

**Expression und Funktion des Ribonuklease Inhibitors RNH1
und der Ribonukleasen Angiogenin und Ribonuklease 1
in Tumor- und Endothelzelllinien unter
hypoxischen, inflammatorischen und apoptotischen Bedingungen**

Inauguraldissertation

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

vorgelegt von
Salpisti Sofia
aus Thessaloniki

Gießen 2021

**Expression und Funktion des Ribonuklease Inhibitors RNH1
und der Ribonukleasen Angiogenin und Ribonuklease 1
in Tumor- und Endothelzelllinien unter
hypoxischen, inflammatorischen und apoptotischen Bedingungen**

Inauguraldissertation

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

vorgelegt von
Salpisti Sofia
aus Thessaloniki

Gießen 2021

Aus dem Fachbereich Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Biochemisches Institut

Gutachter: Prof. Dr. K. T. Preissner

Gutachter: Prof. Dr. H. Teschemacher

Tag der Disputation: 20.01.2022

Für meinen Vater und meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Ribonuklease Inhibitor	1
1.1.1 Strukturelle Charakteristika des Ribonuklease Inhibitors	1
1.1.2 Physiologische Rolle des Ribonuklease Inhibitors	4
1.2 Ribonukleasen	6
1.3 Extrazelluläre RNA	13
1.4 Zelluläre Mikrovessel.....	16
1.4.1 Klassen sekretorischer Vesikel.....	16
1.4.2 Charakterisierung von Mikrovesseln	17
1.4.3 Aufbau der Mikrovessel.....	18
1.4.4 Mechanismen der Mikrovesselbildung.....	19
1.4.5 Funktionelle Eigenschaften der Mikrovessel	20
<i>1.4.5.1 Transfer bioaktiver Moleküle</i>	<i>20</i>
<i>1.4.5.2 Wege des Informationsaustauschs</i>	<i>21</i>
<i>1.4.5.3 Mikrovessel und Entzündungen.....</i>	<i>22</i>
1.4.6 Nachweis von Mikrovesseln.....	23
2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	24
3 MATERIAL UND METHODEN	26
3.1 Chemikalien und Geräte	26
3.1.1 Chemikalien, Enzyme und Kits.....	26
3.1.2 Geräte und sonstige Materialien	30
3.1.3 Antikörper.....	33

3.2 Zellkulturtechnische Methoden	34
3.2.1 Einführung in die verwendeten Zelltypen	34
3.2.1.1 <i>HT1080</i>	34
3.2.1.2. <i>HT29</i>	34
3.2.1.3. <i>HUVEC</i>	35
3.2.1.4. <i>EA.hy926</i>	36
3.2.2 Auftauen der Zellen	36
3.2.3 Passage der Zellen	37
3.2.4 Kryokonservierung von Zellen	37
3.2.5 Bestimmung der Gesamt- und Lebendzellzahl.....	38
3.2.6 Stimulation und Ernten der Zellen.....	38
3.2.7 Proliferationstest	40
3.2.8 Zytotoxizitätstest	41
3.2.9 Apoptosetest.....	42
3.3 Molekularbiologische Methoden	42
3.3.1 RNA-Isolation aus Zellüberständen	42
3.3.2 RNA-Isolation aus Zelllysaten.....	43
3.3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	44
3.3.4 Reverse Transkription	45
3.3.5 Semi-quantitative Polymerasekettenreaktion (PCR).....	46
3.3.6 DNA-Agarose-Gelelektrophorese	47
3.3.7 Transfektion von Zellen mit siRNA.....	48
3.4 Proteinbiochemische Methoden.....	48
3.4.1 Herstellung von Zelllysaten	48
3.4.2 Konzentrierung von Zellüberständen	49
3.4.3 Proteinbestimmung	49
3.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50

3.4.5 Western-Blot-Analyse	52
3.4.6 Enzymatische Bestimmung der Ribonuklease-Aktivität	53
3.4.7 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen	54
3.4.8 Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie	56
3.5 Isolation und Analyse von Mikrovesikeln.....	57
3.5.1 Reinigen und Isolation der Mikrovesikel	57
3.5.2 Charakterisierung von Mikrovesikeln mittels Durchflußzytometrie.....	58
3.6 Statistische Analyse.....	60
4 ERGEBNISSE	61
4.1 Reaktionen des Ribonuklease Inhibitor/Ribonuklease-Systems in Zellen der Tumorzelllinie HT1080 und der Endothelzelllinie EA.hy926 auf hypoxische, inflammatorische und apoptotische Stimuli	61
4.1.1 Nachweis der Expression von Ribonuklease Inhibitor (RNH1), Ribonuklease 1 (RNase 1) und Angiogenin in HT1080- und EA.hy926-Zellen...61	
4.1.2 DNA (aus mRNA, Transkriptionsprodukt) und Protein-immunoreaktives Material (Translationsprodukt) von Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1 und Angiogenin in Zellüberständen und Zelllysaten von HT1080-Zellen innerhalb einer 24-stündigen Stimulation mit TNFα, LPS oder Hypoxie	65
<i>4.1.2.1 Ribonuklease Inhibitor-immunoreaktives Material.....</i>	<i>65</i>
<i>4.1.2.2 Ribonuklease 1-immunoreaktives Material, Ribonuklease-Aktivität.....</i>	<i>69</i>
<i>4.1.2.3 Angiogenin-immunoreaktives Material</i>	<i>72</i>
<i>4.1.2.4 DNA (aus mRNA) von Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1 und Angiogenin..</i>	<i>75</i>
4.1.3 DNA (aus mRNA) und Protein-immunoreaktives Material von Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1 und Angiogenin, RNA und Ribonuklease-Aktivität in Zelllysaten, Zellüberständen oder Mikrovesikeln aus HT1080-Zellen nach einer 24-stündigen Behandlung mit STP, ETOH, TNFα, LPS oder Hypoxie.....	79
<i>4.1.3.1 Zellüberstände und Zelllysate: Protein-immunoreaktives Material.....</i>	<i>79</i>
<i>4.1.3.2 Mikrovesikel und Restüberstände: Protein-immunoreaktives Material.....</i>	<i>82</i>

<i>4.1.3.3 Zellüberstände, Mikrovesikel und Restüberstände: Ribonuklease-Aktivität und RNA</i>	85
<i>4.1.3.4 Zelllysate: DNA (aus mRNA)</i>	86
<i>4.1.3.5 Mikrovesikel: Charakteristika</i>	87
4.1.4 DNA (aus mRNA) und Protein-immunoreaktives Material von Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1 und Angiogenin, RNA und Ribonuklease-Aktivität in Zelllysaten, Zellüberständen oder Mikrovesikeln aus EA.hy926-Zellen nach einer 24-stündigen Behandlung mit STP, ETOH, TNFα, LPS oder Hypoxie	90
<i>4.1.4.1 Zellüberstände und Zelllysate: Protein-immunoreaktives Material</i>	90
<i>4.1.4.2 Mikrovesikel und Restüberstände: Protein-immunoreaktives Material</i>	94
<i>4.1.4.3 Zellüberstände, Mikrovesikel und Restüberstände: Ribonuklease-Aktivität und RNA</i>	97
<i>4.1.4.4 Zelllysate: DNA (aus mRNA)</i>	98
<i>4.1.4.5 Mikrovesikel: Charakteristika</i>	99
4.1.5 Mikrovesikel aus normoxischer und hypoxischer Behandlung von HT1080-Zellen: Zytotoxizität und Einfluss auf die Zellproliferation von humanen primären Endothelzellen (HUVEC-Zellen)	103
<i>4.1.5.1 Zytotoxizität</i>	103
<i>4.1.5.2 Einfluss auf die Zellproliferation</i>	104
4.2 Eigenschaften des Ribonuklease Inhibitors	104
4.2.1 Instabilität des Ribonuklease Inhibitors in humanem Blutplasma	104
4.2.2 Zytotoxizität und Einfluss des Ribonuklease Inhibitors auf die Proliferation von HUVEC-, HT1080- und EA.hy926-Zellen	106
4.2.3 Hemmung der Expression des Ribonuklease Inhibitors mittels siRNA: Expressionshemmung der Ribonukleasen Angiogenin und Ribonuklease 1 und weitere Effekte in HT1080- und EA.hy926-Zellen	107
<i>4.2.3.1 Hemmung der Expression des Ribonuklease Inhibitors mittels siRNA in HT1080-Zellen</i>	107
<i>4.2.3.2 Hemmung der Expression des Ribonuklease Inhibitors mittels siRNA in EA.hy926-Zellen</i>	113

5 DISKUSSION	119
5.1 Extrazelluläre Wirkung des Ribonuklease Inhibitors.....	119
5.2 Intrazelluläre Wirkung des Ribonuklease Inhibitors.....	121
5.3 Expression des Ribonuklease Inhibitors unter inflammatorischen Bedingungen	122
5.3.1 Expressionsunterschiede von Ribonuklease Inhibitor und Ribonukleasen der Ribonuklease A-Superfamilie zwischen Tumor- und Endothelzellen	123
5.3.2 Einfluss proinflammatorischer und hypoxischer Bedingungen auf die Expression und Freisetzung des Ribonuklease Inhibitors in Tumor- und Endothelzellen.....	126
<i>5.3.2.1 Freisetzung des Ribonuklease Inhibitors.....</i>	<i>126</i>
<i>5.3.2.2 Einfluss proinflammatorischer Mediatoren.....</i>	<i>129</i>
<i>5.3.2.3 Einfluss hypoxischer Bedingungen.....</i>	<i>131</i>
5.4 Einfluss der Ribonuklease Inhibitor-Expression auf die Expression von Ribonukleasen der Ribonuklease A-Superfamilie	134
5.5 Schlussfolgerungen und klinische Relevanz des Ribonuklease Inhibitors	135
5.6 Perspektiven	136
ZUSAMMENFASSUNG	138
SUMMARY.....	140
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	142
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	146
TABELLENVERZEICHNIS	152
LITERATURVERZEICHNIS	153
PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	172
EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	173

INHALTSVERZEICHNIS

DANKSAGUNG	174
LEBENS LAUF	175

1 EINLEITUNG

1.1 Ribonuklease Inhibitor

Der Ribonuklease Inhibitor (RNH1) ist ein ubiquitäres, saures (pI 4.7), 50 kDa großes Protein, das sich im Zytosol aller Körperzellen in hohen Konzentrationen bis etwa 4 μM befindet (Roth et al., 1958; Rutkoski und Raines, 2008). Er bildet hoch-affine, nicht-kovalente Bindungen mit Mitgliedern der Ribonuklease (RNase) A-Superfamilie, wie pankreatische RNase 1, *Eosinophil-derived Neurotoxin* (RNase 2), RNase 4 oder RNase 5 (Blackburn und Jaikhani, 1979). Nach seiner Bindung an RNasen inaktiviert RNH1 deren ribonukleolytische Aktivität, sodass RNasen intrazelluläre Ribonukleinsäure (RNA) weder binden noch degradieren können (Roth, 1967; Blackburn P, 1982; Lee und Vallee, 1993; Hofsteenge, 1997; Shapiro, 2001). Damit bildet der RNH1 einen lebensnotwendigen Schutz der Körperzellen gegenüber RNA-Degradation. Obwohl der RNH1 offenbar auch freigesetzte, extrazelluläre RNasen inhibiert, ist er bislang nicht in extrazellulären Körperflüssigkeiten wie Plasma, Speichel oder Urin detektiert worden (Nadano et al., 1994; Futami et al., 1997). Die höchste Affinität zeigt er gegenüber Angiogenin, dem fünften Mitglied der RNase A-Superfamilie, so dass RNH1 auch als Angiogenin-Inhibitor bzw. Angiogenese-Inhibitor bezeichnet wird.

1.1.1 Strukturelle Charakteristika des Ribonuklease Inhibitors

Der RNH1 wird aufgrund seiner aus vielen *Leucin-Rich-Repeats* (LRRs) bestehenden Aminosäuresequenz zur Familie der LRR-Proteine gezählt (Hofsteenge et al., 1988; Lee et al., 1988). Charakteristisch für alle Mitglieder der LRR-Familie ist, dass die LRRs den Bereich der Protein-Protein-Wechselwirkungen ausbilden (Janin, 1994; Kobe und Deisenhofer, 1994; Shapiro et al., 1995; Kobe und Kajava, 2001). RNH1 war das erste LRR-Protein, dessen Struktur kristallisiert und mittels Röntgendiffraktion analysiert wurde (Kobe und Deisenhofer, 1993). Daraus ergab sich, dass die LRR-Domänen abwechselnd α -Helix- und β -Strang-Einheiten bilden, die mit Schleifen untereinander verbunden sind und durch ihre symmetrische Anordnung dem RNH1 seine charakteristische hufeisenförmige Struktur verleihen. Leucinreste und andere aliphatische Seitenketten bilden den inneren hydrophoben Teil des Hufeisens, der eine

große Oberfläche für die Wechselwirkung mit anderen Proteinen bietet (Kobe und Kajava, 2001; Kobe und Deisenhofer, 1995; Kajava, 1998) (Abbildung 1).

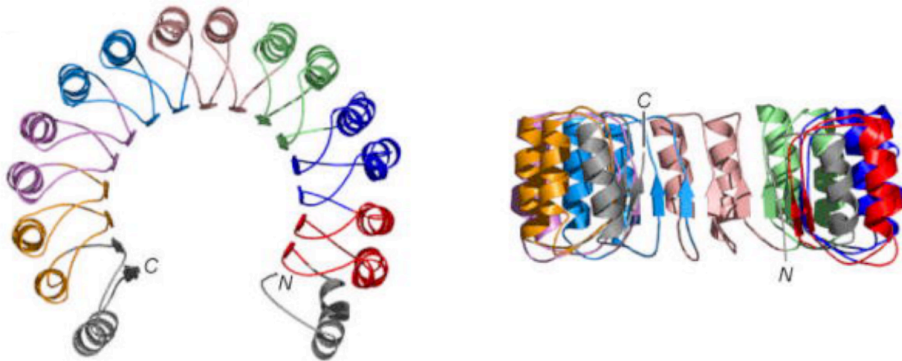


Abbildung 1: Dreidimensionale Struktur des Ribonuklease Inhibitors

Dargestellt ist eine auf Röntgenstrukturanalysen basierende Darstellung des RNHI: Aufsicht des Moleküls (links), Seitenansicht des Moleküls (90° gedreht, rechts). Die Farben entsprechen den durch Exons kodierenden LRR-Domänen (Dickson et al., 2005).

Die Dominanz der LRR-Einheiten spiegelt sich auch in der Desoxyribonukleinsäure-(DNA-) Sequenz des durch Genduplikation entwickelten RNHI-Gens wieder. Die LRR-Domänen korrelieren mit den Exons des RNHI-Gens, da jedes Exon für zwei Segmente einer α -Helix und eines β -Stranges kodiert. Außerdem weisen diese aus 171 Basen bestehenden Exons eine bis zu 60% Identität untereinander auf (Haigis et al., 2002a). Trotz der Expression des RNHI in nahezu allen Organen und Geweben, gibt es nur eine Kopie des RNHI-Gens mit derselben Aminosäuresequenz. In der 5'-untranslatierten Region des RNHI-Gens wurden unterschiedliche Spleißstellen identifiziert, was auf eine mögliche Regulation des Proteins in verschiedenen Geweben und Spezies hindeutet (Crawford et al., 1989).

Bisher wurde die Komplexbildung und Inhibierung von boviner RNase A sowie der humanen RNasen 1-7 durch RNHI untersucht (Rutkoski und Raines, 2008). Die RNHI-RNase A-Kontaktfläche ist 60% größer als die entsprechende Fläche in einem typischen Antikörperantigen-Komplex (Kobe und Deisenhofer, 1995), was auch die äußerst hoch-affine Protein-Protein Interaktion zwischen RNHI und RNase A erklärt (Affinität: ca. 10^{-16} M). Obwohl die LRRs den Bereich für die Interaktion mit anderen Proteinen ausbilden, sind nicht alle LRR-Einheiten vom RNHI für seine Bindung an RNasen oder für die Hemmung ihrer Aktivität notwendig (Lee und Vallee, 1990; Hofsteenge et al., 1991). Der innere Umfang des Hufeisens enthält nur 9 Seitenketten, die an der

Komplexbildung beteiligt sind. Zwei weitere Kontaktstellen befinden sich auf den α -Helices des RNH1. Die restlichen 17 Kontakte sind in Schleifen, die die C-Termini der β -Stränge mit den N-Termini der α -Helices verbinden, lokalisiert (Kobe und Deisenhofer, 1995). Nach der Bindung des RNH1 an RNasen entstehen so nicht-kovalente Komplexe, die Dissoziationskonstanten im femtomolaren Bereich aufweisen (Kobe und Deisenhofer, 1996). Mittels dreidimensionaler Strukturanalyse von freiem und komplexiertem RNH1 erfolgte die genaue Beschreibung der RNH1-RNase-Interaktion (Rutkoski und Raines, 2008; Kobe und Deisenhofer, 1993; Johnson et al., 2007). Aus den Ergebnissen dieser Analysen ließ sich schlussfolgern, dass beide Proteine mit einer Stöchiometrie von 1:1 binden, wobei etwa ein Drittel der RNase inklusive des aktiven Zentrums in die hufeisenförmige Struktur des RNH1 gelangt (Rutkoski und Raines, 2008; Gaur et al., 2001) (Abbildung 2).

