

Expression von extrazellulärer RNase und Analyse ihrer Aktivität in Endothelzellen

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Sara Dadkhahi

aus Teheran/ Iran

Gießen, 2008

Aus dem

Biochemischen Institut

des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Leiter: Prof. Dr. K. T. Preissner

Gutachter: Prof. Dr. Preissner

Gutachter: PD Dr. Gerriets

Tag der Disputation: 24.07.2008

*Meinen lieben Eltern,
Shademan Djalali und
Dr. Taher Dadkhahi*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Humane RNase A-Superfamilie	6
1.2	Zytotoxizität und antitumorale Eigenschaften extrazellulärer RNasen	10
1.3	RNase 1	12
1.4	Angiogenin und seine klinische Relevanz	12
1.5	Extrazelluläre RNA.....	15
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	16
2	Materialien.....	17
2.1	Chemikalien und Reagenzien	17
2.2	Puffer und Lösungen	20
2.3	Zellmedien	22
2.4	Kommerzielle Kits	23
2.5	Antikörper	23
2.6	Primer.....	24
2.7	Geräte	24
3	Methoden	26
3.1	Zellkultur.....	26
3.1.1	Verwendete Endothelzellen	26
3.1.2	Isolierung von HUVEC.....	28
3.1.3	Isolierung von BMEC	28
3.1.4	Kultivierung und Passagieren der verwendeten Endothelzellen.....	30
3.1.5	Einfrieren und Auftauen von Endothelzellen	31
3.1.6	Zellstimulation	31
3.2	Zytotoxizitätstest.....	32
3.3	Arbeiten mit Proteinen	34
3.3.1	Protein-Isolierung	34
3.3.2	Einengung der Zellüberstände	34
3.3.3	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	35
3.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
3.3.5	Western Blot	37
3.3.6	Immunreaktionen	38
3.3.7	ECL-Detektion	38
3.3.8	Stripping.....	39
3.4	Arbeiten mit RNA.....	40
3.4.1	RNA-Isolierung.....	40
3.4.2	Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der Gesamt-RNA	41
3.4.3	Reverse Transkription	41
3.4.4	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	43
3.4.5	DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	44
3.5	RNase-Aktivitätstest	45

4	Ergebnisse	46
4.1	Zytotoxizität	46
4.2	Expression von RNase 1- und Angiogenin auf Proteinebene	47
4.3	Expression von RNase 1- und Angiogenin-mRNA	55
4.4	RNase-Aktivität in den verwendeten Endothelzellen	63
4.5	Lokalisation von RNase 1 und Angiogenin in HUVEC	75
5	Diskussion	78
5.1	Expression von RNase 1 und RNase 5 in makro- versus mikrovaskulären Endothelzellen	78
5.2	Expressions- und Aktivitätsänderung der RNasen durch diverse Stimulationen	79
5.3	Lokalisation von RNase 1 in Granula der Endothelzellen (Weibel-Palade-Körperchen)	81
5.4	Klinische Relevanz von RNasen	81
6	Zusammenfassung	83
6.1	Deutsche Version	83
6.2	Summary	84
7	Literaturverzeichnis	86
8	Liste der verwendeten Abkürzungen	92
9	Erklärung	94
10	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	95
10.1	Abbildungsverzeichnis	95
10.2	Tabellenverzeichnis	97
11	Danksagung	98
12	Lebenslauf	99

1 Einleitung

1.1 Humane RNase A-Superfamilie

Die humane RNase A-Superfamilie besteht aus acht Mitgliedern, die phylogenetisch gesehen wahrscheinlich aufgrund von Genduplikationen entstanden sind, da sie eine Sequenzhomologie von 30-80 % aufweisen (siehe Abb. 1 und 2, S. 8, 9). Die jeweiligen Gene sind auf dem langen Arm des Chromosoms 14 lokalisiert (siehe Abb. 3, S. 9). Alle Familienmitglieder weisen am aktiven Zentrum je ein Lysin- und zwei Histidinreste auf und werden durch jeweils drei bis vier Disulfidbrücken, bestehend aus sechs bis acht Cysteinresten, stabilisiert. Im unglykolysierten Zustand beträgt die Molekularmasse der einzelnen Enzyme 14-17 kDa^{1,2,3}.

Was ihre Funktion angeht, sind diese Enzyme als RNasen nicht nur für den intrazellulären Abbau von RNA und die Regulation der Genexpression nötig, sondern sie üben durch ihre antimikrobiellen, angiogenen und antitumoralen Eigenschaften auch eine wichtige Rolle bei diversen biologischen Prozessen außerhalb von Zellen aus⁴.

Im Folgenden werden die einzelnen Mitglieder der extrazellulären humanen RNase A-Superfamilie und ihre Funktionen genauer vorgestellt:

- RNase 1, auch bekannt als „human pancreatic RNase“ (HPR), wird in den Azinuszellen des Pankreas gebildet. Sie ist essentiell für die Verdauung der RNA, die in der zugeführten Nahrung in großen Mengen enthalten ist, aber auch für den Abbau von RNA intestinaler Bakterien^{3,5}.

Neuere Untersuchungen lassen jedoch vermuten, dass die Hauptquelle der Serum-RNase 1 das Endothelium darstellt^{6,7,8}, wobei die Bedeutung bislang noch unbekannt ist, hierauf wird unter dem Abschnitt 1.3 genauer eingegangen. Weiterhin ist zu erwähnen, dass RNase 1 eine 70 %ige Sequenzhomologie zur bovinen RNase A aufweist².

- RNase 2 hat den Eigennamen „Eosinophil-derived neurotoxin“ (EDN), da für sie eine toxische Wirkung auf Purkinje-Zellen vom Kaninchen beobachtet wurde^{4,9,10}, generell ist sie jedoch nicht zytotoxisch. Das Enzym wird vermehrt gebildet in eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, sowie in Milz, Leber und Placenta. Es besitzt eine antivirale Aktivität gegenüber dem *Respiratory Syncytial Virus*

(RSV) und ist zudem in der Lage, durch Chemotaxis, die Aktivierung von antigen-präsentierenden dendritischen Zellen zu induzieren⁴.

- RNase 3, besser bekannt als „Eosinophil cationic protein“ (ECP), ist zu 70 % identisch mit RNase 2 und konnte bislang einzig in eosinophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Sie ist ein potentes Helmintotoxin, besitzt antibakterielle Aktivität gegenüber *Staphylococcus aureus* und *E. coli*, antivirale Eigenschaft gegen RSV und wirkt zudem zytotoxisch².
- RNase 4 wurde erstmals in tumorzell-konditioniertem Medium, später aber auch in gesundem menschlichem Plasma nachgewiesen². Über ihre Funktion ist bislang nichts weiter bekannt.
- RNase 5, besser bekannt unter dem Namen „Angiogenin“, wurde, wie RNase 4, zunächst in tumorzell-konditioniertem Medium nachgewiesen, bevor sie später auch in gesundem menschlichen Plasma gefunden wurde. Synthesort ist hauptsächlich die Leber. Angiogenin besitzt eine besondere Stellung innerhalb der humanen RNase A-Superfamilie, da es gegenüber den übrigen RNasen eine mehr als 10⁶-fach niedrigere ribonukleolytische Aktivität aufweist. Weiterhin ist das Angiogenin, wie der Name vermuten lässt, einer der potentesten heute bekannten angiogenen Faktoren *in vivo* und induziert somit die Gefäßneubildung¹¹. Aufgrund seiner besonderen klinischen Relevanz wird später genauer auf dieses Enzym eingegangen (siehe Abschnitt 1.4).
- RNase 6 (RNase6) konnte als Protein bislang in keinem menschlichen Gewebe nachgewiesen werden, jedoch ist ihre mRNA-Expression in neutrophilen Granulozyten und in Monozyten detektiert worden, sodass man eine Rolle bei der Immunabwehr annimmt².
- RNase 7, die 2002 entdeckt wurde^{3,12}, wird in gesunden menschlichen Epithelien, hauptsächlich in der Haut, aber auch im Respirations-, Urogenital- und Gastrointestinaltrakt gebildet. Dieser RNase wurde eine sehr starke antimikrobielle Aktivität gegenüber verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen pathogenen Mikroorganismen, wie *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Candida albicans* und Vancomycin-resistenten *Enterococcus Faecium* nachgewiesen. Somit wird angenommen, dass dieses Enzym einen Teil der angeborenen Immunabwehr des Epithels darstellt^{3,12}.

- RNase 8, die als letztes Familienmitglied ebenfalls 2002 entdeckt wurde¹³ und eine 78 %ige Sequenzhomologie zu RNase 7 aufweist, wird nur in der Placenta gebildet. Sie besitzt weder antivirale noch antibakterielle Eigenschaften, jedoch lässt die organspezifische Expression eine besondere physiologische Funktion vermuten¹³.

RNase 1	KESRAK K F Q R Q H M D S D S S P S S S T Y C N Q M R R R N M T Q G R C K P V
RNase 2	KPP Q F T W A Q W F E T Q H I N M T S Q Q ----- C T N A M Q V I N N Y Q R R C K N Q
RNase 3	RPP Q F T R A Q W F A I Q H I S L N P P R ----- C T I A M R A I N N Y R W R C K N Q
RNase 4	--- Q D G M Y Q R F L R Q H V H P E E T G G- S D R Y C N L M M Q R R K M T L Y H C K R F
RNase 5	-- Q D N S R Y T H F L T Q H Y D A K P Q G R - D D R Y C E S I M R R R G L T S P - C K D I
RNase 6	W P K R L T K A H W F E I Q H I Q P S P L Q ----- C N R A M S G I N N Y T Q H C K H Q
RNase 7	K P K G M T S S Q W F K I Q H M Q P S P Q A ----- C N S A M K N I N K H T K R C K D L
RNase 8	K P K D M T S S Q W F K T Q H V Q P S P Q A ----- C N S A M S I I N K Y T E R C K D L
RNase 1	N T F V H E P L V D V Q N V C F Q E K V T C K N G Q G -- N C Y K S N S S M H I T D C R L T N G S
RNase 2	N T F L L T T F A N V V N V C G N P N M T C P S N K T R K N C H H S G S Q V P L I H C N L T T P S
RNase 3	N T F L R T T F A N V V N V C G N Q S I R C P H N R T L N N C H R S R F R V P L L H C D L I N P G
RNase 4	N T F I H E D I W N I R S I C S T T N I Q C K N G K M -- N C H E G V-- V K V T D C R D T G S S
RNase 5	N T F I H G N K R S I K A I C E N K N G--- N P H R E - N L R I S K S S F Q V T T C K L H G G S
RNase 6	N T F L H D S F Q N V A R V C D L L S I V C K N R R H -- N C H Q S S K P V N M T D C R L T - S G
RNase 7	N T F L H E P F S S V A A T C Q T P K I A C K N G D K -- N C H Q S H G P V S L T M C K L T - S G
RNase 8	N T F L H E P F S S V A I T C Q T P N I A C K N S C K -- N C H Q S H G P M S L T M G E L T - S G
RNase 1	R-- Y P N C A Y R T S P K E R H I I V A C E G S----- P Y V P V H F D A S V E D S T
RNase 2	P Q N I S N C R Y A Q T P A N M F Y I V A C D N R D Q R R D P P Q Y P V P V H L D R I I ----
RNase 3	A Q N I S N C R Y A D R P G R R F Y V V A C D N R D - P R D S P R Y P V P V H L D T T I ----
RNase 4	R-- A P N C R Y R A I A S T R R V V I A C E G N----- P Q V P V H F D G -----
RNase 5	P-- W P P C Q Y R A T A G F R N V V V A C E N G----- L P V H L D Q S I F R R P
RNase 6	K-- Y P Q C R Y S A A A Q Y K F F I V A C D P P Q - K S D P P - Y K L V P V H L D S I L----
RNase 7	K-- Y P N C R Y K E K R Q N K S Y V V A C K P P Q - K K D S Q Q F H L V P V H L D R V L----
RNase 8	K-- Y P N C R Y K E K H L N T P Y I V A C D P P Q - Q G D P G - Y P L V P V H L D K V V----

Abbildung 1 Vergleich der Aminosäuresequenz aller RNase A-Superfamilienmitglieder. Konservierte Aminosäuren sind fett gedruckt, aus: Harder et al.¹²

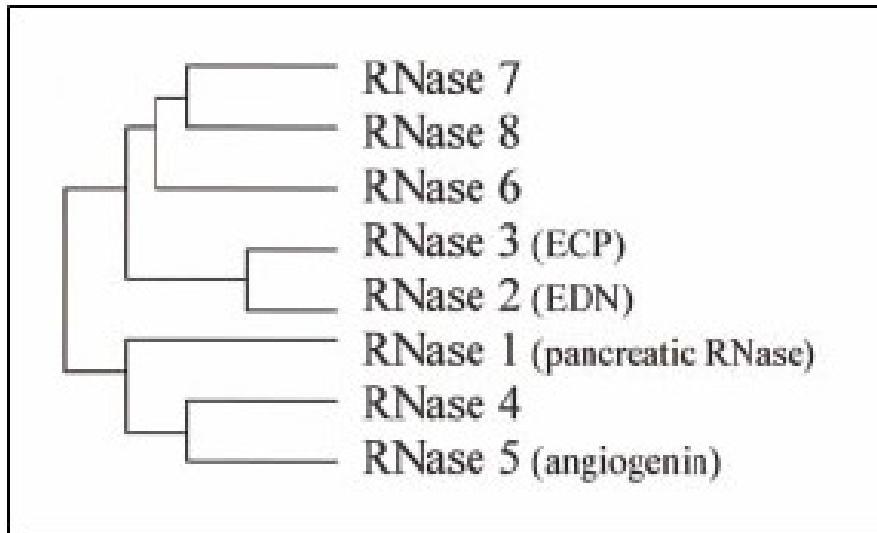


Abbildung 2 Die phylogenetische Verwandtschaft der Mitglieder der humanen RNase A-Superfamilie, aus: Zhang et al.³

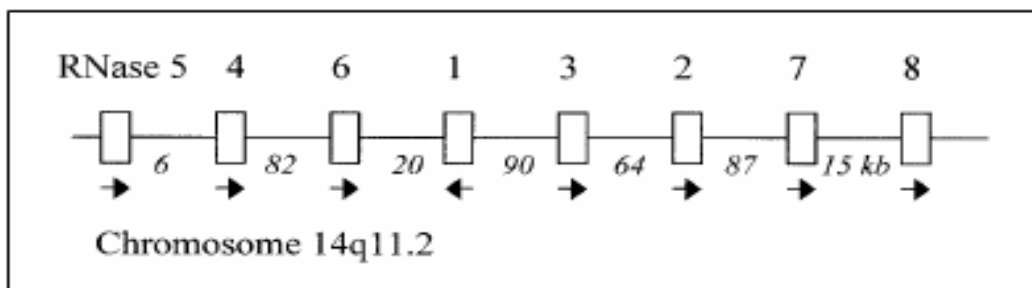


Abbildung 3 Die chromosomale Lokalisation der acht humanen RNase A-Gene. Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtungen an. Die Abstände zwischen den Genen sind angegeben. RNase 8 ist am nächsten zum Telomer, RNase 5 zum Zentromer. Der vollständige RNase A-Genabschnitt beträgt ca. 368 kb, aus: Zhang et al.¹³

1.2 Zytotoxizität und antitumorale Eigenschaften extrazellulärer RNasen

Extrazelluläre RNasen sind in der Lage, ins Zytosol einzudringen, dort intrazelluläre RNA abzubauen und somit die Proteinbiosynthese zu hemmen, was schließlich zum Zelltod führt. Diese zytostatische und zytotoxische Aktivität der RNasen ist antiproportional abhängig von ihrer Affinität zum zytosolisch gelegenen, 50 kDa großen RNase-Inhibitor (RI) (siehe Abbildung 4, S. 11), der dort in hoher Konzentration (bis zu 0,1 % der Zellproteine) vorkommt. Je höher diese Affinität ist, desto besser wird die RNase-Aktivität gehemmt und desto geringer ist die toxische Wirkung der RNasen^{14,15,16}. Für RNase 1, beispielsweise, wurde eine hohe Affinität zum RI beobachtet, daher ist ihr zytotoxischer Effekt auch nur sehr niedrig.

Im Gegensatz dazu weist eine Amphibien-RNase, die in Froschoozyten (*Rana pipiens*) vorkommt und als Onconase bekannt ist, eine RI-Resistenz auf. Diese wird durch einige Aminosäureabweichungen am aktiven Zentrum bedingt, obwohl die Tertiärstruktur der Onconase der der humanen RNase A-Superfamilienmitglieder sehr ähnlich ist. Genau wie Onconase (die als Substrat tRNA bevorzugt) zeigt auch die bovine Seminal-RNase (BS-RNase, die rRNA vorzieht) eine sehr hohe Zytotoxizität, da sie als Dimer ebenfalls nicht vom RI gebunden und somit inaktiviert werden kann. Für beide RNasen ist in mehreren Tierversuchen eine sehr hohe antitumorale Aktivität nachgewiesen worden, jedoch einhergehend mit schwerwiegenden Nebenwirkungen wie Embryotoxizität, Immunsuppression und Aspermatogenese¹⁶. Aufgrund ihrer zytotoxischen bzw. antitumoralen Wirkung sind RNasen sehr interessant als zukünftige Chemotherapeutika zur Behandlung von Krebserkrankungen. Es liegen bereits vielversprechende Ergebnisse in der Tumorthherapie vor, bei der von einer Blockade der RI-Bindung zur RNase Gebrauch gemacht wird¹⁶. Die bereits erwähnte Onconase befindet sich zur Zeit in klinischen Studien im Phase III Stadium zur Behandlung vom malignen Mesotheliom. Weiterhin wird an der Herstellung spezifischer rekombinanter antitumoraler RNasen, die nur die gewünschte Zellart angreifen sollen und somit weniger Nebenwirkungen hätten, geforscht.

Andere Arbeiten zeigen, dass durch Aminosäuresubstitutionen (Glycin-Rest-Ersatz an Position 38 und 111, statt Aspartat und Glutamat) an der wenig toxischen bovinen RNase A ein immenser Anstieg der Zytotoxizität auf Werte der zuvor erwähnten BS-RNase zu erreichen ist¹⁷.

Des Weiteren wirken RI-resistente humane RNasen nicht immunogen und sind daher sehr gut geeignet als Immunotoxine (an Antikörper gekoppelte Toxine) zur Bekämpfung von entarteten Zellen. Da die bisher bekannten Immunotoxine meist pflanzlichen oder bakteriellen Ursprungs sind, können sie bislang aufgrund ihrer Immunogenität nur wenig eingesetzt werden, dies könnte sich künftig mit dem Einsatz von humanen RNasen ändern.

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Kombination von RNasen mit Zytostatika deren Effekt potenzieren kann¹⁶, sodass zusammenfassend zu sagen ist, dass RNasen, besonders aufgrund ihrer zytotoxischen Wirkung, ein sehr interessantes Forschungsgebiet, gerade im Hinblick auf die Behandlung von Krebspatienten, darstellen.

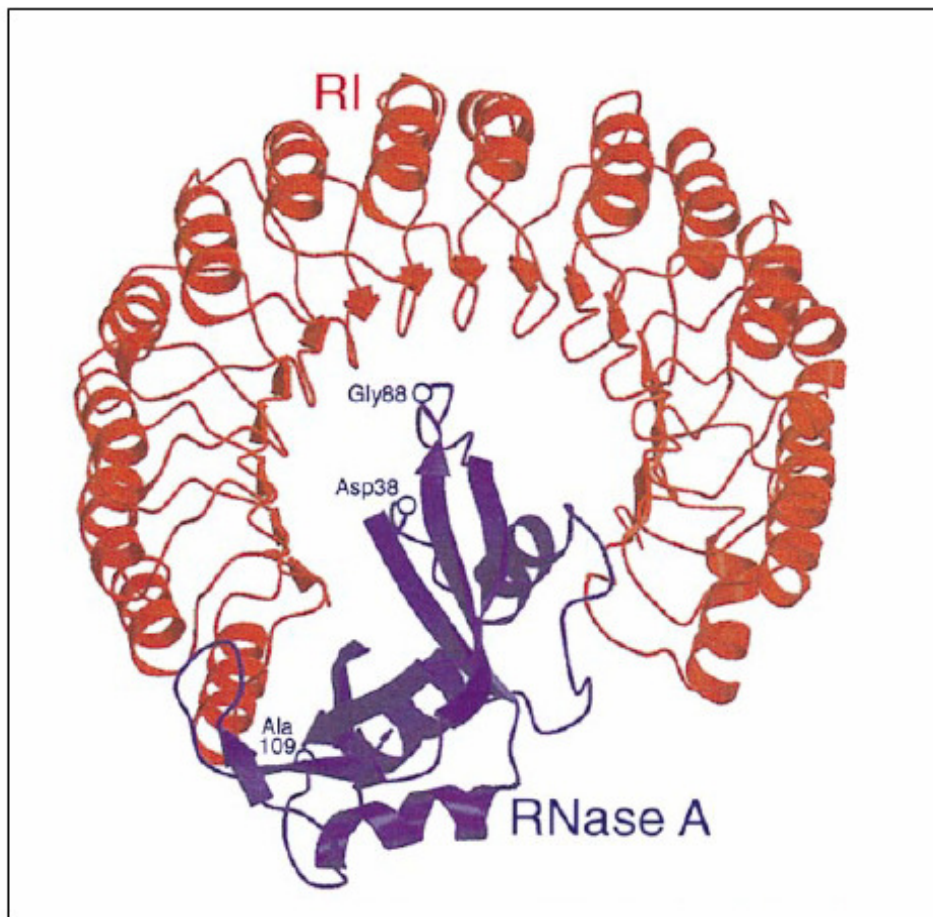


Abbildung 4 Kristalliner Komplex aus RNase-Inhibitor und boviner RNase A. Dreidimensionale Struktur des kristallinen Komplexes aus RNase-Inhibitor (RI, rot) und boviner RNase A (violett), aus: Leland et al.¹⁴

1.3 RNase 1

Ausgangspunkt dieser Arbeit sind Befunde von Landre et al.⁶, die zeigen, dass nicht nur, wie bislang angenommen, das Pankreas der Hauptsyntheseort der RNase 1 ist, sondern, dass dieses Enzym insbesondere auch von Endothelzellen (EC) in hohen Mengen exprimiert wird, während es in Epithelzellen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Immunzellen nicht detektierbar ist.

Die Expression von RNase 1 in EC und ihre somit mögliche rasche Freisetzung in die Blutzirkulation lässt vermuten, dass sie auch eine Rolle bei der Hämostase spielen könnte, gerade weil, wie unter Abschnitt 1.5 genauer erläutert, das Substrat dazu (RNA) eine prokoagulatorische Wirkung aufweist. Diese Hypothese wird unterstützt von Ergebnissen unserer Gruppe, die zeigen, dass RNase 1 *in vitro* und *in vivo* sowohl stark antithrombotische als auch Ödem vermindernde Effekte aufweist¹⁸.

Ferner könnte dieses Enzym nötig sein, um die Konzentration von unter pathologischen Bedingungen freigesetzter RNA niedrig zu halten sowie für eine ausgeglichene RNase-Aktivität zu sorgen.

Weiterhin wurde beobachtet, dass RNase 1, isoliert aus gesundem Pankreas, ein komplett anderes Glykolysierungsmuster zeigt als die aus Pankreas-Adenocarcinom-Tumorzellen^{7,8}. Während gesunde Pankreaszellen neutrale und fukosylierte Formen des Enzyms, ohne Sialinsäurereste exprimieren, weisen Tumorzellen sialinsäurehaltige Strukturen und saure Glykosylierungen der RNase 1 auf. Die Detektion dieses Glykolysierungsunterschiedes könnte von großem Wert für die Entdeckung eines neuen Tumormarkers sein, der gerade beim Pankreascarcinom sehr ersehnt wird, da dieser Tumor bislang nur sehr schwer zu diagnostizieren ist, meist erst im metastasierten Zustand erkannt wird und somit eine sehr schlechte Prognose sowie eine hohe Letalität aufweist. Mit Hilfe eines Tumormarkers könnte durch Früherkennung die Überlebenschance vieler Pankreascarcinom-Patienten wesentlich verbessert werden.

1.4 Angiogenin und seine klinische Relevanz

Angiogenin (RNase 5) (siehe Abb. 5, S. 14), das hauptsächlich in der Leber gebildet wird, ist, wie bereits erwähnt, ein ganz besonderes Mitglied der humanen RNase A-Superfamilie. Es zeigt im Vergleich zu den anderen RNasen eine nur sehr schwache

ribonukleolytische Aktivität (10^6 -fach niedriger), jedoch ist diese essentiell für Angiogenins vasoproliferative Wirkung¹¹. Angiogenin stellt eines der potentesten bislang bekannten angiogenen Faktoren *in vivo* dar.

Angiogenese, die die Gefäßneubildung aus bereits bestehenden Gefäßen beschreibt, ist ein physiologischer Prozess, der z.B. bei der Embryonalentwicklung, Wundheilung, Endometrialproliferation, usw. stattfindet¹⁹. Dabei bindet Angiogenin an einen 170 kDa großen Rezeptor auf den EC (wobei auch Interaktionen mit extrazellulärem Aktin und Heparin bekannt sind¹¹), der nach second messenger Stimulation die Aktivierung von proteolytischen Enzymen wie Metalloproteasen und Plasminogenaktivatoren bzw. Kollagenasen bewirkt. Dies führt zum Abbau der Basalmembran an der entsprechenden Stelle und ermöglicht die Penetration von EC, die anschließend tubuläre Formen annehmen und durch Verschmelzung die Bildung von neuen Blutgefäßen bewirken¹¹.

Andererseits erfolgt die Angiogenese auch verstärkt unter pathologischen Bedingungen, wie bei der diabetischen Retinopathie oder der rheumatoiden Arthritis. Des Weiteren gehen besonders Tumorwachstum, das auf eine erhöhte Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr angewiesen ist, und Metastasierung (Verschleppung von Tumorzellen durch Einbruch ins Gefäßsystem) mit gesteigerter Angiogenese einher. So konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass eine Korrelation besteht zwischen erhöhter Angiogenin-Expression (Serumkonzentration > 400 ng/ml bzw. erhöhtes Angiogenin im betroffenen Gewebe) und Tumorprogression bei z.B. Pankreas-, Colorectal-, Urothelial-, Brust-, Endometrium- und Ovarial-Karzinomen bzw. beim Melanom²⁰⁻²⁵.

Darüber hinaus ist die Serumangiogenin-Konzentration neben den bereits bekannten Kriterien, wie Lymphknotenbefall, Tumorgröße und Tumorstadium als Prognosefaktor für den Magenkrebs entdeckt worden²⁶. Es zeigte sich, dass das Serumangiogenin bei Magenkrebspatienten signifikant höher war, als bei Gesunden, dass es nach Tumoresektion auf normale Werte sank und dass Tumoraggression und Überlebenswahrscheinlichkeit u.a. auch von seiner Konzentration abhängig sind²⁶.

Somit überrascht es nicht, dass Angiogenin ein sehr interessantes Untersuchungsobjekt darstellt und dass Forscher versuchen, durch spezifische Blocker, die Angiogenese zu kontrollieren und dadurch ein Therapeutikum zu entwickeln, das gegen Tumorwachstum und Metastasierung, bzw. gegen pathologisch gesteigerte Vaskularisierung eingesetzt werden könnte. Dazu gibt es bereits Arbeiten, bei denen

durch den Einsatz von monoklonalen anti-Angiogenin-Antikörpern eine Verhinderung bzw. Verzögerung von Tumorprogression (Colonkarzinom, Lungenadenokarzinom, Fibrosarkom) und Metastasierung in Mäusen erzielt werden konnte^{27,28,29}.

Des Weiteren sind kürzlich Katechine in Grüntee (Polyphenole) als natürliche Inhibitoren von Angiogenin entdeckt worden, die sich auch als Therapeutika bei pathologisch gesteigerter Gefäßneubildung anbieten würden^{30,31}.

Diese viel versprechenden Beobachtungen und Ergebnisse lassen hoffen, dass in Zukunft mit dem Nachweis von Angiogenin Aussagen über Tumorverlauf und Prognose gemacht werden können, bzw. dass durch seine Hemmung die Angiogenese kontrolliert und somit Krankheiten, die darauf angewiesen sind, besser therapiert werden können.

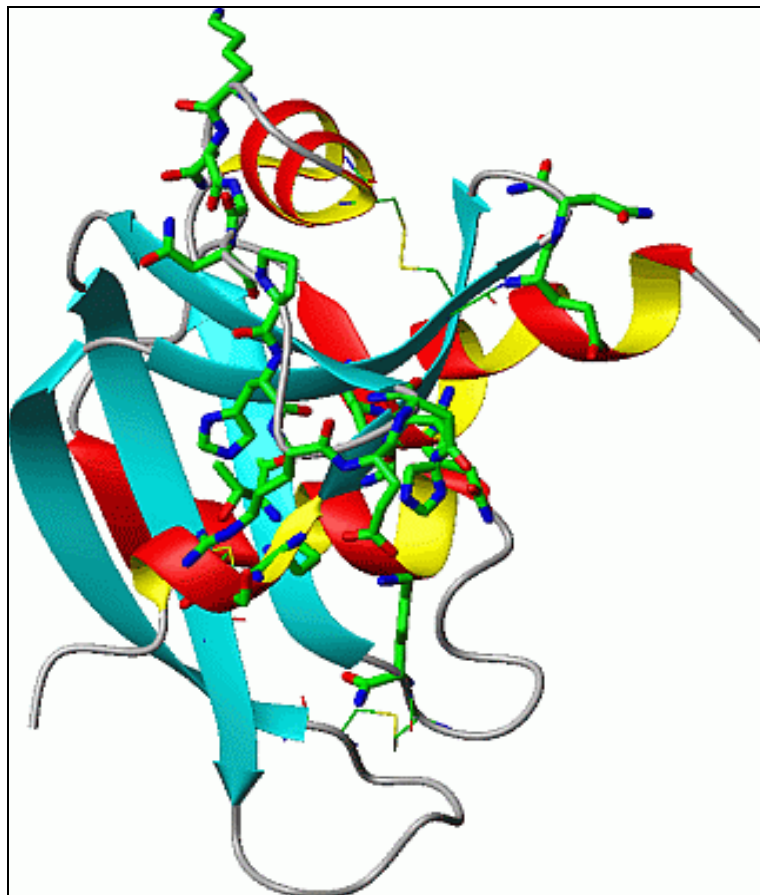


Abbildung 5 Struktur des Angiogenins.

1.5 Extrazelluläre RNA

Da extrazelluläre RNA das Substrat des in dieser Arbeit untersuchten Enzyms (RNase) darstellt, wird an dieser Stelle kurz auf die neusten Erkenntnisse dazu eingegangen.

Unter pathologischen Bedingungen, wie z.B. bei Zellschädigung, erhöhtem Zellumsatz bei Tumorerkrankungen oder bei Gefäßverletzung wird extrazelluläre RNA verstärkt ins Plasma freigesetzt und ist kürzlich als neuer prokoagulatorischer Faktor entdeckt worden. Durch die Aktivierung von Factor VII- activating protease (FSAP) hat extrazelluläre RNA eine wichtige Kofaktorfunktion bei der Blutgerinnung³². Außerdem wurde durch unsere Gruppe in *in vitro* und *in vivo* Versuchen gezeigt, dass sie durch eine erhöhte Aktivierung der Gerinnungsfaktoren XI und XII die Gerinnungskaskade fördert und somit lebensbedrohlichen Blutungen entgegenwirken sowie bei Wundheilung und der Abwehr von Mikroorganismen beteiligt sein könnte³³.

Des Weiteren wurde ebenfalls von unserer Gruppe beobachtet, dass extrazelluläre RNA *in vitro* durch Auflösung der tight junctions eine Permeabilitätssteigerung eines aus mikrovaskulären Gehirndothellzellen bestehenden Monolayers bewirkt und *in vivo* an der Ausbildung eines zerebralen Ödems beteiligt ist¹⁸.

Darüber hinaus konnten erhöhte Konzentrationen tumorspezifischer RNA im Plasma von Krebspatienten sowie fötusspezifische RNA im mütterlichen Plasma nachgewiesen werden³⁴⁻³⁸. Diese Entdeckungen haben eine große klinische Relevanz, denn der relativ einfache Nachweis von Plasma-RNA könnte die Möglichkeit bieten, nichtinvasive Tests zu etablieren, die in Bereichen wie Tumordiagnostik, -monitoring und -prognostik (RNA als Tumormarker; Nachweis tumorassoziierter Viren-RNA), Pränataldiagnostik (nichtinvasive Analyse fetaler Genexpression; frühe Geschlechtsbestimmung), Transplantationsmedizin und der Traumatologie ihre Verwendung finden könnten³⁴⁻³⁸.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der beschriebenen neuen Erkenntnisse über extrazelluläre RNA und RNasen, stellt sich die Frage nach Regulations- und Kontrollmechanismen. Hierzu ist es in erster Linie wichtig, die Rolle von RNasen als natürliche Gegenspieler von extrazellulärer RNA zu charakterisieren, da bestimmte extrazelluläre RNasen, wie bereits erwähnt, vermehrt in Endothelzellen exprimiert werden und somit ebenfalls in der Blutzirkulation vorhanden sind.

