

Das vaskuläre RNA/RNase-System:

Funktionelle Aktivität synthetischer Nukleinsäuren und
extrazelluläre RNase 1 als neuer vaskulärer Regulator



INAUGURAL-DISSERATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

im Fachbereich 08: Biologie und Chemie

an der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl.-Biologin Julia Gansler

aus Pohlheim

Gießen, im März 2012

1. Gutachter:

Professor Dr. Alfred Pingoud

Institut für Biochemie
Fachbereich Biologie und Chemie
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter:

Professor Dr. Klaus T. Preissner

Institut für Biochemie
Fachbereich Medizin
Justus-Liebig-Universität Gießen

3. Prüfer:

Professor Dr. Adriaan Dorresteyn

Institut für Allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie
Fachbereich Biologie und Chemie
Justus-Liebig-Universität Gießen

4. Prüfer:

Professor Dr. Veronika Grau

Sektion Experimentelle Chirurgie
Klinik für Allgemeine und Thoraxchirurgie
Fachbereich Medizin
Justus-Liebig-Universität Gießen

Für meinen Vater und meine Familie.

*„It's been a long night,
Trying to find my way.
Been thru the darkness,
Now I finally have my day.
And I will see my dream come alive at last.
I will touch the sky. (...)
I'm going where my heart will take me.
I've got faith to believe.
I can do anything.“*

Russel Watson „Faith of the heart“

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	IV
ERKLÄRUNG	VIII
ZUSAMMENFASSUNG	IX
SUMMARY	XI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Hämostase	1
1.1.1 Primäre Hämostase (Thrombozytenaktivierung)	1
1.1.2 Sekundäre Hämostase	2
1.1.3 Der intrinsische Gerinnungsweg	6
1.2 Extrazelluläre Nukleinsäuren	9
1.2.1 Einfluss extrazellulärer RNA auf die Koagulation	10
1.2.2 Einfluss extrazellulärer RNA auf die vaskuläre Integrität	12
1.2.3 Aptamere	13
1.2.4 Weitere Interaktionen von extrazellulärer RNA mit Proteinen	14
1.2.4.1 Faktor-VII-aktivierende-Protease	14
1.2.4.2 Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1	15
1.2.4.3 Plättchenfaktor 4	15
1.3 Koagulation und Inflammation	17
1.3.1 Einfluss koagulatorischer Proteine auf die Inflammation	17
1.3.2 Einfluss inflammatorischer Prozesse auf die Koagulation	17
1.3.3 Tumornekrosefaktor α	18
1.4 Ribonukleasen	20
1.4.1 Die RNase A-Superfamilie	20
1.4.2 RNase 1.....	23
1.4.2.1 Expression.....	23
1.4.2.2 Dreidimensionale Struktur und katalytischer Mechanismus	24
1.4.2.3 Ribonuklease Inhibitor.....	26
1.4.2.4 RNase 1 unter pathologischen und inflammatorischen Bedingungen	27

2	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	30
3	MATERIAL UND METHODEN	32
3.1	Chemikalien und Geräte	32
3.1.1	Chemikalien, Enzyme und Kits.....	32
3.1.2	Geräte und sonstige Materialien	35
3.1.3	Antikörper	37
3.1.4	Oligonukleotide für Gerinnungsversuche	38
3.2	Zellkulturtechnische Methoden	38
3.2.1	Einführung in die verwendeten Zelltypen	38
3.2.1.1	HUVEC (human umbilical vein endothelial cells).....	38
3.2.2	Kultivierung von Zellen.....	39
3.2.3	Isolierung von primären Endothelzellen aus der Nabelschnurvene	39
3.2.4	Einfrieren der Zellen (Kryokonservierung)	40
3.2.5	Auftauen der Zellen.....	41
3.2.6	Bestimmung der Zellanzahl.....	41
3.2.7	Stimulation und Ernten der Zellen	41
3.2.8	Zytotoxizitätstest	42
3.2.9	Transfektion von Zellen mit siRNA	42
3.3	Molekularbiologische Methoden	43
3.3.1	RNA-Isolation aus Zellüberständen.....	43
3.3.2	RNA-Isolation aus Zell-Lysaten.....	44
3.3.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	44
3.3.4	Biotinylierung von isolierter RNA.....	45
3.3.5	„Dot-Blot“-Analyse.....	45
3.3.6	cDNA-Synthese	46
3.3.7	Semi-quantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	47
3.3.8	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	48
3.3.9	Agarose-Gelelektrophorese von RNA	49
3.3.10	Quantitative Real-time PCR	49
3.4	Proteinbiochemische Methoden	51
3.4.1	Herstellung von Zell-Lysaten.....	51
3.4.2	Konzentrierung von Zellüberständen.....	51
3.4.3	Proteinbestimmung	51
3.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	52

3.4.5	Western Blot-Analyse	53
3.4.6	Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie	55
3.4.7	Analyse der Bindung von Nukleinsäuren an Proteine.....	56
3.5	Analyse der Aktivität von Ribonukleasen (RNasen)	57
3.5.1	RNase-Aktivitätstest.....	57
3.5.2	In-Gel-Zymographie	58
3.6	Bestimmung der Gerinnungsaktivität	58
3.6.1	Herstellung von Plasma	58
3.6.2	Analyse der Stabilität von Oligonukleotiden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	58
3.6.3	Turbidimetrie.....	59
3.6.4	Analyse der Präkallikrein-Autoaktivierung	60
3.7	Statistische Analyse.....	61
4	ERGEBNISSE.....	62
4.1	Strukturelle Voraussetzungen für die prokoagulatorische Aktivität von Nukleinsäuren.....	62
4.1.1	Stabilität von RNA- und DNA-Oligonukleotiden in humanem Plasma.....	62
4.1.2	Prokoagulatorische Aktivität von RNA- und DNA-Oligonukleotiden	64
4.1.3	Prokoagulatorische Aktivität von verschiedenen DNA-Haarnadel-Strukturen ...	66
4.1.4	Bindung von DNA-Oligonukleotiden an verschiedene Proteine des Gerinnungssystems	68
4.1.5	Prokoagulatorische Aktivität von DNA-Aptameren	70
4.1.6	Interaktion von Plättchenfaktor 4 (PF4) und Nukleinsäuren.....	72
4.2	Expression von RNase1 unter inflammatorischen Bedingungen	74
4.2.1	Einfluss von proinflammatorischen Substanzen auf die RNase 1-Expression in HUVEC	74
4.2.2	Analyse des TNF α -Signalweges	78
4.2.3	Einfluss von RNase 1 auf Zell-Zell-Kontakte	82
5	DISKUSSION	85
5.1	Die prokoagulatorische Aktivität von Oligonukleotiden in Abhängigkeit zu ihrer Sekundärstruktur.....	85
5.1.1	Analyse der prokoagulatorischen Aktivität verschiedener synthetischer DNA- und RNA-Oligonukleotide	85
5.1.2	Bindungsaffinitäten verschiedener synthetischer DNA-Oligonukleotide zu Proteinen des intrinsischen Gerinnungsweges.....	87

5.1.3	Analyse der prokoagulatorischen Aktivität verschiedener Nukleinsäureaptamere	89
5.2	Regulation der prokoagulatorischen Aktivität von Nukleinsäuren durch basische Proteine.....	91
5.3	Regulation des RNA/RNase-Systems: Einfluss von proinflammatorischen Mediatoren auf die RNase 1-Expression.....	92
5.3.1	Einfluss proinflammatorischer Substanzen auf die Expression und Sekretion von RNase 1 und Ribonuklease Inhibitor	93
5.3.2	Einfluss einer verminderten Expression von RNase 1 auf die Integrität von Zell-Zell-Verbindungen.....	93
5.3.3	Analyse der an der RNase 1-Expression beteiligten Signaltransduktionswege	94
LITERATURVERZEICHNIS		97
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....		117
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....		122
TABELLENVERZEICHNIS		124
LEBENS LAUF		125
DANKSAGUNG		129

Erklärung

Ich erkläre: Ich, Julia Gansler (geb. 22.07.1983 in Erbach), habe die vorgelegte Dissertation selbständig und 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 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.

Gießen, den 23. März 2012

Zusammenfassung

Extrazelluläre Ribonukleinsäuren (RNA), vor allem freigesetzt als Folge von Gewebsverletzungen, wurden von unserer Arbeitsgruppe als prokoagulatorischer und proinflammatorischer Faktor im vaskulären System identifiziert. Hierbei dient RNA einerseits über die Bindung an Proteine des intrinsischen Gerinnungsweges (Faktor XI, Faktor XII, Präkallikrein, hochmolekulares Kininogen) als effizienter Kofaktor für deren Autoaktivierung und führt zur Ausbildung eines stabilen Thrombus. Andererseits induziert extrazelluläre RNA über die Aktivierung des vaskulär-endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (VEGF-R2) den Anstieg des intrazellulären Kalzium-Spiegels. Dies resultiert in einer Hyperpermeabilität des Endothels und der Ausbildung zerebraler Ödeme *in vivo*. Diese Effekte wurden *in vivo* durch die Applikation von Ribonuklease 1 (RNase 1), aber nicht mit Desoxyribonuklease (DNase), in entsprechenden Tiermodellen signifikant blockiert.

Bislang gab es keine Hinweise, ob spezifische Strukturmerkmale für die physiologischen Effekte extrazellulärer Nukleinsäuren verantwortlich sind. Daher wurde in der hier vorliegenden Arbeit die prokoagulatorische Aktivität und die Stabilität verschiedener synthetischer Desoxyribonukleinsäure- (DNA) und RNA-Oligonukleotide in humanem Plasma sowie in isolierten Systemen in Abhängigkeit zu strukturellen Charakteristika untersucht. Hierbei waren Oligonukleotide mit stabiler Haarnadelsekundärstruktur (1) stärker vor der Degradierung durch Nukleasen geschützt, (2) effiziente Kofaktoren bei der Auto-Aktivierung von Präkallikrein im isolierten System und (3) prokoagulatorisch in humanem Plasma. Über Bindungsexperimente mit verschiedenen DNA-Oligonukleotiden wurden die stärksten Wechselwirkungen zwischen prokoagulatorisch aktiven Haarnadelstrukturen und hochmolekularem Kininogen ($K_D=1,82 \mu\text{M}$), einem nicht-enzymatischen Kofaktor bei der Aktivierung von Präkallikrein und Faktor XI, charakterisiert. Ebenso zeigten synthetische, therapeutisch verwendete Nukleinsäuren (Aptamere) deutliche prokoagulatorische Eigenschaften. Die systemische Applikation von Aptameren könnte somit von thrombotischen und inflammatorischen Komplikationen begleitet werden.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass kurze Haarnadel-enthaltende Nukleinsäurestrukturen über die spezifische Bindung an Kininogen die Aktivierung des intrinsischen Gerinnungsweges vermitteln können. Dies erweitert unsere Kenntnisse bezüglich der Interaktion zwischen Gerinnungsproteinen und Nukleinsäuren, die bisher lediglich auf deren Größe und negative Ladung zurückgeführt wurden.

In diesem Zusammenhang wurde Plättchenfaktor 4 (PF4), ein basisches Chemokin, das bei der Aktivierung von Thrombozyten aus den α -Granula freigesetzt wird, als neues Nukleinsäure-bindendes Protein identifiziert. Aufgrund seiner starken Bindung an zelluläre und synthetische Nukleinsäuren neutralisiert PF4 deren prokoagulatorische Aktivität und beeinflusst somit als neuer Regulator das Ausmaß der intrinsischen Blutgerinnung.

Zirkulierende RNasen erfüllen als effiziente Gegenspieler der verschiedenen durch extrazelluläre RNA initiierten Prozesse im Gefäßsystem protektive Aufgaben. Hierbei ist insbesondere die Regulation der in Endothelzellen exprimierten RNase 1 unter inflammatorischen und prokoagulatorischen Bedingungen von Bedeutung. Eine signifikante Verminderung der RNase 1-Expression im Endothel wurde nach Stimulation mit Tumornekrosefaktor α (TNF α) oder Thrombin detektiert, während Lipopolysaccharide keinen Effekt hatten. Der Einfluss der Agonisten war dabei reversibel, sodass die Expression von RNase 1 nach Entfernen des Stimulus wiederhergestellt wurde.

Die Herunterregulation von RNase 1 durch TNF α oder RNase 1-siRNA bewirkte eine Zunahme der endothelialen Permeabilität, da das unter Kontrollbedingungen in den *adherens junctions* exprimierte VE-Cadherin eine veränderte, teilweise cytosolische Lokalisierung zeigte. Die Analyse der beteiligten Signalwege, die zur Erniedrigung der RNase 1 Expression nach TNF- α -Behandlung in Endothelzellen führte, schloss einen NF κ B-abhängigen Regulationsmechanismus aus. Vielmehr implizierte die Wiederherstellung der RNase 1-Expression durch Inhibierung der Histondeacetylasen mit Trichostatin A, dass die TNF- α -bedingte erniedrigte Expression von RNase 1 über Veränderungen im Acetylierungsstatus beteiligter Proteine reguliert wird.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine genaue Regulation des RNA/RNase 1-Gleichgewichtes auf mRNA wie auch auf Proteinebene eine wichtige Rolle bei der Homöostase des vaskulären Systems spielt.

Summary

Extracellular ribonucleic acid (RNA), released particularly after tissue or vessel damage, was identified by our group as new procoagulant and proinflammatory mediator in the vascular system. RNA serves as an efficient cofactor for the auto-activation of the proteins of the intrinsic coagulation pathway (factor XI, XII, prekallikrein, high molecular weight kininogen), thereby promoting stable clot formation. Furthermore, extracellular RNA increases endothelial permeability in a vascular endothelial growth factor (VEGF)-dependent manner, resulting in enhanced cerebral edema formation *in vivo*. Both effects were significantly inhibited *in vivo* by the application of ribonuclease 1 (RNase 1) but not deoxyribonuclease (DNase) in respective pathogenic animal models.

In the present study the structure-function relations of extracellular nucleic acids were characterized particularly with respect to their coagulant activities. Therefore, different deoxyribonucleic acid (DNA)- and RNA-oligonucleotides, representing diverse secondary structures, were included in the analysis. The results implicate that oligonucleotides forming a stable hairpin structure (1) are better protected against the degradation by nucleases, (2) serve as efficient cofactors for the auto-activation of prekallikrein in isolated systems and (3) act as potent procoagulant cofactors in human plasma. Binding experiments with different DNA-oligonucleotides revealed specific interactions between procoagulant hairpin forming structures and high molecular weight kininogen ($K_D=1,82 \mu\text{M}$), a non-enzymatic cofactor for the activation of prekallikrein and factor XI. Prominent procoagulant activities were also seen for therapeutically used nucleic acids, so called aptamers. Thus, a systemic application of these compounds could be accompanied by thrombotic or inflammatory side effects. These results implicate that nucleic acids, forming stable hairpin structures, promote the activation of the intrinsic coagulation pathway via specific binding to kininogen. This extends our knowledge of the interaction between coagulation proteins and nucleic acids, which was thought so far to depend solely on their size and negative charge.

Platelet factor 4 (PF4), a basic chemokine, which is released from the α -granules of activated platelets, was identified as new nucleic acid binding protein. Based on this interaction, PF4 neutralises the procoagulant activity of cellular as well as artificial nucleic acids in a dose-dependent manner, thereby representing a new regulator of the procoagulant functions of extracellular nucleic acids.

Circulating RNases, expressed in endothelial cells, represent the natural counterpart of extracellular RNA in the vascular system. In this context, the regulation of the vascular RNase 1 under inflammatory and coagulant conditions was of particular interest. A long-term treatment of human endothelial cells with tumor necrosis factor α (TNF α) or thrombin revealed a significant down-regulation of RNase 1 mRNA and activity. Stimulation with lipopolysaccharids had no effect. Analysis of the endothelial barrier function revealed that the down-regulation of RNase 1 by TNF- α as well as the application of RNase 1-siRNA increased the permeability of the endothelial monolayer as demonstrated by rearrangement of the VE-cadherin distribution and disintegration of cellular contacts in the adherence junctions. Mechanistically, the TNF- α -induced decrease of RNase 1 expression was independent of the activation of NF κ B. Yet, inhibition of histone deacetylases by trichostatin A recovered RNase 1 expression and secretion, indicating an acetylation-dependent regulation process. Furthermore, a depletion of the TNF- α -stimulus induced a recovery of RNase 1 expression and release in a time-dependent manner, indicative for a reversible process.

These results demonstrate a down-regulation of RNase 1 on mRNA and protein level by several inflammatory stimuli including TNF- α , which is mediated by changes of the acetylation status. Consequently, an exact regulation of the RNA/RNase 1 balance on mRNA as well as on protein level plays an important role in the homeostasis of the vascular system.

1 Einleitung

1.1 Hämostase

Die Hämostase ist definiert als die Summe aller physiologischen Prozesse, die zum Stillstand einer Blutung führen. Das wird ermöglicht durch ein komplexes Zusammenspiel von löslichen und zellgebundenen Blutgerinnungs- und Fibrinolysefaktoren mit zellulären Blutkomponenten wie Thrombozyten, sowie der Gefäßwand. Eine Gefäßverletzung führt durch die Initiierung primärer Hämostaseprozesse zur Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten, der Ausbildung eines primären Wundverschlusses und der Bereitstellung thrombozytärer Wachstums- und Regenerierungsfaktoren. Gleichzeitig ermöglicht die Aktivierung plasmatischer Gerinnungsfaktoren während der sekundären Hämostase die Produktion von Fibrin, welches den primären Wundverschluss stabilisiert. Somit stellt die Hämostase einen lebenswichtigen Abwehr- und Reparaturprozess dar, der übermäßigen Blutverlust sowie das Eindringen von Mikroorganismen verhindert.

1.1.1 Primäre Hämostase (Thrombozytenaktivierung)

Die Aktivierung zirkulierender Thrombozyten, ausgelöst durch den Wegfall der Endothelbarriere und den dadurch ermöglichten Kontakt mit subendothelialen Kollagenfasern, führt zur Ausbildung eines primären Wundverschlusses. Dieser ist essentiell für die Konzentrierung und Aktivierung der Proteine des plasmatischen Gerinnungssystems (siehe 1.1.2)¹. Die primäre Hämostase lässt sich in drei Phasen unterteilen: (1) Thrombozytenadhäsion, (2) Thrombozytenaktivierung und –degranulierung sowie (3) Thrombozytenaggregation.

Die Thrombozytenadhäsion und –ausbreitung erfolgt durch die Wechselwirkungen von thrombozytären Rezeptoren mit der extrazellulären Matrix. Diese wird vermittelt durch die Interaktionen eines Komplexes bestehend aus dem Glykoprotein (GP) GPIIb/Faktor V/Faktor IX-Komplex auf der Thrombozytenoberfläche mit den auf Kollagenfasern lokalisierten von-Willebrand-Faktor-Polymeren (vWF) sowie Proteinen der extrazellulären Matrix^{1,2}. vWF ist ein multimeres Plasmaprotein, das ausschließlich in Endothelzellen und Megakaryozyten exprimiert wird^{3,4}, wobei der von Megakaryozyten synthetisierte vWF in den α -Granula von Thrombozyten gespeichert und während deren Aktivierung freigesetzt wird^{4,5}. Endothelzellen sekretieren vWF zum Teil konstitutiv in das Plasma sowie in die subendotheliale Matrix oder speichern diesen in ihren Weibel-Palade-

Granula. Aus diesen wird er als Reaktion auf die Aktivierung des hämostatischen Systems, z.B. durch Stimulation mit Thrombin, freigesetzt^{3,4,6-8}.

Neben den Interaktionen mit vWF führt die Bindung von thrombozytärem GPVI und Integrin $\alpha_2\beta_1$ an Kollagenfasern zu einer weiteren Stabilisierung der Thrombozytenadhäsion. Die daran angeschlossene Ausbreitung der Thrombozyten durch die Relaxation des im Ruhezustand hoch aufgefalteten, offenen kanalikulären Membransystems fördert die effektive Ausbreitung der Thrombozyten und die Abdichtung der Verletzungsstelle⁹. Die Wechselwirkungen der Thrombozyten mit der extrazellulären Matrix sowie die Aktivierung der Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR, *protease-activated-receptor*) 1 und 4^{10,11} durch das während der plasmatischen Gerinnung gebildete Thrombin induzieren eine Reihe von intrazellulären Signaltransduktionskaskaden. Diese führen zur Aktivierung sowie zu einer weiteren Rekrutierung von Thrombozyten und einem damit verbundenen Wachstum des primären Thrombus.

Über die Umlagerung des zytoskeletären Apparates während der Aktivierung der Thrombozyten kommt es zur Degranulierung von verschiedenen Komponenten wie Adhäsionsproteinen, Wachstumsfaktoren, ADP, Serotonin, Thromboxan A_2 sowie Chemokinen wie dem Plättchenfaktor 4 (PF4), der in Kapitel 1.2.4.3 genauer behandelt werden soll. Mittels eines Adenosintriphosphat (ATP)-getriebenen Flip-Flop-Mechanismus kommt es schließlich zur Umlagerung von Phospholipiden (Phosphatidylserin und -inositol) auf die Außenseite der Thrombozytenmembran, wodurch diese eine hohe negative Ladungsdichte erhält¹². Diese wirkt prokoagulatorisch, indem sie die Ca^{2+} -abhängige Bindung und lokale Konzentrierung der Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren ermöglicht^{13,14}. Des Weiteren führt die Aktivierung latenter Membranrezeptoren wie dem $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin über „Inside-out Signaling“ zur Aggregation der Thrombozyten über Fibrinogenbrücken (siehe 1.1.2)¹⁵.

Parallel zu den Reaktionen der primären Hämostase führt die Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems zu der Thrombin-abhängigen Produktion von Fibrin und einer damit verbundenen Stabilisierung des primären Wundverschlusses.

1.1.2 Sekundäre Hämostase

Ziel der sekundären Hämostase ist die Aktivierung des Schlüsselenzyms Thrombin und die dadurch katalysierte Produktion von Fibrin zur Stabilisierung des Wundverschlusses. Essentiell für die Konzentrierung dieser Prozesse auf die Verletzungsstelle ist die aufgrund

der Exposition negativer Phospholipide geladene Thrombozytenoberfläche¹². Sie vermittelt die Ca^{2+} -abhängige Bindung der Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren VII, IX, X sowie Prothrombin über deren Gla-Domäne und konzentriert diese somit lokal^{13,14}. Die Faktoren bilden hierbei Multikomponenten-Enzymkomplexe, wodurch die Geschwindigkeit der jeweilig katalysierten Reaktion, vor allem durch die entsprechenden Kofaktoren, um den Faktor 10^5 gegenüber der einfachen Enzym-Substrat-Reaktion gesteigert wird (Abbildung 1)⁹.

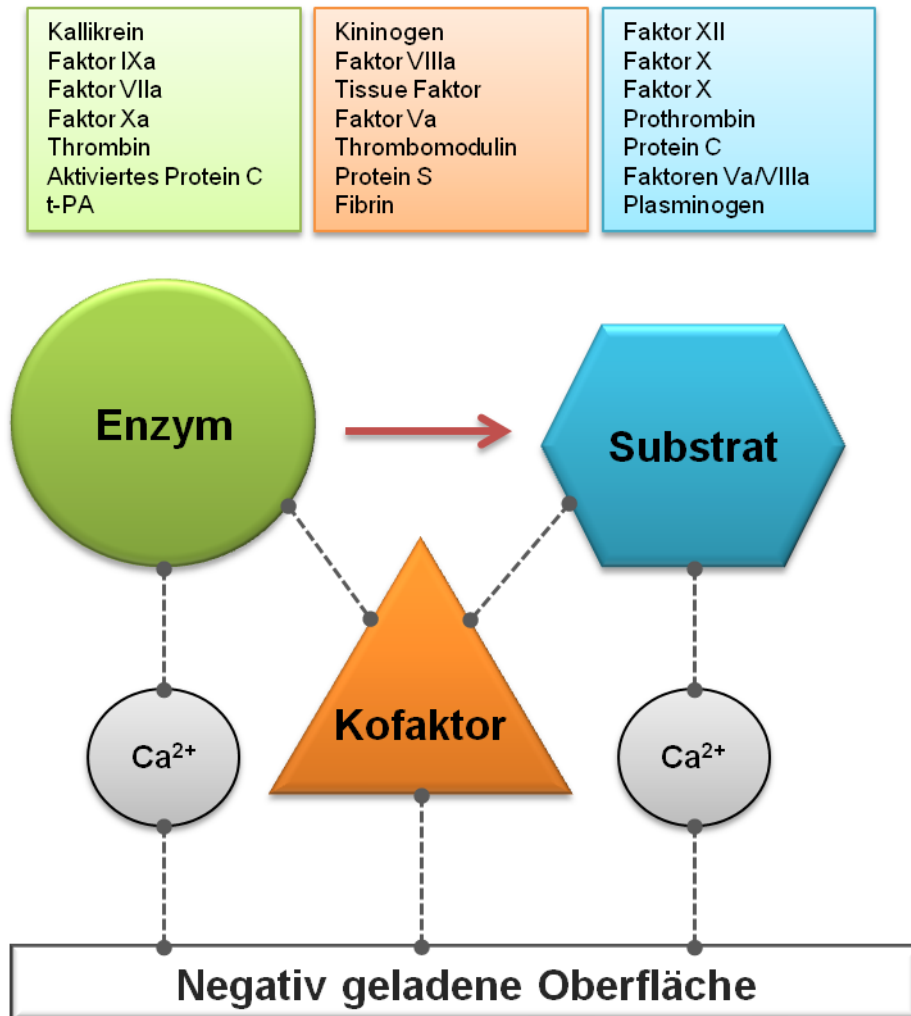


Abbildung 1: Schema der Multikomponenten-Enzymkomplexe der Hämostase

Die Faktoren des plasmatischen Gerinnungssystems binden nach Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten Ca^{2+} -abhängig an negativ geladene Oberflächen und assoziieren zu Multikomponenten-Enzymkomplexen, wodurch die Geschwindigkeit der jeweilig katalysierten Reaktion um den Faktor 10^5 gesteigert wird (verändert nach Preissner, 2006⁹).

Das plasmatische Gerinnungssystem (Abbildung 2) wird ausgelöst durch den extrinsischen Weg („Initiierungsphase“). Der in tieferen Schichten der Gefäßwand exponierte Tissue Faktor (TF) initiiert im Komplex mit Faktor (F) VII/VIIa (a steht für „aktiviert“) auf der negativen Phospholipidoberfläche aktivierter Thrombozyten die Bildung geringer, für eine effektive Fibrinsynthese noch nicht ausreichender Mengen von FXa und Thrombin¹⁶. Die essentielle Bedeutung von TF für die Blutgerinnung wird durch die Tatsache deutlich, dass ein knock-out von TF im Mausmodell lethal ist¹⁷.

In der Amplifikations- und Produktionsphasen des intrinsischen Weges, in dem die initial entstandenen, geringen Mengen an Thrombin durch positive Rückkopplung zu einer außerordentlichen Verstärkung der Thrombinaktivierung führen, entstehen für die Fibrinbildung ausreichende Mengen an Thrombin. Erreicht wird das durch die Thrombin-abhängige Aktivierung der Gerinnungsfaktoren FXI¹⁸, FVIII¹⁹ und FV²⁰. Hierbei vermittelt aktivierter, dimerer FXIa die Ca²⁺-abhängige Bindung und Aktivierung von FIX²¹. FIXa bildet zusammen mit FVIIIa den sogenannten Tenasekomplex, der die Umwandlung von FX zu FXa katalysiert²². Die Bildung des Tenase-Komplexes initiiert eine verstärkte Bildung des Prothrombinasekomplexes bestehend aus FXa/FVa auf der Thrombozytenoberfläche. Dieser produziert genügend Thrombin, um ausreichende Mengen Fibrin für einen stabilen Thrombus zu generieren. Zusätzlich verknüpft die durch Thrombin aktivierte Transglutaminase FXIII die gebildeten Fibrinpolymere, wodurch der primäre Thrombozytenpfropf stabilisiert wird²³.

Die Blutgerinnung ist ein hochgradig regulierter Prozess, der vor allem durch das Schlüsselenzym Thrombin über negative Rückkopplungsmechanismen endogen kontrolliert wird. Da bereits 5% des gebildeten Enzyms für die lokale Fibrinbildung ausreichen, wird der überwiegende Teil des Thrombins, der von der Verletzungsstelle wegdiffundiert, durch die Bindung an den endothelgebundenen Rezeptor Thrombomodulin (TM) inaktiviert. Die starke Komplexbildung mit TM blockiert die Umsetzung der gerinnungsfördernden Substrate des Enzyms, erlaubt aber die effektive Aktivierung von Protein C. Unter Einbeziehung des endothelialen Protein C Rezeptors (EPCR, *endothelial Protein C receptor*)²⁴ werden ausreichende Mengen an aktiviertem Protein C (APC) erzeugt²⁵, das zusammen mit seinem Kofaktor Protein S die proteolytische Inaktivierung von FVa und FVIIIa vermittelt. Dieser Vorgang stoppt die Produktion von Thrombin²⁶.

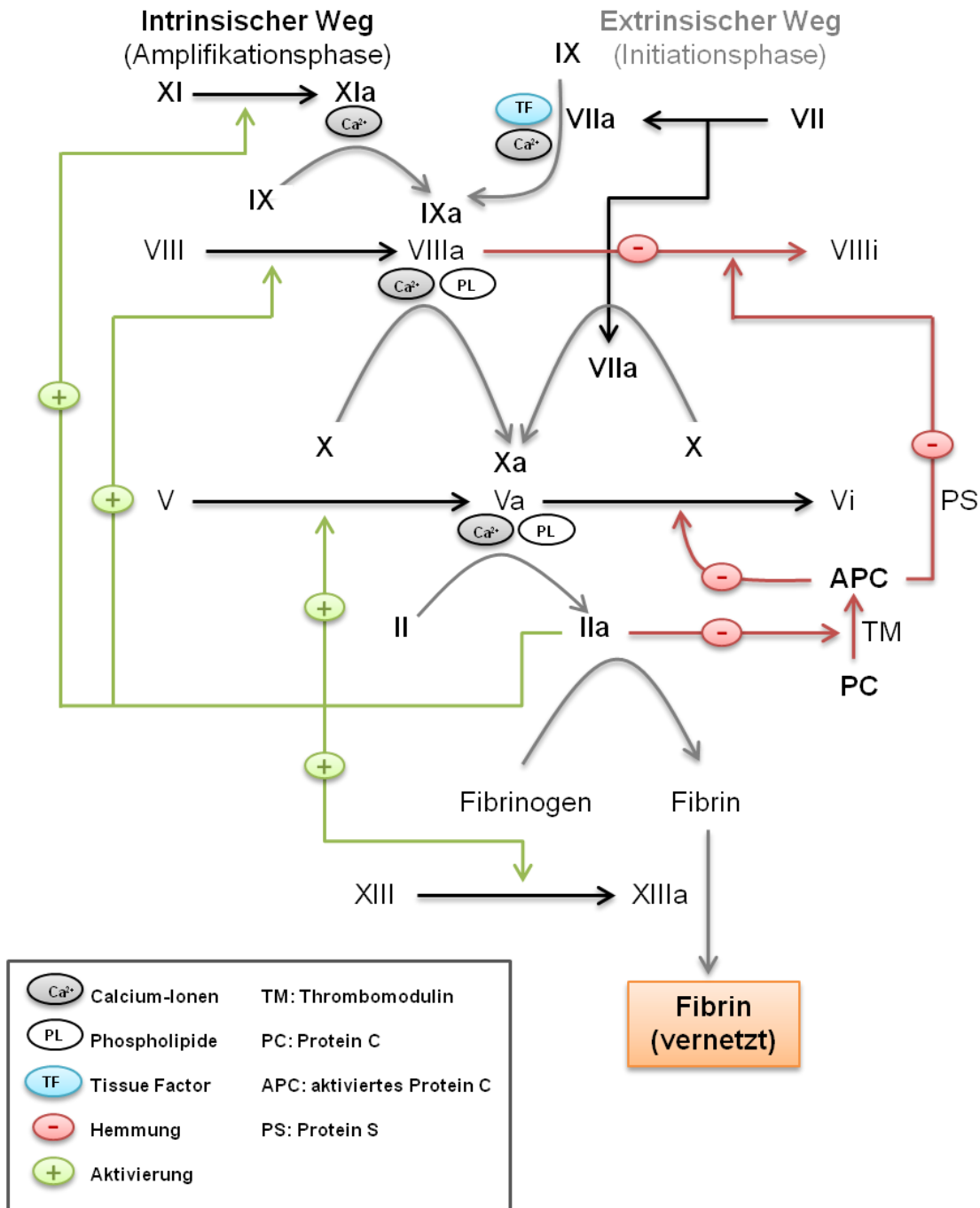


Abbildung 2: Aktivierung und Regulation der Gerinnungskaskade

Nach einer Gefäßverletzung kommt der plasmatische Gerinnungsfaktor VII mit dem von subendothelialen Zellschichten exprimierten TF in Kontakt, wodurch, über die Aktivierung von Faktor X, die Bildung geringer Thrombinmengen (IIa) initiiert wird. Dieses Schlüsselenzym induziert über die direkte Aktivierung von Faktor XI sowie der Kofaktoren V und VIII den intrinsischen Gerinnungsweg, was zu einer Amplifikation der Thrombinproduktion führt. Die resultierende Thrombinkonzentration katalysiert die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin. Zusätzlich aktiviert ungebundenes Thrombin regulatorische Mechanismen durch die Bindung an den Endothelzellrezeptor Thrombomodulin (TM). Dieser Thrombin/TM-Komplex vermittelt die Aktivierung von Protein C (PC), das in seiner aktivierten Form (APC), zusammen mit seinem Kofaktor Protein S, Va und VIIIa proteolytisch inhibiert, sodass eine weitere Bildung von Thrombin verhindert wird (verändert nach Preissner, 2006⁹).

Sowohl in der Blutzirkulation diffundierendes als auch TM-gebundenes Thrombin (das zum Teil endozytotisch entfernt wird) wird durch zirkulierende Serinproteaseinhibitoren, vor allem Antithrombin, gebunden und inhibiert. Dadurch wird die Aktivität dieses multifunktionellen Enzyms und auch anderer Gerinnungsproteasen systemisch kontrolliert und auf den Bereich des verletzten Endothels beschränkt²⁷. Ein zusätzlicher Regulationsmechanismus kontrolliert die Initiierungsphase, indem TF-Pathway-Inhibitor (TFPI) mit FXa bzw. dem TF/FVIIa/FXa-Komplex assoziiert und dessen Aktivität zu Beginn der Kaskade reguliert²⁷.

1.1.3 Der intrinsische Gerinnungsweg

Neben der unter 1.1.2 beschriebenen Aktivierung der Gerinnungskaskade in Abhängigkeit von TF über den extrinsischen Signalweg kann diese auch direkt über den intrinsischen Weg initiiert werden. Dieser, auch als Kontaktaktivierung bezeichnete Weg, umfasst eine Abfolge von Zymogenaktivierungen, welche Präkallikrein (PK), FXII, FXI und den nicht-enzymatischen Kofaktor hochmolekulares Kininogen (HK) einschließen (Abbildung 3)²⁸. Hierbei kommt es zu einer Kontaktaktivierung durch die Bindung von FXII an negativ geladene Oberflächen^{29,30}. *In vitro* kann FXII durch verschiedene polyanionische Substanzen wie Ellagsäure, Glykosaminoglykane, Kollagene, Sulfatide und Heparin sowie künstliche Substanzen wie Glas, Kaolin und Dextransulfate aktiviert werden^{28,29,31}. Auf die endogenen Aktivoren von FXII unter physiologischen Bedingungen wie z.B. Nukleinsäuren oder Polyphosphate soll weiter unten eingegangen werden.

Die Bindung von FXII an negativ geladene Oberflächen führt zu einer Konformationsänderung und ermöglicht so die proteolytische Spaltung des 80 kDa-Zymogens entweder durch Auto-Aktivierung oder, in effizienterer Weise, durch Kallikrein (siehe unten)^{29,30,32}. Das Aktivierungsprodukt ist FXIIa, bestehend aus einer schweren (50 kDa) und einer leichten Kette (30 kDa), die durch eine Disulfidbrücke verbunden sind²⁸. Die Bindestelle für negative Oberflächen liegt in der schweren Kette der Protease, wohingegen die leichte Kette das aktive Zentrum (katalytische Triade aus Histidin, Serin, Asparaginsäure) zur Aktivierung der Zymogene FXI und PK enthält^{28,33}. Bei diesen Reaktionen dient HK als Kofaktor³⁴. FXIIa aktiviert nachfolgend FIX und führt über die weiteren Schritte des intrinsischen Weges zur Generierung von Thrombin (siehe 1.1.2).

Neben der Aktivierung von FXI, vermittelt FXIIa die Aktivierung von PK zu Kallikrein, welches durch die Aktivierung weiterer FXII-Moleküle zu einer Amplifikation des ursprünglichen Kontaktsignals führt²⁸. Hierbei dient das nicht-enzymatische HK als Kofaktor. Zusätzlich

verstärkt HK die Aktivierung von FXI. Für beide Funktionen bildet HK zinkabhängige, nicht-kovalente, äquimolare Komplexe mit den Serinproteasen^{28,34-36}. HK besteht aus sechs Domänen, wobei innerhalb von Domäne 5 Bindestrukturen für negativ geladene Moleküle wie Heparin identifiziert wurden und Domäne 6 die Bindung der Serinproteasen PK und FXI vermittelt^{37,38}. Achtzig Prozent des im Plasma zirkulierenden Präkallikreins liegt gebunden an Kininogen vor, bindet während der Kontaktphasenaktivierung an negativ geladene Oberflächen und wird so aktiviert^{28,36}. Bei dieser Reaktion wird das proinflammatorische Peptid Bradykinin (BK) aus dem Kofaktor HK freigesetzt, auf dessen Eigenschaften weiter unten genauer eingegangen wird³⁹.

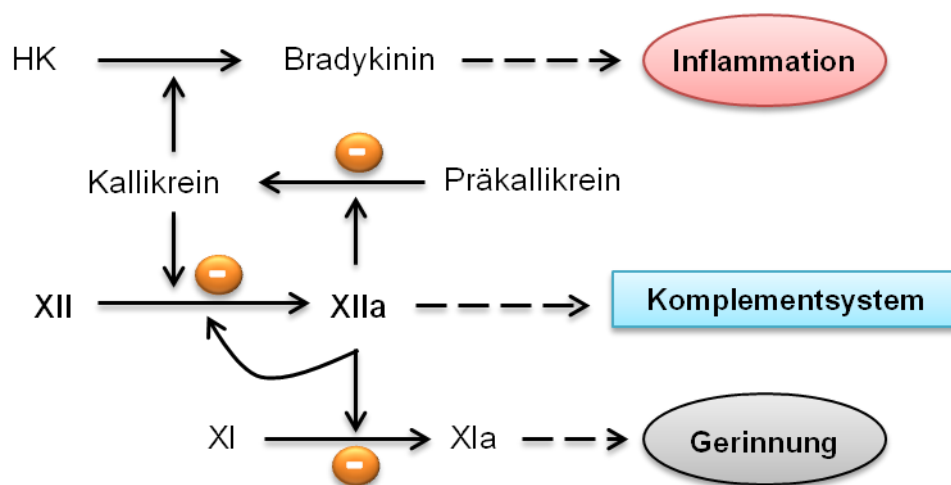


Abbildung 3: Schema des intrinsischen Gerinnungssystems

Das intrinsische Gerinnungssystem wird durch die Kontaktaktivierung des Gerinnungsfaktors XII an negativ geladenen Oberflächen (orangene Kreise) wie Kaolin, Glas, Polyphosphate oder Nukleinsäuren initiiert. Die Aktivierung von Präkallikrein (PK) durch Faktor XIIa zu Kallikrein und dessen Spaltung von Faktor XII resultiert in einer Amplifikation des ursprünglichen Signals. Faktor XIIa katalysiert die Aktivierung von Faktor XI zu Faktor XIa, wodurch das plasmatische Gerinnungssystem unabhängig vom extrinsischen Weg initiiert wird. Des Weiteren induziert das Kontaktphasesystem inflammatorische Prozesse durch die Faktor XIIa-abhängige Aktivierung des Komplementsystems und die Kallikrein-vermittelte Freisetzung des proinflammatorischen Peptids Bradykinin aus dem Kofaktor Kininogen (HK). Dies führt zu einer Hyperpermeabilität des Endothels und der Ausbildung von Ödemen (verändert nach Oehmcke et al., 2010⁴⁰).

Die Relevanz des intrinsischen Signalweges *in vivo* war lange umstritten, da Patienten mit einer Defizienz von FXII, PK oder HK keine verstärkte Blutungsneigung besitzen^{41,42}. Zwar führt das Fehlen von FXI zu einem milden, gewebespezifischen Phänotyp, der als Hämophilie C bezeichnet wird⁴³, paradoxerweise scheint ein Fehlen der Kontaktphasenproteine allerdings in Thrombose- und Schlaganfallmodellen einen protektiven Phänotyp hervorzubringen. Knock-out Mäuse für FXI und FXII sind in verschiedenen

arteriellen und venösen Thrombose- oder in Schlaganfallmodellen vor pathologischer Thrombusbildung geschützt wohingegen im humanen System das Fehlen von FXI mit einem verminderten Auftreten von ischämischen Schlaganfällen korreliert werden konnte⁴⁴⁻⁴⁸.

Die Beobachtung, dass FXI *in vivo* bevorzugt durch Thrombin und nicht durch FXII aktiviert wird, untermauert die These, dass eine Kontaktphase-abhängige, FXII-vermittelte Thrombinbildung *in vivo* unter physiologischen Bedingungen von untergeordneter Bedeutung ist⁴⁹. Allerdings wurde dies 2007 durch eine Studie relativiert, die die Aktivierung von FXI durch Thrombin nur in Anwesenheit von FXII beobachten konnte⁵⁰.

Nachfolgende Untersuchungen identifizierten mehrere Substanzen, die *in vivo* zur Aktivierung von FXII führen. Smith et al. beschrieben 2006 erstmals Polyphosphate (polyP), welche von aktivierten Thrombozyten aus deren Granula freigesetzt werden, als effektive Kofaktoren für koagulatorische Prozesse⁵¹. Des Weiteren wies unsere Arbeitsgruppe 2007 nach, dass extrazelluläre RNA direkt an Proteasen des intrinsischen Weges bindet und diese (auto-)aktiviert⁵². Dieser Mechanismus wird in Kapitel 1.2.1 detailliert behandelt. Weitere Substanzen, welche das intrinsische Gerinnungssystem beeinflussen, sind falsch gefaltete Proteine⁵³ sowie von Neutrophilen freigesetzte extrazelluläre Desoxyribonukleinsäure-Netze (NET, *neutrophil extracellular trap*), die zur Immobilisierung und Abtötung von Bakterien dienen⁴⁰.

Die Proteine des intrinsischen Weges sind in eine Vielzahl weiterer vaskulärer Prozesse involviert. Hierzu zählen (1) die Aktivierung des Komplementsystems⁵⁴, (2) die Freisetzung des vasodilatatorisch wirkenden Peptids BK aus HK^{39,55}, (3) die Fibrinolyse und (4) die Angiogenese.

Die Aktivierung des Komplementsystems durch FXII resultiert in der Produktion von Anaphylatoxin, das eine Kontraktion der glatten Muskelzellen, erhöhte vaskuläre Permeabilität und eine Rekrutierung verschiedener Immunzellen zur Folge hat und somit eine lokale Immunantwort auslöst⁵⁶. Zusätzlich führt die Aktivierung des intrinsischen Systems zur Freisetzung von BK aus HK, das durch die Bindung an seine Endothelzellrezeptoren B1 und B2 die Freisetzung von Stickstoffmonoxid und Prostacyclin induziert. Dies ist verbunden mit einer Relaxierung der glatten Muskelzellen und einer Gefäßerweiterung. Die Freisetzung von BK kann, wie oben beschrieben, in Abhängigkeit von FXII geschehen. Mittlerweile wird aber auch eine FXII-unabhängige Reaktion postuliert^{57,58}. Die Beobachtung, dass der Plasmaspiegel von BK in FXII-knock-out Mäusen stark

vermindert ist, spricht allerdings für eine zentrale Rolle von FXII bei der BK-Bildung^{56,59}. Reguliert wird die Aktivierung beider Systeme durch den C1-Inhibitor. Ein Defekt dieses Inhibitors führt zur Ausprägung von Angioödemem, die durch die BK- oder Anaphylatoxinbedingte, erhöhte Permeabilität des Endothels verursacht werden⁶⁰.

Zusätzlich interagieren Kontaktphasenproteine direkt mit Zellen des Immunsystems. Kallikrein und FXII wirken chemotaktisch auf Neutrophile und induzieren deren Aggregation sowie Degranulierung⁶¹⁻⁶⁴. Des Weiteren stimuliert FXII die Produktion von Zytokinen in Monozyten⁶⁵.

Zusammengefasst stellen die Proteine des intrinsischen Systems eine wichtige Schnittstelle zwischen koagulatorischen und inflammatorischen Prozessen dar.

1.2 Extrazelluläre Nukleinsäuren

Seit der ersten Beschreibung von Nukleinsäuren durch den Schweizer Friedrich Miescher im Jahr 1871⁶⁶ wurden die Funktionen von Ribonukleinsäuren (RNA) und Desoxyribonukleinsäuren (DNA) intensiv untersucht. Hierbei konnte DNA als Speicher der genetischen Information im Nukleus identifiziert werden, während die instabilere RNA intrazellulär (1) in Form von messengerRNA (mRNA), transferRNA (tRNA) und ribosomaler RNA (rRNA) die Übersetzung der genetischen Information in eine Aminosäuresequenz und damit in ein Protein vermittelt⁶⁷ und (2) in Form von kleinen, nicht-kodierenden RNAs wie z.B. small interfering RNA (siRNA)⁶⁸ oder mikroRNA (miRNA)⁶⁹ die Proteinsynthese reguliert.