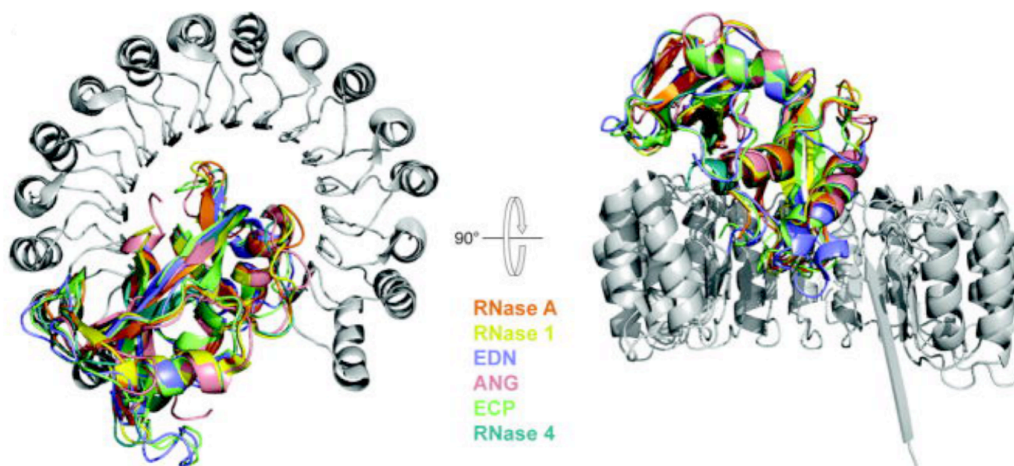


Abbildung 2: Dreidimensionale Struktur des humanen Ribonuklease Inhibitors im Komplex mit verschiedenen Ribonukleasen

Dargestellt ist eine auf Röntgenstrukturanalysen basierende, überlagernde Darstellung der Interaktion von humanem RNH1 (Faille et al., 2012) mit der bovinen RNase A (orange) sowie der humanen RNase 1 (gelb), RNase 2 (EDN, blau), RNase 3 (ECP, grün), RNase 4 (türkis) und RNase 5 (ANG, rosa) (Rutkoski und Raines, 2008).

Die hemmende Wirkung des RNH1 auf die RNasen kann durch Proteasen oder Hitze aufgehoben sowie von pH-Veränderungen beeinflusst werden (Roth, 1962). Ferner ist seine Bindungsaffinität zu RNasen stark vom Redoxpotential der Zelle abhängig, da RNH1 am N- und C-Terminus mehrere Cysteinreste besitzt, die für eine maximale Aktivität des RNH1 in ihrer Gesamtheit in reduzierter Form vorliegen müssen (Fominaya und Hofsteenge, 1992). Sobald einige Cysteinreste oxidiert werden, kommt es zu einer schnellen Konformationsänderung und Denaturierung vom RNH1 (Ferrerias et al., 1995).

1.1.2 Physiologische Rolle des Ribonuklease Inhibitors

Bislang wurde die physiologische Rolle des RNH1 sowohl intra- als auch extrazellulär nicht eindeutig definiert. Aufgrund seiner Funktion als intrazelluläres Schutzmolekül vor in die Zelle aufgenommenen exogenen RNasen, die einen Abbau zytosolischer RNA bewirken könnten, wurde RNH1 zunächst als *molecular sentry* bezeichnet (Haigis et al., 2003). Diese Hypothese stützt sich auf folgende Befunde: Körperfremde RNasen, wie Rinder-Samen-RNase (D'Alessio et al., 1991) oder Onkonase (Turcotte und Raines, 2008), die durch RNH1 nicht gehemmt werden, wirken zytotoxisch. Nach der Mutagenese von nicht-zytotoxischen RNasen werden diese aufgrund der molekularen Änderungen zu RNH1-resistenten, zytotoxischen RNasen sobald sie in die Zelle eindringen (Leland et al., 1998). Zellen, die RNH1 überexprimieren, werden widerstandsfähiger gegenüber der Zytotoxizität von RNasen (Haigis et al., 2003; Leland et al., 1998; Haigis et al., 2002b). Im Gegensatz zur *sentry*-Hypothese gibt es aber auch Befunde, die zeigen, dass Zellen, in denen eine *small interfering* RNA (siRNA) bedingte Herunterregulation des RNH1 erfolgte, nicht für nicht-zytotoxische RNasen anfällig werden (Monti und D'Alessio, 2004). Weiterhin wurden zytotoxische RNasen beschrieben (Matousek et al., 2003), die mit hoher Affinität an RNH1 binden (Naddeo et al., 2005).

Neben der Schutzfunktion übt RNH1 noch eine regulatorische Funktion aus, indem er die Aktivität von RNasen mit bestimmten intrazellulären Funktionen fördert oder unterdrückt. Es wurde gezeigt, dass RNH1 sowohl die intrazelluläre Lokalisierung als auch die Aktivität von Angiogenin kontrolliert, welches unter Wachstumsbedingungen im Kern lokalisiert ist, wo es nicht mit dem RNH1 assoziiert und dadurch die Transkription ribosomaler RNAs (rRNAs) induzieren kann, während das zytoplasmatische Angiogenin mit RNH1 komplexiert und von ihm inaktiviert wird, sodass der Abbau zellulärer RNA verhindert wird (Pizzo et al., 2013).

Zudem übt RNH1 antiangiogene und im weiteren Sinne antitumorigene Funktionen aus, die entweder auf der Inhibierung der starken angiogenen Wirkung des basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktors (*basic fibroblast growth factor*, b-FGF) (Polakowski et al., 1993) oder auf der Hemmung der Angiogenin-induzierten Angiogenese beruhen (Shapiro und Vallee, 1987). Angiogenese, die Bildung neuer Blutgefäße aus dem bestehenden Gefäßsystem, spielt eine entscheidende Rolle im Tumorwachstum und der

-metastasierung (Folkman, 1985; Paweletz und Knierim, 1989; Blood und Zetter, 1990). Aufgrund der starken Komplexbildung mit Angiogenin und dessen Inaktivierung verhindert RNH1 angiogene Prozesse, wodurch auch die Tumorproliferation eingeschränkt wird (Shapiro und Vallee, 1987; Polakowski et al., 1993). Extrazellulär zugegebener RNH1 blockierte die Translokation des Angiogenins in den Zellkern von Tumorzellen, sodass die biologischen Funktionen des Angiogenins unterdrückt und der antiproliferative Effekt des RNH1 verstärkt wurde (Peng et al., 2014). Während RNH1 auch im Tumor-Mausmodell das Tumorwachstum aufgrund seiner antiangiogenen Aktivitäten verminderte (Polakowski et al., 1993), förderte umgekehrt ein *Knockdown* des RNH1 die Proliferation und Metastasierung von Tumorzellen (Chen et al., 2011) sowie die Epithel-Mesenchym Transition (EMT) (Xiong et al., 2014). Schließlich wurde RNH1 wegen des Nachweises von erhöhten Konzentrationen von IgG-Autoantikörpern gegen RNH1 im Plasma von Gallengangskarzinom-Patienten als potentieller Biomarker für bestimmte Tumore vorgeschlagen (Rucksaken et al., 2014).

Hohe Konzentrationen an RNH1 wurden auch in Erythrozyten nachgewiesen, die selbst keine RNase oder RNA enthalten, so dass postuliert wurde, dass RNH1 eine Rolle bei metabolischen und Alterungsprozessen spielt (Moenner et al., 1998). Da eine Aktivitätsabnahme des RNH1 mit mehreren Krankheiten, wie Katarakt (Cavalli L, 1979), Leukämie (Kraft und Shortman, 1970) oder Strahlenexposition (Kraft et al., 1969) assoziiert wurde, könnte RNH1 auch in kernhaltigen Zellen die zelluläre Lebensdauer oder Alterung beeinflussen.

Weiterhin ist RNH1 an der Regulation der intrazellulären Redox-Homöostase beteiligt, da er eine wichtige physiologische Rolle beim Schutz der Zelle gegen oxidativen Stress spielt (Monti et al., 2007). In Übereinstimmung mit diesen Befunden wurde RNH1 auch in Mitochondrien detektiert und als *ROS (Reactive Oxygen Species)-Scavenger* beschrieben (Furia et al., 2011). Die oxidative Inaktivierung der Sulfhydryl-Gruppen des RNH1 führte zu dessen Aktivitätsverlust und intrazellulärem Abbau durch Proteasen (Blazquez et al., 1996), wodurch Zellen, die RNH1 überexprimierten, eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid zeigten (Cui et al., 2003).

Im Gegensatz zu dieser Hypothese gibt es jedoch aktuelle Befunde, laut denen Zellen, in denen ein effektiver RNH1-*Knockout* mittels CRISPR-Cas9 auf genomischer Ebene durchgeführt wurde, und Wildtypzellen für Oxidationsmittel gleichermaßen anfällig sind. Daraus lässt sich schlußfolgern, dass RNH1 den Zellen keinen Schutz vor oxidativem Stress bietet. Ferner unterstützt diese Studie die *sentry*-Hypothese, da die RNH1-*Knockout*-Zellen sensitiver als die Wildtypzellen gegenüber RNase 1 waren, was auf eine Regulation der RNase 1-Toxizität mittels Hemmung ihrer ribonukleolytischen Aktivität durch RNH1 hindeutet (Thomas et al., 2016). Diese Tatsache in Kombination mit der hohen Anfälligkeit des RNH1 für Oxidation, die seine Bindung an RNasen hemmt (Fominaya und Hofsteenge, 1992; Blazquez et al., 1996; Kim et al., 1999), wird eine weitere physiologische Rolle des RNH1 als hochempfindlicher Auslöser für die Entfesselung tödlicher ribonukleolytischer Aktivität als Reaktion auf oxidativen Stress vorgeschlagen, der ansonsten vererbare genomische Schäden verursachen würde (Thomas et al., 2016).

1.2 Ribonukleasen

Der RNH1 kontrolliert die Aktivität der humanen Ribonukleasen (RNasen), indem er mit diesen stabile, nicht-kovalente Komplexe bildet. RNH1-bindende RNasen gehören zur Klasse der RNase A-Superfamilie. Nur acht der dreizehn bekannten extrazellulären humanen RNasen sind ribonukleolytisch aktiv (Sorrentino, 2010). Die Gene dieser Proteinfamilie sind auf Chromosom 14q11.2 in einem Cluster von 368kb organisiert (Cho et al., 2005), und die exprimierten Enzyme weisen eine Sequenzhomologie von 30-80% auf (Pai et al., 2006) (Abbildungen 3,4).

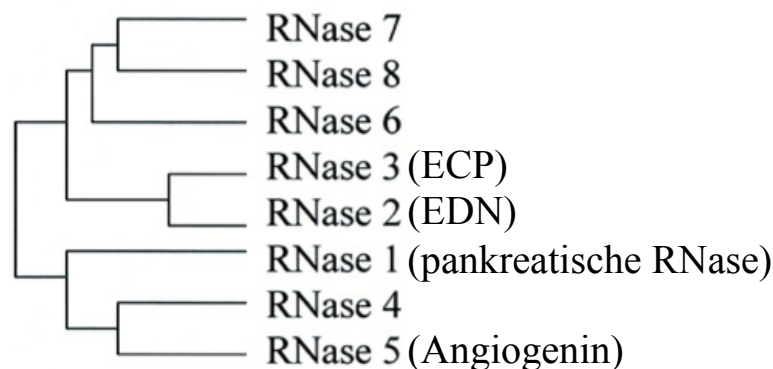


Abbildung 3: Phylogenetische Unterteilung der Ribonuklease A-Superfamilie

Dargestellt ist die phylogenetische Unterteilung der acht ribonukleolytisch aktiven RNasen, verändert nach (Zhang et al., 2003).


```

RNase 1      KESRAKKFQRQHMSDSSPSSSSTYCNQMMRRRNMTQGRCKPV
RNase 2      KPPQFTWAQWFETQHINMTSQ-----CTNAMQVINNYQRRCKNQ
RNase 3      RPPQFTRAQWFAIQHISLNPPR-----CTIAMRAINNYRWRCKNQ
RNase 4      ---QDGMYQRFRLQHVHPEETGG-SDRYCNLMMQRRKMTLYHCKRF
RNase 5      --QDNSRYTHFLTQHYDAKPOGR-DDRYCESIMRRRGLTSP-CKDI
RNase 6      WPKRLTKAHWFEIQHIQPSPLQ-----CNRAMSGINNYTQHCKHQ
RNase 7     KPKGMTSSQWFKIQHMQPSPOA-----CNSAMKNINKHTKRCKDL
RNase 8      KPKDMTSSQWFKTQHVQPSPOA-----CNSAMSIINKYTERCKDL

RNase 1      NTFVHEPLVDVQNVCFQEKVTCCKNGQG--NCYKSNSMHIIDCRLTNGS
RNase 2      NTFLLTTFANVVVCGNPNMTCPSNKTRKNCHHSGSQVPLIHCNLTTPS
RNase 3      NTFLRRTFANVVVCGNQSIKCPHNRTLNNCHRSFRVPLLHCDLINPG
RNase 4      NTFIHEDIWNIRSICSTTNIQCKNGKM--NCHEGV--VKVTD CRTDGSS
RNase 5      NTFIHGNKRSIKAICENKNG--NPHRE-NLRISKSSFQVTTCKLHGGS
RNase 6      NTFLHDSFQNVARVCDLLSIVCKNRRH--NCHQSSKPVNMTDCRLT-SG
RNase 7     NTFLHEPFSSVAATCQTPKIACKNGDK--NCHQSHGFPVSLTMCKLT-SG
RNase 8      NTFLHEPFSSVAITCQTPNIACKNSCK--NCHQSHGPMSLTMGELT-SG

RNase 1      R--YPNCAYRTSPKERHIVACEGS-----PYVPVHFDASVEDST
RNase 2      PQNISNCRYAQT PANMFYIVACDNRDQRRDPPQYVPVHLDRII----
RNase 3      AQNISNCRYADRPGRRFYVACDNRD-PRDSPRYPVVHLDTTI----
RNase 4      R--APNCRYRAIASTRRVVIACEGN-----PQVPVHFDG-----
RNase 5      P--WPPCQYRATAGFRNVVACENG-----LPVHLDQSIFRRP
RNase 6      K--YPQCRYSAQAQYKFFIVACDPPQ-KSDPP-YKLVPVHLDLIL----
RNase 7     K--YPNCRYKEKRNKSYVACKPPQ-KKDSQQFHLVPVHLDLRLV----
RNase 8      K--YPNCRYKEKHLNTPYIVACDPPQ-QGDGP-YPLVPVHLDKVV----

```

Abbildung 4: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Ribonuklease A-Superfamilienmitglieder
Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der acht ribonukleolytisch aktiven RNasen. Konservierte Aminosäuren sind fett gedruckt (Harder und Schroder, 2002).

Diese in verschiedenen Organen und Geweben exprimierten Proteine unterliegen posttranslationaler Glykosylierung, so dass verschiedene Varianten eines einzigen Genprodukts in unterschiedlichen Zelltypen entstehen können. Alle bekannten Mitglieder dieser Superfamilie sind extrazelluläre Proteine, die ein entsprechendes hydrophobes Signalpeptid besitzen, das deren Translation ins endoplasmatische Reticulum (ER) dirigiert. Ihre Tertiärstruktur wird durch drei bis vier Disulfidbrücken, bestehend aus sechs bis acht Cysteinresten, stabilisiert. Das aktive Zentrum der katalytisch aktiven RNasen wird durch einen Lysin- und zwei Histidinreste gebildet (Sorrentino, 2010). Die Molmasse der einzelnen Enzyme beträgt 14-17 kDa im unglykosylierten Zustand (Zhang et al., 2003).

Außer ihrer zytotoxischen Funktion, die durch die Hydrolyse von intrazellulären RNAs vermittelt werden kann, wurden RNasen mittlerweile noch weitere Eigenschaften, wie neurotoxische (Gleich et al., 1986), angiogene (Fett et al., 1985), antibakterielle (Harder und Schroder, 2002) und antivirale (Rugeles et al., 2003) Wirkungen, zugeordnet

(Sorrentino, 2010). Im Folgenden werden die einzelnen Mitglieder der RNase A-Superfamilie und ihre Funktionen genauer vorgestellt.

RNase 1:

Humane RNase 1 (Abbildung 5), auch als humane pankreatische RNase (HPR) bekannt, gehört zu den RNH1-bindenden Proteinen, welche durch die Komplexbildung mit RNH1 effektiv inaktiviert wird und somit, auch in hohen extrazellulären Dosen, nicht zytotoxisch wirken kann (Fischer et al., 2011). Sie wird in den Azinuszellen des exokrinen Pankreas gebildet und ihre bislang bekannteste Funktion ist der Abbau der mit der Nahrung aufgenommenen oder in Bakterien enthaltenen RNA im Magen-Darm Trakt (Barnard, 1969; Beintema, 1998). Ihre Molmasse, die je nach Glykosylierung 17-26 kDa beträgt, ergibt sich hauptsächlich durch ihre aus 128 Resten bestehende Aminosäuresequenz inklusive einem 28 Aminosäuren umfassenden Signalpeptid (Beintema et al., 1984; Seno et al., 1994). Sie verfügt über drei potentielle N-Glykosylierungsstellen (Asn-Xaa-Thr/Ser) an Asparagin-34, Asparagin-76 und Asparagin-88 (Beintema et al., 1988a). Zusätzlich weist RNase 1 eine 70%-ige Sequenzhomologie zur bovinen RNase A auf, dem am besten charakterisierten Mitglied dieser Superfamilie (Beintema et al., 1984).

