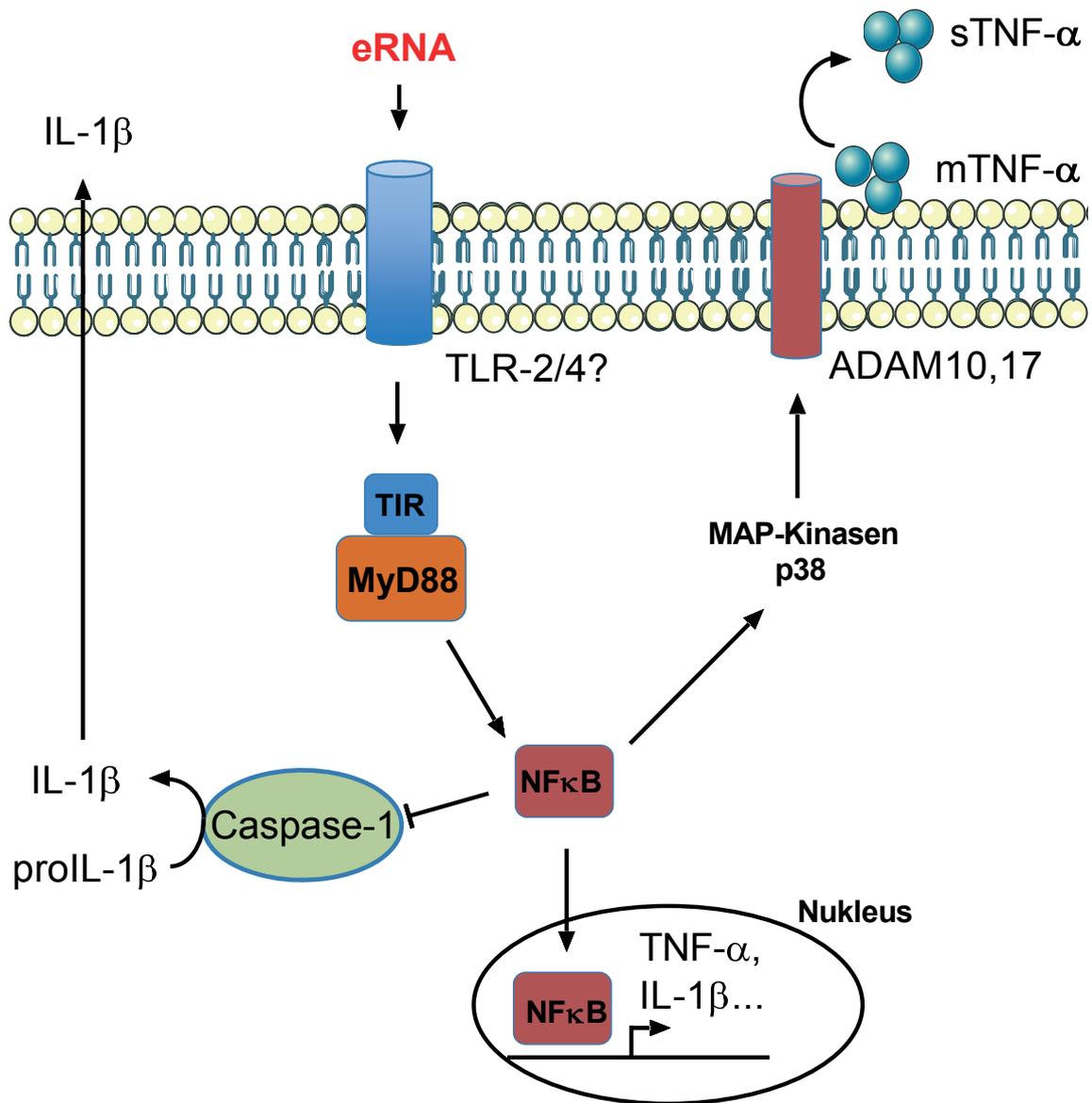


Abb. 30: Zell-Aktivierung durch eRNA

eRNA aktiviert Makrophagen in MyD88- und NF-κB-abhängiger Weise. Die daraus resultierende Aktivierung von MAP-Kinasen ist für die ADAM17 vermittelte TNF-α Freisetzung notwendig. Auch die Genexpression von IL-β wird aktiviert, eine ausreichende Aktivierung des Inflammasoms durch Caspase-1 bleibt jedoch aus. Eine Beteiligung der Toll-like-Rezeptoren 2 und 4 als extrazelluläre RNA-Erkennungsrezeptoren ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Ein weiteres Schlüsselprotein der eRNA-induzierten Aktivierung des NF- κ B Signalweges wurde im Mausmodell (MyD88^{-/-}) als MyD88 identifiziert. Aufgrund der Beziehung zu Toll-like-Rezeptoren wird dieses Ergebnis im nächsten Abschnitt 5.4. diskutiert.

Insgesamt bekräftigen die Daten die Rolle von eRNA als DAMP in der frühen Phase der ausgelösten Immunaktivierung. Der NF- κ B-vermittelte Liberationsmechanismus aus einem an der Membranoberfläche vorgehaltenen pro-TNF-Pool gehört zu einer effektiven Immunantwort bei der Stimulation mit eRNA.

5.4 Die Rolle von Toll-like-Rezeptoren in der Erkennung endogener Ribonukleinsäuren

Die Ergebnisse aus Punkt 4.2.3 ließen erstmals die Beteiligung von extrazellulären Toll-like-Rezeptoren bei der Erkennung von eRNA vermuten, da die Stimulation von MyD88^{-/-}-Makrophagen durch eRNA keine TNF- α Expression und Freisetzung induzieren konnte (Abb. 25). MyD88 ist als ein zentrales Adapterprotein in der NF- κ B vermittelten Signaltransduktion bekannt und interagiert mit diversen endosomalen und extrazellulären Toll-like-Rezeptoren (Punkt 1.1.2). Mehrere Ergebnisse machen in der vorliegenden Arbeit eine Beteiligung endosomaler Rezeptoren bei der eRNA-vermittelten Makrophagenstimulation unwahrscheinlich. Schließlich führten die TLR-2- und TLR-4-Agonisten Pam2CSK4 und LPS zu einer vergleichbaren TNF- α Freisetzung von Makrophagen wie die verwendete eRNA (Abb. 27). Die Verwendung des TLR-4 Antagonisten Cli-095 reduzierte ebenfalls minimal die TNF- α Freisetzung und Expression (Abb. 26). Der Zeitpunkt der TNF- α Expression und Freisetzung setzte im Vergleich zu einer endosomalen Aktivierung ebenfalls vergleichsweise früh ein (Abb. 16 und 17). Durch den Verzicht des Gebrauches von *Lipofectamine*-komplexierter eRNA konnte zudem unphysiologisches Einschleusen der RNA in die Zelle ausgeschlossen werden.

Über die Beteiligung von Toll-like-Rezeptoren bei der Erkennung von eRNA gibt es unterschiedliche Erkenntnisse. Der endosomale TLR-3 wird in unterschiedlichen Publikationen im Zusammenhang mit der Erkennung extrazellulärer Nukleinsäuren genannt. Cavassani et al. zeigten in ihren Ergebnissen den Einfluss von nekrotischen Neutrophilen als Quelle der endogenen RNA auf die Zytokinproduktion von Makrophagen auf. Eine Kokultivierung von Wildtyp-Makrophagen mit von RNase und Benzonase behandelten nekrotischen Neutrophilen reduzierte die Zytokinproduktion (CXCL1 und MIP-2) deutlich. eRNA scheint einen wesentlichen Einfluss auf die Immunantwort der Wildtyp-Makrophagen im Nekrosemodell zu haben. Durch Verwendung von TLR-3^{-/-}-Zellen wurde die Zytokinproduktion bei dieser Kokultivierung

im Vergleich zu Wildtyp-Makrophagen ebenfalls deutlich reduziert (Cavassani et al. 2008). Cavassani schlussfolgert daraus, dass die Aktivierung von Makrophagen durch freigesetzte RNA am TLR-3 erfolgt. Möglich wäre in diesem Modell auch die bei der Nekrose induzierte Freisetzung weiterer TLR-3-Agonisten, die im Zusammenspiel mit der RNA eine Koaktivierung am Rezeptor vermitteln (These der RNA vermittelten Rezeptoraktivierung durch assoziierte Proteine, siehe Punkt 5.5). Für die Vermutung, dass eRNA nur mit dem TLR-3 interagiert, spricht zumindest die fehlende Reduzierung der Zytokinproduktion bei Vorbehandlung mit den Enzymen RNase und Benzonase in den *Knock-out*-Mauszellen. Eine Wirkung an anderen extrazellulären Rezeptoren bleibt in diesem Versuchsansatz somit vermutlich aus. Um dieses jedoch sicher zu bestätigen, fehlen in dieser Veröffentlichung vergleichende Versuchsreihen mit weiteren TLR-*knock-out*-Zellen.