Seit der ersten Erwähnung extrazellulärer Nukleinsäuren durch Mandel und Metais 1948 befinden sich diese im Fokus wissenschaftlichen Interesses⁷⁰. Hierbei wurden bislang verschiedene Freisetzungsmechanismen postuliert⁷¹ wie die passive Freisetzung durch Rupturen der Membran apoptotischer und nekrotischer Zellen, eine aktive Sekretion sowie ein Transport von Nukleinsäuren in Mikropartikeln⁷². Erhöhte Konzentrationen an extrazellulärer DNA wurden bei Auto-Immunerkrankungen wie systemischem *Lupus erythematoses*⁷³ sowie verschiedenen Krebserkrankungen nachgewiesen^{74,75}. Im Plasma von Tumorpatienten wurden spezifische RNAs bzw. RNA-Proteolipid-Komplexe identifiziert, welche begrenzt als Diagnosemarker verwendet werden können⁷⁶⁻⁷⁹. Somit sind DNA und RNA nicht nur intrazelluläre Speicher bzw. Übersetzer für genetische Informationen, sondern können auch extrazellulär verschiedene biologische Aktivitäten besitzen.

1.2.1 Einfluss extrazellulärer RNA auf die Koagulation

Unserer Arbeitsgruppe gelang 2007 der Nachweis, dass extrazelluläre RNA an die Proteasen des intrinsischen Gerinnungsweges bindet und diese aktiviert⁵². RNA dient so als „natürliche fremde Oberfläche“ zur endogenen Aktivierung des Kontaktphasesystems. Bislang wurde eine prokoagulatorische Aktivität für RNA-Moleküle ab einer Länge von 50 Nukleotiden mittels eines Template-Mechanismus gezeigt, bei dem sich die zymogene Vorstufe des Gerinnungsfaktors sowie der Kofaktor am RNA-Molekül (dem Template) positionieren (Abbildung 4)⁸⁰. Die Applikation exogener RNA führte in Kaninchen zu einer messbaren Aktivierung des intrinsischen Gerinnungsweges. **Spezifische Nukleinsäuresequenzen oder Bindemotive wurden bislang nicht identifiziert. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollten daher Struktur-Funktionsanalysen mit verschiedenen synthetischen Nukleinsäuren durchgeführt werden.**

In einem arteriellen, durch Eisenchlorid-induzierten Thrombosemodell in Mäusen konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten- und fibrinreiche Thromben *in vivo* mit extrazellulärer RNA dekoriert sind. Eine Vorbehandlung der Tiere mit Ribonuklease 1 (RNase 1; siehe 1.4), aber nicht mit Desoxyribonuklease (DNase), reduzierte die Thrombusbildung massiv. Der gezielte Verdau von extrazellulärer RNA durch RNase könnte somit einen neuen therapeutischen Ansatz zur Behandlung und Prävention von thrombotischen Komplikationen darstellen^{52,81}. DNA war aufgrund der Lokalisation im Nukleus sowie der Assoziation mit Histonen für Plasmaproteine schlecht zugänglich und schien daher in dem hier postulierten Modell im Vergleich zu RNA eine untergeordnete Rolle zu spielen⁵².

Allerdings wurde in einer Studie von 2009 eine prokoagulatorische Aktivität von extrazellulärer DNA in einem inflammatorischen Modell nachgewiesen. Hierbei wurde erstmals die Bindung und Aktivierung der Serinproteasen des intrinsischen Gerinnungsweges durch die von Neutrophilen in der Gegenwart pathogener Mikroorganismen gebildeten DNA-Netze, den sogenannten NETs (*neutrophil extracellular trap*) beschrieben⁴⁰. Somit scheinen sowohl extrazelluläre RNA wie auch DNA, je nach patho-physiologischer Situation, als Kofaktoren zur Aktivierung des Kontaktphasesystems zu fungieren. Weitere Studien unserer Arbeitsgruppe befassten sich mit dem Einfluss extrazellulärer Nukleinsäuren auf die Integrität des Endothels^{82,83}.

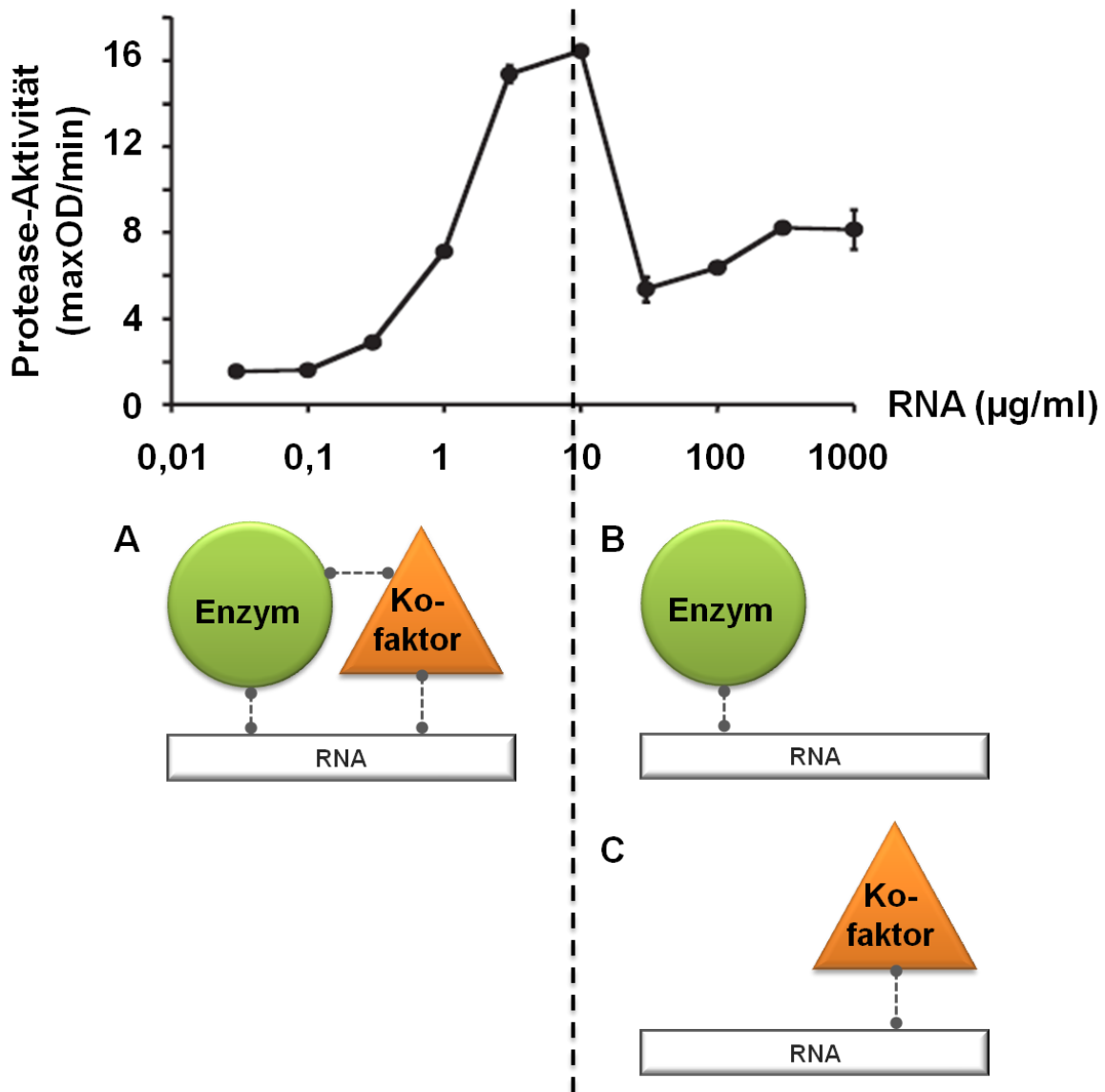


Abbildung 4: RNA-abhängige Aktivierung des intrinsischen Gerinnungsweges mittels eines Template-Mechanismus

Die prokoagulatorische Aktivität von RNA wird durch einen sogenannten Template-Mechanismus vermittelt. Die zymogene Vorstufe einer Serinprotease (Enzym) sowie deren Kofaktor binden an die vorhandenen RNA-Moleküle, wobei verschiedene Zwischenstufen entstehen können: (A) Enzym und Kofaktor binden an das gleiche RNA-Molekül, wodurch es zu einer Auto-Aktivierung der Protease kommt oder (B) Enzym und (C) Kofaktor binden an verschiedene RNA-Moleküle, was die Auto-Aktivierung verhindert. Mit steigenden RNA-Konzentrationen überwiegt die gleichzeitige Bindung von Enzym und Kofaktor an das gleiche RNA-Molekül, sodass die Proteaseaktivität in Abhängigkeit der RNA-Konzentration bis zu einem Maximum ansteigt (links). Mit höheren RNA-Konzentrationen sinkt die Wahrscheinlichkeit einer gleichzeitigen Bindung von Protease und Kofaktor an dem gleichen RNA-Molekül. Stattdessen überwiegen RNA-Moleküle, an denen entweder das Enzym oder der Kofaktor gebunden sind, sodass die Auto-Aktivierung der Protease bei sehr hohen RNA-Konzentrationen vermindert wird (rechts). Dieser Effekt konnte 2007 durch unsere Arbeitsgruppe nachgewiesen werden⁵².

1.2.2 Einfluss extrazellulärer RNA auf die vaskuläre Integrität

Vaskuläre Verletzungen sind immer mit Zellschäden korreliert und führen zu einer sofortigen Freisetzung von intrazellulären Komponenten, die sowohl koagulatorische Prozesse (siehe 1.2.1) in Gang setzen, als auch die Permeabilität des Endothels erhöhen können. 2007 zeigte unsere Gruppe, dass hierbei extrazelluläre RNA, aber nicht DNA, einen wichtigen Kofaktor dieser Aktivitäten darstellt⁸². *In vivo* korrelierte eine erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke mit der Entstehung von zerebralem Schlaganfall, Ödem- und Thrombusbildung. Eine Vorbehandlung von Ratten mit RNase 1, nicht aber mit DNase, reduzierte Gefäßverschlüsse, Infarktgröße und Ödembildung in einem Eisenchlorid-induzierten Verschluss des *Sinus sagittal superior*. Diese *in vivo* Beobachtungen konnten durch Permeabilitätsversuche an mikrovaskulären Gehirnendothelzellen *in vitro* bestätigt werden. Natürliche extrazelluläre RNA wie auch künstlich synthetisierte RNA in doppelsträngiger (poly I:C) oder einzelsträngiger Form erhöhte daher die Permeabilität von mikrovaskulären Gehirnendothelzellen signifikant und führte zu einer Abschwächung der engen Zellverbindungen (lat. *zonula occludens*, engl. *tight junctions*), während DNA keinen Effekt hatte. Mechanistische Untersuchungen zeigten, dass eine RNA-Bindung an extrazellulär gebundenen vaskulär-endothelialen Wachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) eine bedeutende Rolle bei den RNA-induzierten Permeabilitätsveränderungen spielt.

VEGF ist der bislang stärkste bekannte Permeabilitätsfaktor im Gefäßsystem⁸⁴. Die Expression von VEGF wird *in vivo* und *in vitro* durch Hypoxie bzw. Ischämie induziert und stimuliert die Proliferation von Endothelzellen und Angiogeneseprozesse⁸⁴⁻⁸⁶. VEGF ist ein dimeres Glykoprotein mit verschiedenen Spleißvarianten, die sich unter anderem in ihrer Affinität zu Heparin unterscheiden⁸⁷. Bindungsexperimente identifizierten VEGF₁₆₅, aber nicht die kürzere VEGF₁₂₁-Isoform, als RNA-Bindeprotein. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass die Bindung von RNA an VEGF₁₆₅ über die Heparin-bindende Domäne erfolgt, die in der kürzeren VEGF₁₂₁-Isoform fehlt^{82,87}. Die Blockierung von VEGF₁₆₅ sowie dessen Rezeptor-2 (VEGF-R2) inhibierten die oben beschriebenen RNA-abhängigen Permeabilitätsveränderungen. Durch weitere Studien wurde der Signaltransduktionsmechanismus, durch den die RNA-induzierte Hyperpermeabilität in Abhängigkeit von VEGF vermittelt wird, charakterisiert⁸³. Extrazelluläre RNA scheint als verbindendes Element die Bindung von VEGF₁₆₅ an dessen Korezeptor Neuropilin-1 zu verstärken. Die daraus resultierende Phosphorylierung von VEGF-R2 führt zu einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, der assoziiert ist mit einer Permeabilitätszunahme sowie der Exozytose von

Endothel-spezifischen Weibel-Palade-Granula. Es kommt zur Freisetzung proinflammatorischer und prokoagulatorischer Substanzen sowie RNase 1, wie in späteren Studien gezeigt wurde (siehe 1.4.2)^{88,89}.

Während endogen freigesetzte RNA prokoagulatorische wie auch proinflammatorische Prozesse induziert, erbringen exogen applizierte, synthetisch hergestellte und stabilisierte Nukleinsäuren vielversprechende Resultate als Therapeutika in aktuellen klinischen Studien. Auf ihre Eigenschaften soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

1.2.3 Aptamere

Aptamere, oft auch als „chemische Antikörper“ bezeichnet, sind künstlich synthetisierte, einzelsträngige DNA- oder RNA-Nukleotide, die eine stabile dreidimensionale Struktur ausbilden, durch die sie mit hoher Affinität und Spezifität an Zielmoleküle binden und deren biologische Funktion modifizieren oder inhibieren^{90,91}. Kokristallisation eines Aptameres mit dem Zielmolekül führte zur Identifizierung ionischer Interaktionen, Wasserstoffbrückenbindungen sowie der Anordnung der Basen (*base-stacking*) als wichtige Attribute für diese hoch-spezifischen intermolekularen Wechselwirkungen^{91,92}. Gegenüber Antikörpern bieten Aptamere eine Reihe von Vorteilen: Sie lösen offensichtlich keine Immunreaktion aus⁹³, sind nicht toxisch⁹⁴ und können schnell und mit geringem Aufwand hergestellt werden. Die Synthese funktioneller Aptamere erfolgt mit dem sogenannten SELEX-Prozess (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*)^{95,96}. Dieser geht von einer DNA- oder RNA-Bibliothek aus ca. 10^{14} verschiedenen Oligonukleotidmolekülen mit einer Länge von je 30-40 Nukleotiden aus. Diese werden mit dem Zielmolekül inkubiert, gefolgt von einem Selektionsschritt, in dem die gebundenen Oligonukleotide isoliert und amplifiziert werden. Es folgen 7-15 weitere Selektionsschritte, an deren Ende bis zu 100 Oligonukleotide stehen, die das Zielmolekül mit hoher Affinität binden und in post-SELEX-Prozessen weiter modifiziert und optimiert werden können. Unmodifizierte Aptamere diffundieren nach systemischer Applikation unmittelbar in verschiedene Gewebe, werden renal ausgeschieden und von zirkulierenden Nukleasen degradiert^{90,97}. Um die Halbwertszeit der Aptamere zu erhöhen, werden verschiedene Modifikationen wie z.B. 2'-Fluoro-, 2'-aminomethyl-, 2'-O-methyl- oder Polyäthylenglykol-Derivate eingeführt⁹⁸⁻¹⁰⁰.

Aptamere besitzen ein hohes Potential als Therapeutika¹⁰¹: So können Aptamere im vaskulären System mittels systemischer Applikation antiviral wirken¹⁰², aber auch Wachstumsfaktoren¹⁰³, Hormone¹⁰⁴, inflammatorische Moleküle¹⁰⁵ und Gerinnungs-

faktoren^{106,107} inhibieren. Das bislang erfolgreichste Aptamer blockiert VEGF₁₆₅ und wurde 2004 unter dem Namen „Macugen®“ für die Behandlung von Alters-bedingter Makular-Degeneration zugelassen^{93,108}. Des Weiteren können Aptamere Membrankomponenten und Rezeptoren erkennen und ermöglichen durch Kopplung mit zytotoxischen Substanzen eine gezielte Bekämpfung von Tumorzellen^{109,110}. Neuere Studien untersuchen die mögliche Anwendung von Aptameren als diagnostische Hilfsmittel um z.B. durch Farbreaktionen Kokain in Blutproben nachweisen zu können^{111,112}.

Aufgrund der Tatsache, dass Nukleinsäuren sehr effizient den intrinsischen Gerinnungsweg aktivieren (siehe 1.2.1)⁵², befassten sich Paul et al. (2010) mit der Frage, welchen Einfluss Aptamere auf das hämostatische System haben¹¹³. Hierbei wurde eine DNA-Bibliothek, wie sie als Ausgangsmaterial für den SELEX-Prozess verwendet wird, in einem *in vitro* Chandler-Loop-Modell auf prokoagulatorische und proinflammatorische Eigenschaften untersucht. Die Oligonukleotide beeinflussten weder die Aktivität von Thrombozyten, noch inflammatorische Prozesse oder das Komplementsystem, vermittelten aber in effizienter Weise die Auto-Aktivierung der intrinsischen Gerinnungsproteine FXII und Präkallikrein, sodass die systemische Applikation von Aptameren eine gerinnungsfördernde Wirkung hervorrufen könnte. **Im Rahmen dieser Arbeit sollten die prokoagulatorischen Eigenschaften verschiedener Aptamere charakterisiert werden.**

1.2.4 Weitere Interaktionen von extrazellulärer RNA mit Proteinen

Endogene, extrazelluläre RNA stellt durch Wechselwirkungen mit den Proteasen des Kontaktphaseweges sowie VEGF einen effizienten Kofaktor in der Induktion prokoagulatorischer und proinflammatorischer Prozesse dar. Weitere Studien führten zur Identifizierung von zwei weiteren RNA-bindenden Proteinen, auf die kurz eingegangen werden soll.

1.2.4.1 Faktor-VII-aktivierende-Protease

Die Faktor-VII-aktivierende-Protease (FSAP) ist eine plasmatische Serinprotease, die als einzelsträngiges Zymogen zirkuliert und mittels einer auto-katalytischen Spaltung in seine enzymatisch aktive, zweisträngige Form umgewandelt wird^{114,115}. Diese Reaktion läuft verstärkt in der Anwesenheit negativ geladener Substanzen wie Heparin, Dextransulfaten sowie RNA ab. Hierbei bindet FSAP an RNA-Moleküle mit einer Dissoziationskonstante (K_D) von 170-350 nM mit einer Mindestlänge von 100 Nukleotiden⁸⁰. Obwohl eine Beteiligung von

FSAP in Koagulation und Inflammation beschrieben wurde, ist die physiologische Rolle von FSAP noch nicht vollständig geklärt¹¹⁶⁻¹¹⁹.

1.2.4.2 Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1

Die Familie der Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren ist an der Regulation vaskulärer Prozesse beteiligt, indem sie u.a. die Fibrinolyse inhibieren und somit zur Stabilisierung eines gebildeten Thrombus beitragen. Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) spielt hierbei eine dominante Rolle, indem er den gewebespezifischen Plasminogenaktivator (tPA) sowie die Serinproteasen Urokinase (uPA) und FSAP inhibiert¹²⁰. Außerdem interagiert PAI-1 mit Komponenten der extrazellulären Matrix wie Vitronektin und Heparin. Studien von Wygrecka et al. (2007) identifizierten PAI-1 zusätzlich als RNA-bindendes Protein, wobei RNA und Heparin überlappende Bindungsstellen am Inhibitor besetzten. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass RNA zu einer Stabilisierung der aktiven Konformation von PAI-1 führte und die Inhibierung von FSAP durch PAI-1 signifikant verstärkt wurde¹²⁰.

1.2.4.3 Plättchenfaktor 4

Während PAI-1 und FSAP bereits als RNA-bindende Proteine identifiziert wurden, existieren solche Studien für Plättchenfaktor 4 noch nicht. Allerdings erlauben die nachfolgend beschriebenen Eigenschaften dieses Proteins, über eine mögliche Interaktion mit RNA zu spekulieren.

Plättchenfaktor 4 (PF4), auch bekannt als CXCL4, ist ein basisches Chemokin, welches von Megakaryozyten exprimiert¹²¹, in Vesikel verpackt¹²², in den α -Granula von Thrombozyten gespeichert und nach Aktivierung der Thrombozyten zusammen mit anderen Proteinen freigesetzt wird (siehe 1.1.1)¹²³. Das Protein mit 70 Aminosäureresten hat eine molekulare Masse von 7,8 kDa¹²⁴. Unter physiologischen Bedingungen formt es stabile Tetramere mit einer zylindrischen Struktur. Bei niedrigen Konzentrationen sind auch Di- und Trimere möglich¹²⁵.

PF4 wird von aktivierten Thrombozyten während der primären Hämostase aus deren α -Granula freigesetzt und bindet über Heparansulfate an die Oberfläche der Endothelzellen¹²⁶, so dass lokal PF4-Konzentrationen bis zu 25 μ M erreicht werden können¹²⁷. Die Bindung von PF4 an diese negativ geladenen Glykosaminoglykane wird vermittelt durch das C-terminale Ende des Proteins¹²⁸. Paradoxerweise zeigen PF4-knock-out und PF4-überexprimierende Mäuse in Eisenchlorid-induzierten Thrombosemodellen vergleichbare Defekte in der Thrombusbildung¹²⁹. Die Thrombusbildung scheint somit von

der lokalen (und optimalen) PF4-Konzentration abhängig zu sein. Durch die Bindung an Heparansulfate verhindert PF4 die schnelle durch Antithrombin vermittelte Blockade von Thrombin, bei der Endothel-gebundene Heparansulfate und freies Heparin als Kofaktoren fungieren, und wirkt so prothrombotisch¹³⁰⁻¹³². Ladungsabhängige Wechselwirkungen mit Gerinnungsfaktoren scheinen dagegen je nach Kontext pro- oder anti-koagulatorische Effekte zu induzieren¹²⁷.

Eine Folge der Bindung von Heparin an PF4 ist eine Konformationsänderung des Proteins, die durch die Generierung und Bindung von Immunglobulin G (IgG) Antikörpern die Ausbildung eines multimolekularen, antigenen Komplexes bedingt¹³³⁻¹³⁶. Dieser IgG/Heparin/PF4-Komplex bindet über den Fcγ2a-Rezeptor an Thrombozyten und aktiviert diese, wodurch weitere prothrombotische Substanzen freigesetzt werden^{136,137}. Des Weiteren stimuliert der IgG/Heparin/PF4-Komplex die TF-Produktion und Interleukin-8-Sekretion in Monozyten, was die Ausprägung eines prothrombotischen Phänotyps weiter verstärkt¹³⁸.

Diese Prozesse können pathologisch zur Ausprägung einer Heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT) führen¹³³⁻¹³⁶. Dieses Krankheitsbild wurde erstmals 1958 in New York beschrieben¹³⁹. Man unterscheidet zwei verschiedene Formen, wobei Typ I einen transienten Abfall der Thrombozytenanzahl (Thrombozytopenie) etwa zwei Tage nach Beginn einer Heparintherapie beschreibt^{136,140}. HIT Typ II vereint die paradoxen Symptome einer Thrombozytopenie mit einem stark erhöhten Risiko für thrombotische Komplikationen, welche zum Tode führen können^{136,141}. Das Auftreten von Antikörpern gegen Heparin/PF4-Komplexe führt allerdings nicht immer zur Ausbildung von HIT, so dass der Nachweis dieser Antikörper im Plasma von Patienten kein eindeutiger HIT-Indikator ist¹⁴².

In Anbetracht der Tatsache, dass PF4 aufgrund seiner stark positiven Ladung Wechselwirkungen mit negativ geladenen Oberflächen wie Heparin eingeht, ist eine Beeinflussung des intrinsischen Gerinnungsweges durch PF4 nicht überraschend. Frühere Studien zeigten bereits eine PF4-abhängige Inhibierung der Aktivierung von FXII durch Ellagsäure, Kaolin oder Glas¹⁴³. **Eine Beeinträchtigung der durch extrazelluläre Nukleinsäuren vermittelten Aktivierung des intrinsischen Gerinnungsweges durch PF4 muss somit in Betracht gezogen werden. In der hier vorliegenden Arbeit sollte diese Fragestellung bearbeitet werden.**

1.3 Koagulation und Inflammation

Blutgerinnung und Inflammation sind zwei zentrale Abwehrmechanismen zur Erkennung und Zerstörung von Pathogenen sowie zur Eingrenzung von Verletzungen. Beide Mechanismen sind eng miteinander verknüpft, sodass inflammatorische Substanzen immer auch zur Aktivierung koagulatorischer Abläufe führen und umgekehrt^{144,145}.

1.3.1 Einfluss koagulatorischer Proteine auf die Inflammation

PARs wurden als zelluläre Verbindungselemente zwischen Koagulation und Inflammation identifiziert, die auf mononukleären Zellen, Endothelzellen, Thrombozyten, Fibroblasten und glatten Muskelzellen exprimiert werden. Es gibt vier verschiedene PARs, welche durch verschiedene Serinproteasen aktiviert werden können. Mechanistisch spaltet die aktivierende Serinprotease das N-terminale, extrazelluläre Ende des PAR, wodurch ein neuer Aminoterminus entsteht, der wiederum als Ligand für den Rezeptor dient und transmembrane Signalwege initiiert¹⁴⁵. Thrombin spielt hierbei eine zentrale Rolle und kann PAR1, 3 und 4 aktivieren^{10,11,146}. Da PAR1 sowohl durch Thrombin als auch durch den APC/EPCR-Komplex aktiviert werden kann, kommt diesem Rezeptor eine duale Rolle bei Hämostaseprozessen zu¹⁴⁷. Eine Thrombin-abhängige Aktivierung resultiert in einer proinflammatorischen Signaltransduktion und vaskulären Hyperpermeabilität, während eine APC/EPCR-vermittelte Spaltung von PAR1 anti-inflammatorische Prozesse initiiert^{145,148-151}.

1.3.2 Einfluss inflammatorischer Prozesse auf die Koagulation

Inflammatorische Prozesse aktivieren die Blutgerinnung hauptsächlich durch drei Mechanismen: (1) einer Zytokin-abhängigen Induktion der TF-Expression; (2) einer Herunterregulation des Protein C Signalweges und (3) einer Inhibierung der Fibrinolyse¹⁴⁵.

Wie bereits unter 1.1.2 beschrieben führt der Kontakt von Blutkomponenten mit TF zur Aktivierung des extrinsischen Gerinnungsweges. Proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-6¹⁵² und Tumornekrosefaktor α (TNF α)¹⁵³ sowie bakterielle Produkte wie Lipopolysaccharide (LPS) stimulieren die Expression von TF auf der Oberfläche von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen und führen somit zu einer überschießenden Thrombin- und Fibrinproduktion^{154,155}. Verstärkt wird dies durch die Herunterregulation antikoagulatorischer Regulationsmechanismen wie z.B. dem Protein C Signalweg durch eine verminderte Protein C Synthese in der Leber, einem beeinträchtigten

Vitamin K-Stoffwechsel sowie einer verminderten Protein C Aktivierung, welche durch eine verminderte Expression von TM erreicht wird^{144,156,157}.

In den beschriebenen Prozessen spielt das proinflammatorische Zytokin TNF α eine zentrale Rolle, sodass auf die Eigenschaften dieses Proteins im Folgenden genauer eingegangen werden soll.

1.3.3 Tumornekrosefaktor α

Das proinflammatorische Zytokin Tumornekrosefaktor α (TNF α), erstmals beschrieben 1975¹⁵⁸, ist involviert in verschiedene zelluläre Abläufe wie der Induktion anderer Zytokine, Zellproliferation und –differenzierung, Apoptose und Nekrose^{159,160}. TNF α wird als ein transmembranes Homotrimer von einer Vielzahl verschiedener Zelltypen produziert, unter anderem von Monozyten/Makrophagen, Lymphozyten, T-Killerzellen, Astrozyten und Microgliazellen¹⁶¹⁻¹⁶³. Katalysiert durch die Metalloprotease TNF α -konvertierendes-Enzym (TACE) wird die membrangebundene Form proteolytisch gespalten und die lösliche Form des TNF α -Homotrimers freigesetzt^{164,165}.

Beide TNF α -Formen aktivieren zelluläre Signalwege über die Membran-durchspannenden TNF-Rezeptoren (TNFR) 1 und 2^{166,167}. Während TNFR2 ausschließlich nach entsprechender Stimulation von Zellen des Immunsystems exprimiert wird, wird TNFR1 konstitutiv von allen Zellen und Geweben exprimiert und scheint somit eine Schlüsselrolle in der TNF α -Signaltransduktion zu spielen¹⁶⁸. TNFR1 besitzt eine zytoplasmatische „Death-Domain“ (DD), die durch die Bindung des TNFR1-assoziierten-DD-Proteins (TRADD) sowie die daran angeschlossene Rekrutierung der Proteine Fas-assoziiertes-Protein-mit-DD (FADD) und Rezeptor-interagierendes-Protein-1 (RIP1) die Aktivierung von Caspasen und apoptotischer Prozesse induziert (Abbildung 5)¹⁶⁹⁻¹⁷¹.

Der nukleäre Faktor κ B (NF κ B)-abhängige Signalweg wird über eine Aktivierung von TNFR1 und TNFR2 durch die Assoziation mit TNFR-assoziierten-Faktoren (TRAF) induziert. Dies resultiert in der Aktivierung von MAP-Kinasen (MAP; *mitogen activated protein*) und der Translokation des Transkriptionsfaktors NF κ B in den Nukleus^{171,172}. NF κ B stellt einen zentralen Regulationspunkt in der Signaltransduktion inflammatorischer Stimuli dar. Es liegt als Homo- oder Heterodimer aus Proteinen der fünf Mitglieder (p50, p52, p65, RelB, ν -Rel und c-Rel) umfassenden NF κ B/Rel-Transkriptionsfaktor-Familie vor, wobei in Endothelzellen hauptsächlich ein p50-p65-Heterodimer zu finden ist^{173,174}. NF κ B ist im Zytoplasma von Zellen als Komplex mit seinem Inhibitor I κ B- α lokalisiert^{175,176}.

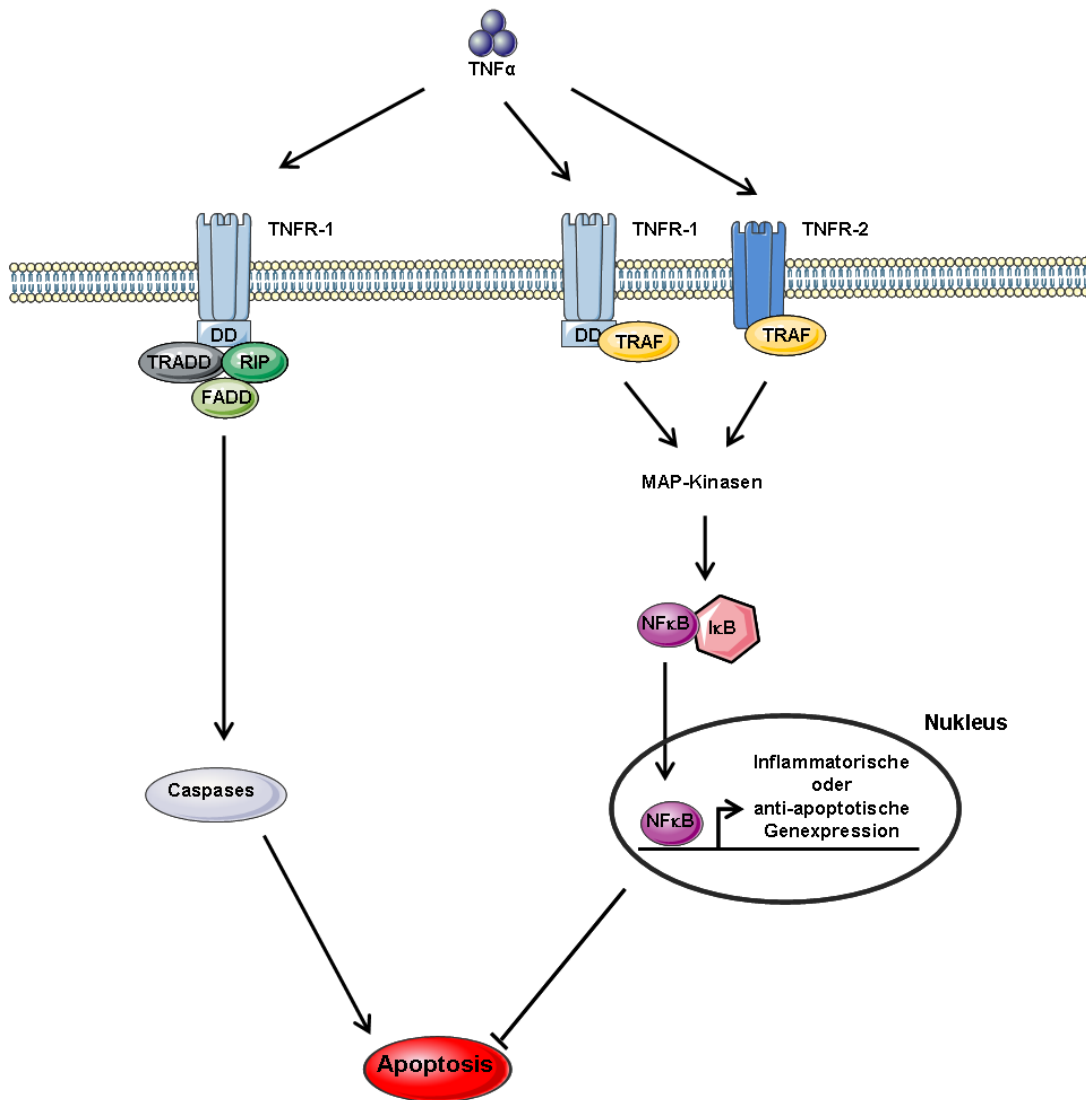


Abbildung 5: TNF α -vermittelte Signalwege

TNF α -vermittelte Signalwege werden durch die Interaktion von TNF α -Homotrimeren mit den Rezeptoren TNFR1 oder TNFR2 aktiviert. Die Bindung an TNFR1 führt unter Rekrutierung der intrazellulären Proteine TRADD (TNFR1-assoziiertes-DD-Protein), RIP (Rezeptor-interagierendes-Protein-1) und FADD (Fas-assoziiertes-Protein-mit-DD) an die DD (*Death-Domain*) zur Aktivierung von Caspasen und resultiert in Apoptose. Die Aktivierung von TNFR1 oder TNFR2 kann durch die Bindung von TRAFs (TNFR-assoziierte-Faktoren) über verschiedene MAP-Kinasen zur Freisetzung und Translokation von NF κ B in den Nucleus führen. Dies resultiert in der Expression inflammatorischer und anti-apoptischer Gene und einem Überleben der Zelle (verändert nach Rahman und McFadden, 2006¹⁷¹).

Eine Stimulation der Zellen, z. B. mit TNF α führt zuerst zu einer Phosphorylierung von I κ B an zwei Serinresten (Ser-32, Ser-36)^{177,178}, der anschließenden Ubiquitinierung sowie der Proteasom-abhängigen Degradierung des Proteins^{173,179,180}. Das durch diesen Mechanismus frei werdende NF κ B gelangt in den Nucleus, wo es als Transkriptionsfaktor

durch die Bindung an die NF κ B-Konsensussequenz die Expression verschiedener Gene aktiviert^{173,181,182}. Viele dieser Gene sind in inflammatorische Prozesse involviert, sodass die Inhibierung des NF κ B/I κ B-Signalweges ein potentieller Ansatzpunkt anti-inflammatorischer Behandlungen ist¹⁷³.

1.4 Ribonukleasen

Ribonukleasen (RNasen) sind Nukleasen, welche die Hydrolyse von RNA katalysieren und dadurch als zytotoxisch angesehen werden. Lange Zeit wurde angenommen ihre Hauptaufgabe bestehe in der Hydrolyse von mit der Nahrung aufgenommenen RNAs^{183,184}. Mittlerweile sind RNasen viele andere Eigenschaften zugeordnet worden¹⁸⁵ wie Neurotoxizität¹⁸⁶ und Angiogenese¹⁸⁷, antibakterielle¹⁸⁸ und antivirale Wirkungen¹⁸⁹.

1.4.1 Die RNase A-Superfamilie

Es sind dreizehn verschiedene extrazelluläre humane RNasen bekannt, von denen acht ribonukleolytisch aktiv sind¹⁸⁵. Sie bilden eine Superfamilie homologer Enzyme und sind auf Chromosom 14q11.2 in einem Cluster von 368 kb organisiert¹⁹⁰. Aufgrund von Sequenzvergleichen werden die RNasen in vier Untergruppen unterteilt (Abbildung 6)¹⁹¹.

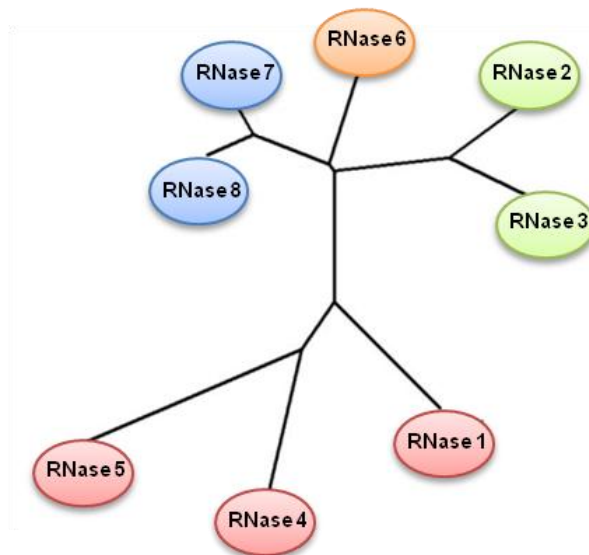


Abbildung 6: Phylogenetische Unterteilung der RNase-Superfamilie

Dargestellt ist die phylogenetische Unterteilung der acht ribonukleolytisch aktiven RNasen in vier Gruppen. Gleiche Farben implizieren eine nahe verwandtschaftliche Entwicklung (verändert nach Sorrentino, 2010¹⁸⁵).

Die Proteine werden in verschiedenen Organen und Geweben exprimiert und posttranslational glykosyliert, sodass verschiedene Varianten eines einzigen Genprodukts existieren. Alle bekannten RNasen dieser Familie sind extrazelluläre Proteine mit einem entsprechenden Signalpeptid und einer durch Disulfidbrücken stabilisierten Tertiärstruktur. Das aktive Zentrum der katalytisch aktiven RNasen wird aus einer hoch-konservierten katalytischen Triade, bestehend aus Histidin-12, Histidin-119 und Lysin-41, gebildet¹⁸⁵.

Während die Eigenschaften von RNase 1 ausführlich unter 1.4.2 diskutiert werden, soll im Folgenden kurz auf die anderen RNasen eingegangen werden.

Die RNasen 2 und 3 werden hauptsächlich von humanen Eosinophilen sekretiert und haben neurotoxische und antivirale Eigenschaften, RNase 3 wirkt zusätzlich antibakteriell^{189,192,193}. Bezüglich ihrer ribonukleolytischen Eigenschaften verdauen beide RNasen bevorzugt Polyribouracilsäure (poly:U) und sind inaktiv gegenüber poly:A und doppelsträngiger RNA^{185,194}.

RNase 4 wurde 1986 aus dem Überstand einer Kolonkarzinoma-Zelllinie isoliert¹⁹⁵. Sie besitzt mit 119 Resten die kürzeste Aminosäuresequenz, ist evolutionär stark konserviert¹⁸⁵, bevorzugt poly:U als Substrat und hydrolysiert 2'-3'-zyklische Nukleotide¹⁹⁵. Bislang ist das Expressionsmuster von RNase 4 nicht genau definiert. Die Expression in Leber, Lunge, Pankreas, Niere und Plazenta wurde lediglich auf mRNA-Ebene gezeigt¹⁹⁶.

RNase 5, auch als Angiogenin bezeichnet, zirkuliert in humanem Plasma und wird bei inflammatorischen Zuständen verstärkt exprimiert^{197,198}. Eine aktuelle Studie unserer Arbeitsgruppe konnte die Expression und Sekretion von RNase 5 von mikro- und makrovaskulären Endothelzellen nachweisen⁸⁹. RNase 5 besitzt trotz struktureller Ähnlichkeit mit den anderen RNasen nur eine geringe ribonukleolytische Aktivität¹⁹⁹. Dies ist zurückzuführen auf die Blockierung der RNA-Bindungsstelle mit einer Seitenkette von Glutamin-117^{185,200}. *In vivo* vermittelt RNase 5 proangiogene Effekte durch die Bindung an einen putativen Endothelzellrezeptor. Dieser RNase 5-Rezeptorkomplex wird endozytotisch aufgenommen und in den Nukleus transportiert^{201,202}, wodurch verschiedene Signaltransduktionskaskaden ausgelöst^{203,204} und die Proliferation von Endothelzellen stimuliert wird¹⁸⁷.

Die mRNA-Expression von RNase 6 konnte in verschiedenen Organen wie Lunge, Herz, Gehirn, Leber, Pankreas und Plazenta gezeigt werden, wobei über die Funktion und Substratspezifität bislang keine Daten vorliegen²⁰⁵.

	Funktionen	Vorkommen (Gewebe/Zelltypen)	bevorzugte Substrate
RNase 1	vaskuläre Hämostase eventuell: antiinflammatorisch antikoagulatorisch	Pankreas Testis Ovarien Gehirn Endothelzellen zirkuliert in Plasma	doppelsträngige RNA doppelsträngige DNA/RNA-Hybride poly:C 2',3'-zyklische Nukleotide
RNase 2	neurotoxisch antiviral	Sekretion durch Eosinophile Milz Leber Niere Plazenta Urin	poly:U Hefe-RNA
RNase 3	neurotoxisch antiviral antimikrobiell	Sekretion durch Eosinophile	poly:U Hefe-RNA
RNase 4	unbekannt	Kolonkarzinoma- Zelllinie Leber (mRNA) Lunge (mRNA) Pankreas (mRNA) Niere (mRNA) Plazenta (mRNA)	poly:U 2',3'-zyklische Nukleotide
RNase 5 (Angiogenin)	Angiogenese (Proliferation von Endothelzellen)	Endothelzellen zirkuliert in Plasma	geringe ribonukleolytische Aktivität
RNase 6	unbekannt	Lunge (mRNA) Herz (mRNA) Gehirn (mRNA) Leber (mRNA) Pankreas (mRNA) Plazenta (mRNA)	unbekannt
RNase 7	antimikrobiell	Epitheliales Gewebe Sekretion durch Keratinocyten Leber (mRNA) Niere (mRNA) Skelettmuskel (mRNA) Herz (mRNA)	unbekannt verdaut Hefe-tRNA
RNase 8	antimikrobiell	Plazenta	unbekannt verdaut Hefe-tRNA

Tabelle1: Eigenschaften der ribonukleolytisch aktiven Mitglieder der RNase A-Familie

RNase 7 gehört zur Gruppe der „Defensine“, deren antimikrobielle Eigenschaften auf die Fähigkeit zur Permeabilisierung von Bakterienmembranen zurückgeführt werden²⁰⁶. Die Expression und Sekretion dieses Proteins durch Keratinozyten wird durch Interleukine, Interferone und Bakterien induziert^{185,188,207}.

Die ebenfalls antimikrobiell wirkende RNase 8 wird ausschließlich in der humanen Plazenta exprimiert und könnte protektiv während der fetalen Entwicklung wirken^{208,209}.

Die ribonukleolytisch inaktiven RNasen 9-13 sind bislang nicht gut charakterisiert. Die spezifische Expression der RNasen 9-11 in den männlichen Fortpflanzungsorganen legt eine Beteiligung an reproduktiven Vorgängen nahe, allerdings wurden diesbezüglich bislang keine genaueren Studien durchgeführt^{185,190}.

1.4.2 RNase 1

1.4.2.1 Expression

Humane RNase 1, die auch als pankreatische RNase bezeichnet wird (Molmasse 17-26 kDa, je nach Glykosylierung), besitzt eine Aminosäuresequenz mit 128 Resten, inklusive einem 28 Aminosäuren umfassenden, sekretorischen Signalpeptid^{210,211}. Die Sequenz von RNase 1 ist zu 70% homolog mit der entsprechenden bovinen RNase A, dem am besten charakterisierten Mitglied dieser Superfamilie²¹⁰. Die Expression von RNase 1 wurde in einer Vielzahl von Geweben wie Pankreas, Testis, Ovarien und Gehirn nachgewiesen^{212,213}. Des Weiteren zirkuliert RNase 1 mit einer Konzentration von 300-400 µg/l im Plasma^{89,214}, bedingt vor allem durch die Expression und Sekretion von RNase 1 durch Endothelzellen^{89,215,216}. Ein Vergleich verschiedener Endothelzelltypen zeigte die stärkste Expression und Sekretion von RNase 1 in makrovaskulären, aus der Nabelschnurvene isolierten Endothelzellen, während nur eine geringe Expression in mikrovaskulären Zellen vorlag. Zusätzlich gelang die Lokalisation von RNase 1 zusammen mit vWF und P-Selectin in den Endothelzell-spezifischen Weibel-Palade-Granula. Dementsprechend korrelierte die Degranulierung der Weibel-Palade-Granula durch proinflammatorische Substanzen wie VEGF, Thrombin und auch extrazelluläre RNA mit einer Freisetzung von RNase 1⁸⁹. **Die regulatorischen Mechanismen, die für das unterschiedliche Expressionsmuster des Enzyms verantwortlich sind, sind unbekannt. In diesem Zusammenhang war für die vorliegende Arbeit die Regulation von RNase 1 unter inflammatorischen Bedingungen von Interesse.**

Die in den unterschiedlichen Geweben und Zelltypen exprimierten RNase 1-Proteine weisen unterschiedliche posttranslationale Glykosylierungsmuster auf. RNase 1 besitzt drei potentielle N-Glykosylierungsstellen (Asn-Xaa-Thr/Ser) an Asparagin-34, Asparagin-76 und Asparagin-88²¹⁷. Während die im Urin auftretende RNase 1 an allen drei Stellen glykosyliert ist²¹⁷, wurden in Pankreas, Testis, Gehirn und Serum verschiedene Glykosylierungsformen nachgewiesen²¹⁸⁻²²¹. Ein Vergleich der Glykosylierungsmuster bestätigte, dass die im Serum befindliche RNase 1 nicht vom Pankreas sondern von Endothelzellen sekretiert wird²¹⁸.

1.4.2.2 Dreidimensionale Struktur und katalytischer Mechanismus

Bis heute wurde keine Röntgenstrukturanalyse von Wildtyp-RNase 1 veröffentlicht, allerdings ermöglichten NMR-Untersuchungen 2008 erste Einblicke in deren Struktur²²². Wie die anderen Mitglieder der RNase A-Superfamilie besitzt RNase 1 eine durch vier Disulfidbrücken stabilisierte, bohnenförmige Struktur, bestehend aus drei α -Helices und sieben β -Faltblättern. Dabei formen die Faltblätter eine charakteristische Tasche, in der das aktive Zentrum bestehend aus Histidin-12, Lysin-41 und Histidin-119, lokalisiert ist (Abbildung 7)²²².