Neben der Biosynthese im exokrinen Pankreas, wird RNase 1 auch in anderen Geweben wie Testis, Ovarien und Gehirn exprimiert (Futami et al., 1997; Sasso et al., 1999) und zirkuliert als endokrines Enzym mit einer Konzentration von 300-400 µg/l im Plasma (Fischer et al., 2011; Weickmann et al., 1984). Neuere Studien der Gießener Arbeitsgruppe zeigten, dass das Gefäßendothel die Hauptquelle dieser zirkulierenden RNase 1 darstellt (Fischer et al., 2011; Landré et al., 2002; Moenner et al., 1997; Ohashi et al., 2017). Die stärkste konstitutive Expression und Freisetzung von RNase 1 findet sich in makrovaskulären, aus der Nabelschnurvene isolierten Endothelzellen, während nur eine geringe Expression im mikrovaskulären Endothel vorliegt. Weiterhin wird RNase 1 zusammen mit von-Willebrand-Faktor (vWF), P-Selektin und anderen für Entzündungsreaktionen relevanten Proteinen in den Endothelzell-spezifischen Weibel-Palade-Granula gespeichert, deren schnelle Degranulierung nach Stimulierung dieser Gefäßwandzellen einsetzt (Fischer et al., 2011). RNase 1 ist das einzige Mitglied der humanen RNase A-Superfamilie, das eine starke Affinität zu doppelsträngiger RNA sowie doppelsträngigen DNA-RNA-Hybriden zeigt (Libonati und Sorrentino, 2001;

Sorrentino und Libonati, 1994). Diese Wechselwirkung wird durch eine strukturelle Anpassung des aktiven Zentrums durch sechs positiv geladene, um das aktive Zentrum angeordnete Aminosäurereste, begünstigt (Libonati und Sorrentino, 2001; Sorrentino et al., 2003). Außerdem wird die Flexibilität des aktiven Zentrums durch Glycin-38 erhöht, so dass doppelsträngige RNA leichter gespaltet werden kann (Gaur et al., 2002). Die Affinität von RNase 1 gegenüber einzelsträngiger RNA ist signifikant niedriger (Libonati und Sorrentino, 2001; Sorrentino und Libonati, 1994).

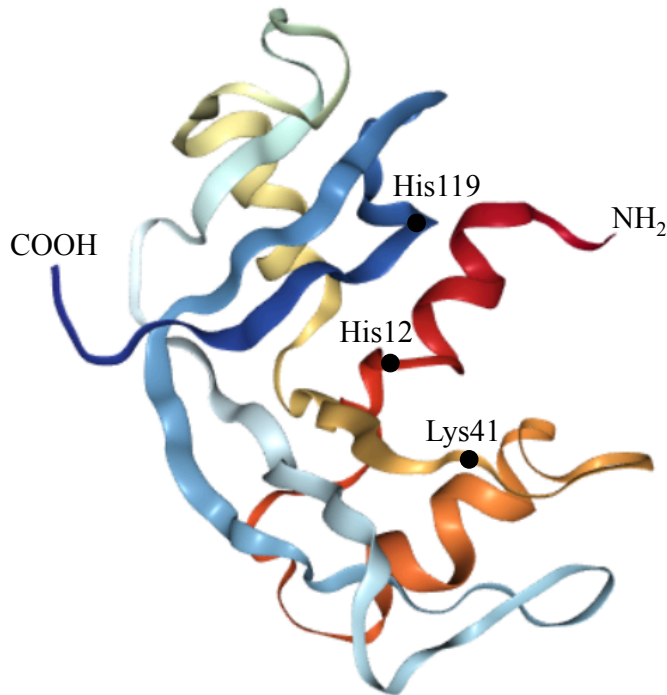


Abbildung 5: Dreidimensionale Struktur der humanen Ribonuklease 1

Dargestellt ist die auf NMR-Studien basierende, dreidimensionale, bohnenförmige Struktur der humanen RNase 1, bestehend aus drei α -Helices und sieben β -Faltblättern (Kövéér et al., 2008). Das aktive Zentrum wird gebildet durch die Aminosäuren Histidin-12, Lysin-41 und Histidin-119. Die Abbildung wurde mit Hilfe der PDB-Datenbank (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2K11>) erstellt.

RNase 2 und RNase 3:

RNase 2 (*Eosinophil-derived Neurotoxin*, EDN) (Hamann et al., 1989) und RNase 3 (*Eosinophil cationic Protein*, ECP) (Barker et al., 1989) sind zwei herausstechende sekretorische Proteine humaner eosinophiler Granulozyten. Sie weisen neurotoxische und antivirale Eigenschaften auf, wobei RNase 3 zusätzlich antibakteriell wirkt (Rugeles et al., 2003; Domachowske et al., 1998b; Domachowske et al., 1998a). Während RNase 3 ausschließlich in Eosinophilen exprimiert wird, wurde RNase 2 auch in Milz (Yasuda et al., 1990), Leber (Sorrentino et al., 1988; Sorrentino et al., 1992), Niere (Mizuta et al., 1990), Plazenta (Shapiro und Vallee, 1991) und Urin (Beintema et al., 1988b) nachgewiesen. Beide RNasen hydrolysieren vorzugsweise Polyribo-

uracylsäure (poly:U) und Hefe-RNA, sind aber gegenüber poly:A und doppelsträngiger RNA inert (Sorrentino, 2010; Sorrentino und Glitz, 1991).

RNase 4:

RNase 4 besitzt mit 119 Resten die kürzeste und am nächsten eine evolutionär konservierte Aminosäuresequenz zwischen verschiedenen Säugetierspezies (Zhou und Strydom, 1993). Sie wurde erstmals aus dem Überstand einer Kolonkarzinoma-Zelllinie isoliert (Shapiro et al., 1986a), und ihre biologische Funktion ist noch nicht aufgeklärt (Sorrentino, 2010). Ihre Expression in Leber, Lunge, Niere, Pankreas und Plazenta erfolgte bislang nur auf mRNA-Ebene (Rosenberg und Dyer, 1995). Bezüglich ihrer ribonukleolytischen Eigenschaften spaltet RNase 4 bevorzugt poly:U und hydrolysiert 2'-3'-zyklische Nukleotide (Shapiro et al., 1986a).

RNase 5:

RNase 5 (Abbildung 6), auch als Angiogenin bezeichnet, ist ein 14 kDa großes Protein, das in humanem Plasma in einer Konzentration von 250-360 µg/l nachgewiesen wurde (Strydom, 1998; Fett et al., 1985), bedingt durch seine Expression und Freisetzung durch Endothelzellen (Fischer et al., 2011). Trotz einer 65%-igen Homologie zu RNase 1 weist Angiogenin eine mehr als 10⁶-fach niedrigere ribonukleolytische Aktivität auf (Shapiro et al., 1986b), da seine Substrat- (RNA-) Bindungsstelle durch eine Seitenkette von Glutamin-117 sterisch blockiert ist (Sorrentino, 2010; Russo et al., 1994). Trotzdem spielt diese niedrige enzymatische Aktivität eine essentielle Rolle für die proliferative Wirkung von Angiogenin (Strydom, 1998). Wie der Name vermuten lässt, ist Angiogenin einer der potentesten bekannten angiogenen Faktoren *in vivo* und induziert somit die Gefäßneubildung (Strydom, 1998). Nach der Bindung von Angiogenin an seinen Endothelzellrezeptor wird der Angiogenin-Rezeptorkomplex endozytotisch aufgenommen und in den Nukleus transportiert (Moroianu und Riordan, 1994; Hu et al., 1997). Dort akkumuliert Angiogenin im Nukleolus und bindet an DNA, wodurch verschiedene Signaltransduktionskaskaden ausgelöst werden (Bicknell und Vallee, 1988; Liu et al., 2001), die das Wachstum von Endothelzellen induzieren (Fett et al., 1985). Andererseits wird Angiogenin auch unter inflammatorischen Bedingungen besonders stark exprimiert (LiotÉ et al., 2003). Des Weiteren sind Tumorzellen, deren Wachstum eine erhöhte Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr verlangt, mit einer gesteigerten Angiogenese und somit einer erhöhten Angiogenin-Expression sowie -Freisetzung

verbunden (Tello-Montoliu et al., 2006). Studien anderer Autoren konnten eine Korrelation zwischen erhöhter Angiogenin-Expression und Tumorproliferation bei verschiedenen Krebsarten zeigen (Shimoyama et al., 1996; Shimoyama et al., 1999; Miyake et al., 1999; Eppenberger et al., 1998; Chopra et al., 1996; Ugurel et al., 2001). Mittlerweile dienen erhöhte Plasmaspiegel von Angiogenin als Prognosefaktor für bestimmte Tumorarten wie z.B. das Magencarcinom. Die signifikant erhöhte Angiogenin-Konzentration bei Magenkrebspatienten, die nach der Tumorentfernung wieder auf Normalwerte sinkt, scheint für die Tumoraggression und Überlebenswahrscheinlichkeit eine entscheidende Rolle zu spielen (Shimoyama und Kaminishi, 2003). Aufgrund der Bindung von RNH1 an RNase 5 und ihrer Inaktivierung ist der RNH1 an der Regulation von angiogenen Prozessen beteiligt. In diesem Zusammenhang war für die vorliegende Arbeit die Charakterisierung der intra- und möglichen extrazellulären vaskulären Funktionen des RNH1 unter Beteiligung von Angiogenin von Interesse.

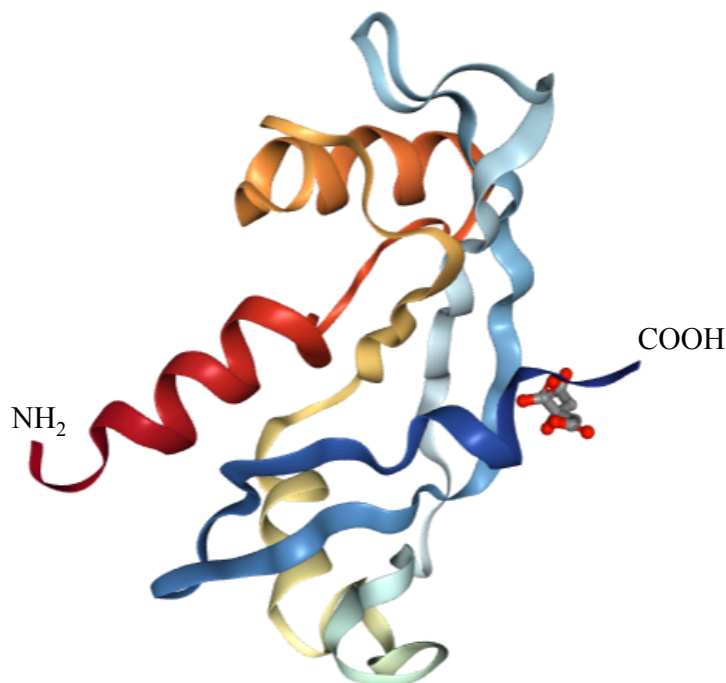


Abbildung 6: Dreidimensionale Struktur der humanen Ribonuklease 5

Dargestellt ist die auf NMR-Studien basierende, dreidimensionale Struktur der humanen RNase 5, bestehend aus drei α -Helices und sieben β -Faltblättern (Allen et al., 1994). Die Abbildung wurde mit Hilfe der PDB-Datenbank (<http://www.rcsb.org/pdb/ngl/ngl.do?pdbid=2ANG&bionumber=1>) erstellt.

RNase 6:

Ein einziges mRNA-Transkript von RNase 6 konnte in verschiedenen Organen wie Lunge, Herz, Gehirn, Leber, Pankreas und Plazenta detektiert werden. Über ihre Substratpräferenz liegen noch keine Daten vor. Obwohl dem Protein bislang noch keine

physiologische Funktion zugeschrieben werden kann, wird wegen des Nachweises seiner mRNA-Expression in Neutrophilen und Monozyten eine Rolle der RNase bei der Immunabwehr vermutet (Sorrentino, 2010; Rosenberg und Dyer, 1996).

RNase 7:

RNase 7 wird in menschlichen Epithelien, hauptsächlich in der Haut, aber auch im Respirations- und Urogenitaltrakt gebildet. Außerdem gelang der Nachweis ihrer mRNA in Leber, Niere, Skelettmuskulatur und Herz (Harder und Schroder, 2002; Zhang et al., 2003). Ihre Expression und Freisetzung durch Keratinozyten wird durch Interleukine, Interferone und Bakterien provoziert (Sorrentino, 2010; Harder und Schroder, 2002; Zhang et al., 2003). Die einzige bekannte katalytische Eigenschaft von RNase 7 steht im Zusammenhang mit dem Verdau von Hefe-*transfer* RNA (tRNA) (Zhang et al., 2003). Wegen der Anlage, Bakterienmembranen zu permeabilisieren, wurde der RNase 7 eine antimikrobielle Wirkung zugeschrieben (Huang et al., 2007). Da die antimikrobiellen Aktivitäten von RNase 7 durch ihre Bindung an RNH1 völlig gehemmt werden, könnte der RNH1 auch eine immunmodulatorische Funktion besitzen (Spencer et al., 2014).

RNase 8:

RNase 8, die eine 78%-ige Sequenzhomologie zu RNase 7 aufweist, wird nur in der Plazenta gebildet. Sie besitzt eine antimikrobielle Wirkung gegen verschiedene klinisch relevante Mikroorganismen. Indem sie die Plazenta vor Infektionen durch verschiedene grampositive und -negative pathogene Mikroorganismen schützt, könnte sie protektiv während der fetalen Entwicklung wirken. Wie RNase 7 kann RNase 8 ebenfalls Hefe-tRNA spalten (Zhang et al., 2003; Zhang et al., 2002; Rudolph et al., 2006).

RNasen 9-11:

Über diese ribonukleolytisch inaktiven Mitglieder der RNase A-Superfamilie gibt es bislang nur wenige Angaben. Da die RNasen 9-11 spezifisch in den männlichen Fortpflanzungsorganen exprimiert werden, lässt sich vermuten, dass sie an reproduktiven Vorgängen beteiligt sein könnten. Bislang liegen keine genauen Studien diesbezüglich vor (Sorrentino, 2010; Cho et al., 2005).

1.3 Extrazelluläre RNA

Da extrazelluläre RNA (eRNA) das Substrat der in dieser Arbeit untersuchten Interaktionspartner des RNH1 (RNase 1 und 5) darstellt, werden an dieser Stelle die relevanten Erkenntnisse zur eRNA vorgestellt. Die Freisetzung von eRNA ins Blut (-Plasma) erfolgt unter Zellstress oder pathologischen Bedingungen, wie Hypoxie, Zellschädigung, Gefäßverletzung oder bei gesteigertem Zellumsatz im Rahmen von Tumorerkrankungen. Ihr wurde eine prokoagulatorische Wirkung zugeschrieben, da sie durch die Aktivierung von *Factor VII-Activating Protease* (FSAP) eine essentielle Kofaktorfunktion bei der Blutgerinnung ausübt (Nakazawa et al., 2005). *In vitro*- und *in vivo*-Versuche unserer Gruppe zeigten, dass eRNA durch Aktivierung der Gerinnungsfaktoren XI und XII die intrinsische Gerinnungskaskade verstärkt, so dass z.B. bei Gewebstrauma lebensbedrohliche Blutungen oder die Invasion von Mikroorganismen verhindert aber auch zusätzliche pathologische Thrombose beobachtet wird (Kannemeier et al., 2007).

Des Weiteren stellt eRNA einen wichtigen Kofaktor von *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) bei der endothelialen Permeabilitätserhöhung dar. Eine bedeutende Rolle bei dieser mittels eRNA-induzierter Permeabilitätsveränderung scheint die Mobilisierung von VEGF und Aktivierung von VEGF-Rezeptor 2 zu spielen. *In vivo*-Versuche unserer Gruppe zeigten eine Korrelation zwischen der Entstehung von zerebralem Schlaganfall, Ödem- und Thrombusbildung und einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke. Die Gefäßverschlüsse, Infarktgröße und Ödembildung in einem Eisenchlorid-induzierten Tiermodell des Verschlusses des *Sinus sagittalis superior* wurden durch Vorbehandlung der Ratten mit RNase 1 vermindert. Permeabilitätsversuche *in vitro* bestätigten diese Beobachtungen, da sowohl natürliche eRNA als auch künstlich synthetisierte RNA in doppelsträngiger (poly I:C) oder einzelsträngiger Form eine signifikante Erhöhung der Permeabilität von mikrovaskulären Gehirnendothelzellen in VEGF-abhängiger Weise bewirkten und in einer Lockerung der engen Zellverbindungen (*tight junctions*) resultierten (Fischer et al., 2007).

Neben den prokoagulatorischen und permeabilitätserhöhenden Wirkungen (Fischer et al., 2014; Fischer et al., 2007; Kannemeier et al., 2007; Nakazawa et al., 2005;

Simsekyilmaz et al., 2014) besitzt körpereigene eRNA *in vivo* und *in vitro* inflammatorische Eigenschaften, indem sie neben der Gefäßpermeabilität (Fischer et al., 2007; Fischer et al., 2009) auch die Adhäsion und Transmigration von Leukozyten erhöht (Fischer et al., 2012; Preissner et al., 2020). Die Behandlung von Monozyten mit eRNA induzierte die Freisetzung von TNF α in zeit- und konzentrationsabhängiger Weise, was die Vermutung nahelegte, dass eRNA nicht nur direkt sondern auch indirekt über eine *Sheddase*-abhängige TNF α -Mobilisierung (proteolytische Spaltung) zur Leukozytenadhäsion beiträgt. TNF α wird als inaktives, transmembranäres Pro-TNF α synthetisiert, das mittels limitierter Proteolyse (*Shedding*) durch Membran-assoziierten TNF α -Converting Enzyme (TACE oder ADAM17) in seiner bioaktiven 52 kDa homotrimeren Form freigesetzt wird (Black et al., 1997) (Abbildung 7).