Um diese Zusammenhänge aufzuklären, sollte in dieser Arbeit zunächst *in vitro* untersucht werden, welche Arten von Endothelzellen (makrovaskulär versus mikrovaskulär) RNase 1 und Angiogenin, das, wie beschrieben, nur eine sehr geringe ribonukleolytische Aktivität, aber eine sehr starke angiogene Wirkung aufweist, exprimieren. Anschließend sollte die Regulation der RNase 1- und Angiogenin-Expression in makrovaskulären und mikrovaskulären Endothelzellen untersucht werden. Insbesondere sollte dabei geprüft werden, ob die Expression und die Aktivität dieser RNasen induzierbar oder hemmbar ist.

Dazu wurden Endothelzellen mit proinflammatorischen Stimuli (LPS, $\text{TNF}\alpha$), prokoagulatorischen (Thrombin, Poly IC und RNA) und antikoagulatorischen (aktiviertes Protein C, 5-Nitrosoglutathion) Regulatoren, Wachstumsfaktoren (VEGF, bFGF) sowie einem anti-angiogenen und anti-inflammatorischen bakteriellen Faktor (Eap) stimuliert, um Rückschlüsse darüber zu erhalten, welche Rolle RNase 1 und Angiogenin bei Entzündungsreaktionen und der Regulation der Hämostase sowie der Angiogenese spielen könnten.

Nach entsprechenden Stimulationen wurde hierzu die RNase 1- und Angiogenin-Expression sowohl auf mRNA- (RT-PCR) als auch auf Proteinebene (Western Blot) untersucht sowie die RNase-Aktivität mittels dem RNase –Aktivitätstest bestimmt, um festzustellen, ob unter diesen Bedingungen vermehrt RNase 1 und Angiogenin exprimiert werden oder ob eine RNase-Aktivitätsänderung zu beobachten ist.

2 Materialien

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

	Produktname	Firma	Firmensitz
acetyliertes BSA	Bovine serum Albumin, acetylated	Sigma	Taufkirchen
Acrylamid	Rotiphorese Gel 30	ROTH	Karlsruhe
Agarose	Agarose NEEO Ultra-Qualität, ROTI GAROSE	ROTH	Karlsruhe
APS	Ammonium persulfate analytical grade	SERVA	Heidelberg
BMEC-Medium	Medium199	Invitrogen	Karlsruhe
Bromphenolblau	Bromphenolblau, Na-Salz	ROTH	Karlsruhe
cyclic RGD	cyclic RGD	Bachem	Bubendorf, Switzerland
Cycloheximid	Cycloheximide	Sigma	Taufkirchen
Dextran	Dextran	Sigma	Taufkirchen
Dispase II	Dispase II	ROTH	Karlsruhe
DMSO	Dimethylsulfoxid für die Molekularbiologie	ROTH	Karlsruhe
DNA- Marker	Mass Ruler DNALadder, low range	Fermentas	St. Leon-Rot
EAP	Extracellular adherence proteins	Eigene Herstellung	Biochemie Gießen
EDTA	EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Sigma	Taufkirchen
Endothelial Cell Basal Medium	Endothelial Cell Basal Medium	PromoCell	Heidelberg
Essigsäure	Acetic acid (glacial), 100 % anhydrous	MERCK	Schwalbach
Ethidiumbromid	Ethidium bromide solution (10 mg/ml)	Sigma	Taufkirchen
Fatty-free BSA	Albumin, bovine serum Essentially Fatty Acid Free	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Fetal Bovine Serum	Fetal Bovine Serum	Perbio Science	Bonn

Fortsetzung Tabelle 1

	Produktname	Firma	Firmensitz
FGF	bFGF, human, recombinant	Invitrogen	Karlsruhe
Film-Entwicklerlösung	ECL-Plus Western Blotting Detection System	Amersham Biosciences	Freiburg
Fungizone	Fungizone	Invitrogen	Karlsruhe
Gelatine	Gelatin, 2 %Solution Type B: From Bovine Skin	Sigma	Taufkirchen
Gel-Blott-Pappe	Gel-Blotting-Paper	Whatman	Dassel
Glucose	Glucose	Sigma	Taufkirchen
Glycerin	Glycerin Rotipuran	ROTH	Karlsruhe
Growth factors for HUVEC-Medium	Supplement Pack (hEGF-0,05; hbFGF-0,5; HC-500)	PromoCell	Heidelberg
HBMEC-Medium	RPMI 1640	Biochrom	Berlin
HCL	Hydrochloric Acid 2 mol/l	ROTH	Karlsruhe
Heparin	Heparin	Sigma	Taufkirchen
Hepes	Hepes (Pufferan für die Gewebezucht)	ROTH	Karlsruhe
Isobutanol	2-Methyl-1-propanol Rotipuran	ROTH	Karlsruhe
Isopropanol	Isopropanol	ROTH	Karlsruhe
KCl	Kaliumchlorid	ROTH	Karlsruhe
Kollagen	Collagen rat tail	BD	Heidelberg
Kollagenase	Collagenase Type 2	Cell Systems	St. Katharinen
Lanthanchlorid	Lanthanum chloride heptahydrate	Sigma	Taufkirchen
L-Glutamin	L-Glutamine 200 mM (100x)	Gibco	Karlsruhe
LPS	LPS	Sigma	Taufkirchen
MEM-Vitamine	MEM-Vitamine	Gibco	Karlsruhe
Methanol	Methanol	Fluka	Taufkirchen
Milchpulver	Skim-Milk-Powder	Fluka	Taufkirchen

Fortsetzung Tabelle 1

	Produktname	Firma	Firmensitz
NaCl	Natriumchlorid	ROTH	Karlsruhe
NaF	Natriumfluorid	MERCK	Schwalbach
NaHCO ₃	NaHCO ₃	Sigma	Taufkirchen
Na-pyruvat	Na-pyruvat	Gibco	Karlsruhe
Natriumortho- vanadat	Natriumorthovanadat	Sigma	Taufkirchen
Non-essential- amino-acids	Non-essential-amino-acids	Gibco	Karlsruhe
NU-Serum	NU-Serum	BD	Heidelberg
Penicillin/ Streptomycin	Penicillin/ Streptomycin	GIBCO	Karlsruhe
Perchlorsäure	Perchlorsäure, A.C.S. Reagenz, 70 %ige Lösung in Wasser	Aldrich	Taufkirchen
Percoll	Percoll	Amersham Biosciences	Freiburg
PMA	Phorbolmyristatacetat	Sigma	Taufkirchen
Poly C	Polycytidylic acid potassium salt	Sigma	Taufkirchen
Poly IC	Poly (I)- Poly (C), Double-Strand	Amersham Biosciences	Freiburg
Protease-inhibitor- cocktail tablet	Complete Mini, EDTA-free	Roche	Mannheim
Proteinkonzentrations- säulen	Centricon, 10.000 NMWL (nominal molecular weight limit)	MILLIPORE	Schwalbach
Proteinmarker	PageRuler prestained Protein- Ladder	Fermentas	St. Leon-Rot
PVDF-Membran	Hybond-P PVDF Membrane	Amersham Biosciences	Freiburg
RNase-A	Ribonuclease A	Fermentas	St. Leon-Rot
RNase-Inhibitor	Ribonuclease Inhibitor, Human, Recombinant, E.coli	Calbiochem	Schwalbach
SDS	Sodium dodecyl sulfate	Fluka	Taufkirchen
S- Nitrosoglutathion	S-Nitrosoglutathione	Calbiochem	Schwalbach
β-Glycerophosphat	β-Glycerophosphate	Sigma	Taufkirchen
Temed	TEMED	ROTH	Karlsruhe

Fortsetzung Tabelle 1

	Produktname	Firma	Firmensitz
Thrombin	Thrombin (from bovine Plasma)	Sigma	Taufkirchen
TNF α	rh TNF- α , Tumor Necrosis Factor Alpha, recombinant human (E.coli-derived)	R&D Systems	Wiesbaden- Nordenstadt
Tris	TRIS Pufferan	ROTH	Karlsruhe
Triton-X-100	Triton-X-100, Sigma Ultra	Sigma- Aldrich	Taufkirchen
Trypsin/EDTA	Trypsin/EDTA (10 x)	Invitrogen	Karlsruhe
Tween 20	Tween 20	ROTH	Karlsruhe
Ultra pure Water	Ultra pure Water, sterile, low Endotoxin	Biochrom	Berlin
Vasopressin	[Arg]-Vasopressin	Sigma	Taufkirchen
VEGF	VEGF165, recombinant	R&D Systems	Wiesbaden- Nordenstadt

2.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 2 Verwendete Puffer und Lösungen

Name	Konzentration	Bestandteile
Blotpuffer	0,02 M 0,15 M 20 %	Tris Glycin Methanol
Earle-Salz Lösung (Angaben für 1l)	116 mM 5,4 mM 0,9 mM 0,8 mM 5,5 mM 1,8 mM	NaCl KCl NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O MgSO ₄ x 7H ₂ O Glucose CaCl ₂
HBS (11 x) (pH 7,4)	1,31 M 44 mM 121 mM 220 mM	NaCl KCl Glucose HEPES
Kollagenase-Lösung (0,02 %ig) (Bestandteile in HBS gelöst)	76,4 μ /ml 1 mM 1 mM	Kollagenase Typ2 MgCl ₂ CaCl ₂

Fortsetzung Tabelle 2

Name	Konzentration	Bestandteile
Ladepuffer (4 x)	25 % 5 % 40 % Spatelspitze	Sammelgelpuffer SDS Glycerin Bromphenolblau
Laufpuffer	0,125 M 1,25 M 0,5 %	Tris Glycin SDS
PBS (11 x) (pH 7,4)	1,5 M 0,03 M 0,09 M 0,02 M	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O KH ₂ PO ₄
Perchlorsäure-Lanthanchlorid-Lösung	6 % 20 mM	Perchlorsäure Lanthanchlorid
Percoll-Lösung (Dichte: 1,04 g/cm ³)	80 % 18 % 2 %	1 x PBS Percoll Medium 199 (10 x)
Percoll-Lösung (Dichte: 1,08 g/cm ³)	40 % 54 % 6 %	1 x PBS Percoll Medium 199 (10 x)
Proteinlysepuffer (pH 7,5)	100 mM 2 mM 1 % 20 mM 10 mM 5 mM	NaCl EDTA Triton-X-100 Tris β-Glycerophosphat NaF
RNase-buffer (pH 8)	50 mM 130 mM 2 mM	Tris NaCl EDTA
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	1 M 0,4 %	Tris SDS
Stripping buffer I (pH 2,8)	200 mM 0,1 %	Glycin Tween 20
Stripping buffer II (pH 9)	200 mM 200 mM 0,1 %	Glycin NaCl Tween 20

Fortsetzung Tabelle 2

Name	Konzentration	Bestandteile
TAE-buffer (1 x)	0,04 M 0,02 M 0,001 M	Tris Essigsäure EDTA
TBS (1 x) (Tris-buffered-saline)	25 mM 0,15 M 0,003 M	Tris NaCl KCl
TBS-T (1 x) (Tris-buffered-saline-Tween)	25 mM 0,15 M 0,003 M 0,1 %	Tris NaCl KCl Tween 20
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M 0,4 %	Tris SDS

2.3 Zellmedien

Tabelle 3 Verwendete Zellmedien

Name	Zusammensetzung
HUVEC-Vollmedium	<ul style="list-style-type: none"> • 500 ml Endothelial Cell basal Medium • 25 ml Fetal bovine serum (5 %) • 5 ml Penicillin/Streptomycin (1 %) • Supplement: <ol style="list-style-type: none"> 1. hEGF-0,05 2. hbFGF-0,5 3. HC-500
HBMEC-Vollmedium	<ul style="list-style-type: none"> • 470 ml RPMI 1640 • 60 ml Fetal bovine serum (10 %) • 60 ml NU-Serum (10 %) • 6 ml L-Glutamin (2 mM) • 12 ml Penicillin/Streptomycin (100 units/ml) • 6 ml MEM-Vitamine (1:100) • 6 ml non-essential-amino-acids (1:100) • 6 ml Na-pyruvat (1 mM)
BMEC-Vollmedium	<ul style="list-style-type: none"> • 500 ml Medium-199 • 5 ml Penicillin/Streptomycin (1 %) • 100 ml Fetal bovine serum (20 %) • 5 ml Fungizone (1 %)

2.6 Primer

Tabelle 6 Verwendete Primer

Primername	Sequenz	Firma	Firmensitz
HP-RNase forward	5'-GAA TCC CGG GCC AAG AAA TTC-3'	Thermo Electron	Ulm
HP-RNase reverse	5'-GTG TCT CTC CTT CGG GCT GGT-3'	Thermo Electron	Ulm
Angiogenin forward	5'-ACC CTG GCT CAG GAT AAC TCC-3'	Thermo Electron	Ulm
Angiogenin reverse	5'-GCA GAG GGG AAA TGG AAG GCA-3'	Thermo Electron	Ulm
Actin forward	5'-ATT GCC GAC AGG ATG CAG GAA-3'	ROTH	Karlsruhe
Actin reverse	5'-GCT GAT CCA CAT CTG CTG GAA-3'	ROTH	Karlsruhe

2.7 Geräte

- Brutschrank: CO₂-Inkubator, Sanyo (Bad Nenndorf, Deutschland)
- Hyperfilm, Amersham Biosciences (Freiburg, Deutschland)
(Filme für den Western blot)
- Gelelektrophorese: Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, Biorad
(München, Deutschland)
(Western blot)
- Heizblock: Schutron Thermoshaker, CLF Emersacker
(Emersacker, Deutschland)
(Inkubator für den RNase-Aktivitätstest)
- Mikroskope:
 1. Wilovert, Will (Wetzlar, Deutschland)
(Beobachtung der Zelllösung nach Trypsinierung)
 2. Leica DMIC, Leica (Bensheim, Deutschland)
(Prüfung der Zellen auf Vitalität und Konfluenz)

- Gel Doc2000 Documentation System, Biorad
(München, Deutschland)
Software: Quantity One, Biorad (München- Deutschland)
(PCR-Gel-Aufnahme)
- PCR-Gelelektrophorese: Mini-sub-cell GT, Biorad (München, Deutschland)
- PCR-Maschine: T-Gradient, Biometra (Göttingen, Deutschland)
- Photometer: EL808 Ultra Mikroplate Reader, BioTek instruments
(Bad Friedrichshall, Deutschland)
Software: KC4, BioTek instruments (Bad Friedrichshall, Deutschland)
(Proteinkonzentrationsbestimmung)
- Photometer: Gene Quant pro- RNA/DNA Calculator,
Amersham pharmacia biotech
(Freiburg, Deutschland)
(RNA- Konzentrations- und -Reinheitsbestimmung)
- Sterilbank: Lamin Air, Heto Holten (Allerød, Dänemark)
- Vakuumzentrifuge, RC 10.22, Jouan (Dreieich bei Frankfurt, Deutschland)
(Speed-Vac)
- Zellkulturschalen: Cellstar Tissue culture dishes, Greiner bio-one
(Frickenhausen, Deutschland)
- Zentrifugen:
 1. Labofuge 400R, Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
(Zellsplitting)
 2. Rotina 46R, Hettich Zentrifugen (Nierstein, Deutschland)
(Überstandseinengung)
 3. Mikro22R, Hettich Zentrifugen (Nierstein, Deutschland)
(RNase-Aktivitätstest)
 4. Mikro20, Hettich Zentrifugen (Nierstein, Deutschland)
(RNA-Isolierung)

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Verwendete Endothelzellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden mittels einer Laminar-Flow-Hood unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten EC waren Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) (siehe Abb. 6), Human brain microvascular endothelial cells (HBMEC) (siehe Abb. 7, S. 27), die freundlicher Weise von Dr. Kim³⁹ zur Verfügung gestellt wurden, sowie Brain microvascular endothelial cells of the pig (BMEC) (siehe Abb. 8, S. 27).

Außerdem wurden zwei weitere Endothelzellreihen, nämlich Bovine retinal endothelial cells (BREC) und Rat microvascular endothelial cells (RMVEC) benutzt.

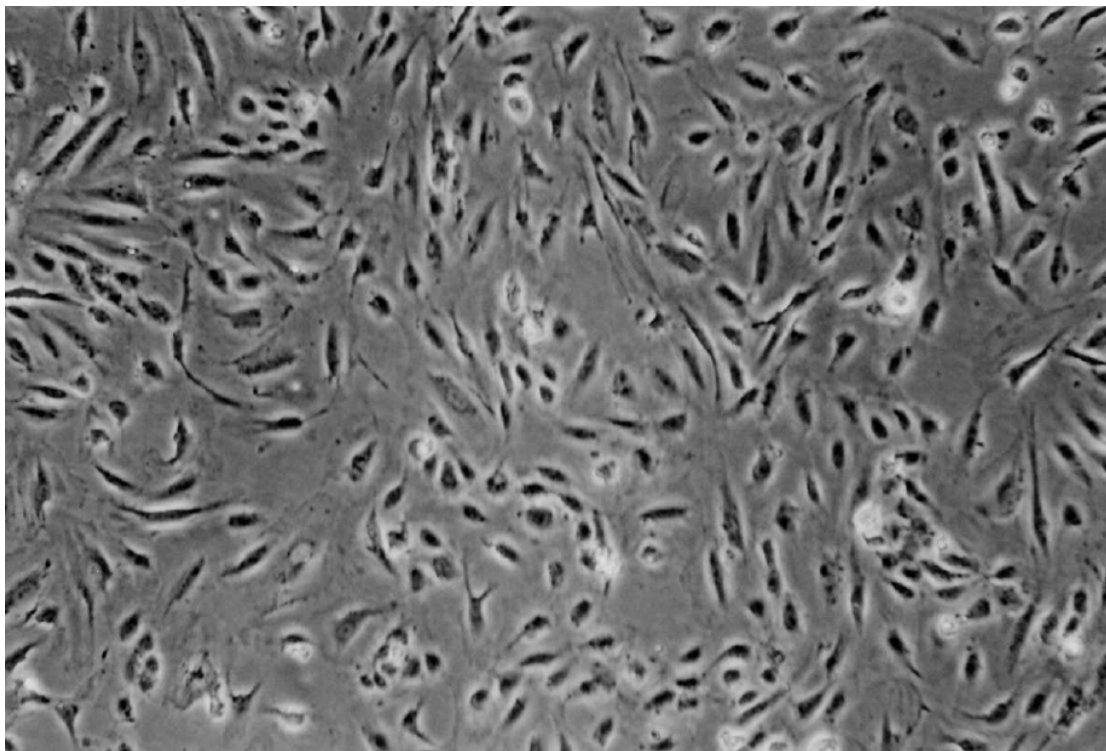


Abbildung 6 Morphologie von HUVEC, 100-fache Vergrößerung.

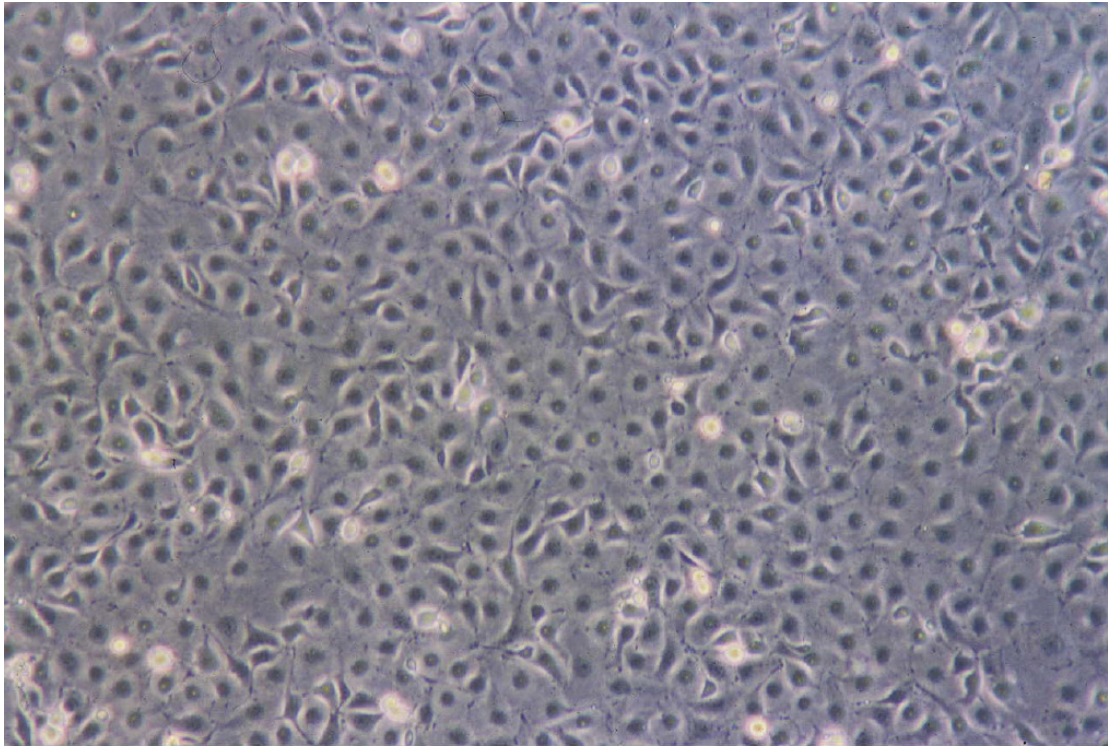


Abbildung 7 Morphologie von HBMEC, 100-fache Vergrößerung. Endothelzellen bilden einen Monolayer und wachsen nicht mehrschichtig übereinander.

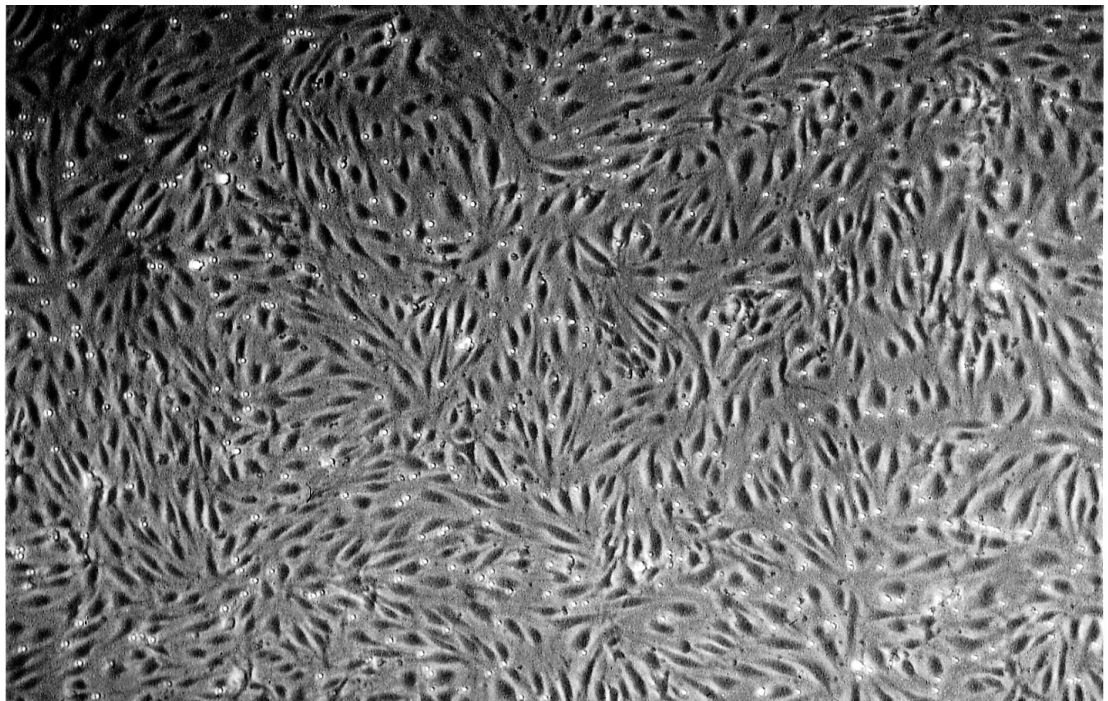


Abbildung 8 Morphologie von BMEC, 100-fache Vergrößerung. Im konfluenten Stadium zeigen sie ein spindelförmiges Wachstumsmuster.

3.1.2 Isolierung von HUVEC

Die Nabelschnüre, die freundlicher Weise von der gynäkologischen Abteilung der Universitätsklinik-Gießen zur Verfügung gestellt wurden, wurden direkt nach der Abnabelung in sterile Becher gegeben, im Kühlschrank aufbewahrt und innerhalb von 48 h bearbeitet.

Zur Isolierung von HUVEC wurde die Nabelschnur unter der Sterilbank mit einer sterilen Kompresse gesäubert und auf Verletzungen und Blutgerinnsel inspiziert, die, wenn vorhanden, mit einem sterilen Skalpell entfernt wurden. Die Nabelschnur sollte dabei eine Mindestlänge von 15 cm nicht unterschreiten. Aufgrund der höheren Kontaminationsgefahr im Randbereich wurde an einem Ende der Nabelschnur etwa 1 cm abgeschnitten, gleichzeitig wurde die Vene dadurch besser auffindbar. In diese Nabelschnurvene wurde nun vorsichtig eine Knopfkanüle mit einem Dreiwegehahn eingeführt und durch einen Nylonstrip befestigt. Somit konnte die Vene anschließend zweimal mit je 50 ml 1 x Hebes buffered saline (HBS) durchgespült werden, um Blutreste zu entfernen. Dann wurde das andere Ende der Nabelschnur durch einen Nadeladapter mit einem Schlauch kanüliert, welcher nun abgeklemmt wurde. Über den Dreiwegehahn wurde eine Kollagenaselösung (0,02 %) in die Vene gespritzt, bis diese voll, aber nicht zu überdehnt war. Anschließend erfolgte eine 20-minütige Inkubation bei 37 °C im Brutschrank bis, mit Hilfe der Kollagenase, das Endothel von der Gefäßwand gelöst werden konnte. Nach einer vorsichtigen Massage der Nabelschnur zur besseren Ablösung der EC, wurden die gelösten Zellen mit 30 ml 1 x HBS in ein Falcon gespült, in das 1 ml fetales Kälberserum (FCS) vorgelegt war, um die Kollagenase-Aktivität zu stoppen. Danach erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 126 g, der Überstand wurde verworfen, das gewonnene Pellet in 5 ml HUVEC-Vollmedium (HUVEC-VM) resuspendiert und auf eine zuvor mit 0,2 % Gelatine beschichtete 6 cm Kulturschale ausgesät. Nach etwa zwei bis drei Tagen war die Schale dicht und konnte passagiert werden.

3.1.3 Isolierung von BMEC

Für die Isolierung dieser EC wurden zehn bis zwölf möglichst frische Schweinehirne in 600 ml kaltem 70 %igem Isopropanol vom Schlachthof zum Labor transportiert, wo sie unter der sterilen Werkbank in 200 ml Earle-Salz-Lösung mit 5,9 ml

7,5 %igem NaHCO_3 und 2 % Penicillin/Streptomycin überführt wurden. Anschließend erfolgte jeweils das Abtrennen und Verwerfen von Hirnhaut, Fettgewebe, Kleinhirn und Hirnstamm, bevor die Gehirne auf einer sterilen Glasplatte mit Hilfe von zwei Skalpellern zerkleinert wurden. Der auf diese Weise entstandene Hirnbrei wurde dann in ein Becherglas mit vorgelegtem 200 ml 37 °C warmen BMEC-Medium ohne FCS (+ 1 % Penicillin/Streptomycin) und 45 ml Dispase-Lösung (5 g Dispase II gelöst in 45 ml BMEC-Medium ohne FCS) gegeben. Es folgte ein zweistündiges Rühren bei Raumtemperatur bis zum Eintritt der Homogenisierung der Suspension. Mit dieser enzymatischen Verdauung wird die Freisetzung der Kapillaren erreicht. Um diese zu isolieren, wurden je 50 ml Homogenisat mit 75 ml kalter 15 % Dextranlösung (150 g Dextran gelöst in 1 l Earl-Salz-Lösung) versetzt, und es wurde gut geschüttelt, bevor eine Zentrifugation bei 4 °C und 5000 g für 10 min erfolgte. Anschließend wurde der Überstand abdekantiert und das Myelin und Fett mit einem sterilen Löffel ausgekratzt und verworfen. Das Zellpellet, bestehend aus Erythrozyten und Kapillaren, wurde mit 4 ml BMEC-Medium ohne FCS resuspendiert. Diese Suspension wurde nun durch ein steriles Polyesternetz (250 μ) in eine Laborglasflasche filtriert, die 70 mg Dispase/Kollagenase in 3 ml BMEC-Medium ohne FCS enthielt. Die Flasche wurde gut abgedichtet und bei 37 °C im Wasserbad für 3 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Dieser zweite enzymatische Verdauungsschritt führt zum Abbau der Basalmembran und somit zur Freisetzung der gewünschten EC.

Während der Inkubationszeit wurde der Percollgradient vorbereitet, indem in sechs Falcons jeweils 15 ml der dichteren Percolllösung (1,08 g/cm^3) vorgelegt und mit je 20 ml der weniger dichten Percolllösung (1,04 g/cm^3) durch langsames und vorsichtiges Auftropfen überschichtet wurden.

Nach der Inkubation wurde die Suspension in zwei Falcons überführt und 10 min bei Raumtemperatur und 1000 g zentrifugiert. Es folgten Abdekantieren der Überstände und Resuspendieren der Zellpellets mit 60 ml BMEC-Medium ohne FCS. Um eine Entfernung von Zellfragmenten und Erythrozyten zu erreichen, wurden anschließend je 10 ml der Zellsuspension vorsichtig auf den zuvor vorbereiteten Percollgradienten aufgetropft und 10 min bei 4 °C und 1300 g zentrifugiert. Danach wurde die mittlere Fraktion entnommen, indem mit einer Pipette durch die obere Fettschicht hindurch gestochen wurde, und die EC, die sich an der Grenzfläche zwischen den beiden Percollösungen befanden, aufgezogen wurden. Diese wurden sofort in einem Falcon

1 : 1 mit kaltem BMEC-Medium ohne FCS verdünnt und 5 min bei Raumtemperatur und 157 g zentrifugiert. Es folgte das Absaugen des Überstandes und die Resuspension des Pellets mit 5 ml kaltem und reinem FCS. Schließlich wurden aus dieser Lösung zwei Testschalen angelegt mit je 42 bzw. 84 µl Zellsuspension, wobei die Schalen zuvor mit 1 % Kollagen I (8,6 µg/ml) in 0,02 M Essigsäure beschichtet worden waren. Die restliche Zellsuspension wurde mit Hilfe des Cryomixes eingefroren (siehe Abschnitt 3.1.5) und bis zur Weiterverwendung bei -80 °C aufbewahrt. Für Versuche mit BMEC wurden stets primäre Zellkulturen verwendet.

3.1.4 Kultivierung und Passagieren der verwendeten Endothelzellen

Alle verwendeten EC wurden bei 37 °C in feuchter Atmosphäre und unter 5 % CO₂ kultiviert. Für die Kultivierung der HUVEC war eine Gelatinebeschichtung der Kulturschalen nötig (es wurden sowohl 79 cm² Schalen als auch 6-well-Platten benutzt), dazu wurden diese entweder über Nacht bei 4 °C oder im Brutschrank bei 37 °C für 1 h mit 0,2 % Gelatinelösung inkubiert. Für die BMEC wurden Schalen mit 1 % Kollagen I (8,6 µg/ml) in 0,02 M Essigsäure Beschichtung verwendet. Zur Kultivierung der HBMEC war keine spezielle Beschichtung notwendig. In der Regel waren drei bis fünf Tage nötig, bis nach dem Auftauen der Zellen eine Konfluenz erreicht war und passagiert werden konnte.