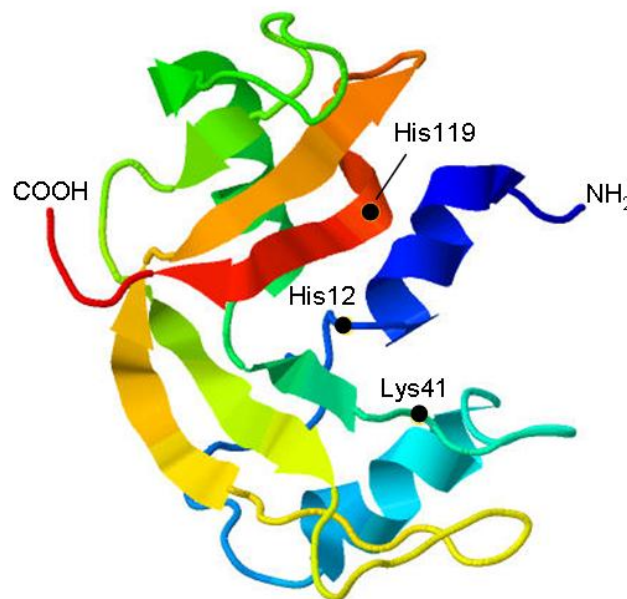


Abbildung 7: Dreidimensionale Struktur der humanen RNase 1

Dargestellt ist die auf NMR-Studien basierende, dreidimensionale Struktur der humanen RNase 1, wobei Spiralen α -Helices und Pfeile β -Faltblattstrukturen darstellen²²². Das aktive Zentrum wird gebildet durch die Aminosäuren Histidin-12, Lysin-41 und Histidin-119. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programms Jmol (Version 12.0.41) und der PDB-Datenbank (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2K11>) erstellt.

Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der RNase A-Superfamilie zeigt RNase 1 eine starke Affinität zu doppelsträngiger RNA sowie doppelsträngigen DNA-RNA-Hybriden, wohingegen die Affinität gegenüber einzelsträngiger RNA signifikant niedriger ist^{223,224}. Während der katalytische Mechanismus zur Degradierung von einzelsträngiger RNA durch bovine RNase A erstmals 1961 beschrieben wurde²²⁵, waren für die Aufklärung der RNase 1-vermittelten Hydrolyse doppelsträngiger RNA umfangreiche Sequenzstudien nötig. Einzelsträngige RNA wird durch RNase A in zwei Reaktionsschritten gespalten (Abbildung 8). Im ersten Schritt wird durch eine Transphosphorylierung ein 2'-3'-zyklisches Nukleotid am 3'-Ende eines Produkts geformt, während am 5'-Terminus des zweiten Produkts eine 5'-OH-Gruppe entsteht. Der zweite Schritt besteht aus der Hydrolyse des 2'-3'-zyklischen Nukleotids zu einem 3'-Nukleotid²²⁶. Diese Reaktion benötigt die lineare Anordnung des 2'- und des 5'-Sauerstoffatoms sowie des dazwischen liegenden Phosphoratoms²²⁷. Diese lineare Anordnung der Phosphodiesterbindung ist bei doppelsträngiger RNA aufgrund der helikalen Sekundärstruktur nicht möglich²²⁷⁻²²⁹.

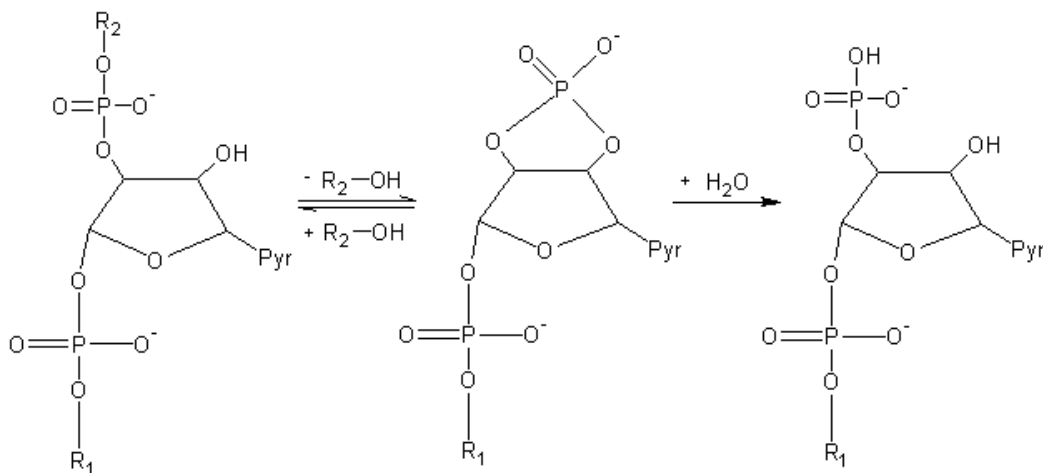


Abbildung 8: Reaktionsmechanismus der durch RNase A katalysierten Hydrolyse von RNA

RNase A spaltet einzelsträngige RNA endonukleolytisch hinter Pyrimidinresten, indem im ersten Schritt durch eine Transphosphorylierung ein 2'-3'-zyklisches Nukleotid am 3'-Ende eines Produkts geformt wird, während am 5'-Terminus des zweiten Produkts eine 5'-OH-Gruppe entsteht. Der zweite Schritt besteht aus der Hydrolyse des 2'-3'-zyklischen Nukleotids zu einem 3'-Nukleotid²²⁶. Die Strukturformeln wurden mit Hilfe des Programms ACD/Chemsketch (Version 5.12) erstellt.

Die erhöhte Affinität von RNase 1 gegenüber doppelsträngiger RNA beruht auf einer strukturellen Anpassung des aktiven Zentrums durch sechs positiv geladene Aminosäurereste, welche um das aktive Zentrum von RNase 1 angeordnet sind^{223,230}. Zusätzlich erhöht die Anwesenheit von Glycin-38 die Flexibilität des aktiven Zentrums und

erleichtert somit die Spaltung von doppelsträngiger RNA²³¹. Die Aktivität von RNasen wird durch die Bindung an das Protein RNase Inhibitor kontrolliert.

1.4.2.3 Ribonuklease Inhibitor

Ribonuklease Inhibitor (RI) ist ein zytosolisches Protein mit einer Molmasse von 50 kDa^{13,232}. Er liegt im Zytoplasma von Zellen in hohen Konzentrationen bis etwa 4 μM vor, was nahelegt, dass RI die Zelle vor den zytotoxischen Aktivitäten zytosolischer RNasen schützt²³³. Aktuelle Studien aus unserer Gruppe konnten zeigen, dass der von Endothelzellen exprimierte RI nicht nur im Zytoplasma lokalisiert ist, sondern auch sekretiert wird⁸⁹.

Bislang wurde die Bindung und Inhibierung von boviner RNase A sowie der humanen RNasen 1-7 durch RI beschrieben¹³. Die entstehenden, nicht-kovalenten Komplexe zwischen RI und RNasen weisen Dissoziationskonstanten im femtomolaren Bereich auf²³⁴. Dreidimensionale Strukturanalysen von freiem^{13,235} und komplexiertem RI²³⁶ ermöglichten die genaue Charakterisierung der RNase-RI-Interaktion. Hierbei zeigte sich, dass beide Proteine im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 binden, wobei etwa ein Drittel der RNase inklusive dem aktiven Zentrum innerhalb der Hufeisen-förmigen Struktur des RI liegen (Abbildung 9)^{13,237}.

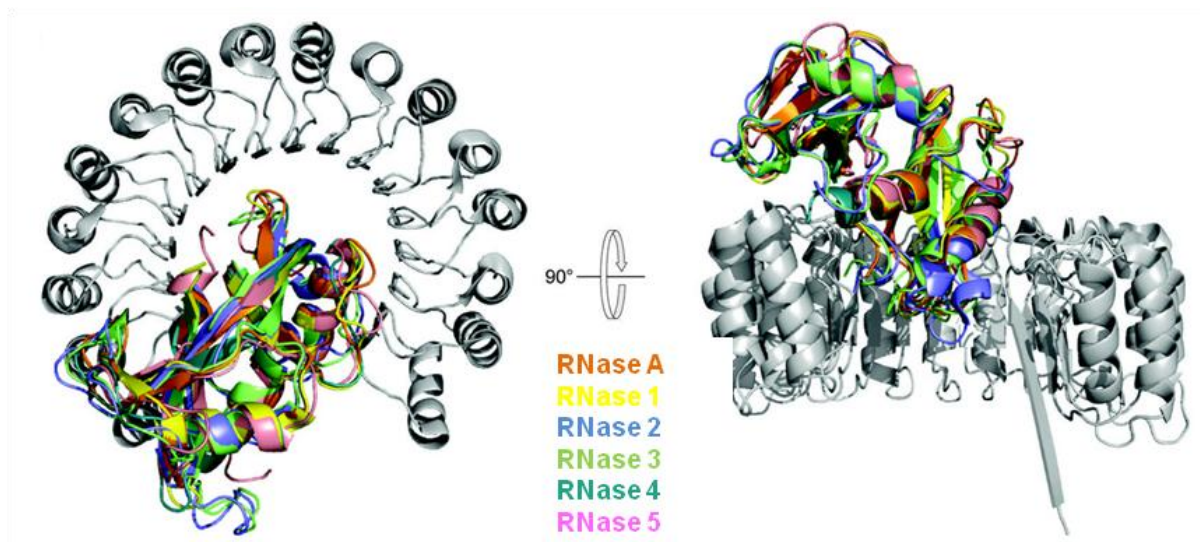


Abbildung 9: Dreidimensionale Struktur des humanem RNase Inhibitor im Komplex mit verschiedenen Ribonukleasen
Dargestellt ist eine auf Röntgenstrukturanalysen basierende, überlagende Darstellung der Interaktion von humanem RNase Inhibitor (grau) mit der bovinen Ribonuklease A (orange) sowie den humanen Ribonukleasen 1 (gelb), 2 (blau), 3 (grün), 4 (türkis) und 5 (rosa)¹³.

1.4.2.4 RNase 1 unter pathologischen und inflammatorischen Bedingungen

Zahlreiche Studien beschrieben eine veränderte RNase Aktivität im Serum von Patienten mit Leukämie^{238,239}, Prostata-²⁴⁰, Pankreas-²⁴¹ und Eierstockkrebs²⁴² sowie anderen Erkrankungen wie pankreatischer Fibrose²⁴³, Myokardinfarkt²⁴⁴ und Niereninsuffizienz²⁴⁵. In diesen Studien wurde die RNase Aktivität in Serumproben durch die Hydrolyse eines artifiziellen Substrates (poly:C) gemessen. Diese Methode spiegelt allerdings nicht spezifisch die Aktivität von RNase 1 wider, da in humanem Plasma mehrere katalytisch aktive RNasen zu finden sind. Daher sollten oben aufgeführte Studien kritisch betrachtet werden^{214,246}.

Zellkulturexperimente belegten eine starke zytotoxische Wirkung körperfremder RNasen, wie der amphibischen Onkonase®²⁴⁷. Diese wird endozytotisch von der Zelle aufgenommen, mangels einer entsprechenden Bindungsstelle durch den zytosolischen RI nicht inhibiert und kann somit die Degradierung zytosolischer RNAs vermitteln²⁴⁸. Diese Eigenschaften will man sich in der Tumorbehandlung zu Nutze machen. Die Onconase®-Therapie durchläuft zurzeit klinische Studien der Stufe III zur Behandlung maligner Mesotheliomen. Hierbei wurde bereits eine signifikante Verlängerung der durchschnittlichen Überlebensdauer von Onconase®-behandelten Patienten nachgewiesen²⁴⁹. Auch humane RNasen, welche ein geringeres immunogenes Risiko als körperfremde Substanzen besitzen, sollen mit Tumorspezifischen Proteinen oder Antikörpern fusioniert und in Tumorzellen eingeschleust werden, um einen gerichteten Zelltod zu induzieren. Die Verwendung von humaner RNase 1 birgt hierbei das Problem, dass deren enzymatische Aktivität im Zytosol sofort durch den RI blockiert wird^{234,250}. Ein Einsatz von RNase 1 als Tumorthapeutikum setzt also eine Mutation der RI-Bindungsstelle voraus^{13,237}.

Unter 1.2 wurde ausführlich auf die prokoagulatorischen und proinflammatorischen Eigenschaften von extrazellulärer RNA eingegangen. RNase 1 kann aufgrund ihrer katalytischen Aktivität sowie ihrer Präsenz in humanem Plasma diese Prozesse regulieren. Dies wird unterstützt durch die Entdeckung unserer Gruppe, dass proinflammatorische Substanzen wie Thrombin und VEGF aber auch extrazelluläre RNA selbst die Freisetzung von RNase 1 aus den endothelialen Weibel-Palade-Granula stimulieren⁸⁹. Dies führt zu einer temporär und lokal stark erhöhten RNase-Aktivität, die proinflammatorische und prokoagulatorische Effekte von extrazellulärer RNA kompensieren könnte (Abbildung 10).

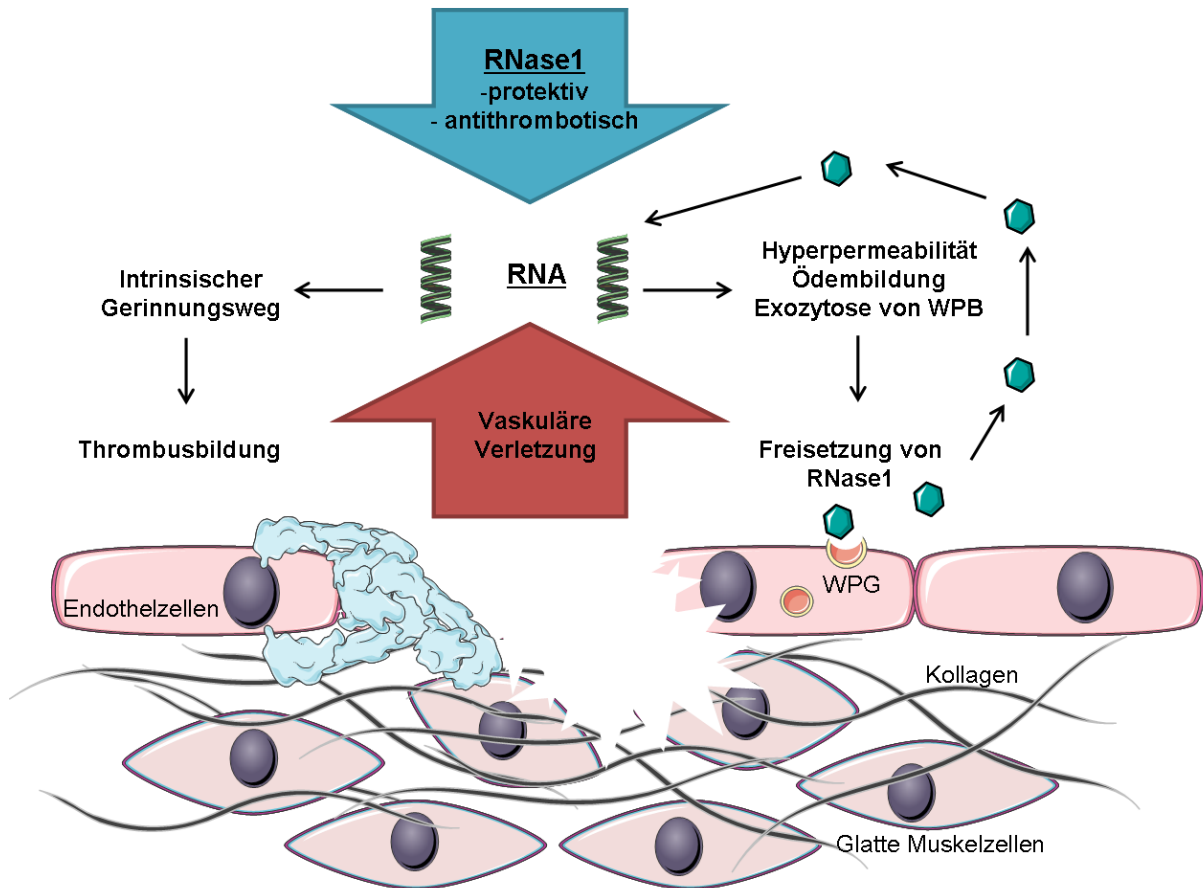


Abbildung 10: Physiologische Aktivitäten von extrazellulärer RNA und RNase 1

Extrazelluläre RNA wird bei Verletzungen von Gefäßen und Geweben sowie Infektionen oder Tumorerleiden freigesetzt und induziert verschiedene physiologische Prozesse. Einerseits bindet extrazelluläre RNA an die Proteine des intrinsischen Gerinnungsweges und führt so als prokoagulatorischer Kofaktor zur Thrombusbildung. Andererseits induziert RNA durch Interaktion mit VEGF (*vascular endothelial growth factor*) eine Hyperpermeabilität des Endothels und damit die Bildung von Ödemen. Diese Prozessen werden reguliert durch Ribonuklease 1 (RNase 1), welche konstitutiv im Plasma zirkuliert, aber auch RNA-vermittelt aus endothelialen Weibel-Palade-Granula (WPG) freigesetzt werden kann (verändert nach Preissner, 2007⁸¹).

Verschiedene *in vivo* Studien aus unserer Gruppe lieferten erste Hinweise auf mögliche therapeutische Anwendungen von RNase 1⁸¹. So konnte in einem durch Eisenchlorid induzierten, arteriellen Thrombosemodell in Mäusen die Thrombusbildung durch eine Vorbehandlung der Tiere mit RNase 1 signifikant vermindert und die prokoagulatorische Wirkung von extrazellulärer RNA gehemmt werden⁵². Auch die unter 1.2.2 beschriebene, RNA-vermittelte Hyperpermeabilität der Blut-Hirn-Schranke und die damit verbundene Ödembildung sowie die Infarktgröße konnten durch RNase 1-Applikation in Ratten gesenkt werden^{82,251}.

Des Weiteren stellt RNase 1 durch ihre hohe Aktivität gegenüber doppelsträngiger RNA ein mögliches Abwehrsystem gegenüber RNA-Viren wie z.B. HIV-Typ1 dar²⁵². Zusätzlich induziert RNase 1 die Produktion und Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren in dendritischen Zellen, vermittelt deren Reifung und scheint somit Teil des Immunsystems zu sein²⁵³.

Zusammengefasst ist eine Beteiligung von RNase 1 als Regulator von Ribonukleinsäure-induzierten inflammatorischen und koagulatorischen Prozessen wahrscheinlich. Dies impliziert, dass an beiden Prozessen beteiligte Proteine wie Thrombin oder TNF α die Expression von RNase 1 beeinflussen könnten, was im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit untersucht werden sollte.

2 Zielsetzung der Arbeit

Extrazelluläre RNA wurde von unserer Gruppe als proinflammatorischer und prokoagulatorischer Faktor im Gefäßsystem identifiziert. Hierbei dient RNA als Kofaktor zur Auto-Aktivierung der Serinproteasen der Kontaktphase und führt zur Bildung von Ödemen durch Induktion einer VEGF-abhängigen Hyperpermeabilität des Endothels. RNase 1, die konstitutiv von Endothelzellen exprimiert und sezerniert sowie zusätzlich durch proinflammatorische Substanzen wie VEGF, Thrombin und RNA aus den endothelialen Weibel-Palade-Granula freigesetzt wird, kann somit als natürlicher Regulator von extrazellulärer RNA wirken.

In der hier vorliegenden Arbeit sollte analysiert werden, ob die beobachteten prokoagulatorischen Aktivitäten von Nukleinsäuren von bestimmten Strukturmerkmalen wie Sequenz oder Sekundärstruktur der Substanzen abhängig sind. Des Weiteren sollte die Regulation des RNA/RNase-Systems unter pathologischen Bedingungen analysiert werden, wozu speziell Veränderungen der RNase 1-Expression unter inflammatorischen Bedingungen betrachtet wurden.

Im Verlauf der Untersuchungen sollten folgende Punkte im Detail bearbeitet werden:

1. Analyse der prokoagulatorischen Aktivität verschiedener synthetischer RNA- und DNA-Oligonukleotide sowie von Nukleinsäure-Aptameren mittels Gerinnungsexperimenten in humanem Plasma sowie im isolierten System
2. Ermittlung der Bindungsaffinitäten verschiedener synthetischer RNA- und DNA-Oligonukleotide zu Proteinen des intrinsischen Gerinnungsweges durch die Verwendung biotinylierter Oligonukleotide und Analyse der Proteinbindung

Die Bearbeitung der aufgeführten Punkte 1 und 2 sollte neue Einblicke in die Regulation des RNA/RNase-Systems im vaskulären System ermöglichen. Eine Abhängigkeit der prokoagulatorischen Aktivität von bestimmten Strukturmerkmalen der extrazellulären RNA könnte neue Bindungsmotive in RNA-Makromolekülen wie z.B. ribosomaler RNA identifizieren und somit die Kenntnisse der Nukleinsäure/Protein-Interaktionen erweitern. Der Nachweis von solchen Strukturbeziehungen könnte die Entwicklung therapeutisch verwendeter Nukleinsäuren verbessern, da eine mögliche Aptamer-vermittelte Aktivierung

des Kontaktphasesystems und damit verbundene thrombotische bzw. inflammatorische Komplikationen durch Vermeidung bestimmter Strukturelemente minimiert werden könnten.

3. Analyse von Veränderungen in der Expression und Sekretion von RNase 1 und RI in humanen Endothelzellen durch den Einfluss proinflammatorischer Substanzen (Thrombin, TNF α , LPS) mittels quantitativer PCR, Western Blot Analysen sowie In-Gel-Zymographien und RNase 1-Aktivitätstests
4. Analyse der Integrität von Zell-Zell-Verbindungen humaner Endothelzellen in Abhängigkeit der RNase 1-Expression anhand immunfluoreszenzmikroskopischer Methoden
5. Identifizierung der an der RNase 1-Expression beteiligten Signaltransduktionswege durch die Verwendung verschiedener Inhibitoren

Da die Applikation von RNase 1 durch verschiedene *in vivo* Studien in experimentellen Tiermodellen zu einer Inhibierung von RNA-vermittelten Prozessen führte, wurde in der hier vorliegenden Arbeit der Fokus auf die Regulation der endogen exprimierten RNase 1 unter inflammatorischen Bedingungen gelegt. Der Nachweis einer veränderten Expression von RNase 1 im Endothel unter inflammatorischen Bedingungen würde deren Rolle als natürlicher Gegenspieler von extrazellulärer RNA untermauern. Die Identifizierung beteiligter Signaltransduktionswege würde erste Erkenntnisse über die endogene Regulation dieses Enzyms liefern und somit auch Korrelationen mit inflammatorischen Erkrankungen erlauben.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Geräte

3.1.1 Chemikalien, Enzyme und Kits

Substanzen	Firma	Firmensitz
2x RNA Probenpuffer	Thermo Fisher Scientific (Fermentas)	Rockford (USA)
Acetyliertes Bovines Serum Albumin	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Aceton	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Aktivierter Faktor XII	American Diagnostica	Stanford (USA)
Albumin (aus Kälberserum)	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Ammoniumacetat	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Ammoniumchlorid	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Ammoniumsulfat	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Aqua ad iniectabilia	Braun	Melsungen (Deutschland)
BAY 11-7082	Enzo Life Sciences	Lörrach (Deutschland)
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (Pierce)	Rockford (USA)
Borsäure	Sigma Aldrich (Fluka)	Taufkirchen (Deutschland)
CasyTon Lösung	Schärfe Systems	Reutlingen (Deutschland)
Chromogene Substrate (S2366, S2302)	Haemochrom	Essen (Deutschland)
Developer	Agfa	Mortsel Belgien
D-Glucose	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
DNA-Marker (GeneRuler 100 bp DNA Ladder)	Thermo Fisher Scientific (Fermentas)	Rockford (USA)
DNA-Oligonukleotide für Gerinnungsexperimente	Biomers	Ulm (Deutschland)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Invitrogen (Gibco)	Darmstadt (Deutschland)
Dynabeads M-280 Streptavidin	Invitrogen	Darmstadt (Deutschland)
ECL Hyperfilme	GE Healthcare	Frankfurt (Deutschland)
ECL Plus Western Blot Detektiersystem	GE Healthcare	Frankfurt (Deutschland)
Endothelzellbasalmedium	Promo Cell	Heidelberg (Deutschland)
Endothelzellbasalmedium (EBM) 2	Lonza	Basel (Schweiz)
Endothelzellbasalmedium (EBM) 2 Supplement Kit	Lonza	Basel (Schweiz)
Endothelzellbasalmedium Supplement Mix	Promo Cell	Heidelberg (Deutschland)

Material und Methoden

Essigsäure	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Ethanol	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Ethidumbromid	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Faktor XI	American Diagnostica	Stanford (USA)
Faktor XII	American Diagnostica	Stanford (USA)
Fetales Kälberserumg (HyClone)	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
Fixierer	Agfa	Mortsel (Belgien)
Glycerin	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Glycin	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
GoTaq Green Mastermix	Promega	Madison (USA)
Hank's Balanced Salt Solution	Promo Cell	Heidelberg (Deutschland)
HEPES	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Hochmolekulares Kininogen	Haemochrom	Essen (Deutschland)
Humanes Präkallikrein	American Diagnostica	Stanford (USA)
Imidazol	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Interleukin-1-β	R&D Systems	Minneapolis (USA)
Isopropanol	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Kaliumchlorid	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Kaliumhydroxid	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Kalziumchloriddihydrat	Merck	Darmstadt (Deutschland)
Kollagenase	Worthington	Lakewood (Kanada)
Lanthanchlorid	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Magermilchpulver	Sigma Aldrich (Fluka)	Taufkirchen (Deutschland)
Magnesiumchloridhexahydrat	Merck	Darmstadt (Deutschland)
Magnesiumsulfat	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Methanol	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Natriumcarbonat	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Natriumchlorid	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphatdihydrat	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Natriumorthovanadat	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Natriumpolyphosphat	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Natronlauge	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Parthenolide	Merck	Darmstadt (Deutschland)
Penicillin-Streptavidin	Invitrogen (Gibco)	Darmstadt (Deutschland)
Perchlorsäure	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Polyribocytidyl-Polyriboinosinsäure (Poly I:C)	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)

Material und Methoden

Polyribocytidylsäure (Poly:C)	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Primer	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
Protaminsulfat	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten (Complete Mini)	Roche	Grenzach-Wyhlen (Deutschland)
Proteinmarker (PageRuler Prestained Protein Ladder)	Thermo Fisher Scientific (Fermentas)	Rockford (USA)
Psoralen-PEO-Biotin Reagenz	Thermo Fisher Scientific (Pierce)	Rockford (USA)
Quant-iT RNA Assay Kit	Invitrogen	Darmstadt (Deutschland)
Quant-iT RNA Assay Kit	Invitrogen	Darmstadt (Deutschland)
Rattenschwanzkollagen (Typ I)	BD	Heidelberg (Deutschland)
Rekombinanter Plättchenfaktor 4	Chromatek	Greifswald (Deutschland)
Ribonuklease A (bovin, rekombinant)	Thermo Fisher Scientific (Fermentas)	Rockford (USA)
RNA Aufreinigungs Kit (MasterPure)	Epicentre	Madison (USA)
RNA Isolations Kit (GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit)	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
RNA-Oligonukleotide	Purimex	Grebenstein (Deutschland)
RNaseZap	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium	Invitrogen (Gibco)	Darmstadt (Deutschland)
Rotiphorese Gel 30	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Salzsäure 1 mol/l- 1 N Lösung	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Salzsäure rauchend (37%)	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
SensiMix Sybr Reagenz	Bioline GmbH	Luckenwalde (Deutschland)
Serva Blue R	Serva	Heidelberg (Deutschland)
siRNA Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH)	Thermo Fisher Scientific (Dharmacon)	Rockford (USA)
siRNA Ribonuklease 1 (RNase 1)	Santa Cruz	Santa Cruz (USA)
siRNA Transfektionsreagenz	Santa Cruz	Santa Cruz (USA)
Sodiumdodecylsulfat ultra rein (SDS)	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Supplement Pack Endothelial Cell Growth Medium	Promo Cell	Heidelberg (Deutschland)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Thrombin	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
TMB Substrat Kit	Thermo Fisher Scientific (Pierce)	Rockford (USA)
Toluidinblau	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Trichostatin A (TSA)	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Tris	Roth	Karlsruhe (Deutschland)

Triton-X-100	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
TrypLE Express	Invitrogen (Gibco)	Darmstadt (Deutschland)
Tumornekrosefaktor α (TNF α)	R&D Systems	Minneapolis (USA)
Tween-20	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Ultra Reinstwasser	Biochrom	Berlin (Deutschland)
Vectashield Eindeckmedium mit DAPI	Vector Laboratories	Burlingame (Kanada)
Wasserstoffperoxid	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Zitronensäuremonohydrat	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Zytotoxizitätstest	Roche	Grenzach-Wyhlen (Deutschland)
β -Mercapthoethanol	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)

3.1.2 Geräte und sonstige Materialien

Geräte bzw. Materialien	Firma	Firmensitz
8-Well Chamber Slides (LabTek)	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
96-Well Platten für ELISA und Bindungsassays (MaxiSorp)	Thermo Fisher Scientific (Nunc)	Rockford (USA)
96-Well Platten für qPCR (ThermoFast 96 PCR Detection Plate)	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
96-Well Zellkulturplatten (steril)	Thermo Fisher Scientific (Nunc)	Rockford (USA)
Amicon Ultra Aufkonzentrierungsröhrchen (Ausschlussgröße 10 kDa)	Millipore	Billerica (USA)
Combitips plus	Eppendorf	Hamburg (Deutschland)
Deckgläser (24x60 mm)	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Dreivegehahn	Braun	Melsungen (Deutschland)
Eismaschine	Scotsman	Vernon Hills (USA)
Elektrophoresekammern für SDS-Gele	BioRad	München (Deutschland)
Elektrophoresekammern für vertikale Agarosegele	PeqLab	Erlangen (Deutschland)
Filterspitzen	Nerbe Plus GmbH	Winsen/Luhe (Deutschland)
Flüssigstickstoff	Linde	Pullach (Deutschland)
Flüssigstickstofftank	Messer	Bad Soden (Deutschland)
Fluoreszenzlesegerät für Mikrotiterplatten (Flx800)	BioTek Instruments	Bad Friedrichshall (Deutschland)
Gefrierbehälter (Nalgene Kryo 1°C Freezing Container)	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
Gel-Dokumentationsgerät mit Software	Intas	Göttingen (Deutschland)
Glasgefäße	Schott	Mainz (Deutschland)
Inkubationsmischer (TS1)	Biometra	Göttingen (Deutschland)

Material und Methoden

Inkubator für die Zellkultur (IR Sensor)	Sanyo	San Diego (USA)
KC4 Version 3.0 Power Reporter Software	BioTek Instruments	Bad Friedrichshall (Deutschland)
Knopfkanüle	NeoLab	Heidelberg (Deutschland)
Kreisschüttler (Rotamax120)	Heidolph	Schwabach (Deutschland)
Kryoröhrchen (Kryo Tube Vials)	Thermo Fisher Scientific (Nunc)	Rockford (USA)
Kühl- und Gefrierschränke	Bosch	Gerlingen-Schillerhöhe (Deutschland)
LaminAir Sterilbank	Thermo Fisher Scientific (Holten)	Rockford (USA)
Leica DMR Fluoreszenzmikroskop	Leica	Wetzlar (Deutschland)
Lesegerät für Mikrotiterplatten (EL808i Ultra)	BioTek Instruments	Bad Friedrichshall (Deutschland)
Magnetrührer mit Heizplatte (MR-Hei-Standard)	Heidolph	Schwabach (Deutschland)
Metamorph Imaging Software Version 7.0	Molecular Devices	Sunnyvale (USA)
Mikropipetten	Gilson	Limburg (Deutschland)
Mikroskop für die Zellkultur	Hund	Wetzlar (Deutschland)
Nadeladapter	NeoLab	Heidelberg (Deutschland)
Nitril-Handschuhe (Peha-Soft)	Hartmann	Oslo (Norwegen)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging	Chicago (USA)
PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf	Hamburg (Deutschland)
PCR-Thermocycler (T3000)	Biometra	Göttingen (Deutschland)
pH-Meter (Hi208)	HANNA	Kehl am Rhein (Deutschland)
Photopapier (K65HM-CE)	Mitsubishi Electric	Ratingen (Deutschland)
Plastikzentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml)	Sarstedt	Nürnberg (Deutschland)
PowerPac Universal	BioRad	München (Deutschland)
Qubit 2.0 Fluorometer	Invitrogen	Darmstadt (Deutschland)
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5 und 2 ml)	Eppendorf	Hamburg (Deutschland)
Reinstwasser-Aufbereitungssystem (Pure Lab Plus)	USF Eliga	Celle (Deutschland)
Roller Mixer (SRT9)	Stuart	Staffordshire (Großbritannien)
Schlauch	NeoLab	Heidelberg (Deutschland)
Spritzen (10 ml, 30 ml, 50 ml)	Braun	Melsungen (Deutschland)
Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,22 µm und 0,45 µm)	Millipore	Billerica (USA)
StepOnePlus Real-time PCR System	Applied Biosystems	Carlsbad (USA)
Sterile Einwegpipetten für die Zellkultur	Greiner Bio-One	Frickenhausen (Deutschland)
Tischzentrifuge (Fresco17)	Thermo Fisher Scientific (Heraeus)	Rockford (USA)
Tischzentrifuge (Mikro200)	Hettich	Tuttlingen (Deutschland)

UV-transparente Küvetten	Sarstedt	Nürnberg (Deutschland)
Vakuum-Absaugpumpe (Vario18)	Medela	Eching (Deutschland)
Versiegelungsfolie für qPCR-Platten (Absolute qPCR Seal)	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
Vortexer (Charley2)	Süd-Laborbedarf GmbH	Gauting (Deutschland)
Waage (SI-2002)	Denver Instruments	Bohemia (USA)
Wasserbad	Memmert	Schwabach (Deutschland)
Zellkulturschalen (6-Well)	Greiner Bio-One	Frickenhausen (Deutschland)
Zellkulturschalen (Cell Star; 10 cm Durchmesser)	Greiner Bio-One	Frickenhausen (Deutschland)
Zellschaber	Sarstedt	Nürnberg (Deutschland)
Zellzähler (CASY Cell Counter Systems)	Schärfe Systems	Reutlingen (Deutschland)
Zentrifuge (Labofuge 400R)	Thermo Fisher Scientific (Heraeus)	Rockford (USA)
Zentrifuge (Rotina 46R)	Hettich	Tuttlingen (Deutschland)

3.1.3 Antikörper

Primär-Antikörper

Antikörper	Firma	Firmensitz
ICAM-1 (rabbit polyclonal anti-human ICAM-1)	New England Biolabs (Cell Signaling)	Frankfurt (Deutschland)
IgG-Kontrolle goat	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
IgG-Kontrolle mouse	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
IgG-Kontrolle rabbit	Dianova GmbH	Hamburg (Deutschland)
β-Aktin (mouse anti-human-β-Aktin)	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
RNase Inhibitor (goat polyclonal anti-human RNase Inhibitor)	Santa Cruz	Santa-Cruz (USA)
RNase 1 (chicken polyclonal anti-human RNase 1)	Sigma Aldrich (Genway)	Taufkirchen (Deutschland)
RNaseA (rabbit polyclonal anti-bovine RNaseA)	Polyscience	Eppelheim (Deutschland)
VE-Cadherin (rabbit polyclonal anti-human VE-Cadherin)	Enzo Life Sciences (Alexis)	Lörrach (Deutschland)

Sekundär-Antikörper

Antikörper	Firma	Firmensitz
Alexa Fluor 488 Donkey anti-goat IgG	Invitrogen	Darmstadt (Deutschland)
Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse IgG	Invitrogen	Darmstadt (Deutschland)
Alexa Fluor 568 Goat anti-rabbit IgG	Invitrogen	Darmstadt (Deutschland)
Donkey polyclonal anti-chicken IgG-HRP	Millipore	Billerica (USA)
Goat polyclonal anti-mouse IgG-HRP	Dako	Hamburg (Deutschland)
Rabbit polyclonal anti-rabbit IgG-HRP	Dako	Hamburg (Deutschland)
Rabbit polyclonal anti-goat IgG-HRP	Dako	Hamburg (Deutschland)

3.1.4 Oligonukleotide für Gerinnungsversuche

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
<i>Group A: DNA-Oligonucleotides</i>	
21mer-L	AAGAATACGACCACCTAGCTC
21mer-H1	GGGAATGGGTATTCCCATCCC
21mer-H2	GGGATGGGAATACCCATTCCC
21mer-H3	AGTCTCAGTTGCGACTGAGAC
45mer	AGTACAAGAAGCTTACCAGCGAACTCAGTAGTCT GATATATAACC
15mer-Thrombin (Aptamer)	GGTTGGTGTGGTTGG
44mer-ProteinC (Aptamer)	CCTAACTGAGCTGTA CTGACTCGACTTATCCCGGATGG GGCTCTTAGG
<i>Group B: RNA-Oligonucleotides</i>	
21mer-L	AAGAAUACGACCACCUAGCUC
21mer-H1	GGGAAUGGGUAAUCCCAUCCC
21mer-H2	GGGAUGGGAAUACCCAUCCC
21mer-H3	AGUCUCAGUUGCGACUGAGAC
45mer	AGUACAAGAAGCUUACCAGCGA ACUCAGUAGUCUGAUUAUAACC

3.2 Zellkulturtechnische Methoden

3.2.1 Einführung in die verwendeten Zelltypen

3.2.1.1 HUVEC (human umbilical vein endothelial cells)

Bei HUVEC handelt es sich um primäre Endothelzellen, die, wie unter 3.2.3 beschrieben, aus humanen Nabelschnurvenen isoliert wurden. Sie dienen als Standardmodell für makrovaskulär-orientierte Experimente, z.B. zur Analyse des Gefäßwachstums, aber auch für zellabhängige Gerinnungs- und Fibrinolysexperimente. Charakteristische Marker dieser

Zellen sind von Willebrand Faktor, CD31 und VE-Cadherin. Für die hier beschriebenen Experimente wurden HUVEC bis Passage 3 verwendet.

HUVEC-Medium

Endothelial Cell Basal Medium
5% Fetales Kälberserum (FCS) (v/v)
1% Penicillin/Streptomycin (v/v)
Supplement Pack:
• 0,1 ng/ml Epidermal Growth Factor
• 1 ng/ml Basic Fibroblast Growth Factor
• 1 µg/ml Hydrocortison

3.2.2 Kultivierung von Zellen

Um die Zellen dauerhaft in Kultur halten zu können, mussten sie alle drei bis vier Tage (bzw. bei 80-90% Konfluenz) auf neue Kulturschalen aufgeteilt werden.

Adhärente Zellen wie HUVEC wurden zweimal mit sterilem Phosphatpuffer (PBS, *Phosphate-buffered saline*) gewaschen und mit 1 ml TrypLE Express im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ von der Kulturschale abgelöst. Das Abstoppen dieser Reaktion erfolgte durch Zugabe von 10 ml Wachstumsmedium. Das durch Zentrifugation bei 250 x g für 5 Minuten (min) erhaltene Zellpellet wurde in 1 ml Wachstumsmedium resuspendiert und wiederum 200 µl davon mit 10 ml Wachstumsmedium in eine neue, mit Rattenschwanzkollagen (50 µg/ml) beschichtete Kulturschale überführt (Verhältnis 1:5).

Die Zellen inkubierten im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und erreichten nach drei bis vier Tagen erneut 80-90% Konfluenz.

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

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

3.2.3 Isolierung von primären Endothelzellen aus der Nabelschnurvene

Die Isolierung von primären Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) wurde erstmals beschrieben von Jaffe et al. 1973²⁵⁴. Die Nabelschnüre wurden innerhalb von 24 Stunden (h) nach der Entbindung bearbeitet. Nach einer Untersuchung auf Verletzungen und der Säuberung mit einer sterilen Kompresse wurde ein Ende mit einem sterilen Skalpell um 1 cm gekürzt, eine Knopfkanüle in die Vene eingeführt und mit einem Kabelbinder fixiert. Nach der Verbindung der Kanüle mit einem

Dreiwegehahn erfolgte ein einmaliges Spülen der Vene mit 50 ml *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS, PromoCell). Am anderen Ende der Nabelschnurvene wurde ein mit einem Stück Schlauch verbundener Nadeladapter eingeführt und mit einem Kabelbinder fixiert. Der Schlauch wurde mit einer Klemme verschlossen und über den Dreiwegehahn Kollagenaselösung (0,05% w/v in HBSS) in die Vene eingespritzt. Nach einer Inkubationszeit von 18 bis 20 min bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank wurden die abgelösten Endothelzellen mit 30 ml HBSS aus der Nabelschnurvene in ein 50 ml Röhrchen mit 1 ml FCS überführt. Durch Zentrifugation (5 min bei 250 x g) wurden die Zellen pelletiert, in 10 ml HUVEC Wachstumsmedium mit 20% FCS resuspendiert und in eine mit Rattenschwanzkollagen (50 µg/ml) beschichtete Schale ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 10 ml HUVEC Wachstumsmedium hinzugegeben.

3.2.4 Einfrieren der Zellen (Kryokonservierung)

Gefrierkulturen ermöglichten eine langfristige Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff. Hierzu wurde das Medium 24 h vor dem Anlegen der Kultur erneuert und zwei Lösungen zum Einfrieren hergestellt, die durch einen 0,22 µm Spritzenvorsatzfilter steril filtriert wurden:

Lösung A: Wachstumsmedium mit 20% DMSO (v/v)

Lösung B: Wachstumsmedium mit 40% FCS (v/v)

500 µl von Lösung A wurden in sterile Kryoröhrchen überführt und auf Eis gekühlt. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden diese durch Inkubation mit 1 ml TrypLE Express bei 37°C, 5% CO₂ im Brutschrank von der Kulturschale gelöst und die Reaktion durch Zugabe von 10 ml Wachstumsmedium gestoppt. Das durch Zentrifugation (250 x g; 5 min) erhaltene Zellpellet wurde in 1 ml kalter Lösung B resuspendiert und 500 µl der Zellsuspension in die vorbereiteten Kryoröhrchen überführt, sodass die Zellsuspension eine Endkonzentration von 10% DMSO (v/v) und 20% FCS (v/v) aufwies. Zum langsamen Einfrieren wurden die Kryoröhrchen für mindestens 2 h in einen mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter bei -80°C aufbewahrt. Durch die Lagerung in Isopropanol kühlte die Zellsuspension mit einer Abkühlrate von -1°C/min auf -80°C herunter, damit sie anschließend für eine dauerhafte Lagerung in einen Flüssigstickstofftank überführt werden konnte.

3.2.5 Auftauen der Zellen

Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde das entsprechende Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C unter ständigem Schütteln aufgetaut und in 10 ml Wachstumsmedium überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (250 x g; 5 min) pelletiert, in 10 ml frischem Wachstumsmedium aufgenommen und in eine mit Rattenschwanzkollagen (50 µg/ml) beschichtete Schale ausgesät. Die Zellen inkubierten im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und erreichten nach 1 bis 3 Tagen 80-90% Konfluenz, sodass sie, wie unter 3.2.2 beschrieben, auf neue Kulturschalen aufgeteilt werden konnten.

3.2.6 Bestimmung der Zellanzahl

Damit die Zellen für die entsprechenden Experimente genau ausgesät werden konnten, musste die Zellanzahl bestimmt werden. Hierzu wurden die Zellen trypsinisiert und pelletiert (siehe 3.2.2). Das Zellpellet wurde dann in 1 ml PBS aufgenommen und 20 µl dieser Suspension in 10 ml *CasyTon*-Lösung (*Schärfe Systems*) überführt. Die Zellanzahl wurde mit Hilfe des *CasyCounters* (*Schärfe Systems*) bestimmt. Der abgelesene Messwert beschrieb die Zellkonzentration pro ml *CasyTon*-Lösung. Die Zellanzahl in der Originallösung wurde durch folgende Formel berechnet:

$$\text{Zellanzahl pro ml} = \text{Zellkonzentration in CasyTon} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.2.7 Stimulation und Ernten der Zellen

Zur Stimulation wurden die Zellen 4 h zuvor mit PBS gewaschen und in Medium ohne FCS gesetzt. Nach Zugabe der Stimuli und der Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) für die angegebenen Zeiten wurden die Überstände gesammelt und bei 250 x g 4°C abzentrifugiert um abgestorbene Zellen zu entfernen. Im Anschluss daran lagerten die Überstände bis zur weiteren Verwendung bei -20°C. Die Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS entweder für Protein- (siehe 3.4.1) oder Genexpressionsanalysen (siehe 3.3.2) lysiert und bei -20°C gelagert.

3.2.8 Zytotoxizitätstest

Die Bestimmung der Aktivität des Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) im Zellüberstand ist eine gängige Methode, um zytotoxische Effekte von Stimulanzen auf Zellen auszuschließen. Erhöhte LDH-Aktivität im Blut oder im Zellüberstand ist hierbei ein Indikator für Zell- und Gewebeschäden²⁵⁵. Die LDH katalysiert im ersten Schritt die Oxidation von Lactat zu Pyruvat bei gleichzeitiger Reduktion von NAD⁺ zu NADH/H⁺. Im zweiten Schritt überträgt der im Substratmix enthaltene Katalysator Diaphorase die Reduktion des Tetrazoliumsalzes Iodonitrotetrazoliumchlorid zu Formazan unter Oxidation von NADH/H⁺. Hierbei korreliert die Menge an gebildetem Formazan direkt mit der LDH-Aktivität im Zellüberstand und somit mit der Zytotoxizität des Stimulus²⁵⁶.

Um die Zytotoxizität von Stimulanzen auf Zellen zu testen, wurden diese auf 96-Well-Platten ausgesät, bis zur Konfluenz bei 37°C, 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert und anschließend mit den entsprechenden Stimulanzen behandelt. Als Positivkontrolle diente 0,1% Triton-X-100 (v/v) und als Negativkontrolle unbehandeltes Medium. Die durch Zentrifugation bei 250 x g für 10 min erhaltenen zellfreien Überstände wurden in eine neue 96-Well-Platte überführt und pro Well 100 µl *LDH-Substratmix* von *Roche* zugegeben. Die Bildung von Formazan wurde bei einer Absorption von 500 nm detektiert.