Auch Chan Chen et al. untersuchten den Einfluss von eRNA auf die Aktivierung des TLR-3. In dieser Veröffentlichung induzierte das Material aus nekrotischen Zellen (Makrophagen und Kardiomyozyten) die Freisetzung von Zytokinen (MIP-2) aus Kardiomyozyten. Auch hier konnte die Zytokinfreisetzung von Kardiomyozyten bei Vorbehandlung der nekrotischen Makrophagen mit RNase reduziert werden. Durch Verwendung von TLR-3^{-/-}-Mauszellen konnte die Zytokinfreisetzung (MIP-2) ebenfalls signifikant erniedrigt werden (Chen et al. 2014). Ein genauer Zusammenhang der Beteiligung von eRNA mit Aktivierung des TLR-3 ist aber auch in dieser Arbeit nicht sicher bewiesen, da bei Nekrose neben endogener RNA weitere Agonisten im Versuchsansatz zu finden sein können, die mit oder ohne Beteiligung von RNA eine TLR-vermittelte Signaltransduktion auslösen. Als Beispiel für einen endogenen TLR-3-Agonisten konnte Stathmin, ein Protein des Zytoskelettes, identifiziert werden.

Auch Bretano et al. formulierten die These, dass endogene RNA aus nekrotischen Synovialzellen im Rahmen der rheumatoiden Arthritis Fibroblasten via TLR-3 aktiviert (Brentano et al. 2005). Die Behandlung mit Benzonase und einem im verwendeten Modell spezifisch wirkenden TLR-3-Antagonisten reduzierte die Freisetzung von Zytokinen (IL-6, CXCL 10 und CCL 5). Ein direkter Beweis für den Zusammenhang von RNA mit TLR-3 steht jedoch auch bei diesen Ergebnissen aus, zumal keine Analyse der eRNA erfolgte.

Eine weitere Veröffentlichung rückt den endosomalen TLR-7 in den Mittelpunkt der eRNA-Erkennung (Feng et al. 2015). Die TNF- α Freisetzung von Maus-Makrophagen (MyD88^{-/-}) bei Stimulation mit *Lipofectamine*-komplexierter RNA war ebenfalls signifikant reduziert. Auch durch Verwendung von TLR-7^{-/-}-Mausmakrophagen konnte eine, wenn auch geringere Reduzierung der TNF- α Freisetzung, beobachtet werden. Dass der Effekt der TNF- α Freisetzung erst durch die Stabilisierung mit *Lipofectamine*

zustande kam, macht die Untersuchung eines natürlichen Erkennungsweges jedoch schwierig. Des Weiteren wird auch in dieser Publikation die Phosphorylierung von MAP-Kinasen und Degradation des Inhibitors I κ B α in Makrophagen durch die erwähnte RNA beschrieben. Zudem stellte die Genexpression von MyD88 und nicht die Genexpression von TLR-7 eine Voraussetzung für die Leukozytenmigration dar. Die Ergebnisse von Feng et al. lassen demnach darauf schließen, dass neben der Beteiligung von TLR-7 noch andere Erkennungsmechanismen für eRNA in der Immunaktivierung in Frage kommen müssen.

5.5 Ausblick

Die Beteiligung von körpereigener eRNA an proinflammatorischen und prokoagulatorischen Prozessen im menschlichen Körper ist unbestritten. Die diversen Ergebnisse und Interpretationen zur Erkennung eRNA zeigen jedoch die Vielschichtigkeit dieses Themas auf und schließen an die Diskussion aus Punkt 5.1 an. Da die Zusammensetzung der verwendeten eRNA in verschiedenen Veröffentlichungen nicht präzisiert wurde, ist eine eindeutige Bewertung der Beteiligung von extrazellulären versus endosomalen Toll-like-Rezeptoren kaum möglich. In unserer Arbeitsgruppe wird die Beteiligung der extrazellulären Toll-like-Rezeptoren 2 und 4 in diesem Versuchsmodell weiter erforscht. Dabei scheinen die membranständigen Toll-like-Rezeptoren, vor allem aber Toll-like-Rezeptor 2, wesentlich an der Erkennung von eRNA beteiligt zu sein, vermutlich in Kombination mit primären TLR-Agonisten. Diese schnelle, extrazelluläre Erkennung von Noxen und die daraus resultierende TNF- α Freisetzung sind in diesem Modell ein synergistischer Prozess der Immunabwehr von Makrophagen und zeigen die enge Verknüpfung zwischen dem Alarmsignal eRNA und dem inflammatorischen Zytokin TNF- α auf.

Zukünftige Fragestellungen werden sich voraussichtlich neben der Identifizierung von eRNA-Rezeptoren vor allem damit auseinandersetzen, ob eRNA eher als Vermittler (RNA-Protein-Interaktion) oder eigenständiger Initiator (strukturelle Analysen) einer Immunantwort von Makrophagen angesehen werden kann. Die Beteiligung extrazellulärer TLR-Rezeptoren in der *self*-eRNA-Erkennung bietet dabei ein neues, bis daher kaum beschriebenes Forschungsfeld. Hier müssen Versuche über die Interaktionen von eRNA mit weiteren Komponenten der Zelloberfläche und TLR-Korezeptoren folgen. Eventuell vermittelt eRNA oder ein an ihr gebundenes Protein über Anlagerung an Zellmembranen eine Koaktivierung mehrerer extrazellulärer Rezeptoren (*cross-link*) mit frühzeitiger Aktivierung. Die Bindungsfähigkeit von eRNA an andere Rezeptoragonisten und daraus resultierende Oberflächenaktivierung an Zellmembranoberflächen können daher Schwerpunkte zukünftiger Arbeiten zu werden.

6. Zusammenfassung

Extrazelluläre Ribonukleinsäure (eRNA) wird bei Gewebetraumata, Ischämie oder Tumorwachstum als prothrombotischer, proinflammatorischer und permeabilitätssteigernder Faktor freigesetzt. Über ihre Wirkung auf murine und humane Makrophagen ist jedoch wenig bekannt, sodass ihr Einfluss auf die TNF- α Freisetzung dieser Zellen genauer untersucht wurde.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass eRNA aus murinen Fibroblasten die Freisetzung von TNF- α durch Aktivierung der Metalloproteinase TACE, auch ADAM17 genannt, induziert und als *danger-associated molecular pattern* (DAMP) wirken kann. Dabei wurde TNF- α in zeit- und konzentrationsabhängiger Weise von THP-1 Makrophagen freigesetzt und konnte als Mediator einer frühen Immunantwort per ELISA identifiziert werden. Sekundäre Effekte durch Bindung des freigesetzten TNF- α an TNF-Rezeptoren konnten dabei ausgeschlossen werden. Die spezifische Inhibierung der in der TNF- α Freisetzung aktiven Enzyme ADAM10 und ADAM17 entschlüsselte dabei ADAM17 als hauptverantwortliches Enzym der TNF- α Freisetzung. Auch die Beteiligung von MAP-Kinasen und des NF- κ B Signalweges in der ADAM17-Aktivierung von Makrophagen konnte aufgezeigt werden. Außerdem induzierte eRNA unabhängig von der ADAM17-Aktivierung die mRNA-Expression weiterer inflammatorischer Zytokine, wie IL-1 β , CCL3, CCL4 und IL-8. Im Gegensatz zu LPS war eRNA jedoch nicht in der Lage die Caspase-1 ausreichend zu aktivieren, um IL-1 β freizusetzen. Des Weiteren konnte MyD88 in MyD88^{-/-}-Maus-Makrophagen als weiteres Schlüsselprotein der eRNA-induzierten TNF- α Freisetzung identifiziert werden. Dies führte dazu, dass durch Verwendung weiterer Toll-like-Rezeptor-Agonisten und eines TLR-4-Antagonisten der TLR-2 und TLR-4 in den Mittelpunkt der eRNA induzierten TNF- α Freisetzung rückte. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass extrazelluläre *self*-RNA als DAMP die Freisetzung von TNF- α via extrazellulärer Toll-like-Rezeptoren in Makrophagen zu initiieren vermag.