Zum Passagieren wurde das alte Medium weggesaugt und die Schale mit 10 ml 37 °C warmem 1 x Phosphate buffered saline (PBS) gewaschen. Anschließend wurde 1 ml 1 x Trypsin-EDTA-Lösung auf die Schale pipettiert, die gut geschwenkt wurde, bevor sie 1 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert wurde. (Bei HBMEC und BMEC, die sich schwerer ablösten, waren 3-5 min Inkubationszeit nötig). Das Ablösen der Zellen wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert und bei Bedarf wurde durch Beklopfen der Schale etwas nachgeholfen. Die Trypsinaktivität wurde nun mit 9 ml RPMI-VM abgestoppt, das Gesamtvolumen von 10 ml pro Schale in ein Falcon überführt und 5 min bei 126 g in Raumtemperatur zentrifugiert. In der Regel erfolgte das Passagieren in einem Verhältnis von 1 : 4, dazu wurde das Pellet, gewonnen aus einer Schale, in 4 ml entsprechendem Kulturmedium resuspendiert und davon je 1 ml auf vier Schalen mit je 9 ml vorgelegtem 37 °C warmem Medium ausgesät.

3.1.5 Einfrieren und Auftauen von Endothelzellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst mit 10 ml 37 °C warmem 1 x PBS pro Schale gewaschen, bevor die Trypsinierung und Zentrifugation, wie bereits in Abschnitt 3.1.4 beschrieben, erfolgte. Das Pellet wurde anschließend in reinem FCS (0,5 ml pro Schale) resuspendiert. Unter Schwenken auf Eis wurde zu dieser Zellsuspension das Kryomix (Medium ohne FCS + 20 % Dimethylsulfoxid (DMSO)) in einem Verhältnis von 1 : 1 langsam hinzugetropft. Je 1 ml dieses Gemisches wurde danach in Cryoröhrchen überführt, die zum langsamen Abkühlen in einen Freezing Container gestellt wurden. Nach 24 h konnten die Cryoröhrchen dann zum längeren Aufbewahren der Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Zum Auftauen der Zellen wurde das Cryoröhrchen kurz im 37 °C warmen Wasserbad geschwenkt und die aufgetaute Zellsuspension (ca. 1 ml) zu 9 ml vorgelegtem Kultur-VM (37 °C) hinzupipettiert. Diese Schritte müssen sehr zügig ablaufen, da das DMSO schädlich für die Zellen ist. Anschließend erfolgte eine fünf-minütige Zentrifugation bei 126 g, das Pellet wurde in 10 ml jeweiligem Kulturmedium (37 °C) resuspendiert und auf die entsprechend beschichtete 79 cm² Schale ausgesät.

3.1.6 Zellstimulation

Für die Zellstimulation wurden die entsprechenden Stimulanzien in verschiedenen Konzentrationen in Kulturmedium ohne FCS angesetzt.

Konfluent gewachsene Zellen wurden mit 10 ml 1 x PBS pro Schale (79 cm²) gewaschen und anschließend mit je 4 ml Stimulanzansatz 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Es wurden stets auch unbehandelte Kontrollen mitgeführt (Medium ohne FCS).

Nach der Inkubationszeit wurden die Überstände abgenommen, eingefroren und später eingeengt (siehe Abschnitt 3.3.2). Die entsprechenden Zellen wurden entweder für Protein- oder RNA-Lysat-Herstellung verwendet (siehe Abschnitte 3.3.1 und 3.4.1).

Bei den Zeitabhängigkeitstests betragen die Inkubationszeiten 0 min, 1 h, 3 h, 7 h und 24 h.

Für die Zeitabhängigkeit der RNase-Aktivität wurden 6-well-Platten benutzt, die Stimulation erfolgte mit 1 ml Stimulanzansatz pro well (je 3-fach-Werte) und nach

den entsprechenden Inkubationszeiten wurden je 100 µl Überstand abgenommen, der bis zur Durchführung des Tests bei -20 °C eingefroren wurde.

3.2 Zytotoxizitätstest

Der Zytotoxizitätstest diente der Untersuchung auf die toxische Wirkung der von uns verwendeten Stimulanzen in den jeweiligen Konzentrationen. Dafür wurde das LDH-Cytotoxicity Detection Kit verwendet, mit dem die LDH-Aktivität photometrisch bestimmt werden konnte.

Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein stabiles ubiquitäres zytoplasmatisches Enzym, das bei der Zellyse bzw. bei der Beschädigung der Plasmamembran unmittelbar freigesetzt wird und beispielsweise im Überstand nachgewiesen werden kann.

Die Methode besteht aus folgenden zwei Schritten:

Zunächst oxidiert die LDH Laktat (in Lösung 1 des Kits) zu Pyruvat, wobei jeweils zwei Wasserstoffatome freigesetzt werden. Diese werden daraufhin durch einen Katalysator (in Lösung 2 des Kits) auf das gelbe Tetrazolium Salz übertragen, das dadurch zu rotem Formazan Salz reduziert wird (siehe Abb. 9, S. 33) und somit photometrisch bestimmt werden kann.

Für diesen Test wurden HUVEC auf einer zuvor mit 0,2 %iger Gelatinelösung (50 µl pro well) beschichteten 96-well-Mikrotiterplatte mit 100 µl HUVEC-VM kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen einmal mit 1 x PBS gewaschen (200 µl pro well) und anschließend mit der entsprechenden Konzentration des zu untersuchenden Stimulanzes in FCS-freiem Medium (200 µl pro well) 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Es wurden jeweils 3-fach-Werte pipettiert.

Nach 24 h Inkubationszeit wurden je 100 µl Überstand pro well in gleicher Anordnung auf eine neue 96-well-Mikrotiterplatte überführt. Falls während dieser Zeit Zellyse stattgefunden haben sollte, müsste die LDH-Aktivität in den entsprechenden Überständen erhöht sein.

Um diese messen zu können, wurde das LDH-Reagenz angesetzt, indem zunächst das Lyophilisat in Flasche 1 (catalyst) in 1 ml doppelt destilliertem H₂O (ddH₂O) gelöst wurde. 250 µl dieser Lösung wurde anschließend zu 11,25 ml des Inhalts der Flasche 2 (dye solution) pipettiert und gevortext. Je 100 µl dieses LDH-Reagenzes wurde nun auf die neue 96-well-Mikrotiterplatte zu den zu untersuchenden Überständen pipettiert.

Anschließend folgte eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, die aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Reagenzes unter Abdeckung stattfand.

Schließlich wurde die Absorption, die proportional zur Anzahl der lysierten Zellen ist, bei 450 nm gemessen.

Als Positivkontrolle wurde das Detergens Triton-100 verwendet.

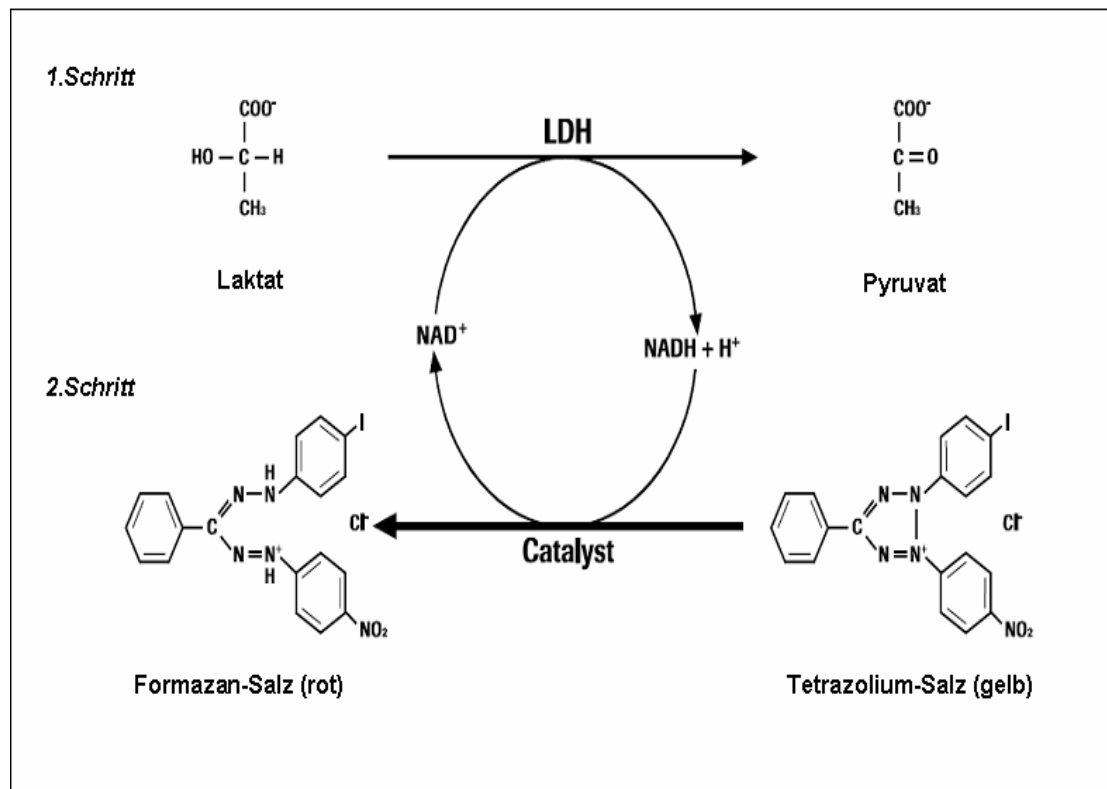


Abbildung 9 Schematische Darstellung der Farbumschlagsreaktion im LDH-Zytotoxizitätstest.

3.3 Arbeiten mit Proteinen

3.3.1 Protein-Isolierung

Nach 24-stündiger Stimulation der konfluent gewachsenen Zellen, wurde jeweils der Überstand abgenommen, bei -80 °C aufbewahrt und später eingengt (siehe Abschnitt 3.3.2.).

Anschließend wurde jede Schale mit 5 ml 1 x PBS gewaschen. Auf jede 79 cm² Schale wurde unter gleichzeitigem Schwenken 500 µl frisch angesetzter Lysispuffer (zur Zusammensetzung siehe Tabelle 7) pipettiert (bei 10 cm²-Schalen waren entsprechend nur je 100 µl Lysispuffer nötig). Nach einer Minute Einwirkzeit konnte das Lysat mit einem Plastikscraper abgeschabt und in ein Eppi überführt werden. Dieses wurde anschließend 10 min bei 14340 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet, bestehend aus DNA-Fragmenten und Zelltrümmern, wurde verworfen und der Überstand (= Proteinlysate) bei -80 °C aufbewahrt.

Tabelle 7 Zusammensetzung des Lysispuffers

Reagenz	Menge
Proteinlysepuffer	10 ml
Proteaseinhibitor	1 Tablette
Natriumvanadat (500 mM) (Phosphataseinhibitor)	100 µl

3.3.2 Einengung der Zellüberstände

Die Überstände wurden zunächst 10 min bei 4 °C und 1062 g zentrifugiert, um sie von toten Zellen oder Zelltrümmern zu befreien.

Danach erfolgte die Einengung der Überstände von jeweils 4 ml auf 200 - 400 µl, für die sogenannte Centricons mit einem cutoff von 10 kDa benutzt wurden. Zunächst wurden diese mit jeweils 2 ml Überstand gefüllt und ca. 50 min bei 4 °C und 3500 g zentrifugiert, bis nahezu die ganzen 2 ml den Filter passiert hatten. Als Retentat blieben ca. 300 µl Proteinkonzentrat mit einem Molekulargewicht größer als 10 kDa

zurück. Der Durchfluss wurde verworfen und die restlichen 2 ml Überstand wurden erneut, wie beschrieben, zentrifugiert.

Da das Proteinkonzentrat aufgrund des Mediums rötlich gefärbt war, und dieses die photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung verfälschen würde, erfolgte nach der Einengung ein Entsalzen und Entfärben der Proben durch einen zweimaligen Waschvorgang mit je 2 ml ddH₂O, ebenfalls bei 4 °C und 3500 g für ca. 50 min. Schließlich wurden zur Konzentratgewinnung die Centricons um 180° gedreht und ein letztes Mal 2 min bei 4 °C und 54 g zentrifugiert.

Anschließend erfolgte die photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung von den eingegangenen Überständen und deren Lysaten.

3.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Micro-BCA-Protein Assay-Kit verwendet. Bei dieser Methode wird Bicinchoninic acid (BCA) als Detektionsreagent für Cu¹⁺, das entsteht, sobald Cu²⁺ in alkalischer Lösung von Proteinen reduziert wird, benutzt. Das violettfarbene Reaktionsprodukt entsteht durch eine Chelatbildung aus zwei Molekülen BCA mit einem Kupferion (Cu¹⁺) und hat sein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 562 nm.

Die Absorption bei 562 nm verhält sich demnach proportional zur Proteinkonzentration.

1. Protein + Cu²⁺ -> Tetridentat-Cu¹⁺-Komplex
2. Cu¹⁺-Komplex + BCA -> BCA-Cu¹⁺-Komplex (violett)

Dazu wurde zunächst ein Proteinstandard von 0 - 2400 µg/ml ddH₂O angesetzt. In eine 96-well-Mikrotiterplatte wurde 10 µl Standard bzw. 10 µl Proteinprobe pro well (jeweils 3-fach-Werte) pipettiert. In jedes well wurde anschließend 200 µl Reagenzlösung, bestehend aus einem Teil Reagenz A und 1/50 Teil Reagenz B, hinzugefügt. Die Mikrotiterplatte wurde dann leicht geschwenkt und die Extinktion bei 562 nm mit dem KC4-Programm gemessen. Die Proteinkonzentration konnte dann anhand der bovinen Serumalbumin (BSA) -Standardkurve ermittelt werden.

3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden Proteinmengen zwischen 30 und 50 µg verwendet, dazu wurden die entsprechenden Proben vorher in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

Zur Durchführung der Gelelektrophorese, die unter reduzierenden Bedingungen erfolgte, wurde zunächst die Apparatur gereinigt und zusammengebaut. Anschließend wurden Trenn- und Sammelgel angesetzt (siehe Tabelle 8), wobei jeweils Ammoniumpersulfat (APS) und Temed kurz vor dem Gießen hinzugefügt wurden, da diese zur baldigen Polymerisation der Gele führen. Nach dem Festwerden der Gele wurden diese an eine Elektrode befestigt und in eine Kammer gesetzt, die mit Laufpuffer gefüllt wurde, anschließend erfolgte das Laden der Gele. Dazu wurde jeweils das getrocknete Protein in 30 µl ddH₂O resuspendiert und mit 10 µl 4 x Ladepuffer mit 10 % Mercaptoethanol vermischt. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren wurden die Proben 10 min in kochendem Wasser denaturiert, bevor sie dann, mit einem Gesamtvolumen von 40 µl, in die Taschen des Sammelgels pipettiert werden konnten. Parallel zu den Proben lief in der ersten Tasche stets 7 µl des Markers (page ruler, prestained protein ladder) zur Größenbestimmung mit.

Zum Auftrennen der Proteine nach ihrem Molekulargewicht war für zwei Gele eine Laufzeit von ca. 2 h bei 50 mA nötig.

Tabelle 8 Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels, je für zwei Gele

<u>15 % Trenngel</u>	<u>5 % Sammelgel</u>
3,75 ml ddH ₂ O	2,85 ml ddH ₂ O
3,75 ml Trenngelpuffer	1,25 ml Sammelgelpuffer
7,5 ml Acrylgel	825 µl Acrylgel
100 µl APS	50 µl APS
10 µl Temed	5 µl Temed

3.3.5 Western Blot

Um das gesuchte Protein später mit dem entsprechenden Antikörper sichtbar machen zu können, erfolgte nach der Gelelektrophorese der Transfer der Proteine von SDS-Gelen auf Blotmembranen. Dazu wurden in einer Vorrichtung jeweils Gel und Membranen zu einem sogenannten ‚Sandwich‘ (siehe Abb. 10) wie folgt zusammengebaut.

Auf die Seite der Vorrichtung, die später zur Anode zeigte, wurde als erste Schicht eine in Blotpuffer getränkte Schwammmembran gelegt, darauf kam zurechtgeschnittenes und ebenfalls in Blotpuffer getränktes Whatmanpapier. Die Blotmembran, die zuvor durch 10-sekündiges Eintauchen in 100 % Methanol, 1-minütiges Waschen in ddH₂O und mindestens 10-minütiges Einlegen in Blotpuffer vorbereitet worden war, wurde nun luftblasenfrei auf das Whatmanpapier gelegt. Auf diese Membran wiederum wurde vorsichtig das Gel luftblasenfrei positioniert, gefolgt von je einer Lage Whatmanpapier und Schwammmembran. Die Vorrichtung wurde nun verschlossen und in eine Plattenelektrode gesteckt, die in eine Kammer mit Blockeis und Blotpuffer gestellt wurde.

Der Blotvorgang erfolgte für 1,5 h bei 100 Volt auf Eis.

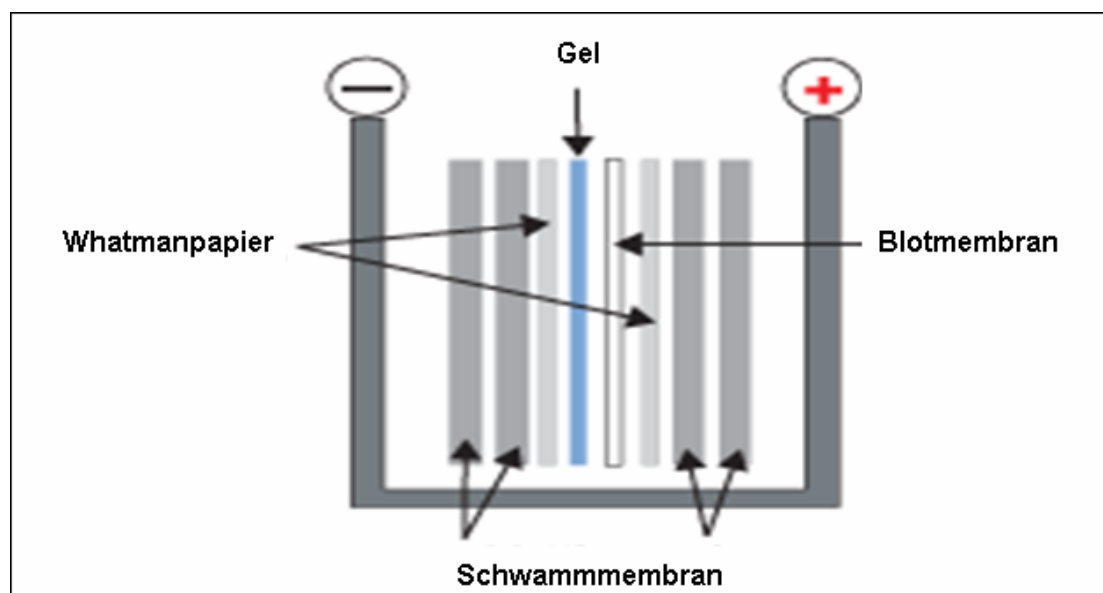


Abbildung 10 Schema des Western Blot- Sandwiches.

3.3.6 Immunreaktionen

Nach dem Blotvorgang wurden die Membranen mit je 10 ml 5 % Milchpulver in Tris-buffered-saline-Tween (TBS-T) für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Roller geblockt. Dieser Schritt ist notwendig, um Membranbereiche, die nicht mit Proteinprobe besetzt sind, abzublocken und somit unspezifische Bindungen des 1. oder 2. Antikörpers, die zu starken und unerwünschten Hintergrundsignalen führen würden, zu vermeiden. Nach dem Blocken wurden die Membranen je mit 5 ml 1. Antikörperlösung entweder 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anti-RNase A wurde dabei in einer Konzentration von 10 µg/ml, Anti-Angiogenin 1 µg/ml und Anti-Aktin 1 µg/ml, jeweils in 5 % Milchpulver in TBS-T angesetzt. Nach der Inkubation mit dem 1. Antikörper wurden die Membranen je 4 x 10 min mit ca. 25 ml TBS-T gewaschen. Der Sinn des Waschens besteht darin, ungebundene Antikörper von der Membran zu entfernen und somit störende unspezifische Signale zu vermeiden. Anschließend wurden die Membranen mit je 5 ml der 2. Antikörperlösung für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Alle 2. Antikörper wurden ebenfalls mit 5 % Milchpulver in TBS-T angesetzt. Folgende Verdünnungen wurden benutzt: Anti-rabbit-Peroxidase (POD): 1 : 5000, Anti-goat-POD: 1 : 3000, Anti-mouse-POD: 1 : 5000.

Da die 2. Antikörper lichtempfindlich sind, wurden die Membranen für diese Inkubation abgedeckt. Nach der Inkubation mit dem 2. Antikörper wurden die Membranen erneut 4 x 10 min mit jeweils ca. 25 ml TBS-T unter Abdeckung gewaschen, bevor die Proteindetektion erfolgen konnte.

3.3.7 ECL-Detektion

Zur Detektion der Proteinbanden wurde das Enhanced Chemiluminescence (ECL) - Kit verwendet.

Diese Methode basiert auf einer enzymatisch katalysierten Lumineszenzreaktion, die ausgelöst wird durch die an den 2. Antikörper gekoppelte horse-radish-peroxidase. Diese reduziert Hydrogenperoxid (in Lösung 1 des Kits), das wiederum Luminol (in Lösung 2 des Kits) oxidiert. Bei dieser Reaktion entsteht Lichtlumineszenz, die durch einen Verstärker intensiviert wird und somit zur Schwärzung des Films an der entsprechenden Stelle führt (siehe Abb. 11, S. 39).

Dazu wurden im Fotolabor Lösung 1 und 2 des ECL-Kits im Verhältnis von 40 : 1 zusammengesetzt und anschließend wurde auf jede Membran 1,5 ml dieses Ansatzes gleichmäßig verteilt. Nach 5 min Einwirkzeit im Dunkeln wurden die Membranen luftblasenfrei in Saranwrapfolie eingepackt, zugeschweißt und in eine Filmkassette eingeklebt. Es wurde ein fluoreszenzempfindlicher Film aufgelegt und nach anschließender Entwicklung waren die Proteinbanden sichtbar. Bevor die Membranen aus der Filmkassette entfernt werden konnten, wurde jeweils der Marker nachgezeichnet, um das Molekulargewicht der Proteine erkennen zu können.

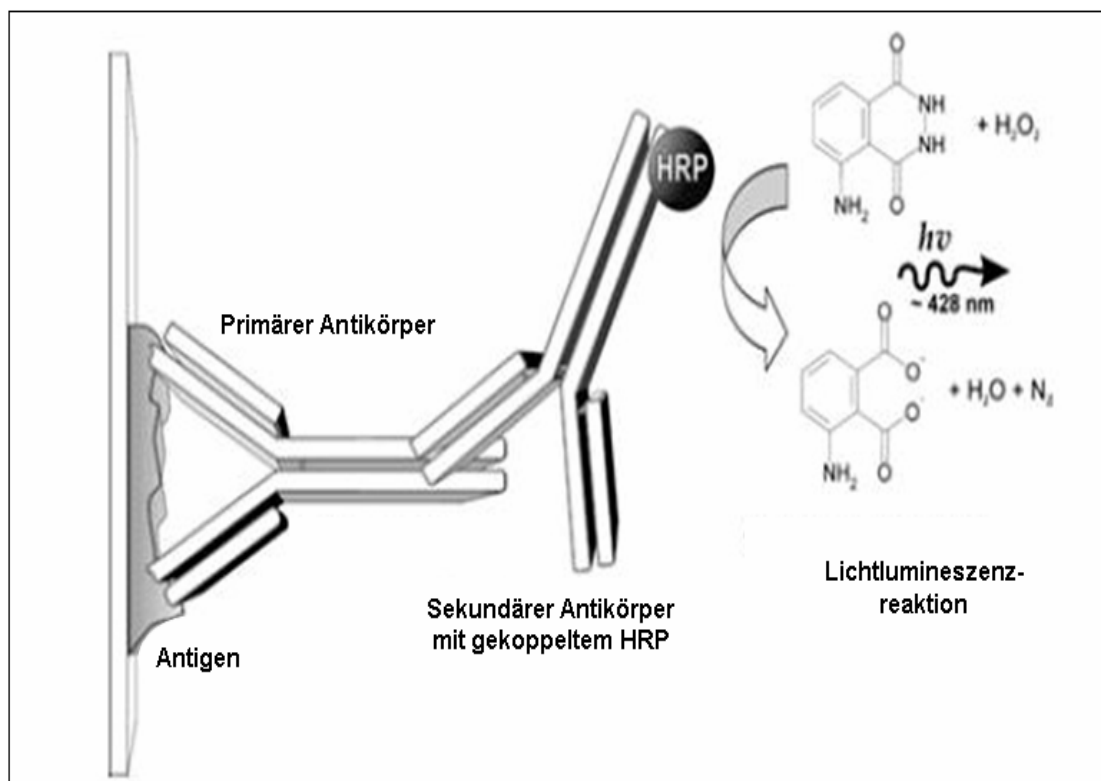


Abbildung 11 Schema der Antikörper- und ECL-Reaktion.

3.3.8 Stripping

Um auf einer Blotmembran verschiedene Proteine nachweisen zu können, besteht die Möglichkeit, die Membran zu stripping.

In dieser Arbeit wurde nach dem Western Blot jeweils zunächst RNase A als 1. Antikörper benutzt, nach der Detektion des Proteins wurde die Membran gestriipt und der Nachweis des Angiogenins schloss sich an. Schließlich wurde ein letztes Mal gestriipt und das Aktin als Ladungskontrolle detektiert.

Zum Strippen wurde die Blotmembran aus der Saranwrapfolie herausgeschnitten und 3 x 30 min in einer kleinen Schale mit Stripping buffer I (pH 2,8) auf dem Taumler gewaschen. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Waschung der Membran in Stripping buffer II (pH 9). Um den pH-Wert wieder zu neutralisieren, wurde die Membran danach zweimal 5 min mit TBS-T gewaschen. Sie wurde dann in ein Falcon überführt, mit 5 % Milchpulver in TBS-T geblockt und, wie unter Abschnitt 3.3.6 + 3.3.7 erläutert, weiterbehandelt.

3.4 Arbeiten mit RNA

3.4.1 RNA-Isolierung

Für sämtliche Arbeiten mit RNA wurden alle benötigten Materialien steril verwendet. Die RNA-Isolierung wurde unter Verwendung des GenElute Mammalian Total RNA Kits durchgeführt. Diese Methode macht Gebrauch von Guanidiniumthiocyanat, das als eines der effektivsten Protein-denaturierenden Agenzien, zur Denaturierung von Makromolekülen und Inaktivierung von RNasen führt.

Zur RNA-Lysat Gewinnung wurden, nach Abnahme der Überstände, die konfluent gewachsenen Schalen einmal mit je 5 ml 1 x PBS gewaschen und gut trocken gesaugt. Anschließend wurde 600 µl Lysispuffer (aus dem Kit) + 1 % Mercaptoethanol auf jede Schale pipettiert, die dann ca. 1 min geschwenkt und mit einem Zellscraper abgeschabt wurde. Das RNA-Lysat wurde nun in ein Eppi überführt und bei -80 °C aufbewahrt, bis die Isolierung (auf Eis) durchgeführt wurde.

Hierzu wurden 700 µl RNA-Lysat in eine Filtrationssäule pipettiert und 2 min bei 17500 g zentrifugiert, dieser Schritt dient der Entfernung von Zelltrümmern und der Scherung von DNA. Die Filtrationssäule wurde nun verworfen, 700 µl 70 % Ethanol in den Durchflussbehälter pipettiert und kurz gevortext. Anschließend wurde 700 µl aus dem Lysat-Ethanol Gemisch auf eine Bindsäule pipettiert und 15 sec bei 17500 g zentrifugiert. Hierbei führt das Ethanol zur Bindung der RNA an die Membran der Säule. Der Durchfluss wurde verworfen, die restlichen 700 µl des Lysat-Ethanol-Gemisches auf dieselbe Bindsäule pipettiert und erneut 15 sec bei 17500 g zentrifugiert. Nachdem auch dieser Durchfluss verworfen wurde, wurde 500 µl Waschlösung 1 des Kits auf die Säule pipettiert und ebenfalls 15 sec bei 17500 g

zentrifugiert. Die Bindsäule wurde nun in einen frischen Auffangbehälter überführt und mit 500 µl Waschlösung 2 des Kits, das zuvor in einem Verhältnis von 1 : 5 mit Ethanol verdünnt worden war, 15 sec bei 17500 g zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde nach Verwerfung des Durchflusses wiederholt, wobei diesmal 2 min zentrifugiert wurde, um die Membran zu trocknen. Diese Waschschrte haben den Zweck, eventuelle Kontaminationen zu entfernen. Um die Gesamt-RNA nun aus der Membran herauszubekommen, wurde, nachdem die Bindsäule ein letztes Mal in einen neuen Auffangbehälter überführt wurde, 50 µl Elutionslösung dazu pipettiert und 1 min bei 17500 g zentrifugiert. Schließlich wurden pro Säule 50 µl Elutionslösung mit enthaltener Gesamt-RNA gewonnen.

3.4.2 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der Gesamt-RNA

Nach der Gewinnung von Gesamt-RNA in Elutionslösung wurde diese in einem Verhältnis von 1 : 50 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Je 100 µl aus dieser Verdünnung wurde in eine RNA-Küvette pipettiert und die Absorption, die sich proportional zur RNA-Menge verhält, wurde bei 260 nm gemessen. Dabei entspricht eine Extinktion von 1 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml.

Da Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren, ergibt sich aus dem Verhältnis OD 260 nm/ OD 280 nm (optische Dichte) ein Maß für die Reinheit der RNA bzw. deren Verunreinigung durch Proteine. Der angestrebte Wert für diesen Quotienten lag bei 1,8 - 2.

3.4.3 Reverse Transkription

Bei dieser Methode wurde das Super Script First-Strand Synthesis System Kit zur cDNA Synthese benutzt.

Nach kurzem Vortexen und Abzentrifugieren aller benötigten Reagenzien, wurden zunächst auf Eis je 10 µl RNA-Primer-Mix Ansätze in spezielle PCR- Eppis nach folgendem Schema pipettiert (siehe Tabelle 9, S. 42).

Tabelle 9 Pipettierschema des RNA-Primer-Mixes

Reagenz	Pro Ansatz
Total-RNA	1 µg (Volumen berechnet)
10 mM dNTP mix	1 µl
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ (0,5 µg/µl)	1 µl
DEPC-treated water	Zu 10 µl ergänzt

Nach kurzem Vortexen und Abzentrifugieren wurden die Ansätze 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend für mindestens 1 min auf Eis gestellt. Nun wurde ein Mastermix für n + 1 Proben in der angegebenen Reihenfolge angesetzt (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10 Pipettierschema des Mastermixes

Reagenz	Für einen Ansatz
10 x RT buffer	2 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNaseOUT (recombinant RNase Inhibitor)	1 µl

Der Mastermix wurde kurz gevortext und abzentrifugiert, bevor je 9 µl daraus in die zuvor angesetzten RNA-Primer-Mixe pipettiert wurde. Nach erneutem Vortexen und Abzentrifugieren dieser Gemische, wurden sie nun 2 min bei 42 °C inkubiert. Danach erfolgte ein Hinzupipettieren von je 1 µl (50 units) Super Script II RT in jeden Ansatz mit anschließender Inkubation bei 42 °C für 50 min. Dieser Schritt, bei dem die Synthese von cDNA erfolgt, wurde gestoppt durch eine 15-minütige Inkubation bei 70 °C. Die Ansätze wurden danach kurz auf Eis gestellt, bevor je 1 µl RNase H hinzupipettiert und 20 min bei 37 °C inkubiert wurde. Dieser Schritt bewirkt eine Entfernung der Template-RNA aus der neu synthetisierten cDNA. Die gewonnene cDNA wurde nun bei -20 °C aufbewahrt, bis sie für die PCR eingesetzt wurde.

3.4.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) diente der Bestimmung der mRNA-Expression von RNase 1 und Angiogenin. Als Positivkontrolle wurde die Aktin mRNA-Expression untersucht. Diese Reaktion wurde mit Hilfe der Platinum Taq DNA Polymerase durchgeführt. Zunächst wurde für $n + 1$ Ansätze folgendes Schema auf Eis pipettiert (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11 Pipettierschema für die PCR

Reagenz	Pro Ansatz
10 x PCR buffer minus Mg	5 μ l
50 mM MgCl ₂	1,5 μ l
10 mM dNTP mix	1 μ l
10 μ M Primer forward	1 μ l
10 μ M Primer reverse	1 μ l
Platinum Taq DNA Polymerase (5 units/ μ l)	0,1 μ l
autoklaviertes ddH ₂ O	39,4 μ l

Der gleiche Ansatz, mit entsprechend anderen Primern, wurde parallel dazu auch für die Positivkontrolle Aktin bzw. für Angiogenin angesetzt. Nachdem dieser Ansatz gevortext und zentrifugiert wurde, wurden je 49 μ l daraus in autoklavierte PCR-Eppis pipettiert, zu denen dann je 1 μ l cDNA hinzugefügt wurden. Es schloß sich eine 2-minütige Inkubation bei 94 °C an, bei der, gemäß Abb. 12 (S. 44), die Denaturierung des Templates und die Aktivierung der Polymerase stattfand. Anschließend folgten 35 Zyklen, jeweils bestehend aus

1. Denaturierung: 30 sec bei 94 °C
2. Annealing: 30 sec bei 56,4 °C
3. Elongation: 30 sec bei 72 °C.

Die Zyklus- und Annealing-Temperatur-Optimierung wurden in Vortests bestimmt und waren für RNase A und Angiogenin identisch. Um die Reaktion zu beenden, wurde ein letztes Mal 10 min bei 72 °C inkubiert, bevor die PCR-Amplifikate auf Eis gestellt wurden und die Gelelektrophorese durchgeführt werden konnte.