Die Berechnung der prozentualen Zytotoxizität erfolgte nach folgender Formel aus den gemessenen Absorptionen der Kontrollen sowie der Stimulationen:

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{\text{Stimulation} - \text{Negativkontrolle}}{\text{Positivkontrolle} - \text{Negativkontrolle}} \times 100$$

3.2.9 Transfektion von Zellen mit siRNA

Die Zellen wuchsen in 6-Well Platten in Wachstumsmedium bis zu einer Konfluenz von 60-70%. Die Transfektionsmethode basiert auf der Komplexbildung zwischen den im Transfektionsreagenz vorhandenen kationischen Lipiden und der siRNA (*small interfering RNA*). Dieser Komplex wird endozytotisch von der Zelle aufgenommen^{257,258}. Nach der Freisetzung der siRNA in das Zytoplasma penetriert diese in den Zellkern und kann dort an ihre Ziel-mRNA binden und das entsprechende Protein herunterregulieren^{68,259}.

Um die Effizienz dieser Reaktion zu optimieren, wurden verschiedene Verhältnisse zwischen Transfektionsreagenz und siRNA getestet, wobei die für HUVEC optimale siRNA-vermittelte

Herunterregulation mit Endkonzentrationen von 50 nM siRNA und 0,4% (v/v) Transfektionsreagenz erreicht wurde. Beide Substanzen wurden in Basalmedium in einem Endvolumen von je 100 µl verdünnt und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min hatten sich Lipid-Nukleinsäure-Komplexe gebildet, welche zusammen mit 800 µl Antibiotika-freiem Basalmedium auf die Zellen getropft wurden. Nach 4 h wurde das Transfektionsmedium verworfen und 2 ml Wachstumsmedium zugegeben. 24 h bis 48 h nach der Transfektion konnten die Zellen verwendet werden.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA-Isolation aus Zellüberständen

Zur Quantifizierung des RNA-Gehalts von Zellüberständen wurden die darin enthaltenen RNasen durch die Zugabe von 80 U/ml RNase Inhibitor direkt nach dem Ernten inhibiert und die Proben bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Isolation der RNA erfolgte mit dem *MasterPure RNA Purification Kit* von *Epicentre*. Um vorhandene Proteine zu verdauen, wurden 100 µl Zellüberstand mit 400 µl *Tissue and Cell Lysis Solution* und 50 µg *Proteinase K* versetzt und 15 min bei 65°C inkubiert. Nach einer weiteren 15-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proteine durch Zugabe von 250 µl *MPC Protein Precipitation Reagenz* ausgefällt und durch zweimaliges Zentrifugieren (10.000 x g; 10 min; 4°C) pelletiert. Die Nukleinsäuren wurden aus dem proteinfreien Überstand durch Zugabe von 600 µl eiskaltem Isopropanol ausgefällt und durch einen Zentrifugationsschritt (10.000 x g; 10 min; 4°C) pelletiert. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem 70% Ethanol wurde das Nukleinsäurepellet getrocknet und in 30 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst.

Zur Quantifizierung der RNA wurde das *QubitTM RNA Assay Kit* von *Invitrogen* verwendet. Hierzu wurden die im Kit enthaltenen Puffer *RNA Buffer A* und *RNA Buffer B* im Verhältnis 1:200 zu einem Arbeitsreagenz gemischt. Das Arbeitsreagenz enthält einen Farbstoff, welcher nach Bindung an die in der Probe enthaltene RNA, aber nicht an DNA, fluoresziert und diese so spezifisch mit einem Fluorometer detektiert werden kann. Als Standards dienen die im Kit enthaltenen RNA-Standards #1 (Negativkontrolle) bzw. #2 (Positivkontrolle). Standards und Proben wurden im Verhältnis 1:200 mit Arbeitsreagenz gemischt. Anschließend erfolgten eine zweiminütige Inkubation bei Raumtemperatur sowie die Bestimmung der RNA-Konzentration unter Verwendung des *QubitTM Fluorometers* von *Invitrogen*.

Die RNA-Konzentration im Überstand wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration (ng/ml)} = \frac{\text{Messwert (ng/ml)} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Eingesetztes Volumen (\mu l)}}$$

3.3.2 RNA-Isolation aus Zell-Lysaten

Für die RNA-Isolation aus Zellen wurde das *GenElute™ Mammalian Total RNA Kit* von *Sigma* verwendet. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden diese mit 250 μ l Lysispuffer lysiert und eventuell noch vorhandene Zellbestandteile im Lysat durch eine Zentrifugation (14.000 x g; 2 min) durch Filtrationssäulen zerkleinert. Diese wurden verworfen, der Durchfluss mit 250 μ l 70% Ethanol versetzt und auf eine RNA-bindende Silica-Säule pipettiert. Durch Zentrifugation für 30 Sekunden (sec) bei 14.000 x g konnte die RNA an die Säule binden. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule einmal mit *Waschpuffer 1* und zweimal mit *Waschpuffer 2* gewaschen. Nach Abschluss der Waschschrirte wurde die Säule trocken zentrifugiert (14.000 x g; 2 min) und die RNA anschließend mit 30 μ l *Elutionspuffer* von der Säule eluiert. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (siehe 3.3.3).

3.3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration isolierter Nukleinsäuren wurde mit Hilfe eines UV-Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt, da einzel- und doppelsträngige Nukleinsäuren bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum aufweisen.

Für die Messung wurde die Probe mit destilliertem Wasser verdünnt, in eine Küvette überführt und die Absorption gegen destilliertes Wasser als Referenzwert bestimmt. Die Nukleinsäurekonzentration einer Probe kann durch eine Multiplikation der Absorption bei 260 nm mit dem Verdünnungsfaktor sowie einem Nukleinsäure-spezifischen Multiplikationsfaktor (MF) berechnet werden, der sich aus den Konzentrationen der Nukleinsäuren bei einem pH-Wert von 7,0 und der Absorption $A_{260\text{nm}} = 1,0$ ergibt:

dsDNA	50 μ g/ml
ssDNA	30 μ g/ml
RNA	40 μ g/ml
Oligonukleotide	30 μ g/ml

Somit ergibt sich folgende Formel zur Berechnung der Nukleinsäurekonzentration:

$$\text{Nukleinsäurekonzentration } (\mu\text{g/ml}) = A_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{MF}$$

Die Reinheit der Probe lässt sich durch Bestimmung des Verhältnisses $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ ermitteln: Ein Verhältnis im Bereich von 1,8 – 2,0 zeigt eine reine Nukleinsäurelösung ohne Verunreinigungen durch Proteine an.

3.3.4 Biotinylierung von isolierter RNA

Um die Bindung von RNA an Proteine analysieren zu können (siehe 3.4.7), wurde diese, wie unter 3.3.2 beschrieben, aus Zellen isoliert und mit dem *Psoralen-PEO-Biotin Reagenz* (Pierce) biotinyliert. Hierfür wurden 20 nM Biotin mit 1 mg RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 500 μl eingestellt und für 30 min mit UV-Licht bei 366 nm inkubiert. Nach Zugabe von 50 μl Natriumacetat und 1,25 ml Ethanol sowie einer Inkubation über Nacht bei -20°C erfolgte ein Zentrifugationsschritt (12.000 x g; 30 min; 4°C). Nach einmaligen Waschen mit 70% Ethanol wurde das Pellet in Nuklease-freiem Wasser resuspendiert, die Integrität der RNA durch eine Gelelektrophorese mit einem 1% TAE-Agarose-Gel (siehe 3.3.9) bestätigt und deren Konzentration photometrisch bestimmt (siehe 3.3.3). Die Biotinylierung wurde durch eine „Dot Blot“-Analyse kontrolliert.

3.3.5 „Dot-Blot“-Analyse

Das „Dot-Blot“-Verfahren ermöglicht die Übertragung biotinylierter Nukleinsäuren auf eine Nitrocellulosemembran sowie deren Detektion mit immunchemischen Methoden.

Zuerst wurde die Dot Blot-Apparatur mit 70%igem Ethanol gereinigt, um eventuelle Kontaminationen zu entfernen. Eine Nitrozellulose-Hybond-N-Membran wurde für 10 min in „Dot-Blot“-Bindungspuffer gelegt und die zu analysierende RNA mit den gewünschten Konzentrationen in einem Gesamtvolumen von je 100 μl in PBS angesetzt. Nach dem Zusammenbau der Apparatur mit der dazwischenliegenden Membran wurde es an eine Pumpe angeschlossen und die Proben in die vorgesehenen Öffnungen der Apparatur pipettiert. Die angeschlossene Pumpe saugte überschüssige Flüssigkeit durch die Membran innerhalb von 10-15 min ab, was zu einer Fixierung der enthaltenen Nukleinsäuren auf der Membran führte. Nach einmaligem Waschen mit Bindungspuffer erfolgte eine 10-minütige Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm), gefolgt von einem weiteren Waschschrift in

Bindungspuffer und einer einstündigen Inkubation der Membran mit Streptavidin-gekoppelter Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP), die 1:5000 in Bindungspuffer verdünnt war. Streptavidin bindet mit sehr hoher Affinität an Biotin. Die an das Streptavidin gekoppelte HRP ermöglichte den Nachweis biotinylierter Nukleinsäuren auf der Membran mittels eines HRP-Substrats. Dazu wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit Bindungspuffer gewaschen und durch Verwendung der *Super Signal West Pico Chemilumineszenz Substrat-Lösung* (Pierce) entwickelt, indem die im Kit enthaltenen Lösungen 1:1 gemischt und 5 min auf der Membran inkubiert wurden. Die Lösung enthält Luminol, welches von der an das Streptavidin gekoppelten HRP oxidiert wird und dabei ein Chemilumineszenzsignal abgibt. Zur Signaldetektion wurden Röntgenfilme aufgelegt und in einem Entwicklerbad mit anschließender Fixierung entwickelt.

„Dot Blot“-Bindungspuffer	
Tris/HCl (1M, pH 7,6)	1% (v/v)
EDTA (500 mM)	0,2 % (v/v)
50x Denhards	2% (v/v)
Natriumchlorid (1M)	5% (v/v)

50x Denhards	
Ficoll-PM-400	1% (v/v)
Polyvinylpyrrolidone	1% (w/v)
BSA	1% (w/v)

3.3.6 cDNA-Synthese

Bei der cDNA (*complementary DNA*) handelt es sich um eine komplementäre DNA-Kopie eines RNA-Templates, sodass sie wie das RNA-Template keine Intron-Exon-Struktur mehr aufweist. Unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (siehe 3.3.7) kann die cDNA vervielfältigt und die Expressionrate der zugrundeliegenden RNA analysiert werden. Dadurch sind Unterschiede zwischen Geweben bzw. verschiedenen Stimulationen nachweisbar. Des Weiteren wird die cDNA für Klonierungen und die Herstellung rekombinanter Proteine verwendet.

Die cDNA-Synthese erfolgte unter Verwendung des *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems). Hierbei synthetisiert das Enzym *Reverse Transkriptase* aus RNA die komplementäre cDNA, wobei kurze, zufällige DNA-Sequenzen, sogenannte Random Primer, die Bindung der reversen Transkriptase an die RNA vermitteln. Die Zugabe von RNase Inhibitor in den Reaktionsansatz schützte die RNA

während der Reaktion vor einem Verdau durch Ribonukleasen. In allen Reaktionen musste die gleiche RNA-Menge (300 ng in 10 µl Endvolumen) verwendet werden, um die Expressionsraten der RNAs vergleichbar zu machen.

Für die Synthese wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Reaktionsansatz	
10x Puffer	2 µl
Random Primer	1 µl
dNTP (100 mM)	0,8 µl
RNase Inhibitor (40U/ml)	0,25 µl
Reverse Transkriptase	0,5 µl
Wasser	5,45 µl
Endvolumen	10 µl

Es wurden 10 µl dieses Reaktionsansatzes mit 10 µl RNA-Lösung (enthielt 300 ng RNA) gemischt und im Thermocycler 10 min bei 25°C, 60 min bei 42°C und 15 min bei 72°C inkubiert. Aufgrund ihrer hohen Stabilität kann cDNA bei -20°C langfristig gelagert werden.

3.3.7 Semi-quantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*; PCR) ermöglicht durch drei aufeinanderfolgende Reaktionsschritte mit unterschiedlichen Temperaturstufen die exponentielle Amplifikation von Nukleinsäuren.

Zunächst denaturiert man die DNA für 3 min bei 95°C, was zur Aufschmelzung der doppelsträngigen in eine einzelsträngige DNA-Struktur führt und im nächsten Schritt („Annealing“) die Bindung von kurzen DNA-Oligonukleotiden, den Primern, ermöglicht. Hierfür wird das Reaktionsgemisch auf eine primerspezifische Temperatur (zwischen 55 und 65°C) für 30 sec abgekühlt. Die Bindung der Primer erzeugt ein doppelsträngiges DNA-Fragment mit freiem 3'OH-Ende, das im dritten Schritt („Elongation“) bei einer Temperatur von 72°C durch die DNA-Polymerase verlängert wird. Die Verwendung von zwei Primern (jeweils für den *sense*- und den *antisense*-Strang), welche den zu analysierenden DNA-Abschnitt flankieren, führt mit jedem Zyklus zu einer Verdopplung des gewünschten DNA-Abschnitts. Die mehrfache Wiederholung dieser Schritte ermöglicht eine exponentielle Amplifikation der DNA.

Für eine semi-quantitative PCR wurde ein Reaktionsgemisch aus folgenden Komponenten hergestellt:

Reaktionsansatz	
GoTaq Green Mastermix (Promega)	5 µl
Forward Primer (10 µM)	0,4 µl
Reverse Primer (10 µM)	0,4 µl
Wasser	3,2 µl
cDNA	1 µl
Endvolumen	10 µl

Der *GoTaq Green Mastermix (Promega)* enthielt die für die PCR-Reaktion benötigte Taq-Polymerase, dNTPs sowie einen grünen Probenpuffer, durch den die Proben nach der PCR-Reaktion direkt auf ein Agarosegel aufgetragen werden konnten.

Die Reaktion fand im Thermocycler unter folgenden Bedingungen statt:

PCR-Bedingungen		
3 min	95°C	Denaturierung
x Zyklen		
30 sec	95°C	Denaturierung
30 sec	x°C	Annealing
30 sec	72°C	Elongation
10 min	72°C	Endelongation
Pause	4°C	Kühlung

Die Anzahl der Zyklen und die Annealing-Temperatur wurden den optimalen Bedingungen der einzelnen Gene angepasst:

Gen	Sequenz (5'-3')	Annealing-temperatur	Zyklen	Produktgröße
GAPDH (NM_002046.3)	F: CCACATCGCTCAGACACCAT R: CGCAACAATATCCACTTTACCAGA	60°C	20	113 bp
RNase Inhibitor (NM_002939.3)	F: AAGTGGTCAGGCTGGACGACT R: TCAGGCAGCAGTTCTGGAGG	56,4 °C	25	201 bp
RNase 1 (NM_198235.2)	F: GAATCCCGGGCCAAGAAATTC R: GTGTCTCTCCTTCGGGCTGGT	56,4°C	24	312 bp
β-Aktin (NM_001101.3)	F: ATTGCCGACAGGATGCAGAA R: GCTGATCCACATCTGCTGGAA	56,4 °C	20	150 bp

3.3.8 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Analyse von DNA-Fragmenten. Hierzu wurden 1,5 g Agarose in 100 ml Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) aufgekocht, mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml) und in die dafür vorgesehene Gießvorrichtung gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurden 5 µl PCR-Probe bzw. 5 µl

der *GeneRuler 100 bp DNA-Ladder (Fermentas)* als Marker pro Tasche aufgetragen. Durch die Verwendung des *GoTaqGreen Mastermixes (Promega)* bei der semi-quantitiven PCR war keine Zugabe von Probenpuffer nötig. Die Elektrophorese erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 100 V für 45 min, wobei das Ethidiumbromid mit der DNA interkaliert und die PCR-Produkte so mittels UV-Bestrahlung detektiert und dokumentiert werden können.

TAE (Tris-Acetat-EDTA): pH 8,5	
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	8,2 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM

3.3.9 Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Um den Verdau der RNA durch Ribonukleasen zu verhindern, wurde die Gelapparatur vor der Benutzung gründlich mit Wasserstoffperoxid gereinigt. Anschließend wurde, wie unter 3.3.8 beschrieben, ein 1,5% Agarosegel gegossen, wobei autoklavierter TAE-Puffer verwendet wurde. Ein 1:1 Gemisch aus RNA und zweifach konzentriertem RNA-Probenpuffer wurde 10 min bei 70°C erhitzt und auf das Gel geladen. Als Marker wurden 5 µl DNA-Marker (*GeneRuler 100 bp DNA-Ladder, Fermentas*) verwendet und die Elektrophorese sowie die Dokumentation, wie unter 3.3.8 beschrieben, durchgeführt.

3.3.10 Quantitative Real-time PCR

Die quantitative Real-time PCR beruht auf dem Prinzip der unter 1.3.3 beschriebenen PCR-Methode. Durch die Anwesenheit des interkalierenden Farbstoffes *SybrGreen®* ist es möglich, die Amplifizierung von Nukleinsäuresequenzen unter Echtzeitbedingungen zu messen. *SybrGreen®* lagert sich während der Synthese in die neugebildeten DNA-Fragmente ein und wird durch Fluoreszenzmessungen detektiert. Hierbei steigt das Fluoreszenzsignal proportional zur Menge des gebildeten PCR-Produkts.

Zur Auswertung wurde der Ct-Wert (*Cycle-Threshold*) bestimmt. Dieser beschreibt den Reaktionszyklus, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über einen gewählten Schwellenwert (*Threshold*) ansteigt. Als Bezugsgröße wurde für jede cDNA neben dem zu analysierenden Gen auch ein Haushaltsgen (hier Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase, GAPDH) amplifiziert, dessen Expression sich während der Stimulation nicht verändert. Aus den Ct-Werten wurde ΔCt als Differenz der Ct-Werte des zu analysierenden Gens und GAPDH berechnet. Die so normalisierten Werte wurden verwendet, um unbehandelte mit behandelten Proben zu vergleichen, indem $\Delta\Delta Ct$ als Differenz zwischen

Kontrolle und Stimulation berechnet und die n-fache Änderung der Genexpression folgendermaßen angegeben wurde:

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

Um die Spezifität der Reaktion sicherzustellen, wurden die Schmelzkurven analysiert.

Für eine Real-time PCR wurde ein Reaktionsgemisch aus folgenden Komponenten hergestellt:

Reaktionsansatz	
2x SensiMix (Bioline)	10 µl
Forward Primer (10 µM)	0,175 µl
Reverse Primer (10 µM)	0,175 µl
Wasser	8,65 µl
cDNA	1 µl
Endvolumen	20 µl

Der 2x SensiMix von *Bioline* enthält die für die PCR nötige Polymerase, dNTPs sowie den interkalierenden Farbstoff *SybrGreen®*.

Die Reaktion fand in einem speziellen Thermocycler statt, der die entstehenden Fluoreszenzsignale detektierte. Die Reaktion fand unter folgenden Bedingungen statt:

Real-time PCR-Bedingungen		
8.5 min	95°C	Denaturierung
40 Zyklen		
30 sec	95°C	Denaturierung
30 sec	59°C	Annealing
30 sec	72°C	Elongation

Die Primer für die Real-time PCR-Reaktionen sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Gen	Sequenz (5'-3')	Annealing-temperatur	Produktgröße
RNase 1 (NM_002933.4)	F: GCTGCAGATCCAGGCTTTTCTGGG R: GCTGCTGCTGGGGGAAGTCTGTC	59°C	188 bp
RNase Inhibitor (NM_002939.3)	F: AAGTGGTCAGGCTGGACGACT R: TCAGGCAGCAGTTCTGGAGG	59°C	201 bp
GAPDH (NM_002046.3)	F: CCACATCGCTCAGACACCAT R: CGCAACAATATCCACTTTACCAGAG	59°C	114 bp

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Herstellung von Zell-Lysaten

Um die Proteinexpression verschieden stimulierter Zellen zu vergleichen, wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit kaltem PBS durch Zugabe von 80 µl (6-Well Zellkulturplatte) bzw. 250 µl (10 cm Zellkulturschale) RIPA-Puffer (*Radio-immunoprecipitation-assay*) lysiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

RIPA-Puffer (Radio-immunoprecipitation-assay)	
Tris/HCl (pH 7,4)	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
Triton-X-100	1% (w/v)
Sodiumdeoxycholate	1% (w/v)
SDS (10%)	0,1% (v/v)
Protease Inhibitor Cocktail	1 Tablette pro 10 ml Puffer
Lagerung	-20°C
Direkt vor Verwendung zugeben:	
Natriumorthovanadat	1 mM
PMSF	0,5 mM

3.4.2 Konzentrierung von Zellüberständen

Um die im Zellüberstand vorhandenen Proteine untersuchen zu können, musste das Volumen der Zellüberstände reduziert und die Proteinkonzentration erhöht werden. Dazu wurden die Überstände in Aufkonzentrierungsröhrchen (Milipore) mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa überführt und bei 4.000 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und das Konzentrat dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen, um störende Salze zu entfernen. Anschließend wurde es auf ein Endvolumen von 50-100 µl eingestellt.

3.4.3 Proteinbestimmung

Damit die Proteinkonzentration in Lysaten und Überständen von Zellen bestimmt werden konnte, wurden die Proben bei 10.000 x g und 4°C für 10 min abzentrifugiert, um vorhandene Überreste von Zellmembranen zu pelletieren und zu verwerfen. Es wurden 5 µl der Überstände und 2,5 µl der Lysate für die Proteinbestimmung in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Als Standards dienten je 5 µl verschiedener Konzentrationen an Bovinem Serum Albumin (BSA) (Eichkurve: 0, 125, 250, 500, 750, 1.000, 1.500, 2.000 µg/ml). Zur Bestimmung des Proteingehalts wurden pro Well 100 µl der

Reaktionslösung des *Thermo Scientific Pierce BCA-Proteinassay* zugegeben und die Proben 30 min bei 37°C inkubiert. Die Methode beruht auf der sogenannten Biuret-Reaktion, bei der Cu^{2+} durch Proteine in alkalischem Milieu zu Cu^{1+} reduziert wird. Cu^{1+} bildet einen violetten Chelat-Komplex mit Bicinchoninsäure, dessen Absorption bei 562 nm photometrisch detektiert werden kann^{260,261}. Anhand der aus der BSA-Standardgeraden abgeleiteten Geradengleichung wird der Proteingehalt der unbekanntenen Proben berechnet.

3.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz, das fast alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen innerhalb nativer Proteine zerstört. Es bindet ca. ein SDS-Anion pro zwei Aminosäuren. Das Protein erhält eine stark negative Ladung, die größer als die Eigenladung des Proteins und proportional zu seiner Masse ist. Zusätzlich werden durch die Zugabe von 10% β -Mercaptoethanol Disulfidbrücken reduziert. Das Laufverhalten des Proteins innerhalb des Polyacrylamidgels wird so durch seine Masse bestimmt.

Zur Probenvorbereitung wurden 20 μg Protein mit vierfach konzentriertem Probenpuffer und der entsprechenden Menge destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 30 μl eingestellt und 10 min auf 95°C erhitzt. Das Erhitzen erleichterte die Spaltung der nichtkovalenten Bindungen durch SDS. Zum Größenabgleich wurden 7,5 μl eines Proteinmarkers (*Prestained Protein Ladder; Thermo Fisher*) verwendet, der Standardproteine einer bekannten Größe enthält.

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

Die Auftrennung der Proben erfolgte mittels Gelelektrophorese in einem Tris-Glycin-Gel nach der von Ulrich Lämmli entwickelten Methode²⁶². Die Gelmatrix ist hierbei in ein Sammel- und ein Trenngel unterteilt, welche sich in Porengröße und pH-Wert unterscheiden. Dies führt zur Bildung eines Ionengradienten, durch den die Proteine in einer scharfen Bande im weitporigen Sammelgel konzentriert werden und sich bis zum Übertritt in das Trenngel mit der gleichen Geschwindigkeit im Gel bewegen. Im engmaschigen Trenngel werden die Proteine nun nach ihrer Größe aufgetrennt. Diese sogenannte diskontinuierliche Gelelektrophorese sorgt für eine hoch-auflösende Auftrennung der Proteine und ermöglicht das Auftragen höherer Probenvolumina.

Die Herstellung der Gele erfolgte nach folgendem Schema:

	Trenngel			Sammelgel
	10%	12,5%	15%	5%
Trenn- bzw. Sammelgelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Acrylamid (30%)	3,3 ml	4,2 ml	5 ml	1,65 ml
Wasser	4,1 ml	3,2 ml	2,4 ml	5,7 ml
Ammoniumpersulfat	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Endvolumen	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml

Die Elektrophorese wurde bei einem konstanten Stromfluss von 25 mA pro Gel unter der Verwendung von SDS-Laufpuffer als Elektrolyt durchgeführt.

Trenngelpuffer: pH 6,8

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

Sammelgelpuffer: pH 8,8

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

SDS-Laufpuffer

Tris	25 mM
Glycin	250 mM
SDS	0,1 % (w/v)

3.4.5 Western Blot-Analyse

Bei dieser erstmals 1979 von Renart et al. beschriebenen Methode werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinyliden-Fluoridmembran übertragen²⁶³. Es wird eine elektrische Spannung angelegt, die senkrecht zum Polyacrylamidgel orientiert ist und die Proteine auf die Membran überträgt, ohne das Muster der elektrophoretischen Auftrennung zu beeinflussen. Als Elektrolyt wurde Blot-Puffer verwendet und für 90 min eine Spannung von 100 V angelegt.

Blot-Puffer

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

Ein 90-minütiges Blocken mit 5% Milchpulver (w/v) in TBS-T bzw. 5% BSA (w/v) in TBS-T führte zu einem Absättigen von unspezifischen Bindungsstellen. Die Membranen inkubierten über Nacht mit einem Protein-spezifischen Antikörper bei 4°C. Nach viermaligem Waschen mit TBS-T erfolgte eine 60-minütige Inkubation mit einem mit Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelten Sekundär-Antikörper, gefolgt von erneutem, viermaligem Waschen mit TBS-T. Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung des *ECL Plus Western Blot Detektiersystems* (GE Healthcare), indem die im Kit enthaltenen Lösungen gemäß der Herstellervorgaben im Verhältnis 1:40 gemischt und 5 min auf der Membran inkubiert wurden. Diese Lösung enthielt Luminol, das von der an den Sekundär-Antikörper gekoppelten HRP oxidiert wurde und dabei ein Chemilumineszenzsignal in Höhe des gesuchten Proteins abgab. Dieses Signal wurde mit Röntgenfilmen detektiert, wobei die Entwicklung der Röntgenfilme in einem Entwicklerbad mit anschließender Fixierung erfolgte.

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

Tris	25 mM
NaCl	150 mM
KCl	3 mM

Zur Herstellung von TBS-T wurden 0,1% Tween-20 (w/v) zugegeben.

Die Membranen können mehrfach mit Antikörpern behandelt werden, damit verschiedene Proteine auf derselben Membran nachgewiesen werden können. Dazu wurde die Membran nach dem Entwickeln dreimal mit TBS-T gewaschen, um die ECL-Lösung zu entfernen und dann 90 min mit Stripping-Puffer inkubiert. Dieser Puffer entfernte die gebundenen Primär- und Sekundär-Antikörper und ermöglichte die Behandlung der Membran mit weiteren Antikörpern. Dazu wurde die Membran, wie oben beschrieben, mit 5% Milchpulver (w/v) in TBS-T bzw. 5% BSA (w/v) in TBS-T blockiert und mit dem nächsten Primär-Antikörper behandelt. Eine Membran wurde maximal viermal wiederverwendet, da mit jeder Behandlung mit Stripping-Puffer auch vermehrt Proteine von der Membran gelöst wurden.

Stripping-Puffer

Glycin	0,1 M
Konzentrierte Salzsäure	10 % (v/v)

Primär-Antikörper (Name, Spezies, Verdünnung)	Sekundär-Antikörper (Name, Spezies, Verdünnung)
ICAM1 Rabbit polyclonal-anti-human-ICAM1 1:1000 in 5% BSA (w/v) in TBS-T	Swine polyclonal-anti-rabbit IgG HRP 1:3000 in 5% BSA (w/v) in TBS-T
RNase Inhibitor Goat polyclonal-anti-human-RNase Inhibitor 1:1000 in 5% Milchpulver (w/v) in TBS-T	Rabbit polyclonal-anti-goat IgG HRP 1:3000 in 5% Milchpulver (w/v) in TBS-T
RNase 1 Chicken polyclonal-anti-human-RNase 1 1:1000 in 5% Milchpulver (w/v) in TBS-T	Donkey polyclonal-anti-chicken IgG HRP 1:5000 in 5% Milchpulver (w/v) in TBS-T
β-Aktin Mouse anti-human-β-Actin 1:10.000 in 5% Milchpulver (w/v) in TBS-T	Goat polyclonal-anti-mouse IgG HRP 1:3000 in 5% Milchpulver (w/v) in TBS-T

3.4.6 Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Immunfluoreszenzfärbungen erlauben es, die Lokalisation eines Proteins innerhalb einer Zelle bzw. eines Gewebes zu untersuchen. Die Zellen wurden in einem 8-Well Objektträger kultiviert und stimuliert. Für die Färbung erfolgte ein zweimaliges Waschen mit PBS, 10-minütiges Fixieren mit eiskaltem Methanol/Aceton-Gemisch (Verhältnis 1:1) und erneutes dreimaliges Waschen mit PBS. Es gibt unterschiedliche Fixierungsmethoden, wobei die Auswahl vom jeweiligen Antigen bzw. Antikörper abhängt. Organische Fixative wie die hier verwendete Mischung aus Methanol und Aceton gehören zu den präzipitierenden Fixativen, da sie Proteine durch das Auflösen hydrophober Wechselwirkungen ausfällen. Die Fixierung erhält die Zellstruktur, verhindert das Auswaschen des Antigens, ermöglicht durch das Permeabilisieren der Zellmembran den Zugang des Antikörpers zum Antigen und erhält dieses in einer für den Antikörper erkennbaren Form. Im Anschluss an die Fixierung wurden unspezifische Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation mit 3% BSA (w/v) in TBS-T blockiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS wurde der Primär-Antikörper verdünnt in 1% BSA (w/v) in TBS-T zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unspezifische Immunglobuline G (IgGs), isoliert aus der gleichen Spezies wie der Primär-Antikörper, um unspezifische Wechselwirkungen mit dem Zielgewebe zu detektieren. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem entsprechenden, mit Alexa-Farbstoff gekoppelten Sekundär-Antikörper (Verdünnung 1:200 in 1% BSA (w/v) in TBS-T), der gegen Spezies-spezifische Epitope des Primär-Antikörpers gerichtet war. Hierbei haben Alexa-488 Farbstoffe eine Emissionsmaximum von 519 nm (grün) und Alexa-568 ein Emissionsmaximum von 603 nm (rot). Nach einem letzten Waschschrift wurde der Objektträger in das Eindeckmedium *Vecta-*

Shield mit DAPI (4,6'diamidino-2-phenylindole) eingebettet, ein Abdeckglas aufgelegt und mit Nagellack versiegelt. Das Eindeckmedium verhinderte ein rapides Ausbleichen der Fluoreszenz und erlaubte so eine langfristige Lagerung der Objektträger. Das im Eindeckmedium vorhandene DAPI fluoresziert nach Bindung an DNA blau mit einem Absorptionsmaximum von 358 nm und einem Emmisionsmaximum von 461 nm, wodurch der Zellkern lokalisiert werden konnte.

Die Färbungen wurden mit einem *Leica DMR Fluoreszenzmikroskop* unter Verwendung von Objektiven für vierzigfache sowie dreiundsechzigfache Vergrößerungen dokumentiert und mit der *Metamorph Imaging Software* (Version 7.0) analysiert. Um die Fluoreszenzsignale der verschiedenen Versuchsgruppen miteinander verglichen zu können, wurden, optimiert für jeden Antikörper, gleiche Belichtungszeiten sowie Kontrast- und Helligkeitseinstellungen verwendet und die Bilder mit entsprechenden Größenmarkern gekennzeichnet.

Primär-Antikörper (Name, Spezies, Verdünnung)	Sekundär-Antikörper (Name, Spezies, Verdünnung)
VE-Cadherin Rabbit polyclonal anti-human VE-Cadherin 1:50	Alexa-568 goat anti-rabbit IgG 1:200
RNaseA Rabbit polyclonal-anti-bovine-RNaseA 1:100	Alexa-568 goat anti-rabbit IgG 1:200

3.4.7 Analyse der Bindung von Nukleinsäuren an Proteine

Die Bindung von Nukleinsäuren an Proteine wurde durch die Verwendung biotinylierter Nukleinsäuren analysiert. Hierfür wurde zum einen biotinylierte zelluläre RNA verwendet, die, wie unter 3.3.4 beschrieben, hergestellt wurde. Des Weiteren wurden biotinylierte DNA-Oligonukleotide eingesetzt, die von der Firma *Biomers* (Ulm) bezogen wurden. Die Bindung dieser markierten Nukleinsäuren konnte mittels eines Streptavidin-gekoppelten Antikörpers nachgewiesen werden.

Eine mit 10 µg/ml Plättchenfaktor 4 (PF4), BSA, Präkallikrein, Kininogen, FXI, FXII sowie FXIIa (verdünnt in 100 mM Natriumcarbonat (pH 9,5)) beschichtete 96-Well-Mikrotiterplatte wurde über Nacht bei 4°C inkubiert, wodurch die Proteine an die Oberfläche der Mikrotiterplatte banden. Als Negativkontrolle diente entweder eine Beschichtung mit 100 mM Natriumcarbonat (pH 9,5) oder mit 10 µg/ml BSA in 100 mM Natriumcarbonat (pH 9,5). Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden ein einmaliger Waschschriff mit TBS und eine zweistündige Inkubation mit 3% BSA in TBS bei Raumtemperatur durchgeführt. Die

Bindung steigender Konzentrationen biotinylierter RNA (0,78-25 µg/ml) bzw. biotinylierter Oligonukleotide (0,31-50 µg/ml) an die Proteine erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur, gefolgt von dreimaligem Waschen mit TBS. Die Biotinylierung der gebundenen Nukleinsäuren vermittelte die Bindung von Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin. Die Peroxidase katalysierte die Umsetzung von TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) zu einem photometrisch detektierbaren blauen Reaktionsprodukt mit einer Absorption bei 450 nm.

Um das Bindungsverhalten anderer Substanzen zu analysieren, wurden kompetitive Bindungsexperimente durchgeführt, indem das Bindungsverhalten steigender Konzentrationen biotinylierter RNA an Proteine in Anwesenheit von 300 µg/ml verschiedener unmarkierter Substanzen bestimmt wurde.

3.5 Analyse der Aktivität von Ribonukleasen (RNasen)

3.5.1 RNase-Aktivitätstest

Die Bestimmung der RNase-Aktivität wurde mit leichter Modifikation nach der 1965 von Zimmermann et al. beschriebenen Methode durchgeführt²⁶⁴. Hierbei diente die synthetische Nukleinsäure Poly:C als Substrat für den enzymatischen Verdau durch RNasen. Deren Aktivität wurde bestimmt, indem das unverdaute Substrat ausgefällt und die entstandenen Nukleotide photometrisch nachgewiesen werden. Es wurden 10-100 µl von Zelllysaten oder -überständen, Plasmaproben oder 1 µg rekombinante bovine RNase A (als Positivkontrolle) mit RNase Puffer auf ein Gesamtvolumen von 150 µl eingestellt und 100 µl Poly:C (Endkonzentration 400 µg/ml) als Substrat zugegeben. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 37°C im Thermoschüttler wurde unverdautes Poly:C ausgefällt, indem 100 µl Aliquots der inkubierten Proben mit 250 µl einer eiskalten Lösung aus 6% Perchlorsäure, 20 mM Lanthanchlorid sowie 100 µl Fettsäure-freiem BSA (10 mg/ml) versetzt und 15 min auf Eis inkubiert wurden. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 15.000 x g und 4°C für 15 min. Der Substratverdau wurde durch photometrische Messung der Absorption bei 260 nm im Überstand festgestellt und die Aktivitätswerte auf 1 mg Gesamtproteinmenge in der Probe bezogen.

RNase-Puffer: pH 8,0	
Tris	50 mM
NaCl	130 mM
EDTA	2 mM
Acetyliertes BSA	0,1 mg/ml
Lagerung	4°C

3.5.2 In-Gel-Zymographie

Die In-Gel-Zymographie erlaubt es, aktive RNasen in einer elektrophoretisch aufgetrennten Probe sichtbar zu machen. Hierfür wurden 20 µg Gesamtprotein einer Probe unter nicht-denaturierenden Bedingungen über ein 15% SDS-Polyacrylamidgel, das zusätzlich 0,5 mg/ml Poly:C als Substrat für RNase 1 enthielt, elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 3.4.4). Zwei zehnmütige Waschschrirte mit 10 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,5) und Isopropanol (20% v/v) entfernten das SDS nach der Elektrophorese aus dem Gel. Die Proteine wurden durch jeweils einmaliges Waschen für 10 min mit 10 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,5), 0,1 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,5) und 10 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,5) renaturiert. Das im Gel enthaltene Poly:C wurde durch 10 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,5) mit Toluidinblau (0,2% w/v) angefärbt und das Gel anschließend mit doppelt destilliertem Wasser entfärbt. Hierbei erschienen klare Banden vor einem dunklen Hintergrund als Bereiche mit RNase Aktivität ²⁶⁵.

3.6 Bestimmung der Gerinnungsaktivität

3.6.1 Herstellung von Plasma

Mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) versetzte Blutproben von fünf gesunden Spendern wurden vom Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin (Fachbereich Medizin, Universität Gießen) zur Verfügung gestellt. Um plättchenarmes Plasma zu erhalten, wurden die Proben bei 2.800 x g, 4°C für 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden gemischt und Aliquots bei -80°C bis zur Benutzung gelagert.

3.6.2 Analyse der Stabilität von Oligonukleotiden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Ein weitporiges Agarose-TAE-Gel, wie es zur Auftrennung von DNA oder RNA verwendet wurde (siehe 3.3.8 und 3.3.9), lieferte nicht die nötige Auflösung, um die Integrität kurzer Oligonukleotide zu analysieren. Stattdessen wurden diese durch eine Polyacrylamid-

Gelelektrophorese (PAGE) unter Verwendung sehr engporiger Gele aufgetrennt, was eine optimale Auflösung ermöglichte.

Für ein 20%iges Polyacrylamidgel wurden folgende Komponenten benötigt:

20% Polyacrylamidgel	
10x TBE	2 ml
Acrylamid (30%)	13,3 ml
Wasser	4,7 ml
Ammoniumpersulfat	200 µl
TEMED	20 µl
Endvolumen	20 ml

Es wurden 1,25 µg des Oligonukleotids mit sechsfach konzentriertem DNA- oder zweifach konzentriertem RNA-Probenpuffer (*Fermentas*) mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 10 µl eingestellt und auf das Gel aufgetragen. Um den Verdau der Oligonukleotide in Plasma zu untersuchen, wurden 1,25 µg des entsprechenden Oligonukleotids für 1 bzw. 5 min bei 37°C in 10 µl humanem EDTA-Plasma inkubiert und entsprechende Mengen sechsfach konzentrierter DNA- oder zweifach konzentrierter RNA-Probenpuffer (*Fermentas*) zugegeben. Direkt im Anschluss erfolgte die Elektrophorese.

Sechsfach konzentrierter DNA-Probenpuffer	
Glycerol	30% (w/v)
Bromphenolblau	0,25% (w/v)

Die Elektrophorese erfolgte unter Verwendung eines Tris-Borat-EDTA (TBE-) Puffers bei 20 mA, gefolgt von einer 15-minütigen Färbung in einer 20% Ethidiumbromidlösung. Die Integrität der Oligonukleotide wurde mit einem Geldokumentationsgerät (*INTAS*) unter Verwendung der *INTAS-Dokumentationssoftware* dokumentiert.

TBE (Tris-Borat-EDTA): pH 8,0	
Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2 mM

3.6.3 Turbidimetrie

Die Turbidimetrie-Messung ermöglichte es, die prokoagulatorischen Eigenschaften verschiedener Substanzen wie z. B. Nukleinsäuren zu untersuchen. Hierbei wurde photometrisch die Gerinnselbildung von humanem Plasma durch Rekalzifizierung sowie dessen Lyse durch Zugabe von Gewebs-Plasminogenaktivator (*tissue-type plasminogen activator*, t-PA) detektiert. Aufgrund der Gerinnselbildung stieg die Absorption der Proben bis auf ein Absorptionsmaximum an.

Die anschließend durch t-PA initiierten Fibrinolyseprozesse resultierten in der Auflösung des Gerinnsels und einem damit verbundenen Abfall der Absorption. Analysiert wurde die Zeit, die bis zum Erreichen der maximalen Absorption, also der maximalen Gerinnelbildung, benötigt wurde (Abbildung 11).

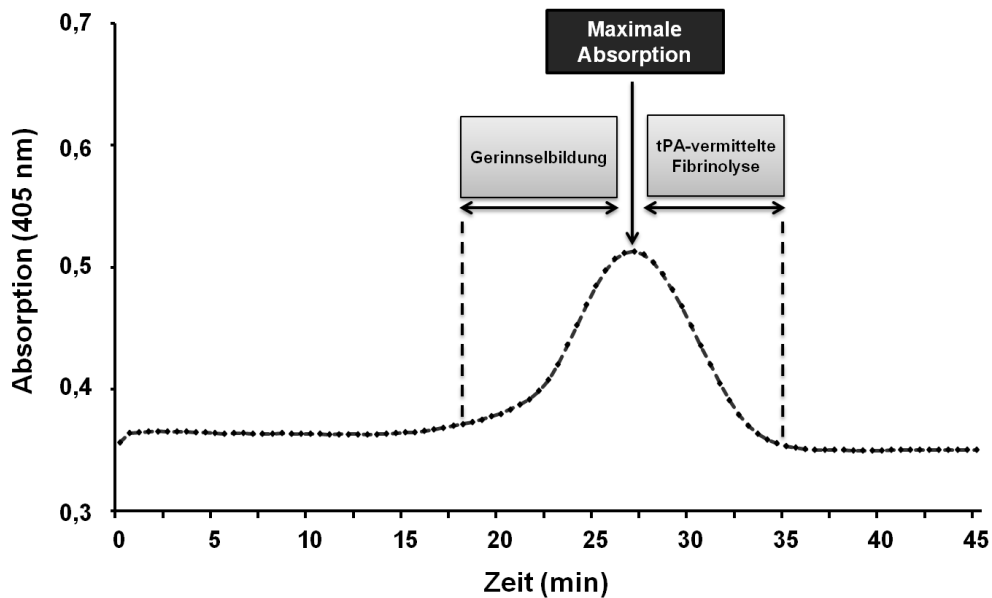


Abbildung 11: Bestimmung der Gerinnungszeit

Unspezifische Bindungsstellen einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden durch einstündige Inkubation mit 3% BSA (w/v) in TBS bei 37°C blockiert. Alle verwendeten Reagenzien wurden mit 0,1 M Imidazol-Puffer zu einem Gesamtvolumen von 100 µl verdünnt. Steigende Konzentrationen von Nukleinsäuren wurden mit 100 ng/ml t-PA und einem Drittel Volumen humanem EDTA-Plasma für 5 min bei 37°C inkubiert und anschließend die Gerinnungsreaktion durch Rekalzifizierung mit 6 mM Kalziumchlorid gestartet. Die Absorption wurde über 30 min bei 405 nm mithilfe der *KC4 Software (BIO-TEK)* gemessen und analysiert.

3.6.4 Analyse der Präkallikrein-Autoaktivierung

Um spezifisch die Aktivierung des intrinsischen Gerinnungsweges zu untersuchen, wurde der Einfluss von Nukleinsäuren auf die Aktivierung von Präkallikrein in einem isolierten System mithilfe eines chromogenen Substrats untersucht. Das Experiment basiert auf der enzymatischen Spaltung des ursprünglich farblosen Substrats zu einem farbigen Produkt, dessen Absorption bei 405 nm photometrisch gemessen wird. Über die einstündige Inkubation einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit 3% BSA (w/v) in HBS-Puffer bei 37°C wurden

unspezifische Bindungsstellen der Plastikoberfläche der Platte blockiert. Die Aktivierung von Präkallikrein (20 nM) wurde in Anwesenheit steigender Konzentrationen an totaler RNA, DNA oder Oligonukleotiden zusammen mit 55 nM Kininogen, 50 µM Zinkchlorid und 0,3 mM chromogenem Substrat S2366 bei 37°C für 1 h verfolgt. Um die neutralisierende Wirkung von PF4 auf die Präkallikreinaktivierung durch Nukleinsäuren zu untersuchen, wurden steigende PF4-Konzentrationen mit 1 µg/ml totaler RNA oder DNA bzw. 5 µg/ml der verwendeten Oligonukleotide für das Experiment verwendet. Die Absorption wurde über 60 min bei 405 nm mithilfe der *KC4 Software (BIO-TEK)* gemessen und analysiert.

HBS (HEPES-buffered-saline): pH 7,4	
NaCl	118 mM
KCl	0,36 mM
HEPES	1,81 mM
D-Glucose	1 mM
Lagerung	4°C

3.7 Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung der hier vorliegenden Ergebnisse wurde das Programm *GraphPad Prism 5* (Version 5.02) verwendet.

Die statistische Signifikanz von zwei Gruppen wurde durch die Verwendung des Einstichproben-t-Test geprüft. Zum Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde die ein- bzw. zweifaktorielle Varianzanalyse (*Analysis of variance, ANOVA*) verwendet und die Signifikanz durch den Bonferroni-Test geprüft. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Strukturelle Voraussetzungen für die prokoagulatorische Aktivität von Nucleinsäuren

4.1.1 Stabilität von RNA- und DNA-Oligonukleotiden in humanem Plasma

Bereits 2007 beschrieben Kannemeier et al. die Eigenschaft von zellulärer RNA und DNA als Kofaktoren für die Initiierung des intrinsischen Gerinnungsweges zu dienen, indem sie die Autoaktivierung von zymogenen Vorstufen der in die Kontaktphase involvierten Gerinnungsproteine vermitteln⁵². Bislang wurden noch keine Struktur-Funktions-Studien in Bezug auf Länge, Sequenz oder Sekundärstruktur der Nucleinsäuren und ihrer prokoagulatorischen Aktivität durchgeführt. Vielmehr wurde bislang postuliert, dass Nucleinsäuren mindestens eine Länge von 100 Nucleotiden besitzen müssen, um mittels eines Template-Mechanismus als Kofaktoren für die Aktivierung der intrinsischen Proteasen zu wirken⁵².