Abstract

Extracellular RNA (eRNA) is being released as a prothrombotic, proinflammatory and permeability-increasing factor during tissue traumatization, ischemia or tumor growth. However, knowledge is scarce about its effect on murine or human macrophages. Therefore, its influence on the release of TNF- α of these cells needed to be examined more precisely.

The results of this paper show that eRNA can function as a damage-associated molecular pattern (DAMP), and thereby trigger the shedding of bioactive tumor necrosis factor- α (TNF- α) from macrophages, mediated by a TNF- α -converting enzyme (TACE or ADAM17) -a membrane-bound disintegrin metalloproteinase.

The release of TNF- α from macrophages proceeded in a time- and concentration-dependent manner. TNF- α was identified as a mediator of early immune response. Secondary effects caused by a bonding unit of the released TNF- α and TNF-receptors could be excluded. Using specific inhibitors for ADAM17 and ADAM10, both involved in the TNF- α sheddase reaction, ADAM17 was identified to be mainly responsible for the release of soluble TNF- α .

Further it is proven that MAP-kinases and NF- κ B signaling pathways are involved in these inflammatory actions of eRNA. In addition, eRNA induced the mRNA-expression of other cytokines like IL-1 β , CCL3, CCL4, or IL-8 from macrophages, yet by an ADAM17-independent mechanism. Contrary to TNF- α , eRNA could not induce liberation of IL-1 β by activation of caspase-1. Moreover, MyD88 played an important role in the activation of macrophages. Using different Toll-like-receptors-agonists and a TLR-4-antagonist we focused on eRNA recognition by TLR-2 and TLR-4.

These results indicate that extracellular self-RNA functioning as a damage-associated molecular pattern may initiate the inflammatory response by inducing the early release of TNF- α from macrophages and furthermore, Toll-like-receptors 2 and 4 are probably involved in this process.

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Abb	Abbildung
Abs	Absatz
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
APPs- α	Amyloid-Vorläuferprotein α
AS	Aminosäure
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
AUS	Australien
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BEL	Belgien
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CARD	<i>Caspase recruitment protein</i>
cDNA	<i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	<i>Cycle threshold</i>
D	Deutschland
DAMP	<i>Danger-associated molecular pattern</i>
DD	<i>Death-Domain</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ErbB	Rezeptor-tyrosinkinase
eRNA	extrazelluläre RNA
et al.	et alteri (und andere)
F _{ab}	<i>Fragment-antigen-binding</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FADD	Fas-assoziiertes-Protein-mit- <i>Death-Domäne</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FRA	Frankreich

FSAP	Faktor-VII-aktivierende-Protease
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
h	Stunden
HIF1- α	<i>Hypoxia-inducible factor 1-α</i>
Hp	<i>Hairpin</i> , Form der Oligonukleotide
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
ICAM1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
I κ B	Inhibitor von Kappa B
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
INF- β	Interferon β
IRAK	Interleukinrezeptor-assoziierte-Proteinkinase
IRF-3	Interferon-regulierender Faktor 3
kDa	Kilodalton
L	<i>Linear</i> , Form der Oligonukleotide
LAL	<i>Limulus Amebocyte Lysate</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
L929	Murine Fibroblasten-Zelllinie
M	Molar (Mol pro Liter)
MAD2	<i>Mitotic arrest deficient 2</i>
MAP-Kinasen	<i>Mitogen activated protein</i> -Kinasen
M-CSF	<i>Macrophage colony stimulating factor</i>
MEK1=MAP2K1	<i>Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>
MF	Multiplikationsfaktor
mg	Milligramm
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MIP-2	<i>Macrophage inflammatory protein 2</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
mol	Mol ($6,023 \times 10^{23}$ Teilchen)
miRNA	<i>micro RNA</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MydD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>

MW	Mittelwert
n	Anzahl oder nano
NAC	N-Acetyl-Cystein
NAD ⁺	Oxidiertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH/H ⁺	Reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
Neu-5-Ac	N-Acetylneuraminsäure
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
ng	Nanogramm
NIH	murine Fibroblastenzelllinie
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
NOD1	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1</i>
NOR	Norwegen
P	Wahrscheinlichkeit oder Population
PAI-I	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDK-1	Pyruvatdehydrogenasekinase
PF4	<i>Platelet factor 4</i>
pg	Pikogramm
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung
PLK-2	Polo-like-Kinase 2
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Poly(I:C)	Polyribocytidyl-Polyriboinosinsäure
PSA	Polysialinsäure
PTPH1	Proteintyrosinphosphatase 1
q	quantitativ
RIN	RNA <i>integrity number</i>
RIP	Rezeptor-interagierendes-Protein-1
RIPA	<i>Radio-immunoprecipitation-assay</i>
RIG-1	<i>Retinoic acid-inducible gene 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure

S	Svedberg
SAP97	<i>Synapse associated Protein 97</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfalte</i>
sek	Sekunden
siRNA	<i>small-interfering RNA</i>
Tab	Tabelle
Tabl	Tablette
TACE	<i>Tumornecrosisfactor-alpha converting enzyme</i>
TAE	Tris-EDTA-Acetat
TAPI-2	TNF- α -proteaseinhibitor-2
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris buffered saline with tween</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- α	<i>Transforming growth factor-alpha</i>
THP-1	humane Makrophagenzelllinie
TIMP-3	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase 3</i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
TNF-R1	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha-rezeptor 1
TNF-R2	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha-rezeptor 2
TRADD	TNFR-1 assoziiertes-DD-Protein
TRAF	TNFR-assozierte-Faktoren
tRNA	transfer RNA
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
USA	<i>United States of America</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
v/v	Volumen pro Volumen
WM	Wortmannin
Wt	Wildtyp einer Mauszelllinie
w/v	Gewicht pro Volumen
Zn	Zink
-/-	<i>Gen-Knockdown</i>

§	Paragraph
λ	Wellenlänge
%	Prozent
°C	Grad Celsius
M	Mikro
*	P<0,05
**	P<0,01
***	P<0,001
****	P<0,0001

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

1. Einleitung

Abbildung 1.....	3
Abbildung 2.....	9
Abbildung 3.....	11
Abbildung 4.....	14

3. Material und Methoden

Tabelle 1.....	16
Tabelle 2.....	18
Tabelle 3.....	20
Tabelle 4.....	20
Tabelle 5.....	20
Tabelle 6.....	21
Tabelle 7.....	21
Tabelle 8.....	21
Tabelle 9.....	21
Tabelle 10.....	21
Tabelle 11.....	22
Tabelle 12.....	22
Tabelle 13.....	22
Tabelle 14.....	22
Tabelle 15.....	22
Tabelle 16.....	22
Tabelle 17.....	23
Abbildung 5.....	24
Abbildung 6.....	24
Abbildung 7.....	25
Abbildung 8.....	25
Abbildung 9.....	26
Abbildung 10.....	30
Tabelle 18.....	32
Tabelle 19.....	33
Tabelle 20.....	33
Tabelle 21.....	34
Tabelle 22.....	35
Tabelle 23.....	35

Tabelle 24.....	36
Abbildung 11.....	38
Tabelle 25.....	38
Tabelle 26.....	40
Tabelle 27.....	41
4. Ergebnisse	
Tabelle 28.....	42
Abbildung 12.....	43
Abbildung 13.....	44
Abbildung 14.....	45
Abbildung 15.....	46
Abbildung 16.....	47
Abbildung 17.....	48
Abbildung 18.....	49
Abbildung 19.....	50
Abbildung 20.....	51
Abbildung 21.....	51
Abbildung 22.....	52
Abbildung 23.....	53
Abbildung 24.....	54
Abbildung 25.....	55
Abbildung 26.....	56
Abbildung 27.....	57
5. Diskussion	
Abbildung 28.....	59
Abbildung 29.....	61
Abbildung 30.....	64
10. Anhang	
Abbildung 31.....	94

9. Literaturverzeichnis

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

Ali, N.; Knaüper, V. (2007): Phorbol ester-induced shedding of the prostate cancer marker transmembrane protein with epidermal growth factor and two follistatin motifs 2 is mediated by the disintegrin and metalloproteinase-17. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (52), S. 37378–37388.

Allinson, T. M.; Parkin, E. T.; Turner, A. J.; Hooper, N. M. (2003): ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. In: *Journal of neuroscience research* 74 (3), S. 342–352.