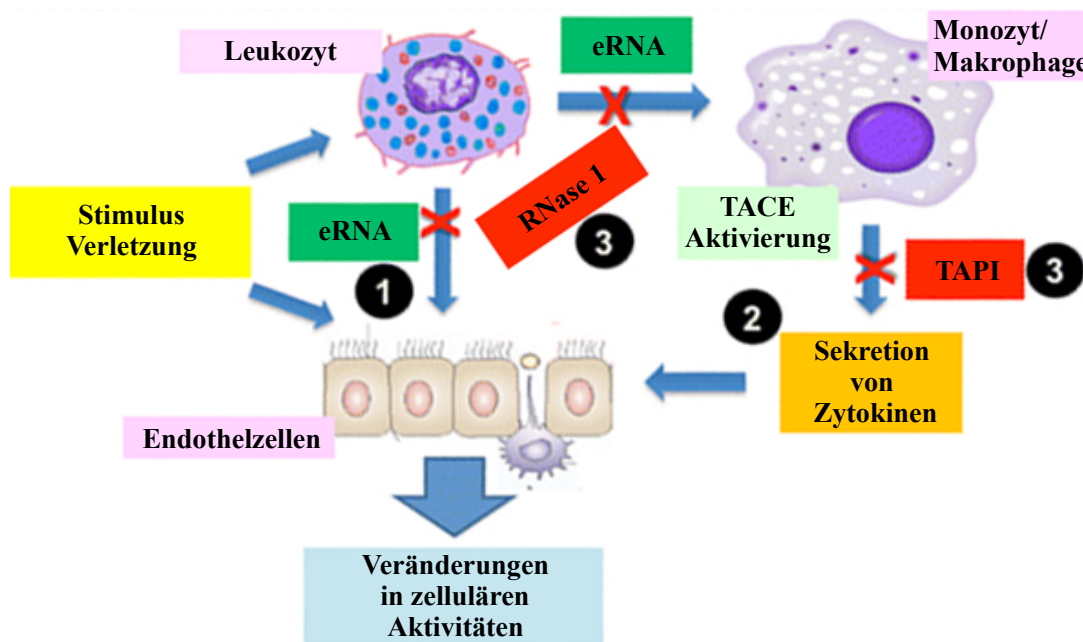


Abbildung 7: Vorgeschlagene Mechanismen für die Freisetzung und Funktion der extrazellulären RNA in der zytokinvermittelten inflammatorischen Aktivität

Nach der Freisetzung von eRNA, die durch exogene oder endogene Stimuli oder auch im Rahmen von Verletzungen und Traumata induziert wird, kann eigene eRNA direkt oder indirekt (mittels VEGF oder anderer aus Leukozyten sezernierten Faktoren) eine Permeabilitätserhöhung beim Gefäßendothelium provozieren und dadurch die endotheliale Barrierefunktion und die Leukozytenadhäsion beeinflussen (1). Alternativ fördert eRNA die Freisetzung von TNF α und anderer Zytokine (insbesondere durch die TACE-Aktivierung in Monozyten/Makrophagen), was ebenfalls in Änderungen der inflammatorischen Aktivitäten resultiert (2). Die Aktivitäten von eRNA werden von RNase 1 antagonisiert, wohingegen die TACE-Aktivierung durch den Inhibitor TAPI blockiert wird (3), verändert nach (Fischer et al., 2014).

Aus den Forschungsergebnissen unserer Gruppe können für eRNA auch essentielle Wirkungen für die Tumorprogression abgeleitet werden. Aus Tumorzellen freigesetzte eRNA hat die Fähigkeit, die Tumorzellinvasion durch endotheliale Barrieren mittels

verschiedener Reaktionen, inklusive eines TNF α -abhängigen Mechanismus, zu fördern. Die Verabreichung von RNase 1 in experimentellen Tumormodellen *in vivo* führte zu einer signifikanten Reduktion des Tumolvolumens bzw. -gewichtes (Fischer et al., 2013).

Die genannten eRNA-induzierten Prozesse können durch die Gabe von exogener RNase 1 kontrolliert bzw. inhibiert werden. Da proinflammatorische Substanzen wie Thrombin, VEGF aber auch eRNA selbst die Freisetzung von RNase 1 aus den endothelialen Weibel-Palade-Granula fördern (Fischer et al., 2011), kommt es zu einer temporär und lokal erhöhten RNase 1-Aktivität, die prokoagulatorische, permeabilitätssteigernde und inflammatorische Wirkungen von eRNA kompensieren kann.

Unsere Arbeitsgruppe lieferte weitere Hinweise auf mögliche therapeutische Anwendungen von RNase 1 durch eine Vielzahl von *in vivo*-Experimenten, in denen die Applikation von RNase 1 die schädigenden Funktionen der eRNA verhinderte oder hemmte, so dass RNase 1 auch antithrombotische, antiinflammatorische bzw. kardioprotektive sowie antitumorale Wirkungen ausüben kann (Fischer et al., 2011; Fischer et al., 2007; Kannemeier et al., 2007; Fischer et al., 2012; Fischer und Preissner, 2013; Walberer et al., 2009; Fischer et al., 2013). Somit stellt das eRNA/RNase1-System eine neue Komponente bei der Regulation der vaskulären Homöostase dar. Die Rolle des RNH1 in der Regulation der intra- und extrazellulären RNase 1-Expression und -Aktivität wurde bisher nicht definiert. Deswegen war für diese Arbeit die Expression von RNH1 im Vergleich zu der Expression von RNase 1 unter pathologischen Bedingungen von Bedeutung.

Darüber hinaus wurden erhöhte Konzentrationen von spezifischen RNAs bzw. RNA-Proteolipid-Komplexen im Plasma von Krebspatienten nachgewiesen, welche als Diagnosemarker verwendet werden können (Wieczorek et al., 1985; Kopreski et al., 1999; Chen et al., 2000; Garcia-Olmo et al., 2004). Zusätzlich gelang die Identifizierung fötusspezifischer RNA im mütterlichen Plasma (Chan et al., 2003). Die klinische Relevanz dieser Entdeckungen ist groß, da hiermit nicht-invasive Nachweistests von Plasma-RNA etabliert und in Bereichen wie Tumordiagnostik, -monitoring und -prognostik, Pränataldiagnostik, Transplantationsmedizin und

Traumatologie verwendet werden könnten (Chan et al., 2003; Anker et al., 2001; Johnson und Lo, 2002; Anker und Stroun, 2002; Tsui et al., 2002).

1.4 Zelluläre Mikrovesikel

Bisher wurde RNH1 nur als zytosolisches Protein beschrieben, da er weder in Plasmaproben nachgewiesen wurde noch eine Beschreibung von extrazellulären Wirkungen vorliegt (Futami et al., 1997; Nadano et al., 1994). Jedoch wurde schon in Studien unserer Gruppe gezeigt, dass der RNH1 nicht nur im Zytoplasma, sondern auch in Zellkulturüberständen von Endothelzellen nachweisbar ist (Gansler et al., 2014). Da das RNH1-Gen keine Signalsequenz enthält (Bond und Vallee, 1988), stellte sich die Frage, wie der RNH1 aus der Zelle ausgeschüttet wird. Ein möglicher Sekretionsweg wäre der Transport des RNH1 mittels Mikrovesikeln, der auch experimentell im weiteren Verlauf dieser Arbeit überprüft wurde.

1.4.1 Klassen sekretorischer Vesikel

Mikrovesikel (MV) müssen von Exosomen und apoptotischen Körpern hinsichtlich ihrer Biogenese und Zusammensetzung unterschieden werden und lassen sich hinsichtlich ihrer Größe, Ursprung, Aufbau und Freisetzungsmechanismen differenzieren (Tabelle 1).

Tabelle 1: Unterschiede zwischen Exosomen, Mikrovesikeln und apoptotischen Körpern
Verändert nach (Mause und Weber, 2010).

Kennzeichen	Exosomen	MV	Apopt. Körper
Größe	50-100 nm	100-1000 nm	bis 4000 nm
Sedimentation bei	100000 g	20000 g	16000 g
Ursprung	Multivesikulär, Zellkompartimente	Plasmamembran	Zelluläre Fragmente
Freisetzung	Konstitutive und / oder zelluläre Aktivierung	Zelluläre Aktivierung, frühe Apoptose	Terminale Apoptose
Annexin V- Bindungskapazität	Keine oder niedrige	Hohe	Hohe
Markerproteine	Tetraspan Protein CD63	Integrine, Selektine, andere Antigene der Ursprungszelle	Histone

1.4.2 Charakterisierung von Mikrovesikeln

MV stellen mit einem Durchmesser von 100 bis 1000 nm eine heterogene Gruppe von Vesikeln dar, die von einer Vielzahl eukaryotischer Zellen durch Abknospung der Plasmamembran freigesetzt werden und sowohl Membranbestandteile als auch zytoplasmatische Elemente der Ursprungszelle tragen. Durch die lokale Trennung von ihrer Ursprungszelle sind sie Bestandteil des interzellulären Kommunikationsnetzwerks (Mause und Weber, 2010; Armstrong et al., 1988; Bos-Vreugdenhil et al., 1985; Barry et al., 1997).

Sie wurden 1967 in humanem Plasma von Peter Wolf entdeckt. Er beschrieb sie als Membranfragmente, die von aktivierten Thrombozyten freigesetzt werden (Wolf, 1967). Als Aktivierungsauslöser der Thrombozyten dienen Thrombin, Kollagen oder mechanischer Stress (George et al., 1982). Die MV wirken prokoagulatorisch und inflammatorisch, da sie weitere Blutplättchen oder Endothelzellen aktivieren können (Barry et al., 1997). Diese Aktivierung wird durch in MV enthaltenen *Tissue Faktor* (TF) und Arachidonsäure vermittelt. Die Thrombozytenvesikel induzieren z.B. die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 in aktivierten Endothelzellen, was in einer verstärkten Adhäsion von Neutrophilen und Monozyten an die Gefäßwand resultiert (Barry et al., 1998).

Aufgrund ihrer prokoagulatorischen Wirkung, ihrer Beteiligung an inflammatorischen Prozessen sowie ihrer Fähigkeit, zelluläre Funktionen direkt zu beeinflussen, stehen MV in den letzten Jahren im Mittelpunkt vieler biomedizinischer Studien (Abbildung 8).

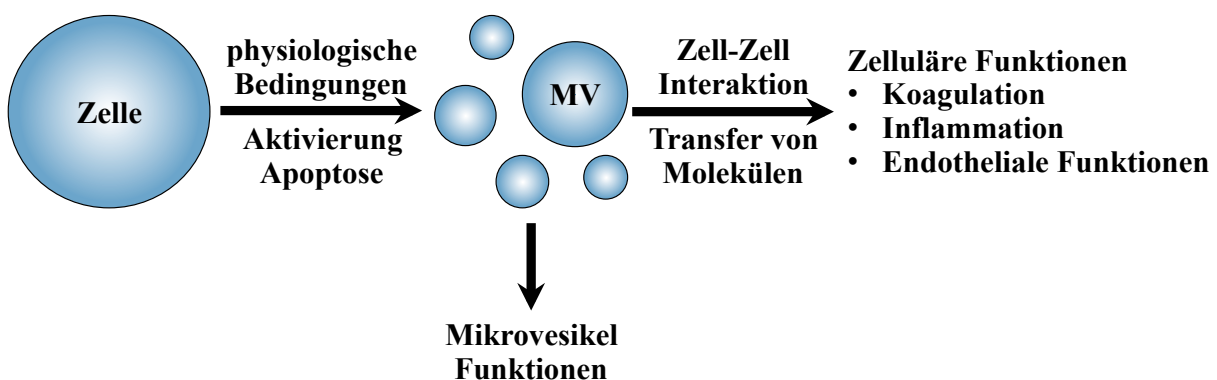


Abbildung 8: Bildung und funktionelle Eigenschaften von zellulären Mikrovesikeln
Verändert nach (Diamant et al., 2004).

Die im Blut vorkommenden MV stammen hauptsächlich aus Thrombozyten (George et al., 1982), während nur ein kleiner Anteil aus Erythrozyten, Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und Endothelzellen freigesetzt wird (Berckmans et al., 2001). Die MV-Fraktionen im Blutkreislauf gesunder Menschen (Berckmans et al., 2001; George et al., 1986) unterscheiden sich signifikant von denen, die im Plasma von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen, wie z.B. Atherosklerose, Sepsis, Diabetes mellitus, Bluthochdruck oder Nierenversagen detektiert werden (Diamant et al., 2002; Nieuwland et al., 2000; Mallat et al., 2000; Sabatier et al., 2002).

1.4.3 Aufbau der Mikrovesikel

Die MV-Freisetzung scheint ein gerichteter und kein zufällig ablaufender Prozess zu sein, da die MV-Bildung nur an bestimmten Stellen der Plasmamembran erfolgt. Die Anzahl sowie der Inhalt der MV ist abhängig von der Donorzelle (Armstrong et al., 1988).

MV präsentieren auf ihrer Oberfläche ein breites Spektrum an biologisch aktiven Substanzen und Rezeptoren (Morel et al., 2011). Dabei handelt es sich häufig um charakteristische Antigene, die hauptsächlich in der Membran der Ursprungszelle exprimiert werden. So sind beispielsweise auf MV, die von Thrombozyten freigesetzt werden, unter anderem Glykoprotein Ib, Adhäsionsmoleküle und Aktivierungsmarker wie P-Selektin zu finden. Ähnlich sind MV anderer Ausgangszellen aufgebaut. Erythrozyten-MV exprimieren Glykophorin A, Lymphozyten-MV CD4 und CD8 und aus Endothelzellen stammende MV exprimieren CD31, CD34, CD51, CD62E und CD146 (Berckmans et al., 2001; Joop et al., 2001; Abid Hussein et al., 2003). Trotzdem werden die charakteristischen Membranproteine einer Zelle bei der Abschnürung von MV nicht immer mitübertragen. Dadurch können MV endothelialen Ursprungs einen unterschiedlichen Phänotyp aufweisen, der nicht mehr dem der Endotheloberfläche entspricht (Abid Hussein et al., 2003).

Der Inhalt der MV setzt sich aus Zytokinen, Chemokinen, Enzymen, Wachstumsfaktoren, genetischem Material wie rRNA, *messenger* RNA (mRNA), mikroRNA (miRNA) und vielen weiteren Signalproteinen, die sich normalerweise im

Zellinneren befinden, zusammen (Mause und Weber, 2010; McVey et al., 2012) (Abbildung 9).

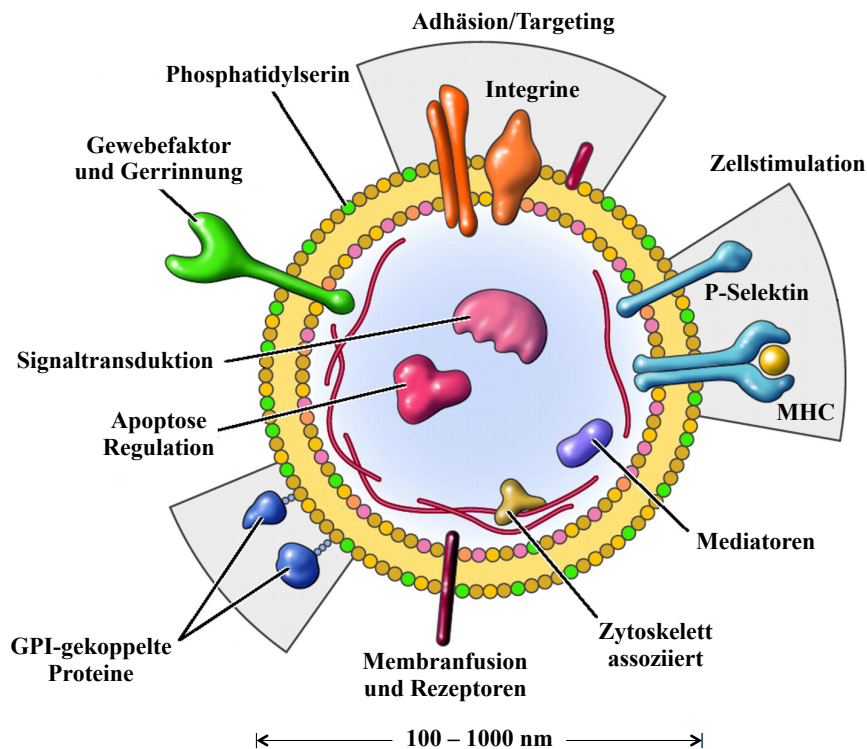


Abbildung 9: Zelluläres Mikrosesikel
Verändert nach (Hugel et al., 2005).

1.4.4 Mechanismen der Mikrosesikelbildung

Die regulatorischen Prozesse der Vesikelfreisetzung sind bis heute noch nicht vollständig geklärt. Der Mechanismus der MV-Knospung als Reaktion der Zelle auf äußere Reize, wie beispielsweise apoptotische (z.B. Staurosporin) oder inflammatorische (z.B. Tumornekrosefaktor α (TNF α), Lipopolysaccharide) Stimuli (McVey et al., 2012), unterliegt einer intrazellulären Kalziumerhöhung. Hierdurch werden die Phospholipid-Transporter Floppase und Scramblase aktiviert und eine bestimmte Flippase, die Aminophospholipid-Translokase, inhibiert. Dadurch kommt es zur Reorganisation der Phospholipid-Asymmetrie in der Membran, die mit einer Translokation des Phosphatidylserins (PS) von innen nach außen einhergeht (Beyer und Pisetsky, 2010; Lhermusier et al., 2011). Das PS kann nun zur Identifizierung von MV mittels der Durchflusszytometrie genutzt werden, indem es Annexin V bindet (Morel et al., 2011; Shet, 2008). Des Weiteren ist für die Vesikulation das Trennen von Membranproteinen vom Zytoskelett essentiell. Diese Aufgabe übernehmen die kalziumsensitiven proteolytischen Enzyme Calpain und Gelsolin (Fox et al., 1991). Davizon *et al.* sehen eine Verbindung zwischen der Bildung von MV und *lipid rafts* in

der Zellmembran, die durch einen hohen Anteil an Cholesterol charakterisiert sind. Sie vermuten, dass *lipid rafts* eine aktive Rolle bei der Knospung der MV von ihrer Ursprungszelle spielen und dass MV Bestandteile dieser Lipidflöße enthalten (Davizon et al., 2010) (Abbildung 10).