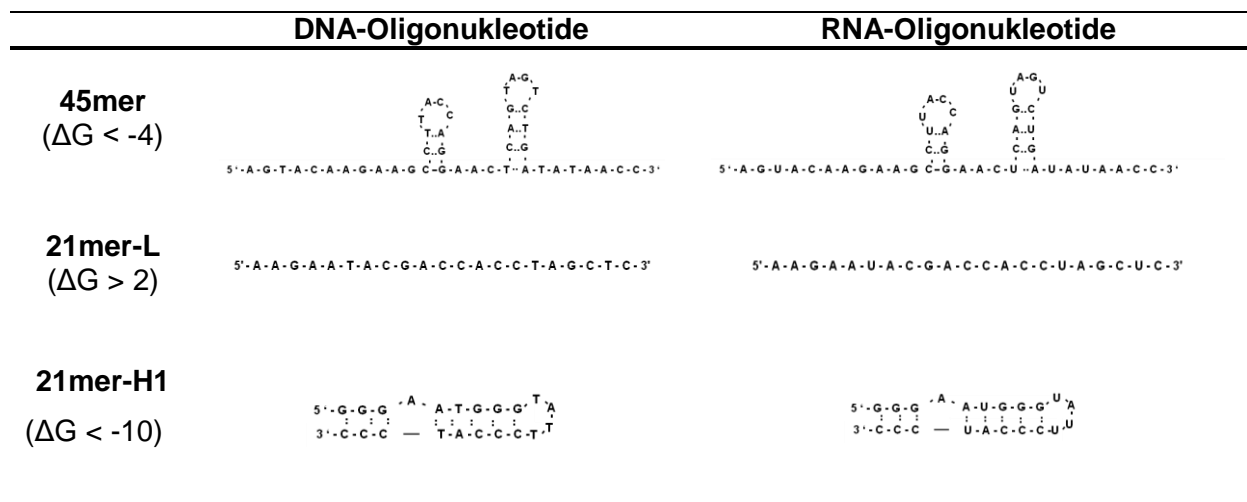


Abbildung 12: Sekundärstrukturen der verwendeten DNA- und RNA-Oligonukleotide

Dargestellt sind die von der mFold DNA- bzw. RNA-Datenbank (Universität Albany, USA) berechneten Sekundärstrukturen der für die Studie verwendeten DNA- und RNA-Oligonukleotide. Die freie Gibbs'sche Energie (ΔG) repräsentiert die Veränderung der freien Enthalpie, wobei negative Werte exergone und positive Werte endergone Prozesse darstellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die prokoagulatorischen Eigenschaften kurzer Oligonukleotide in Abhängigkeit von Sequenz und Sekundärstruktur untersucht. Es wurden zwei 21mer-Oligonukleotide mit verschiedenen Sekundärstrukturen (linear ohne stabile

Sekundärstruktur sowie eine Haarnadel-Struktur) und ein längeres, komplexer strukturiertes 45mer-Oligonukleotid jeweils in Form von RNA und DNA verwendet (Abbildung 12).

Eine Stabilitätsanalyse der verschiedenen Oligonukleotide in humanem Plasma mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) zeigte die Stabilität aller DNA-Oligonukleotide bei einer ein- bis fünfminütigen Inkubation in humanem Plasma. Im Gegensatz dazu blieb lediglich das 21mer-H1-RNA-Oligonukleotid in Plasma bis zu 20 min nachweisbar (nicht gezeigt), während die RNA-Oligonukleotide 21mer-L und 45mer sofort degradiert wurden (Abbildung 13).

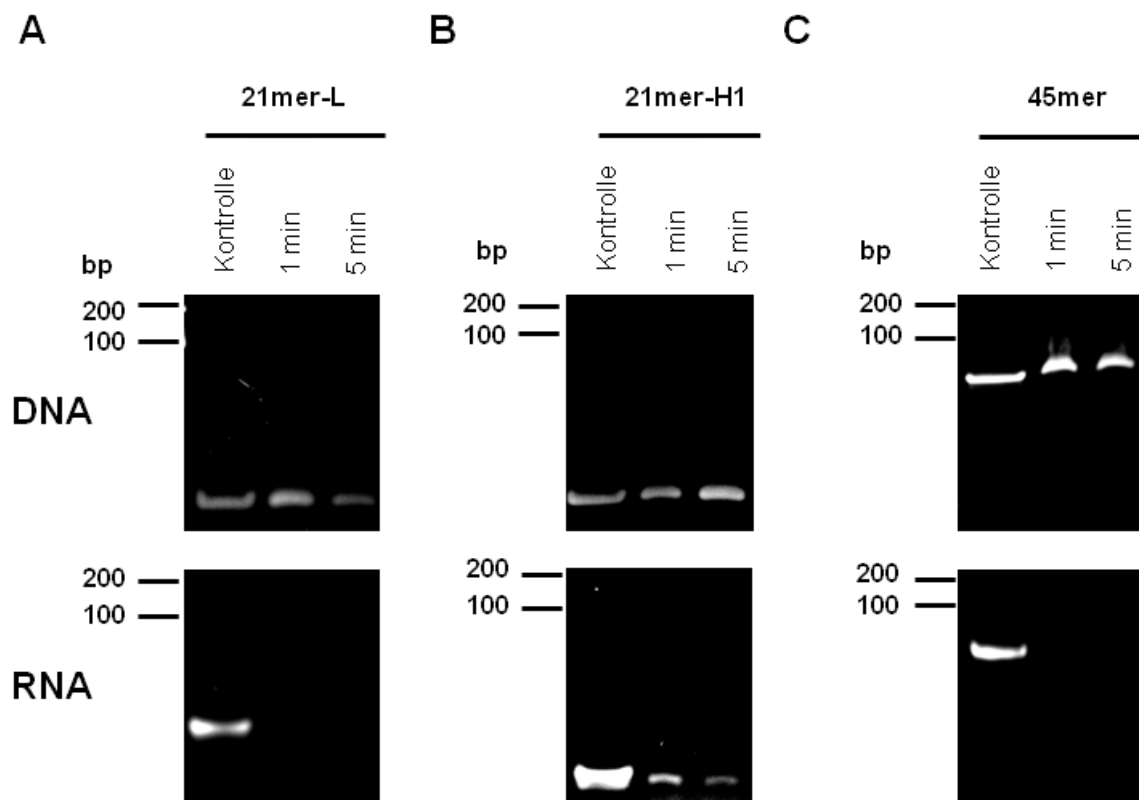


Abbildung 13: Stabilität der verwendeten DNA- und RNA-Oligonukleotide in humanem Plasma

Die Integrität der DNA- und RNA-Oligonukleotide (A) 21mer-L, (B) 21mer-H1 und (C) 45mer wurde nach ein- bzw. fünfminütiger Inkubation in humanem Plasma durch PAGE analysiert. Als Kontrolle dienten die entsprechenden unbehandelten Oligonukleotide. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

Aus diesen Beobachtungen ließ sich schlussfolgern, dass RNA aufgrund der Anwesenheit von RNasen in humanem Plasma²⁴⁶ deutlich schneller als DNA degradierte, wobei die Geschwindigkeit der Hydrolyse offensichtlich abhängig von der Sekundärstruktur war.

4.1.2 Prokoagulatorische Aktivität von RNA- und DNA-Oligonukleotiden

In Anlehnung an die Studie von Kannemeier et al.⁵², die erstmals die Kofaktor-Aktivität von Nukleinsäuren bei der Aktivierung des intrinsischen Gerinnungsweges beschrieb, erfolgte eine Analyse der prokoagulatorischen Aktivitäten der oben beschriebenen Oligonukleotide. Hierfür wurden steigende Konzentrationen der Substanzen zu humanem EDTA-Plasma hinzugegeben, die Gerinnungsreaktionen mittels Rekalzifizierung gestartet und die Zeit bis zur Gerinnungsbildung photometrisch detektiert.

Die DNA-Oligonukleotide 21mer-H1 und 45mer konnten die Gerinnungszeit in diesem Experiment dosisabhängig verkürzen, wobei das Konstrukt 45mer bereits bei einer Konzentration von 3 µg/ml eine maximale Verkürzung der Gerinnungszeit auf 80% der Kontrolle bewirkte. Das Konstrukt 21mer-H1 verkürzte die Gerinnungszeit auf bis zu 60% des Kontrollwertes, allerdings erst bei höheren Konzentrationen als das Konstrukt 45mer. Das DNA-Oligonukleotid 21mer-L zeigte trotz seiner Stabilität in Plasma nur eine schwache prokoagulatorische Aktivität (Abbildung 14A). Bei Betrachtung der RNA-Oligonukleotide erreichte nur das Konstrukt 21mer-H1 eine mit dem entsprechenden DNA-Konstrukt vergleichbare prokoagulatorische Aktivität, wobei die Gerinnungszeit bis auf 75%, verglichen zur Kontrolle, gesenkt wurde. Die beiden anderen getesteten RNA-Oligonukleotide vermittelten keine Verkürzung der Gerinnungszeit (Abbildung 14B).

Um den Einfluss der verschiedenen Oligonukleotide auf die Aktivierung von Proteasen im intrinsischen Zweig der Gerinnungskaskade zu untersuchen, wurde die Auto-Aktivierung von Präkallikrein in der Gegenwart von Kininogen und Zn^{2+} -Ionen im isolierten System analysiert. Hierbei zeigte sich die stärkste Kofaktor-Aktivität bezüglich der Auto-Aktivierung von Präkallikrein bei dem DNA-Oligonukleotid 21mer-H1. Die 45mer-Struktur vermittelte nur eine schwache Aktivierung von Präkallikrein, während das Oligonukleotid 21mer-L gar keinen Effekt zeigte (Abbildung 14C). Die gleichen Aktivitätsmessungen wurden mit den entsprechenden RNA-Oligonukleotiden durchgeführt. Hierbei zeigte das RNA-Konstrukt 21mer-H1 die stärkste Kofaktoraktivität bei der Auto-Aktivierung von Präkallikrein, allerdings war der Effekt deutlich schwächer verglichen mit dem entsprechenden DNA-Oligonukleotid. Das RNA-Konstrukt 45mer fiel in seinen Kofaktoraktivitäten gegenüber 21mer-H1 deutlich ab, 21mer-L zeigte keine Effekte mehr (Abbildung 14D).

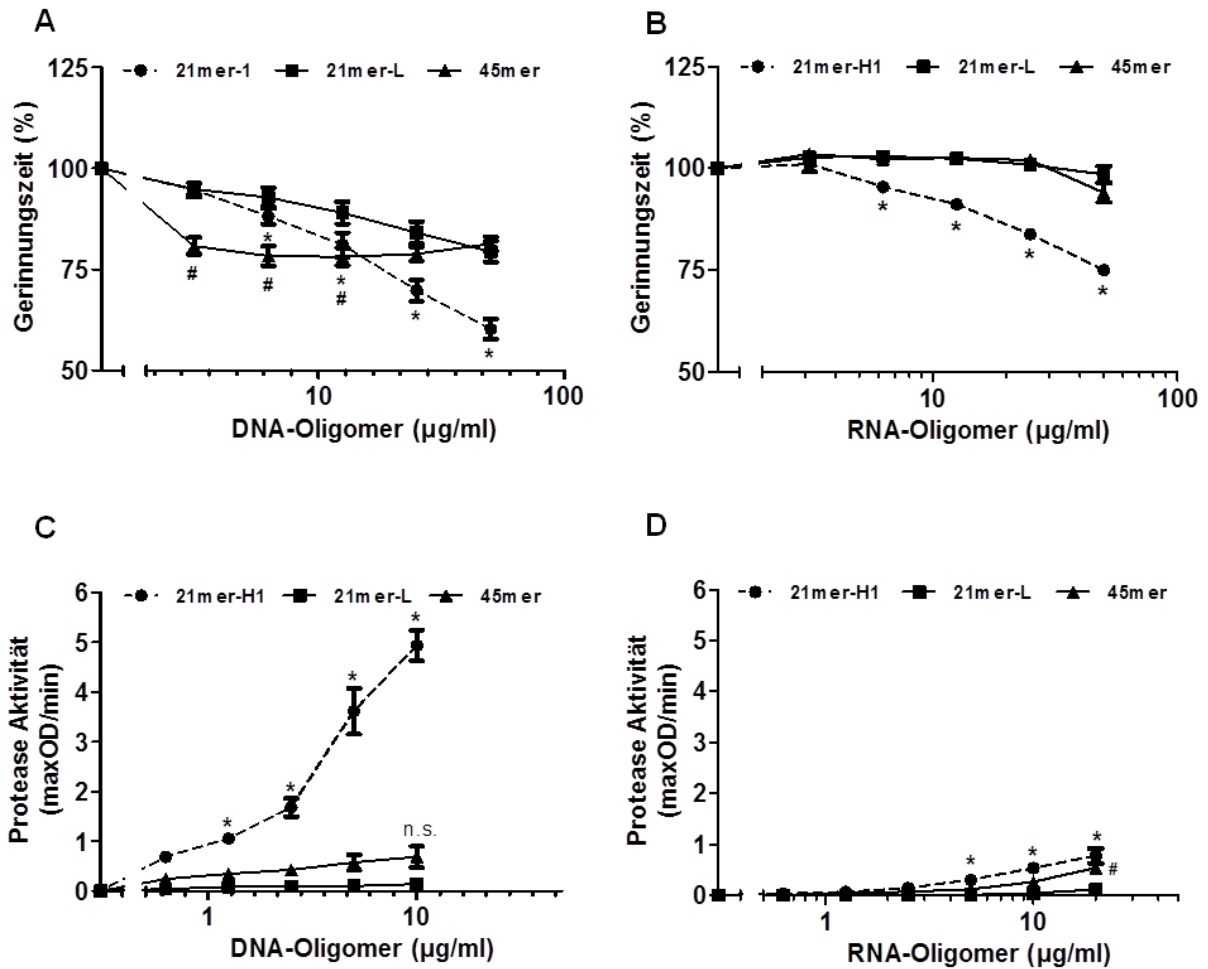


Abbildung 14: Prokoagulatorische Aktivität verschiedener DNA- und RNA-Oligonukleotide mit Unterschieden in Länge und Sekundärstrukturen

(A) Die prokoagulatorischen Eigenschaften steigender Konzentrationen der (A) DNA- und (B) RNA-Oligonukleotide 21mer-H1 (Kreise), 21mer-L (Quadrate) und 45mer (Dreiecke) wurden in humanem Plasma mittels eines Turbidimetrie-Experiments analysiert, wobei die Gerinnung durch Rekalzifizierung initiiert wurde. Die Gerinnungszeit von unbehandeltem humanem Plasma wurde als 100% definiert. Die Aktivierung von Präkallikrein in der Präsenz steigender Konzentration der (C) DNA- und (D) RNA-Oligonukleotide 21mer-H1 (Kreise, unterbrochene Linie), 21mer-L (Quadrate) und 45mer (Dreiecke) wurde in einem isolierten Versuchssystem analysiert. Hierfür wurde die Enzymaktivität anhand der Spaltung eines chromogenen Substrats detektiert. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 4$; * $p < 0,05$; 21mer-H1 vs. 21mer-L; # $p < 0,05$ 45mer vs. 21mer-L).

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass kurze, 21 Basen umfassende Oligonukleotide abhängig von ihrer Sekundärstruktur prokoagulatorisch wirkten, wobei das DNA-Oligonukleotid 21mer-H1 die höchste spezifische Aktivität besaß.

4.1.3 Prokoagulatorische Aktivität von verschiedenen DNA-Haarnadel-Strukturen

Da das 21mer-H1 DNA-Oligonukleotid den stärksten prokoagulatorischen Einfluss auf den intrinsischen Gerinnungsweg zeigte, wurden in weiteren Experimenten die prokoagulatorischen Effekte verschiedener DNA-Oligonukleotide mit Haarnadel-Struktur verglichen (Abbildung 15A). Alle Konstrukte besaßen eine Länge von 21 Nukleotiden, wobei 21mer-H1 eine ungepaarte Region innerhalb des doppelsträngigen Stamms aufwies. 21mer-H2 besaß einen 3'-Überhang und eine zu 21mer-H1 ähnliche Sequenz. 21mer-H3 unterschied sich in der Sequenz von den anderen beiden Konstrukten und wies zusätzlich einen 5'-Überhang auf.

Mittels PAGE-Analysen wurde die Integrität der Konstrukte überprüft, wobei die Oligonukleotide 45mer und 21mer-L als Kontrollen diente. Das 45mer wanderte aufgrund seiner Größe am langsamsten durch das Gel. Trotz der gleichen Nukleotidanzahl verhielten sich die Konstrukte 21mer-L und die 21mer-H-Strukturen nicht gleich. Vielmehr zeigten die kompakteren Haarnadel-Strukturen eine höhere Mobilität, sodass diese ein Signal unterhalb der Bande von 21mer-L lieferten. Zusätzlich wurden für 21mer-H3 zwei weitere Signale detektiert mit dem stärksten Signal zwischen der Bande von 45mer und den beiden 21mer-H-Oligonukleotiden sowie einer schwächeren Bande oberhalb von 45mer. Dies weist sehr wahrscheinlich auf die Ausbildung multimerer Strukturen von 21mer-H3 hin (Abbildung 15B).

Die verschiedenen Haarnadel-Strukturen unterschieden sich in ihrem Effekt auf die Auto-Aktivierung von Präkallikrein. Es zeigte sich, dass das DNA-Oligonukleotid 21mer-H1 die stärkste Auto-Aktivierung von Präkallikrein vermittelte, während 21mer-H2 eine geringere und 21mer-H3 keine Aktivität zeigte (Abbildung 15C). Alle Substanzen verkürzten die Gerinnungszeit von humanem Plasma konzentrationsabhängig, wobei 21mer-H1 und 21mer-H2 am effektivsten waren (Abbildung 15D).

Diese Daten führten zu der Schlussfolgerung, dass Oligonukleotide mit stabiler Haarnadelstruktur, sofern diese als Monomere vorlagen, als Kofaktoren des intrinsischen Gerinnungsweges dienen. Eine Multimerisierung der Moleküle korrelierte mit einer Aktivitätsverminderung, eventuell bedingt durch eine Blockierung von Bindungsstrukturen.

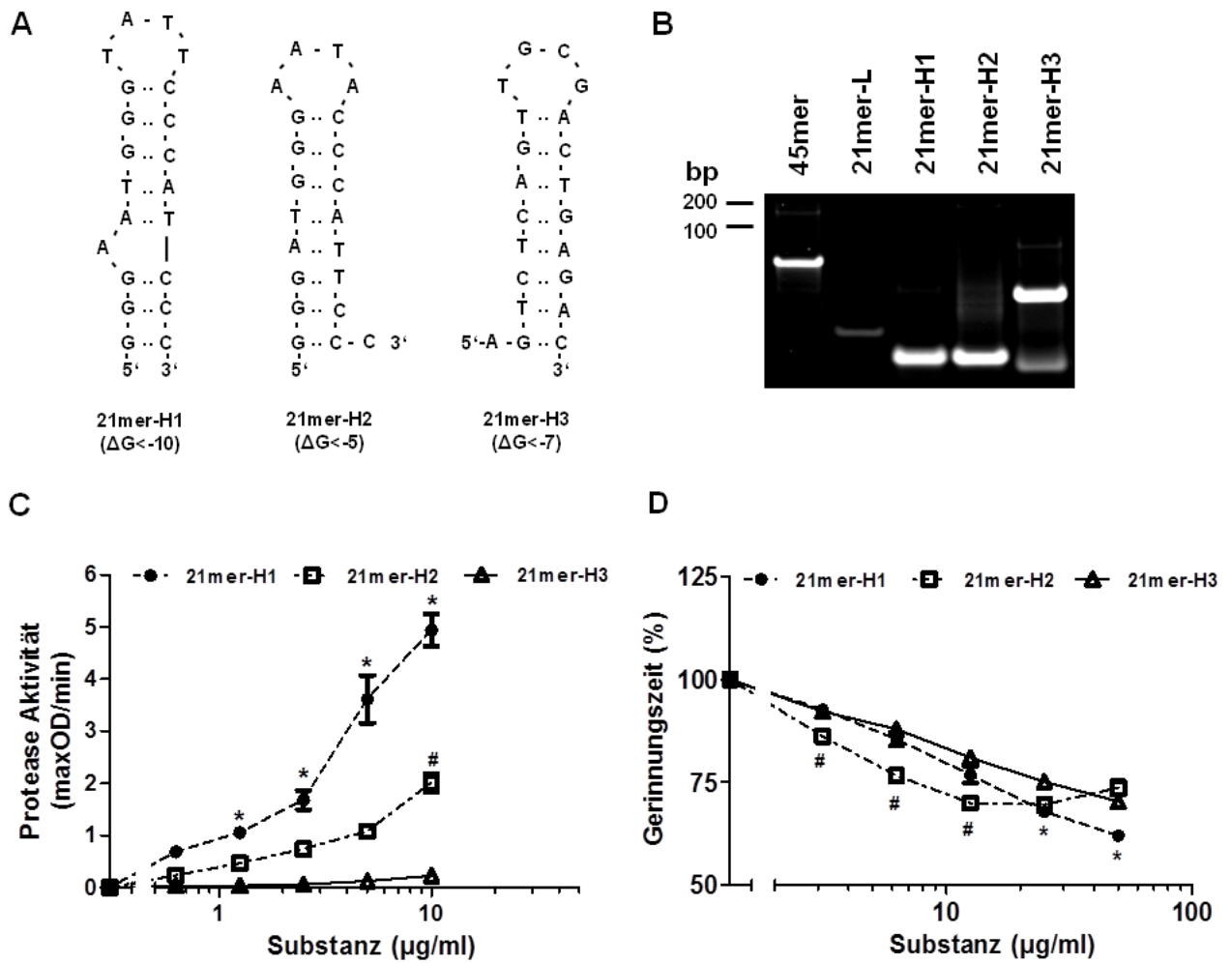


Abbildung 15: Vergleich der prokoagulatorischen Eigenschaften verschiedener Haarnadel-formender DNA-Oligonucleotide

(A) Dargestellt sind die mittels der mFold DNA-Datenbank (Universität Albany, USA) berechneten Sekundärstrukturen der verwendeten Haarnadel-formenden DNA-Oligonucleotide. Die freie Gibbs'sche Energie (ΔG) repräsentiert die Veränderung der freien Enthalpie, wobei negative Werte exergone und positive Werte endergone Prozesse darstellen. (B) Die Größen der verwendeten DNA-Oligonucleotide 45mer, 21mer-L, 21mer-H1, 21mer-H2 und 21mer-H3 wurden mittels PAGE analysiert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten. (C) Steigende Konzentrationen der DNA-Oligonucleotide 21mer-H1 (gefüllte Kreise, unterbrochene Linie), 21mer-H2 (offene Quadrate, unterbrochene Linie) und 21mer-H3 (offene Dreiecke) wurden (C) auf ihre Eigenschaften zur Auto-Aktivierung von Präkallikrein und (D) zur Verkürzung der Gerinnungszeit von humanem Plasma in einer Turbidimetrie-Messung untersucht. Die Gerinnungszeit von humanem Plasma allein wurde als 100% definiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 3$; * $p < 0,05$; 21mer-H1 vs. 21mer-H3; # $p < 0,05$ 21mer-H2 vs. 21mer-H3).

4.1.4 Bindung von DNA-Oligonukleotiden an verschiedene Proteine des Gerinnungssystems

Um zu verstehen, warum die verwendeten DNA-Oligonukleotide unterschiedlichen Einfluss auf die Auto-Aktivierung von Präkallikrein zeigten, wurden ihre Bindungsaffinitäten zu den verschiedenen Proteinen des intrinsischen Gerinnungsweges untersucht. Hierzu wurden Bindungsstudien mit biotinylierten Formen von drei verschiedenen DNA-Oligonukleotiden durchgeführt: 21mer-H1 (starke prokoagulatorische Effekte) sowie 21mer-H3 und 21mer-L (beide inaktiv; Abbildung 16A). Eine spezifische Bindung von 21mer-H1 an Kininogen konnte bereits bei niedrigen Konzentrationen detektiert werden. Im Gegensatz dazu banden die Konstrukte 21mer-L und 21mer-H3 Kininogen erst bei höheren Konzentrationen ab 25 µg/ml (Abbildung 16B). Dies spiegelte sich auch in den Dissoziationskonstanten (K_D) wider, welche durch die Darstellung der Messwerte nach der von Lineweaver-Burk etablierten Form berechnet wurden (Tabelle 1). Hierbei ergaben sich die folgenden Dissoziationskonstanten: 21mer-H1 $K_D=1,82 \mu\text{M} (\pm 0,23)$, für 21mer-H3 $K_D=20,77 \mu\text{M} (\pm 0,74)$ und für 21mer-L $K_D=13,43 \mu\text{M} (\pm 1,91)$. Für alle verwendeten Konstrukte war eine direkte Bindung an Präkallikrein erst bei hohen Konzentrationen ab 25 µg/ml detektierbar, sodass eine Berechnung der Dissoziationskonstanten mit den vorhandenen Messwerten nicht möglich war (Abbildung 16C).

DNA-Oligonukleotid	K_D Kininogen (μM)
21mer-H1	$1,82 \pm 0,23$
21mer-H3	$20,77 \pm 0,74$
21mer-L	$13,43 \pm 1,91$

Tabelle 2: Dissoziationskonstanten (K_D) der Bindung von biotinylierten DNA-Oligonukleotiden an Kininogen

Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM (n=3).

Um die Bindung der verschiedenen Konstrukte an weitere Faktoren des intrinsischen Gerinnungsweges direkt vergleichen zu können, wurde die Bindung von 25 µg/ml der Oligonukleotide an Präkallikrein, Kininogen sowie die Gerinnungsfaktoren FXI, FXII und FXIIa analysiert.

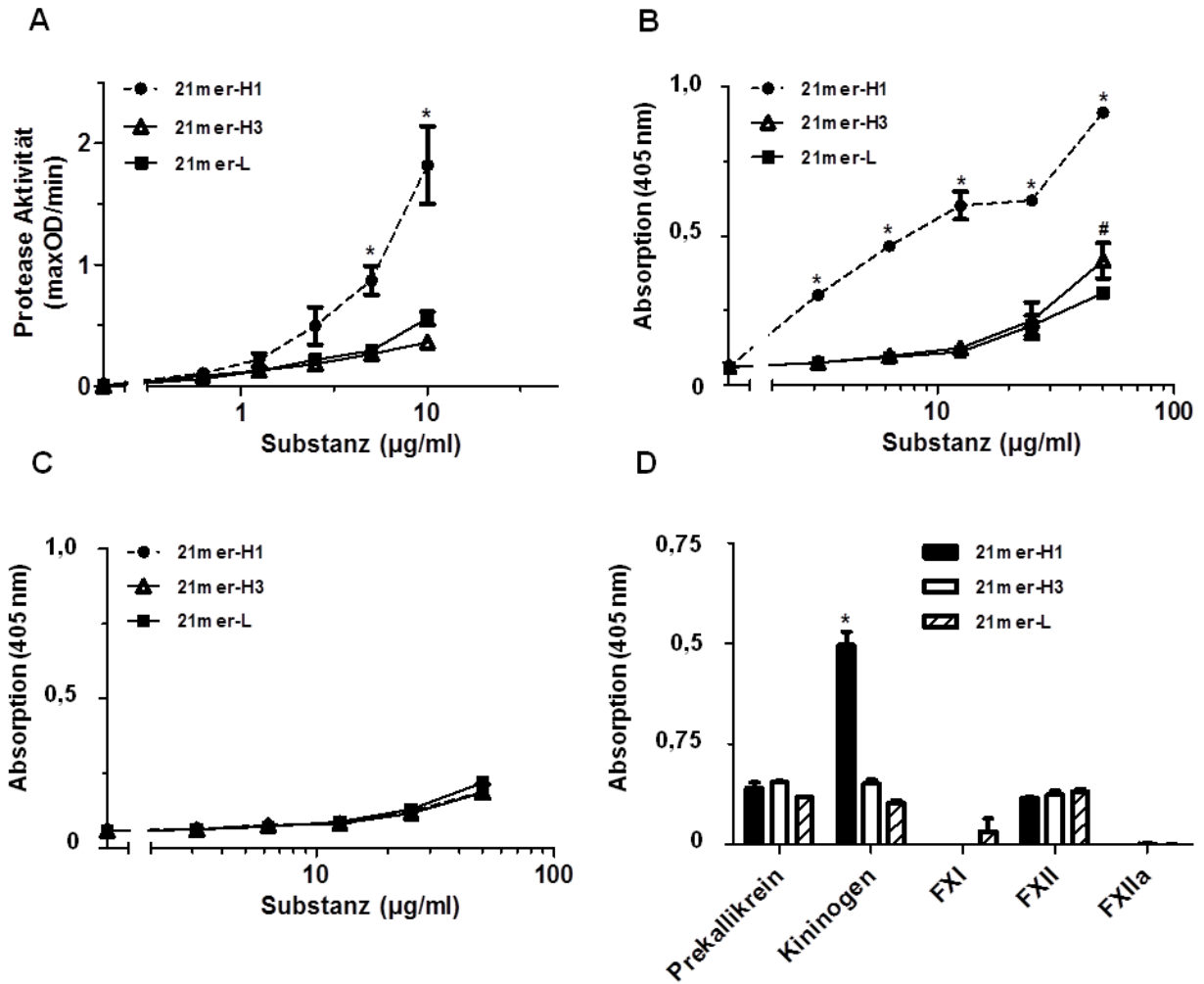


Abbildung 16: Bindung verschiedener biotinylierter DNA-Oligonukleotide an Gerinnungsfaktoren

(A) Steigende Konzentrationen der biotinylierten DNA-Oligonukleotide 21mer-H1 (gefüllte Kreise, unterbrochene Linie), 21mer-H3 (offene Dreiecke) und 21mer-L (gefüllte Quadrate) wurden auf ihre Eigenschaften zur Auto-Aktivierung von Präkallikrein untersucht. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM (n=3; *p<0,05; 21mer-H1 vs. 21mer-L). 96-Well-Platten wurden mit (B) 10 µg/ml Kininogen bzw. (C) 10 µg/ml Präkallikrein beschichtet und mit steigenden Konzentrationen der biotinylierten DNA-Oligonukleotide 21mer-H1 (geschlossene Kreise, unterbrochene Linie), 21mer-H3 (offene Dreiecke) und 21mer-L (geschlossene Quadrate) inkubiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM eines repräsentativen von drei unabhängig durchgeführten Experimenten (*p<0,05; 21mer-H1 vs. 21mer-L; #p<0,05; 21mer-H3 vs. 21mer-L). (D) Eine 96-Well-Platte wurde mit je 10 µg/ml Präkallikrein, Kininogen, Faktor XI (FXI), Faktor XII (FXII) und aktiviertem Faktor XII (FXIIa) beschichtet und mit 25 µg/ml der DNA-Oligonukleotide 21mer-H1 (schwarze Balken), 21mer-H3 (weiße Balken) und 21mer-L (gestreifte Balken) inkubiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM eines repräsentativen von drei unabhängig durchgeführten Experimenten (*p<0,05; 21mer-L oder 21mer-H3 vs. 21mer-H1).

Wie bereits oben beschrieben, war bei dieser Konzentration die stärkste Bindung des prokoagulatorischen Konstrukts 21mer-H1 an Kininogen detektierbar, während von 21mer-H3 und 21mer-L nur ein Drittel dieser Affinität erreicht wurde. Alle verwendeten Konstrukte banden mit vergleichbar niedriger Affinität an Präkallikrein und Faktor XII, während für Faktor XI und Faktor XIIIa keine Bindung detektierbar war (Abbildung 16D).

Diese Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass die prokoagulatorische Kofaktor-Aktivität kurzer Oligonukleotide mit stabiler Haarnadelstruktur durch eine spezifische Bindung an Kininogen vermittelt wurde und weiterführend in einer Aktivierung von Präkallikrein und den nachfolgenden Faktoren der Gerinnungskaskade resultierte.

4.1.5 Prokoagulatorische Aktivität von DNA-Aptameren

In Anlehnung an die Studie von Kannemeier et al.⁵² und die in den vorangegangenen Kapiteln beschriebene Eigenschaft kurzer Oligonukleotide mit stabiler Sekundärstruktur, die Initiierung des intrinsischen Gerinnungsweges zu vermitteln, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit die prokoagulatorischen Eigenschaften von zwei Aptameren analysiert. Hierzu wurden einerseits ein in den 1990er Jahren charakterisiertes 15mer-Thrombin-Aptamer¹⁰⁶, das stark antithrombotisch wirkt und aufgrund seiner freien Enthalpie keine stabile Sekundärstruktur ausbilden sollte, allerdings in Lösung in Form einer Quadruplex-Struktur vorliegt²⁶⁶⁻²⁶⁸, andererseits ein neu charakterisiertes 44mer-Protein C-Aptamer mit stabiler Sekundärstruktur, das die Thrombinproduktion reguliert, herangezogen²⁶⁹ (Abbildung 17A und B).

Die mögliche Fähigkeit dieser Aptamere als Kofaktoren die Aktivierung von Präkallikrein zu vermitteln wurde konzentrationsabhängig untersucht. Es zeigte sich, dass beide Aptamere Präkallikrein aktivierten, wobei das 44mer-Protein C-Aptamer bereits bei einer Konzentration von 1 µg/ml die maximale Aktivierung von Präkallikrein vermittelte und die Aktivität bei höheren Konzentrationen wieder stark abnahm, was auf einen möglichen Template-Effekt zurückzuführen ist. Das Thrombin-Aptamer erreichte die maximale Präkallikrein-Aktivierung bei einer Konzentration von 5 µg/ml (Abbildung 17C). Turbidimetrie-Experimente bestätigten die Funktionalität des 15mer-Thrombin-Aptamers in humanem Plasma, da es die Thrombin-abhängige Produktion von Fibrin und somit die Gerinnungsbildung inhibierte. Im Gegensatz dazu bewirkte das 44mer-Protein C-Aptamer eine Verkürzung der Gerinnungszeit auf 70% der Kontrolle (Abbildung 17D).

Diese Daten zeigen, dass Aptamere, auch mit eigentlich antikoagulatorischen Wirkungen wie das 15mer-Thrombin-Aptamer, als Kofaktoren die Aktivierung des intrinsischen Gerinnungswegs bewirken können. Dies resultierte in der hier vorliegenden Arbeit zwar nicht in einer verkürzten Gerinnungszeit, die Aktivierung des intrinsischen Systems ist allerdings immer mit der Freisetzung des Peptids Bradykinin verbunden³⁹, sodass die Applikation von Aptameren zu einem proinflammatorischen Phänotyp führen könnte.

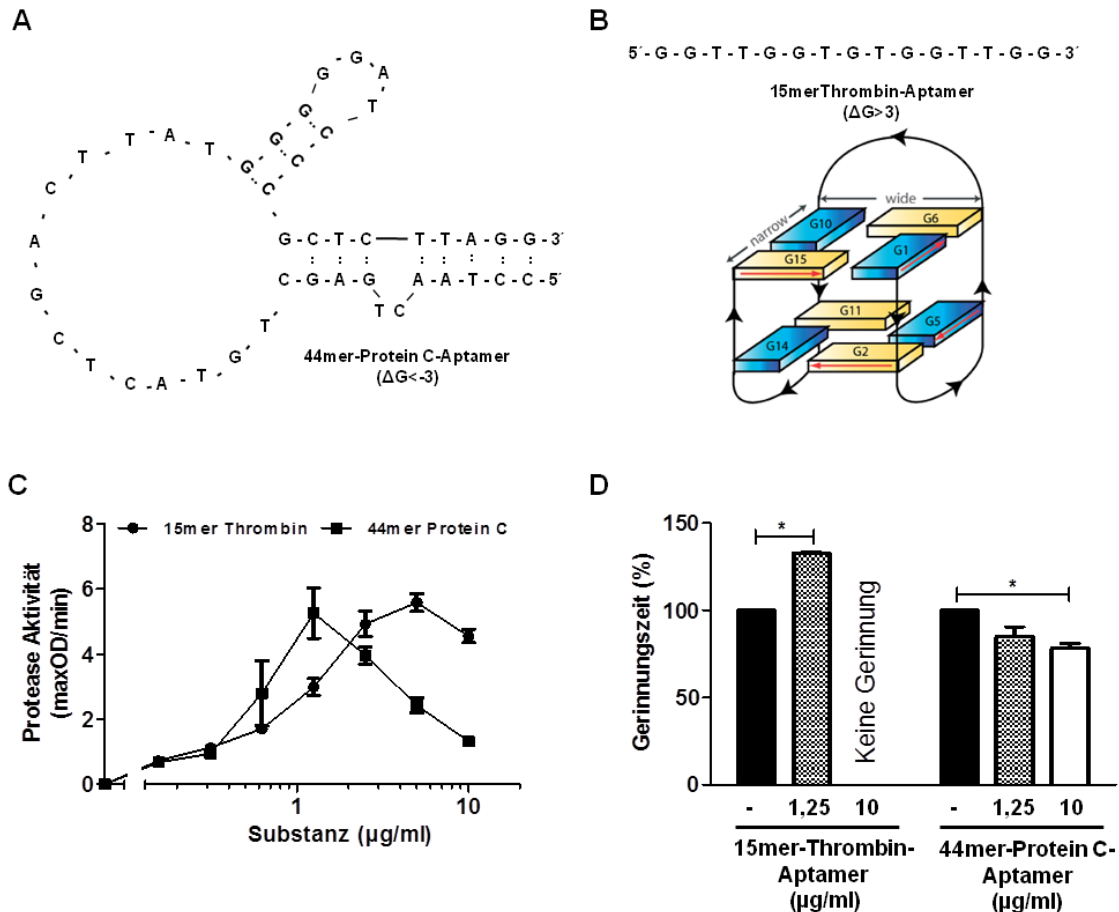


Abbildung 17: Prokoagulatorische Aktivität von DNA-Aptameren

Dargestellt sind die mittels der mFold DNA-Datenbank (Universität Albany, USA) berechneten Sekundärstrukturen sowie die freie Gibbs'sche Energie ΔG (negative Werte repräsentieren exergone und positive Werte endergone Prozesse) der verwendeten DNA-Aptamere (A) 44mer-Protein C und (B) 15mer-Thrombin und ein auf NMR-Analysen basierendes Modell der stabilen Quadruplex-Struktur des 15mer-Thrombin-Aptamers²⁶⁷. (C) Steigende Konzentrationen der DNA-Aptamere 15mer-Thrombin (Kreise) und 44mer-Protein C (Quadrate) wurden auf ihre Eigenschaften zur Auto-Aktivierung von Präkallikrein untersucht. (D) Es wurden Turbidimetrie-Messungen in humanem Plasma in Abwesenheit (schwarze Balken) oder Anwesenheit von 1,25 (gestreifte Balken) und 10 $\mu\text{g/ml}$ (weiße Balken) der DNA-Aptamere 15mer-Thrombin und 44mer-Protein C durchgeführt. Die Gerinnungszeit von humanem Plasma allein wurde als 100% definiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 3$; $*p < 0,05$; 1,25 $\mu\text{g/ml}$ oder 10 $\mu\text{g/ml}$ vs. Kontrolle).

4.1.6 Interaktion von Plättchenfaktor 4 (PF4) und Nukleinsäuren

Zusätzlich zu der Bindung von Nukleinsäuren an die Kontaktphasenproteine (Faktor XII, Faktor XI, Präkallikrein, Kininogen) konnten durch unsere Arbeitsgruppe auch Zytokine^{82,83}, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1)¹²⁰ sowie andere basische Proteine als Nukleinsäure-bindende Proteine identifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Chemokin Plättchenfaktor 4 (PF4) als weiterer Bindungspartner für RNA und DNA identifiziert.

Bindungsstudien mit biotinylierter RNA zeigten eine spezifische Wechselwirkung mit PF4, die durch die Zugabe von unmarkierter zellulärer RNA bzw. DNA, dem artifiziellen RNA-Analogon poly I:C sowie Heparin kompetitiert wurde (Abbildung 18A). Dieser Versuch wurde durchgeführt von Dr. Silvia Fischer, welche die Daten freundlicherweise zur Verfügung stellte. Da es sich bei zellulärer RNA um ein Gemisch verschiedener RNA-Moleküle mit unterschiedlicher Molmasse handelte, konnten aus den Bindungsversuchen keine Dissoziationskonstanten berechnet werden. Weitere Versuche zeigten, dass die Auto-Aktivierung von Präkallikrein vermittelt durch 1 µg/ml totale zelluläre DNA bzw. RNA (Abbildung 18B) sowie durch das DNA-Oligonukleotid 21mer-H1 (Abbildung 18C) konzentrationsabhängig durch die Zugabe von PF4 gehemmt werden konnte. Die Analyse der Bindung biotinylierter DNA-Oligonukleotide an PF4 lieferte vergleichbare Dissoziationskonstanten für alle getesteten Konstrukte (Abbildung 18D). Es ergaben sich für 21mer-H1 $K_D=2,81 \mu\text{M}$ ($\pm 0,49$), für 21mer-H3 $K_D=1,96 \mu\text{M}$ ($\pm 0,23$) und für 21mer-L $K_D=3,31 \mu\text{M}$ ($\pm 0,36$) (Abbildung 18E).

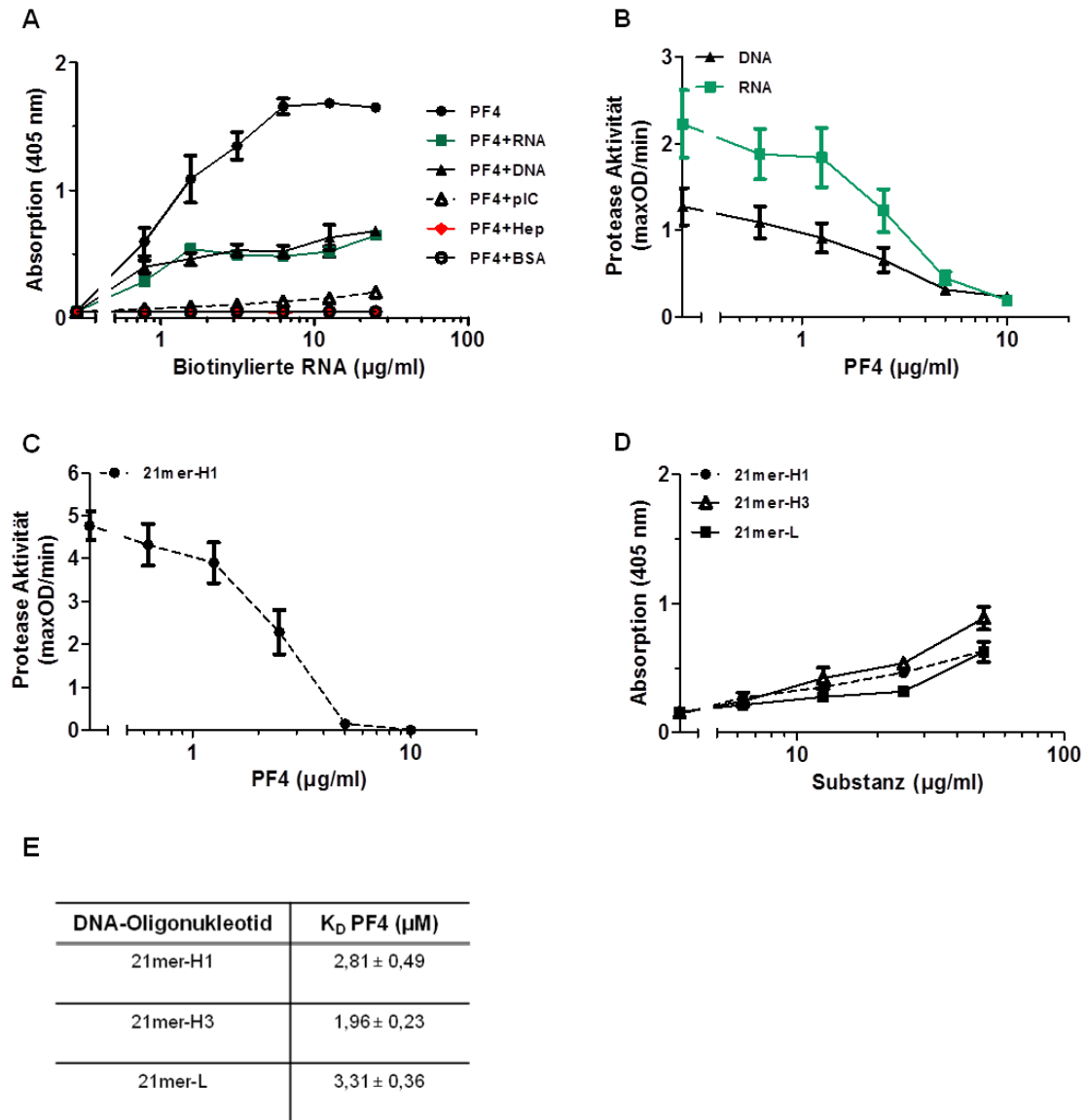


Abbildung 18: Interaktion von Plättchenfaktor 4 mit Nukleinsäuren

(A) 96-Well-Platten wurden mit 10 µg/ml PF4 beschichtet und mit steigenden Konzentrationen biotinylierter RNA (schwarze Kreise) inkubiert. Dies wurde zusätzlich in Anwesenheit von 300 µg/ml unmarkierter RNA (grüne Linie mit Quadraten), unmarkierter DNA (schwarze Dreiecke), poly I:C (unterbrochene Linie, offene schwarze Dreiecke), Heparin (rote Linie mit Rauten) und BSA (offene Kreise) durchgeführt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte ± SEM eines repräsentativen von drei unabhängigen Experimenten. Die Auto-Aktivierung von Präkallikrein wurde in der Anwesenheit steigender Konzentrationen von PF4 sowie (B) 1 µg/ml zellulärer DNA (schwarze Linie mit Dreiecken) oder RNA (grüne Linie mit Quadraten) bzw. (C) 1 µg/ml des DNA-Oligonukleotids 21mer-H1 (geschlossene Kreise) gemessen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten. (D) 96-Well-Platten wurden mit 10 µg/ml PF4 beschichtet und mit steigenden Konzentrationen der biotinylierten DNA-Oligonukleotide 21mer-H1 (geschlossene Kreise, unterbrochene Linie), 21mer-H3 (offene Dreiecke) und 21mer-L (geschlossene Quadrate) inkubiert. Die Abbildung zeigt Mittelwerte ± SEM eines repräsentativen von drei unabhängigen Experimenten. (E) Dissoziationskonstanten der Bindung verschiedener DNA-Oligonukleotide an PF4. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SEM (n=3).