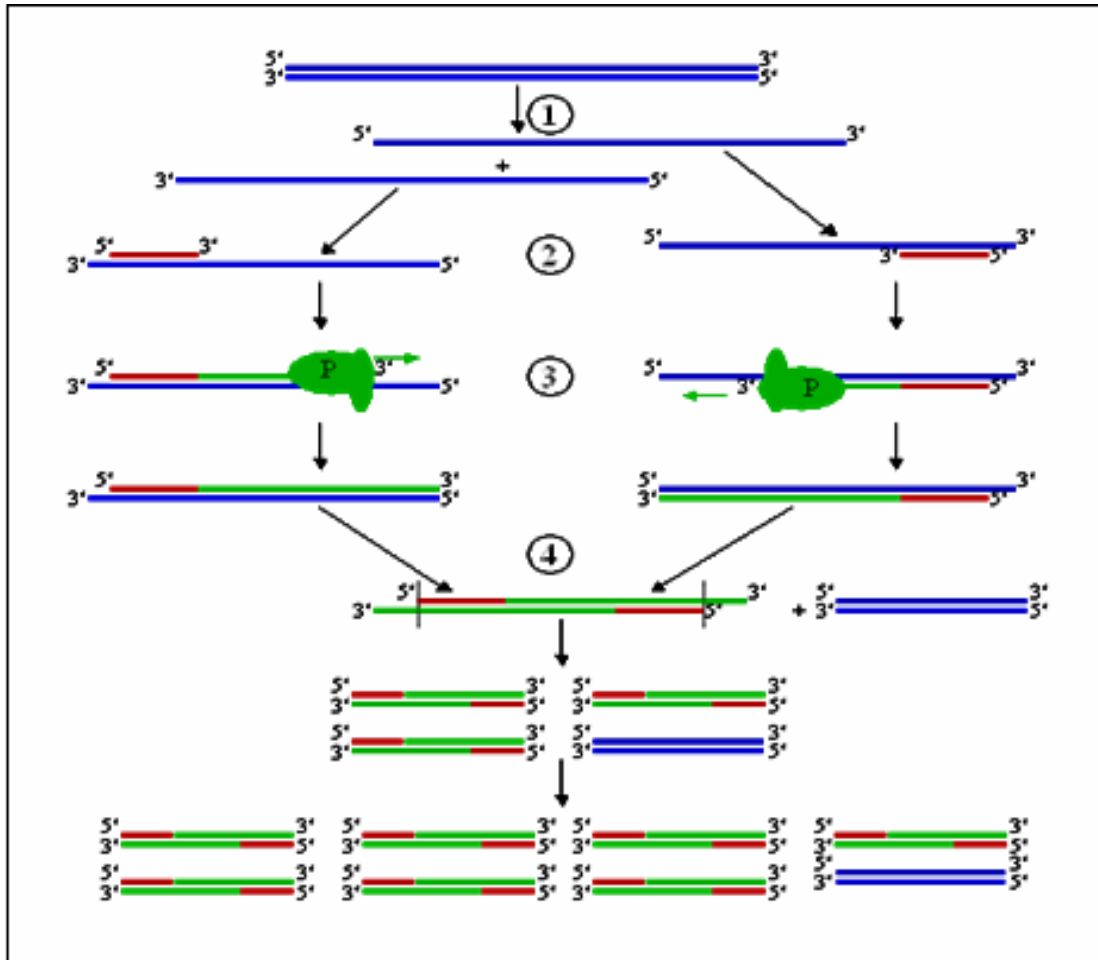


Abbildung 12 Schematische Darstellung des PCR-Zyklus:

1. Denaturierung bei ca. 94 °C, 2. Anlagerung des Primers bei ca. 56 °C,
3. Elongation bei ca. 72 °C, (P= Polymerase), 4. Der erste Zyklus ist beendet.

3.4.5 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Für diese Methode, bei der 2 %ige Gele verwendet wurden, wurden zunächst 2 g Agarose abgewogen und mit 100 ml 1 x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. In diese Lösung wurde 2 µl Ethidiumbromid pipettiert, bevor sie dann in eine Flachbettapparatur gegossen wurde. Direkt danach wurde ein Kamm aufgesteckt und nach ca. 20 min bei Raumtemperatur war das Gel fest. Anschließend wurde die Kammer mit 1 x TAE-Puffer gefüllt, bevor das Gel mit DNA-Probe + 6 x loading buffer (pro Tasche 10 µl Probe + 2 µl 6 x loading buffer) geladen werden konnte. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente lief jeweils 5 µl Marker (low-range-DNA-ladder) mit. Zum Laufen des Gels wurde eine Spannung von 85 V angelegt, wodurch die negativ geladenen DNA-Fragmente zur Anode wanderten. Schließlich konnten aufgrund der Interaktion von Ethidiumbromid mit der DNA die

stark fluoreszierenden Banden unter UV-Licht visualisiert und fotografisch dokumentiert werden.

3.5 RNase-Aktivitätstest

Die RNase-Aktivität wurde durch den Abbau von Poly C, wie von Landre et al.⁶ beschrieben, jedoch mit einigen Abweichungen, bestimmt. Alle Schritte wurden auf Eis und mit autoklavierten Materialien durchgeführt.

Als Probe wurden für die 24 h Stimulationstests jeweils 4 µg Protein der entsprechenden Überstände bzw. 100 µg Protein der jeweiligen Lysate eingesetzt. Für die Zeitabhängigkeitsversuche wurden nach entsprechenden Zeiten (0 min, 1 h, 3 h, 7 h und 24 h) je 100 µl Überstand abgenommen (je 3-fach-Werte) und für diese Methode verwendet.

Benötigte Proteinmengen und die notwendige Inkubationszeit wurden in Vortests ermittelt. Der Aktivitätstest wurde wie folgt durchgeführt:

Zunächst wurden jeweils 250 µl Ansätze, bestehend aus entsprechender Menge Probe, 100 µl Poly C (1 mg/ml ddH₂O) und einer je zu 250 µl Gesamtvolumen angepassten Menge RNase-Puffer + acetyliertes BSA (0,1 mg/ml) 5 min bei 37 °C inkubiert. Bei diesem Schritt wird das Poly C von den in den Proben enthaltenen RNasen gespalten. Anschließend wurde jeweils 100 µl Inkubat zu zuvor vorbereiteten Ansätzen mit je 250 µl eiskalter Perchlorsäure (6 %)-Lanthanchlorid (20 mM)-Lösung und 100 µl Fettsäure-freiem-BSA (10 mg/ml) hinzupipettiert, kräftig gevortext und 15 min auf Eis stengelassen. Dieser Schritt dient zur Fällung von noch ungespaltenem Poly C. Danach erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 16000 g, um das gefällte Material als Pellet verwerfen zu können.

Schließlich wurde je 100 µl des Überstandes, welches nun ausschließlich gespaltene Nukleotide des Poly C enthielt, zur photometrischen Messung bei 280 nm verwendet. Die Extinktion verhält sich proportional zur RNase-Aktivität in den Proben.

Es wurden jeweils 3-fach-Bestimmungen durchgeführt und pro Test lief ein Leerwert (250 µl Ansatz bestehend nur aus 100 µl Poly C und 150 µl RNase-Puffer + acetyliertes BSA, ohne Probe) und eine Positivkontrolle (250 µl Ansatz mit 1 µl RNase A statt der Probe) mit.

4 Ergebnisse

4.1 Zytotoxizität

Da die verwendeten EC für die Stimulation überwiegend 24 h mit verschiedenen Agenzien inkubiert wurden, wurde zunächst geprüft, ob diese toxisch wirkten.

Mittels des LDH-Zytotoxizitätstest wurde gezeigt, dass die verwendeten Stimulanzien in den entsprechenden Konzentrationen nach 24 h keine toxische Wirkung auf die HUVEC hatten.

Als Positivkontrolle wurde das Detergens Triton (1 %) benutzt (siehe Abb. 13).

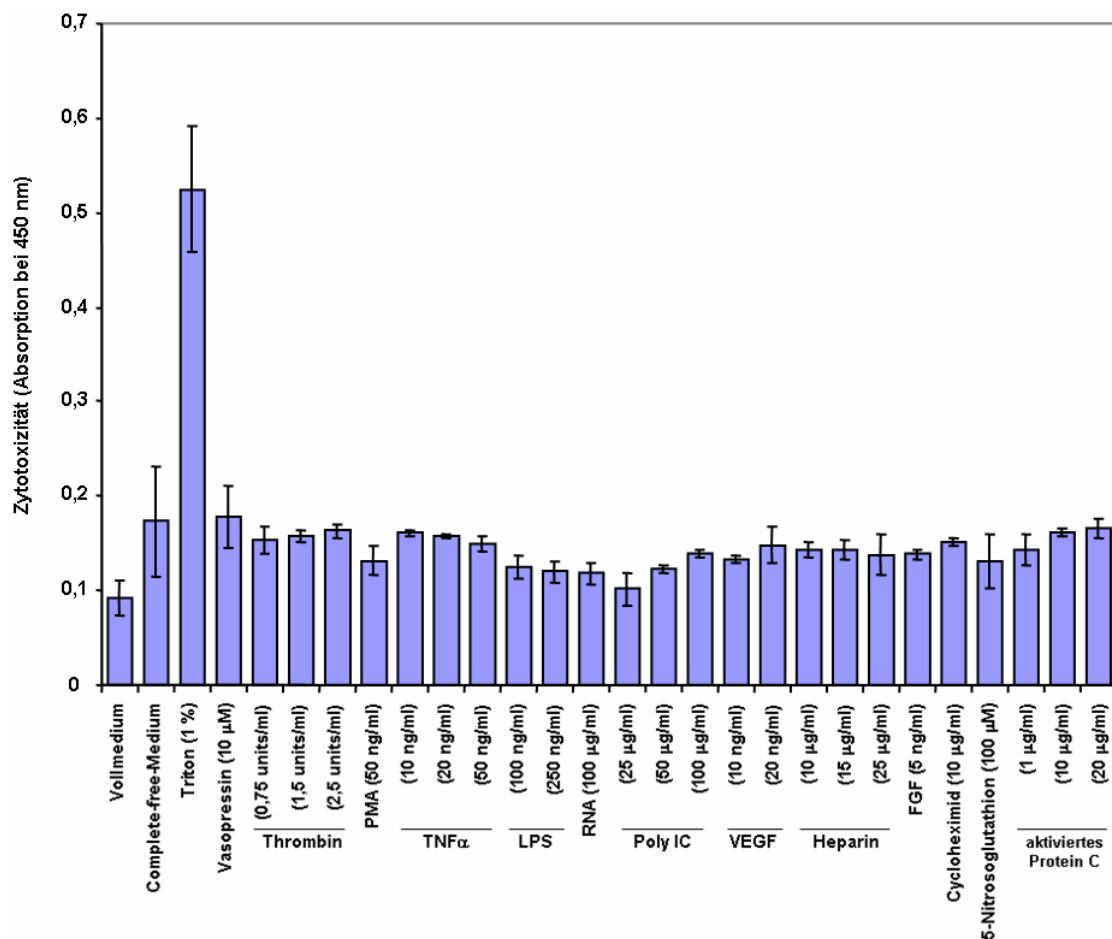


Abbildung 13 Photometrische Bestimmung der Zytotoxizität der verwendeten Stimulanzien. Als Positivkontrolle wurde das Detergens Triton (1%) benutzt.

4.2 Expression von RNase 1- und Angiogenin auf Proteinebene

Zunächst wurden die drei Endothelzelllinien (HUVEC, HBMEC und BMEC) auf RNase 1- und Angiogenin-Proteinexpression, jeweils im Lysat und im Überstand untersucht. Es zeigte sich, dass die makrovaskulären EC (HUVEC) eine höhere RNase 1- Proteinexpression besitzen, als die mikrovaskulären EC (HBMEC, BMEC). Dabei sezernieren HUVEC RNase 1 hauptsächlich in den Überstand, während bei den mikrovaskulären EC dieses Protein stärker im Lysat nachweisbar war. Unter den mikrovaskulären EC wiesen HBMEC eine höhere RNase 1- Proteinexpression auf als BMEC.

Die Angiogenin-Proteinexpression zeigte sich in HBMEC-Überständen am stärksten. Auch in HUVEC-Überständen ließ sich das Angiogenin nachweisen, jedoch nicht in solch einem hohen Maße, wie in HBMEC. Dieses Protein war in den Lysaten der EC kaum detektierbar.

In BMEC ließ sich das Angiogenin mit dem verwendeten Antikörper nicht nachweisen (siehe Abb. 14).

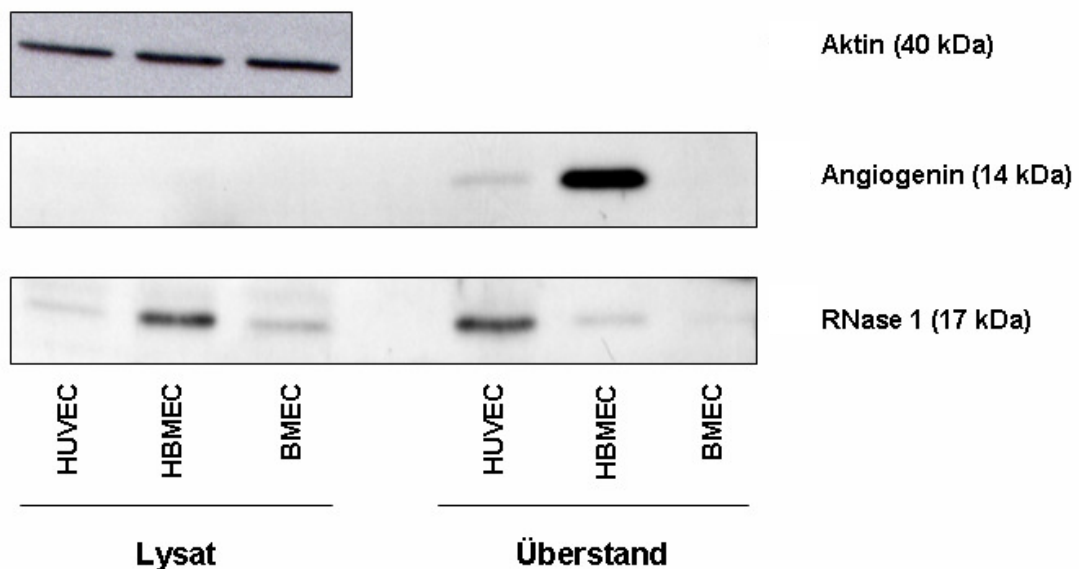


Abbildung 14 Western Blot Analyse zum Nachweis der RNase 1- und Angiogenin-Expression in HUVEC, HBMEC und BMEC. Diese Endothelzellen wurden 24 h in FCS-freiem Medium kultiviert. Nach Einengen und Entsalzen der Überstände wurden je 15 µg Protein für die Analyse verwendet. Zur Ladungskontrolle wurden die Membranen gestriipt und zur Bestimmung der Aktinexpression verwendet.

Als sich auch in weiteren Untersuchungen (RT-PCR, RNase-Aktivitätstest (s.u.)) herausstellte, dass das Vorkommen von RNase 1 in HUVEC am höchsten ist, wurden die Stimulationsexperimente hauptsächlich auf diese EC beschränkt.

Dazu wurden HUVEC 24 h mit unterschiedlich wirkenden Agenzien (pro-, antiinflammatorisch, pro-, antiproliferativ, pro-, antikoagulatorisch) verschiedener Konzentrationen inkubiert, wobei als Kontrolle unbehandelte Zellen dienten.

RNase 1 und Angiogenin waren beide stärker im Überstand nachweisbar als im Lysat der HUVEC. Der Angiogenin-AK zeigte eine Kreuzreaktivität mit RNase 1, jedoch ließen sich die Banden durch das unterschiedliche Molekulargewicht gut voneinander trennen (RNase 1: 17 kDa, Angiogenin: 14 kDa). Die Stimulierungsversuche auf Proteinebene zeigten, dass die Agenzien LPS (100 ng/ml, 250 ng/ml), TNF α (10 ng/ml, 20 ng/ml) und Poly IC (25 μ g/ml, 50 μ g/ml) keinen signifikanten Einfluss auf die RNase 1- und Angiogenin-Expression hatten (siehe Abb. 15).

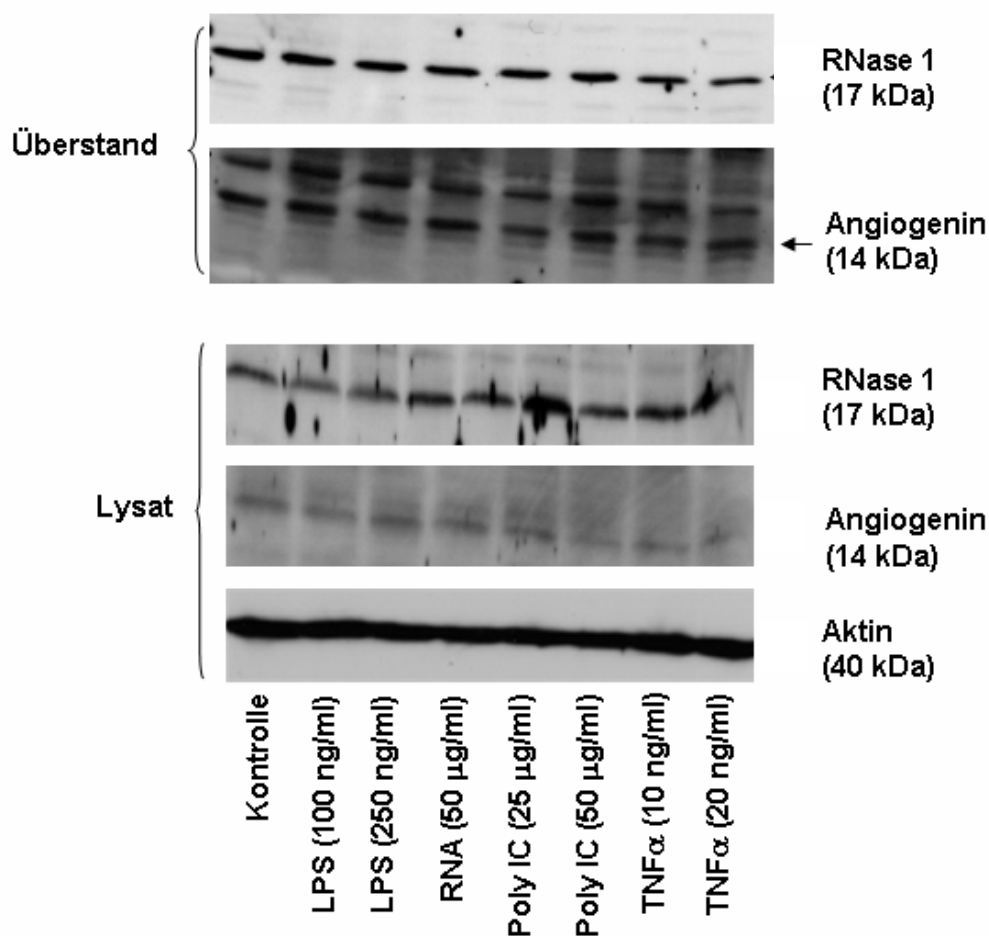


Abbildung 15 Western Blot Analyse zum Nachweis der RNase 1- und Angiogenin-Expression in HUVEC-Lysaten und -Überständen nach jeweils 24-stündiger Stimulation mit LPS, RNA, Poly IC und TNF α . Als Ladungskontrolle wurde Aktin verwendet.

Auch nach der Stimulation mit höheren Konzentrationen von TNF α (50 ng/ml), Poly IC (100 μ g/ml) und RNA (94,1 μ g/ml) war keine Veränderung der RNase 1- und Angiogenin-Proteinexpression erkennbar.

Die Thrombinstimulation (2,5 units/ml) führte zu einer leichten Abnahme der RNase 1-Expression (siehe Abb. 16).

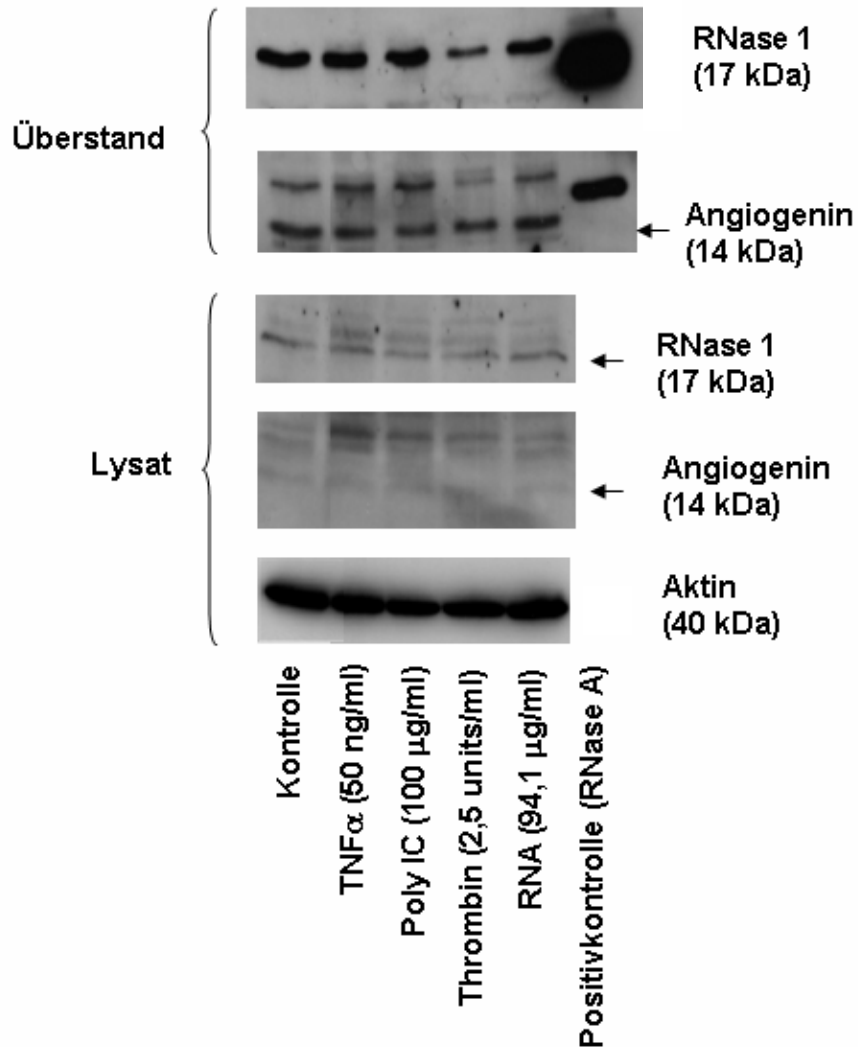


Abbildung 16 Western Blot Analyse zum Nachweis der RNase 1- und Angiogenin-Expression in HUVEC-Lysaten und -Überständen nach jeweils 24-stündiger Stimulation mit TNF α , Poly IC, Thrombin und RNA. Als Ladungskontrolle wurde Aktin verwendet.

Weiterhin erfolgte die Stimulation der HUVEC mit den Wachstumsfaktoren VEGF (20 ng/ml), bFGF (5 ng/ml) und VEGF (20 ng/ml) zusammen mit bFGF (5 ng/ml). Auch hierbei ließ sich keine Proteinexpressionsänderung von RNase 1 und Angiogenin beobachten (siehe Abb. 17).

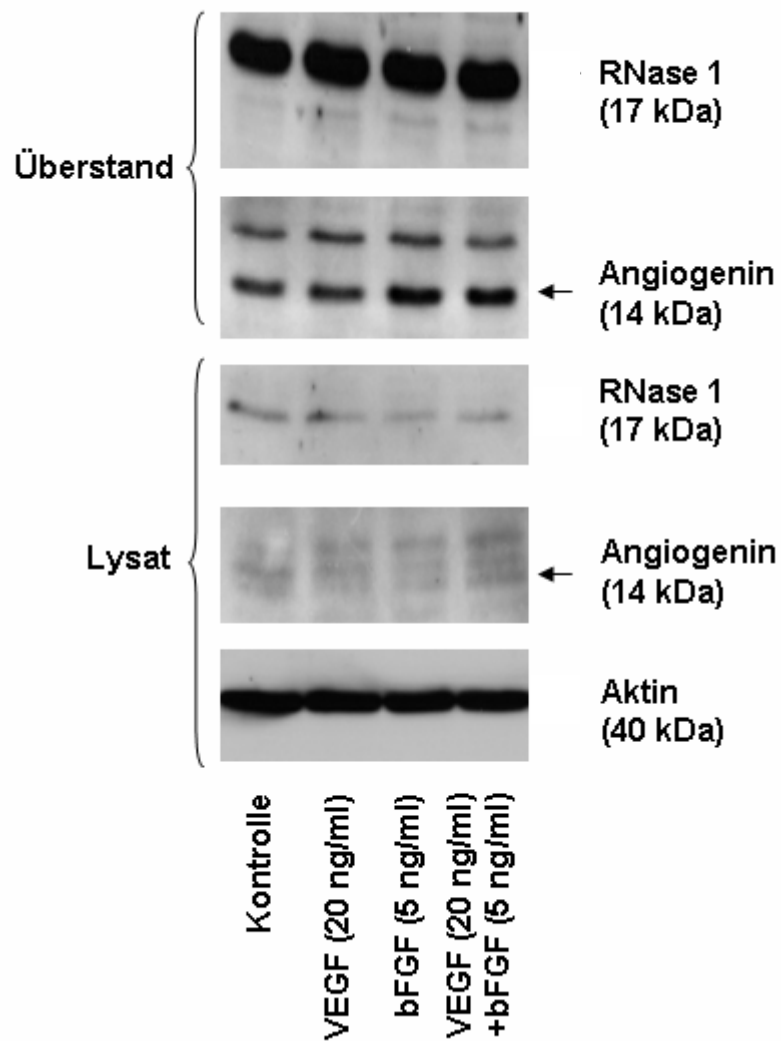


Abbildung 17 Western Blot Analyse zum Nachweis der RNase 1- und Angiogenin-Expression in HUVEC-Lysaten und -Überständen nach jeweils 24-stündiger Stimulation mit VEGF, bFGF und VEGF zusammen mit bFGF. Als Ladungskontrolle wurde Aktin verwendet.

Die Stimulation der HUVEC mit Extracellular adherence protein (Eap) (20 $\mu\text{g/ml}$), einem Protein, das aus *Staphylococcus aureus* isoliert wird und eine anti-angiogene sowie anti-inflammatorische Wirkung besitzt^{40,41}, führte zu einer deutlichen Zunahme der RNase 1-Proteinexpression im Überstand, während dort gleichzeitig eine Abnahme der Angiogenin-Expression auf Proteinebene zu beobachten war (siehe Abb. 18).

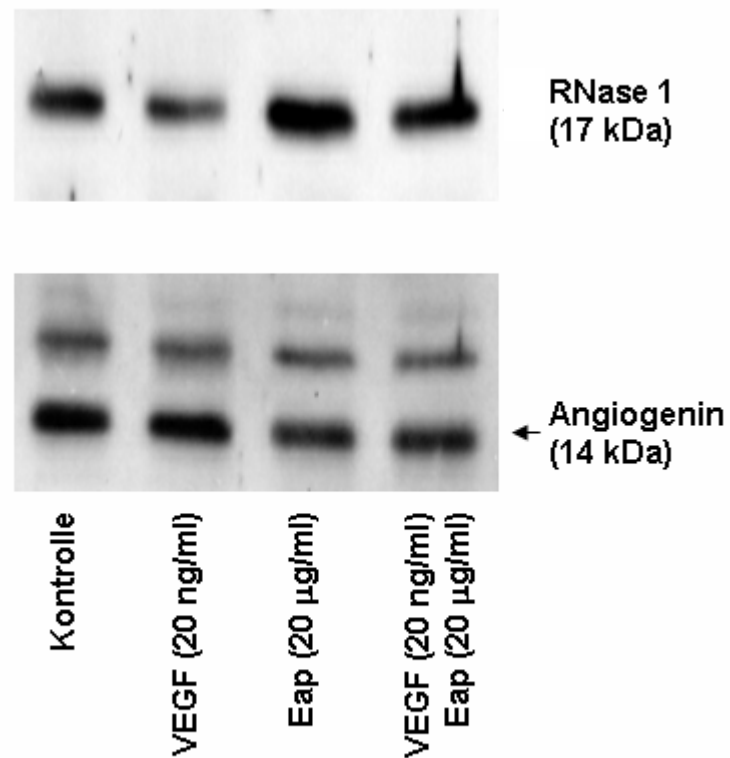


Abbildung 18 Western Blot Analyse zum Nachweis der RNase 1- und Angiogenin-Expression in HUVEC-Überständen nach jeweils 24-stündiger Stimulation mit VEGF, Eap und VEGF zusammen mit Eap.

Stimulationsexperimente an HBMEC ergaben, dass RNase 1 in diesen EC kaum detektierbar war, während Angiogenin eine besonders starke Expression auf Proteinebene zeigte.

Die Angiogenin-Proteinexpression zeigte nach Behandlung der HBMEC mit VEGF (10 ng/ml), Poly IC (25 μ g/ml, 50 μ g/ml), Heparin (15 μ g/ml, 18 μ g/ml), TNF α (10 ng/ml) sowie dem Wachstumsfaktor bFGF (5 ng/ml) keine signifikante Änderung (siehe Abb. 19).

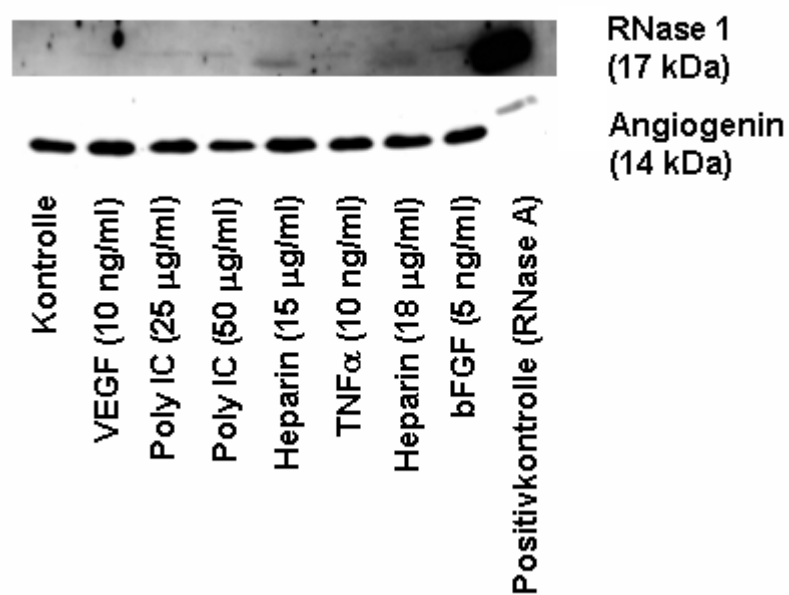


Abbildung 19 Western Blot Analyse zum Nachweis der RNase 1- und Angiogenin-Expression in HBMEC-Überständen nach jeweils 24-stündiger Stimulation mit VEGF, Poly IC, Heparin, TNF α und bFGF.

Parallel zu dieser Arbeit wurden von Dr. K. Hersemeyer, Dr. A. Shibamiya und Dr. S. Fischer immunhistologische Untersuchungen zur genauen Lokalisation von RNase 1 und Angiogenin in HUVEC durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass RNase 1 zum Teil in Granulas gespeichert zu sein scheint, die in EC als Weibel-Palade-Körperchen (WPB) bezeichnet werden (siehe Abb. 44-46, S. 75-77). Da bekannt ist, dass diese Granula u.a. P-Selektin enthalten, und dass die Stimulation mit Agenzien wie PMA, Vasopressin, Thrombin und Histamin zu ihrer Entleerung führt⁴²⁻⁴⁶, wurden HUVEC mit PMA (50 ng/ml) bzw. Vasopressin (10 μ M) stimuliert. Es folgten RNase 1- und Angiogenin-Nachweis im Überstand und Lysat nach 0 min, 30 min, 1 h, 3 h, 7 h und 24 h.