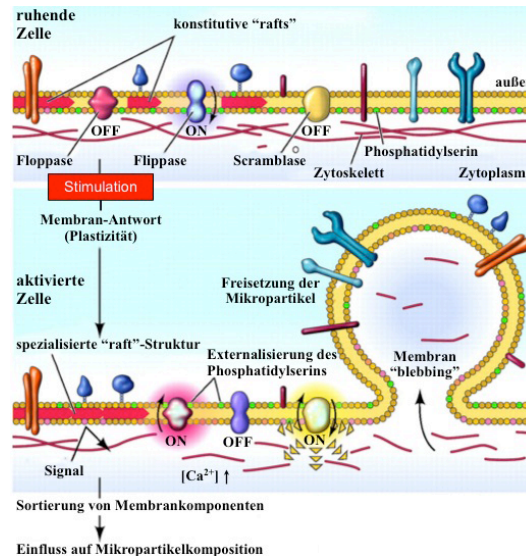


Abbildung 10: Einfluss von Stimulationen auf die Struktur der Plasmamembran und die Bildung von Mikrovesikeln bei einer eukaryotischen Zelle
Verändert nach (Hugel et al., 2005).

1.4.5 Funktionelle Eigenschaften der Mikrovesikel

1.4.5.1 Transfer bioaktiver Moleküle

Die im Blutkreislauf zirkulierenden MV sind in der Lage sowohl lokal und in Nachbarschaft ihres Entstehungsortes als auch in entfernten Regionen im Körper zu wirken. Eine der essentiellen Funktionen von MV betrifft den Transport von löslichen Entzündungsmarkern, wie z.B. E-Selektin oder TF, die zum großen Teil mit MV assoziiert sind (Horstman et al., 2004). Außerdem sind MV am Austausch von Membranproteinen beteiligt. MV verschiedenen Ursprungs transportieren Rezeptoren, die die Zielzellen insofern modifizieren können, als dass sie beispielsweise für neue rezeptorspezifische Stimuli zugänglich werden. So können Leukozyten-MV mittels Übertragung leukozytenspezifischer Antigene u.a. Endothelzellen aktivieren, was zu einer Änderung der Phosphorylierung endothelialer Proteine führt und damit in einer Umgestaltung der endothelialen Adhäsionseigenschaften resultiert (Mesri und Altieri, 1998; Tabibzadeh et al., 1994). Da MV als Transportsystem für Rezeptoren fungieren, sind sie sogar bei der Infizierung von Zellen durch HI-Viren beteiligt (Mack et al., 2000; Rozmyslowicz et al., 2003). MV von Thrombozyten üben neben ihrer

prokoagulatorischen (Berckmans et al., 2001; Nieuwland et al., 1997) auch eine regulatorische Wirkung aus. Im Einzelnen können MV biologisch aktive Komponenten auf hämatopoetische Zellen übertragen, indem sie von diesen Zellen aufgenommen werden. Hierdurch sind MV in der Lage die Zellproliferation, das Überleben und die Chemotaxis hämatopoetischer Zellen zu kontrollieren (Baj-Krzyworzeka et al., 2002).

1.4.5.2 Wege des Informationsaustauschs

MV übertragen Informationen von der Donorzelle zu Zielzellen entweder durch direkten Zell-Zell-Kontakt für die Lieferung von genetischem Material wie RNA, Proteinen und Lipiden oder durch Ferninteraktion mittels Freisetzung löslicher Mediatoren und Effektoren aus den MV. Bislang wurden hauptsächlich vier unterschiedliche Interaktionsmechanismen zwischen MV und Zielzellen beschrieben (McVey et al., 2012) (Abbildung 11).

Erstens können MV die Zielzellen mittels *outside-in-signaling* stimulieren. Hierbei präsentieren MV membranassoziierte Liganden, die direkt an ihre Oberflächenrezeptoren binden oder lösliche Faktoren wie z.B. Zytokine freisetzen, die dann mittels rezeptorvermittelten oder rezeptorunabhängigen Mechanismen auf die Zielzelle wirken. Zweitens werden ganze MV endozytotisch von der Zielzelle aufgenommen und sind in Lysosomen detektierbar, wo ihr Abbau schließlich stattfindet. Durch die Internalisierung der MV gelangen sowohl Membran als auch Vesikelinhalt in die Zielzelle. Einen dritten möglichen Weg des Informationsaustauschs stellt die Fusion der MV mit der Membran der Empfängerzelle dar. Dabei kann ein Teil oder sogar die ganze Membran der Vesikel mit der Partnerzelle fusionieren. Der Inhalt der MV kann so zum Teil oder ganz in das Zytosol der Zelle abgegeben werden. Viertens und letztens sind MV auch beim Nukleinsäuretransfer beteiligt. Somit kann eine kodierende mRNA oder miRNA von der Zelle A in die Zelle B transferiert und dort translatiert werden bzw. in die Regulation der Translation eingebunden werden und dadurch das Proteom der Zelle B verändern (McVey et al., 2012).

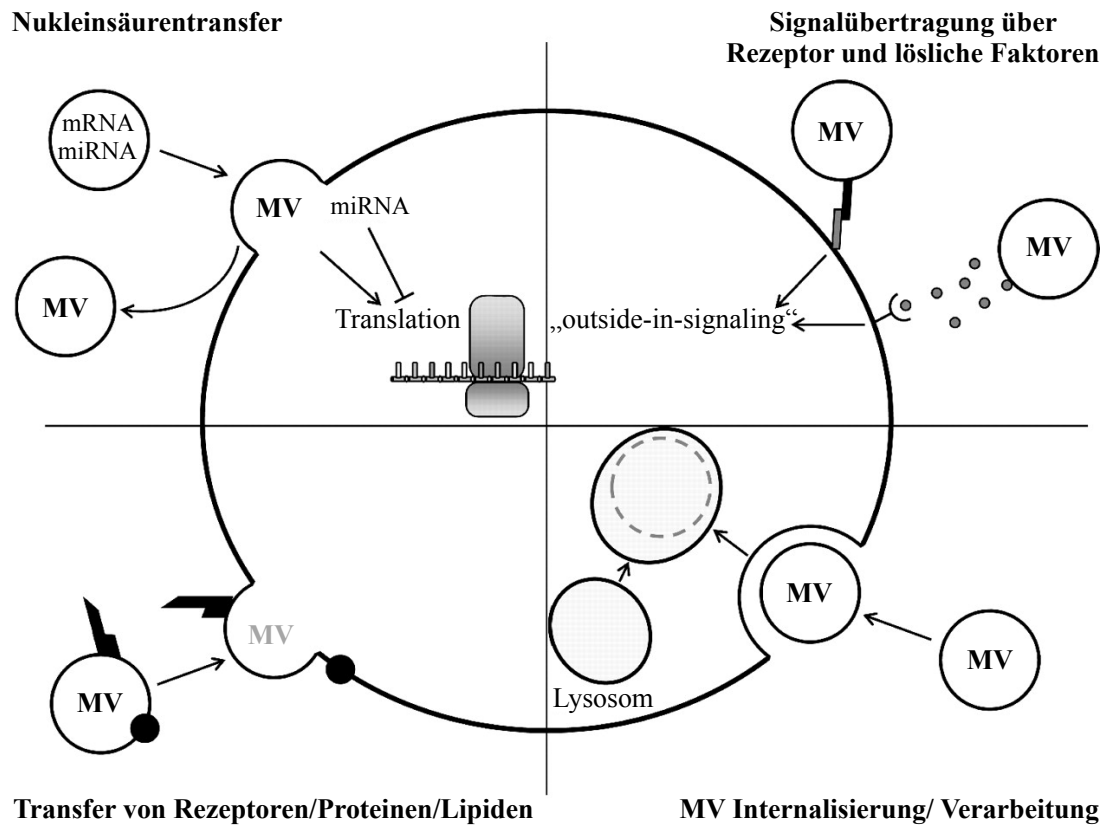


Abbildung 11: Mögliche Interaktionen zwischen Mikrovesikeln und Zielzellen

Die Interaktion zwischen MV und ihren Zielzellen erfolgt hauptsächlich über vier unterschiedliche Mechanismen: *outside-in-signaling* über Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung oder sekretierte Faktoren (oben rechts); Internalisierung und lysosomale Verarbeitung von MV erleichtert beispielsweise die anschließende Präsentation von MV-Antigenen auf der Oberfläche der Zielzellen (unten rechts); Fusionsvermittelter Transfer von Oberflächenrezeptoren, Proteinen und Lipiden (unten links); Transfer von genetischem Material, wie mRNA oder miRNA (oben links). MV können entweder vollständig oder temporär mit der Zielzelle fusionieren, was zu einer vollständigen oder selektiven Übertragung des MV-Inhalts führt, verändert nach (McVey et al., 2012).

1.4.5.3 Mikrovesikel und Entzündungen

Im Plasma von Patienten, die an einer Entzündung litten, konnte ein hoher Titer an verschiedenen MV bestimmt werden. Daraus lässt sich schließen, dass MV als Biomarker für eine Reihe von entzündlichen Krankheiten wie z.B. Atherosklerose, Diabetes Typ 2, Lupus erythematodes, Morbus Crohn oder rheumatoider Arthritis gelten können. Auch bei infektiösen Erkrankungen wie Malaria wurden erhöhte MV-Spiegel nachgewiesen (McVey et al., 2012).

Besonders im Rahmen einer Sepsis scheinen MV die Aktivierung proinflammatorischer Signalkaskaden durch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie die Präsentation des prokoagulatorischen TF zu fördern. Da eine Sepsis häufig mit einer disseminierten intravasalen Koagulopathie einhergeht, ist besonders die Expression des

TF auf MV hervorzuheben. Dieser aktiviert den extrinsischen Weg der Gerinnungskaskade und löst so die Bildung von Thrombin aus. Die Aktivität des TF ist dabei nicht nur von seiner Expression, sondern auch von seiner Konformation abhängig. MV enthalten die aktive Form des TF und repräsentieren damit einen hochpotenten prothrombotischen Faktor. Aber auch MV, die keinen TF exprimieren, können die Gerinnung fördern, da sie anionische Phospholipide einschließlich PS auf ihrer Oberfläche tragen, die erst die Calcium-abhängige Bindung von Gerinnungskomplexen an eine Biomebran erlauben. MV können jedoch auch antikoagulatorisch wirken, was durch das Protein C und den *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI) vermittelt wird. Ob MV eine pro- oder antikoagulatorische Wirkung ausüben, ist vom Ursprung der MV abhängig. Es konnte gezeigt werden, dass die Größe eines Blutgerinnsels positiv mit der Menge an MV aus Thrombozyten und negativ mit dem MV-Gehalt aus Leukozyten korreliert. Dies deutet darauf hin, dass das Gleichgewicht zwischen unterschiedlichen MV ausschlaggebend für die resultierenden lokalen und/oder systemischen funktionellen Wirkungen zu sein scheint (McVey et al., 2012).

1.4.6 Nachweis von Mikrovesikeln

Für den Nachweis und die Charakterisierung der MV werden verschiedene Methoden angewandt. Hierzu gehören Durchflusszytometrie, ELISA, funktionelle Koagulationstests, Elektronen-, *Atomic force*- und Konfokalmikroskopie, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, Kapillarelektrophorese sowie die Massenspektrometrie (McVey et al., 2012). Alle diese Methoden haben ihre Vor- und Nachteile. Die am häufigsten angewandte Methode zur initialen Charakterisierung ist die Durchflusszytometrie. Hierbei wird für die Detektion von MV die Bindung von Annexin V an PS auf der Oberfläche der MV genutzt oder nach für die Ursprungszelle charakteristischen Markern der MV gesucht. Die Verfolgung der Herkunft der MV stellt jedoch eine schwierige Aufgabe dar. Zum einen ändert sich der Phänotyp der MV *in vivo* stetig durch Interaktionen mit Zellen oder anderen MV, so dass es durch Fusionsvorgänge zum Austausch von zellspezifischen Markern kommt (Quesenberry und Aliotta, 2010). Zum anderen kann bereits die Unterscheidung von MV, deren Ursprungszellen ähnlicher Herkunft sind, eine Hürde darstellen. So sind beispielsweise aus Thrombozyten und Megakaryozyten stammende MV phänotypisch sehr ähnlich und dadurch kaum zu unterscheiden (Flaumenhaft et al., 2010; Rank et al., 2010).

2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

RNH1 ist einer der stärksten intrazellulären Bindungspartner von Mitgliedern der RNase A-Superfamilie, wie RNase 1 und Angiogenin. Nach seiner Bindung an RNasen inaktiviert RNH1 deren ribonukleolytische Aktivität gegenüber RNA-Substraten. Neben der Expression und Freisetzung aus dem exokrinen Pankreas und der Funktion als Verdauungs-Endonuklease im Dünndarm wirkt die hauptsächlich von Endothelzellen exprimierte und freigesetzte vaskuläre RNase 1 im endokrinen System (Zirkulation) als natürlicher Gegenspieler von eRNA zu deren Degradation. Laut Studien unserer Gruppe weist die unter pathologischen Bedingungen bzw. bei Gewebe- oder Zellschaden freigesetzte eRNA funktionelle Eigenschaften wie prothrombotische, proinflammatorische oder gefäßpermeabilitätssteigernde Funktionen auf. Insbesondere dient eRNA als Kofaktor zur Auto-Aktivierung der Serinproteasen der Kontaktphase der Blutgerinnung, fördert die Adhäsion und Transmigration von Leukozyten und führt zur Ödembildung mittels Induktion einer VEGF-abhängigen Hyperpermeabilität des Endothels.

In der vorliegenden Arbeit sollten biologische Funktionen des Gegenspielers von RNase 1, dem RNH1, und seiner Regulation unter pathologischen Bedingungen analysiert werden, wozu speziell Veränderungen der RNH1-, RNase 1- und Angiogenin-Expression unter hypoxischen, inflammatorischen und apoptotischen Bedingungen betrachtet wurden. Im Verlauf der Untersuchungen sollten folgende Punkte im Detail bearbeitet werden:

1. Analyse von Veränderungen in der Expression und Freisetzung von RNH1, RNase 1 und Angiogenin in Endothel- sowie Tumorzellen durch den Einfluss inflammatorischer ($\text{TNF}\alpha$, Lipopolysaccharide), apoptotischer Substanzen (Staurosporin) und Hypoxie mittels semiquantitativer PCR, Western-Blot-Analysen und RNase-Aktivitätstests
2. Analyse der RNH1-Freisetzung aus Endothel- und Tumorzellen mittels Western-Blot-Analysen
3. Untersuchung der zellulären RNH1-Effekte auf unterschiedlichen Zelltypen mittels Zytotoxizitäts- und Proliferationstests

4. Analyse des Einflusses der RNH1-Expression auf die Expression von RNase 1 und Angiogenin in Endothel- und Tumorzellen mittels RNH1-*Knockdown*-Experimente durch siRNA.

Die Bearbeitung dieser Aspekte sollte neue Einblicke in die Beteiligung des RNH1 an der Regulation der vaskulären Homöostase und Angiogenese ermöglichen.

Zunächst wurde die Gen- und Proteinexpression von RNH1 und seiner Interaktionspartner unter hypoxischen, inflammatorischen und apoptotischen Bedingungen in Tumor- und Endothelzellen untersucht. Der Nachweis einer veränderten Expression von RNH1 würde seine regulatorische Rolle in der intra- und extrazellulären RNase 1- bzw. Angiogenin-Expression und -Aktivität untermauern.

Zudem würde die Identifizierung beteiligter Sekretionswege erste Erkenntnisse über die Freisetzung des RNH1 unter pathologischen Bedingungen liefern und somit auch eine Korrelation mit inflammatorischen Erkrankungen erlauben.

Des Weiteren wurden unterschiedliche Zelltypen mit rekombinantem RNH1 in steigenden Konzentrationen stimuliert und anschließend seine zytotoxische bzw. proliferative Wirkung auf diese Zellen bestimmt. Die Identifizierung zellulärer RNH1-Effekte würde neue Erkenntnisse über die Wirkung des extrazellulären RNH1 auf die Viabilität der Zellen vermitteln, die eventuell in der Tumorthherapie Anwendung finden könnten.