4.2 Expression von RNase1 unter inflammatorischen Bedingungen

Extrazelluläre Nukleinsäuren, insbesondere RNA, induzieren einen proinflammatorischen und prokoagulatorischen Phänotyp am Endothel, indem sie zum einen VEGF-abhängig zu einer Permeabilitätserhöhung und der Exozytose vaso-aktiver Substanzen aus dem Endothel führen, zum anderen aber auch selbst als prokoagulatorischer Kofaktor den intrinsischen Gerinnungsweg aktivieren⁸¹. Dementsprechend könnten Ribonukleasen, welche die Degradierung von RNA katalysieren, regulatorisch in diese Prozesse eingreifen.

4.2.1 Einfluss von proinflammatorischen Substanzen auf die RNase 1-Expression in HUVEC

2010 ergaben Studien unserer Arbeitsgruppe, dass humane, aus Nabelschnurvenen isolierte primäre Endothelzellen (HUVEC) unter den getesteten Endothelzellen die stärkste Expression und Sekretion von RNase 1 zeigen. HUVEC sezernieren RNase 1 nicht nur konstitutiv, sondern speichern auch geringe Mengen dieses Enzyms in den Weibel-Palade-Granula, deren Exozytose durch proinflammatorische Stimulanzen wie Thrombin, VEGF, RNA oder Vasopressin induziert werden kann. Dies führt zu einem kurzfristigen Anstieg der RNase Aktivität im Zellkulturmedium oder, bei Anwendung des oben genannten Agonisten Vasopressin, auch in der Zirkulation der Maus⁸⁹.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von proinflammatorischen Stimuli auf die Expression und Sekretion von RNase 1 auf Gen- und Proteinebene analysiert werden. Hierzu wurden HUVEC 24 h mit verschiedenen Konzentrationen an Tumornekrosefaktor α (TNF α), Thrombin sowie Lipopolysacchariden (LPS) stimuliert und die mRNA-Expression von RNase 1 und RNase Inhibitor durch quantitative PCR ermittelt. Während LPS keinen Einfluss auf die Expression beider Proteine hatte, führte eine 24-stündige Stimulation mit TNF α in konzentrationsabhängiger Weise zu einer signifikanten Abnahme der mRNA-Expression von RNase 1 um 70% und durch 2,5 U/ml Thrombin um 50%. Im Gegensatz dazu konnte die Expression von RNase Inhibitor lediglich durch 0,75 U/ml Thrombin zweifach erhöht werden (Abbildung 19).

Eine signifikante Herunterregulation von RNase 1 wurde bei einer TNF α -Konzentration von 10 ng/ml sowie bei einer Thrombin-Konzentration von 2,5 U/ml erreicht, sodass diese Konzentrationen für alle weiteren Versuche verwendet wurden.

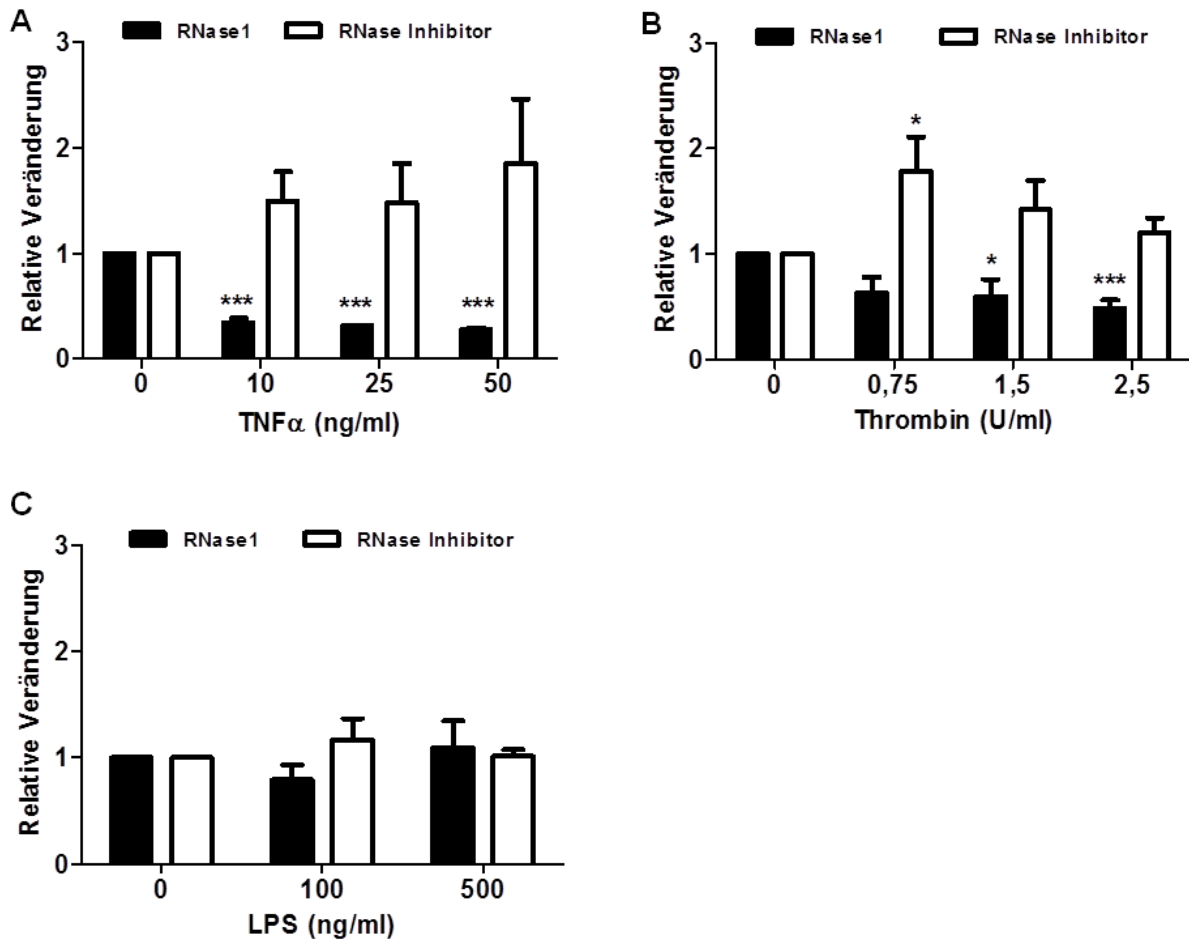


Abbildung 19: Genexpression von RNase 1 und RNase Inhibitor in HUVEC nach konzentrationsabhängiger Stimulation mit TNF α , Thrombin und LPS für 24 Stunden

Die Genexpression von RNase 1 und RNase Inhibitor in HUVEC wurde mittels quantitativer Real-time-PCR nach 24-stündiger Stimulation mit steigenden Konzentrationen von (A) TNF α , (B) Thrombin und (C) LPS ermittelt. Die Daten wurden normalisiert zu den Expressionsraten der GAPDH mRNA und ausgedrückt als das Verhältnis der Expression des Zielgens zu GAPDH. Die Expressionsrate in unbehandelten Zellen wurde als 1 definiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM (n \geq 3, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Zeitabhängige Stimulationen von HUVEC sollten Aufschluss über die Kinetik der durch TNF α - und Thrombin-vermittelten Verminderung der RNase 1 mRNA-Expression geben. Während durch Thrombin bereits nach 8 h Stimulation eine signifikante Veränderung der Expression von RNase 1 detektierbar war, wurde dies durch TNF α -induzierte Prozesse erst nach 24 h erreicht. Beide Stimulanzien hatten in den verwendeten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Expression von RNase Inhibitor (Abbildung 20).

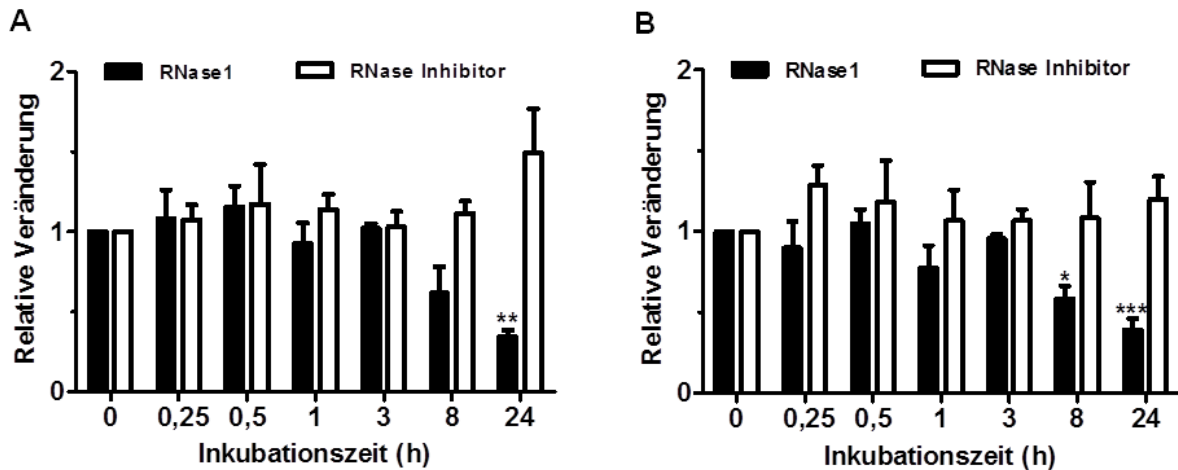


Abbildung 20: Genexpression von RNase 1 und RNase Inhibitor nach zeitabhängiger Stimulation von HUVEC mit TNFα oder Thrombin

Die Genexpression von RNase 1 und RNase Inhibitor in HUVEC wurde mittels quantitativer Real-time-PCR nach zeitabhängiger Stimulation mit (A) 10 ng/ml TNFα oder (B) 2,5 U/ml Thrombin ermittelt. Die Daten wurden normalisiert zu den Expressionsraten der GAPDH mRNA und ausgedrückt als das Verhältnis der Expression des Zielgens zu GAPDH. Die Expressionsrate in unbehandelten Zellen wurde als 1 definiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 4$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Um den Einfluss von TNFα und Thrombin auf die Expression von RNase 1 und RNase Inhibitor auf Proteinebene zu analysieren, wurden HUVEC 24 h mit TNFα bzw. Thrombin stimuliert und Lysate sowie Überstände für Western Blot Analysen, RNase Aktivitätstests und Zymographien verwendet.

Die Western Blot Analyse bestätigte die bereits mehrfach gezeigte Sekretion von RNase 1 in verschiedenen glykosylierten Isoformen durch HUVEC; diese entsprachen den drei Proteinbanden zwischen 17 und 26 kDa^{89,215}. In den Lysaten der Zellen konnte kein RNase 1-Signal detektiert werden. Während die Stimulation der Zellen mit Thrombin nur einen minimalen Einfluss auf die RNase 1-Expression zeigte, verminderte TNFα die Sekretion von RNase 1 auf ca. 30% des Kontrollwerts. Des Weiteren wurde durch beide Stimulationen weder die Expression von RNase Inhibitor im Zelllysate noch dessen Sekretion in den Zellüberstand beeinflusst (Abbildung 21A). LPS hatte keinen Einfluss auf die Sekretion von RNase 1 (Abbildung 21B).

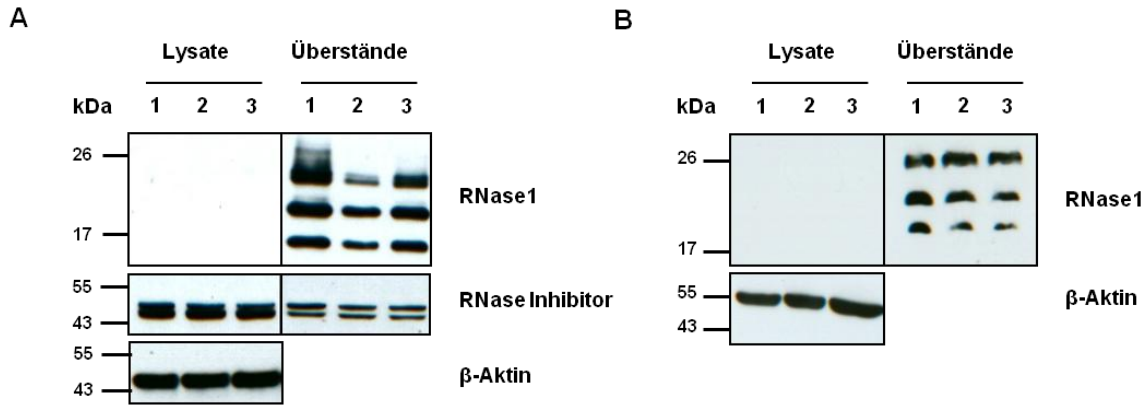


Abbildung 21: Proteinexpression und Sekretion von RNase 1 in HUVEC nach 24-stündiger Stimulation mit TNF α , Thrombin und LPS

(A) Nach 24-stündiger Behandlung mit (1) Serum-freiem Medium, (2) 10 ng/ml TNF α oder (3) 2,5 U/ml Thrombin wurden Lysate sowie konzentrierte Zellüberstände mittels Western Blot analysiert, wobei Primärantikörper gegen RNase 1, RNase Inhibitor und β -Aktin verwendet wurden. (B) Nach 24-stündiger Behandlung mit (1) Serum-freiem Medium, (2) 250 ng/ml LPS oder (3) 500 ng/ml LPS wurden Lysate und konzentrierte Zellüberstände mittels Western Blot analysiert, wobei Primärantikörper gegen RNase 1 und β -Aktin verwendet wurden. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

Eine 24-stündige Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen an TNF α verminderte die RNase-Aktivität in den Überständen von HUVEC signifikant um bis zu 70%, während die Stimulation der Zellen mit Thrombin zu keiner signifikanten Änderung der RNase-Aktivität führte (Abbildung 22A). Eine In-Gel-Zymographie, welche die Detektion von RNasen in Polyacrylamidgelen durch den Verdau des Substrats Poly:C ermöglichte, bestätigte die oben beschriebenen Ergebnisse. Während in den Lysaten keine messbare RNase-Aktivität vorhanden war, wurden in den Überständen der unbehandelten HUVEC, wie im Western Blot (Abbildung 21), drei RNase-Banden zwischen 17 und 26 kDa detektiert. Deren Intensität war nach 24-stündiger Behandlung mit TNF α deutlich geringer. Im Gegensatz dazu beeinflusste die Stimulation mit Thrombin die Bandenintensität nicht (Abbildung 22B). Zusätzlich zeigten die Überstände von TNF α - aber nicht von Thrombin-behandelten HUVEC einen signifikant erhöhten RNA-Gehalt in ihren Überständen (Abbildung 22C und D).

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, dass die proinflammatorischen Substanzen TNF α und Thrombin die Expression, Sekretion und Aktivität von RNase 1 auf Gen- und Proteinebene verminderten. Da hierbei die durch TNF α vermittelten Effekte im Vergleich zu Thrombin deutlich stärker waren, fokussierten sich nachfolgende Experimente auf die Rolle von TNF α als negativer Regulator von RNase 1 sowie die Analyse des involvierten Signaltransduktionsweges.

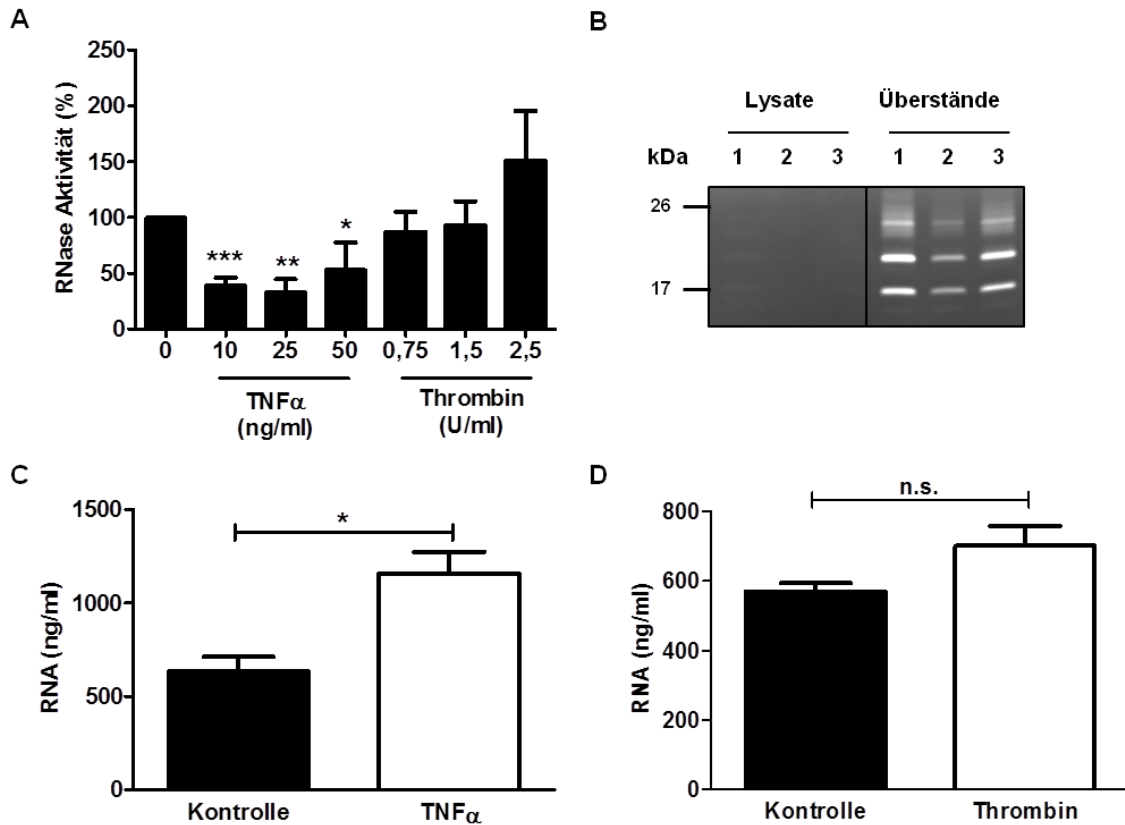


Abbildung 22: RNase-Aktivität und RNA-Gehalt in HUVEC-Überständen nach 24-stündiger Stimulation mit TNF α und Thrombin

(A) Die RNase-Aktivität im Überstand von HUVEC wurde nach 24 h Stimulation mit Serum-freiem Medium oder steigenden Konzentration von TNF α oder Thrombin mittels eines Aktivitätstests detektiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- SEM (n \geq 4, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). (B) Zymographie von Lysaten und Überständen nach 24-stündiger Stimulation mit (1) Serum-freiem Medium, (2) 10 ng/ml TNF α bzw. (3) 2,5 U/ml Thrombin. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten. Der RNA-Gehalt in den Zellüberständen wurde nach 24-stündiger Stimulation von HUVEC mit (C) 10 ng/ml TNF α und (D) 2,5 U/ml Thrombin bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- SEM (n \geq 3, *p<0,05).

4.2.2 Analyse des TNF α -Signalweges

Zur mechanistischen Analyse des Signaltransduktionsweges, der zur TNF α -abhängigen Absenkung der RNase 1-Expression führte, wurde zunächst die Rolle des Transkriptionsfaktors NF κ B untersucht. Die Bindung von TNF α an die TNF-Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 führt zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege, wobei der prominenteste Signalweg über den Transkriptionsfaktor NF κ B läuft (siehe 1.3.3)^{159,168,172}. Um nachzuweisen, dass die TNF α -vermittelte Verminderung der RNase 1-Expression NF κ B-abhängig ist, wurde die Aktivierung von NF κ B durch den Inhibitor BAY 11-7082 blockiert, der spezifisch die Phosphorylierung von I κ B und damit auch die nachfolgende Aktivierung von

NFκB und dessen Translokation in den Zellkern verhinderte¹⁷³. HUVEC wurden für 4 h mit 10 μM BAY 11-7082 vorinkubiert, anschließend 24 h mit TNFα behandelt und die Proben anschließend auf Proteinebene untersucht. Die TNFα-abhängige Verminderung der RNase 1-Expression konnte durch Zugabe des Inhibitors BAY 11-7082 nicht kompensiert werden, was für einen NFκB-unabhängigen Signalweg spricht. Die Inhibierung der durch TNFα in NFκB-abhängiger Weise vermittelten Hochregulation des intrazellulären Adhäsionsmoleküls 1 (ICAM-1, *intracellular adhesion protein 1*)^{270,271} bestätigte die Funktionalität des Inhibitors (Abbildung 23). Diese Ergebnisse deuten auf einen von NFκB unabhängigen Regulationsmechanismus der RNase 1 hin.

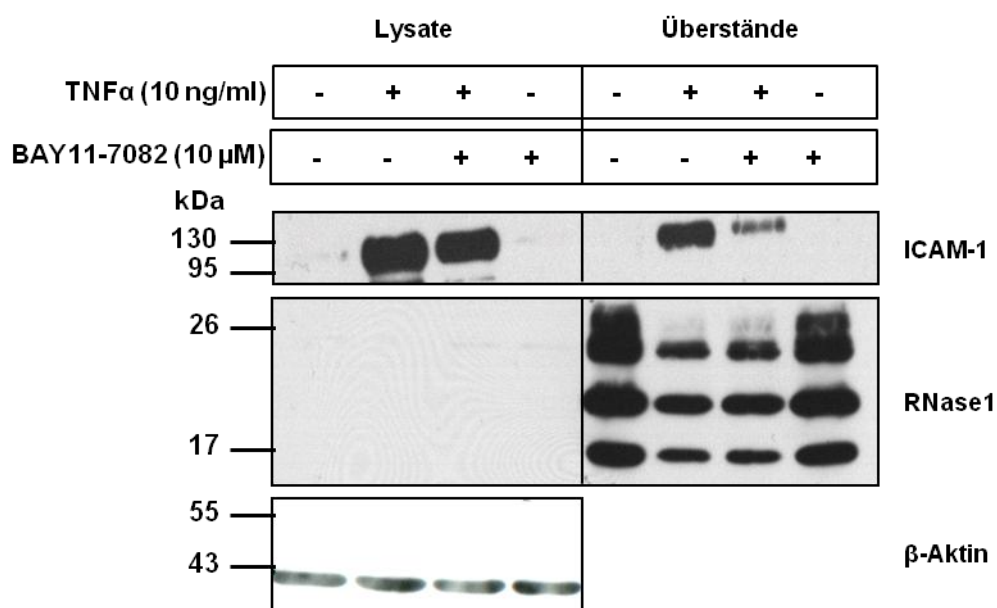


Abbildung 23: Proteinexpression und Sekretion von RNase 1 nach Stimulation von HUVEC mit TNFα und BAY11-7082
 HUVEC wurden 2 h mit Serum-freiem Medium gehungert und 4 h mit 10 μM BAY11-7082 wie angegeben vorinkubiert. Nach Zugabe von 10 ng/ml TNFα wurden die Zellen 24 h inkubiert und Lysate und konzentrierte Überstände mittels Western Blot analysiert. Es wurden Primärantikörper gegen ICAM-1, RNase 1 und β-Aktin verwendet. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

In mehreren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass TNFα die Genexpression verschiedener Proteine durch Modifikationen des Acetylierungsmusters von Histonen beeinflusst^{272,273}. Die Verwendung von Trichostatin A (TSA), das Histondeacetylasen (HDAC) der Klasse I und II inhibierte, ermöglichte es zu untersuchen, ob die Expression der RNase 1 von einem veränderten Acetylierungsstatus der Zellen abhängig ist.

Zur Inhibierung der HDACs erfolgte eine 4-stündige Vorinkubation der HUVEC mit verschiedenen Konzentrationen TSA, gefolgt von einer 24-stündigen Stimulation mit TNF α und anschließender Western Blot Analyse von Lysaten und Überständen. Während die Sekretion von RNase 1 durch TNF α -Behandlung auf ca. 30% des Kontrollwertes vermindert wurde, erhöhte die Vorinkubation der Zellen mit TSA die Menge der in den Überstand sezernierten RNase 1 konzentrationsabhängig. TSA allein hatte keinen Einfluss auf die RNase 1-Expression, allerdings verstärkte es die durch TNF α induzierte Freisetzung von ICAM-1 in den Zellkulturüberstand (Abbildung 24).

Die Daten ließen die Schlussfolgerung zu, dass die Expression von RNase 1 über eine Veränderung des Acetylierungsmusters gesteuert wurde. Da diese Art der Genregulation von äußeren Stimuli abhängig ist, sollte die Herunterregulation von RNase 1 nach Entfernen des TNF α -Stimulus wieder hergestellt werden.

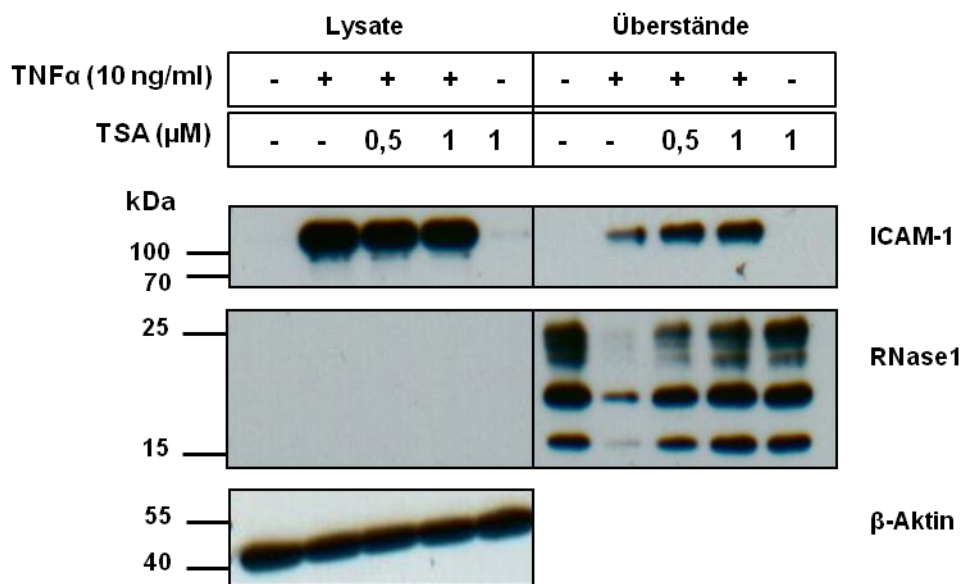


Abbildung 24: Proteinexpression und Sekretion von RNase 1 nach Stimulation von HUVEC mit TNF α und Trichostatin A (TSA)

HUVEC wurden 2 h mit Serum-freiem Medium gehungert, 4 h mit 0,5 μ M bzw. 1 μ M TSA vorinkubiert und anschließend mit 10 ng/ml TNF α für 24stimuliert. Es erfolgte eine Western Blot Analyse von Lysaten und konzentrierten Überständen, wobei Primärantikörper gegen ICAM-1, RNase 1 und β -Aktin verwendet wurden. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

Dazu erfolgten nach 24-stündiger Inkubation von HUVEC mit Serum-freiem Medium im Vergleich zu 10 ng/ml TNF α ein Mediumwechsel und eine zeitabhängige Inkubation in Serum-freiem, unbehandeltem Medium. Durch Analysen auf mRNA- und Proteinebene

wurde die zeitabhängige Wiederherstellung der RNase 1-Expression detektiert. Die Expressionsrate von RNase 1 lag 8 h nach Entfernen des TNF α -Stimulus signifikant über dem Ausgangswert und nach 24 h wieder auf Ausgangsniveau (Abbildung 25). Diese Ergebnisse bestätigten die Abhängigkeit der Expressionsverminderung von RNase 1 von einem äußeren Stimulus.

Neben der Analyse des involvierten Signalweges, stand die Beteiligung der daraus resultierenden Verminderung der RNase 1-Expression an TNF α -abhängigen Prozessen, wie Permeabilitätsveränderungen des Endothels, im Fokus weiterführender Experimente.

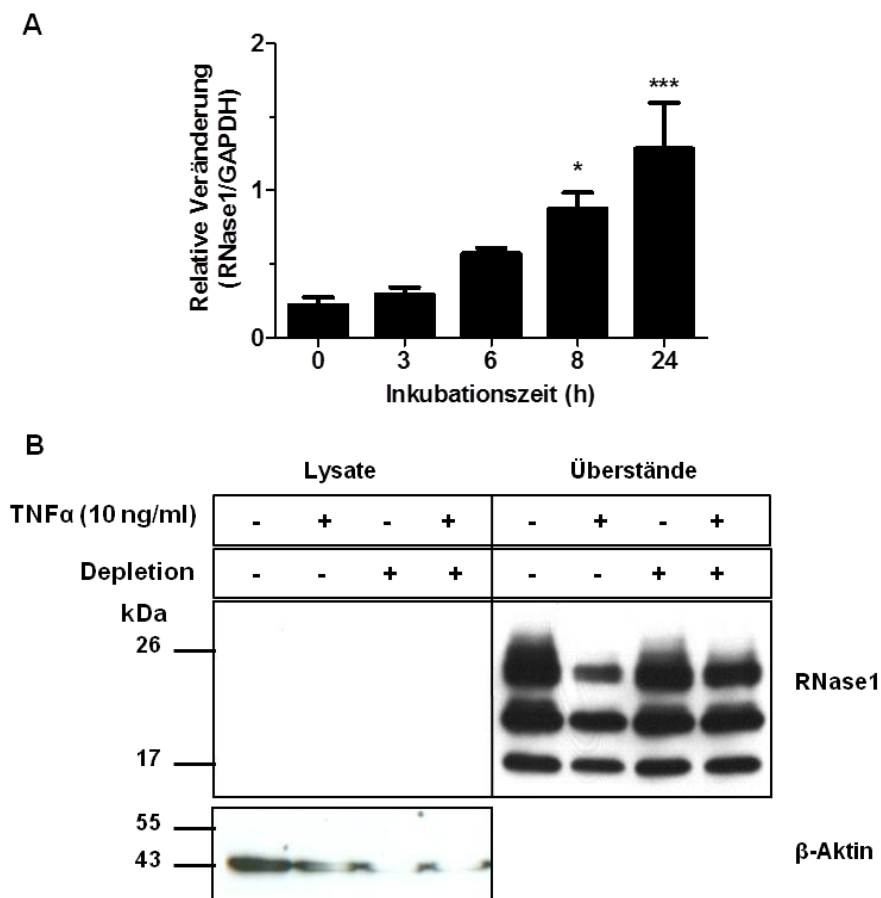


Abbildung 25: Expression und Sekretion von RNase 1 nach Depletion des TNF α -Stimulus

Nach 24-stündiger Stimulation von HUVEC mit Serum-freiem Medium oder 10 ng/ml TNF α erfolgte eine zeitabhängige Inkubation in Serum-freiem Medium. (A) Die Zellen wurden zeitabhängig nach dem Mediumwechsel geerntet und die Genexpression von RNase 1 mittels quantitativer Real-time PCR ermittelt. Die Daten wurden normalisiert zu den Expressionsraten der GAPDH mRNA und ausgedrückt als Verhältnis der Expression von RNase 1 zu GAPDH. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 3$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). (B) Die Zellen wurden 24 h nach dem Mediumwechsel geerntet und die Proteinexpression von RNase 1 und β -Aktin in Lysaten und konzentrierten Überständen mittels Western Blot analysiert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

4.2.3 Einfluss von RNase 1 auf Zell-Zell-Kontakte

Die Erhöhung der zellulären Permeabilität ist ein bekannter Effekt von TNF α auf Endothelzellen, welcher auch mit einer veränderten Expression und Verteilung von VE-Cadherin verbunden ist²⁷⁴. Um zu analysieren, ob die TNF α -abhängige Hyperpermeabilität in Endothelzellen mit der Herunterregulation von RNase 1 korreliert, wurde die Expression von RNase 1 mittels siRNA in HUVEC vermindert.

Zur Etablierung dieser Methode wurden HUVEC mit steigenden Konzentrationen einer gegen RNase 1 gerichteten siRNA sowie einer siRNA-Kontrolle, gerichtet gegen GAPDH, transfiziert und die Effizienz nach 24 h mittels semi-quantitativer PCR nachgewiesen, wobei die mRNA-Expression von RNase 1 auf etwa 30%, bezogen auf die Kontrolle, sank (Abbildung 26A). Die Transfektion mit einer siRNA gegen GAPDH zeigte keinen Einfluss auf die RNase 1-Expression, wohingegen die Expression des Zielgens GAPDH reduziert wurde.

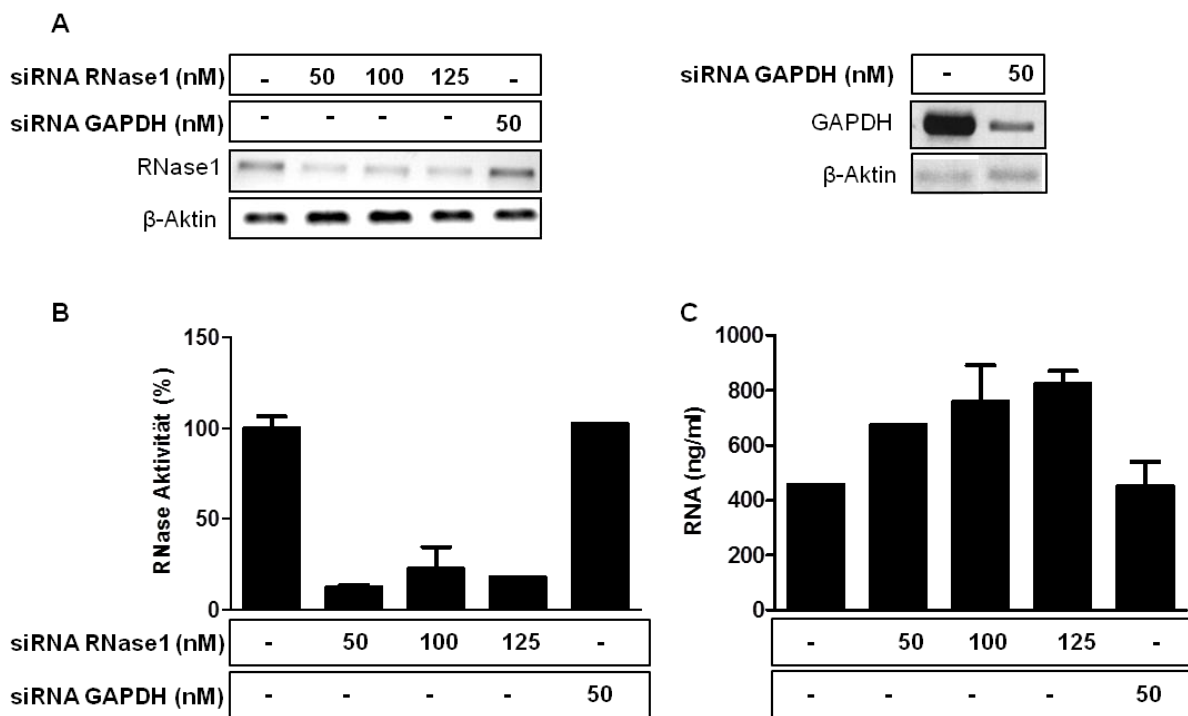


Abbildung 26: siRNA-vermittelte Herunterregulation der RNase 1-Expression in HUVEC

HUVEC wurden mit steigenden Konzentrationen an siRNA gegen RNase 1 bzw. GAPDH transfiziert und die Effizienz mittels (A) semi-quantitativer PCR und (B) RNase-Aktivitätstest nachgewiesen. (C) Der RNA-Gehalt in den Überständen von transfizierten HUVEC wurde bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm SD eines repräsentativen von zwei unabhängigen Experimenten.

RNase Aktivitätstests der Zellkulturüberstände transfizierter Zellen bestätigten die Effizienz der Methode auf Proteinebene, da nur in den mit siRNA gegen RNase 1 transfizierten Zellen eine Abnahme der RNase Aktivität beobachtet wurde, während die verminderte Expression von GAPDH keinen Einfluss auf die RNase Aktivität hatte (Abbildung 26B). Zusätzlich war der RNA-Gehalt in den Überständen der mit siRNA gegen RNase 1 transfizierten Zellen erhöht, was mit der verminderten RNase 1-Expression und der damit verbundenen reduzierten Enzymaktivität korrelierte (siehe Abbildung 26C). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden alle weiteren Versuche mit einer siRNA-Konzentration von 50 nM durchgeführt.

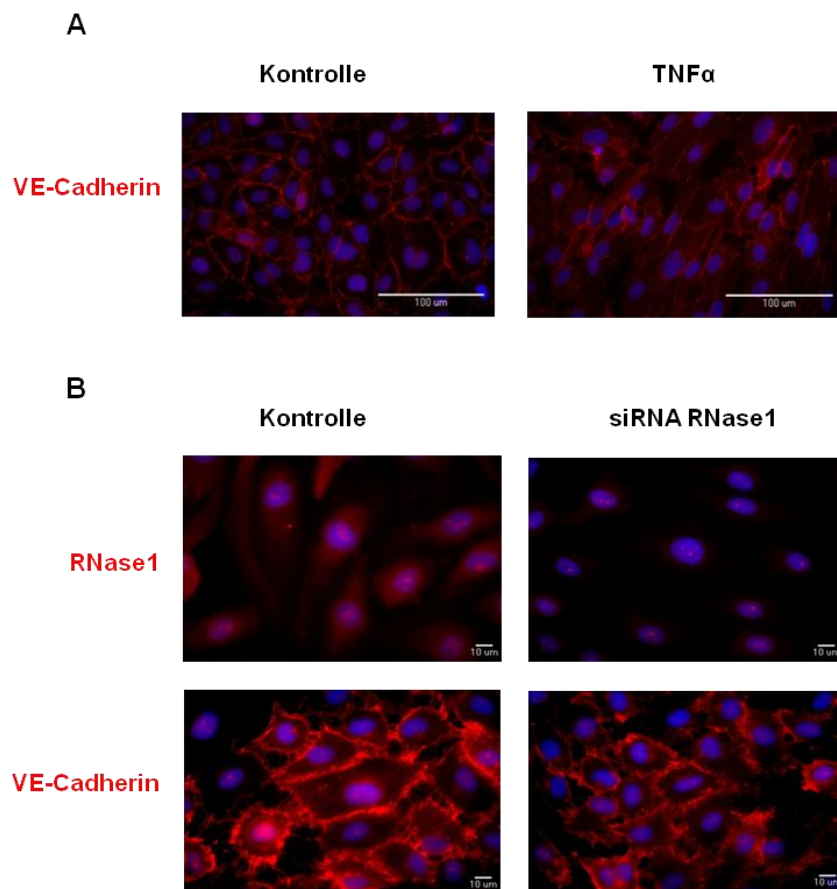


Abbildung 27: Fluoreszenzfärbung von HUVEC

(A) HUVEC wurden auf 8-Well Objektträgern ausgesät, 24 h mit Serum-freiem Medium (Kontrolle) oder 10 ng/ml TNF α behandelt und eine Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen VE-Cadherin (rot) durchgeführt und mit 40-facher Vergrößerung analysiert. (B) HUVEC wurden auf 8-Well Objektträger ausgesät und mit siRNA gegen RNase 1 transfiziert. Nach 48 h wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen RNase 1 (rot) und VE-Cadherin (rot) durchgeführt und mit 63-facher Vergrößerung analysiert. Die Aufnahmen entsprechen einem repräsentativen Versuch von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Der Einsatz indirekter Fluoreszenzmikroskopie ermöglichte eine Analyse der VE-Cadherin-Verteilung zum einen in TNF α -behandelten HUVEC, zum anderen in HUVEC, deren RNase 1-Expression mittels siRNA auf ein Minimum reduziert wurde.

Die Stimulation von HUVEC mit TNF α beeinflusste die Verteilung von VE-Cadherin in bekannter Weise. Während die Zell-Zell-Kontakte in den unbehandelten HUVEC intakt waren und die Zellen kompakt verbanden, war die Intensität des VE-Cadherin-Signals in den mit TNF α -behandelten Zellen deutlich abgeschwächt und wies außerdem deutliche Unterbrechungen auf, die auf eine erhöhte Permeabilität hinwiesen (Abbildung 27A). Eine Analyse der siRNA-transfizierten HUVEC mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden bestätigte die Reduktion der RNase 1-Expression durch ein deutlich vermindertes Fluoreszenzsignal im Zytoplasma. Gleichzeitig korrelierte die Herunterregulation von RNase 1 mit einem verminderten Signal für VE-Cadherin und einer diffuseren Färbung der Zell-Zellkontakte (Abbildung 27B). Eine vorläufige Western Blot-Analyse der Zelllysate von HUVEC, nach Transfektion mit siRNA gegen RNase 1 bzw. nach 24-stündiger Simulation mit 10 ng/ml TNF α , bestätigte, dass die Proteinexpression von VE-Cadherin nicht verändert wurde, sondern die diffusere Immunfluoreszenzfärbung in den behandelten Zellen auf einer Umverteilung des VE-Cadherins beruht (Abbildung 28).

Diese Analysen lieferten erste Hinweise, dass die TNF α -vermittelte Herunterregulation der RNase 1-Expression an einer Umverteilung von VE-Cadherin beteiligt war.

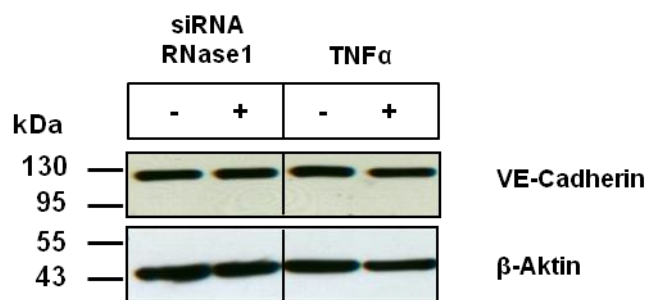


Abbildung 28: VE-Cadherin-Expression in HUVEC

HUVEC wurden mit 50 nM siRNA gegen RNase 1 transfiziert bzw. 24 h mit 10 ng/ml TNF α stimuliert und die Lysate mittels Western Blot analysiert, wobei Primärantikörper gegen VE-Cadherin und β -Aktin verwendet wurden. Die Abbildung zeigt vorläufige Ergebnisse, da das Experiment bisher nur einmal durchgeführt werden konnte.

5 Diskussion

5.1 Die prokoagulatorische Aktivität von Oligonukleotiden in Abhängigkeit zu ihrer Sekundärstruktur

Seit der ersten Beschreibung im Jahr 1871⁶⁶ wurden die Funktionen von Nukleinsäuren intensiv untersucht. Hierbei konnte DNA als Speicher der genetischen Information im Nukleus identifiziert werden, während die instabilere RNA intrazellulär die Übersetzung der genetischen Information in eine Aminosäuresequenz und damit in ein Protein vermittelt⁶⁷ und in Form von kleinen, nicht-kodierenden RNAs die Proteinsynthese reguliert^{68,69}.

Dass DNA und RNA nicht nur intrazelluläre sondern auch extrazelluläre Aktivitäten besitzen, wurde durch verschiedene Studien gezeigt. So wurden erhöhte Konzentrationen verschiedener DNAs, RNAs sowie RNA-Lipid-Komplexe im Plasma von Tumorpatienten und Patienten mit Autoimmunerkrankungen beschrieben⁷³⁻⁷⁸.

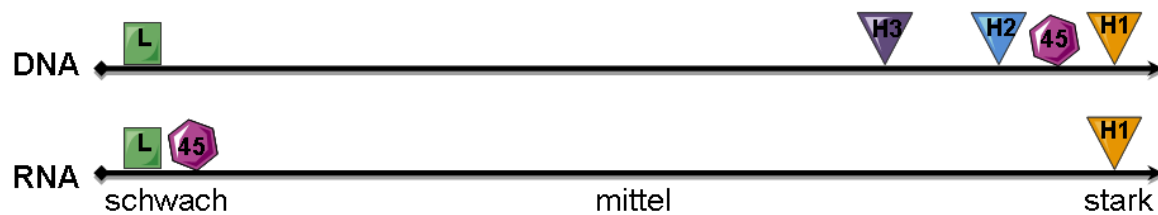
Unsere Gruppe identifizierte 2007 extrazelluläre RNA, freigesetzt durch Zellruptur und vaskuläre Verletzungen, als Kofaktoren zur Aktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems⁵². Nachfolgende Studien von Oehmcke et al. erweiterten diese Ergebnisse durch die Beobachtung, dass die Serinproteasen des intrinsischen Gerinnungsweges durch die von Neutrophilen in der Gegenwart pathogener Mikroorganismen gebildeten DNA-Netze, den NETs, aktiviert werden⁴⁰. Somit besitzen sowohl extrazelluläre DNA wie auch RNA prokoagulatorische Aktivitäten. Allerdings wurde bislang nicht untersucht, inwieweit diese Aktivitäten von bestimmten Strukturmerkmalen wie Sequenz oder Sekundärstruktur der Substanzen abhängig sind.

5.1.1 Analyse der prokoagulatorischen Aktivität verschiedener synthetischer DNA- und RNA-Oligonukleotide

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Stabilität sowie die prokoagulatorische Aktivität verschiedener DNA- und RNA-Oligonukleotide in Abhängigkeit ihrer Struktur untersucht. Dafür wurden zwei 21mer-Oligonukleotide mit verschiedenen Sekundärstrukturen (linear ohne stabile Sekundärstruktur sowie eine Haarnadel-Struktur) und ein längeres, komplexer strukturiertes 45mer-Oligonukleotid jeweils in Form von RNA und DNA verwendet (Abbildung 12).

Korrelierend mit vorangegangenen Studien, in denen DNAs unabhängig von ihrer Struktur bis zu zwei Stunden in Plasma nachweisbar waren²⁷⁵, wurden die DNA-Oligonukleotide nicht degradiert. Im Gegensatz dazu erfolgte die Hydrolyse der verwendeten RNA-Oligonukleotide durch die im Plasma zirkulierenden RNasen^{241,246} in Abhängigkeit ihrer Sekundärstruktur, sodass nur das RNA-Oligonukleotid 21mer-H1, welches eine stabile Haarnadelstruktur aufweist, nach fünf-minütiger Inkubation noch detektierbar war.