Altincicek, B.; Stötzel, S.; Wygrecka, M.; Preissner, K. T.; Vilcinskas, A. (2008): Host-derived extracellular nucleic acids enhance innate immune responses, induce coagulation, and prolong survival upon infection in insects. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181 (4), S. 2705–2712.

Am Chinnaiyan; O'Rourke, K.; Tewari, M.; Dixit, V. M. (1995): FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. In: *Cell* 81 (4), S. 505–512.

Auwerx, J. (1991): The human leukemia cell line, THP-1. A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. In: *Experientia* 47 (1), S. 22–31.

Baggiolini, M. (2001): Chemokines in pathology and medicine. In: *Journal of internal medicine* 250 (2), S. 91–104.

Bax, D. V.; Messent, A. J.; Tart, J.; van Hoang, M.; Kott, J.; Maciewicz, R. A.; Humphries, M. J. (2004): Integrin alpha5beta1 and ADAM-17 interact in vitro and co-localize in migrating HeLa cells. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (21), S. 22377–22386.

Beg, A. A.; Finco, T. S.; Nantermet, P. V.; Baldwin, A. S., JR (1993): Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha. A mechanism for NF-kappa B activation. In: *Molecular and cellular biology* 13 (6), S. 3301–3310.

Bernard, J. J.; Cowing-Zitron, C.; Nakatsuji, T.; Muehleisen, B.; Muto, J.; Borkowski, A. W. et al. (2012): Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. In: *Nature medicine* 18 (8), S. 1286–1290. DOI: 10.1038/nm.2861.

- Black, R. A. (2002): Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 34 (1), S. 1–5.
- Brentano, F.; Schorr, O.; Gay, R. E.; Gay, S.; Kyburz, D. (2005a): RNA released from necrotic synovial fluid cells activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via Toll-like receptor 3. In: *Arthritis and rheumatism* 52 (9), S. 2656–2665.
- Brentano, F.; Schorr, O.; Gay, R. E.; Gay, S.; Kyburz, D. (2005b): RNA released from necrotic synovial fluid cells activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via Toll-like receptor 3. In: *Arthritis and rheumatism* 52 (9), S. 2656–2665.
- Buxbaum, J. D.; Liu, K. N.; Luo, Y.; Slack, J. L.; Stocking, K. L.; Peschon, J. J. et al. (1998): Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (43), S. 27765–27767.
- Cabrera-Fuentes, H. A.; Lopez, M. L.; McCurdy, S.; Fischer, S.; Meiler, S.; Baumer, Y. et al. (2015a): Regulation of monocyte/macrophage polarisation by extracellular RNA. In: *Thrombosis and haemostasis* 113 (3), S. 473–481. DOI: 10.1160/TH14-06-0507.
- Cabrera-Fuentes, H. A.; Niemann, B.; Grieshaber, P.; Wollbrueck, M.; Gehron, J.; Preissner, K. T.; Böning, A. (2015b): RNase1 as a potential mediator of remote ischaemic preconditioning for cardioprotection+. In: *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 48 (5), S. 732–737. DOI: 10.1093/ejcts/ezu519.
- Caescu, C. I.; Jeschke, G. R.; Turk, B. E. (2009): Active-site determinants of substrate recognition by the metalloproteinases TACE and ADAM10. In: *The Biochemical journal* 424 (1), S. 79–88. DOI: 10.1042/BJ20090549.
- Camussi, G.; Albano, E.; Tetta, C.; Bussolino, F. (1991): The molecular action of tumor necrosis factor-alpha. In: *European journal of biochemistry / FEBS* 202 (1), S. 3–14.
- Canault, M.; Peiretti, F.; Kopp, F.; Bonardo, B.; Bonzi, M. F.; Coudeyre, J. C. et al. (2006): The TNF alpha converting enzyme (TACE/ADAM17) is expressed in the atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. Possible contribution to elevated plasma levels of soluble TNF alpha receptors. In: *Atherosclerosis* 187 (1), S. 82–91.
- Caplen, N. J.; Parrish, S.; Imani, F.; Fire, A.; Morgan, R. A. (2001): Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (17), S. 9742–9747.

Carlotti, F.; Dower, S. K.; Qvarnstrom, E. E. (2000): Dynamic shuttling of nuclear factor kappa B between the nucleus and cytoplasm as a consequence of inhibitor dissociation. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (52), S. 41028–41034.

Carswell, E. A.; Old, L. J.; Kassel, R. L.; Green, S.; Fiore, N.; Williamson, B. (1975): An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (9), S. 3666–3670.

Castell, J. V.; Gómez-Lechón, M. J.; David, M.; Andus, T.; Geiger, T.; Trullenque, R. et al. (1989): Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. In: *FEBS letters* 242 (2), S. 237–239.

Cavassani, K. A.; Ishii, M.; Wen, H.; Schaller, M. A.; Lincoln, P. M.; Lukacs, N. W. et al. (2008): TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. In: *The Journal of experimental medicine* 205 (11), S. 2609–2621. DOI: 10.1084/jem.20081370.

Chen, C.; Feng, Y.; Zou, L.; Wang, L.; Chen, H. H.; Cai, J. Y. et al. (2014): Role of extracellular RNA and TLR3-Trif signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury. In: *Journal of the American Heart Association* 3 (1), S. e000683. DOI: 10.1161/JAHA.113.000683.

Chen, J.; Cui, X.; Zacharek, A.; Ding, G. L.; Shehadah, A.; Jiang, Q. et al. (2009): Niaspan treatment increases tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme and promotes arteriogenesis after stroke. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 29 (5), S. 911–920. DOI: 10.1038/jcbfm.2009.11.

Chikaraishi, Y.; Shimazawa, M.; Yokota, K.; Yoshino, K.; Hara, H. (2009): CB-12181, a new azasugar-based matrix metalloproteinase/tumor necrosis factor-alpha converting enzyme inhibitor, inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro and retinal neovascularization in vivo. In: *Current neurovascular research* 6 (3), S. 140–147.

Chow, J. C.; Young, D. W.; Golenbock, D. T.; Christ, W. J.; Gusovsky, F. (1999): Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (16), S. 10689–10692.

Cozzolino, F.; Rubartelli, A.; Aldinucci, D.; Sitia, R.; Torcia, M.; Shaw, A.; Di Guglielmo, R. (1989): Interleukin 1 as an autocrine growth factor for acute myeloid leukemia cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (7), S. 2369–2373.

- Daigneault, M.; Preston, J. A.; Marriott, H. M.; Whyte, M. K.; Dockrell, D. H. (2010): The identification of markers of macrophage differentiation in PMA- stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. In: *PloS one* 5 (1), S. e8668. DOI: 10.1371/journal.pone.0008668.
- Decker, T.; Lohmann-Matthes, M. L. (1988): A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. In: *Journal of immunological methods* 115 (1), S. 61–69.
- Deindl, E.; Fischer, S.; Preissner, K. T. (2009): New directions in inflammation and immunity. The multi-functional role of the extracellular RNA/RNase system. In: *Indian journal of biochemistry & biophysics* 46 (6), S. 461–466.
- Denes, A.; Lopez-Castejon, G.; Brough, D. (2012): Caspase-1. Is IL-1 just the tip of the ICEberg? In: *Cell death & disease* 3, S. e338. DOI: 10.1038/cddis.2012.86.
- Deregibus, M. C.; Cantaluppi, V.; Calogero, R.; Lo Iacono, M.; Tetta, C.; Biancone, L. et al. (2007): Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. In: *Blood* 110 (7), S. 2440–2448.
- Duffy, M. J.; McKiernan, E.; O'Donovan, N.; McGowan, P. M. (2009): Role of ADAMs in cancer formation and progression. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 15 (4), S. 1140–1144. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1585.
- Fan, D.; Takawale, A.; Shen, M.; Wang, W.; Wang, X.; Basu, R. et al. (2015): Cardiomyocyte A Disintegrin And Metalloproteinase 17 (ADAM17) Is Essential in Post-Myocardial Infarction Repair by Regulating Angiogenesis. In: *Circulation. Heart failure* 8 (5), S. 970–979. DOI: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.002029.
- Fan, H.; Turck, C. W.; Derynck, R. (2003): Characterization of growth factor-induced serine phosphorylation of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme and of an alternatively translated polypeptide. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (20), S. 18617–18627.
- Feng, Yan; Chen, Hongliang; Cai, Jiayan; Zou, Lin; Yan, Dan; Xu, Ganqiong et al. (2015): Cardiac RNA Induces Inflammatory Responses in Cardiomyocytes and Immune Cells via Toll-like Receptor 7 Signaling. In: *The Journal of biological chemistry* 290 (44), S. 26688–26698. DOI: 10.1074/jbc.M115.661835.