Schließlich wurde die Genexpression des RNH1 in Tumor- und Endothelzellen herunterreguliert und dabei die RNase 1- und Angiogenin-Expression verfolgt. Dadurch könnten neue Informationen über die Notwendigkeit der RNH1-Schutzfunktion für das Überleben der Zellen gewonnen werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Chemikalien und Geräte

3.1.1 Chemikalien, Enzyme und Kits

Substanzen	Firma	Firmensitz
Acetyliertes Bovines Serum Albumin	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Albumin (aus Kälberserum)	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Ammoniumacetat	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Ammoniumchlorid	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Ammoniumpersulfat	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Ammoniumsulfat	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Aqua ad iniectabilia	Braun	Melsungen (Deutschland)
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (Pierce)	Rockford
BD FACS Clean Solution	BD Biosciences	Heidelberg (Deutschland)
BD FACS Flow Sheath Fluid	BD Biosciences	Heidelberg (Deutschland)
BD FACS Shutdown Solution	BD Biosciences	Heidelberg (Deutschland)
Bromphenolblau	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Cell Meter™ Phosphatidylserine Apoptosis Assay Kit (Green Fluorescence)	AAT Bioquest	Sunnyvale
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche	Grenzach-Wyhlen (Deutschland)
Coomassie Brilliant Blue R250	Thermo Fisher Scientific (Pierce)	Rockford
D-Glucose	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Developer	Agfa	Mortsel (Belgien)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth	Karlsruhe (Deutschland)

MATERIAL UND METHODEN

DNA-Marker (GeneRuler 100 bp DNA Ladder)	Thermo Fisher Scientific (Fermentas)	Rockford
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Invitrogen (Gibco)	Darmstadt (Deutschland)
ECL Hyperfilme	GE Healthcare	Frankfurt (Deutschland)
ECL Prime Western Blot Detektiersystem	GE Healthcare	Frankfurt (Deutschland)
Endothelzellbasalmedium	Promo Cell	Heidelberg (Deutschland)
Endothelzellbasalmedium Supplement Mix	Promo Cell	Heidelberg (Deutschland)
Essigsäure	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Ethanol	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Fetales Kälberserum HyClone™ (FCS)	Thermo Fisher Scientific	Rockford
Fixierer	Agfa	Mortsel (Belgien)
Glycerin	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Glycin	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
GoTaq Green Mastermix	Promega	Madison
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Promo Cell	Heidelberg (Deutschland)
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems	Darmstadt (Deutschland)
Hygromycin B	Invitrogen (Gibco)	Darmstadt (Deutschland)
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)

MATERIAL UND METHODEN

Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent	Invitrogen	Darmstadt (Deutschland)
Lipopolysaccharides from Escherichia coli O111:B4	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)
Natriumdeoxycholat	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphatdihydrat	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Natriumorthovanadat	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Natriumpolyphosphat	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Natronlauge	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Paraformaldehyd	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences	Heidelberg (Deutschland)
Penicillin-Streptavidin	Invitrogen (Gibco)	Darmstadt (Deutschland)
Perchlorsäure	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific	Rockford
Polyribocytidylsäure (Poly:C)	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Primer	Thermo Fisher Scientific	Rockford
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten (Complete Mini)	Roche	Grenzach-Wyhlen (Deutschland)
Proteinmarker (PageRuler Prestained Protein Ladder)	Thermo Fisher Scientific (Fermentas)	Rockford

MATERIAL UND METHODEN

Quant-iT RNA Assay Kit	Invitrogen	Darmstadt (Deutschland)
Rekombinantes Humanes Angiogenin Protein	R&D Systems	Minneapolis
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific (Fermentas)	Rockford
Ribonuklease A (bovin, rekombinant)	Thermo Fisher Scientific (Fermentas)	Rockford
RNA Isolation Kit (GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit)	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
RNA Purification Kit (MasterPure)	Epicentre	Madison
RNaseZap	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium	Invitrogen (Gibco)	Darmstadt (Deutschland)
Roti®-Block	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Rotiphorese Gel 30	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Salzsäure 1 mol/l-1 N Lösung	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Salzsäure rauchend (37%)	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Serva Blue R	Serva	Heidelberg (Deutschland)
Silencer® Negative Control No. 2 siRNA	Thermo Fisher Scientific (Ambion)	Rockford
siRNA Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH)	Thermo Fisher Scientific (Dharmacon)	Rockford
siRNA RNH1	Santa Cruz	Santa Cruz
Sodiumdodecylsulfat ultra rein (SDS)	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
SPHERO™ AccuCount Fluorescent Particles	Spherotech	Lake Forest
Staurosporine	Cayman Chemical	Michigan
Supplement Pack Endothelial Cell Growth Medium	Promo Cell	Heidelberg (Deutschland)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Tris	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Triton-X-100	Roth	Karlsruhe (Deutschland)

MATERIAL UND METHODEN

Trypan Blue Dye 0,4%	BioRad	München (Deutschland)
TrypLE Express	Invitrogen (Gibco)	Darmstadt (Deutschland)
Tumornekrosefaktor α (TNF α)	R&D Systems	Minneapolis
Tween-20	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Ultra Reinstwasser	Biochrom	Berlin (Deutschland)
Vectashield Eindeckmedium mit DAPI	Vector Laboratories	Burlingame (Kanada)
Wasserstoffperoxid	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
96-Well Zellkulturplatten (steril)	Thermo Fisher Scientific (Nunc)	Rockford
Amicon Ultra Aufkonzentrierungsröhrchen (Ausschlussgröße 10 kDa)	Millipore	Billerica
BD FACSCanto II Flow Cytometer	BD Biosciences	Heidelberg (Deutschland)
BioPhotometer plus	Eppendorf	Hamburg (Deutschland)
Cell Counting Slides (für den TC10 Automatisierten Zellzähler)	BioRad	München (Deutschland)
Combitips plus	Eppendorf	Hamburg (Deutschland)
Deckgläser (24x60 mm)	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Dreiwegehahn	Braun	Melsungen (Deutschland)
Eismaschine	Scotsman	Vernon Hills
Elektrophoresekammern für SDS-Gele	BioRad	München (Deutschland)
Elektrophoresekammern für vertikale Agarosegele	PeqLab	Erlangen (Deutschland)
FACSDiva Software Version 6.1.3	BD Biosciences	Heidelberg (Deutschland)

MATERIAL UND METHODEN

Fluoreszenzlesegerät für Mikrotiterplatten (Flx800)	BioTek Instruments	Bad Friedrichshall (Deutschland)
Flüssigstickstoff	Linde	Pullach (Deutschland)
Flüssigstickstofftank	Messer	Bad Soden (Deutschland)
Gefrierbehälter (Nalgene Kryo 1°C Freezing Container)	Thermo Fisher Scientific	Rockford
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Fisher Scientific	Rockford
Gel-Dokumentationsgerät mit Software	Intas	Göttingen (Deutschland)
Gene5 Software	BioTek Instruments	Bad Friedrichshall (Deutschland)
Glasgefäße	Schott	Mainz (Deutschland)
Hybond-P PVDF Membran	GE Healthcare	Frankfurt (Deutschland)
Inkubationsmischer (TS1)	Biometra	Göttingen (Deutschland)
Inkubator für die Zellkultur (IR Sensor)	Sanyo	San Diego
Innova CO-48 CO ₂ Inkubator	New Brunswick Scientific	Nürtingen (Deutschland)
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
Kühl- und Gefrierschränke	Bosch	Gerlingen-Schillerhöhe (Deutschland)
LabImage 1D Software	Intas	Göttingen (Deutschland)
LaminAir Sterilbank	Thermo Fisher Scientific (Holten)	Rockford
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
Mikropipetten	Gilson	Limburg (Deutschland)

MATERIAL UND METHODEN

Mikroskop für die Zellkultur	Hund	Wetzlar (Deutschland)
Multipipette plus	Eppendorf	Hamburg (Deutschland)
Nadeladapter	NeoLab	Heidelberg (Deutschland)
Nitril-Handschuhe (Peha-Soft)	Hartmann	Oslo (Norwegen)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging	Chicago
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)
Pinzette aus Federstahl	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Pipetboy	Integra Bioscience	Fernwald (Deutschland)
Plastikzentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml)	Sarstedt	Nürnberg (Deutschland)
PowerPac Universal	BioRad	München (Deutschland)
PowerPac™ Universal Power Supply	BioRad	München (Deutschland)
Probenröhre 75 x 12 mm (5 ml, PS) für Durchflusszytometrie	Sarstedt	Nürnberg (Deutschland)
Quantity One Software	BioRad	München (Deutschland)
Qubit 2.0 Fluorometer	Invitrogen	Darmstadt (Deutschland)
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5 und 2 ml)	Eppendorf	Hamburg (Deutschland)
Reinstwasser-Aufbereitungssystem (Milli-Q Direct 8)	Millipore	Billerica
Roller Mixer (SRT9)	Stuart	Staffordshire (Großbritannien)
Schlauch	NeoLab	Heidelberg (Deutschland)
Skalpell	Braun	Melsungen (Deutschland)
Spritzen (10 ml, 30 ml, 50 ml)	Braun	Melsungen (Deutschland)
Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,22 µm und 0,45 µm)	Millipore	Billerica
Sterile Einwegpipetten für die Zellkultur	Greiner Bio-One	Frickenhausen (Deutschland)

MATERIAL UND METHODEN

Tank-Blot System Mini Trans-Blot® Cell	BioRad	München (Deutschland)
TC10 Automatisierter Zellzähler	BioRad	München (Deutschland)
Tischzentrifuge (Fresco17)	Thermo Fisher Scientific (Heraeus)	Rockford
Tischzentrifuge (Mikro200)	Hettich	Tuttlingen (Deutschland)
UV-transparente Küvetten	Sarstedt	Nürnberg (Deutschland)
Vakuum-Absaugpumpe (Vario18)	Medela	Eching (Deutschland)
Vortexer (Charley2)	Süd- Laborbedarf GmbH	Gauting (Deutschland)
Waage (SI-2002)	Denver Instruments	Bohemia
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)
Zentrifuge (Labofuge 400R)	Thermo Fisher Scientific (Heraeus)	Rockford
Zentrifuge (Rotina 46R)	Hettich	Tuttlingen (Deutschland)

3.1.3 Antikörper

Primärantikörper

Antikörper	Firma	Firmensitz
Angiogenin (goat polyclonal anti-human Angiogenin)	Santa Cruz	Santa Cruz
Angiogenin (goat polyclonal anti-human Angiogenin)	Millipore (Calbiochem)	Billerica
IgG-Kontrolle goat	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
IgG-Kontrolle rabbit	Dianova GmbH	Hamburg (Deutschland)
RNase 1 (chicken polyclonal anti-human RNase 1)	Sigma Aldrich (Genway)	Taufkirchen (Deutschland)
RNase 1 (rabbit polyclonal anti-human RNase 1)	Polyscience	Eppelheim (Deutschland)

RNH1 (goat polyclonal anti-human RNH1)	Santa Cruz	Santa Cruz
β -Aktin (mouse anti-human- β -Aktin)	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)

Sekundärantikörper

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

3.2 Zellkulturtechnische Methoden

3.2.1 Einführung in die verwendeten Zelltypen

3.2.1.1 HT1080

HT1080 sind adhärenente Bindegewebszellen mit epithelialer Morphologie. Diese Zellen wurden 1974 aus dem Fibrosarkom eines 35-jährigen kaukasischen Patienten, der zuvor nicht radio- oder chemotherapeutisch behandelt wurde, isoliert (Rasheed et al., 1974). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Zelllinie stellvertretend zur Untersuchung von Tumorzellen mit niedriger RNase-Aktivität genutzt.

HT1080 Wachstumsmedium

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)
10% fetales Kälberserum (FCS) (v/v)
1% Penicillin/Streptomycin (v/v)
0,4% Hygromycin B (v/v)

3.2.1.2. HT29

HT29 sind adhärenente Tumorzellen mit epithelialer Morphologie, die 1964 aus dem kolorektalen Adenokarzinom einer 44-jährigen kaukasischen Patientin isoliert wurden. Diese Zellen sind sensitiv gegenüber chemotherapeutischen Medikamenten wie 5-Fluorouracil und Oxaliplatin, die zur Standardtherapie des kolorektalen Karzinoms

gehören. Die HT29-Zelllinie wird unter anderem als *in-vitro* Modell zur Untersuchung von Absorption, Transport und Sekretion der Darmzellen verwendet. Unter standardmäßigen Kulturbedingungen wachsen diese Zellen als nichtpolarisierte, undifferenzierte Mehrschicht.

HT29 Wachstumsmedium

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)
10% fetales Kälberserum (FCS) (v/v)
1% Penicillin/Streptomycin (v/v)

3.2.1.3. HUVEC

Humane umbilikale venöse Endothelzellen (*Human umbilical vein endothelial cells*, HUVECs) sind primäre adhärenente Endothelzellen, die aus humanen Nabelschnurvenen isoliert wurden. Diese primären Zellen werden standardmäßig zur Untersuchung von Funktionen und pathologischen Zuständen des makrovaskulären Endothels verwendet. Unsere Arbeitsgruppe testete in 2010 unterschiedliche Endothelzellen, von denen HUVEC die stärkste Expression und Freisetzung von RNase 1 zeigten (Fischer et al., 2011). Die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden mit HUVEC bis Passage 4 durchgeführt.

HUVEC Wachstumsmedium

Endothelial Cell Basal Medium
5% fetales Kälberserum (FCS) (v/v)
1% Penicillin/Streptomycin (v/v)
Supplements:

- 0,1 ng/ml *Epidermal Growth Factor*
- 1 ng/ml *Basic Fibroblast Growth Factor*
- 1 µg/ml Hydrokortison

Nach der von Jaffe *et al.* 1973 (Jaffe et al.) erstmals beschriebenen Methode erfolgte die Isolierung von primären Endothelzellen aus der Nabelschnurvene 24 Stunden (h) nach der Entbindung. Zunächst wurden die Nabelschüre mit einer sterilen Kompresse gesäubert und auf Verletzungen und Blutgerinnsel inspiziert, die, wenn vorhanden, mit einem sterilen Skalpell entfernt wurden. An einem Ende der Nabelschnur wurde etwa 1 cm entfernt, eine Knopfkanüle mit einem Dreiweghahn in die Vene eingeführt und mit einem Kabelbinder fixiert. Somit konnte die Vene mit 50 ml *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS, *PromoCell*) gespült werden, um Blutreste zu entfernen. Das andere Ende der Nabelschnur wurde ebenfalls gekürzt und anschließend die Vene mit einem

Nadeladapter kanüliert. Das an dem Nadeladapter gebundene Schlauchstück wurde abgeklemmt und Kollagenaselösung (0,05% w/v in HBSS) über den Dreiwegehahn in die Vene eingespritzt. Nach Ende der 20-minütigen Inkubation der Nabelschnur mit der Kollagenaselösung bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank wurden die abgelösten Zellen mit 30 ml HBSS aus der Vene in ein 50 ml Röhrchen mit 1 ml FCS ausgespült. Anschließend wurden die Zellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 250 g pelletiert, in 10 ml HUVEC Wachstumsmedium mit 20% FCS resuspendiert und in eine Kulturschale überführt. Nach 24 h wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 10 ml frisches HUVEC Wachstumsmedium überführt. Nach drei- bis viertägiger Inkubation der Zellen im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ erreichten diese erneut 80-90%-ige Konfluenz und konnten passagiert werden.

3.2.1.4. EA.hy926

Eine der am häufigsten verwendeten und besten charakterisierten menschlichen vaskulären Endothelzellen sind EA.hy926 (Edgell et al., 1983). Die Zelllinie wurde 1983 durch die Fusion von HUVEC mit der menschlichen Lungenkrebszelllinie A549 erzeugt (Lieber et al., 1976). Die entstandenen Hybriden hatten mehr Chromosomen als ihre Vorläuferzellen und trugen ein Markerchromosom der A549-Zelllinie. EA.hy926 werden zurzeit als Standardmodell für verschiedene physiologische und pathologische Prozesse besonders in der Angiogeneseforschung verwendet (Bauer et al., 1992; Cieslak et al., 2002). Als Derivat der Fusion mit HUVEC zeigen auch EA.hy926 eine hohe RNase 1-Expression und -Freisetzung.

EA.hy926 Wachstumsmedium

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)
10% fetales Kälberserum (FCS) (v/v)
1% Penicillin/Streptomycin (v/v)

3.2.2 Auftauen der Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurde das entsprechende Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C geschwenkt und die aufgetaute Zellsuspension in 10 ml Wachstumsmedium überführt. Anschließend erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 250 g, das Zellpellet wurde in 10 ml frischem Wachstumsmedium aufgenommen und in einer

Kulturschale ausgesät. Nach Erreichen einer 80-90%-igen Konfluenz im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ konnten die Zellen, wie unter 3.2.3 beschrieben, passagiert werden.

3.2.3 Passage der Zellen

Um die Zellen dauerhaft in Kultur zu halten, mussten sie bei 80-90%-iger Konfluenz auf neue Kulturschalen aufgeteilt werden. Die Zellen 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. Nach dem Abstoppen dieser Reaktion durch Zugabe von 10 ml Wachstumsmedium erfolgte die Zentrifugation der Zellsuspension bei 250 g für 5 Minuten (min). Das erhaltene Zellpellet wurde in Wachstumsmedium resuspendiert und auf neue Kulturschalen verteilt.

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

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

3.2.4 Kryokonservierung von Zellen

Zur langfristigen Lagerung der Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. 24 h vor Beginn der Kryokonservierung wurde das Medium erneuert und zwei für das Einfrieren benötigte steril filtrierte Lösungen angesetzt:

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

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

500 µl von Lösung A wurden in sterilen Kryoröhrchen vorgelegt und bis zur Verwendung auf Eis gestellt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und durch Inkubation mit 1 ml *TrypLE Express* bei 37°C, 5% CO₂ im Brutschrank von der Kulturschale gelöst. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 10 ml Wachstumsmedium wurden die Zellen 5 min bei 250 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml kalter Lösung B resuspendiert und 500 µl der Zellsuspension in die vorbereiteten Kryoröhrchen überführt. Die Zellsuspension wies dadurch eine Endkonzentration von 10% DMSO (v/v) und 20% FCS (v/v) auf. Die Kryoröhrchen wurden für mindestens 2 h in einem Gefrierbehälter bei -80°C aufbewahrt. Das im

Gefrierbehälter enthaltene Isopropanol diente dem langsamen Abkühlen der Zellen mit einer Geschwindigkeit von $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ auf -80°C . Im Anschluss wurden die Zellen für eine dauerhafte Lagerung in einen Stickstofftank überführt.