A: Einfluss auf die Gerinnungszeit von Plasma



B: Auto-Aktivierung von Präkallikrein

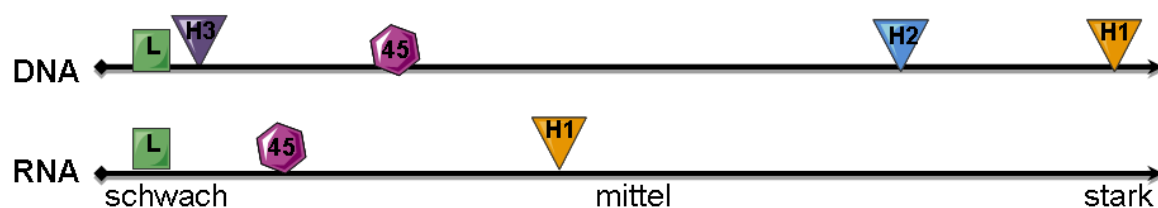


Abbildung 29: Vergleich der prokoagulatorischen Eigenschaften der verwendeten synthetischen Nukleinsäure-oligonukleotide

Dargestellt ist ein direkter Vergleich der Einflüsse der verwendeten DNA- und RNA-Oligonukleotide auf (A) die Gerinnungszeit von humanem Plasma und (B) die Autoaktivierung von Präkallikrein im isolierten System: 21mer-L (grünes Quadrat), 21mer-H1 (orangefarbenes Dreieck), 21mer-H2 (blaues Dreieck), 21mer-H3 (graues Dreieck), 45mer (lila Sechseck).

Die prokoagulatorischen Aktivitäten der verwendeten 21mer-Oligonukleotide waren von ihrer Sekundärstruktur abhängig, sodass für Haarnadel-formende Strukturen starke prokoagulatorische Aktivitäten detektiert wurden während Strukturen ohne stabile Sekundärstruktur, unabhängig von ihrer Stabilität im Plasma, inaktiv waren. Im direkten Vergleich erbrachte dabei das DNA-Oligonukleotid 21mer-H1 die höchste spezifische Kofaktoraktivität. Vergleiche verschiedener Haarnadel-Strukturen bestätigten die koagulatorischen Kofaktoraktivitäten dieser Substanzen (Abbildung 29). Die verminderte prokoagulatorische Aktivität von multimeren Haarnadel-Strukturen kann möglicherweise auf

eine verminderte Zugänglichkeit der für die Proteinbindung relevanten Nukleinsäuresequenzen zurückgeführt werden.

Die prokoagulatorischen Eigenschaften der verwendeten 45mer-Oligonukleotide korrelierten mit ihrer Stabilität im Plasma. Während das DNA-Oligonukleotid die Gerinnungszeit von humanem Plasma verkürzte, zeigte das RNA-Oligonukleotid aufgrund seiner raschen Degradierung keine Aktivität.

5.1.2 Bindungsaffinitäten verschiedener synthetischer DNA-Oligonukleotide zu Proteinen des intrinsischen Gerinnungsweges

Bereits 2007 identifizierte unsere Gruppe die Serinproteasen des intrinsischen Gerinnungsweges (PK, FXII, FXI) sowie deren nicht-enzymatischen Kofaktor HK als Nukleinsäure-bindende Proteine⁵². Um die Interaktion zwischen den verschiedenen Oligonukleotiden und den Proteinen des intrinsischen Gerinnungsweges zu analysieren, wurden Bindungsexperimente durchgeführt. Diese zeigten, dass die 21mer-DNA-H1-Struktur spezifisch mit HK interagiert, während die anderen getesteten Substanzen keine bzw. nur geringe Bindungsaffinitäten für HK, PK, FXI oder FXII zeigten.

Diese Daten implizieren, dass die prokoagulatorische Aktivität der Haarnadel-enthaltenden Nukleinsäuren durch die spezifische Bindung an HK vermittelt wird. Diese Interaktion positioniert die Nukleinsäuren in unmittelbarer Nähe der Serinproteasen des intrinsischen Gerinnungsweges und könnte so deren Autoaktivierung unterstützen. Zusätzlich könnte das bei diesen Reaktionen während der Spaltung von HK freigesetzte Peptid BK durch Interaktion mit den entsprechenden Rezeptoren einen proinflammatorischen Phänotyp, verbunden mit einer Hyperpermeabilität des Endothels und einem erhöhten Risiko zur Ausbildung von Ödemen, induzieren (Abbildung 30).

Dies erweitert die bisherigen Kenntnisse der Interaktion von Nukleinsäuren mit Gerinnungsproteinen, da bislang alle Experimente mit zellulärer RNA bzw. DNA durchgeführt und die gezeigten Wechselwirkungen lediglich auf Ladungs- und größenabhängige Effekte zurückgeführt wurden. Die hier vorliegenden, neuen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass insbesondere Haarnadel-formende Strukturen prokoagulatorische Funktionen vermitteln. Solche Strukturen sind auch in den natürlich vorkommenden RNA-Makromolekülen (ribosomaler RNA, transfer-RNA und messenger-RNA) vorhanden, welche aus dem Zytoplasma geschädigter Zellen freigesetzt werden. Aufgrund der Anwesenheit von RNasen in humanem Plasma ist die Halbwertszeit freier RNA-Moleküle wahrscheinlich zu kurz, um

systemische Auswirkungen zu haben. Lokal werden allerdings ausreichend hohe Konzentrationen erreicht, um an der Verletzungsstelle physiologische Prozesse zu vermitteln.

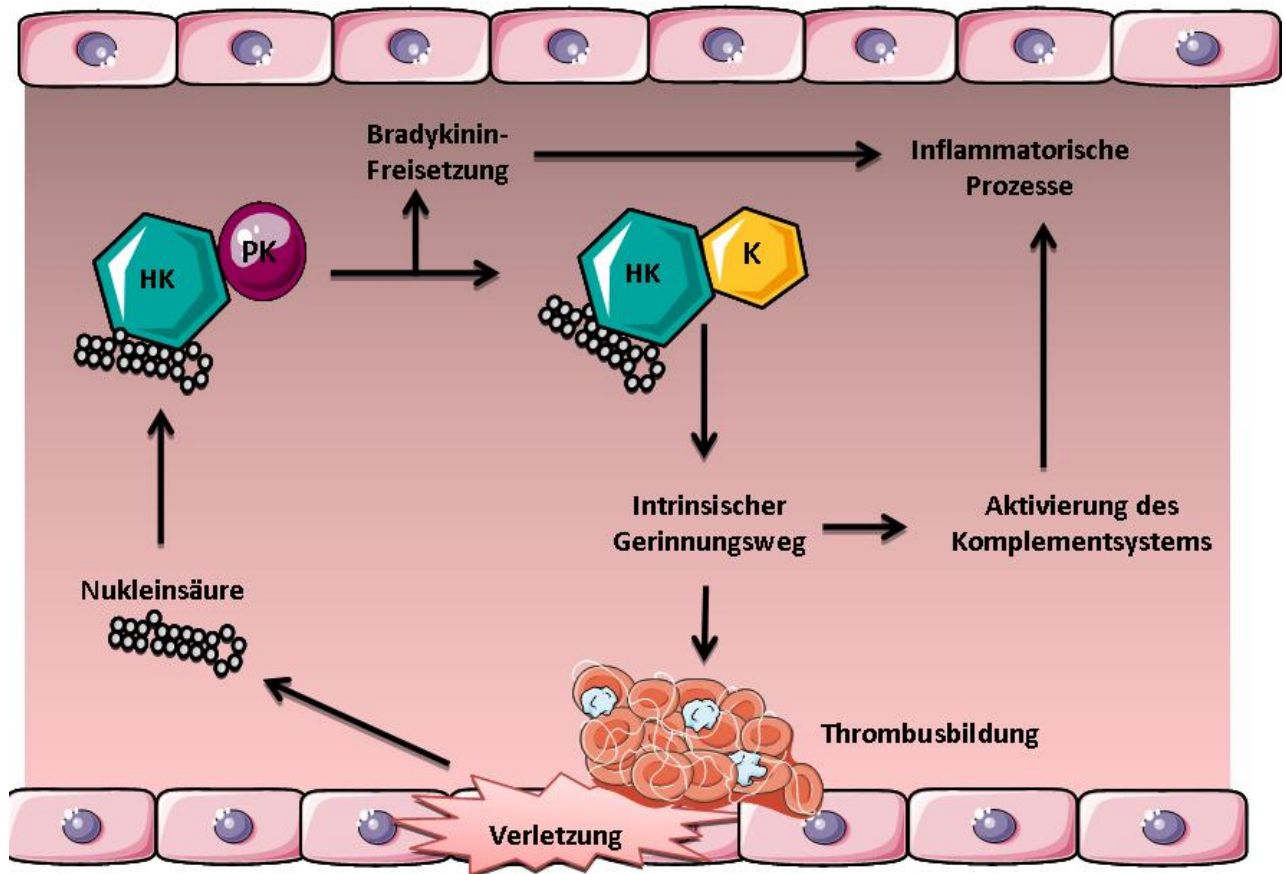


Abbildung 30: Haarnadel-Strukturen vermitteln die prokoagulatorische Aktivität von Nucleinsäuren

Nucleinsäuren mit stabiler Haarnadel-Struktur binden an den im vaskulären System zirkulierenden Komplex aus Präkallikrein (PK) und hochmolekularem Kininogen (HK), was zu einer auto-katalytischen Spaltung und der damit verbundenen Aktivierung von Präkallikrein zu Kallikrein (K) sowie der Freisetzung des Peptids Bradykinin aus Kininogen führt. Kallikrein vermittelt über den intrinsischen Gerinnungsweg die kaskadenartige Aktivierung weiterer zymogener Vorstufen von Gerinnungsproteinen, was in der Bildung eines stabilen Thrombus resultiert. Sowohl die Freisetzung von Bradykinin als auch die Faktor XII-abhängige Aktivierung des Komplementsystems können inflammatorische Prozesse initiieren.

Die bereits einleitend beschriebene Identifizierung verschiedener RNAs²⁷⁶ in humanem Plasma unter normalen wie auch pathologischen Bedingungen⁷⁶⁻⁷⁸, welche offenbar vor einer Degradierung durch RNasen geschützt sind, festigt die Hypothese, dass extrazelluläre RNAs durch verschiedene Mechanismen stabilisiert werden. Dies könnte *in vivo* durch den Transport in Mikropartikeln (siehe 5.3) oder die Bindung an Proteine, wie die unter 5.2

genauer diskutierte Wechselwirkung zwischen Nukleinsäuren und PF4, erreicht werden. Dadurch würden auch langfristige physiologische Aktivitäten von extrazellulärer RNA ermöglicht. *In vivo* bestätigte die signifikante Verminderung der Thrombusbildung durch eine Vorbehandlung von Mäusen mit RNase 1, aber nicht mit DNase, die Beteiligung von RNA an diesem Prozess. Die Beteiligung von endogener extrazellulärer DNA wurde, auch aufgrund der Lokalisation im Nukleus und der Assoziation mit Histonen, als gering eingeschätzt^{52,82}.

Diese Einschätzung wurde durch Studien von Oehmcke et al. aus dem Jahr 2009 erweitert⁴⁰. Hierbei wurde erstmals die Bindung und Aktivierung der Serinproteasen des intrinsischen Gerinnungsweges durch die von Neutrophilen in der Gegenwart pathogener Mikroorganismen gebildeten NETs beschrieben. Extrazelluläre DNA vermittelt somit unter inflammatorischen Bedingungen die Aktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems. Die involvierten Serinproteasen sind neben koagulatorischen auch in inflammatorische Prozesse (Aktivierung des Komplementsystems, Freisetzung von BK aus HK) involviert, die zu einer Amplifikation der angeborenen Immunantwort führen können und somit einen wichtigen Aspekt des körpereigenen Abwehrsystems gegenüber Mikroorganismen darstellen.

Bei den durch Neutrophile freigesetzten NETs handelt es sich um chromosomale DNA, die u.a. mit Histonen, mit neutrophiler Elastase und Cathepsin G assoziiert ist²⁷⁷⁻²⁷⁹. Diese DNA-Protein-Strukturen enthalten auch Haarnadel-bildende Strukturen, die als Bindemotive für Gerinnungsproteine dienen und somit deren Aktivierung vermitteln könnten.

5.1.3 Analyse der prokoagulatorischen Aktivität verschiedener Nukleinsäureaptamere

Synthetische Nukleinsäuren in Form von DNA- und RNA-Oligonukleotiden, sogenannte Aptamere, finden in neuerer Zeit verstärkt klinische Anwendung, sodass auch deren prokoagulatorische Aktivität untersucht wurde. Aptamere sind kurze DNA- oder RNA-Moleküle mit einer Länge von 30-40 Nukleotiden, welche hochspezifisch an Proteine binden und dadurch deren Funktion beeinflussen können. Der therapeutische Nutzen dieser Substanzen wird aufgrund geringer immunogener und toxischer Nebenwirkungen als sehr hoch eingeschätzt. Bezugnehmend auf die Studie von Kannemeier et al.⁵² und den Nachweis der prokoagulatorischen Aktivität von extrazellulären Nukleinsäuren, wurde das Potential prothrombotischer Nebenwirkungen durch Aptamere erstmals 2010 von Paul et al. analysiert¹¹³. Es konnte gezeigt werden, dass eine DNA-Aptamer-Bibliothek (bestehend aus DNA-Oligonukleotiden mit verschiedenen Sequenzen bzw. Sekundärstrukturen) zur Auto-

Aktivierung von Präkallikrein und FXII und daraus resultierend zur Bildung von Thrombin führte. Allerdings wurde in dieser Studie nicht genauer eingegrenzt, ob alle verwendeten DNA-Strukturen diese Aktivität vermitteln und ob funktionelle, bereits gut charakterisierte Aptamere die gleichen Effekte zeigen.

Aufgrund der bereits beschriebenen prokoagulatorischen Aktivität von DNA-Oligomeren wurden in der hier vorliegenden Arbeit die Effekte von zwei verschiedenen DNA-Aptameren auf die Autoaktivierung von PK sowie auf die Gerinnungszeit von humanem Plasma analysiert. Beide Aptamere wurden ursprünglich zur Inhibierung von Gerinnungsproteinen synthetisiert: Während das Thrombin-Aptamer über die Blockierung von Thrombin (und damit der Gerinnselbildung) antithrombotische Eigenschaften aufweist, greift das Protein C Aptamer in regulatorische Mechanismen des Gerinnungsprozesses ein und verhindert die APC-abhängige Inhibierung der Thrombinproduktion. Es trägt somit zur Stabilisierung des Thrombus bei^{106,269}.

Beide Aptamere wurden in der hier vorliegenden Arbeit als effiziente Kofaktoren für die Autoaktivierung von Präkallikrein identifiziert, wobei hierbei unter Beachtung der vorangegangenen Ergebnisse zum einen die Quadruplex-Struktur des Thrombin-Aptamers sowie die Haarnadel-Strukturen des Protein C-Aptamers als aktivierende Elemente in Betracht gezogen werden sollten. Zusätzlich verkürzte das Protein C-Aptamer in den hier vorgenommenen Messungen die Gerinnungszeit in humanem Plasma, sodass eine direkte prothrombotische Aktivität angenommen werden muss. Das Thrombin-inhibierende Aptamer verhinderte in humanem Plasma effizient die Thrombin- und damit auch die Gerinnselbildung, sodass die durch dieses Aptamer vermittelte Aktivierung des intrinsischen Systems nicht zu thrombotischen Nebenwirkungen führen konnte. Allerdings sollten weitere Studien klären, ob das während der Spaltung von HK gebildete BK inflammatorische Prozesse fördert.

Bei den hier verwendeten Aptameren handelte es sich um unmodifizierte DNA-Sequenzen. Die als Therapeutika entwickelten Aptamere tragen allerdings in der Regel verschiedene Modifikationen, welche ihre Stabilität im Plasma erhöhen. Weiterführende Studien sollten klären, ob diese Modifikationen die hier identifizierten, prokoagulatorischen Eigenschaften von Aptameren beeinflussen.

Zusammengefasst liefern die Ergebnisse dieser Arbeit neue Einblicke in die Nukleinsäure-Protein-Interaktion. Erstmals wurden Haarnadel-Strukturen als Bindedomänen in kurzen

Oligonukleotiden identifiziert, welche die Bindung an HK und damit verbunden die Aktivierung des intrinsischen Gerinnungsweges vermitteln.

5.2 Regulation der prokoagulatorischen Aktivität von Nukleinsäuren durch basische Proteine

In der vorliegenden Arbeit wurde PF4 als neues regulatorisches Protein identifiziert, das die prokoagulatorische Funktion von natürlichen wie auch synthetischen Nukleinsäuren neutralisiert. PF4 ist ein positiv geladenes Chemokin, das bei der Aktivierung von Thrombozyten aus deren α -Granula freigesetzt wird, an Heparansulfate auf der Oberfläche von Endothelzellen bindet und durch stark negative Moleküle, wie z. B. Heparin, von diesen Proteoglykanen gelöst wird¹²⁶. Frühere Studien zeigten bereits eine PF4-abhängige Inhibierung der Aktivierung von FXII durch Ellagsäure, Kaolin oder Glas¹⁴³. In Anbetracht dieser starken Wechselwirkungen mit negativ geladenen Substanzen wurde die Wechselwirkung von PF4 mit Nukleinsäuren sowie der Einfluss des basischen Proteins auf den intrinsischen Gerinnungsweg untersucht.

PF4 konnte als starkes Nukleinsäure-bindendes Protein identifiziert werden, welches nicht nur mit zellulärer RNA oder DNA, sondern auch mit den lediglich 21 Nukleotiden umfassenden Oligonukleotiden interagiert und dadurch das prokoagulatorische Potential aller getesteten Nukleinsäuren konzentrationsabhängig reduzierte. Unveröffentlichte Ergebnisse unserer Kooperationspartner der Universität Greifswald bestätigten, dass die Bindung von Nukleinsäuren an PF4 ähnliche Konformationsänderungen des Proteins induzierte, wie die Bindung von Heparin (Miriam Jaax).

Die in den Experimenten verwendeten PF4-Konzentrationen entsprechen physiologischen Werten, da unmittelbar nach der Thrombozytenaktivierung eine lokale Konzentration von etwa 5 $\mu\text{g/ml}$ PF4 erreicht werden kann¹²³. PF4 kontrolliert somit lokal die Aktivierung der Gerinnungskaskade durch extrazelluläre Nukleinsäuren indem es die Auto-Aktivierung der Kontaktphasenproteine verhindert bzw. reduziert (Abbildung 31).

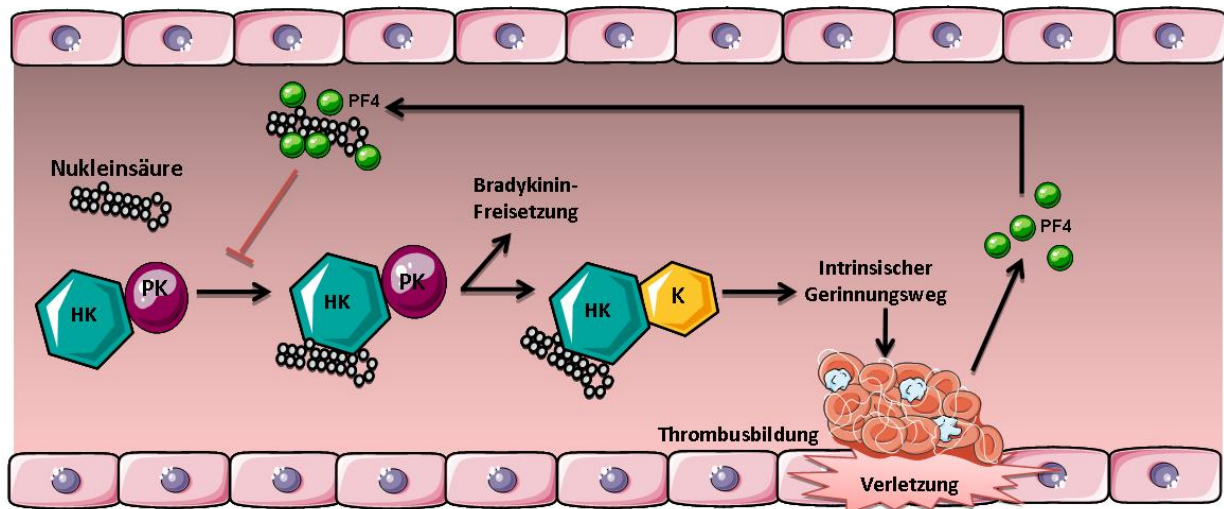


Abbildung 31: Regulation der prokoagulatorischen Aktivität von Nucleinsäuren durch Plättchenfaktor 4

Nucleinsäuren vermitteln als effektive Kofaktoren zusammen mit hochmolekularem Kininogen (HK) die Auto-Aktivierung der Serinprotease Präkallikrein (PK) zu Kallikrein (K) des intrinsischen Gerinnungssystems. Dadurch kommt es zu einer kaskadenartigen Aktivierung weiterer zymogener Vorstufen von Gerinnungsproteinen, was in der Bildung eines stabilen Thrombus resultiert. Der aus den α -Granula aktivierter Thrombozyten freigesetzte Plättchenfaktor 4 (PF4) bindet extrazelluläre Nucleinsäuren und neutralisiert so deren prokoagulatorische Effekte.

5.3 Regulation des RNA/RNase-Systems: Einfluss von proinflammatorischen Mediatoren auf die RNase 1-Expression

RNasen erfüllen, möglicherweise als effiziente Gegenspieler der verschiedenen durch extrazelluläre RNA initiierten pathophysiologischen Reaktionen im Gefäßsystem, wichtige protektive Aufgaben. Für acht der dreizehn bekannten Mitglieder der RNase A-Superfamilie wurden, außerhalb der ursprünglich für RNasen postulierten Funktion (Degradierung von mit der Nahrung aufgenommener Nucleinsäuren), antibakterielle¹⁸⁸ und antivirale Wirkungen¹⁸⁹ sowie neurotoxische¹⁸⁶ und angiogene¹⁸⁷ Effekte nachgewiesen.

Aufgrund der von unserer Gruppe veröffentlichten Beobachtungen, dass extrazelluläre RNA im vaskulären System (a) die Proteasen des intrinsischen Gerinnungssystems aktiviert⁵², (b) VEGF-abhängig zu einer Hyperpermeabilität des Endothels führt^{82,83} und (c) vergleichbar mit anderen proinflammatorischen Mediatoren die Exozytose der endothelialen Weibel-Palade-Granula induziert⁸⁹, war für die hier vorliegende Arbeit insbesondere die Regulation der im vaskulären System exprimierten RNase 1 von Interesse. Da HUVEC die bislang stärkste Expression und Sekretion von RNase 1 *in vitro* zeigten⁸⁹, wurden diese Primärzellen als Modellsystem verwendet.

5.3.1 Einfluss proinflammatorischer Substanzen auf die Expression und Sekretion von RNase 1 und Ribonuklease Inhibitor

Während die Stimulation von HUVEC mit LPS keine Auswirkungen auf die Expression von RNase 1 oder deren Inhibitor besaß, bewirkten langfristige Stimulationen mit TNF α und Thrombin eine signifikante Herunterregulation von RNase 1 auf mRNA- bzw. mit TNF α zusätzlich auch auf Proteinebene. Dies wurde durch eine verminderte RNase-Aktivität im Zellkulturmedium der behandelten Zellen bestätigt. Unsere Arbeitsgruppe wies bereits nach, dass Thrombin, aber auch extrazelluläre RNA, als proinflammatorische Faktoren innerhalb von 10 min die Freisetzung von RNase 1 aus den Weibel-Palade-Granula induzierte⁸⁹, während TNF α keine Degranulierung stimulierte²⁸⁰. Dieser Prozess führte zu einer signifikanten Erhöhung der extrazellulären RNase-Konzentration und ermöglichte dadurch einen schnellen Verdau physiologisch aktiver, extrazellulärer RNA⁸⁹.

Zusammengenommen mit den hier vorliegenden Daten spricht dies für eine duale Rolle von RNase 1 in inflammatorischen Prozessen: (1) Die erhöhte RNase 1-Konzentration unter akut-inflammatorischen Bedingungen vermittelt einen schnellen Verdau proinflammatorischer RNA während (2) unter chronisch-inflammatorischen Bedingungen die RNase 1-Expression signifikant vermindert ist.

Noch unveröffentlichte Beobachtungen von Dr. Silvia Fischer aus unserer Gruppe liefern erste Hinweise, wie beide Mechanismen miteinander verknüpft sein könnten. So konnte gezeigt werden, dass nach kurzzeitiger Stimulation mit RNA signifikante Mengen TNF α aus Monozyten freigesetzt werden. Weitere Studien sollen bestätigen, dass der aus Monozyten freigesetzte TNF α langfristig die Expression von RNase 1 im Endothel vermindern kann.

5.3.2 Einfluss einer verminderten Expression von RNase 1 auf die Integrität von Zell-Zell-Verbindungen

Da unter physiologischen Bedingungen die Wahrscheinlichkeit einer 24-stündigen Stimulation mit Thrombin aufgrund dessen schneller Bindung und Inaktivierung durch Antithrombin und Thrombomodulin zur Unterbindung unkontrollierter Gerinnungsprozesse sehr gering ist¹³⁰, lag der weitere Fokus dieser Arbeit auf den durch TNF α -vermittelten Mechanismen. Im Gegensatz zu Thrombin kann TNF α während chronisch-inflammatorischer Erkrankungen wie z.B. rheumatoider Arthritis langfristig im vaskulären System nachgewiesen werden²⁸¹. TNF α wirkt hierbei stark permeabilitätserhöhend, was auch von einer veränderten Lokalisation von VE-Cadherin in den *adherens junctions* begleitet wird²⁷⁴. In der hier

vorliegenden Arbeit konnte eine vergleichbare, veränderte VE-Cadherin-Verteilung in den *adherens junctions* auch in Zellen mit einer durch siRNA-Transfektion verminderten RNase 1-Expression anhand fluoreszenzmikroskopischer Methoden beobachtet werden. Gleichzeitig wurde eine erhöhte Konzentration an extrazellulärer RNA im Kulturüberstand dieser transfizierten Zellen gemessen, vergleichbar mit der erhöhten extrazellulären RNA-Konzentration nach TNF α -Behandlung.

Es ist bekannt, dass TNF α ²⁸², wie auch Thrombin²⁸³, die Freisetzung von Mikropartikeln, induziert, die zytoplasmatische Bestandteile und Nukleinsäuren wie z. B. rRNA und mRNA transportieren können^{72,284,285}. Sollte die so verpackte RNA vor dem Verdau plasmatischer RNasen geschützt sein, könnte sie langfristige und auch systemische Effekte vermitteln. Zusätzlich könnte die TNF α -abhängige Verminderung der RNase 1-Expression die Akkumulation von freier, nicht mit Mikropartikeln assoziierter, extrazellulärer RNA unterstützen. Dies könnte im vaskulären System bei chronisch-inflammatorischen Situationen (1) die Hyperpermeabilität VEGF-abhängig verstärken oder stabilisieren⁸², (2) eine weitere Freisetzung von TNF α aus Monozyten induzieren (unveröffentlichte Ergebnisse, Dr. Silvia Fischer) sowie (3) durch die Aktivierung des intrinsischen Systems mit zu dem für inflammatorische Situationen typischen prokoagulatorischen Phänotyp beitragen.

5.3.3 Analyse der an der RNase 1-Expression beteiligten Signaltransduktionswege

Bislang wurde der prokoagulatorische Phänotyp, welcher bei Entzündungsreaktionen auftritt, beschrieben als Folge der durch Zytokine wie TNF α induzierten Expression von TF, der Inhibierung des APC-Signalweges und der Fibrinolyse¹⁴⁵ sowie einer verminderten Expression des regulatorisch wirkenden TM¹⁵⁷. Die Herunterregulation von TM lief allerdings im Vergleich zu der hier gezeigten Verminderung der RNase 1-Expression deutlich schneller (innerhalb weniger Stunden) ab²⁸⁶. Mechanistisch wurde die TM-Expression durch die Bindung des Kofaktors p300 an Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie NF κ B-abhängig inhibiert^{287,288}. Analysen des Signalweges, der zur Verminderung der RNase 1-Expression führte, schlossen eine NF κ B-abhängige Regulation allerdings aus und implizierten vielmehr einen durch Acetylierungen gesteuerten Mechanismus, da eine Inhibierung der im Zellkern lokalisierten Histon-Deacetylasen (HDAC) der Klassen I und II durch Trichostatin A (TSA) die RNase 1-Expression wieder herstellte.

HDACs und ihre Gegenspieler, die Histon-Acetyltransferasen (HAT), vermitteln post-translationalen Modifikationen durch das Entfernen bzw. Transferieren von Acetylresten an ϵ -Aminogruppen von Lysinen entsprechender Proteine und verändern so deren Nettoladung²⁸⁹. Die ersten Proteine, bei denen diese Modifikationen identifiziert wurden, waren Histone, wobei eine Acetylierung durch HATs die Affinität dieser Proteine für DNA senkte und die Bildung von transkriptionell aktivem Euchromatin förderte. Die Deacetylierung durch HDACs verstärkte dagegen die DNA-Histon-Wechselwirkung und damit die Chromatindichte und inhibierte die Transkription²⁸⁹. Mittlerweile sind mehr als 1700 weitere Proteine bekannt, die durch Acetylierungen modifiziert werden²⁹⁰.

Kawabata et al. (2010) beobachteten eine erhöhte Expression und Aktivität von HDAC1 in Rheumatoider Arthritis (RA)²⁹¹, einer chronisch-inflammatorischen Erkrankung der Gelenke, die durch in das Synovialgewebe infiltrierende Immunzellen und deren vermehrte Sekretion inflammatorischer Zytokine wie TNF α , Interleukin-1, Interleukin-6 und Interleukin-8 ausgelöst wird²⁸¹. Hierbei korrelierte die Expression von HDAC1 mit dem TNF α -Spiegel in der Synovialflüssigkeit der betroffenen Gelenke von Patienten²⁹¹. Eine nachfolgende Studie beschrieb die Absenkung der HDAC1-Expression in RA-Patienten, welche mit TNF α -Blockern behandelt wurden²⁹², was die Möglichkeit einer Beeinflussung der HDAC-Expression durch TNF α erhärtete. In der hier vorliegenden Arbeit konnte eine Verminderung der RNase 1-Expression von HUVEC durch TNF α mit der Aktivität von HDACs korreliert werden. Des Weiteren stellte eine Eliminierung des TNF α -Stimulus die Expression von RNase 1 innerhalb von 24 h wieder her, was für einen langsamen, eventuell von einer Proteinneusynthese abhängigen Mechanismus sprach.

Zusammenfassend geben die Ergebnisse dieser Arbeit neue Einblicke in die Regulation der RNase 1 im vaskulären System und beschreiben eine mögliche duale Rolle von RNase 1 in inflammatorischen Prozessen. Unter akut-inflammatorischen Bedingungen führten Substanzen wie Thrombin oder extrazelluläre RNA zu einer rapiden Konzentrationserhöhung von RNase 1 durch die Degranulierung der Weibel-Palade-Granula und stellten so einen unmittelbaren Verdau von proinflammatorisch-wirkender RNA sicher⁸⁹. Chronisch-inflammatorische Situationen mit hoher TNF α -Konzentration inhibierten dagegen die Expression von RNase 1, wodurch wahrscheinlich die Akkumulation extrazellulärer RNA induziert und der Ablauf inflammatorischer Prozesse stimuliert wurde. Zusätzlich konnte erstmals gezeigt werden, dass die Regulation der RNase 1-Expression durch TNF α in einer NF κ B-unabhängigen und reversiblen Weise durch die Aktivität von HDACs erfolgte (Abbildung 32). Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass die Herunterregulation von

RNase 1 im vaskulären System für den Verlauf chronisch-inflammatorischer Erkrankungen essentiell sein könnte. Weiterführende Studien sollten (a) die RNase 1-Konzentration im Blut von Patienten mit chronisch-inflammatorischen Erkrankungen wie RA analysieren, (b) die RNase 1-Aktivität in der Synovialflüssigkeit sowie die Expression in entsprechendem Gewebe auf eine Korrelation mit HDAC untersuchen und (c) die Promotorregion von RNase 1 auf Bindestellen für Acetylierungs-abhängige Transkriptionsfaktoren *in silico* und *in vitro* analysieren.

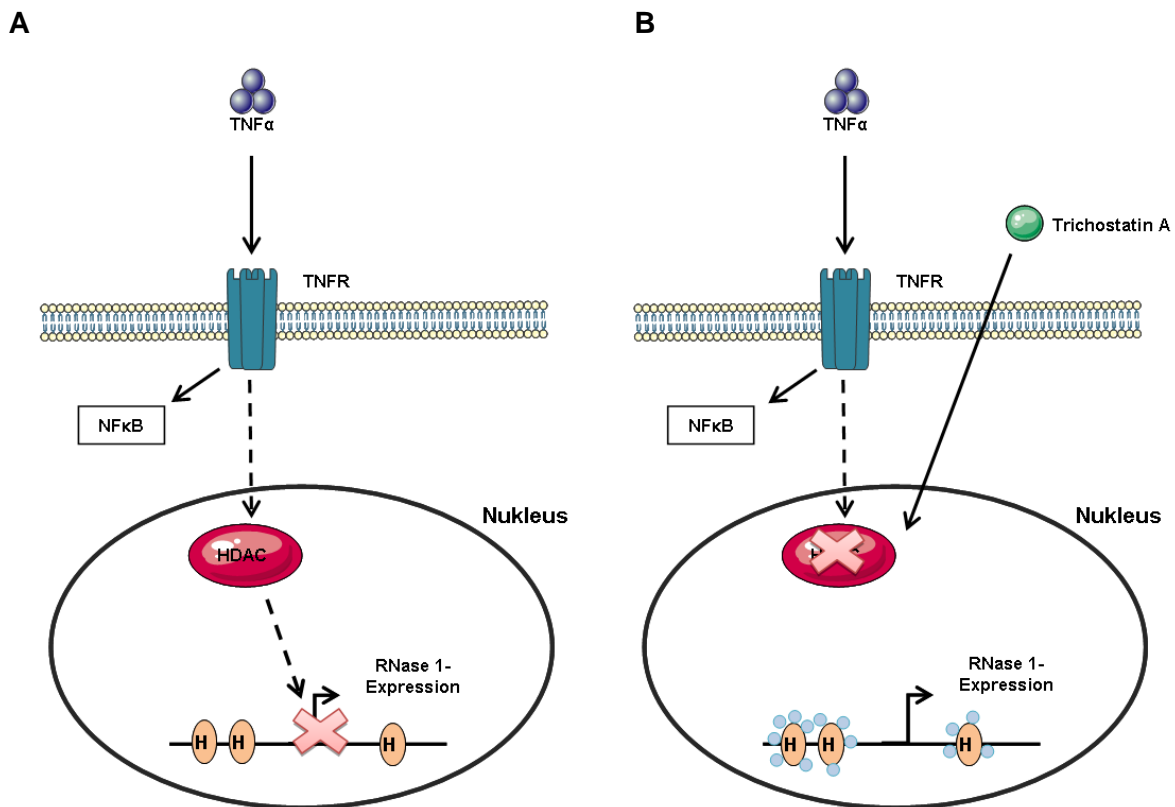


Abbildung 32: Mechanismus der TNF α -vermittelten Verminderung der RNase 1-Expression in HUVEC

(A) TNF α inhibiert in NF κ B-unabhängiger Weise die Expression von RNase 1 in HUVEC. (B) Die Inhibition von HDACs (Typ I und II) mittels Trichostatin A führt zur Wiederherstellung der RNase 1-Expression. Dies wird vermutlich durch die damit verbundene Erhaltung der Histon (H)-Acetylierungen (blaue Kreise) erreicht.

Literaturverzeichnis

1. **Jennings LK** (2009) Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost* 102: 248-57.
2. **Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR** (2002) Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1381-9.
3. **Wagner DD** (1990) Cell biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol* 6: 217-46.
4. **Schneppenheim R, Budde U** (2009) Von-Willebrand-Faktor und ADAMTS13. In: Pötsch B, Madlener K, eds. *Hämostaseologie*. Vol. 2. Springer Berlin Heidelberg:227-35.
5. **Cramer EM, Breton-Gorius J, Beesley JE, et al.** (1988) Ultrastructural demonstration of tubular inclusions coinciding with von Willebrand factor in pig megakaryocytes. *Blood* 71: 1533-8.
6. **Stel HV, Sakariassen KS, de Groot PG, et al.** (1985) Von Willebrand factor in the vessel wall mediates platelet adherence. *Blood* 65: 85-90.
7. **Turitto VT, Weiss HJ, Zimmerman TS, et al.** (1985) Factor VIII/von Willebrand factor in subendothelium mediates platelet adhesion. *Blood* 65: 823-31.
8. **Reininger AJ** (2009) Thrombusformation im Blutfluss. In: Pötsch B, Madlener K, eds. *Hämostaseologie*. Vol. 2. Springer Berlin Heidelberg:73-80.
9. **Preissner KT** (2006) Thromboseprophylaxe und Thrombolytika. In: Estler C-J, Schmidt H, eds. *Pharmakologie und Toxikologie* (ed 6). Schattauer Verlag GmbH:507-48.
10. **Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, et al.** (1991) Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64: 1057-68.
11. **Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, et al.** (1998) Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6642-6.
12. **Bevers EM, Tilly RH, Senden JM, et al.** (1989) Exposure of endogenous phosphatidylserine at the outer surface of stimulated platelets is reversed by restoration of aminophospholipid translocase activity. *Biochemistry* 28: 2382-7.
13. **Rutkoski TJ, Raines RT** (2008) Evasion of ribonuclease inhibitor as a determinant of ribonuclease cytotoxicity. *Curr Pharm Biotechnol* 9: 185-9.
14. **Stafford DW** (2005) The vitamin K cycle. *J Thromb Haemost* 3: 1873-8.
15. **Peerschke EI, Zucker MB, Grant RA, et al.** (1980) Correlation between fibrinogen binding to human platelets and platelet aggregability. *Blood* 55: 841-7.

16. **Tracy PB, Rohrbach MS, Mann KG** (1983) Functional prothrombinase complex assembly on isolated monocytes and lymphocytes. *J Biol Chem* 258: 7264-7.
17. **Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, et al.** (1996) Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood* 88: 1583-7.
18. **Oliver JA, Monroe DM, Roberts HR, et al.** (1999) Thrombin activates factor XI on activated platelets in the absence of factor XII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 170-7.
19. **Lollar P, Knutson GJ, Fass DN** (1985) Activation of porcine factor VIII:C by thrombin and factor Xa. *Biochemistry* 24: 8056-64.
20. **Monkovic DD, Tracy PB** (1990) Activation of human factor V by factor Xa and thrombin. *Biochemistry* 29: 1118-28.
21. **Gailani D, Ho D, Sun MF, et al.** (2001) Model for a factor IX activation complex on blood platelets: dimeric conformation of factor XIa is essential. *Blood* 97: 3117-22.
22. **Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR** (1996) Transmission of a procoagulant signal from tissue factor-bearing cell to platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis* 7: 459-64.
23. **Hornyak TJ, Shafer JA** (1992) Interactions of factor XIII with fibrin as substrate and cofactor. *Biochemistry* 31: 423-9.
24. **Esmon CT, Xu J, Gu JM, et al.** (1999) Endothelial protein C receptor. *Thromb Haemost* 82: 251-8.
25. **Esmon CT, Owen WG** (1981) Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 2249-52.
26. **Dahlback B, Villoutreix BO** (2005) The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett* 579: 3310-6.
27. **Lu G, Broze GJ, Jr., Krishnaswamy S** (2004) Formation of factors IXa and Xa by the extrinsic pathway: differential regulation by tissue factor pathway inhibitor and antithrombin III. *J Biol Chem* 279: 17241-9.
28. **Colman RW, Schmaier AH** (1997) Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood* 90: 3819-43.
29. **Cochrane CG, Revak SD, Wuepper KD** (1973) Activation of Hageman factor in solid and fluid phases. A critical role of kallikrein. *J Exp Med* 138: 1564-83.
30. **Griffin JH** (1978) Role of surface in surface-dependent activation of Hageman factor (blood coagulation factor XII). *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 1998-2002.

31. **Hojima Y, Cochrane CG, Wiggins RC, et al.** (1984) In vitro activation of the contact (Hageman factor) system of plasma by heparin and chondroitin sulfate E. *Blood* 63: 1453-9.
32. **Samuel M, Pixley RA, Villanueva MA, et al.** (1992) Human factor XII (Hageman factor) autoactivation by dextran sulfate. Circular dichroism, fluorescence, and ultraviolet difference spectroscopic studies. *J Biol Chem* 267: 19691-7.
33. **Citarella F, Ravon DM, Pascucci B, et al.** (1996) Structure/function analysis of human factor XII using recombinant deletion mutants. Evidence for an additional region involved in the binding to negatively charged surfaces. *Eur J Biochem* 238: 240-9.
34. **Thompson RE, Mandle R, Jr., Kaplan AP** (1977) Association of factor XI and high molecular weight kininogen in human plasma. *J Clin Invest* 60: 1376-80.
35. **Tait JF, Fujikawa K** (1987) Primary structure requirements for the binding of human high molecular weight kininogen to plasma prekallikrein and factor XI. *J Biol Chem* 262: 11651-6.
36. **Calin GA, Croce CM** (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 6: 857-66.
37. **Kunapuli SP, DeLa Cadena RA, Colman RW** (1993) Deletion mutagenesis of high molecular weight kininogen light chain. Identification of two anionic surface binding subdomains. *J Biol Chem* 268: 2486-92.
38. **DeLa Cadena RA, Colman RW** (1992) The sequence HGLGHGHEQQHGLGHGH in the light chain of high molecular weight kininogen serves as a primary structural feature for zinc-dependent binding to an anionic surface. *Protein Sci* 1: 151-60.
39. **Regoli D, Barabe J** (1980) Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* 32: 1-46.
40. **Oehmcke S, Morgelin M, Herwald H** (2009) Activation of the human contact system on neutrophil extracellular traps. *J Innate Immun* 1: 225-30.
41. **Ratnoff OD, Colopy JE** (1955) A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot-promoting fraction of plasma. *J Clin Invest* 34: 602-13.
42. **Gailani D, Renne T** (2007) Intrinsic pathway of coagulation and arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 2507-13.
43. **Bolton-Maggs PH** (2000) Factor XI deficiency and its management. *Haemophilia* 6 Suppl 1: 100-9.
44. **Wang X, Cheng Q, Xu L, et al.** (2005) Effects of factor IX or factor XI deficiency on ferric chloride-induced carotid artery occlusion in mice. *J Thromb Haemost* 3: 695-702.
45. **Wang X, Smith PL, Hsu MY, et al.** (2006) Effects of factor XI deficiency on ferric chloride-induced vena cava thrombosis in mice. *J Thromb Haemost* 4: 1982-8.

46. **Salomon O, Steinberg DM, Koren-Morag N, et al.** (2008) Reduced incidence of ischemic stroke in patients with severe factor XI deficiency. *Blood* 111: 4113-7.
47. **Renne T, Pozgajova M, Gruner S, et al.** (2005) Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med* 202: 271-81.
48. **Kleinschnitz C, Stoll G, Bendszus M, et al.** (2006) Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis. *J Exp Med* 203: 513-8.
49. **Gailani D, Broze GJ, Jr.** (1991) Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science* 253: 909-12.
50. **Pedicord DL, Seiffert D, Blat Y** (2007) Feedback activation of factor XI by thrombin does not occur in plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12855-60.
51. **Smith SA, Mutch NJ, Baskar D, et al.** (2006) Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 903-8.
52. **Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, et al.** (2007) Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6388-93.
53. **Maas C, Govers-Riemslog JW, Bouma B, et al.** (2008) Misfolded proteins activate factor XII in humans, leading to kallikrein formation without initiating coagulation. *J Clin Invest* 118: 3208-18.
54. **Ghebrehiwet B, Silverberg M, Kaplan AP** (1981) Activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment. *J Exp Med* 153: 665-76.
55. **Schmaier AH** (2008) The elusive physiologic role of Factor XII. *J Clin Invest* 118: 3006-9.
56. **Woodruff RS, Sullenger B, Becker RC** (2011) The many faces of the contact pathway and their role in thrombosis. *J Thromb Thrombolysis* 32: 9-20.
57. **Lenich C, Pannell R, Gurewich V** (1995) Assembly and activation of the intrinsic fibrinolytic pathway on the surface of human endothelial cells in culture. *Thromb Haemost* 74: 698-703.
58. **Motta G, Rojkaer R, Hasan AA, et al.** (1998) High molecular weight kininogen regulates prekallikrein assembly and activation on endothelial cells: a novel mechanism for contact activation. *Blood* 91: 516-28.
59. **Iwaki T, Castellino FJ** (2006) Plasma levels of bradykinin are suppressed in factor XII-deficient mice. *Thromb Haemost* 95: 1003-10.
60. **Tosi M** (1998) Molecular genetics of C1 inhibitor. *Immunobiology* 199: 358-65.