Fischer, S.; Gerriets, T.; Wessels, C.; Walberer, M.; Kostin, S.; Stolz, E. et al. (2007): Extracellular RNA mediates endothelial-cell permeability via vascular endothelial growth factor. In: *Blood* 110 (7), S. 2457–2465.

Fischer, S.; Gesierich, S.; Griemert, B.; Schänzer, A.; Acker, T.; Augustin HG et al. (2013a): Extracellular RNA liberates tumor necrosis factor-alpha to promote tumor cell trafficking and progression. In: *Cancer research* 73 (16), S. 5080–5089. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4657.

Fischer, S.; Grantzow, T.; Pagel, J. I.; Tschernatsch, M.; Sperandio, M.; Preissner, K. T.; Deindl, E. (2012): Extracellular RNA promotes leukocyte recruitment in the vascular system by mobilising proinflammatory cytokines. In: *Thrombosis and haemostasis* 108 (4), S. 730–741.

Fischer, S.; Nishio, M.; Dadkhahi, S.; Gansler, J.; Saffarzadeh, M.; Shibamiyama, A. et al. (2011): Expression and localisation of vascular ribonucleases in endothelial cells. In: *Thrombosis and haemostasis* 105 (2), S. 345–355. DOI: 10.1160/TH10-06-0345.

Fischer, S.; Nishio, M.; Peters, S. C.; Tschernatsch, M.; Walberer, M.; Weidemann, S. et al. (2009): Signaling mechanism of extracellular RNA in endothelial cells. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (7), S. 2100–2109. DOI: 10.1096/fj.08-121608.

Fischer, S.; Preissner, K. T. (2013): Extracellular nucleic acids as novel alarm signals in the vascular system. Mediators of defence and disease. In: *Hämostaseologie* 33 (1), S. 37–42. DOI: 10.5482/HAMO-13-01-0001.

Fischer, Silvia; Gesierich, Sabine; Griemert, Barbara; Schänzer, Anne; Acker, Till; Augustin, Hellmut G. et al. (2013b): Extracellular RNA liberates tumor necrosis factor- α to promote tumor cell trafficking and progression. In: *Cancer research* 73 (16), S. 5080–5089. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4657.

Franovic, A.; Robert, I.; Smith, K.; Kurban, G.; Pause, A.; Gunaratnam, L.; Lee, S. (2006): Multiple acquired renal carcinoma tumor capabilities abolished upon silencing of ADAM17. In: *Cancer research* 66 (16), S. 8083–8090.

Futami, J.; Tsushima, Y.; Murato, Y.; Tada, H.; Sasaki, J.; Seno, M.; Yamada, H. (1997): Tissue-specific expression of pancreatic-type RNases and RNase inhibitor in humans. In: *DNA and cell biology* 16 (4), S. 413–419.

Gaeta, M. L.; Johnson; Kluger, M. S.; Pober, J. S. (2000): The death domain of tumor necrosis factor receptor 1 is necessary but not sufficient for Golgi retention of the

receptor and mediates receptor desensitization. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 80 (8), S. 1185–1194.

Gansler, J.; Preissner, K. T.; Fischer, S. (2014): Influence of proinflammatory stimuli on the expression of vascular ribonuclease 1 in endothelial cells. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28 (2), S. 752–760. DOI: 10.1096/fj.13-238600.

Geissmann, F.; Manz, M. G.; Jung, S.; Sieweke, M. H.; Merad, M.; Ley, K. (2010): Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 327 (5966), S. 656–661. DOI: 10.1126/science.1178331.

Gewirtz, A. T.; Navas, T. A.; Lyons, S.; Godowski, P. J.; Madara, J. L. (2001): Cutting edge. Bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167 (4), S. 1882–1885.

Gooz, M. (2010): ADAM-17. The enzyme that does it all. In: *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 45 (2), S. 146–169. DOI: 10.3109/10409231003628015.

Grell, M.; Douni, E.; Wajant, H.; Löhden, M.; Clauss, M.; Maxeiner, B. et al. (1995): The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. In: *Cell* 83 (5), S. 793–802.

Hartnell, A.; Steel, J.; Turley, H.; Jones, M.; Jackson, D. G.; Crocker, P. R. (2001): Characterization of human sialoadhesin, a sialic acid binding receptor expressed by resident and inflammatory macrophage populations. In: *Blood* 97 (1), S. 288–296.

Hehlgans, T.; Pfeffer, K. (2005): The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily. Players, rules and the games. In: *Immunology* 115 (1), S. 1–20.

Hemmi, H.; Takeuchi, O.; Kawai, T.; Kaisho, T.; Sato, S.; Sanjo, H. et al. (2000): A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. In: *Nature* 408 (6813), S. 740–745.

Howard, A. D.; Kostura, M. J.; Thornberry, N.; Ding, G. J.; Limjuco, G.; Weidner, J. et al. (1991): IL-1-converting enzyme requires aspartic acid residues for processing of the IL-1 beta precursor at two distinct sites and does not cleave 31-kDa IL-1 alpha. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 147 (9), S. 2964–2969.

Hsu, H.; Huang, J.; Shu, H. B.; Baichwal, V.; Goeddel, D. V. (1996a): TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. In: *Immunity* 4 (4), S. 387–396.

- Hsu, H.; Shu, H. B.; Pan, M. G.; Goeddel, D. V. (1996b): TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. In: *Cell* 84 (2), S. 299–308.
- Huang, X.; Lv, B.; Jin, H. F.; Zhang, S. (2011): A meta-analysis of the therapeutic effects of tumor necrosis factor- alpha blockers on ulcerative colitis. In: *European journal of clinical pharmacology* 67 (8), S. 759–766. DOI: 10.1007/s00228-011-1079-3.
- Im Verma; Stevenson, J. K.; Schwarz, E. M.; van Antwerp, D.; Miyamoto, S. (1995): Rel/NF-kappa B/I kappa B family. Intimate tales of association and dissociation. In: *Genes & development* 9 (22), S. 2723–2735.
- Ismail, Noura; Wang, Yijie; Dakhlallah, Duaa; Moldovan, Leni; Agarwal, Kitty; Batte, Kara et al. (2013): Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. In: *Blood* 121 (6), S. 984–995. DOI: 10.1182/blood-2011-08-374793.
- Jaax, M. E.; Krauel, K.; Marschall, T.; Brandt, S.; Gansler, J.; Fürll, B. et al. (2013): Complex formation with nucleic acids and aptamers alters the antigenic properties of platelet factor 4. In: *Blood* 122 (2), S. 272–281. DOI: 10.1182/blood-2013-01-478966.
- Josephy, P. D.; Eling, T.; Mason, R. P. (1982): The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates. In: *The Journal of biological chemistry* 257 (7), S. 3669–3675.
- Kaboth, W.; Schick, P.; Trepel, F.; Theml, H. (1977): Zur Kinetik und Differenzierung der Monozyten beim Menschen. ÉAKinetics and differentiation of monocytes in man (author's transl) ÉU. In: *Medizinische Klinik* 72 (23), S. 1033–1037.
- Kannemeier, C.; Shibamiya, A.; Nakazawa, F.; Trusheim, H.; Ruppert, C.; Markart, P. et al. (2007): Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (15), S. 6388–6393.
- Karikó, K.; Ni, H.; Capodici, J.; Lamphier, M.; Weissman, D. (2004): mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (13), S. 12542–12550.
- Karrer, H. E. (1960): Electron microscopic study of the phagocytosis process in lung. In: *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 7, S. 357–366.
- Katakowski, M.; Jiang, F.; Zheng, X.; Gutierrez, J. A.; Szalad, A.; Chopp, M. (2009): Tumorigenicity of cortical astrocyte cell line induced by the protease ADAM17. In: *Cancer science* 100 (9), S. 1597–1604. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01221.x.