Die PMA-Stimulation zeigte eine leichte Zunahme der RNase 1 in HUVEC-Überständen bereits nach 30 min, während sich in den Lysaten eine Abnahme beobachten ließ (siehe Abb. 20).

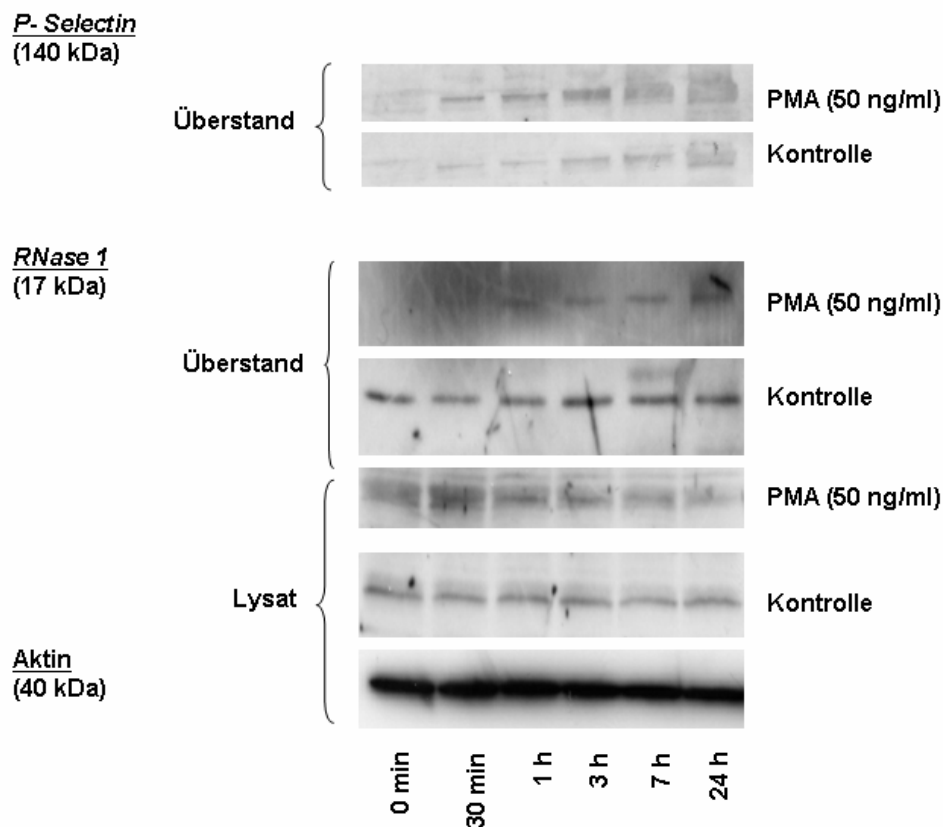


Abbildung 20 Western Blot Analyse zum Nachweis der RNase 1- und P-Selectin-Expression in HUVEC-Lysaten und -Überständen nach PMA-Stimulation in einer Zeitkinetik. Als Ladungskontrolle wurde Aktin verwendet.

Die Stimulation der HUVEC mit Vasopressin (10 μ M) zeigte ebenfalls bereits nach einer Stunde eine Zunahme der RNase 1 in den Überständen.

In den entsprechenden Lysaten war innerhalb von 24 h eine Abnahme der RNase 1-Expression zu beobachten, was auf die Entleerung der Granula hinweisen könnte.

Im Vergleich dazu stieg die RNase 1-Proteinmenge in den unbehandelten Kontrollüberständen erst nach 7 h an, was auf de novo Proteinsynthese schließen lässt (siehe Abb. 21).

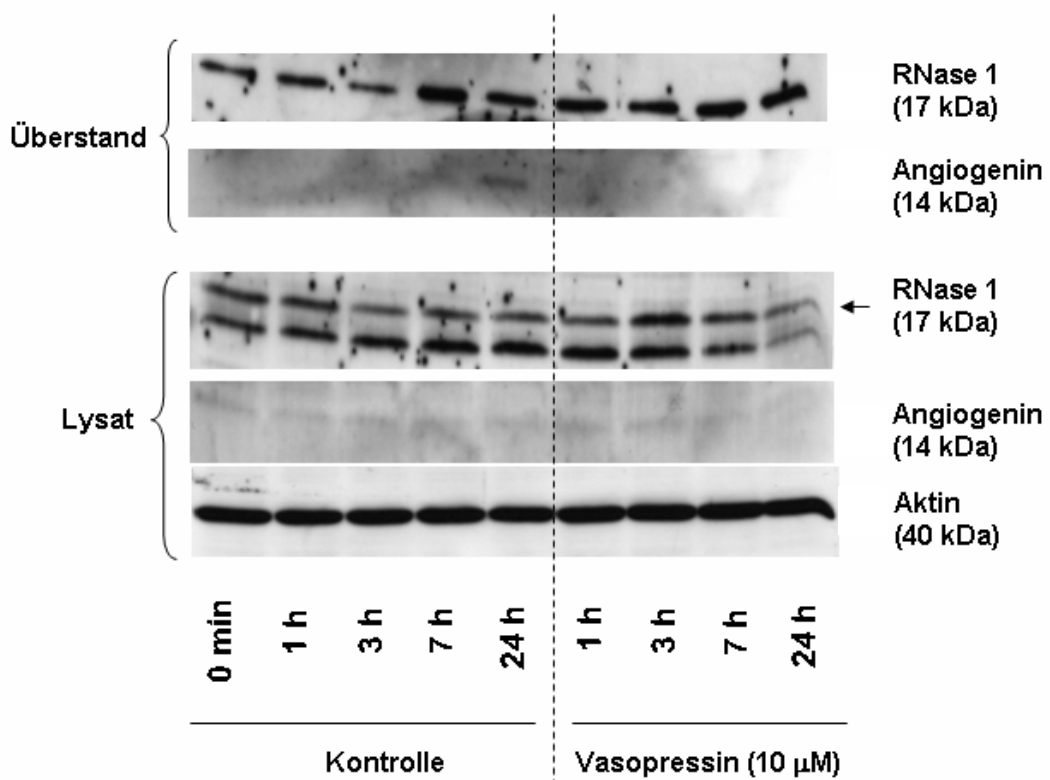


Abbildung 21 Western Blot Analyse zum Nachweis der RNase 1- und Angiogenin-Expression in HUVEC-Lysaten und -Überständen nach Vasopressin-Stimulation in einer Zeitkinetik. Als Ladungskontrolle wurde Aktin verwendet.

4.3 Expression von RNase 1- und Angiogenin-mRNA

Zur Untersuchung, ob eine Regulation der RNase 1- und Angiogenin-Expression bereits auf der Transkriptionsebene erfolgte, wurde RT-PCR durchgeführt. Zum halbquantitativen Nachweis von RNase 1- (311 bp) und Angiogenin- (420 bp) mRNA wurden zunächst jeweils Temperatur- und Zyklusoptimierung für beide PCR-Reaktionen durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass für die RNase 1-Primer eine annealing-Temperatur von 56,4 °C optimal war (siehe Abb. 22) sowie eine Zyklenzahl von 35 im linearen Bereich lag (siehe Abb. 23).

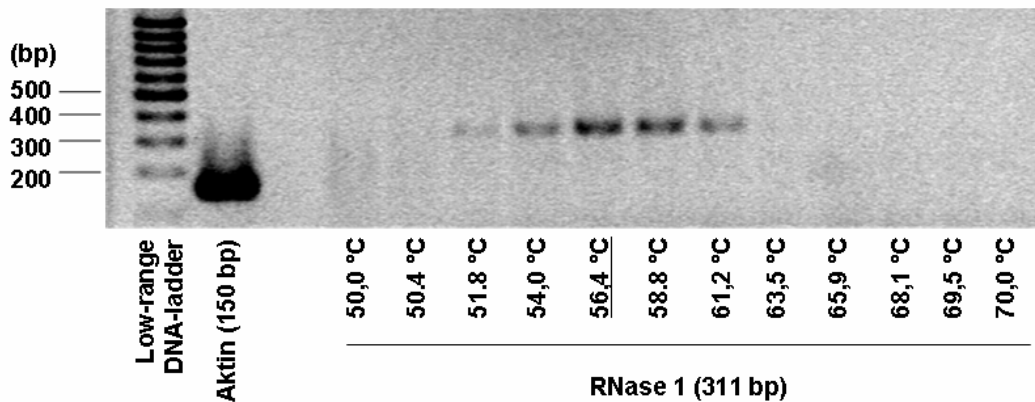


Abbildung 22 Expressionsanalyse von RNase 1 in Endothelzellen. Temperaturoptimierung der PCR-Reaktion zur Amplifikation der RNase 1.

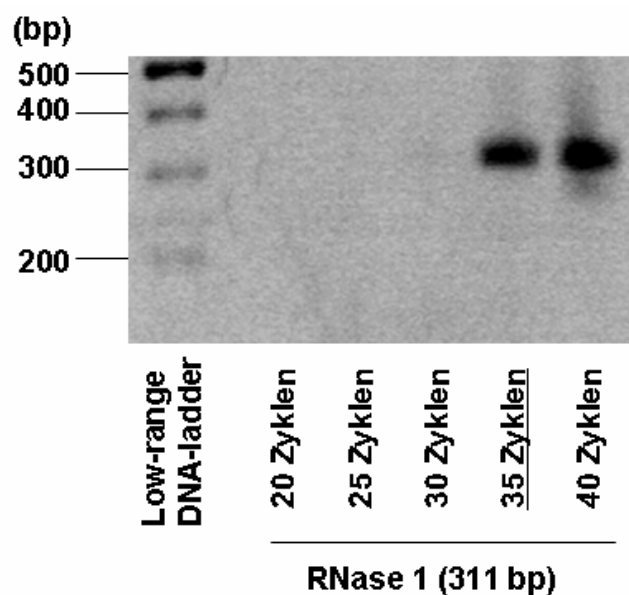


Abbildung 23 Expressionsanalyse von RNase 1 in Endothelzellen. Zyklusoptimierung.

Für die Angiogenin-Primer wurden die gleichen Bedingungen beobachtet. Auch hier wurden für die RT-PCR 56,4 °C als annealing-Temperatur und 35 Zyklen benutzt (siehe Abb. 24, 25).

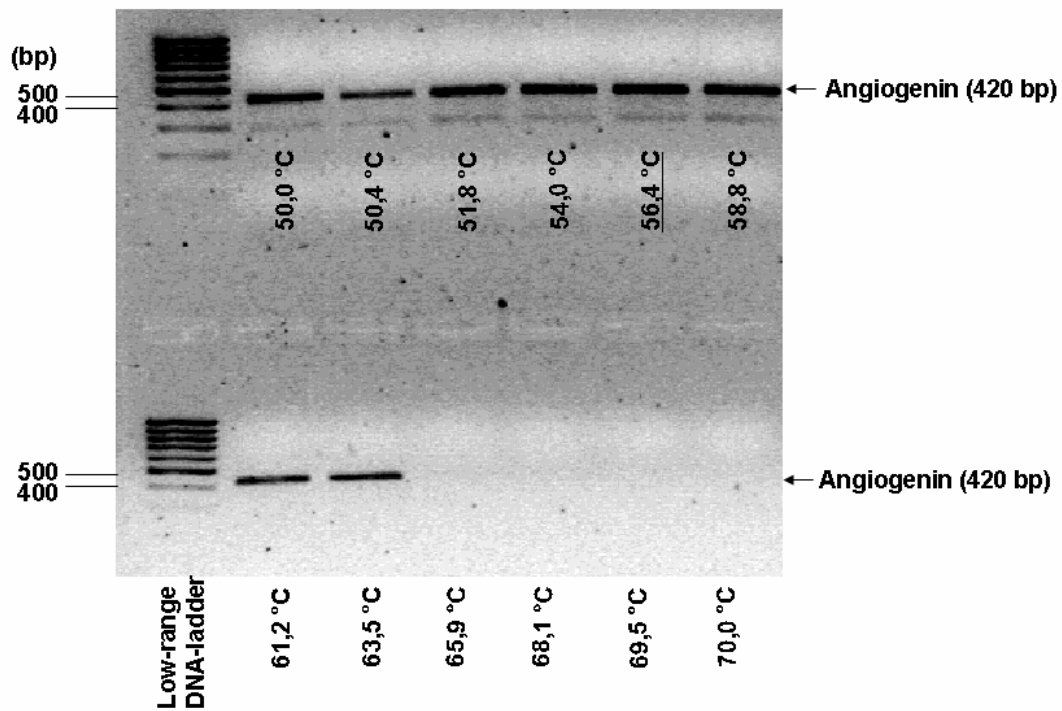


Abbildung 24 Expressionsanalyse von Angiogenin in Endothelzellen. Temperaturoptimierung der PCR-Reaktion zur Amplifikation des Angiogenins.

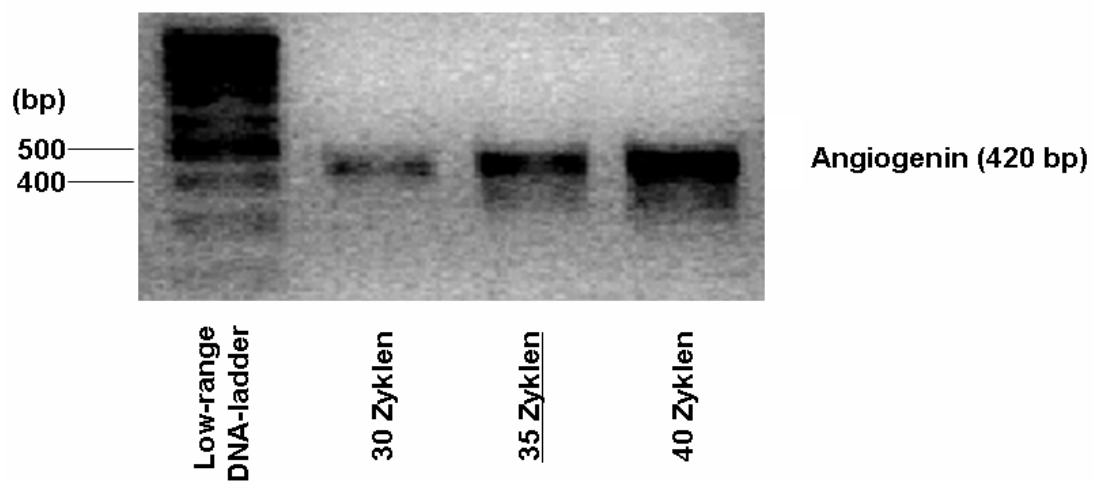


Abbildung 25 Expressionsanalyse von Angiogenin in Endothelzellen. Zyklusoptimierung der PCR-Reaktion zur Amplifikation des Angiogenins.

Nach Temperatur- und Zyklusoptimierung erfolgte der Vergleich von RNase 1- und Angiogenin-Expression auf mRNA-Ebene in HUVEC und HBMEC (da BMEC nicht menschlichen Ursprungs sind, funktionierten die Primer hier nicht).

Wie bereits bei den Ergebnissen des Western Blots gezeigt wurde, bestätigte sich auch bei der RT-PCR die Beobachtung, dass die RNase 1-Expression in HUVEC höher ist als in HBMEC, während die Angiogenin-Expression in HBMEC stärker ist als in HUVEC (siehe Abb. 26).

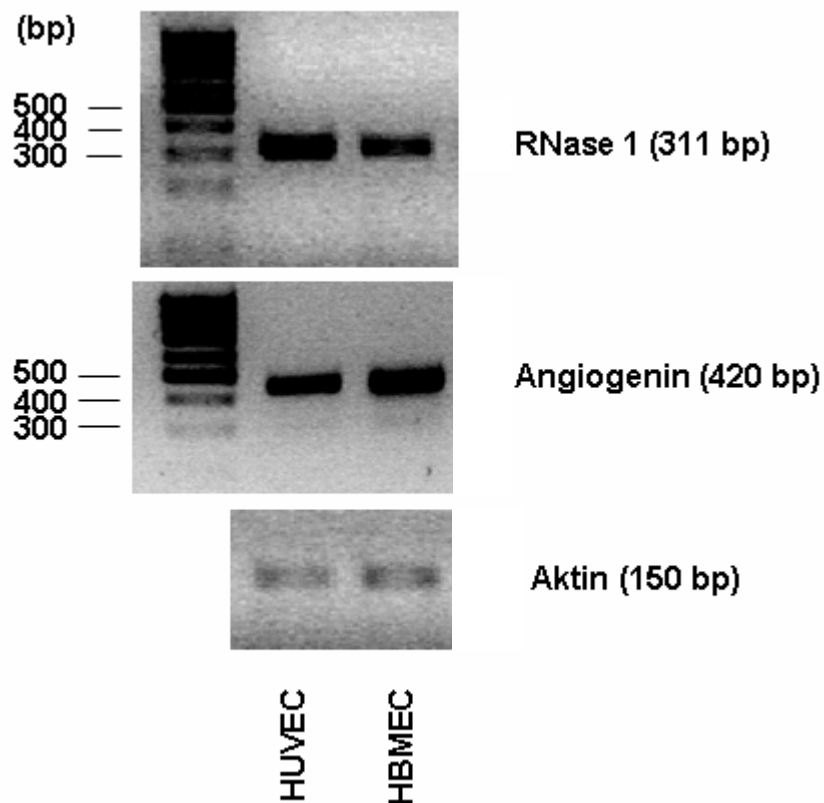


Abbildung 26 Nachweis von RNase 1- und Angiogenin-mRNA in HUVEC und HBMEC. Als Ladungskontrolle wurde Aktin verwendet.

Anschließend wurden HUVEC, wie unter Abschnitt 3.1.6 beschrieben, mit RNA (50 $\mu\text{g/ml}$), Poly IC (25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$), $\text{TNF}\alpha$ (20 ng/ml), Thrombin (0,75 units/ml) sowie Heparin (10 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert und die mRNA-Expression von RNase 1 und Angiogenin wurde untersucht.

Es zeigten sich keine Veränderungen der mRNA-Expression von RNase 1 und Angiogenin (siehe Abb. 27).

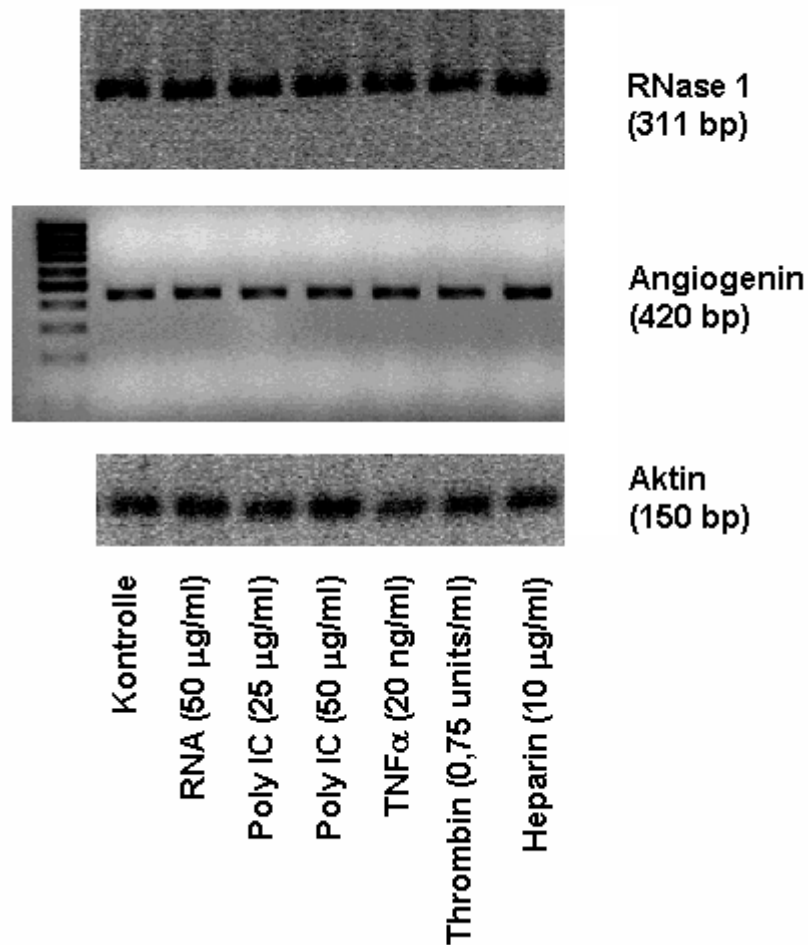


Abbildung 27 Nachweis von RNase 1- und Angiogenin-mRNA in HUVEC nach jeweils 24-stündiger Stimulation mit RNA, Poly IC, $\text{TNF}\alpha$, Thrombin und Heparin. Als Ladungskontrolle wurde Aktin verwendet.

Darüber hinaus ließ sich durch die Stimulation der HUVEC mit höheren Konzentrationen der Agenzien ($\text{TNF}\alpha$ (50 ng/ml), Poly IC (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Thrombin (2,5 units/ml), RNA (94 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und FCS (5 %)) ebenfalls keine veränderte mRNA-Expression von RNase 1 und Angiogenin beobachten (siehe Abb. 28).

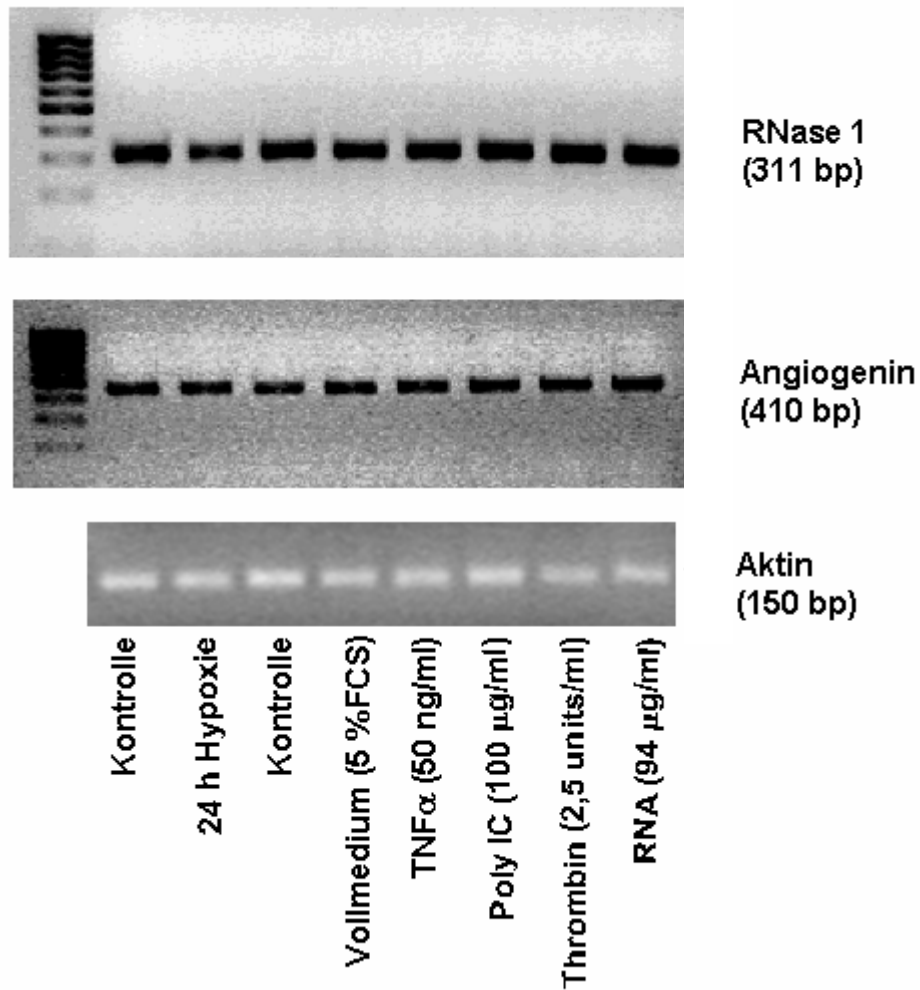


Abbildung 28 Nachweis von RNase 1- und Angiogenin-mRNA in HUVEC nach jeweils 24-stündiger Stimulation mit Vollmedium (5 % FCS), $\text{TNF}\alpha$, Poly IC, Thrombin, RNA sowie nach 24 h Hypoxie. Als Ladungskontrolle wurde Aktin verwendet.

Auch eine Stimulation der HUVEC mit den Wachstumsfaktoren VEGF (20 ng/ml) und bFGF (5 ng/ml) sowie die gleichzeitige Behandlung mit beiden Agenzien zeigte keine Veränderungen der mRNA-Expression von RNase 1 und Angiogenin (siehe Abb. 29).

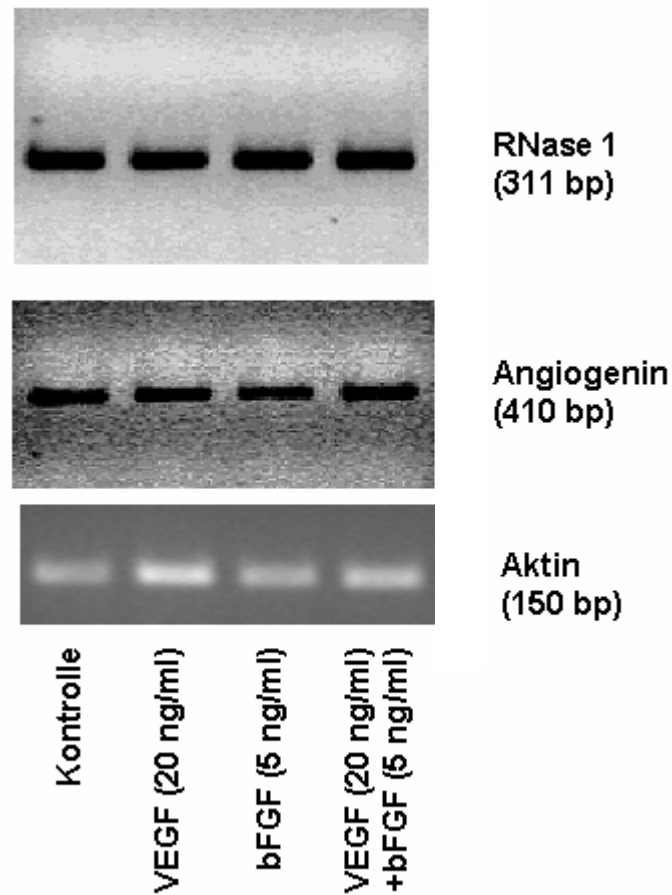


Abbildung 29 Nachweis von RNase 1- und Angiogenin-mRNA in HUVEC nach jeweils 24-stündiger Stimulation mit VEGF, bFGF und VEGF zusammen mit bFGF. Als Ladungskontrolle wurde Aktin verwendet.

Die Behandlung der HUVEC mit dem anti-angiogen und anti-inflammatorisch wirkenden bakteriellen Protein Eap^{40,41} (20 µg/ml) bewirkte, trotz eines deutlichen Anstieges der RNase 1-Expression auf Proteinebene (siehe Abb. 18, S. 51), keine veränderte mRNA-Expression dieses Enzyms (siehe Abb. 30).

Die gleichzeitige Stimulation mit Eap (20 µg/ml) und dem Wachstumsfaktor VEGF (20 ng/ml) zeigte ebenfalls keine Änderung der RNase 1-Expression auf mRNA-Ebene (siehe Abb. 30).

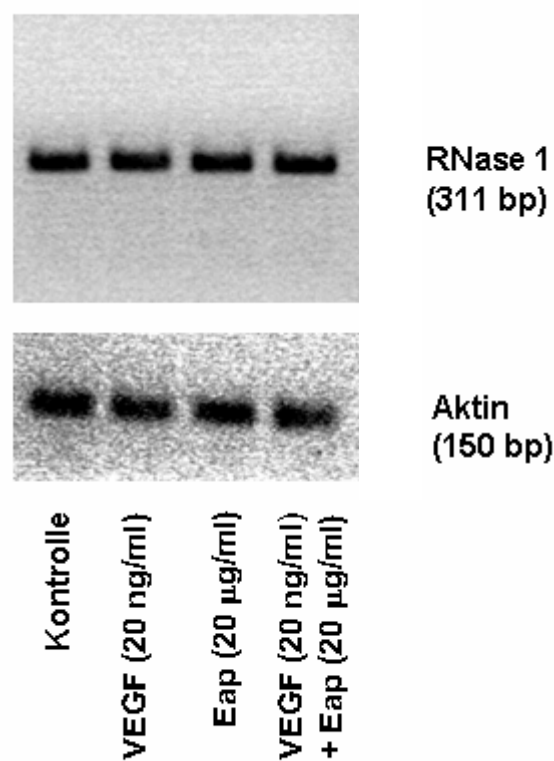


Abbildung 30 Nachweis von RNase 1-mRNA in HUVEC nach jeweils 24-stündiger Stimulation mit VEGF, Eap und VEGF zusammen mit Eap. Als Ladungskontrolle wurde Aktin verwendet.

Auch in den mikrovaskulären HBMEC zeigten sich nach 24 h Stimulation mit den Agenzien VEGF (10 ng/ml), Poly IC (25 µg/ml, 50 µg/ml), TNFα (10 ng/ml), Heparin (18 µg/ml) sowie bFGF (5 ng/ml) keine RNase 1- oder Angiogenin-mRNA-Expressionsänderungen (siehe Abb. 31).

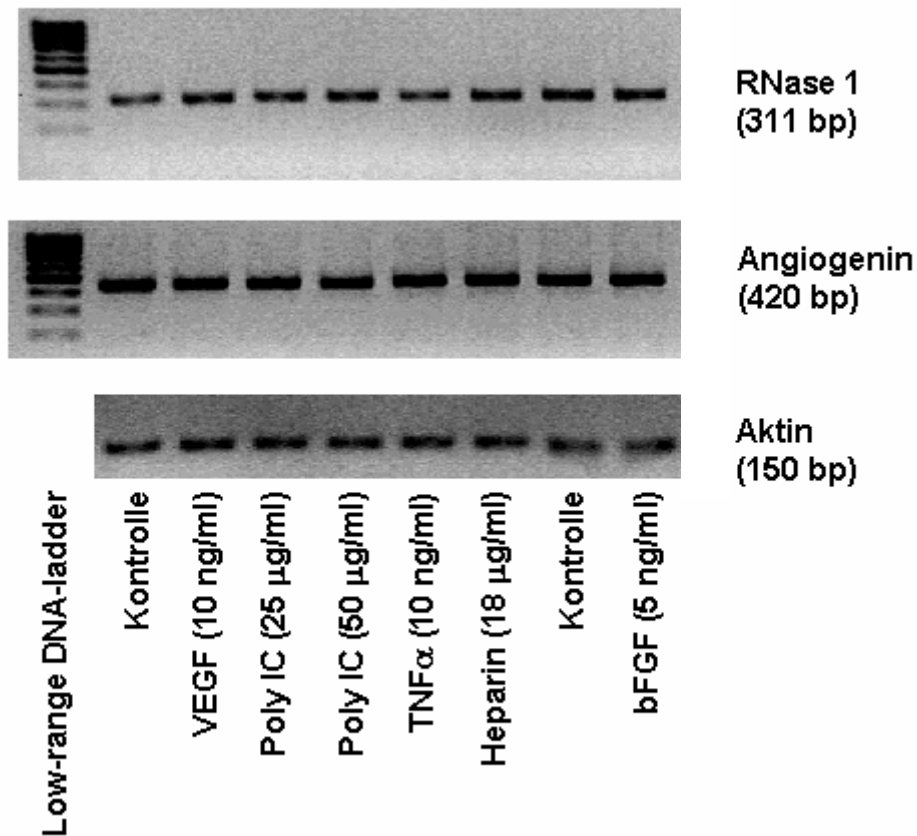


Abbildung 31 Nachweis von RNase 1- und Angiogenin-mRNA in HBMEC nach jeweils 24-stündiger Stimulation mit VEGF, Poly IC, TNFα, Heparin und bFGF. Als Ladungskontrolle wurde Aktin verwendet.

4.4 RNase-Aktivität in den verwendeten Endothelzellen

Mit dem Aktivitätstest wurde zunächst untersucht, welche EC die stärkste RNase-Aktivität aufzeigten. Dabei stellte sich heraus, dass die RNase-Aktivität in den HUVEC-Überständen ($753,6 \pm 18,1$ units/mg Protein) um ein Vielfaches höher war, als in den Überständen der mikrovaskulären EC HBMEC ($58,5 \pm 14,7$ units/mg Protein) und BMEC ($53,3 \pm 2,7$ units/mg Protein) (siehe Abb. 32A).