3.2.5 Bestimmung der Gesamt- und Lebendzellzahl

Um eine definierte Zellzahl in den Experimenten aussähen zu können, wurden die Zellen mit dem *TC10TM Automated Cell Counter* von *Bio-Rad* gezählt. Wie unter 3.2.3 beschrieben, wurden die Zellen trypsinisiert und pelletiert. Die resuspendierten Zellen wurden mit Trypanblau (*Trypan Blue Dye 0.4%*) im Verhältnis 1:1 vermischt, auf die zum Zählgerät passenden Objektträger gegeben und in die entsprechende Öffnung des Gerätes eingeführt. Tote bzw. nicht intakte Zellen nehmen vermehrt den Farbstoff Trypanblau auf und verfärben sich, während lebende Zellen mit intakten Zellmembranen ungefärbt bleiben. Dadurch ist die genaue Detektion und Differenzierung möglich (Strober, 2001). Die abgelesenen Messwerte beschrieben die Gesamtzellzahl sowie die Anzahl der lebenden Zellen in einem ml der Originallösung.

3.2.6 Stimulation und Ernten der Zellen

Vor jeder Stimulation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in Medium ohne FCS gesetzt. Die Zellen inkubierten mit den Stimuli im Brutschrank (37°C , 5% CO_2) für die angegebenen Zeiten. Nach Ende der Stimulation wurden die Überstände bei $250\text{ g } 4^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert, um abgestorbene Zellen zu entfernen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen sowohl für Protein- (siehe 3.4.1) als auch Genexpressionsanalysen (siehe 3.3.2) lysiert und bei -20°C gelagert.

Im Folgenden werden die einzelnen Stimulanzen eingeführt.

Staurosporin:

Bei Staurosporin handelt es sich um ein Alkaloid, das erstmals 1977 aus dem Bakterium *Streptomyces staurosporeus* isoliert wurde (Omura et al., 1995). Es wird als Referenzsubstanz zur Apoptoseauslösung experimentell verwendet. Insbesondere ist Staurosporin an der Induktion des intrinsischen Apoptoseweges beteiligt (Ying und Häcker, 2007; Zheng et al., 2008).

Ethanol:

Ethanol mit der Formel C_2H_5OH ist ein aliphatischer, einwertiger Alkohol, der zu der Gruppe der n-Alkanolen gehört. Aufgrund seiner nekrotischen Wirkung wird Ethanol unter anderem in der perkutanen Tumorbehandlung verwendet (Sugiura, 1983).

TNF α :

TNF α ist ein Zytokin des Immunsystems, das bei Entzündungsvorgängen hauptsächlich von Makrophagen, aber auch von Mastzellen, Lymphozyten, Fibroblasten und Endothelzellen gebildet und freigesetzt wird (Tracey et al., 1989; Kriegler et al., 1988). Insbesondere wird die TNF α -Freisetzung durch körperfremde, bakterielle Bestandteile wie Lipopolysaccharide induziert (Sayers et al., 1987). Desweiteren ist TNF α auch an nekrotischen sowie apoptotischen Vorgänge beteiligt (Idriss und Naismith, 2000).

Lipopolysaccharid:

Lipopolysaccharid ist ein wichtiger Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien. Dieses Endotoxin ist ein äußerst starker Stimulus des Immunsystems. Seine inflammatorischen Wirkungen werden über so genannte Toll-like-Rezeptoren und CD14-Rezeptoren entfaltet (Alexander und Rietschel, 2001).

Hypoxie:

Hypoxie, also die unzureichende Sauerstoffzufuhr, stellt für die Zelle eine extreme Belastung dar, die langfristig zu einer permanenten Zellschädigung führen kann. Eine bedeutende Rolle bei der Anpassung von Zellen an hypoxische Bedingungen spielen die Hypoxie-induzierbaren Faktoren (*Hypoxia-inducible factors*, HIFs) (Wang et al., 1995). Bislang wurden drei HIF-Proteine (HIF1, HIF2, HIF3) identifiziert (Wang et al., 1995; Maynard et al., 2003). Bei den HIFs handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die verschiedene zelluläre Anpassungsvorgänge wie beispielsweise die Umstellung des Zellstoffwechsels auf anaerobe Bedingungen regulieren können (Semenza, 2011). Insbesondere fördert HIF2 die Erythropoese (Warnecke et al., 2003), während sowohl HIF1 als auch HIF2 an der Regulation der Angiogenese durch Induktion von VEGF beteiligt sind (Feng et al., 2016; Huang et al., 2010). Von einem HIF1 α -vermittelten Mechanismus scheint auch die Hochregulation der Angiogenin-Expression unter hypoxischen Bedingungen sowohl in gesunden Geweben als auch in manchen soliden Tumoren abhängig zu sein (Rajashekhar et al., 2005; Nakamura et al., 2006; Hartmann

et al., 1999; Kishimoto et al., 2012; Campo et al., 2005; Pilch et al., 2001; Lai et al., 2016).

3.2.7 Proliferationstest

Die proliferative Wirkung der verwendeten Stimulanzen auf die Zellen wurde photometrisch durch Verwendung des *BrdU Cell Proliferation Kits* von Roche bestimmt. Da die Zellproliferation die genomische DNA-Synthese voraussetzt, stellt die Überwachung der DNA-Synthese einen indirekten Parameter der Zellproliferation dar. Dieser Test beruht auf der Detektion von 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU), das in die genomische DNA von proliferierenden Zellen eingebaut wird und mittels Spektrophotometer (ELISA Lesegerät) bei 450 nm nachgewiesen werden kann.

Zur Bestimmung des proliferativen Einflusses der Stimulanzen auf HUVEC und HT1080 wurden jeweils 5000 Zellen pro Well einer 96-Well-Platte ausgesät und für 4-6 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Erreichen einer 40%-igen Konfluenz wurden beide Zelllinien mit PBS gewaschen und anschließend die HUVEC im mit 0,5% FCS versetzten bzw. HT1080 im serumfreien Medium mit den entsprechenden Stimulanzen behandelt. Als Positivkontrolle diente für HUVEC Medium mit 5% und für HT1080 Medium mit 10% FCS. Unbehandeltes Medium mit 0,5% FCS bei der HUVEC- bzw. serumfreies Medium bei der HT1080-Stimulation wurde als Negativkontrolle verwendet. Nach 24-stündiger Stimulation wurde die Proliferation der Zellen bestimmt. Dafür wurden die Zellen für 2 h in der BrdU-Markierungslösung inkubiert. Während dieser Inkubationszeit erfolgte der Einbau des Pyrimidin-Analogons BrdU anstelle von Thymidin in die DNA der proliferierenden Zellen (Porstmann et al., 1985). Durch Zugabe von 200 µl pro Well *Fix Denat* für 30 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen fixiert und die DNA denaturiert. *Fix Denat* wurde entfernt und 100 µl BrdU-POD-Antikörperlösung wurden für 90 min bei Raumtemperatur auf die Zellen getropft. Der BrdU-POD-Antikörper band an das in die neu synthetisierte zelluläre DNA eingebaute BrdU (Vanderlaan und Thomas, 1985; Gonchoroff et al., 1985). Nach der Entfernung des Antikörpers wurden die Zellen dreimal gewaschen und 100 µl Substratlösung für 30 min bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Die Immunkomplexe wurden durch die anschließende Substratreaktion nachgewiesen. Die Reaktion wurde durch Verwendung von 25 µl 1 mM H₂SO₄ gestoppt

und die Platten wurden im Spektrophotometer bei 450 nm gemessen. Die Farbentwicklung und damit die Absorptionswerte korrelieren direkt mit der Menge der DNA-Synthese und dadurch mit der Anzahl der proliferierenden Zellen in den jeweiligen Mikrokulturen.

3.2.8 Zytotoxizitätstest

Um toxische Effekte von den verwendeten Stimulanzen auf Zellen auszuschließen, wurde das *LDH-Cytotoxicity Detection Kit* von Roche verwendet, mit dem die Aktivität des Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) im Zellüberstand photometrisch bestimmt wird. LDH ist ein ubiquitäres zytoplasmatisches Enzym, das durch Zell- und Gewebeschädigung freigesetzt und dadurch in Überständen nachweisbar wird (Korzeniewski und Callewaert, 1983). Die Methode beruht auf zwei Hauptreaktionen. Zunächst wird Laktat durch die LDH zu Pyruvat oxidiert und gleichzeitig NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert. Im zweiten Schritt erfolgt die Reduktion des Tetrazoliumsalzes Iodonitrotetrazoliumchlorid zu Formazan durch den Katalysator Diaphorase unter Oxidation von NADH/H^+ . Die gebildete Formazanmenge ist hierbei direkt proportional zur LDH-Aktivität im Zellüberstand und somit zur Zytotoxizität des Stimulus (Decker und Lohmann-Matthes, 1988).

Zur Bestimmung der Zytotoxizität der Stimulanzen auf HUVEC, EA.hy926 und HT1080-Zellen wurden jeweils 15000 Zellen pro Well einer 96-Well-Platte ausgesät und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in serumfreiem Medium mit den entsprechenden Stimulanzen behandelt. Als Negativkontrolle wurde unbehandeltes Medium und als Positivkontrolle 0,1% Triton-X-100 (v/v) verwendet. Nach 24-stündiger Stimulation wurde die 96-Well-Platte 10 min bei 250 g zentrifugiert und 100 μl der zellfreien Überstände auf eine neue 96-Well-Platte überführt. Nach der Zugabe von 100 μl *LDH-Substratmix* (Roche) pro Well wurde die Platte lichtgeschützt für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption des gebildeten Formazans bei 500 nm.

Aus den gemessenen Absorptionswerten der Kontrollen und der Stimulanzen wurde nach folgender Formel der Zytotoxizitätsanteil berechnet:

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

3.2.9 Apoptosetest

Die apoptotische Wirkung der Stimulanzen auf Zellen wurde mit dem *Cell MeterTM Phosphatidylserine Apoptosis Assay Kit* von *AAT Bioquest[®]* festgestellt, das auf dem Nachweis der Translokation von Phosphatidylserin (PS) beruht. Während der Apoptose wird PS an die äußere Schicht der Plasmamembran transportiert. Das Auftreten von PS auf der Zelloberfläche ist ein universales Zeichen der Initial- bzw. Zwischenstadien der Zellapoptose und kann früher als die morphologischen Veränderungen beobachtet werden (Koulov et al., 2003). Der PS-Sensor *ApopxinTM* zeigt eine grüne Fluoreszenz nach seiner Bindung an PS, deren Intensität bei 490/520 nm gemessen werden kann.

Zur Bestimmung der apoptotischen Effekte der verwendeten Stimulanzen auf EA.hy926 wurden 30000 Zellen pro Well einer 96-Well-Platte ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in serumfreiem Medium mit den entsprechenden Stimulanzen behandelt. Unbehandeltes Medium wurde als Negativkontrolle verwendet. Nach 24 h Stimulation wurden 100 µl *ApopxinTM Green assay working solution (AAT Bioquest[®])* pro Well zugegeben. Die 96-Well-Platte inkubierte lichtgeschützt bei Raumtemperatur für 1 h. Nach der Zentrifugation der Platte bei 49 g für 2 min wurde die Fluoreszenzintensität von *ApopxinTM* bei 490/520 nm bestimmt.

Aufgrund der erhöhten Autofluoreszenz von HT1080, die die Bestimmung der Fluoreszenzintensität von *ApopxinTM* störte, war die Durchführung des Apoptosetests mit diesen Zellen nicht möglich.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA-Isolation aus Zellüberständen

Nach dem Abschluss der Stimulation wurden die Zellüberstände unter anderem zur Quantifizierung des RNA-Gehalts aufgehoben. Um die RNA vor den im Überstand

enthaltenen RNasen zu schützen, wurden 80 U/ml RNH1 in die Proben gegeben, die bis zur Bearbeitung bei -80 °C gelagert wurden.

Zur Isolierung der RNA wurde das *MasterPure RNA Purification Kit* von *Epicentre* verwendet. Zunächst sollten die in den Zellüberständen vorhandenen Proteine verdaut werden. Deswegen wurden 400 µl *Tissue and Cell Lysis Solution* und 50 µg Proteinase K in 100 µl der Proben zugegeben, die anschließend 15 min bei 65 °C inkubierten. Nach einer weiteren 10-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Ausfällung der Proteine durch Zugabe von 250 µl *MPC Protein Precipitation Reagenz*. Die Proben wurden zweimal bei 10000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, wodurch die ausgefällten Proteine pelletiert und verworfen wurden. Der proteinfreie Überstand wurde mit 600 µl eiskaltem Isopropanol versetzt und einmal bei 10000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Dadurch wurden die Nukleinsäuren ausgefällt und pelletiert. Das Nukleinsäurepellet wurde zweimal mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst.

Die Quantifizierung der RNA erfolgte mit dem *QubitTM RNA Assay Kit* von *Invitrogen*. *RNA Buffer A* und *RNA Buffer B* wurden im Verhältnis 1:200 zu einem Arbeitsreagenz gemischt, das einen spezifischen RNA bindenden Farbstoff enthält. Nach seiner Bindung an RNA fluoresziert der Farbstoff und der RNA-Gehalt kann dadurch mit einem Fluorometer detektiert werden. Als Negativkontrolle bzw. Positivkontrolle dienten die im Kit enthaltenen *RNA-Standards#1* bzw. *#2*. Nach der Mischung der Standards bzw. der Proben im Verhältnis 1:200 mit dem Arbeitsreagenz und einer zweiminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA-Konzentration unter Verwendung des *QubitTM Fluorometers* von *Invitrogen* bestimmt.

Die Berechnung der RNA-Konzentration im Zellüberstand erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Konzentration (ng/ml)} = \text{Messwert (ng/ml)} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.3.2 RNA-Isolation aus Zelllysaten

Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 250 µl *Lysisbuffer* des *GenEluteTM Mammalian Total RNA Kits* von *Sigma* lysiert. Die Zelllysate wurden auf

Filtrationssäulen geladen und für 2 min bei 14000 g zentrifugiert, um noch vorhandene Zellbestandteile zu zerkleinern. Der Durchfluss wurde mit 250 µl 70% Ethanol gemischt, auf eine RNA-bindende Silica-Säule überführt und für 30 Sekunden (Mallat et al.) bei 14000 g zentrifugiert. Der neue Durchfluss wurde verworfen und die an der Säule gebundene RNA einmal mit *Waschpuffer 1* und zweimal mit *Waschpuffer 2* gewaschen. Im Anschluss wurde die Säule für 2 min bei 14000 g trocken zentrifugiert, die RNA mit 30 µl *Elutionspuffer* von der Säule eluiert und deren Konzentration photometrisch bestimmt (siehe 3.3.3).

3.3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch unter Anwendung eines UV-Spektralphotometers. Die Proben wurden vor der Messung mit destilliertem Wasser verdünnt und in Küvetten überführt. Die Absorptionsbestimmung erfolgte bei 260 nm, weil einzel- und doppelsträngige Nukleinsäuren bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum aufweisen. Als Referenzwert galt die Absorption des destillierten Wassers. Für die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration ist neben der Absorption bei 260 nm und dem Verdünnungsfaktor der Multiplikationsfaktor (MF) notwendig. Der Letzte ist für jede Nukleinsäureklasse spezifisch und ergibt sich aus den Konzentrationen der Nukleinsäuren bei einem pH-Wert von 7,0 und der Absorption $A_{260\text{nm}} = 1,0$:

dsDNA	50 µg/ml
ssDNA	30 µg/ml
RNA	40 µg/ml
Oligonukleotide	30 µg/ml

Somit berechnet sich die Nukleinsäurekonzentration nach folgender Formel:

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

Zusätzlich zu der Absorption bei 260 nm wird die Absorption bei 280 nm gemessen. Das Verhältnis $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ ist für die Reinheit der Probe entscheidend und sollte im Bereich 1,8 – 2,0 liegen. Niedrigere Werte sind ein Zeichen für die Anwesenheit von Proteinen, Phenol oder anderen Verunreinigungen, die stark bei oder in der Nähe von 280 nm absorbieren.

3.3.4 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription erfolgt die Umschreibung der Sequenzabfolge einer RNA in eine komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT). Dabei handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die sowohl RNA- als auch DNA-Sequenzen als Template verwenden kann. Im ersten Schritt lagert sich die Polymerase dem RNA-Einzelstrang an kurzen DNA-Sequenzen an, den sogenannten *Random Primern*. Diese heften sich an die RNA per Zufall an und die RT synthetisiert an ihrem 3'-OH-Ende durch Einbau der Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP) den komplementären DNA-Strang. Im zweiten Schritt findet die Hydrolyse des Hybridstranges aus RNA-DNA über eine Exoribonukleaseaktivität der RT statt. Im Anschluss wird ein kompletter DNA-Doppelstrang gebildet.

Die cDNA wurde aus der gewonnenen RNA (siehe 3.3.2) hergestellt. Für die cDNA-Synthese wurde das *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)* mit dem folgenden Reaktionsansatz verwendet:

Reaktionsansatz	
10x Puffer	2 µl
<i>Random Primer</i>	2 µl
dNTP (100 mM)	0,80 µl
RNH1 (40 U/ml)	0,20 µl
RT	0,5 µl
RNA	1 µg
H ₂ O	ad 20 µl

Um die RNA-Expression verschiedener Zelllinien vergleichen zu können, wurde jeweils 1 µg RNA verwendet. Zum Schutz der RNA vor einem vorzeitigen Abbau durch RNasen wurde zusätzlich RNH1 in den Reaktionsansatz gegeben. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit destilliertem Wasser auf 20 µl aufgefüllt und in den *Thermocycler* aufgestellt.