- Kawai, T.; Adachi, O.; Ogawa, T.; Takeda, K.; Akira, S. (1999): Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. In: *Immunity* 11 (1), S. 115–122.
- Kieseier, B. C.; Pischel, H.; Neuen-Jacob, E.; Tourtellotte, W. W.; Hartung, H. P. (2003): ADAM-10 and ADAM-17 in the inflamed human CNS. In: *Glia* 42 (4), S. 398–405.
- Kilian, P. L.; Kaffka, K. L.; Stern, A. S.; Woehle, D.; Benjamin, W. R.; Dechiara, T. M. et al. (1986): Interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta bind to the same receptor on T cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 136 (12), S. 4509–4514.
- Klaas, M.; Oetke, C.; Le Lewis, Erwig, L. P.; Heikema, A. P.; Easton, A. et al. (2012): Sialoadhesin promotes rapid proinflammatory and type I IFN responses to a sialylated pathogen, *Campylobacter jejuni*. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 189 (5), S. 2414–2422. DOI: 10.4049/jimmunol.1200776.
- Köller, M.; Hensler, T.; König, B.; Prévost, G.; Alouf, J.; König, W. (1993): Induction of heat-shock proteins by bacterial toxins, lipid mediators and cytokines in human leukocytes. In: *Zentralblatt für Bakteriologie : international journal of medical microbiology* 278 (2-3), S. 365–376.
- Kopreski, M. S.; Benko, F. A.; Kwak, L. W.; Gocke, C. D. (1999): Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 5 (8), S. 1961–1965.
- Kostura, M. J.; Tocci, M. J.; Limjuco, G.; Chin, J.; Cameron, P.; Hillman, A. G. et al. (1989): Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (14), S. 5227–5231.
- Kriegler, M.; Perez, C.; DeFay, K.; Albert, I.; Lu, S. D. (1988): A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein. Ramifications for the complex physiology of TNF. In: *Cell* 53 (1), S. 45–53.
- Kunsch, C.; Lang, R. K.; Rosen, C. A.; Shannon, M. F. (1994): Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF-kappa B p65 (RelA) and NF-IL-6. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 153 (1), S. 153–164.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685.

- Lee, R. C.; Feinbaum, R. L.; Ambros, V. (1993): The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. In: *Cell* 75 (5), S. 843–854.
- LeMay, L. G.; Otterness, I. G.; Vander, A. J.; Kluger, M. J. (1990): In vivo evidence that the rise in plasma IL 6 following injection of a fever-inducing dose of LPS is mediated by IL 1 beta. In: *Cytokine* 2 (3), S. 199–204.
- Li, A.; Varney, M. L.; Valasek, J.; Godfrey, M.; Dave, B. J.; Singh, R. K. (2005): Autocrine role of interleukin-8 in induction of endothelial cell proliferation, survival, migration and MMP-2 production and angiogenesis. In: *Angiogenesis* 8 (1), S. 63–71.
- Li, X.; Yan, Y.; Huang, W.; Yang, Y.; Wang, H.; Chang, L. (2009): The regulation of TACE catalytic function by its prodomain. In: *Molecular biology reports* 36 (4), S. 641–651. DOI: 10.1007/s11033-008-9224-5.
- Lifely; Nowicka, U. T.; Moreno, C. (1986): Analysis of the chain length of oligomers and polymers of sialic acid isolated from *Neisseria meningitidis* group B and C and *Escherichia coli* K1 and K92. In: *Carbohydrate research* 156, S. 123–135.
- Liu, Z. G. (2005): Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. In: *Cell research* 15 (1), S. 24–27.
- Lopez-Castejon, G.; Brough, D. (2011): Understanding the mechanism of IL-1beta secretion. In: *Cytokine & growth factor reviews* 22 (4), S. 189–195. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2011.10.001.
- Luo, X.; Budihardjo, I.; Zou, H.; Slaughter, C.; Wang, X. (1998): Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. In: *Cell* 94 (4), S. 481–490.
- Mackaness, G. B. (1960): The phagocytosis and inactivation of staphylococci by macrophages of normal rabbits. In: *The Journal of experimental medicine* 112, S. 35–53.
- Mandel, P.; Metais, P. (1948): Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. ÉANot AvailableÉU. In: *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales* 142 (3-4), S. 241–243.
- March, C. J.; Mosley, B.; Larsen, A.; Cerretti, D. P.; Braedt, G.; Price, V. et al. (1985 Jun 20-26): Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. In: *Nature* 315 (6021), S. 641–647.

- Matsushima, K.; Morishita, K.; Yoshimura, T.; Lavu, S.; Kobayashi, Y.; Lew, W. et al. (1988): Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. In: *The Journal of experimental medicine* 167 (6), S. 1883–1893.
- Maurer, Annika (2014): Mast cells contribute to arteriogenesis in a PI3 Kinase γ -dependent manner.
- Metcalf, D. (1985): The granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. In: *Science (New York, N.Y.)* 229 (4708), S. 16–22.
- Mills, D. M.; Zucker-Franklin, D. (1969): Electron microscopic study of isolated Kupffer cells. In: *The American journal of pathology* 54 (2), S. 147–166.
- Mizushima, T.; Sasaki, M.; Ando, T.; Wada, T.; Tanaka, M.; Okamoto, Y. et al. (2010): Blockage of angiotensin II type 1 receptor regulates TNF- α -induced MAdCAM-1 expression via inhibition of NF- κ B translocation to the nucleus and ameliorates colitis. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 298 (2), S. G255-66. DOI: 10.1152/ajpgi.00264.2009.
- Montenarh und Löffler (2007): Biochemie und Pathobiochemie. Nucleotide und Nucleinsäuren, Kapitel 5: Springer Verlag.
- Morita, T.; Ohtsubo, S.; Nakamura, T.; Tanaka, S.; Iwanaga, S.; Ohashi, K.; Niwa, M. (1985): Isolation and biological activities of limulus anticoagulant (anti-LPS factor) which interacts with lipopolysaccharide (LPS). In: *Journal of biochemistry* 97 (6), S. 1611–1620.
- Moss, M. L.; White, J. M.; Lambert, M. H.; Andrews, R. C. (2001): TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery. In: *Drug discovery today* 6 (8), S. 417–426.
- Naismith, J. H.; Sprang, SR (1998): Modularity in the TNF-receptor family. In: *Trends in biochemical sciences* 23 (2), S. 74–79.
- Nakazawa, F.; Kannemeier, C.; Shibamiya, A.; Song, Y.; Tzima, E.; Schubert, U. et al. (2005): Extracellular RNA is a natural cofactor for the (auto-)activation of Factor VII-activating protease (FSAP). In: *The Biochemical journal* 385 (Pt 3), S. 831–838.
- Nathan, C. F.; Murray, H. W.; Wiebe, M. E.; Rubin, B. Y. (1983): Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. In: *The Journal of experimental medicine* 158 (3), S. 670–689.

Nelson, K. K.; Schlöndorff, J.; Blobel, C. P. (1999): Evidence for an interaction of the metalloprotease-disintegrin tumour necrosis factor alpha convertase (TACE) with mitotic arrest deficient 2 (MAD2), and of the metalloprotease-disintegrin MDC9 with a novel MAD2-related protein, MAD2beta. In: *The Biochemical journal* 343 Pt 3, S. 673–680.

Odilo Mueller, Sama Lightfoot, Andreas Schroeder (2004): RNA Integrity Number (RIN) –Standardization of RNA Quality Control. Agilent Technologies.

Ohashi, K.; Burkart, V.; Flohé, S.; Kolb, H. (2000): Cutting edge. Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164 (2), S. 558–561.

Okamura, Y.; Watari, M.; Jerud, E. S.; Young, D. W.; Ishizaka, S. T.; Rose, J. et al. (2001): The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (13), S. 10229–10233.

Parmentier, M.; Hirani, N.; Rahman, I.; Donaldson, K.; MacNee, W.; Antonicelli, F. (2000a): Regulation of lipopolysaccharide-mediated interleukin-1beta release by N-acetylcysteine in THP-1 cells. In: *The European respiratory journal* 16 (5), S. 933–939.

Parmentier, M.; Hirani, N.; Rahman, I.; Donaldson, K.; MacNee, W.; Antonicelli, F. (2000b): Regulation of lipopolysaccharide-mediated interleukin-1beta release by N-acetylcysteine in THP-1 cells. In: *The European respiratory journal* 16 (5), S. 933–939.

Peiretti, F.; Deprez-Beauclair, P.; Bonardo, B.; Aubert, H.; Juhan-Vague, I.; Nalbone, G. (2003): Identification of SAP97 as an intracellular binding partner of TACE. In: *Journal of cell science* 116 (Pt 10), S. 1949–1957.

Peschon, J. J.; Slack, J. L.; Reddy, P.; Stocking, K. L.; Sunnarborg, S. W.; Lee, D. C. et al. (1998): An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. In: *Science (New York, N.Y.)* 282 (5392), S. 1281–1284.