61. **Kaplan AP, Kay AB, Austen KF** (1972) A prealbumin activator of prekallikrein. 3. Appearance of chemotactic activity for human neutrophils by the conversion of human prekallikrein to kallikrein. *J Exp Med* 135: 81-97.
 62. **Schapira M, Despland E, Scott CF, et al.** (1982) Purified human plasma kallikrein aggregates human blood neutrophils. *J Clin Invest* 69: 1199-202.
 63. **Wachtfogel YT, Kucich U, James HL, et al.** (1983) Human plasma kallikrein releases neutrophil elastase during blood coagulation. *J Clin Invest* 72: 1672-7.
 64. **Wachtfogel YT, Pixley RA, Kucich U, et al.** (1986) Purified plasma factor XIIa aggregates human neutrophils and causes degranulation. *Blood* 67: 1731-7.
 65. **Toossi Z, Sedor JR, Mettler MA, et al.** (1992) Induction of expression of monocyte interleukin 1 by Hageman factor (factor XII). *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 11969-72.
 66. **Dahm R** (2008) Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Hum Genet* 122: 565-81.
 67. **M. Berg J, Tymoczko J, Stryer L** (2007) DNA, RNA und der Fluss der genetischen Information (Kapitel 4). *Biochemie* (ed 6). Spektrum Akademischer Verlag.
 68. **Hamilton AJ, Baulcombe DC** (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-2.
 69. **Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V** (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-54.
 70. **Mandel P, Metais P** (1948) Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil* 142: 241-3.
 71. **Tsang JC, Lo YM** (2007) Circulating nucleic acids in plasma/serum. *Pathology* 39: 197-207.
 72. **Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, et al.** (2007) Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* 110: 2440-8.
 73. **Tan EM, Schur PH, Carr RI, et al.** (1966) Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 45: 1732-40.
 74. **Stroun M, Anker P, Maurice P, et al.** (1989) Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 46: 318-22.
 75. **Galeazzi M, Morozzi G, Piccini M, et al.** (2003) Dosage and characterization of circulating DNA: present usage and possible applications in systemic autoimmune disorders. *Autoimmun Rev* 2: 50-5.
 76. **Wieczorek AJ, Rhyner C, Block LH** (1985) Isolation and characterization of an RNA-proteolipid complex associated with the malignant state in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 3455-9.
-

77. **Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, et al.** (1999) Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 5: 1961-5.
78. **Chen XQ, Bonnefoi H, Pelte MF, et al.** (2000) Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 6: 3823-6.
79. **Garcia-Olmo DC, Ruiz-Piqueras R, Garcia-Olmo D** (2004) Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS) and its relation to stem cells and cancer metastasis: state of the issue. *Histol Histopathol* 19: 575-83.
80. **Nakazawa F, Kannemeier C, Shibamiya A, et al.** (2005) Extracellular RNA is a natural cofactor for the (auto-)activation of Factor VII-activating protease (FSAP). *Biochem J* 385: 831-8.
81. **Preissner KT** (2007) Extracellular RNA. A new player in blood coagulation and vascular permeability. *Hamostaseologie* 27: 373-7.
82. **Fischer S, Gerriets T, Wessels C, et al.** (2007) Extracellular RNA mediates endothelial-cell permeability via vascular endothelial growth factor. *Blood* 110: 2457-65.
83. **Fischer S, Nishio M, Peters SC, et al.** (2009) Signaling mechanism of extracellular RNA in endothelial cells. *FASEB J* 23: 2100-9.
84. **Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, et al.** (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 146: 1029-39.
85. **Schoch HJ, Fischer S, Marti HH** (2002) Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression causes vascular leakage in the brain. *Brain* 125: 2549-57.
86. **Goldman CK, Bharara S, Palmer CA, et al.** (1997) Brain edema in meningiomas is associated with increased vascular endothelial growth factor expression. *Neurosurgery* 40: 1269-77.
87. **Robinson CJ, Stringer SE** (2001) The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 114: 853-65.
88. **Matsushita K, Yamakuchi M, Morrell CN, et al.** (2005) Vascular endothelial growth factor regulation of Weibel-Palade-body exocytosis. *Blood* 105: 207-14.
89. **Fischer S, Nishio M, Dadkhahi S, et al.** (2010) Expression and localisation of vascular ribonucleases in endothelial cells. *Thromb Haemost* 105: 345-55.
90. **Bouchard PR, Hutabarat RM, Thompson KM** (2009) Discovery and development of therapeutic aptamers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50: 237-57.
91. **Khati M** (2010) The future of aptamers in medicine. *J Clin Pathol* 63: 480-7.
92. **Convery MA, Rowsell S, Stonehouse NJ, et al.** (1998) Crystal structure of an RNA aptamer-protein complex at 2.8 Å resolution. *Nat Struct Biol* 5: 133-9.

-
93. **Group ES** (2002) Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration. *Retina* 22: 143-52.
 94. **Lopes de Campos WR, Coopusamy D, Morris L, et al.** (2009) Cytotoxicological analysis of a gp120 binding aptamer with cross-clade human immunodeficiency virus type 1 entry inhibition properties: comparison to conventional antiretrovirals. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 3056-64.
 95. **Tuerk C, Gold L** (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249: 505-10.
 96. **Ellington AD, Szostak JW** (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346: 818-22.
 97. **Geary RS, Leeds JM, Henry SP, et al.** (1997) Antisense oligonucleotide inhibitors for the treatment of cancer: 1. Pharmacokinetic properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Anticancer Drug Des* 12: 383-93.
 98. **Wilson C, Keefe AD** (2006) Building oligonucleotide therapeutics using non-natural chemistries. *Curr Opin Chem Biol* 10: 607-14.
 99. **Chelliserrykattil J, Ellington AD** (2004) Evolution of a T7 RNA polymerase variant that transcribes 2'-O-methyl RNA. *Nat Biotechnol* 22: 1155-60.
 100. **Green LS, Jellinek D, Bell C, et al.** (1995) Nuclease-resistant nucleic acid ligands to vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Chem Biol* 2: 683-95.
 101. **Dausse E, Da Rocha Gomes S, Toulme JJ** (2009) Aptamers: a new class of oligonucleotides in the drug discovery pipeline? *Curr Opin Pharmacol* 9: 602-7.
 102. **Khati M, Schuman M, Ibrahim J, et al.** (2003) Neutralization of infectivity of diverse R5 clinical isolates of human immunodeficiency virus type 1 by gp120-binding 2'-F-RNA aptamers. *J Virol* 77: 12692-8.
 103. **Ruckman J, Green LS, Beeson J, et al.** (1998) 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *J Biol Chem* 273: 20556-67.
 104. **Helmling S, Maasch C, Eulberg D, et al.** (2004) Inhibition of ghrelin action in vitro and in vivo by an RNA-Spiegelmer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 13174-9.
 105. **Charlton J, Kirschenheuter GP, Smith D** (1997) Highly potent irreversible inhibitors of neutrophil elastase generated by selection from a randomized DNA-valine phosphonate library. *Biochemistry* 36: 3018-26.
 106. **Bock LC, Griffin LC, Latham JA, et al.** (1992) Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* 355: 564-6.
-

107. **Rusconi CP, Scardino E, Layzer J, et al.** (2002) RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa. *Nature* 419: 90-4.
108. **Group ES** (2003) Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: phase II study results. *Ophthalmology* 110: 979-86.
109. **McNamara JO, 2nd, Andrechek ER, Wang Y, et al.** (2006) Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat Biotechnol* 24: 1005-15.
110. **Farokhzad OC, Cheng J, Teply BA, et al.** (2006) Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 6315-20.
111. **Liu J, Lu Y** (2006) Preparation of aptamer-linked gold nanoparticle purple aggregates for colorimetric sensing of analytes. *Nat Protoc* 1: 246-52.
112. **Liu J, Mazumdar D, Lu Y** (2006) A simple and sensitive "dipstick" test in serum based on lateral flow separation of aptamer-linked nanostructures. *Angew Chem Int Ed Engl* 45: 7955-9.
113. **Paul A, Avci-Adali M, Neumann B, et al.** (2010) Aptamers influence the hemostatic system by activating the intrinsic coagulation pathway in an in vitro Chandler-Loop model. *Clin Appl Thromb Hemost* 16: 161-9.
114. **Etscheid M, Hunfeld A, König H, et al.** (2000) Activation of proPHBSP, the zymogen of a plasma hyaluronan binding serine protease, by an intermolecular autocatalytic mechanism. *Biol Chem* 381: 1223-31.
115. **Kannemeier C, Feussner A, Stohr HA, et al.** (2001) Factor VII and single-chain plasminogen activator-activating protease: activation and autoactivation of the proenzyme. *Eur J Biochem* 268: 3789-96.
116. **Kanse SM, Declerck PJ, Ruf W, et al.** (2011) Factor VII-Activating Protease Promotes the Proteolysis and Inhibition of Tissue Factor Pathway Inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*
117. **Stephan F, Aarden LA, Zeerleder S** (2012) FSAP, a new player in inflammation? *Hamostaseologie* 32: 51-5.
118. **Sedding D, Daniel JM, Muhl L, et al.** (2006) The G534E polymorphism of the gene encoding the factor VII-activating protease is associated with cardiovascular risk due to increased neointima formation. *J Exp Med* 203: 2801-7.
119. **Shibamiya A, Muhl L, Tannert-Otto S, et al.** (2007) Nucleic acids potentiate Factor VII-activating protease (FSAP)-mediated cleavage of platelet-derived growth factor-BB and inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation. *Biochem J* 404: 45-50.

-
120. **Wygrecka M, Morfy RE, Markart P, et al.** (2007) Plasminogen activator inhibitor-1 is an inhibitor of factor VII-activating protease in patients with acute respiratory distress syndrome. *J Biol Chem* 282: 21671-82.
 121. **Ryo R, Nakeff A, Huang SS, et al.** (1983) New synthesis of a platelet-specific protein: platelet factor 4 synthesis in a megakaryocyte-enriched rabbit bone marrow culture system. *J Cell Biol* 96: 515-20.
 122. **Hegy E, Heilbrun LK, Nakeff A** (1990) Immunogold probing of platelet factor 4 in different ploidy classes of rat megakaryocytes sorted by flow cytometry. *Exp Hematol* 18: 789-93.
 123. **Slungaard A** (2005) Platelet factor 4: a chemokine enigma. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 1162-7.
 124. **Deuel TF, Keim PS, Farmer M, et al.** (1977) Amino acid sequence of human platelet factor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 2256-8.
 125. **Mayo KH, Chen MJ** (1989) Human platelet factor 4 monomer-dimer-tetramer equilibria investigated by ¹H NMR spectroscopy. *Biochemistry* 28: 9469-78.
 126. **Rybak ME, Gimbrone MA, Jr., Davies PF, et al.** (1989) Interaction of platelet factor four with cultured vascular endothelial cells. *Blood* 73: 1534-9.
 127. **Sachais BS, Higazi AA, Cines DB, et al.** (2004) Interactions of platelet factor 4 with the vessel wall. *Semin Thromb Hemost* 30: 351-8.
 128. **Loscalzo J, Melnick B, Handin RI** (1985) The interaction of platelet factor four and glycosaminoglycans. *Arch Biochem Biophys* 240: 446-55.
 129. **Eslin DE, Zhang C, Samuels KJ, et al.** (2004) Transgenic mice studies demonstrate a role for platelet factor 4 in thrombosis: dissociation between anticoagulant and antithrombotic effect of heparin. *Blood* 104: 3173-80.
 130. **Marcum JA, McKenney JB, Rosenberg RD** (1984) Acceleration of thrombin-antithrombin complex formation in rat hindquarters via heparinlike molecules bound to the endothelium. *J Clin Invest* 74: 341-50.
 131. **Zucker MB, Katz IR** (1991) Platelet factor 4: production, structure, and physiologic and immunologic action. *Proc Soc Exp Biol Med* 198: 693-702.
 132. **Lane DA, Denton J, Flynn AM, et al.** (1984) Anticoagulant activities of heparin oligosaccharides and their neutralization by platelet factor 4. *Biochem J* 218: 725-32.
 133. **Amiral J, Bridey F, Dreyfus M, et al.** (1992) Platelet factor 4 complexed to heparin is the target for antibodies generated in heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 68: 95-6.
 134. **Greinacher A, Potzsch B, Amiral J, et al.** (1994) Heparin-associated thrombocytopenia: isolation of the antibody and characterization of a multimolecular PF4-heparin complex as the major antigen. *Thromb Haemost* 71: 247-51.
-

-
135. **Kelton JG, Smith JW, Warkentin TE, et al.** (1994) Immunoglobulin G from patients with heparin-induced thrombocytopenia binds to a complex of heparin and platelet factor 4. *Blood* 83: 3232-9.
136. **Donovan JL, Tran MT, Kanaan AO** (2010) An overview of heparin-induced thrombocytopenia. *J Pharm Pract* 23: 226-34.
137. **Reilly MP, Taylor SM, Hartman NK, et al.** (2001) Heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis in a transgenic mouse model requires human platelet factor 4 and platelet activation through FcγRIIA. *Blood* 98: 2442-7.
138. **Arepally GM, Mayer IM** (2001) Antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia stimulate monocytic cells to express tissue factor and secrete interleukin-8. *Blood* 98: 1252-4.
139. **Weismann RE, Tobin RW** (1958) Arterial embolism occurring during systemic heparin therapy. *AMA Arch Surg* 76: 219-25; discussion 25-7.
140. **Greinacher A** (1995) Antigen generation in heparin-associated thrombocytopenia: the nonimmunologic type and the immunologic type are closely linked in their pathogenesis. *Semin Thromb Hemost* 21: 106-16.
141. **Kelton JG, Warkentin TE** (2008) Heparin-induced thrombocytopenia: a historical perspective. *Blood* 112: 2607-16.
142. **Greinacher A** (2009) Heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 7 Suppl 1: 9-12.
143. **Dumenco LL, Everson B, Culp LA, et al.** (1988) Inhibition of the activation of Hageman factor (factor XII) by platelet factor 4. *J Lab Clin Med* 112: 394-400.
144. **van der Poll T, de Boer JD, Levi M** (2011) The effect of inflammation on coagulation and vice versa. *Curr Opin Infect Dis* 24: 273-8.
145. **Petaja J** (2011) Inflammation and coagulation. An overview. *Thromb Res* 127 Suppl 2: S34-7.
146. **Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, et al.** (1997) Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* 386: 502-6.
147. **Riewald M, Ruf W** (2005) Protease-activated receptor-1 signaling by activated protein C in cytokine-perturbed endothelial cells is distinct from thrombin signaling. *J Biol Chem* 280: 19808-14.
148. **Esmon CT** (2004) The impact of the inflammatory response on coagulation. *Thromb Res* 114: 321-7.
149. **Shua F, Kobayashia H, Fukudomeb K, et al.** (2000) Activated protein C suppresses tissue factor expression on U937 cells in the endothelial protein C receptor-dependent manner. *FEBS Lett* 477: 208-12.
-

150. **Sturn DH, Kaneider NC, Feistritzer C, et al.** (2003) Expression and function of the endothelial protein C receptor in human neutrophils. *Blood* 102: 1499-505.
151. **Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, et al.** (2002) Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science* 296: 1880-2.
152. **van der Poll T, Levi M, Hack CE, et al.** (1994) Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. *J Exp Med* 179: 1253-9.
153. **van der Poll T, Buller HR, ten Cate H, et al.** (1990) Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects. *N Engl J Med* 322: 1622-7.
154. **Franco RF, de Jonge E, Dekkers PE, et al.** (2000) The in vivo kinetics of tissue factor messenger RNA expression during human endotoxemia: relationship with activation of coagulation. *Blood* 96: 554-9.
155. **Osterud B** (1998) Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological roles. *Blood Coagul Fibrinolysis* 9 Suppl 1: S9-14.
156. **Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, et al.** (2008) Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol* 83: 536-45.
157. **Conway EM, Rosenberg RD** (1988) Tumor necrosis factor suppresses transcription of the thrombomodulin gene in endothelial cells. *Mol Cell Biol* 8: 5588-92.
158. **Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, et al.** (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 3666-70.
159. **Liu ZG** (2005) Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell Res* 15: 24-7.
160. **Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, et al.** (1985) Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 230: 943-5.
161. **Camussi G, Albano E, Tetta C, et al.** (1991) The molecular action of tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Biochem* 202: 3-14.
162. **Kriegler M, Perez C, DeFay K, et al.** (1988) A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53: 45-53.
163. **Tang P, Hung MC, Klostergaard J** (1996) Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* 35: 8216-25.
164. **Smith RA, Baglioni C** (1987) The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem* 262: 6951-4.
165. **Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, et al.** (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385: 729-33.
-

-
166. **Schall TJ, Lewis M, Koller KJ, et al.** (1990) Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell* 61: 361-70.
167. **Loetscher H, Pan YC, Lahm HW, et al.** (1990) Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* 61: 351-9.
168. **Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P** (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10: 45-65.
169. **Micheau O, Tschopp J** (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114: 181-90.
170. **Jiang Y, Woronicz JD, Liu W, et al.** (1999) Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* 283: 543-6.
171. **Rahman MM, McFadden G** (2006) Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLoS Pathog* 2: e4.
172. **Thommesen L, Laegreid A** (2005) Distinct differences between TNF receptor 1- and TNF receptor 2-mediated activation of NFkappaB. *J Biochem Mol Biol* 38: 281-9.
173. **Pierce JW, Schoenleber R, Jesmok G, et al.** (1997) Novel inhibitors of cytokine-induced I kappa B alpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J Biol Chem* 272: 21096-103.
174. **Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, et al.** (1995) Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 9: 2723-35.
175. **Beg AA, Finco TS, Nantermet PV, et al.** (1993) Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation. *Mol Cell Biol* 13: 3301-10.
176. **Baeuerle PA, Baltimore D** (1988) I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* 242: 540-6.
177. **Carlotti F, Dower SK, Qwarnstrom EE** (2000) Dynamic shuttling of nuclear factor kappa B between the nucleus and cytoplasm as a consequence of inhibitor dissociation. *J Biol Chem* 275: 41028-34.
178. **Brown K, Gerstberger S, Carlson L, et al.** (1995) Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* 267: 1485-8.
179. **Orian A, Whiteside S, Israel A, et al.** (1995) Ubiquitin-mediated processing of NF-kappa B transcriptional activator precursor p105. Reconstitution of a cell-free system and identification of the ubiquitin-carrier protein, E2, and a novel ubiquitin-protein ligase, E3, involved in conjugation. *J Biol Chem* 270: 21707-14.
180. **Traenckner EB, Wilk S, Baeuerle PA** (1994) A proteasome inhibitor prevents activation of NF-kappa B and stabilizes a newly phosphorylated form of I kappa B-alpha that is still bound to NF-kappa B. *EMBO J* 13: 5433-41.
-

181. **Read MA, Whitley MZ, Williams AJ, et al.** (1994) NF-kappa B and I kappa B alpha: an inducible regulatory system in endothelial activation. *J Exp Med* 179: 503-12.
182. **Collins T, Read MA, Neish AS, et al.** (1995) Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 9: 899-909.
183. **Barnard EA** (1969) Biological function of pancreatic ribonuclease. *Nature* 221: 340-4.
184. **Beintema JJ** (1998) Introduction: the ribonuclease A superfamily. *Cell Mol Life Sci* 54: 763-5.
185. **Sorrentino S** (2010) The eight human "canonical" ribonucleases: molecular diversity, catalytic properties, and special biological actions of the enzyme proteins. *FEBS Lett* 584: 2194-200.
186. **Gleich GJ, Loegering DA, Bell MP, et al.** (1986) Biochemical and functional similarities between human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein: homology with ribonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 3146-50.
187. **Fett JW, Strydom DJ, Lobb RR, et al.** (1985) Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry* 24: 5480-6.
188. **Harder J, Schroder JM** (2002) RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem* 277: 46779-84.
189. **Rugeles MT, Trubey CM, Bedoya VI, et al.** (2003) Ribonuclease is partly responsible for the HIV-1 inhibitory effect activated by HLA alloantigen recognition. *AIDS* 17: 481-6.
190. **Cho S, Beintema JJ, Zhang J** (2005) The ribonuclease A superfamily of mammals and birds: identifying new members and tracing evolutionary histories. *Genomics* 85: 208-20.
191. **Sorrentino S, Libonati M** (1997) Structure-function relationships in human ribonucleases: main distinctive features of the major RNase types. *FEBS Lett* 404: 1-5.
192. **Domachowske JB, Dyer KD, Bonville CA, et al.** (1998) Recombinant human eosinophil-derived neurotoxin/RNase 2 functions as an effective antiviral agent against respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 177: 1458-64.
193. **Domachowske JB, Bonville CA, Dyer KD, et al.** (1998) Evolution of antiviral activity in the ribonuclease A gene superfamily: evidence for a specific interaction between eosinophil-derived neurotoxin (EDN/RNase 2) and respiratory syncytial virus. *Nucleic Acids Res* 26: 5327-32.
194. **Sorrentino S, Glitz DG** (1991) Ribonuclease activity and substrate preference of human eosinophil cationic protein (ECP). *FEBS Lett* 288: 23-6.
-

195. **Shapiro R, Fett JW, Strydom DJ, et al.** (1986) Isolation and characterization of a human colon carcinoma-secreted enzyme with pancreatic ribonuclease-like activity. *Biochemistry* 25: 7255-64.
196. **Rosenberg HF, Dyer KD** (1995) Human ribonuclease 4 (RNase 4): coding sequence, chromosomal localization and identification of two distinct transcripts in human somatic tissues. *Nucleic Acids Res* 23: 4290-5.
197. **Shapiro R, Strydom DJ, Olson KA, et al.** (1987) Isolation of angiogenin from normal human plasma. *Biochemistry* 26: 5141-6.
198. **Liote F, Champy R, Moenner M, et al.** (2003) Elevated angiogenin levels in synovial fluid from patients with inflammatory arthritis and secretion of angiogenin by cultured synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 132: 163-8.
199. **Shapiro R, Riordan JF, Vallee BL** (1986) Characteristic ribonucleolytic activity of human angiogenin. *Biochemistry* 25: 3527-32.
200. **Russo N, Shapiro R, Acharya KR, et al.** (1994) Role of glutamine-117 in the ribonucleolytic activity of human angiogenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 2920-4.
201. **Moroianu J, Riordan JF** (1994) Nuclear translocation of angiogenin in proliferating endothelial cells is essential to its angiogenic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 1677-81.
202. **Hu GF, Riordan JF, Vallee BL** (1997) A putative angiogenin receptor in angiogenin-responsive human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 2204-9.
203. **Bicknell R, Vallee BL** (1988) Angiogenin activates endothelial cell phospholipase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5961-5.
204. **Liu S, Yu D, Xu ZP, et al.** (2001) Angiogenin activates Erk1/2 in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 305-10.
205. **Rosenberg HF, Dyer KD** (1996) Molecular cloning and characterization of a novel human ribonuclease (RNase k6): increasing diversity in the enlarging ribonuclease gene family. *Nucleic Acids Res* 24: 3507-13.
206. **Huang YC, Lin YM, Chang TW, et al.** (2007) The flexible and clustered lysine residues of human ribonuclease 7 are critical for membrane permeability and antimicrobial activity. *J Biol Chem* 282: 4626-33.
207. **Zhang J, Dyer KD, Rosenberg HF** (2003) Human RNase 7: a new cationic ribonuclease of the RNase A superfamily. *Nucleic Acids Res* 31: 602-7.
208. **Zhang J, Dyer KD, Rosenberg HF** (2002) RNase 8, a novel RNase A superfamily ribonuclease expressed uniquely in placenta. *Nucleic Acids Res* 30: 1169-75.
209. **Rudolph B, Podschun R, Sahly H, et al.** (2006) Identification of RNase 8 as a novel human antimicrobial protein. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 3194-6.

-
210. **Beintema JJ, Wietzes P, Weickmann JL, et al.** (1984) The amino acid sequence of human pancreatic ribonuclease. *Anal Biochem* 136: 48-64.
211. **Seno M, Futami J, Kosaka M, et al.** (1994) Nucleotide sequence encoding human pancreatic ribonuclease. *Biochim Biophys Acta* 1218: 466-8.
212. **Futami J, Tsushima Y, Murato Y, et al.** (1997) Tissue-specific expression of pancreatic-type RNases and RNase inhibitor in humans. *DNA Cell Biol* 16: 413-9.
213. **Sasso MP, Lombardi M, Confalone E, et al.** (1999) The differential pattern of tissue-specific expression of ruminant pancreatic type ribonucleases may help to understand the evolutionary history of their genes. *Gene* 227: 205-12.
214. **Weickmann JL, Olson EM, Glitz DG** (1984) Immunological assay of pancreatic ribonuclease in serum as an indicator of pancreatic cancer. *Cancer Res* 44: 1682-7.
215. **Landre JB, Hewett PW, Olivot JM, et al.** (2002) Human endothelial cells selectively express large amounts of pancreatic-type ribonuclease (RNase 1). *J Cell Biochem* 86: 540-52.
216. **Moenner M, Hatzi E, Badet J** (1997) Secretion of ribonucleases by normal and immortalized cells grown in serum-free culture conditions. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 33: 553-61.
217. **Beintema JJ, Blank A, Schieven GL, et al.** (1988) Differences in glycosylation pattern of human secretory ribonucleases. *Biochem J* 255: 501-5.
218. **Barrabes S, Pages-Pons L, Radcliffe CM, et al.** (2007) Glycosylation of serum ribonuclease 1 indicates a major endothelial origin and reveals an increase in core fucosylation in pancreatic cancer. *Glycobiology* 17: 388-400.
219. **Ribo M, Beintema JJ, Osset M, et al.** (1994) Heterogeneity in the glycosylation pattern of human pancreatic ribonuclease. *Biol Chem Hoppe Seyler* 375: 357-63.
220. **Yasuda T, Nadano D, Takeshita H, et al.** (1993) Two distinct secretory ribonucleases from human cerebrum: purification, characterization and relationships to other ribonucleases. *Biochem J* 296 (Pt 3): 617-25.
221. **Mizuta K, Awazu S, Yasuda T, et al.** (1990) Purification and characterization of three ribonucleases from human kidney: comparison with urine ribonucleases. *Arch Biochem Biophys* 281: 144-51.
222. **Kover KE, Bruix M, Santoro J, et al.** (2008) The solution structure and dynamics of human pancreatic ribonuclease determined by NMR spectroscopy provide insight into its remarkable biological activities and inhibition. *J Mol Biol* 379: 953-65.
223. **Libonati M, Sorrentino S** (2001) Degradation of double-stranded RNA by mammalian pancreatic-type ribonucleases. *Methods Enzymol* 341: 234-48.
224. **Sorrentino S, Libonati M** (1994) Human pancreatic-type and nonpancreatic-type ribonucleases: a direct side-by-side comparison of their catalytic properties. *Arch Biochem Biophys* 312: 340-8.
-

225. **Findlay D, Herries DG, Mathias AP, et al.** (1961) The active site and mechanism of action of bovine pancreatic ribonuclease. *Nature* 190: 781-84.
226. **Cuchillo CM, Pares X, Guasch A, et al.** (1993) The role of 2',3'-cyclic phosphodiesterases in the bovine pancreatic ribonuclease A catalysed cleavage of RNA: intermediates or products? *FEBS Lett* 333: 207-10.
227. **Rehman MT, Dey P, Hassan MI, et al.** (2011) Functional role of glutamine 28 and arginine 39 in double stranded RNA cleavage by human pancreatic ribonuclease. *PLoS One* 6: e17159.
228. **Libonati M, Sorrentino S** (1992) Revisiting the action of bovine ribonuclease A and pancreatic-type ribonucleases on double-stranded RNA. *Mol Cell Biochem* 117: 139-51.
229. **Nicholson AW** (1996) Structure, reactivity, and biology of double-stranded RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 52: 1-65.
230. **Sorrentino S, Naddeo M, Russo A, et al.** (2003) Degradation of double-stranded RNA by human pancreatic ribonuclease: crucial role of noncatalytic basic amino acid residues. *Biochemistry* 42: 10182-90.
231. **Gaur D, Seth D, Batra JK** (2002) Glycine 38 is crucial for the ribonucleolytic activity of human pancreatic ribonuclease on double-stranded RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 297: 390-5.
232. **Roth JS** (1958) Ribonuclease. VII. Partial purification and characterization of a ribonuclease inhibitor in rat liver supernatant fraction. *J Biol Chem* 231: 1085-95.
233. **Haigis MC, Kurten EL, Raines RT** (2003) Ribonuclease inhibitor as an intracellular sentry. *Nucleic Acids Res* 31: 1024-32.
234. **Kobe B, Deisenhofer J** (1996) Mechanism of ribonuclease inhibition by ribonuclease inhibitor protein based on the crystal structure of its complex with ribonuclease A. *J Mol Biol* 264: 1028-43.
235. **Kobe B, Deisenhofer J** (1993) Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. *Nature* 366: 751-6.
236. **Johnson RJ, Lavis LD, Raines RT** (2007) Intraspecies regulation of ribonucleolytic activity. *Biochemistry* 46: 13131-40.
237. **Gaur D, Swaminathan S, Batra JK** (2001) Interaction of human pancreatic ribonuclease with human ribonuclease inhibitor. Generation of inhibitor-resistant cytotoxic variants. *J Biol Chem* 276: 24978-84.
238. **Akagi K, Yamanaka M, Murai K, et al.** (1978) Serum acid ribonuclease in myelogenous leukemia. *Cancer Res* 38: 2168-73.
239. **Drake WP, Pokorney DR, Ruckdeschel JC, et al.** (1975) A white blood cell RNase assay for the possible monitoring of malignancy. *J Natl Cancer Inst* 54: 1475-8.
-

240. **Chu TM, Wang MC, Kuciel R, et al.** (1977) Enzyme markers in human prostatic carcinoma. *Cancer Treat Rep* 61: 193-200.
241. **Reddi KK, Holland JF** (1976) Elevated serum ribonuclease in patients with pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73: 2308-10.
242. **Sheid B, Lu T, Pedrinan L, et al.** (1977) Plasma ribonuclease: a marker for the detection of ovarian cancer. *Cancer* 39: 2204-8.
243. **Bardon A, Slerakowska H, Shugar D** (1976) Purification and properties of human acid-thermostable ribonucleases, and diagnosis of childhood pancreatic fibrosis. *Clin Chim Acta* 67: 231-43.
244. **Sznajd J, Magdon M, Naskalski JW, et al.** (1981) Serum ribonuclease activity in acute myocardial infarction. *Cor Vasa* 23: 241-7.
245. **Reddi KK** (1978) Serum ribonuclease of normal persons and patients with renal impairment. *Clin Biochem* 11: 133-4.
246. **Akagi K, Murai K, Hirao N, et al.** (1976) Purification and properties of alkaline ribonuclease from human serum. *Biochim Biophys Acta* 442: 368-78.
247. **Wu Y, Mikulski SM, Ardelt W, et al.** (1993) A cytotoxic ribonuclease. Study of the mechanism of onconase cytotoxicity. *J Biol Chem* 268: 10686-93.
248. **Haigis MC, Raines RT** (2003) Secretory ribonucleases are internalized by a dynamin-independent endocytic pathway. *J Cell Sci* 116: 313-24.
249. **Zhao H, Ardelt B, Ardelt W, et al.** (2008) The cytotoxic ribonuclease onconase targets RNA interference (siRNA). *Cell Cycle* 7: 3258-61.
250. **Johnson RJ, McCoy JG, Bingman CA, et al.** (2007) Inhibition of human pancreatic ribonuclease by the human ribonuclease inhibitor protein. *J Mol Biol* 368: 434-49.
251. **Walberer M, Tschernatsch M, Fischer S, et al.** (2009) RNase therapy assessed by magnetic resonance imaging reduces cerebral edema and infarction size in acute stroke. *Curr Neurovasc Res* 6: 12-9.
252. **Lee-Huang S, Huang PL, Sun Y, et al.** (1999) Lysozyme and RNases as anti-HIV components in beta-core preparations of human chorionic gonadotropin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2678-81.
253. **Yang D, Chen Q, Rosenberg HF, et al.** (2004) Human ribonuclease A superfamily members, eosinophil-derived neurotoxin and pancreatic ribonuclease, induce dendritic cell maturation and activation. *J Immunol* 173: 6134-42.
254. **Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, et al.** (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52: 2745-56.
-

-
255. **Korzeniewski C, Callewaert DM** (1983) An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods* 64: 313-20.
256. **Decker T, Lohmann-Matthes ML** (1988) A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 115: 61-9.
257. **Felgner PL, Gadek TR, Holm M, et al.** (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 7413-7.
258. **Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, et al.** (1994) Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem* 269: 2550-61.
259. **Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al.** (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-8.
260. **Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al.** (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85.
261. **Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD** (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* 175: 231-7.
262. **Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.
263. **Renart J, Reiser J, Stark GR** (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 3116-20.
264. **Zimmerman SB, Sandeen G** (1965) A sensitive assay for pancreatic ribonuclease. *Analytical Biochemistry* 10: 444-49.
265. **Blank A, Sugiyama RH, Dekker CA** (1982) Activity staining of nucleolytic enzymes after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: use of aqueous isopropanol to remove detergent from gels. *Anal Biochem* 120: 267-75.
266. **Macaya RF, Schultze P, Smith FW, et al.** (1993) Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 3745-9.
267. **Russo Krauss I, Merlino A, Giancola C, et al.** (2011) Thrombin-aptamer recognition: a revealed ambiguity. *Nucleic Acids Res* 39: 7858-67.
268. **Wang KY, McCurdy S, Shea RG, et al.** (1993) A DNA aptamer which binds to and inhibits thrombin exhibits a new structural motif for DNA. *Biochemistry* 32: 1899-904.
269. **Muller J, Isermann B, Ducker C, et al.** (2009) An exosite-specific ssDNA aptamer inhibits the anticoagulant functions of activated protein C and enhances inhibition by protein C inhibitor. *Chem Biol* 16: 442-51.
-

270. **Collins T** (1993) Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest* 68: 499-508.
271. **Modur V, Zimmerman GA, Prescott SM, et al.** (1996) Endothelial cell inflammatory responses to tumor necrosis factor alpha. Ceramide-dependent and -independent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* 271: 13094-102.
272. **Acharyya S, Sharma SM, Cheng AS, et al.** (2010) TNF inhibits Notch-1 in skeletal muscle cells by Ezh2 and DNA methylation mediated repression: implications in duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* 5: e12479.
273. **Rahman I, Gilmour PS, Jimenez LA, et al.** (2002) Oxidative stress and TNF-alpha induce histone acetylation and NF-kappaB/AP-1 activation in alveolar epithelial cells: potential mechanism in gene transcription in lung inflammation. *Mol Cell Biochem* 234-235: 239-48.
274. **Friedl J, Puhlmann M, Bartlett DL, et al.** (2002) Induction of permeability across endothelial cell monolayers by tumor necrosis factor (TNF) occurs via a tissue factor-dependent mechanism: relationship between the procoagulant and permeability effects of TNF. *Blood* 100: 1334-9.
275. **Chu BC, Orgel LE** (1992) The stability of different forms of double-stranded decoy DNA in serum and nuclear extracts. *Nucleic Acids Res* 20: 5857-8.
276. **Kamm RC, Smith AG** (1972) Nucleic acid concentrations in normal human plasma. *Clin Chem* 18: 519-22.
277. **Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, et al.** (2006) Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* 8: 668-76.
278. **Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al.** (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532-5.
279. **Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, et al.** (2012) Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One* 7: e32366.
280. **Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, et al.** (2006) Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med* 12: 235-9.
281. **Grabiec AM, Reedquist KA** (2010) Histone deacetylases in RA: epigenetics and epiphenomena. *Arthritis Res Ther* 12: 142.
282. **Combes V, Simon AC, Grau GE, et al.** (1999) In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 104: 93-102.
283. **Sapet C, Simoncini S, Lloriod B, et al.** (2006) Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. *Blood* 108: 1868-76.
-

284. **Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, et al.** (2010) Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res* 107: 810-7.
285. **Ullal AJ, Pisetsky DS, Reich CF, 3rd** (2010) Use of SYTO 13, a fluorescent dye binding nucleic acids, for the detection of microparticles in in vitro systems. *Cytometry A* 77: 294-301.
286. **Nan B, Lin P, Lumsden AB, et al.** (2005) Effects of TNF-alpha and curcumin on the expression of thrombomodulin and endothelial protein C receptor in human endothelial cells. *Thromb Res* 115: 417-26.
287. **Sohn RH, Deming CB, Johns DC, et al.** (2005) Regulation of endothelial thrombomodulin expression by inflammatory cytokines is mediated by activation of nuclear factor-kappa B. *Blood* 105: 3910-7.
288. **von der Ahe D, Nischan C, Kunz C, et al.** (1993) Ets transcription factor binding site is required for positive and TNF alpha-induced negative promoter regulation. *Nucleic Acids Res* 21: 5636-43.
289. **Shakespear MR, Halili MA, Irvine KM, et al.** (2011) Histone deacetylases as regulators of inflammation and immunity. *Trends Immunol* 32: 335-43.
290. **Choudhary C, Kumar C, Gnad F, et al.** (2009) Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 325: 834-40.
291. **Kawabata T, Nishida K, Takasugi K, et al.** (2010) Increased activity and expression of histone deacetylase 1 in relation to tumor necrosis factor-alpha in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 12: R133.
292. **Huber LC, Brock M, Hemmatzad H, et al.** (2007) Histone deacetylase/acetylase activity in total synovial tissue derived from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum* 56: 1087-93.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
3D	3-dimensional
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
APC	aktiviertes Protein C
AT-III	Antithrombin-III
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BK	Bradykinin
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca	Calcium
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CO ₂	Kohlendioxid
Ct	<i>Cycle-Threshold</i>
Cu	Kupfer
d.h.	das heißt
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DD	<i>Death-Domain</i>
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPCR	endothelialen Protein C Rezeptor (<i>endothelial Protein C receptor</i>)
et al.	et alteri (und andere)
FAD	Fas-assoziiertes-Protein-mit-DD

Abkürzungsverzeichnis

FCS	Fetales Kälberserum (<i>Fetal calf serum</i>)
FII	Faktor II
FIX	Faktor IX
FIXa	aktivierter FIX
FSAP	Faktor VII-aktivierende Protease
FV	Faktor V
FVa	aktivierter FV
FVII	Faktor VII
FVIIa	aktivierter Faktor VII
FVIII	Faktor VIII
FVIIIa	aktivierter FVIII
FX	Faktor X
FXa	aktivierter Faktor X
FXI	Faktor XI
FXIa	aktivierter Faktor XI
FXII	Faktor XII
FXIIa	aktivierter Faktor XII
FXIII	Faktor XIII
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphaat-dehydrogenase
GP	Glykoprotein
h	Stunde
HBS	<i>Hepes buffered saline</i>
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HCl	Salzsäure
HDAC	Histondeacetylase
HAT	Histonacetyltransferase
HIT	Heparin-induzierte Thrombozytopenie
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HK	Hochmolekulares Kininogen (<i>high molecular weight kininogen</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
ICAM-1	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1
IgG	Immunglobulin G

Abkürzungsverzeichnis

kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
m	milli
M	Molar (Mol pro Liter)
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein (<i>mitogen activated protein</i>)
MEM	Modified Eagle's Medium
MF	Multiplikationsfaktor
min	Minute
mol	Mole ($6,023 \times 10^{23}$ Teilchen)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	nano oder Anzahl
NAD ⁺	oxidierte Form von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	reduzierte Form von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NET	<i>neutrophil extracellular trap</i>
NF κ B	Nukleärer Faktor κ B
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor (<i>protease-activated-receptor</i>)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PF4	Plättchenfaktor 4
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung
PK	Präkallikrein
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Poly C	Polyribocytidylsäure
Poly I:C	Polyribocytidyl-Polyriboinosinsäure
Poly:U	Polyribouracylsäure
polyP	Polyphosphat
PTT	Thromboplastinzeit

Abkürzungsverzeichnis

qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
RI	RNase Inhibitor
RIP-1	Rezeptor-interagierendes-Protein-1
RIPA	<i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (Revolutions per minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfalte</i>)
Sec	Sekunde
SELEX	<i>Systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TACE	TNF α -konvertierendes-Enzym
TAE	Tris EDTA Acetat
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris buffered saline with tween</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	<i>Tissue factor</i> (Thromboplastin)
TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i> (Thromboplastin-Inhibitor)
TM	Thrombomodulin
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
TNF-R	TNF-Rezeptoren
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
t-PA	gewebespezifischer Plasminogenaktivator (<i>tissue-type plasminogen activator</i>)
TRAD	TNFR1-assoziierten-DD-Proteins
TRAF	TNFR-assoziierte-Faktoren
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Trichostatin A
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen

Abkürzungsverzeichnis

VE-Cadherin	Vaskulär-endotheliales Cadherin
VEGF	vaskulär-endothelialer Wachstumsfaktor (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)
VEGF-R	VEGF-Rezeptor
Vol.	Volumen
vWF	von-Willebrand-Faktor
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
Zn	Zink

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der Multikomponenten-Enzymkomplexe der Hämostase	3
Abbildung 2: Aktivierung und Regulation der Gerinnungskaskade	5
Abbildung 3: Schema des intrinsischen Gerinnungssystems	7
Abbildung 4: RNA-abhängige Aktivierung des intrinsischen Gerinnungsweges mittels eines Template-Mechanismus	11
Abbildung 5: TNF α -vermittelte Signalwege	19
Abbildung 6: Phylogenetische Unterteilung der RNase-Superfamilie	20
Abbildung 7: Dreidimensionale Struktur der humanen RNase 1	24
Abbildung 8: Reaktionsmechanismus der durch RNase A katalysierten Hydrolyse von RNA	25
Abbildung 9: Dreidimensionale Struktur des humanem RNase Inhibitor im Komplex mit verschiedenen Ribonukleasen	26
Abbildung 10: Physiologische Aktivitäten von extrazellulärer RNA und RNase 1	28
Abbildung 11: Bestimmung der Gerinnungszeit	60
Abbildung 12: Sekundärstrukturen der verwendeten DNA- und RNA-Oligonukleotide	62
Abbildung 13: Stabilität der verwendeten DNA- und RNA-Oligonukleotide in humanem Plasma	63
Abbildung 14: Prokoagulatorische Aktivität verschiedener DNA- und RNA-Oligonukleotide mit Unterschieden in Länge und Sekundärstrukturen	65
Abbildung 15: Vergleich der prokoagulatorischen Eigenschaften verschiedener Haarnadel- formender DNA-Oligonukleotide	67
Abbildung 16: Bindung verschiedener biotinylierter DNA-Oligonukleotide an Gerinnungsfaktoren	69
Abbildung 17: Prokoagulatorische Aktivität von DNA-Aptameren	71
Abbildung 18: Interaktion von Plättchenfaktor 4 mit Nukleinsäuren	73
Abbildung 19: Genexpression von RNase 1 und RNase Inhibitor in HUVEC nach konzentrationsabhängiger Stimulation mit TNF α , Thrombin und LPS für 24 Stunden ..	75
Abbildung 20: Genexpression von RNase 1 und RNase Inhibitor nach zeitabhängiger Stimulation von HUVEC mit TNF α oder Thrombin	76
Abbildung 21: Proteinexpression und Sekretion von RNase 1 in HUVEC nach 24-stündiger Stimulation mit TNF α , Thrombin und LPS	77
Abbildung 22: RNase-Aktivität und RNA-Gehalt in HUVEC-Überständen nach 24-stündiger Stimulation mit TNF α und Thrombin	78
Abbildung 23: Proteinexpression und Sekretion von RNase 1 nach Stimulation von HUVEC mit TNF α und BAY11-7082	79
Abbildung 24: Proteinexpression und Sekretion von RNase 1 nach Stimulation von HUVEC mit TNF α und Trichostatin A (TSA)	80
Abbildung 25: Expression und Sekretion von RNase 1 nach Depletion des TNF α -Stimulus	81
Abbildung 26: siRNA-vermittelte Herunterregulation der RNase 1-Expression in HUVEC	82
Abbildung 27: Fluoreszenzfärbung von HUVEC	83
Abbildung 28: VE-Cadherin-Expression in HUVEC	84

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 29: Vergleich der prokoagulatorischen Eigenschaften der verwendeten synthetischen Nukleinsäureoligonukleotide	86
Abbildung 30: Haarnadel-Strukturen vermitteln die prokoagulatorische Aktivität von Nukleinsäuren ..	88
Abbildung 31: Regulation der prokoagulatorischen Aktivität von Nukleinsäuren durch Plättchenfaktor 4.....	92
Abbildung 32: Mechanismus der TNF α -vermittelten Verminderung der RNase 1-Expression in HUVEC	96

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eigenschaften der ribonukleolytisch aktiven Mitglieder der RNase A-Familie.....	22
Tabelle 2: Dissoziationskonstanten (K_D) der Bindung von biotinylierten DNA-Oligonukleotiden an Kininogen.....	68

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

Danksagung

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich es natürlich nicht versäumen, den Menschen zu danken, die mich während meiner Doktorandenzeit begleitet und unterstützt haben:

Prof. Preissner, der mir die Möglichkeit gab, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen und mit vielen Anmerkungen und Ratschlägen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Prof. Pingoud, der freundlicherweise die Betreuung der Arbeit als Erstgutachter außerhalb des Fachbereiches Biologie und Chemie übernommen hat.

Silvia für die tolle Betreuung während meiner ganzen Doktorandenzeit. Du hattest bei allen Problemen ein offenes Ohr, hast mir geduldig mit Rat und Tat weitergeholfen und mir wichtige Denkanstöße geliefert.

Bärbel, Barbara, Jessy, Ute, Susanne, Thomas, Sandip, Anke, Christiane, Uwe, Gudrun, Mary und Ines für die tatkräftige Unterstützung und das tolle Arbeitsklima. Ihr habt mich in allen Belangen unterstützt, alle Fragen geduldig beantwortet und wart auch immer für einen Spaß zu haben.

Gosia, Darek, Brigitte, Horst und Yvonne für die nette Zusammenarbeit und die hilfreichen Ratschläge.

Mona, Mareike, Hector, Amit, Saravanan und Mirka für die vielen tollen Gespräche, Tips und Aufmunterungen und die netten Abende auf dem Weihnachtsmarkt oder in der „Paprica“. Doktoranden müssen einfach zusammenhalten! ☺

Silke und Elfie für die tolle Zeit im Labor mit hilfreichen Diskussionen und unzähligen lustigen und aufmunterten Momenten („Blot, Blot, Western Baby“), den Japan/Südkorea-Abenteuertrip („highly recommendable“), unsere London-Bon Jovi-Tour, das King’s of Leon Konzert, die „Anoying Orange“-Phase, nicht zu vergessen die Kaffee-Abhängigkeit, die Cocktail- und Tequila-Abende, den Hawaii-Toast-Song sowie unzählige Kinobesuche und Shopping-Trips. Ohne euch wär’s nur halb so schön gewesen! ☺

Meiner Mutter Renate, meinen Schwestern Michaela und Claudia und ihren Familien sowie meinen Paten Gerda und Wolfgang für eure Unterstützung und weil ihr immer und ohne jeden Zweifel an mich geglaubt habt.

Chris- meinem Seelenverwandten und Fels in der Brandung. Ich danke dir, dass du mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hast, selbst die tiefsten Tiefen meiner Launen ertragen, dir jeden Tag meine Laborprobleme angehört (auch wenn du wahrscheinlich mit maximal 20% davon wirklich etwas anfangen konntest ☺) und mich aufgemuntert hast. Du hast mir meine Selbstzweifel immer wieder ausgeredet und mir Mut gemacht. Ohne dich wäre ich nie soweit gekommen.