Weiterhin wurden mit diesem Test die Überstände zweier weiterer Endothelzellreihen (BREC, RMVEC) untersucht, wobei zu beobachten war, dass auch diese mikrovaskulären EC im Gegensatz zu HUVEC ($389,8 \pm 20,8$ units/mg Protein) eine nur sehr niedrige RNase-Aktivität ($14,7 \pm 11$ units/mg Protein und $6,2 \pm 0,7$ units/mg Protein) aufwiesen (siehe Abb. 32B).

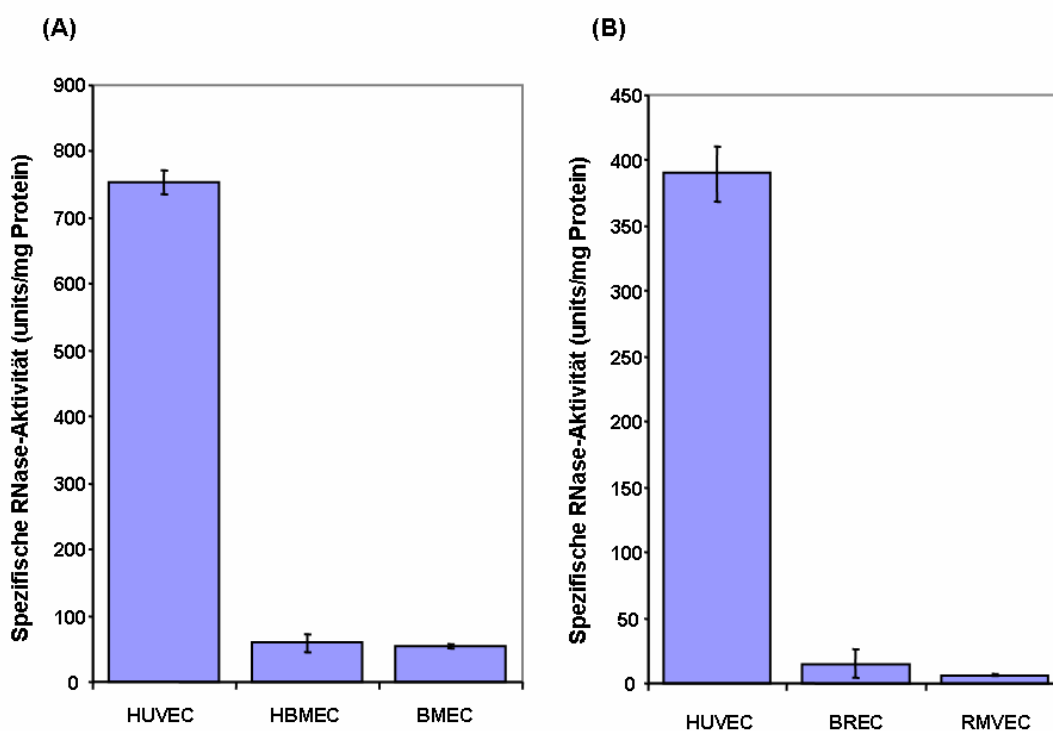


Abbildung 32 A RNase-Aktivität in Überständen von HUVEC im Vergleich zu HBMEC- und BMEC-Überständen. Die Endothelzellen wurden 24 h in FCS-freiem Medium kultiviert, anschließend wurden die Überstände eingengt und entsalzen, bevor die RNase-Aktivität, wie unter Abschnitt 3.4 beschrieben, bestimmt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw (n=3).

B RNase-Aktivität der HUVEC- Überstände im Vergleich zu BREC- und RMVEC-Überständen.

Als nächstes erfolgte der Vergleich von RNase-Aktivität im Überstand und im Lysat der makrovaskulären HUVEC.

Dabei stellte sich heraus, dass in den Lysaten ($2,7 \pm 0,3$ units/mg Protein) im Gegensatz zu den Überständen (718 ± 63 units/mg Protein) nahezu keine RNase-Aktivität nachweisbar war (siehe Abb. 33).

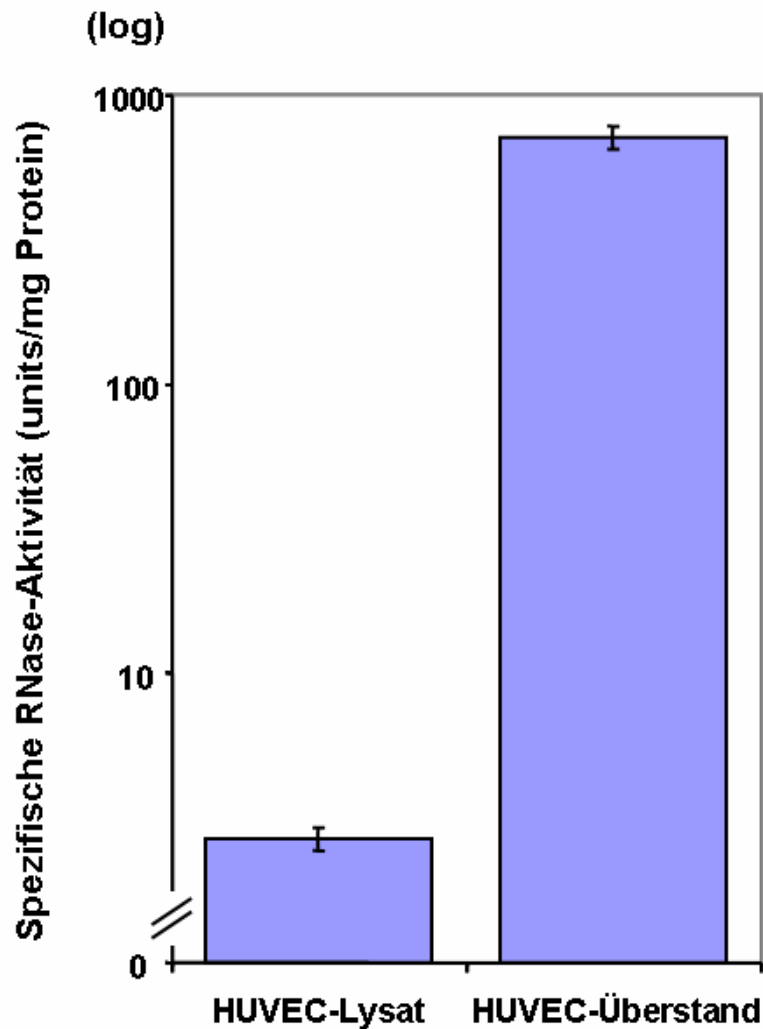


Abbildung 33 RNase-Aktivität im Lysat und Überstand von makrovaskulären HUVEC im Vergleich. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw ($n=3$).

Auch bei den mikrovaskulären HBMEC und BMEC zeigte sich, dass die RNase-Aktivität in den Überständen ($19,7 \pm 4,5$ units/mg Protein und $18,2 \pm 1,6$ units/mg Protein) höher war als in den Lysaten ($1 \pm 0,1$ units/mg Protein und $1,4 \pm 0,02$ units/mg Protein) (siehe Abb. 34).

Es ist jedoch zu beachten, dass es sich bei diesem Unterschied um einen Faktor von ca. 20 handelt, während bei den makrovaskulären HUVEC die RNase-Aktivität in den Überständen ca. 300-fach höher war als in den Lysaten (siehe Abb. 33, S.64).

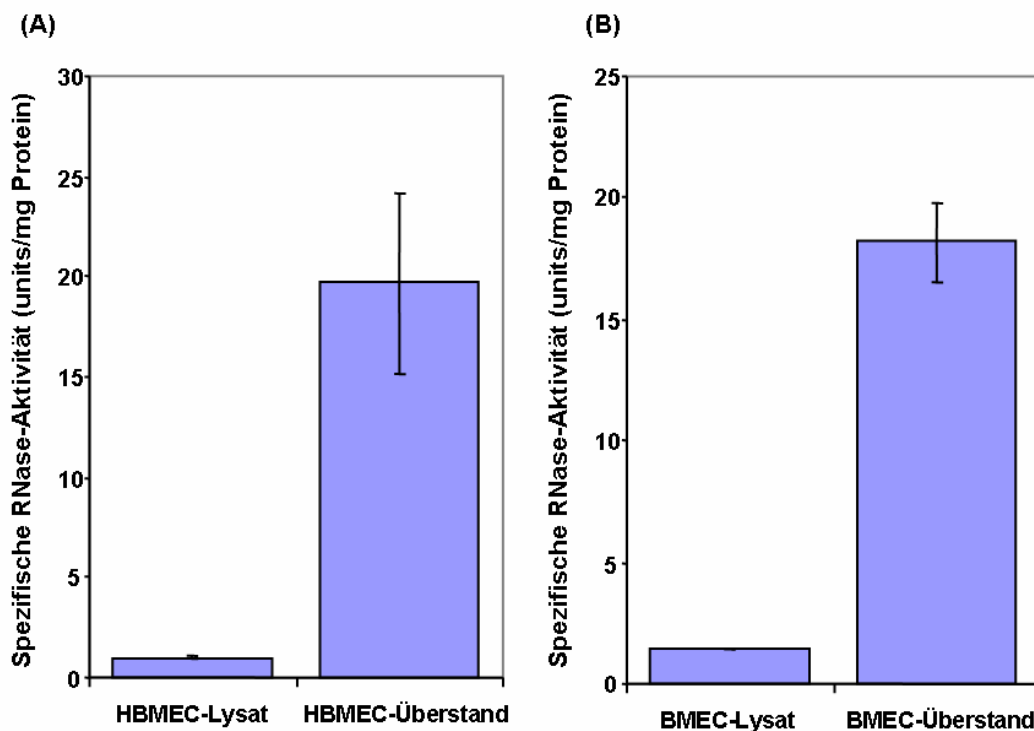


Abbildung 34 RNase-Aktivität von mikrovaskulären Endothelzellen im Lysat und Überstand. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw (n=3). **A** HBMEC **B** BMEC.

In den Lysaten aller untersuchten EC war eine nur sehr geringe RNase-Aktivität detektierbar, wobei diese in den HUVEC leicht höher war als in den mikrovaskulären EC.

Die spezifischen Aktivitäten betragen im Einzelnen: HUVEC ($3,0 \pm 0,2$ units/mg Protein), HBMEC ($1,0 \pm 0,1$ units/mg Protein) und BMEC ($1,4 \pm 0,02$ units/mg Protein) (siehe Abb. 35).

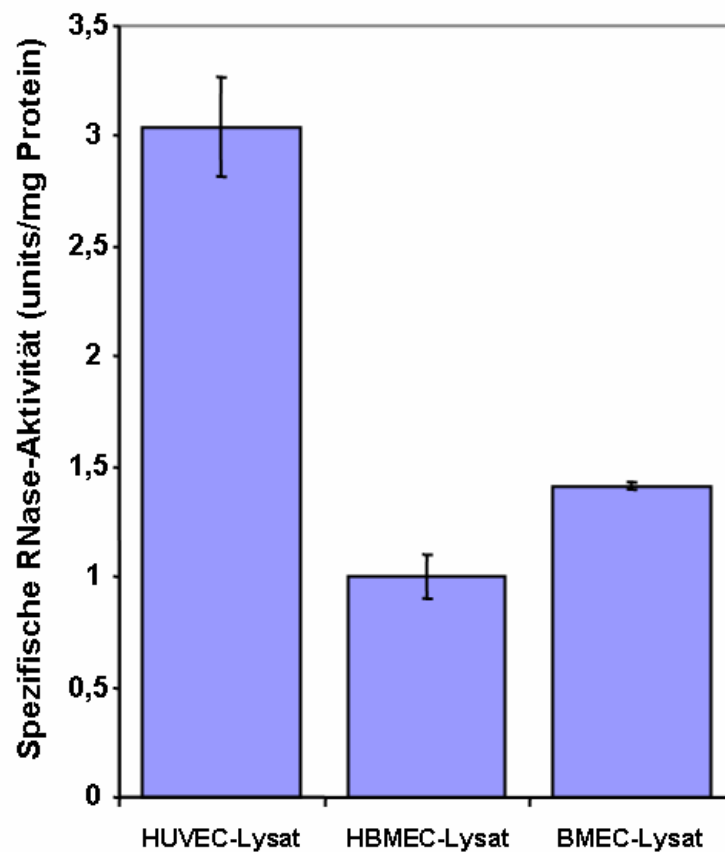


Abbildung 35 RNase-Aktivität im Lysat von HUVEC, HBMEC und BMEC. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw (n=3).

Um zu beweisen, dass mit diesem Test auch tatsächlich die RNase-Aktivität gemessen wurde, wurde ein Hemmtest durchgeführt, indem einer unbehandelten HUVEC-Überstandsprobe vor der Inkubation bei 37 °C RNase-Inhibitor (40 units) zugegeben wurde.

Dabei ließ sich die RNase-Aktivität, wie erwartet, um 80 % senken (siehe Abb. 36).

Die Zugabe eines neutralisierenden Angiogenin-Antikörpers (12 µg/ml) zu einer unbehandelten HUVEC-Überstandsprobe hatte, wie ebenfalls zu erwarten war, keinen Einfluss auf die RNase-Aktivität (siehe Abb. 36), da Angiogenin so gut wie keine ribonukleolytische Aktivität besitzt.

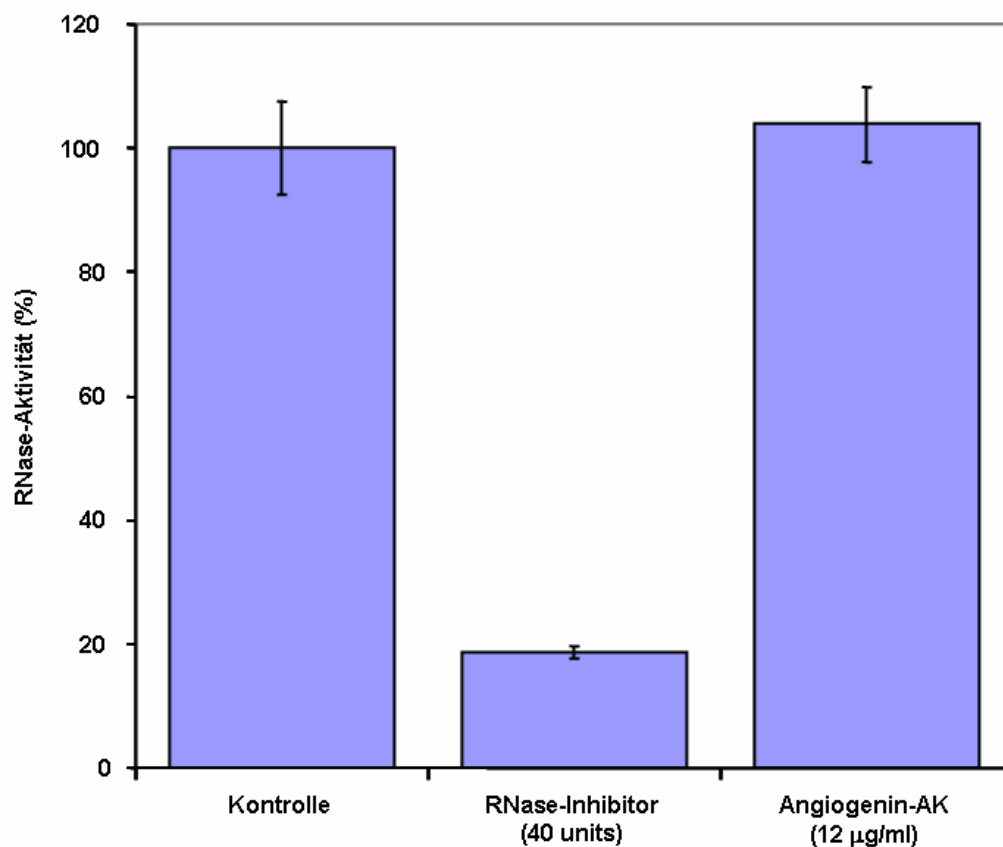


Abbildung 36 RNase-Aktivität im HUVEC-Kontroll-Überstand und nach Zugabe von RNase-Inhibitor bzw. Angiogenin-Antikörper. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw (n=3).

Da, wie bereits gezeigt, die RNase-Aktivität mit Abstand am höchsten in HUVEC-Überständen nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 32 A, B, S. 63), wurden diese für die folgenden Stimulationstests verwendet.

Zunächst wurden HUVEC mit Agenzien behandelt, die proinflammatorisch (TNF α) bzw. prokoagulatorisch (Thrombin, RNA) wirken.

Dabei stellte sich heraus, dass eine 24-stündige Inkubation mit Poly IC (25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml), RNA (50 μ g/ml, 100 μ g/ml), TNF α (10 ng/ml, 20 ng/ml) und Thrombin (0,75 units/ml, 1,5 units/ml, 2,5 units/ml) zu einer signifikanten Abnahme der RNase-Aktivität in diesen EC führte (siehe Abb. 37 und Tabelle 12, S. 69).

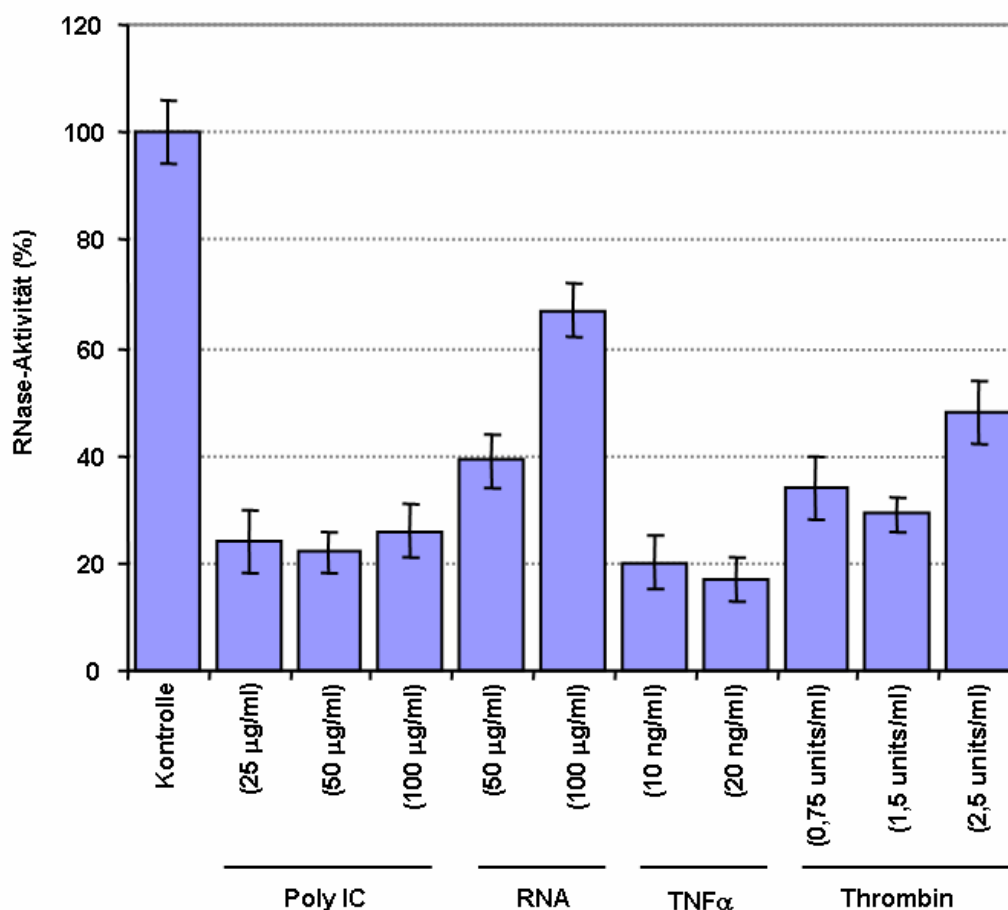


Abbildung 37 RNase-Aktivität in HUVEC-Überständen nach jeweils 24 h Stimulationszeit. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw (n=3).

Hingegen zeigten 24-stündige Inkubationen mit LPS (100 ng/ml, 250 ng/ml), VEGF (20 ng/ml), nativem bzw. rekombinantem Eap (20 μ g/ml) und zyklischem RGD (5 μ g/ml) keine signifikanten RNase-Aktivitätsänderungen (siehe Abb. 38 und Tabelle 12, S. 69).

Eine Aktivitätszunahme war zu beobachten nach einer Inkubation der HUVEC mit dem angiogen wirkenden bFGF (5 ng/ml), bFGF (5 ng/ml) zusammen mit VEGF (20 ng/ml) und nach 24 h Hypoxie (siehe Abb. 38 und Tabelle 12).

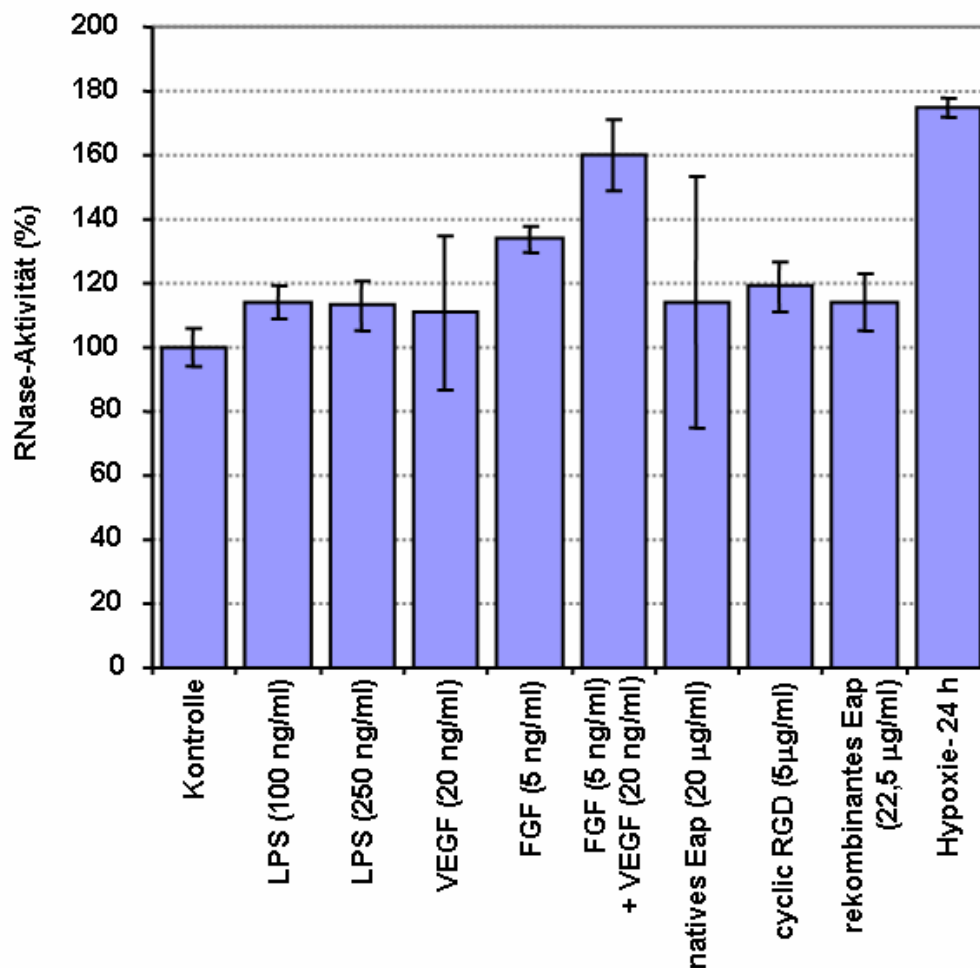


Abbildung 38 RNase-Aktivität in HUVEC-Überständen nach jeweils 24 h Stimulationszeit. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw ($n=3$).

Tabelle 12 Wirkung der verwendeten Stimulanzen auf die RNase-Aktivität in HUVEC

Stimulation	Poly IC (25, 50, 100 μ g/ml)	RNA (50, 100 μ g/ml)	TNF α (10, 20 ng/ml)	Thrombin (0,75; 1,5; 2,5 units/ml)	LPS (100, 250 ng/ml)
Aktivität	↓, ↓, ↓	↓, ↓	↓, ↓	↓, ↓, ↓	→, →
Stimulation	Eap (20 μ g/ml)	VEGF (20 ng/ml)	bFGF (5 ng/ml)	bFGF (5 ng/ml) + VEGF (20 ng/ml)	Hypoxie (24 h)
Aktivität	→	→	↑	↑	↑

Da immunhistologische Bilder in weiteren Untersuchungen zeigten, dass ein Teil der RNase 1 in speziellen Granulas (WPB) gespeichert ist (siehe Abb. 44-46, S. 75-77), wurden HUVEC mit Agenzien behandelt, von denen bekannt ist, dass sie zur Entleerung dieser Granula führen. Anschließend wurde nach unterschiedlichen Zeiten die RNase-Aktivität in den Überständen bestimmt.

Die Stimulation mit PMA (50 ng/ml), $\text{TNF}\alpha$ (20 ng/ml), Thrombin (1,5 units/ml) und Vasopressin (10 μM), für die bereits gezeigt ist, dass sie zur Entleerung von endothelzellspezifischen Granula führen⁴²⁻⁴⁶, führte hier nach den untersuchten Zeiten (0 min, 1 h, 3 h, 7 h, 24 h) zu keiner reaktiven Zunahme der RNase-Aktivität (siehe Abb. 39). Was sich jedoch bei den Zeitabhängigkeitsuntersuchungen erneut beobachten ließ, war, dass nach 24 h Stimulation mit Thrombin bzw. $\text{TNF}\alpha$, die RNase-Aktivität abnahm (siehe Abb. 37, S. 68 und Abb. 39).

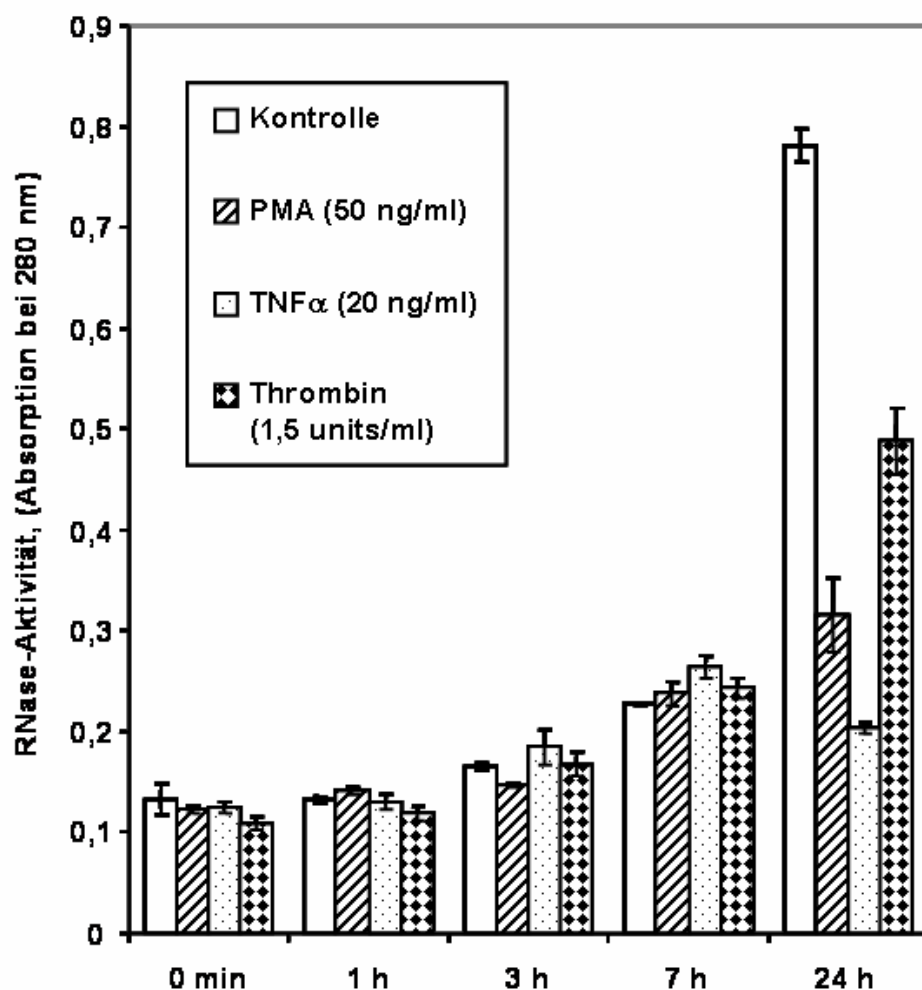


Abbildung 39 RNase-Aktivität in HUVEC-Überständen nach Behandlung mit PMA, $\text{TNF}\alpha$ und Thrombin in einer Zeitkinetik. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw (n=3).

Auch die Stimulation der HUVEC mit Vasopressin (10 μM) zeigte nach den untersuchten Zeiten (0 min, 1 h, 3 h, 7 h, 24 h) keine reaktive Zunahme der RNase-Aktivität.

Jedoch ließ sich nach 24 h eine leichte Abnahme der RNase-Aktivität in HUVEC-Überständen beobachten (siehe Abb. 40).

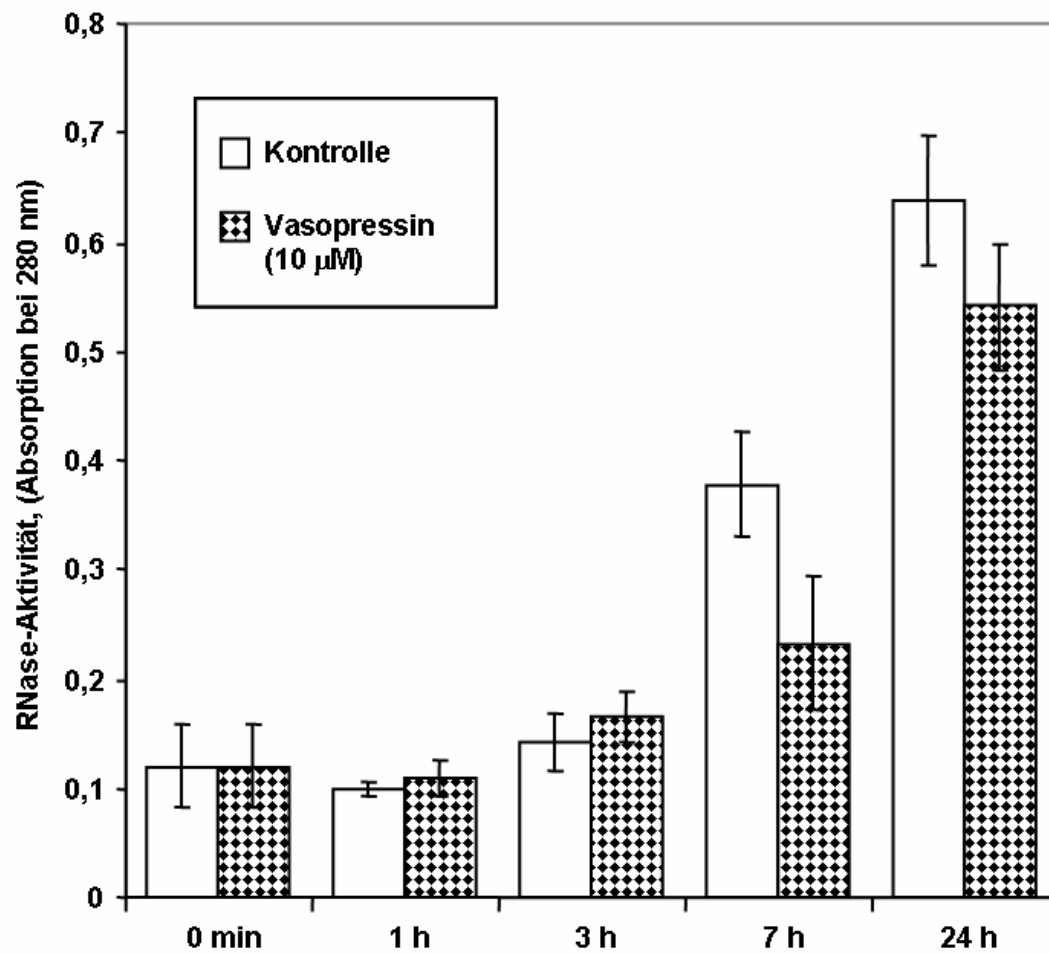


Abbildung 40 RNase-Aktivität in HUVEC-Überständen nach Behandlung mit Vasopressin in einer Zeitkinetik. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw (n=3).