Pierce, J. W.; Schoenleber, R.; Jesmok, G.; Best, J.; Moore, S. A.; Collins, T.; Gerritsen, M. E. (1997): Novel inhibitors of cytokine-induced I κ B α phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (34), S. 21096–21103.

Preissner, K. T. (2007): Extracellular RNA. A new player in blood coagulation and vascular permeability. In: *Hämostasologie* 27 (5), S. 373–377.

Rahman, M. M.; McFadden, G. (2006): Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. In: *PLoS pathogens* 2 (2), S. e4.

- Read, M. A.; Whitley, M. Z.; Williams, A. J.; Collins, T. (1994): NF-kappa B and I kappa B alpha. An inducible regulatory system in endothelial activation. In: *The Journal of experimental medicine* 179 (2), S. 503–512.
- Reddy, A. B.; Ramana, K. V.; Srivastava, S.; Bhatnagar, A.; Srivastava, S. K. (2009): Aldose reductase regulates high glucose-induced ectodomain shedding of tumor necrosis factor (TNF)-alpha via protein kinase C-delta and TNF-alpha converting enzyme in vascular smooth muscle cells. In: *Endocrinology* 150 (1), S. 63–74. DOI: 10.1210/en.2008-0677.
- Reich, C. 3rd; Pisetsky, D. S. (2009): The content of DNA and RNA in microparticles released by Jurkat and HL-60 cells undergoing in vitro apoptosis. In: *Experimental cell research* 315 (5), S. 760–768. DOI: 10.1016/j.yexcr.2008.12.014.
- Renart, J.; Reiser, J.; Stark, G. R. (1979): Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (7), S. 3116–3120.
- Roche, P. A.; Furuta, K. (2015): The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. In: *Nature reviews. Immunology* 15 (4), S. 203–216. DOI: 10.1038/nri3818.
- Rock, K. L.; Kono, H. (2008): The inflammatory response to cell death. In: *Annual review of pathology* 3, S. 99–126.
- Rosi, A.; Guidoni, L.; Am Luciani; Mariutti, G.; Viti, V. (1988): RNA-lipid complexes released from the plasma membrane of human colon carcinoma cells. In: *Cancer letters* 39 (2), S. 153–160.
- Sánchez, I.; Xu, C. J.; Juo, P.; Kakizaka, A.; Blenis, J.; Yuan, J. (1999): Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. In: *Neuron* 22 (3), S. 623–633.
- Satoh, M.; Ishikawa, Y.; Itoh, T.; Minami, Y.; Takahashi, Y.; Nakamura, M. (2008): The expression of TNF-alpha converting enzyme at the site of ruptured plaques in patients with acute myocardial infarction. In: *European journal of clinical investigation* 38 (2), S. 97–105. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2007.01912.x.
- Sawyer, W. D.; Smith; Wood, W. B., JR (1954): The mechanisms by which macrophages phagocyte encapsulated bacteria in the absence of antibody. In: *The Journal of experimental medicine* 100 (4), S. 417–424.

- Sayers, T. J.; Macher, I.; Chung, J.; Kugler, E. (1987): The production of tumor necrosis factor by mouse bone marrow-derived macrophages in response to bacterial lipopolysaccharide and a chemically synthesized monosaccharide precursor. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 138 (9), S. 2935–2940.
- Scheller, J.; Chalaris, A.; Garbers, C.; Rose-John, S. (2011): ADAM17. A molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. In: *Trends in immunology* 32 (8), S. 380–387. DOI: 10.1016/j.it.2011.05.005.
- Schultz, R. M. (1987): Interleukin 1 and interferon-gamma. Cytokines that provide reciprocal regulation of macrophage and T cell function. In: *Toxicologic pathology* 15 (3), S. 333–337.
- Schwandner, R.; Dziarski, R.; Wesche, H.; Rothe, M.; Kirschning, C. J. (1999): Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (25), S. 17406–17409.
- Schwarz, Jeanette; Schmidt, Stefanie; Will, Olga; Koudelka, Tomas; Köhler, Kaja; Boss, Melanie et al. (2014a): Polo-like kinase 2, a novel ADAM17 signaling component, regulates tumor necrosis factor α ectodomain shedding. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (5), S. 3080–3093. DOI: 10.1074/jbc.M113.536847.
- Schwarz, Jeanette; Schmidt, Stefanie; Will, Olga; Koudelka, Tomas; Köhler, Kaja; Boss, Melanie et al. (2014b): Polo-like kinase 2, a novel ADAM17 signaling component, regulates tumor necrosis factor α ectodomain shedding. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (5), S. 3080–3093. DOI: 10.1074/jbc.M113.536847.
- Seki, E.; Tsutsui, H.; Nakano, H.; Tsuji, N.; Hoshino, K.; Adachi, O. et al. (2001): Lipopolysaccharide-induced IL-18 secretion from murine Kupffer cells independently of myeloid differentiation factor 88 that is critically involved in induction of production of IL-12 and IL-1 β . In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 166 (4), S. 2651–2657.
- Sharifpanah, F.; Jayarathne, S. W.; Bekhite, M. M.; Hurtado-Oliveros, J.; Preissner, K. T.; Wartenberg, M.; Sauer, H. (2015): Stimulation of Vasculogenesis and Leukopoiesis of Embryonic Stem Cells by Extracellular Transfer RNA and Ribosomal RNA. In: *Free radical biology & medicine*. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.423.
- Shin, M. S.; Kang, Y.; Lee, N.; Wahl, E. R.; Kim, S. H.; Kang, K. S. et al. (2013): Self double-stranded (ds)DNA induces IL-1 β production from human monocytes by activating NLRP3 inflammasome in the presence of anti-dsDNA antibodies. In: *Journal*

of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 190 (4), S. 1407–1415. DOI: 10.4049/jimmunol.1201195.

Sims, J. E.; Gayle, M. A.; Slack, J. L.; Alderson; Bird, T. A.; Giri, J. G. et al. (1993): Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (13), S. 6155–6159.

Simsekylmaz, S.; Cabrera-Fuentes, H. A.; Meiler, S.; Kostin, S.; Baumer, Y.; Liehn, E. A. et al. (2014): Role of extracellular RNA in atherosclerotic plaque formation in mice. In: *Circulation* 129 (5), S. 598–606. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002562.

Smiley, S. T.; King, J. A.; Hancock, W. W. (2001): Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll- like receptor 4. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167 (5), S. 2887–2894.

Smith, M. E.; van der Maesen K; Somera, F. P.; Sobel, R. A. (1998): Effects of phorbol myristate acetate (PMA) on functions of macrophages and microglia in vitro. In: *Neurochemical research* 23 (3), S. 427–434.

Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano MD et al. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. In: *Analytical biochemistry* 150 (1), S. 76–85.

Smith, R. A.; Baglioni, C. (1987): The active form of tumor necrosis factor is a trimer. In: *The Journal of biological chemistry* 262 (15), S. 6951–6954.

Soond, S. M.; Everson, B.; Riches, D. W.; Murphy, G. (2005): ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNFalpha-converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. In: *Journal of cell science* 118 (Pt 11), S. 2371–2380.

Srikrishna, G.; Freeze, H. H. (2009): Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer. In: *Neoplasia (New York, N.Y.)* 11 (7), S. 615–628.

Strober, W. (2001): Trypan blue exclusion test of cell viability. In: *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]* Appendix 3, S. Appendix 3B. DOI: 10.1002/0471142735.ima03bs21.

Stroun, M.; Anker, P.; Beljanski, M.; Henri, J.; Lederrey, C.; Ojha, M.; Maurice, P. A. (1978): Presence of RNA in the nucleoprotein complex spontaneously released by human lymphocytes and frog auricles in culture. In: *Cancer research* 38 (10), S. 3546–3554.