Die Inkubation der HUVEC mit Cycloheximid, einem Translationshemmer, der die de novo Proteinsynthese hemmt, zeigte, dass nach 24 h so gut wie keine RNase-Aktivität mehr detektierbar war (siehe Abb. 41).

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Aktivität, die in den Tests nach 24 h gemessen wurde, auf Proteinbiosynthese und nicht auf der Entleerung von Granula basierte.

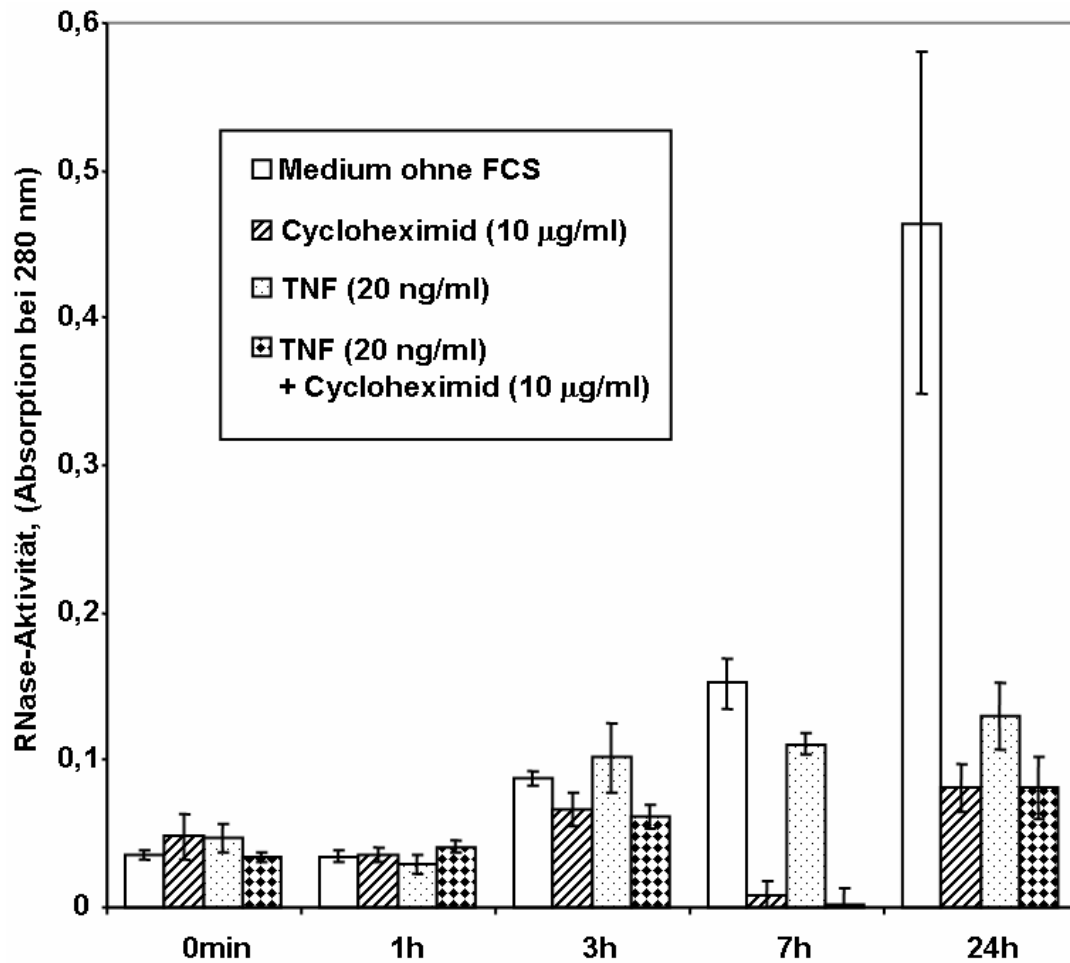


Abbildung 41 RNase-Aktivität in HUVEC-Überständen nach Behandlung mit Cycloheximid, TNF α und Cycloheximid zusammen mit TNF α in einer Zeitkinetik. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw (n=3).

Interessanterweise stellte sich weiterhin heraus, dass im Gegensatz zum prokoagulatorisch wirkenden Thrombin, das nach 24 h Stimulationszeit zu einer Abnahme der RNase-Aktivität in den HUVEC-Überständen geführt hatte (siehe Abb. 37, S. 68), das aktivierte Protein C (10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$), das bekanntermaßen einen antikoagulatorischen Effekt aufweist, zu deren starken Zunahme führte (siehe Abb. 42).

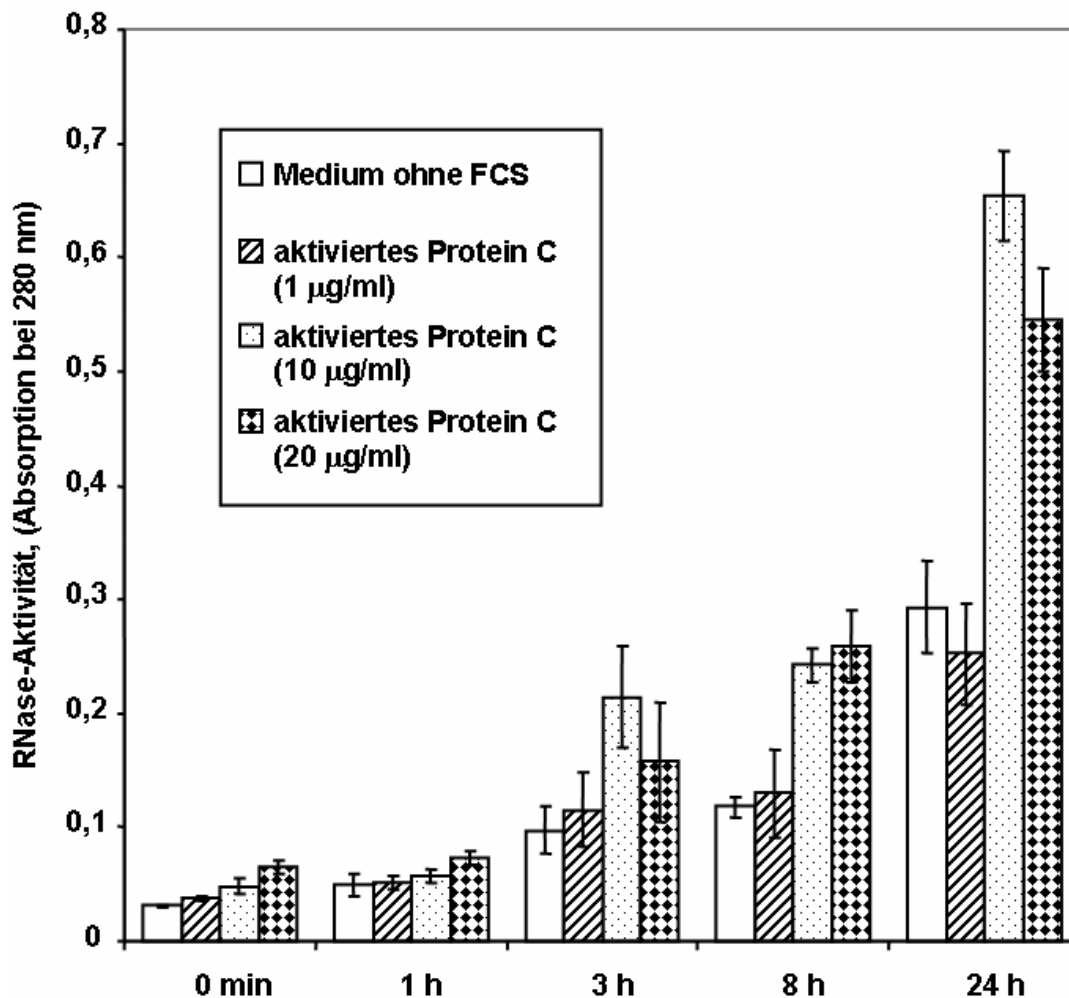


Abbildung 42 RNase-Aktivität in HUVEC-Überständen nach Behandlung mit drei verschiedenen Konzentrationen von aktiviertem Protein C in einer Zeitkinetik. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw (n=3).

Übereinstimmend mit der Wirkung vom aktivierten Protein C, führte auch der Stickstoffmonoxid-Donator, 5-Nitrosoglutathion (50 μM , 100 μM), der durch seine Thrombozyten-aggregationshemmende Wirkung ebenfalls antikoagulatorisch agiert, nach 24 h Stimulationszeit zu einer Zunahme der RNase-Aktivität in den HUVEC-Überständen (siehe Abb. 43).

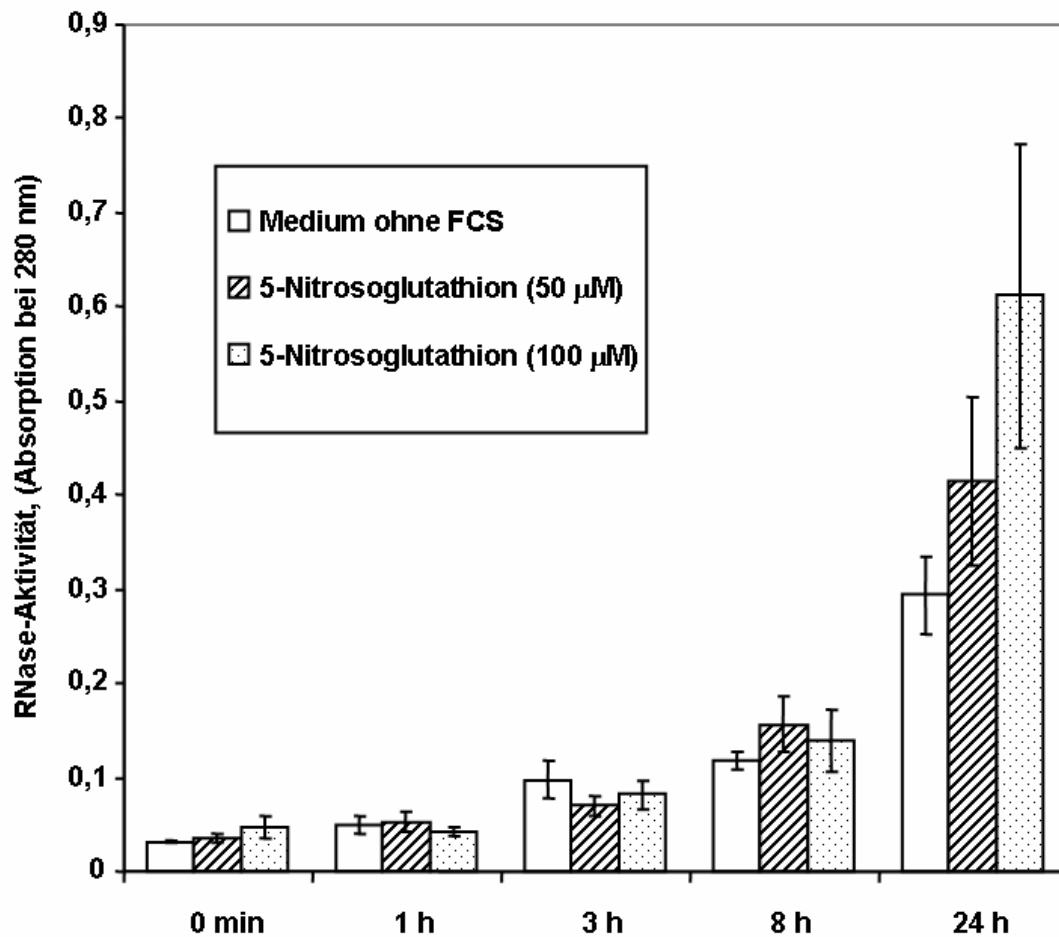


Abbildung 43 RNase-Aktivität in HUVEC-Überständen nach Behandlung mit zwei verschiedenen Konzentrationen von 5-Nitrosoglutathion in einer Zeitkinetik. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Stabw ($n=3$).

4.5 Lokalisation von RNase 1 und Angiogenin in HUVEC

Die folgenden Bilder sind freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Dr. S. Fischer. Sie zeigen immuncytochemisch die Expression der RNase 1 und des Angiogenins in HUVEC.

Interessanterweise zeigte das Vorkommen von RNase 1 und Angiogenin in diesen EC eine nach Granula aussehende Fluoreszenz. (siehe Abb. 44). Deshalb wurde auch die Expression des von Willebrand Faktors (vWF) untersucht, von dem bekannt ist, dass er in speziellen Granula der EC, den Weibel-Palade-Körperchen (WPB) gespeichert ist⁴²⁻⁴⁶.

Wie aus Abb. 44 erkennbar wird, zeigte vWF eine ähnliche Expression wie RNase 1 und Angiogenin. Deshalb wurde weiterhin untersucht, ob RNase 1 und Angiogenin auch in diesen Granulas gespeichert sein könnten.

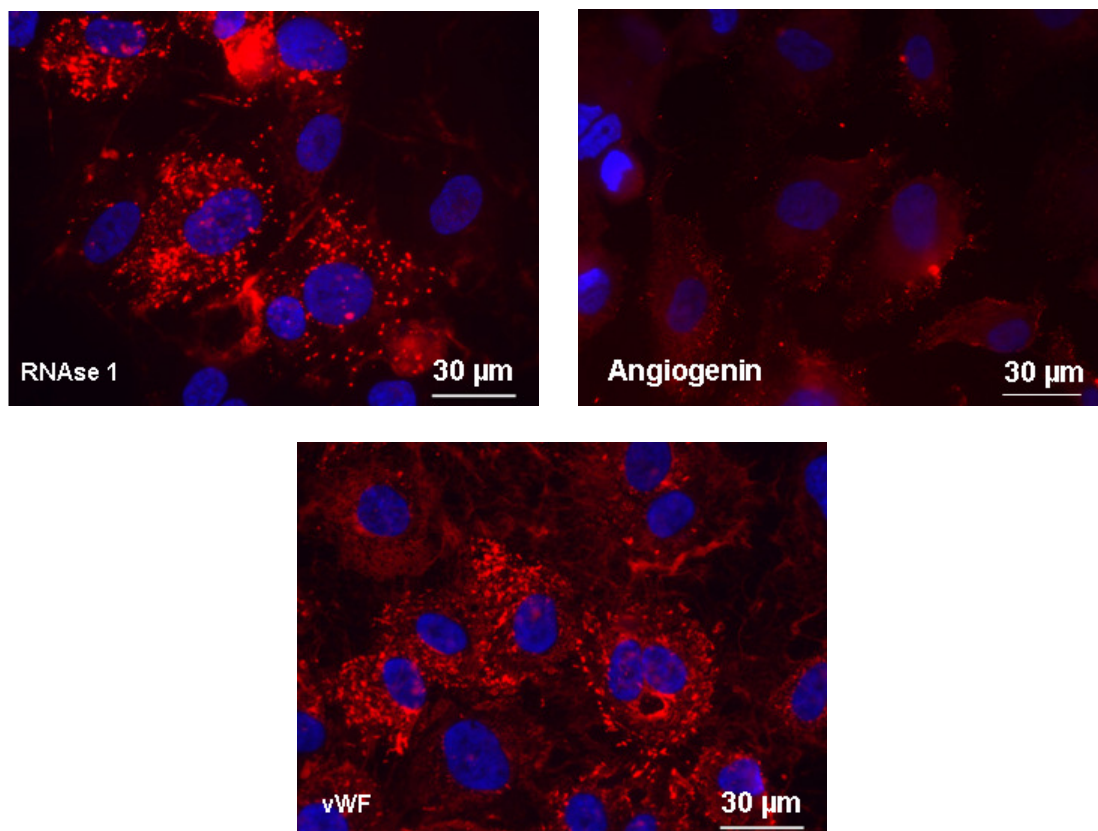


Abbildung 44 Immuncytochemischer Nachweis von RNase 1, Angiogenin und von Willebrand Faktor in HUVEC. HUVEC wurden zunächst fixiert (10' Methanol:Aceton = 1:1), gewaschen und anschließend 1 h geblockt (1 h 3 % BSA). Die Detektion der Proteine erfolgte nach Inkubation der Zellen mit den Antikörpern rabbit anti RNase (1:50), goat anti Angiogenin (1:50) und mouse anti vWF (1:100), gefolgt von einstündiger Inkubation mit den entsprechenden an Rhodamin gekoppelten Zweitantikörpern. Die Aufnahmen erfolgten an einem Leica Fluoreszenzmikroskop.

Zur genaueren Lokalisationsbestimmung dieser Enzyme wurden Kolokalisierungsexperimente durchgeführt, die bestätigten, dass RNase 1 wie vWF auch in WPB gespeichert wird (siehe Abb. 45).

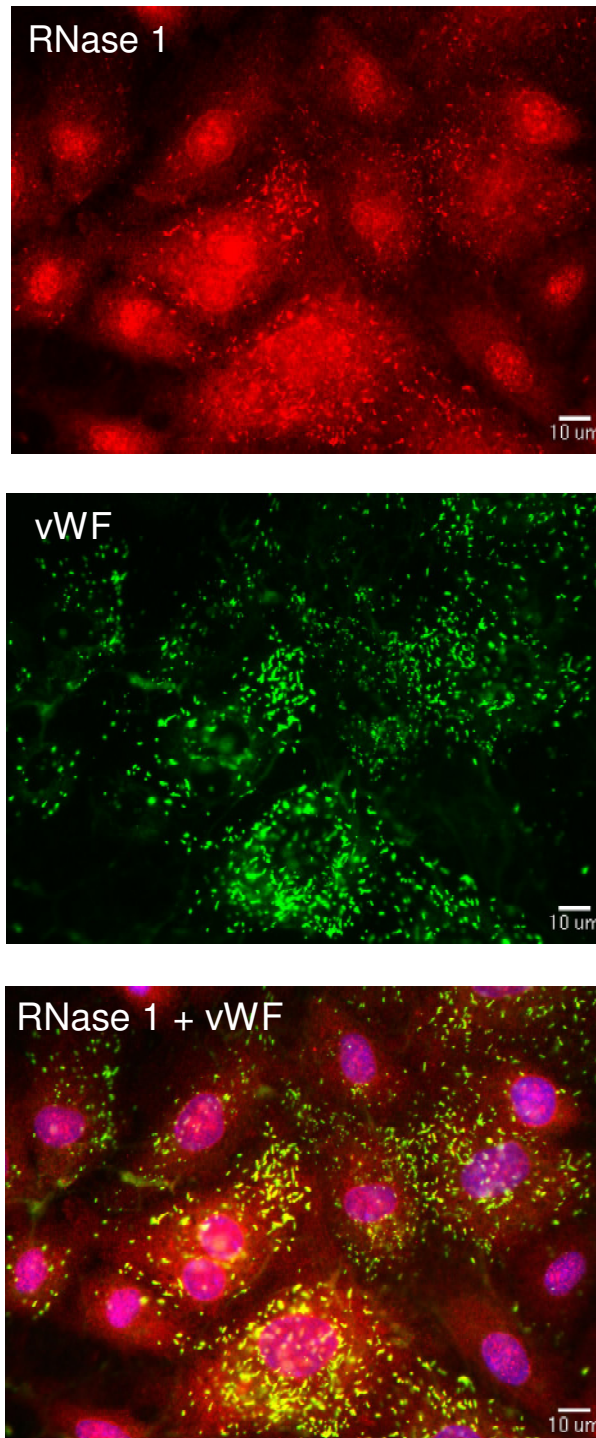


Abbildung 45 Immuncytochemischer Nachweis der Kolokalisierung von RNase 1 mit von Willebrand Faktor in HUVEC. HUVEC wurden zunächst fixiert (10' Methanol:Aceton = 1:1), gewaschen und anschließend 1 h geblockt (1 h 3 % BSA). Die Detektion der Proteine erfolgte nach Inkubation der Zellen mit den Antikörpern rabbit anti RNase (1:50) und mouse anti vWF (1:100), gefolgt von einstündiger Inkubation mit den entsprechenden an Rhodamin und FITC gekoppelten Zweitantikörpern. Die Aufnahmen erfolgten an einem Leica Fluoreszenzmikroskop.

Für das Angiogenin erhärtete sich der Verdacht auf die Kolokalisation in weiteren Tests nicht (siehe Abb. 46), vielmehr war das anfänglich positive Ergebnis auf die Kreuzreaktivität des Angiogenin-Antikörpers mit RNase 1 zurückzuführen.

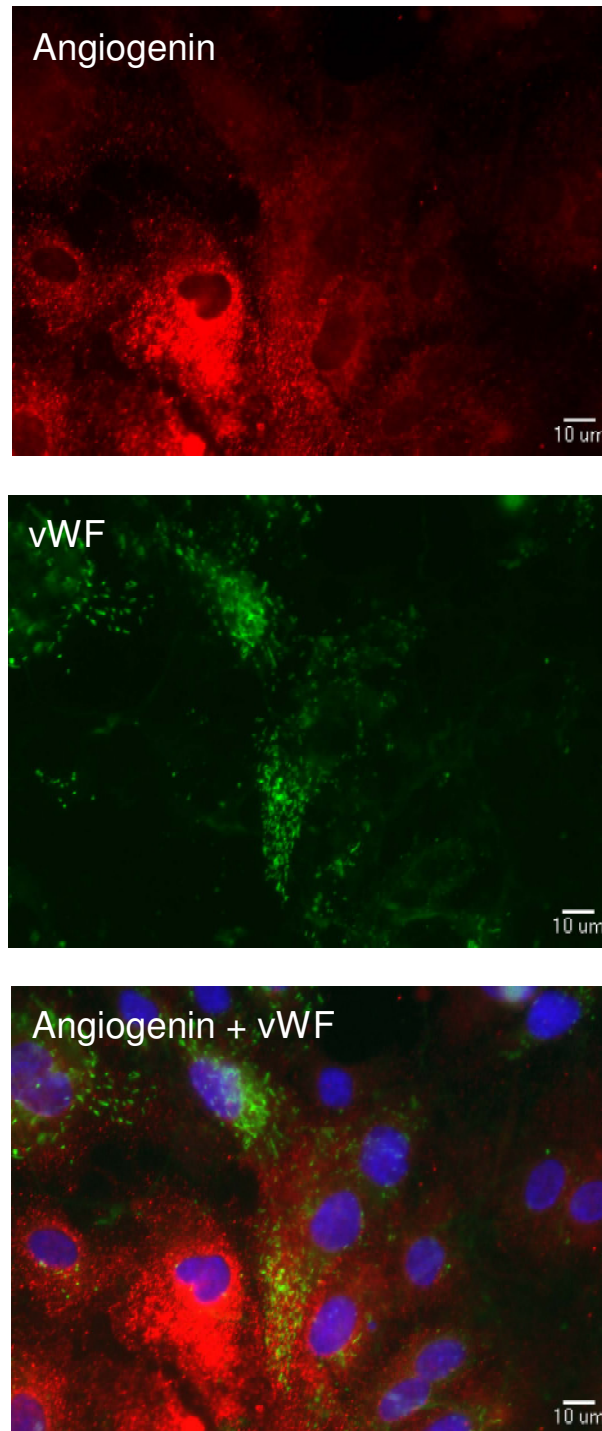


Abbildung 46 Immuncytochemischer Nachweis der Kolokalisierung von Angiogenin mit von Willebrand Faktor in HUVEC. HUVEC wurden zunächst fixiert (10' Methanol:Aceton = 1:1), gewaschen und anschließend 1 h geblockt (1 h 3 % BSA). Die Detektion der Proteine erfolgte nach Inkubation der Zellen mit den Antikörpern goat anti Angiogenin (1:50) und mouse anti vWF (1:100), gefolgt von einstündiger Inkubation mit den entsprechenden an Rhodamin und FITC gekoppelten Zweitantikörpern. Die Aufnahmen erfolgten an einem Leica Fluoreszenzmikroskop.

5 Diskussion

Die Beschreibung von RNasen im Endothel^{6,7,8}, sowie der Nachweis von RNase 1 und Angiogenin mit mittleren Konzentrationen von 400 ng/ml und 250 ng/ml in der Blutzirkulation²⁰⁻²⁵ legen die Vermutung nahe, dass diese Enzyme neben der Spaltung von intra- und extrazellulärer RNA auch in anderen Prozessen, wie z.B. der Hämostase involviert sein könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals genauer untersucht, welche verschiedenen Arten von EC unter welchen Bedingungen die RNasen RNase 1 und RNase 5 (= Angiogenin) exprimieren und sezernieren sowie ob durch diverse Stimulationen RNase-Aktivitätsänderungen zu induzieren waren. Dazu wurden makro- und mikrovaskuläre EC mit verschiedenen Agenzien behandelt und anschließend die Expression von RNase 1 und Angiogenin sowie die RNase-Aktivität untersucht, um neue Erkenntnisse über Regulationsmechanismen der RNasen zu erhalten. Da dies eine der ersten Arbeiten ist, die diese Zusammenhänge beschreibt, kann an dieser Stelle nur auf wenige Referenzen zur Expression extrazellulärer RNasen verwiesen werden.

5.1 Expression von RNase 1 und RNase 5 in makro- versus mikrovaskulären Endothelzellen

Die Ergebnisse zeigten, dass in den makrovaskulären EC wesentlich mehr RNase 1 als Angiogenin exprimiert und diese nahezu vollständig in den Überstand sezerniert wird. Im Vergleich dazu exprimieren mikrovaskulären EC wesentlich geringere Mengen dieses Enzyms (wie durch mRNA- und Proteinexpressionsnachweis gezeigt wurde), das vorwiegend im Zytosol zurückgehalten wird.

Eine vermehrte Expression und Freisetzung der RNase 1 in makrovaskulären EC erscheint sinnvoll, da es in größeren Gefäßen durch den erhöhten Blutfluss, im Vergleich zum mikrovaskulären Gefäßbett, zu mehr Zellschädigung und damit zu vermehrter Freisetzung von RNA aus geschädigten Zellen kommen könnte. Die erhöhte RNase 1-Freisetzung eröffnet somit eine Möglichkeit, die gebildete RNA schnell zu degradieren und dadurch auch deren prokoagulatorische Aktivität zu hemmen. Neuere Studien haben in Übereinstimmung damit gezeigt, dass RNase 1

sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine antikoagulatorische Aktivität sowie eine Ödem-senkende Wirkung aufweist^{18,33}.

Die Beobachtung, dass in den mikrovaskulären HBMEC die RNase 1-Expression im Überstand kaum detektierbar ist, führt zu der Vermutung, dass im mikrovaskulären Gefäßbett die Zellschädigung und die damit verbundene erhöhte RNA-Konzentration wesentlich kleiner ist als im makrovaskulären System und damit dieser Regulationsmechanismus eine nur unbedeutende Rolle spielen könnte. Außerdem ist das Verhältnis EC zu Blutvolumen in Kapillaren um ein Vielfaches zugunsten des Endothels verschoben, so dass hier bereits die Expression kleinerer Mengen von RNase 1 pro EC ausreichend sein könnte.

Im Gegensatz dazu zeigten die Untersuchungen, dass die Angiogenin-Expression in den mikrovaskulären EC besonders stark ist. Dieses Enzym ist, wie in der Einleitung genauer beschrieben, bekannt als eines der potentesten vasoproliferativen Faktoren *in vivo*¹¹, außerdem wurde in mehreren Arbeiten gezeigt, dass seine Konzentration in diversen Krebsleiden erhöht ist und diese mit der Schwere der Erkrankung korreliert²⁰⁻²⁶.

Die hohe Angiogeninkonzentration in HBMEC wirft die Frage auf, ob dieses Protein eine Rolle beim Erhalt bzw. bei der Funktion der Blut-Hirn-Schranke spielen könnte oder ob es vielleicht eine neuroprotektive Eigenschaft besitzt. Neuste Studien (2008) zeigen eine neuroprotektive Wirkung des Angiogenins bei der ‚amyotrophen Lateralsklerose‘⁴⁷, einer degenerativen Erkrankung des motorischen Nervensystems, sowie erhöhte Angiogeninserumspiegel beim Hirninfarkt⁴⁸.

Ob das Angiogenin im Gehirn noch weitere, bislang unbekannte Funktionen übernimmt, ist nicht bekannt und bleibt weiter zu klären.

5.2 Expressions- und Aktivitätsänderung der RNasen durch diverse Stimulationen

Keine der verwendeten Stimulanzen, mit Ausnahme von Thrombin und Eap, zeigten eine Expressionsänderung der untersuchten RNasen, weder auf mRNA- noch auf Proteinebene.

Die Behandlung der HUVEC mit dem anti-angiogen und anti-inflammatorisch wirkenden bakteriellen Protein Eap^{40,41} führte zur Abnahme der

Angiogeninexpression bei gleichzeitiger Erhöhung der RNase 1-Expression auf Proteinebene, während sich auf mRNA-Ebene sowie im RNase-Aktivitätstest keine Veränderungen zeigten. Die durch Eap induzierte RNase 1-Expression könnte der proliferativen Wirkung von RNA (unveröffentlichte Ergebnisse aus unserem Labor sprechen dafür, dass RNA proliferativ auf EC wirkt) entgegenwirken. Es wäre interessant weiter zu analysieren, ob das Eap gerade wegen der Beobachtung der verminderten Angiogeninexpression anti-angiogen wirkt sowie ob Angiogenin- und RNase 1-Expression in direktem (reziproken) Zusammenhang zueinander stehen.

Die Tatsache, dass die anderen getesteten Stimulanzen keine Expressionsänderungen der RNasen bewirkten, während die Aktivität der freigesetzten RNasen verändert war, lässt darauf schließen, dass während der unterschiedlichen Zellstimulationen möglicherweise noch weitere Faktoren von den Zellen sezerniert wurden, die in der Lage sind, die RNase-Aktivität zu beeinflussen. So zeigten unsere Ergebnisse, dass sich die RNase-Aktivität in HUVEC-Überständen durch die Stimulation mit den prokoagulatorisch wirkenden Agenzien Thrombin und RNA hemmen lässt. Ein Erklärungsansatz für die Aktivitätsabnahme könnte durch den bereits in der Einleitung vorgestellten RI^{14-16,50-51} gegeben sein (siehe Abschnitt 1.2), den die EC als Gegenregulation bzw. als Schutzmechanismus bei zu hohen RNase-Konzentrationen freisetzen könnte, um die RNase-Aktivität zu hemmen.

Die antikoagulatorisch wirkenden Agenzien „aktiviertes Protein C“ und der Stickstoffmonoxid-Donator „5-Nitrosoglutathion“ führten zwar zu keiner gesteigerten Expression, jedoch zu einer gesteigerten RNase-Aktivität. Die antithrombotische Wirkung von aktiviertem Protein C und 5-Nitrosoglutathion könnte, neben den schon bekannten Wirkungsmechanismen, zusätzlich auch durch die Erhöhung der RNase-Aktivität erklärbar sein, zumal, übereinstimmend dazu, in Arbeiten gezeigt werden konnte, dass Thromben viel RNA enthalten, die die Koagulation weiter induzieren³³. Inwieweit diese Beobachtungen mit pathologischer Thrombusbildung im Zusammenhang stehen könnten, bleibt in weiteren Untersuchungen zu überprüfen.

Weiterhin stellt sich die Frage, warum sich durch die Stimulation der HUVEC mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF α eine signifikante Abnahme der RNase-Aktivität zeigte (RNase-Hemmung im Rahmen von entzündlichen Prozessen?) sowie nach Behandlung mit den Wachstumsfaktoren bFGF und bFGF zusammen mit VEGF eine Aktivitätszunahme zu beobachten war, während auf Protein- und mRNA-Ebene

keine RNase 1-Expressionsänderungen erkennbar waren. Die Regulationsmechanismen der RNase-Aktivität bleiben somit noch genauer aufzudecken.

5.3 Lokalisation von RNase 1 in Granula der Endothelzellen (Weibel-Palade-Körperchen)

Ferner zeigten die Ergebnisse (immunhistochemische Aufnahmen und Western Blots), dass RNase 1 in speziellen Granulas von EC, den sogenannten Weibel-Palade-Körperchen (WPB), benannt nach ihren Erstbeschreibern Weibel und Palade, die diese Zellorganellen 1964 erstmals entdeckten⁴⁹, gespeichert ist. Dies erlaubt bei Bedarf eine rasche Freisetzung dieses Enzyms in die Blutbahn, unabhängig von Protein de novo Synthese. Weitere bekannte Substanzen, die in WPB gespeichert werden, sind u.a. vWF, P-Selektin, Interleukin 8, tissue plasminogen activator (tPA) und Endothelin 1⁴²⁻⁴⁶. Weiterhin ist bereits bekannt, dass Agenzien wie Histamin, VEGF, PMA, Thrombin, Vasopressin, Epinephrin und Serotonin in der Lage sind, durch Erhöhung intrazellulärer Konzentrationen von Calcium bzw. zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), eine Entleerung der WPB zu bewirken⁴²⁻⁴⁶.