- Sutton, J. S.; Weiss, L. (1966): Transformation of monocytes in tissue culture into macrophages, epithelioid cells, and multinucleated giant cells. An electron microscope study. In: *The Journal of cell biology* 28 (2), S. 303–332.
- Swendeman, S.; Mendelson, K.; Weskamp, G.; Horiuchi, K.; Deutsch, U.; Scherle, P. et al. (2008): VEGF-A stimulates ADAM17-dependent shedding of VEGFR2 and crosstalk between VEGFR2 and ERK signaling. In: *Circulation research* 103 (9), S. 916–918. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.184416.
- Tang, P.; Hung, M-C; Klostergaard, J. (1996): Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. In: *Biochemistry* 35 (25), S. 8216–8225.
- Tellier, E.; Canault, M.; Rebsomen, L.; Bonardo, B.; Juhan-Vague, I.; Nalbone, G.; Peiretti, F. (2006): The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. In: *Experimental cell research* 312 (20), S. 3969–3980.
- Togashi, N.; Ura, N.; Higashiura, K.; Murakami, H.; Shimamoto, K. (2002): Effect of TNF-alpha--converting enzyme inhibitor on insulin resistance in fructose-fed rats. In: *Hypertension* 39 (2 Pt 2), S. 578–580.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (9), S. 4350–4354.
- Tracey, K. J.; Vlassara, H.; Cerami, A. (1989): Cachectin/tumour necrosis factor. In: *Lancet (London, England)* 1 (8647), S. 1122–1126.
- Traenckner, E. B.; Wilk, S.; Baeuerle, P. A. (1994): A proteasome inhibitor prevents activation of NF-kappa B and stabilizes a newly phosphorylated form of I kappa B-alpha that is still bound to NF-kappa B. In: *The EMBO journal* 13 (22), S. 5433–5441.
- Vabulas, R. M.; Ahmad-Nejad, P.; Ghose, S.; Kirschning, C. J.; Issels, R. D.; Wagner, H. (2002): HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (17), S. 15107–15112.
- Valadi, Hadi; Ekstrom, Karin; Bossios, Apostolos; Sjostrand, Margareta; Lee, James J.; Lotvall, Jan O. (2007): Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. In: *Nature cell biology* 9 (6), S. 654–659. DOI: 10.1038/ncb1596.
- Varfolomeev, E. E.; Schuchmann, M.; Luria, V.; Chiannikulchai, N.; Beckmann JS; Mett, I. L. et al. (1998): Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell

death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. In: *Immunity* 9 (2), S. 267–276.

Verstak, B.; Hertzog, P.; Mansell, A. (2007): Toll-like receptor signalling and the clinical benefits that lie within. In: *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society ... ÉAet al.ÉU* 56 (1), S. 1–10.

Wajant, H.; Pfizenmaier, K.; Scheurich, P. (2003): Tumor necrosis factor signaling. In: *Cell death and differentiation* 10 (1), S. 45–65.

Wang, X. (2001): The expanding role of mitochondria in apoptosis. In: *Genes & development* 15 (22), S. 2922–2933.

Weaver, A. L. (2004): The impact of new biologicals in the treatment of rheumatoid arthritis. In: *Rheumatology (Oxford, England)* 43 Suppl 3, S. iii17-iii23.

Wiechelman, K. J.; Braun, R. D.; Fitzpatrick, J. D. (1988): Investigation of the bicinchoninic acid protein assay. Identification of the groups responsible for color formation. In: *Analytical biochemistry* 175 (1), S. 231–237.

Wieczorek, A. J.; Rhyner, C.; Block, L. H. (1985): Isolation and characterization of an RNA-proteolipid complex associated with the malignant state in humans. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (10), S. 3455–3459.

Wygrecka, M.; Morty, R. E.; Markart, P.; Kanse, S. M.; Andreasen, P. A.; Wind, T. et al. (2007): Plasminogen activator inhibitor-1 is an inhibitor of factor VII-activating protease in patients with acute respiratory distress syndrome. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (30), S. 21671–21682.

Xu, P.; Liu, J.; Sakaki-Yumoto, M.; Derynck, R. (2012): TACE activation by MAPK-mediated regulation of cell surface dimerization and TIMP3 association. In: *Science signaling* 5 (222), S. ra34. DOI: 10.1126/scisignal.2002689.

Yamamoto, M.; Sato, S.; Hemmi, H.; Hoshino, K.; Kaisho, T.; Sanjo, H. et al. (2003): Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. In: *Science (New York, N.Y.)* 301 (5633), S. 640–643.

Yamamoto, M.; Sato, S.; Mori, K.; Hoshino, K.; Takeuchi, O.; Takeda, K.; 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. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169 (12), S. 6668–6672.

Yin, J.; Yu, F. S. (2009): ERK1/2 mediate wounding- and G-protein-coupled receptor ligands- induced EGFR activation via regulating ADAM17 and HB-EGF shedding. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 50 (1), S. 132–139. DOI: 10.1167/iovs.08-2246.

Yoshimura, T.; Matsushima, K.; Oppenheim, J. J.; Leonard, E. J. (1987): Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)- stimulated human blood mononuclear leukocytes. Partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1). In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 139 (3), S. 788–793.

Zernecke, Alma; Preissner, Klaus T. (2016): Extracellular Ribonucleic Acids (RNA) Enter the Stage in Cardiovascular Disease. In: *Circulation research* 118 (3), S. 469–479. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307961.

Zhang, Q.; Thomas, S. M.; Lui, V. W.; Xi, S.; Siegfried, J. M.; Fan, H. et al. (2006): Phosphorylation of TNF-alpha converting enzyme by gastrin-releasing peptide induces amphiregulin release and EGF receptor activation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (18), S. 6901–6906.

Zheng, Y.; Schlondorff, J.; Blobel, C. P. (2002): Evidence for regulation of the tumor necrosis factor alpha- convertase (TACE) by protein-tyrosine phosphatase PTPH1. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (45), S. 42463–42470.

Zlotnik, A.; Yoshie, O.; Nomiya, H. (2006): The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. In: *Genome biology* 7 (12), S. 243.

10. Anhang

Die Kontrolle der Deletion des Gens MyD88 bei den verwendeten Mäusen erfolgte durch PCR.

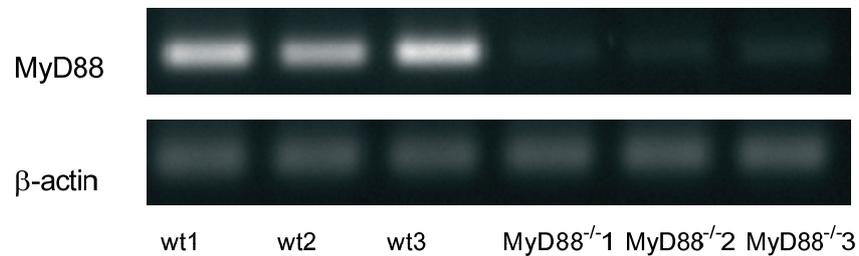


Abbildung 31: Genexpression von MyD88 bei Mäusen

Bei den Mäusen vom Wildtyp (wt1, wt2, wt3) war das Gen MyD88 nachweisbar. Bei den Mäusen MyD88^{-/-}1, MyD88^{-/-}2 und MyD88^{-/-}3 wurde es nicht exprimiert.

11. Publikationsverzeichnis

Self extracellular RNA stimulates TNF- α -release via Toll-like receptors in mouse macrophages F.Noll, J.Behnke, K.T.-Preissner, S.Fischer, Institute of Biochemistry, Medical School, Justus-Liebig University Giessen, Germany 2016, Poster im Rahmen des Kongresses Nucleic Acid Sensing Pathways 2016 in Dresden

12. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

13. Danksagung

Ich möchte mich an erster Stelle bei Herrn Prof. Dr. Preissner für sein entgegengebrachtes Vertrauen und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe bedanken. Er ermöglichte mir einen spannenden Einblick in die naturwissenschaftliche Forschung und das Wissen über den langen Weg zur Gewinnung medizinisch, anwendbarer Erkenntnisse.

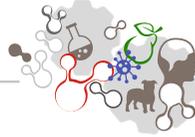
Ich bedanke mich sehr bei Dr. Silvia Fischer für die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit. Ihr Engagement und ihre Ratschläge haben wesentlich zur Fertigstellung dieser Dissertation beigetragen.

Ich danke Jessica, Ute, Bärbel, Julia, Barbara, Silke, Uwe, Susanne, Dimitri und Mareike für die Einarbeitung in den Laboralltag und jede angenehme Arbeitsatmosphäre mit vielen abwechslungsreichen, auch nichtwissenschaftlichen Gesprächsthemen.

Frederik danke ich für jede Fachsimpelerei, seine außergewöhnliche Hilfsbereitschaft und der gewissenhaften Fortführung dieses Forschungsthemas.

Am Schluss möchte ich mich ausdrücklich bei meinen Eltern und meiner Schwester für jede familiäre Unterstützung und Fürsorge während meines Studiums in Gießen bedanken.

Vor allem aber danke ich Dir, Judith, für alle ermunternden Worte, für zwei Laborsommer, deine Zeit und Geduld.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6600-0



9 783835 196600