In Anlehnung dazu wurden HUVEC mit PMA und Vasopressin inkubiert und nach 30 min Stimulationszeit waren erhöhte RNase 1-Konzentrationen in HUVEC-Überständen mittels Western Blot detektierbar. Als Positivkontrolle wurde die Expression von P-Selektin nach PMA-Stimulation untersucht. Es zeigte sich ein ähnlicher zeitlicher Verlauf der Proteinexpression wie für RNase 1 gefunden wurde, was die immunhistochemischen Befunde erhärtet, dass auch RNase 1 in WPB gespeichert ist.

5.4 Klinische Relevanz von RNasen

Wie in der Einleitung genauer beschrieben wurde, haben RNasen bzw. extrazelluläre RNA zudem eine große klinische Relevanz, da ihre Serumkonzentrationen bei diversen Krebsleiden erhöht sind, wie in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden konnte^{20-26,34-37}.

Es liegen vielversprechende Ergebnisse vor, so z.B. der Einsatz von RNasen als mögliche Tumormarker (durch veränderte Glykolyisierungsmuster^{7,8}) sowie als Chemotherapeutika^{14,16,17,50,51} (durch ihre zytotoxische Aktivität) oder das Blockieren von Angiogenin, wodurch eine Antagonisierung von Tumorwachstum und Metastasierung erreicht werden könnte^{27-29,52}.

Auch in diesem Bereich sind noch weiterführende Untersuchungen unerlässlich, um einer großen Anzahl von Krebspatienten durch verbesserte Diagnostik und Therapie helfen zu können.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse dieser Arbeit schlussfolgern, dass RNasen als natürliche Antagonisten von RNA nicht nur eine wichtige Rolle bei der Regulation der Thrombusbildung spielen, sondern in Zukunft auch in der Tumorforschung von großer Bedeutsamkeit sein könnten.

6 Zusammenfassung

6.1 Deutsche Version

In der vorliegenden Arbeit wurden die Expression von RNase 1 und Angiogenin (= RNase 5) auf mRNA- und Proteinebene sowie die RNase-Aktivität in makro- und mikrovaskulären EC mittels RT-PCR, Western Blot und RNase-Aktivitätstest untersucht.

Die Befunde zeigten, dass die RNase 1- und Angiogenin-Expression auf mRNA- und Proteinebene sowie die RNase-Aktivität in makro- und mikrovaskulären EC unterschiedlich ist.

Makrovaskuläre Nabelschnur-EC (HUVEC) exprimieren RNase 1, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene, viel stärker als mikrovaskuläre EC (HBMEC, BMEC) und sezernieren diese hauptsächlich in den Überstand. In HBMEC hingegen ließ sich das Enzym im Zelllysat, aber kaum in den Überständen nachweisen. Im Gegensatz dazu war zu beobachten, dass Angiogenin wesentlich stärker in HBMEC als in HUVEC exprimiert ist und dass es nahezu vollständig in den Überstand sezerniert wird.

Nach 24-stündiger Stimulation der HUVEC und HBMEC mit proinflammatorischen Agenzien (LPS, TNF α), prokoagulatorischen (RNA, Poly IC) und antikoagulatorischen (aktiviertes Protein C, 5-Nitrosoglutathion) Regulatoren sowie Wachstumsfaktoren (VEGF, bFGF) wurde die Expression von RNase 1 und Angiogenin auf mRNA- oder Proteinebene nicht signifikant verändert.

Dagegen bewirkte die Behandlung von HUVEC mit dem anti-angiogen und anti-inflammatorisch wirkenden bakteriellen Faktor Eap eine deutliche Zunahme der RNase 1-Expression in den Überständen bei gleichzeitiger Abnahme der Angiogeninexpression auf Proteinebene, jedoch keine Expressionsänderung auf mRNA-Ebene. Ferner führte die Stimulation mit Thrombin zu einer leichten Abnahme der RNase 1-Expression in HUVEC-Überständen auf Proteinebene.

Die Überprüfung der EC auf ihre RNase-Aktivität zeigte, dass diese in den makrovaskulären HUVEC-Überständen weitaus höher war (> 10-fach) als in den mikrovaskulären EC.

In den Lysaten aller untersuchten EC war kaum RNase-Aktivität detektierbar.

Die von HUVEC sezernierte RNase-Aktivität wurde durch die verwendeten Stimulanzen auf unterschiedliche Weise verändert.

So führte eine 24-stündige Stimulation der HUVEC mit Poly IC, RNA, TNF α sowie Thrombin zu einer beachtlichen Abnahme der RNase-Aktivität in den Überständen, während durch LPS, VEGF, Eap und zyklischem RGD keine signifikante Aktivitätsänderung zu beobachten war. Eine leichte RNase-Aktivitätszunahme zeigte sich nach der Behandlung mit den Wachstumsfaktoren bFGF bzw. bFGF zusammen mit VEGF, eine stärkere Zunahme war zu beobachten durch die Stimulation mit dem antikoagulatorisch wirkenden aktivierten Protein C, dem Aggregations-hemmenden 5-Nitrosoglutathion sowie nach 24 h Hypoxie.

Zusammenfassend lässt sich aus den gezeigten Ergebnissen schlussfolgern, dass die RNase-Aktivität, stärker als die RNase-Expression, unter verschiedenen Bedingungen induzierbar bzw. hemmbar ist. Welche Rolle dies bei physiologischen Prozessen bzw. unter pathologischen Zuständen, wie z.B. bei gesteigerter Thrombusbildung, spielt, bleibt in weiteren Untersuchungen aufzudecken.

6.2 Summary

In the present work the expression of RNase 1 and angiogenin (= RNase 5) on mRNA- and protein level as well as RNase-activity were investigated in micro- and macrovascular EC by RT-PCR, Western blotting and RNase-activity-test.

The results showed that RNase 1- and angiogenin expression on mRNA- and protein level as well as RNase-activity in macro- and microvascular EC are different. Makrovascular EC of umbilical cord (HUVEC) express much more RNase 1 than microvascular EC (HBMEC, BMEC) on both mRNA- and protein level and secrete this enzyme into the supernatant mainly. However, in HBMEC RNase 1 was detected in the celllysates, but hardly in the supernatant. In contrast, angiogenin expression was found to be much stronger in HBMEC than in HUVEC and the majority of this protein was secreted into the supernatant.

After 24 h stimulation of HUVEC and HBMEC with proinflammatory agents (LPS, TNF α), procoagulant (RNA, Poly IC) and anticoagulant (activated protein C, 5-Nitrosoglutathion) regulators as well as growth factors (VEGF, bFGF), no

significant change of RNase 1- or angiogenin expression could be observed on mRNA- or protein level.

Though, treatment of HUVEC with the anti-angiogenic and anti-inflammatory bacterial factor Eap showed a clear increase of RNase 1-expression in the supernatant, whereas a decrease of angiogenin expression was observed at the same time on protein level, without any alteration of expression on mRNA-level. Moreover, stimulation with thrombin led to a moderate decrease of RNase 1-expression in HUVEC-supernatant on protein level.

Investigations on RNase-activity in EC showed that this activity is much higher (> 10-fold) in the macrovascular HUVEC-supernatant than in microvascular EC.

In the celllysates of all tested EC there was almost no RNase-activity detectable.

RNase-activity secreted by HUVEC was modulated by the used agents in different ways.

Thus, 24 h stimulation of HUVEC with Poly IC, RNA, TNF α and thrombin led to a remarkable decrease of RNase-activity in the supernatant, whereas no significant change in activity was observed through treatment with LPS, VEGF, Eap and cyclic RGD. A weak increase of RNase-activity was induced by treatment with the growth factors bFGF and bFGF together with VEGF, stronger increases were observed by stimulations with the anticoagulant activated protein C, by 5-Nitrosoglutathion, which is known to have an anti-aggregatory function as well as after 24 h hypoxia.

Conclusively, the presented results suggest, that RNase-activity, more than RNase-expression is induced and inhibited respectively under different conditions. It remains to be established by further investigations, which role this might play in physiological processes or under pathological states, such as increased thrombus formation.

7 Literaturverzeichnis

1. Pai TW, Su BH, Wu PC, Chang MD, Chang HT, Fan TC, Liu SH.
Unique peptide identification of RNase A superfamily sequences based on reinforced merging algorithms.
J Bioinform Comput Biol. 2006; 4: 75-92.
2. Sorrentino S.
Human extracellular ribonucleases: multiplicity, molecular diversity and catalytic properties of the major RNase types.
Cell Mol Life Sci. 1998; 54: 785-94.
3. Zhang J, Dyer KD, Rosenberg HF.
Human RNase 7: a new cationic ribonuclease of the RNase A superfamily.
Nucleic Acids Res. 2003; 31: 602-7.
4. Yang D, Chen Q, Rosenberg HF, Rybak SM, Newton DL, Wang ZY, Fu Q, Tchernev VT, Wang M, Schweitzer B, Kingsmore SF, Patel DD, Oppenheim JJ, Howard OM.
Human ribonuclease A superfamily members, eosinophil-derived neurotoxin and pancreatic ribonuclease, induce dendritic cell maturation and activation.
J Immunol. 2004; 173: 6134-42.
5. Barnard, EA.
Biological function of pancreatic ribonuclease.
Nature. 1969; 221: 340-4.
6. Landre JB, Hewett PW, Olivot JM, Friedl P, Ko Y, Sachinidis A, Moenner M.
Human endothelial cells selectively express large amounts of pancreatic-type ribonuclease (RNase 1).
J Cell Biochem. 2002; 86: 540-52.
7. Barrabés S, Pagès-Pons L, Radcliffe CM, Tabarés G, Fort E, Royle L, Harvey DJ, Moenner M, Dwek RA, Rudd PM, De Llorens R, Peracaula R.
Glycosylation of serum ribonuclease 1 indicates a major endothelial origin and reveals an increase in core fucosylation in pancreatic cancer.
Glycobiology. 2007; 17: 388-400.
8. Peracaula R, Royle L, Tabares G, Mallorqui-Fernández G, Barrabés S, Harvey DJ, Dwek RA, Rudd PM, de Llorens R.
Glycosylation of human pancreatic ribonuclease: differences between normal and tumor states.
Glycobiology. 2003; 13: 227-44.

9. Rosenberg HF, Domachowske JB.
Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens.
J Leukoc Biol. 2001; 70: 691-8.
10. Durack DT, Ackerman SJ, Loegering DA, Gleich GJ.
Purification of human eosinophil-derived neurotoxin.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1981; 78: 5165-9.
11. Strydom DJ.
The angiogenins.
Cell Mol Life Sci. 1998; 54: 811-24.
12. Harder J, Schroder JM.
RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin.
J Biol Chem. 2002; 277: 46779-84.
13. Zhang J, Dyer KD, Rosenberg HF.
RNase 8, a novel RNase A superfamily ribonuclease expressed uniquely in placenta.
Nucleic Acids Res. 2002; 30: 1169-75.
14. Leland PA, Schultz LW, Kim BM, Raines RT.
Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95: 10407-12.
15. Libonati M.
Biological actions of the oligomers of ribonuclease A.
Cell Mol Life Sci. 2004; 61: 2431-6.
16. Matousek J.
Ribonucleases and their antitumor activity.
Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2001; 129: 175-91.
17. Cafaro V, Bracale A, Di Maro A, Sorrentino S, D'Alessio G, Di Donato A.
New muteins of RNase A with enhanced antitumor action.
FEBS Lett. 1998; 437: 149-52.
18. Fischer S, Gerriets T, Wessels C, Walberer M, Kostin S, Stolz E, Zheleva K, Hocke A, Hippenstiel S, Preissner KT.
Extracellular RNA mediates endothelial-cell permeability via vascular endothelial growth factor.
Blood. 2007; 110: 2457-65.
19. Leland PA, Staniszewski KE, Park C, Kelemen BR, Raines RT.
The ribonucleolytic activity of angiogenin.
Biochemistry. 2002; 41: 1343-50.

20. Shimoyama S, Gansauge F, Gansauge S, Negri G, Oohara T, Beger HG.
Increased angiogenin expression in pancreatic cancer is related to cancer aggressiveness.
Cancer Res. 1996; 56: 2703-6.
21. Shimoyama S, Yamasaki K, Kawahara M, Kaminishi M.
Increased serum angiogenin concentration in colorectal cancer is correlated with cancer progression.
Clin Cancer Res. 1999; 5: 1125-30.
22. Miyake H, Hara I, Yamanaka K, Gohji K, Arakawa S, Kamidono S.
Increased angiogenin expression in the tumor tissue and serum of urothelial carcinoma patients is related to disease progression and recurrence.
Cancer. 1999; 86: 316-24.
23. Eppenberger U, Kueng W, Schlaeppli JM, Roesel JL, Benz C, Mueller H, Matter A, Zuber M, Luescher K, Litschgi M, Schmitt M, Foekens JA, Eppenberger-Castori S.
Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independently define high- and low-risk subsets of node-negative breast cancer patients.
J Clin Oncol. 1998; 16: 3129-36.
24. Chopra V, Dinh TV, Hannigan EV.
Angiogenin, interleukins, and growth-factor levels in serum of patients with ovarian cancer: correlation with angiogenesis.
Cancer J Sci Am. 1996; 2: 279-85.
25. Ugurel S, Rapp G, Tilgen W, Reinhold U.
Increased serum concentration of angiogenic factors in malignant melanoma patients correlates with tumor progression and survival.
J Clin Oncol. 2001; 19: 577-83.
26. Shimoyama S, Kaminishi M.
Angiogenin in sera as an independent prognostic factor in gastric cancer.
J Cancer Res Clin Oncol. 2003; 129: 239-44.
27. Olson KA, Byers HR, Key ME, Fett JW.
Inhibition of prostate carcinoma establishment and metastatic growth in mice by an antiangiogenin monoclonal antibody.
Int J Cancer. 2002; 98: 923-9.
28. Olson KA, Fett JW, French TC, Key ME, Vallee BL.
Angiogenin antagonists prevent tumor growth in vivo.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92: 442-6.
29. Olson KA, French TC, Vallee BL, Fett JW.
A monoclonal antibody to human angiogenin suppresses tumor growth in athymic mice.
Cancer Res. 1994; 54: 4576-9.

30. Ghosh KS, Maiti TK, Dasgupta S.
Green tea polyphenols as inhibitors of ribonuclease A.
Biochem Biophys Res Commun. 2004; 325: 807-11.
31. Maiti TK, Chatterjee J, Dasgupta S.
Effect of green tea polyphenols on angiogenesis induced by an angiogenin-like protein.
Biochem Biophys Res Commun. 2003; 308: 64-7.
32. Nakazawa F, Kannemeier C, Shibamiya A, Song Y, Tzima E, Schubert U, Koyama T, Niepmann M, Trusheim H, Engelmann B, Preissner KT.
Extracellular RNA is a natural cofactor for the (auto-)activation of Factor VII-activating protease (FSAP).
Biochem J. 2005; 385: 831-8.
33. Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, Markart P, Song Y, Tzima E, Kennerknecht E, Niepmann M, von Bruehl ML, Sedding D, Massberg S, Günther A, Engelmann B, Preissner KT.
Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104: 6388-93.
34. Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M.
Circulating nucleic acids in plasma or serum.
Clin Chim Acta. 2001; 313: 143-6.
35. Johnson PJ, Lo YM.
Plasma nucleic acids in the diagnosis and management of malignant disease.
Clin Chem. 2002; 48: 1186-93.
36. Chan AK, Chiu RW, Lo YM; Clinical Sciences Reviews Committee of the Association of Clinical Biochemists.
Cell-free nucleic acids in plasma, serum and urine: a new tool in molecular diagnosis.
Ann Clin Biochem. 2003; 40: 122-30.
37. Anker P, Stroun M.
Progress in the knowledge of circulating nucleic acids: plasma RNA is particle-associated. Can it become a general detection marker for a cancer blood test?
Clin Chem. 2002; 48: 1210-1.
38. Tsui NB, Ng EK, Lo YM.
Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma.
Clin Chem. 2002; 48: 1647-53.

39. Stins MF, Gilles F, Kim KS.
Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells.
J Neuroimmunol. 1997; 76: 81-90.
40. Sobke AC, Selimovic D, Orlova V, Hassan M, Chavakis T, Athanasopoulos AN, Schubert U, Hussain M, Thiel G, Preissner KT, Herrmann M.
The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* abrogates angiogenic responses of endothelial cells by blocking Ras activation.
FASEB J. 2006; 20: 2621-3.
41. Athanasopoulos AN, Economopoulou M, Orlova VV, Sobke A, Schneider D, Weber H, Augustin HG, Eming SA, Schubert U, Linn T, Nawroth PP, Hussain M, Hammes HP, Herrmann M, Preissner KT, Chavakis T.
The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms.
Blood. 2006; 107: 2720-7.
42. Pinsky DJ, Naka Y, Liao H, Oz MC, Wagner DD, Mayadas TN, Johnson RC, Hynes RO, Heath M, Lawson CA, Stern DM.
Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies. A mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation.
J Clin Invest. 1996; 97: 493-500.
43. Fiedler U, Scharpfenecker M, Koidl S, Hegen A, Grunow V, Schmidt JM, Kriz W, Thurston G, Augustin HG.
The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies.
Blood. 2004; 103: 4150-6.
44. Rondaj MG, Bierings R, Kragt A, van Mourik JA, Voorberg J.
Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006; 26: 1002-7.
45. Kaufmann JE, Oksche A, Wollheim CB, Gunther G, Rosenthal W, Vischer UM.
Vasopressin-induced von Willebrand factor secretion from endothelial cells involves V2 receptors and cAMP.
J Clin Invest. 2000; 106: 107-16.
46. Matsushita K, Yamakuchi M, Morrell CN, Ozaki M, O'Rourke B, Irani K, Lowenstein CJ.
Vascular endothelial growth factor regulation of Weibel-Palade-body exocytosis.
Blood. 2005; 105: 207-14.

47. Subramanian V, Crabtree B, Acharya KR.
Human angiogenin is a neuroprotective factor and amyotrophic lateral sclerosis associated angiogenin variants affect neurite extension/pathfinding and survival of motor neurons.
Hum Mol Genet. 2008; 17: 130-49.
48. Huang L, Guo H, Cheng M, Zhao Y, Jin X.
The kinetic change of the serum angiogenin level in patients with acute cerebral infarction.
Eur Neurol. 2007; 58: 224-7.
49. Weibel Er, Palade Ge.
New cytoplasmic components in arterial endothelia.
J Cell Biol. 1964; 23: 101-12.
50. Monti DM, D'Alessio G.
Cytosolic RNase inhibitor only affects RNases with intrinsic cytotoxicity.
J Biol Chem. 2004; 279: 39195-8.
51. Erickson HA, Jund MD, Pennell CA.
Cytotoxicity of human RNase-based immunotoxins requires cytosolic access and resistance to ribonuclease inhibition.
Protein Eng Des Sel. 2006; 19: 37-45.
52. Fett JW, Olson KA, Rybak SM.
A monoclonal antibody to human angiogenin. Inhibition of ribonucleolytic and angiogenic activities and localization of the antigenic epitope.
Biochemistry. 1994; 33: 5421-7.
53. Hartmann A, Kunz M, Kostlin S, Gillitzer R, Toksoy A, Brocker EB, Klein CE.
Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin in human malignant melanoma.
Cancer Res. 1999; 59: 1578-83.
54. Weickmann JL, Glitz DG.
Human ribonucleases. Quantitation of pancreatic-like enzymes in serum, urine, and organ preparations.
J Biol Chem. 1982; 257: 8705-10.
55. Beintema JJ.
Introduction: the ribonuclease A superfamily.
Cell Mol Life Sci. 1998; 54: 763-5.
56. Beintema JJ, Kleinedam RG.
The ribonuclease A superfamily: general discussion.
Cell Mol Life Sci. 1998; 54: 825-32.

8 Liste der verwendeten Abkürzungen

- APS Ammoniumpersulfat
- BCA Bicinchoninic acid
- BMEC Brain Microvascular Endothelial Cells (of the pig)
- bp Basenpaare
- BREC Bovine Retinal Endothelial Cells
- BSA bovines Serumalbumin
- BS-RNase Bovine seminal RNase
- cDNA complementary Desoxyribonucleic acid
- DAPI 4,6-diamidino-2-Phenylindol
- DEPC Diethylpyrocarbonate
- dd doppelt destilliert
- DMSO Dimethylsulfoxid
- dNTP Desoxyribonukleosidtriphosphate
- DTT Dithiothreitol
- EAP Extracellular adherence protein
- EC Endothelzelle
- ECL Enhanced Chemiluminescence
- EDTA Ethylendeamintetraacetat
- FCS fetales Kälberserum
- hbFGF human basic Fibroblast Growth Factor
- HBMEC Human Brain Microvascular Endothelial Cells
- HBS Hepes buffered saline
- HC Hydrocortison
- hEGF human Epidermal Growth Factor
- HRP horseradish peroxidase
- HUVEC Human Umbilical Vein Endothelial Cells
- kDa Kilodalton
- LDH Laktatdehydrogenase
- LPS Lipopolysaccharid
- µg Mikrogramm

- μl Mikroliter
- M Molar
- mA Milliamper
- mg Milligramm
- ml Milliliter
- ng Nanogramm
- nm Nanometer
- OD optische Dichte
- PBS Phosphate buffered saline
- PCR Polymerase Chain Reaction
- PMA Phorbolmyristataacetat
- POD Peroxidase
- Poly C Polycytidylic acid
- Poly IC Polyinosinic- Polycytidylic acid
- PVDF Polyvinylidenfluorid
- RI RNase Inhibitor
- RMVEC Rat Microvascular Endothelial Cells
- RNA Ribonucleic acid
- RNase A Ribonuklesae A
- RT reverse Transkription
- SDS Sodium dodecyl sulfate
- Stabw Standardabweichung
- TAE Tris-Acetat-EDTA
- TBS Tris-buffered-saline
- TBS-T Tris-buffered-saline-Tween
- Temed N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
- TNF α Tumor Nekrose Faktor α
- VEGF Vascular Endothelial Growth Factor
- VM Vollmedium
- vWF von Willebrand Faktor
- WPB Weibel-Palade-Bodies

9 Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.

Sara Dadkhahi

10 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

10.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Vergleich der Aminosäuresequenz aller RNase A-Superfamilienmitglieder	8
Abbildung 2	Die phylogenetische Verwandtschaft der Mitglieder der humanen RNase A-Superfamilie.	9
Abbildung 3	Die chromosomale Lokalisation der acht humanen RNase A-Gene. .	9
Abbildung 4	Kristalliner Komplex aus RNase-Inhibitor und boviner RNase A ..	11
Abbildung 5	Struktur des Angiogenins.....	14
Abbildung 6	Morphologie von HUVEC, 100-fache Vergrößerung.	26
Abbildung 7	Morphologie von HBMEC, 100-fache Vergrößerung.....	27
Abbildung 8	Morphologie von BMEC, 100-fache Vergrößerung.....	27
Abbildung 9	Schematische Darstellung der Farbumschlagsreaktion im LDH-Zytotoxizitätstest.....	33
Abbildung 10	Schema des Western Blot- Sandwiches.....	37
Abbildung 11	Schema der Antikörper- und ECL-Reaktion	39
Abbildung 12	Schematische Darstellung des PCR-Zyklus	44
Abbildung 13	Photometrische Bestimmung der Zytotoxizität der verwendeten Stimulanzen	46
Abbildung 14	Western Blot Analyse zum Nachweis der RNase 1- und Angiogenin-Expression in HUVEC, HBMEC und BMEC.	47
Abbildung 15	Western Blot Analyse zum Nachweis der RNase 1- und Angiogenin-Expression in HUVEC-Lysaten und -Überständen nach jeweils 24 h Stimulationszeit (1).	48
Abbildung 16	Western Blot Analyse zum Nachweis der RNase 1- und Angiogenin-Expression in HUVEC-Lysaten und -Überständen nach jeweils 24 h Stimulationszeit (2).....	49
Abbildung 17	Western Blot Analyse zum Nachweis der RNase 1- und Angiogenin-Expression in HUVEC-Lysaten und -Überständen nach jeweils 24 h Stimulationszeit (3).	50
Abbildung 18	Western Blot Analyse zum Nachweis der RNase 1- und Angiogenin-Expression in HUVEC-Überständen nach jeweils 24 h Stimulationszeit.....	51
Abbildung 19	Western Blot Analyse zum Nachweis der RNase 1- und Angiogenin-Expression in HBMEC-Überständen nach jeweils 24 h Stimulationszeit.....	52
Abbildung 20	Western Blot Analyse zum Nachweis der RNase 1- und P-Selectinexpression in HUVEC-Lysaten und -Überständen nach PMA-Stimulation in einer Zeitkinetik.	53
Abbildung 21	Western Blot Analyse zum Nachweis der RNase 1- und Angiogenin-Expression in HUVEC-Lysaten und -Überständen nach Vasopressin-Stimulation in einer Zeitkinetik.	54
Abbildung 22	Expressionsanalyse von RNase 1 in Endothelzellen. Temperaturoptimierung der PCR-Reaktion zur Amplifikation der RNase 1.	55

Abbildung 23	Expressionsanalyse von RNase 1 in Endothelzellen. Zyklusoptimierung.....	55
Abbildung 24	Expressionsanalyse von Angiogenin in Endothelzellen. Temperaturoptimierung der PCR-Reaktion zur Amplifikation des Angiogenins.....	56
Abbildung 25	Expressionsanalyse von Angiogenin in Endothelzellen. Zyklusoptimierung der PCR-Reaktion zur Amplifikation des Angiogenins.....	56
Abbildung 26	Nachweis von RNase 1- und Angiogenin-mRNA in HUVEC und HBMEC.....	57
Abbildung 27	Nachweis von RNase 1- und Angiogenin-mRNA in HUVEC nach jeweils 24 h Stimulationszeit (1).....	58
Abbildung 28	Nachweis von RNase 1- und Angiogenin-mRNA in HUVEC nach jeweils 24 h Stimulationszeit (2).....	59
Abbildung 29	Nachweis von RNase 1- und Angiogenin-mRNA in HUVEC nach jeweils 24 h Stimulationszeit (3).....	60
Abbildung 30	Nachweis von RNase 1-mRNA in HUVEC nach jeweils 24 h Stimulationszeit.....	61
Abbildung 31	Nachweis von RNase 1- und Angiogenin-mRNA in HBMEC nach jeweils 24 h Stimulationszeit.....	62
Abbildung 32	A: RNase-Aktivität in Überständen von HUVEC im Vergleich zu HBMEC- und BMEC-Überständen. B: RNase-Aktivität in Überständen von HUVEC im Vergleich zu BREC- und RMVEC- Überständen.....	63
Abbildung 33	RNase-Aktivität im Lysat und Überstand von makrovaskulären HUVEC im Vergleich.....	64
Abbildung 34	RNase-Aktivität von mikrovaskulären Endothelzellen in Lysat und Überstand. A: HBMEC, B: BMEC.....	65
Abbildung 35	RNase-Aktivität im Lysat von HUVEC, HBMEC, BMEC.....	66
Abbildung 36	RNase-Aktivität in HUVEC-Kontroll-Überstand und nach Zugabe von RNase- Inhibitor bzw. Angiogenin-Antikörper.....	67
Abbildung 37	RNase-Aktivität in HUVEC Überständen nach jeweils 24 h Stimulationszeit (1).....	68
Abbildung 38	RNase-Aktivität in HUVEC Überständen nach jeweils 24 h Stimulationszeit (2).....	69
Abbildung 39	RNase-Aktivität in HUVEC- Überständen nach Behandlung mit PMA, TNF α und Thrombin in einer Zeitkinetik.....	70
Abbildung 40	RNase-Aktivität in HUVEC- Überständen nach Behandlung mit Vasopressin in einer Zeitkinetik.....	71
Abbildung 41	RNase-Aktivität in HUVEC-Überständen nach Behandlung mit Cycloheximid, TNF α und Cycloheximid zusammen mit TNF α in einer Zeitkinetik.....	72
Abbildung 42	RNase-Aktivität in HUVEC-Überständen nach Behandlung mit drei verschiedenen Konzentrationen von aktiviertem Protein C in einer Zeitkinetik.....	73
Abbildung 43	RNase-Aktivität in HUVEC-Überständen nach Behandlung mit zwei verschiedenen Konzentrationen von 5-Nitrosoglutathion in einer Zeitkinetik.....	74
Abbildung 44	Immuncytochemischer Nachweis von RNase 1, Angiogenin und von Willebrand Faktor in HUVEC.....	75

Abbildung 45 Immuncytochemischer Nachweis der Kolo­kalisierung von RNase 1 mit von Willebrand Faktor in HUVEC.	76
Abbildung 46 Immuncytochemischer Nachweis der Kolo­kalisierung von Angiogenin mit von Willebrand Faktor in HUVEC.	77

10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	17
Tabelle 2 Verwendete Puffer und Lösungen.....	20
Tabelle 3 Verwendete Zellmedien.....	22
Tabelle 4 Verwendete Kits.....	23
Tabelle 5 Verwendete Antikörper.....	23
Tabelle 6 Verwendete Primer.....	24
Tabelle 7 Zusammensetzung des Lysis­puffers.....	34
Tabelle 8 Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels, je für zwei Gele.....	36
Tabelle 9 Pipettierschema des RNA-Primer-Mixes.....	42
Tabelle 10 Pipettierschema des Mastermixes.....	42
Tabelle 11 Pipettierschema für die PCR.....	43
Tabelle 12 Wirkung der verwendeten Stimulanzen auf die RNase-Aktivität HUVEC.....	69

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all jenen bedanken, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und durch ihre moralische Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. K. T. Preissner danke ich dafür, dass er mich in sein Team aufgenommen und mir somit die Möglichkeit gegeben hat, die interessante Erfahrung mit Forschungsarbeit gemacht zu haben.

Bei Dr. Silvia Fischer möchte ich mich für die nette Betreuung dieser Arbeit, die Bereitstellung des Themas sowie ihre Unterstützung und Bemühungen, besonders auch im schriftlichen Teil der Arbeit bedanken.

Ein großer Dank gilt weiterhin Dr. Aya Shibamiya, die mir stets eine wichtige Ansprechpartnerin war und durch ihre Hilfe, besonders am PC, einen großen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet hat. Ich bin sehr glücklich darüber, sie kennengelernt zu haben und danke ihr für unsere Freundschaft.

Susanne Tannert-Otto danke ich für die Einarbeitung und dafür, stets ein offenes Ohr für mich gehabt zu haben, eine bessere Tischnachbarin hätte ich mir nicht wünschen können.

Bei Dr. Karin Hersemeyer bedanke ich mich für die Mitarbeit an den immunhistochemischen Bildern (zusammen mit Dr. Aya Shibamiya und Dr. Silvia Fischer) und ihre Hilfestellung beim schriftlichen Teil der Arbeit. Die langjährige Zusammenarbeit mit ihr als studentische Hilfskraft hat mir großen Spaß bereitet.

Außerdem möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe, insbesondere Uwe Schubert, Thomas Schmidt-Wöll, Özgür Uslu, Bärbel Fühler, Dr. Malgorzata Wygrecka, Lars Muhl, Markus Queisser und Antje Kirsten bedanken, die ich bei alltäglich Laborproblemen jederzeit um Hilfe bitten konnte.

Ein ganz besonderer Dank gilt schließlich meinen Eltern, die mir durch ihre ununterbrochene Unterstützung, Motivation und Liebe einen wichtigen Halt im Leben schenken.

12Lebenslauf

Persönliche Daten:

- Name: Dadkhahi
- Vorname: Sara
- Geburtsdatum: 16.10.1980
- Geburtsort: Teheran/ Iran
- Einreise nach Deutschland: Oktober 1988

Ausbildung:

- 1986-1988: 1. und 2. Grundschulklasse in Teheran/ Iran
- 1988-1991: Grundschule (Goetheschule, Gießen)
- 1991-2000: Gesamtschule mit gymnasialer Oberstufe (Ricarda-Huch-Schule, Gießen)
- Juni 2000: Abitur (Note: 1,3)
- Okt. 2000: Beginn des Medizinstudiums an der Justus-Liebig-Universität Gießen
- 09.09.2002: Ärztliche Vorprüfung
- 28.08.2003: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 08.09.2005: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- Okt. 2005 – Sept. 2006: Promotionsarbeit im biochemischen Institut der Justus- Liebig- Universität Gießen unter Anleitung von Prof. Preissner
- Okt. 2006 – Sept. 2007: Praktisches Jahr:
 - 1.Tertial: Chirurgie (Lehrkrankenhaus Bad Hersfeld)
 - 2.Tertial: Pädiatrie (Uniklinik Gießen)
 - 3.Tertial: Innere Medizin (Uniklinik Gießen)
- 25.10.2007: Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Gesamtnote: 1,83)