Anfangs wurden die Reaktionsansätze im *Thermocycler* 10 min bei 65°C inkubiert, um die Sekundärstrukturen der RNA zu denaturieren. Danach folgte die reverse Transkription über 60 min bei 42°C. Abschließend wurde die RT für 15 min bei 72°C inaktiviert, die cDNA auf 4°C abgekühlt und bei -20°C gelagert.

3.3.5 Semi-quantitative Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur *in vitro* Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente, die 1987 von K. B. Mullis entwickelt wurde (Mullis und Faloona, 1987). Durch die Vervielfältigung von cDNA und Analyse der Expressionsrate der zugrundeliegenden RNA sind Unterschiede zwischen Geweben bzw. verschiedenen Behandlungen nachweisbar.

Der Reaktionszyklus der PCR besteht aus drei Schritten:

1. Denaturierung
2. Hybridisierung der Primer (*Annealing*) und
3. Elongation

Zunächst wird die doppelsträngige DNA für 3 min bei 95°C erhitzt, um die DNA-Stränge durch Lösen der Wasserstoffbrückenbindungen zu trennen und somit die Anlagerung von Primern, kurzen DNA-Oligonukleotiden, an die einzelsträngigen DNA-Strukturen zu ermöglichen. Um die Hybridisierung der Primer zu sichern, wird die Temperatur 30 sec lang auf einem primerspezifischen Wert (zwischen 55 und 65°C) gehalten. Die DNA-Polymerase synthetisiert im dritten Schritt von den Primern ausgehend die zur DNA komplementären Stränge in 5'-Richtung bei einer Temperatur von 72°C. Am Ende sind aus zwei DNA-Einzelsträngen, zwei DNA-Doppelstränge entstanden. Die Wiederholung dieser drei Schritte ermöglicht die exponentielle Vervielfältigung der DNA.

Für die semi-quantitative PCR wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Reaktionsansatz	
<i>2x GoTaq Green Mastermix (Promega)</i>	5 µl
<i>Forward Primer (10 µM)</i>	0,5 µl
<i>Reverse Primer (10 µM)</i>	0,5 µl
H ₂ O	3 µl
cDNA	1 µl
Endvolumen	10 µl

Der *GoTaq Green Mastermix (Promega)* enthielt eine hitzestabile DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase), dNTPs sowie MgCl₂ und Reaktionspuffer in optimalen Konzentrationen für die effiziente Amplifikation von DNA. Außerdem enthielt es zwei

Probenpuffer (blau und gelb), die das direkte Auftragen der Proben nach der PCR-Reaktion auf ein Agarosegel ermöglichen.

Im Thermocycler wurden folgende Parameter für die PCR-Reaktion eingestellt:

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

Die optimale Anzahl der Zyklen hängt von der jeweiligen Expression des Gens und die Annealing-Temperatur von der Sequenz der Primer ab:

Gen	Sequenz (5'-3')	Annealing-Temperatur	Zyklen	Produktgröße
Angiogenin (NM_001145)	F: TTTTGGTTGTTGGTCTTCGTGCTG R: TGCGCTTGTTGCCATGAATAA	56,4 °C	33	207 bp
GAPDH (NM_002046.3)	F: CCACATCGCTCAGACACCAT R: CGCAACAATATCCACTTTACCAGAG	58 °C	26	114 bp
RNH1 (NM_002939.3)	F: AAGTGGTCAGGCTGGACGACT R: TCAGGCAGCAGTTCTGGAGG	56,4 °C	24	201 bp
RNase 1 (NM_198235.2)	F: GAATCCCGGGCCAAGAAATTC R: GTGTCTCTCCTTCGGGCTGGT	56,4 °C	31	312 bp
β-Aktin (NM_001101.3)	F: ATTGCCGACAGGATGCAGAA R: GCTGATCCACATCTGCTGGAA	56,4 °C	26	150 bp
VEGF-α (NM_001025366)	F: ACAACAAATGTGAATGCAGACCA R: TCGTTTTTGCCCCTTCCCT	55,5 °C	32	86 bp

3.3.6 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Diese Methode dient der Größenbestimmung von DNA-Fragmenten durch deren Vergleich mit DNA-Sequenzen bekannter Größe nach Anlegen einer Spannung. Hierfür wird ein 1,5%-iges (w/v) Agarosegel mit 1 x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) hergestellt und mit 1% (v/v) Ethidiumbromid versetzt. Pro Tasche wurden jeweils 5 µl DNA-Probe bzw. 5 µl Marker (*GeneRuler 100 bp DNA-Ladder, Fermentas*) aufgetragen. Durch das Anlegen einer Spannung von 100 V für 45 min wanderten die negativ geladenen DNA-Fragmente zur Anode. Die Interaktion von Ethidiumbromid mit der DNA ermöglichte die Detektion der stark fluoreszierenden PCR-Produkte mittels UV-Bestrahlung und deren fotografische Dokumentation.

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

Tris	40 mM
Essigsäure	20 mM
EDTA	1 mM

3.3.7 Transfektion von Zellen mit siRNA

Für die Transfektionsversuche wurden jeweils 180000 Zellen pro Well einer 6-Well Platte in Wachstumsmedium ausgesät. Die Transfektion der Zellen erfolgte durch Lipofektamin. Bei dieser Methode bildet siRNA (*small interfering RNA*) einen Komplex mit den kationischen Lipiden, die in dem Transfektionsreagenz enthalten sind. Nach der endozytotischen Aufnahme dieses Komplexes in die Zelle wird die siRNA in das Zytoplasma freigesetzt (Felgner et al., 1994; Felgner et al., 1987). Dort bindet sie an ihre Ziel-mRNA und ruft die Herunterregulation des entsprechenden Proteins hervor (Hamilton und Baulcombe, 1999; Elbashir et al., 2001).

In Vorversuchen wurden verschiedene Verhältnisse zwischen Transfektionsreagenz und siRNA getestet, um die Effizienz der Transfektion zu maximieren. Die optimale siRNA-vermittelte Herunterregulation wurde sowohl bei EA.hy926 als auch bei HT1080 mit einer Endkonzentration von 75 nM siRNA und 0,4% (v/v) Transfektionsreagenz erreicht. Nach der Verdünnung beider Substanzen mit Basalmedium zu einem Endvolumen von je 100 µl wurden diese vorsichtig gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit die Lipid-Nukleinsäure-Komplexe gebildet werden. Im weiteren Verlauf wurden die Komplexe mit 800 µl Antibiotikafreiem Basalmedium für 4 h auf die Zellen gegeben. Am Ende dieser Inkubation wurde das Transfektionsmedium verworfen und durch 2 ml Wachstumsmedium ersetzt. 48 h nach der Transfektion konnten die Zellen lysiert und die Überstände gesammelt werden.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Nach 24-stündiger Stimulation bzw. 48 h nach der Transfektion wurden die in 10 cm Zellkulturschalen bzw. in 6-Well Zellkulturplatten ausgesäten Zellen geerntet. Dazu wurden die adhärennten Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS durch Zugabe von

500 µl (10 cm Zellkulturschalen) bzw. 80 µl (6-Well Zellkulturplatten) frisch angesetztem RIPA-Puffer (*Radioimmunoprecipitationsassay*) lysiert.

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

Nach zweimaliger 15-sekündiger Ultraschallbehandlung wurden die Proben für 10 min bei 10000 g und 4 °C zentrifugiert, um vorhandene Zelltrümmer und -kerne zu entfernen. Die Pellets wurden verworfen während die Proteinextrakte in neue Eppis überführt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.4.2 Konzentrierung von Zellüberständen

Damit die Konzentration der im Zellüberstand enthaltenen Proteine für deren Untersuchung ausreichend hoch ist, musste das Volumen der Zellüberstände reduziert werden. Die Volumenreduktion erfolgte unter Anwendung von Aufkonzentrierungsröhrchen (*Millipore*) mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa. Die in die Aufkonzentrierungsröhrchen überführten Überstände wurden bei 4000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Um im Konzentrat enthaltene Salze zu entfernen, wurde es dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen, während der Durchfluss jeweils verworfen wurde. Anschließend wurde das Endvolumen des Konzentrats auf 100 µl eingestellt.

3.4.3 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurde photometrisch durch Anwendung des *Pierce BCA Protein Assay Kits* von *Thermo Scientific* durchgeführt. Bei dieser, auf der Biuret-Reaktion beruhenden Methode, werden zweiwertige Kupferionen in alkalischer Lösung von Proteinen reduziert und die dadurch entstandenen einwertigen Kupferionen von Bicinchoninsäure (BCA) detektiert. Durch

die Chelatbildung aus zwei Molekülen BCA und einem einwertigen Kupferion entsteht ein violettes, wasserlösliches Reaktionsprodukt, das eine starke Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm aufweist (Smith et al., 1985; Wiechelman et al., 1988). Die Absorption ist nahezu linear zur steigenden Proteinkonzentration. Da Studien gezeigt haben, dass die Farbeentwicklung nicht nur durch die Summe individueller, funktioneller Gruppen zu Stande kommt, wird die Proteinkonzentration der zu untersuchenden Probe immer im Vergleich zu Standardproteinproben (BSA) bestimmt und dargestellt.

Es wurden 5 µl der jeweiligen Probe bzw. 5 µl Standard als Doppelbestimmung in die Wells einer 96-Well-Platte pipettiert. Hierzu wurden 100 µl Reagenzlösung, bestehend aus einem Teil Reagenz A und 1/20 Teil Reagenz B, hinzugegeben. Nach der Inkubation der Proben bei 37°C für 30 min wurde die Extinktion bei 562 nm gemessen und anhand der bovinen Serumalbumin-Standardkurve der Proteingehalt berechnet.

3.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein stark negativ geladenes Detergens, das durch Bindung seines Fettsäureanteils an hydrophobe Bereiche von Proteinen zur ihrer Entfaltung und somit zur Zerstörung nicht-kovalenter Wechselwirkungen innerhalb der Proteine führt. SDS bindet in einem konstanten Verhältnis (1 SDS-Molekül pro 1,5-2 Peptidbindungen) an Proteine, wodurch diese eine stark negative zu ihrer Masse proportionale Ladung erhalten, die deren Eigenladung überlagert. Somit ist die Trennung der Proteine nach ihrer Masse innerhalb des Polyacrylamidgels möglich. Die Zugabe von 10%-igem β -Mercaptoethanol im Probenansatz führt zur Reduktion von Disulfidbrücken, sodass über Disulfidbrücken stabilisierte Konformationen aufgehoben und über Disulfidbindungen verbundene Proteinkomplexe in Einzelbestandteile zerlegt werden.

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden 20 µg Protein mit der entsprechenden Menge vierfach konzentriertem Probenpuffer versetzt und bis zur Einstellung des Endvolumens von 40 µl mit destilliertem Wasser gemischt. Das Erhitzen der Proben für 10 min bei 95°C erleichterte die Spaltung der nicht-kovalenten Bindungen durch SDS. Anschließend wurden die vorbereiteten Proben und 5 µl eines

Proteinmarkers (*Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher*), der Standardproteine einer bekannten Größe enthält, auf das Gel aufgetragen.

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

Die Auftrennung der Proben erfolgte mittels des von Ulrich Lämmler entwickelten diskontinuierlichen elektrophoretischen Systems mit Tris-Glycin-Puffern (Laemmli, 1970). Die Polyacrylamidmatrix dieses Systems setzt sich aus zwei Teilen zusammen, einem Sammel- und einem Trenngel, die sich sowohl in ihrem pH-Wert als auch in ihrer Porengröße unterscheiden. Zuerst wandern die Proteine in dem weitporigen Sammelgel, in dem sie in einer scharfen Bande konzentriert werden und anschließend in dem engmaschigen Trenngel, in dem die Auftrennung nach ihrer Molmasse erfolgt.

Die Zusammensetzung der Gele wird im folgenden Schema dargestellt:

	Trenngel		Sammelgel
	12,5%	15%	5%
Trenn- bzw. Sammelgelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Acrylamid (30%)	4,2 ml	5,0 ml	1,65 ml
H ₂ O	3,2 ml	2,4 ml	5,7 ml
Ammoniumpersulfat	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl
Endvolumen	10 ml	10 ml	10 ml

Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V unter Verwendung von SDS-Laufpuffer als Elektrolyt durchgeführt.

Trenngelpuffer: pH 8,8	
Tris	1,5 M
SDS	0,4% (w/v)

Sammelgelpuffer: pH 6,8	
Tris	0,5 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

Die Western-Blot-Analyse diente dem Nachweis von Proteinen in einem Proteingemisch, das zuvor mittels SDS-PAGE-Gelelektrophorese entsprechend der Proteingröße in einzelne Proteinbanden aufgetrennt wurde. Nach der Trennung des Proteingemischs erfolgte die Übertragung der Polypeptidbanden auf eine Trägermembran durch das Anlegen eines senkrecht zum Polyacrylamidgel gerichteten elektrischen Feldes unter Erhaltung des elektrophoretischen Auftrennungsmusters. Dieses Verfahren wurde erstmals 1979 von Towbin *et al.* unter Verwendung einer Nitrocellulosemembran beschrieben (Towbin *et al.*, 1979), während neun Jahre später Gültekin und Heermann die Polyvinylidendifluoridmembran einführten (Gulteкин und Heermann, 1988). Bei Polyvinylidendifluoridmembranen, die auch in dieser Arbeit verwendet wurden, blieben Proteine aufgrund hydrophober und polarer Wechselwirkungen an der Membranoberfläche haften und konnten mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert werden (Towbin *et al.*, 1979). Während des Transfers wurde Blot-Puffer als Elektrolyt 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)

Die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran wurden durch 60-minütiges Blocken mit *Rotiblock* bzw. 5% Milchpulver (w/v) in TBS-T abgesättigt. Der Proteinspezifische Erstantikörper verblieb über Nacht bei 4 °C auf der Membran. Unspezifisch gebundener Antikörper wurde durch viermaliges Waschen mit TBS-T entfernt. Anschließend inkubierte die Membran mit einem mit Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelten Sekundäantikörper für 60 min bei Raumtemperatur. Nach weiterem viermaligem Waschen mit TBS-T erfolgte die Entwicklung der Membran mit dem *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare) nach den Vorgaben des Herstellers. Das im Reagenz enthaltene Luminol wurde von der an den Sekundäantikörper gekoppelten HRP oxidiert, wodurch in Höhe des gesuchten Proteins ein Chemilumineszenzsignal abgegeben wurde, das mit Röntgenfilmen detektierbar war.

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

Tris	25 mM
NaCl	150 mM
KCl	3 mM

Für die Herstellung von TBS-T wurde zusätzlich 0,1% Tween-20 (w/v) zugegeben.

Um die Membran erneut mit weiteren Antikörper behandeln zu können, mussten die aufgetragenen Erst- und Zweitantikörper durch Inkubation der Membran mit einem Glycin-HCL-haltigen Puffer (pH 2,5) entfernt werden. Hierfür erfolgte nach dem Entwickeln das dreimalige Waschen der Membran mit TBS-T, das zur Entfernung der ECL-Lösung diente. Nach der 90-minütigen Inkubation der Membran mit *Stripping*-Puffer bei Raumtemperatur wurde sie viermal mit TBS-T gewaschen. Anschließend konnte die Membran wieder blockiert und mit dem neuen Erstantikörper behandelt werden.

Primärantikörper (Name, Spezies, Verdünnung)	Sekundärantikörper (Name, Spezies, Verdünnung)
Angiogenin <i>Goat polyclonal-anti-human-Angiogenin</i> 1:500 in 1% BSA (w/v) in TBS-T	<i>Rabbit polyclonal-anti-goat IgG HRP</i> 1:3000 in 5% Milchpulver (w/v) in TBS-T
RNase 1 <i>Chicken polyclonal-anti-human-RNase 1</i> 1:1000 in 1% BSA (w/v) in TBS-T	<i>Donkey polyclonal-anti-chicken IgG HRP</i> 1:5000 in 5% Milchpulver (w/v) in TBS-T
RNH1 <i>Goat polyclonal-anti-human-RNH1</i> 1:500 in 1% BSA (w/v) in TBS-T	<i>Rabbit polyclonal-anti-goat IgG HRP</i> 1:3000 in 5% Milchpulver (w/v) in TBS-T
β-Aktin <i>Mouse anti-human-β-Actin</i> 1:20.000 in 1% BSA (w/v) in TBS-T	<i>Goat polyclonal-anti-mouse IgG HRP</i> 1:5000 in 5% Milchpulver (w/v) in TBS-T

***Stripping*-Puffer (Glycin-HCl Puffer): pH 2,5**

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

3.4.6 Enzymatische Bestimmung der Ribonuklease-Aktivität

Die Bestimmung der RNase-Aktivität beruht auf der 1965 von Zimmermann *et al.* beschriebenen Methode (Zimmerman SB, 1965). Als Substrat für die enzymatische Spaltung durch RNasen wurde die synthetische Nukleinsäure Poly:C verwendet. Nach dieser Methode kommt es zur Ausfällung des unverdauten Substrats und zum photometrischen Nachweis der entstandenen Nukleotide wodurch die RNase-Aktivität

berechnet werden kann. Initial wurden die Zellüberstände, wie unter 3.2.6. beschrieben, aufbereitet und von abgestorbenen Zellen befreit. Die Isolation der Mikrovesikelfractionen erfolgte wie unter 3.5.1. beschrieben. Im Verlauf wurden 20-100 µl von Zellüberständen und Mikrovesikelfractionen sowie 1 µl rekombinanter boviner RNase A, die als Positivkontrolle diente, mit RNase Puffer auf ein Gesamtvolumen von 150 µl eingestellt. Hinzu wurden jeweils 100 µl Poly:C als Substrat gegeben, sodass die Endkonzentration von Poly:C 400 µg/ml betrug. Die Proben inkubierten für 5 min bei 37°C im Thermoschüttler. Im Anschluss wurden 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) gemischt und 15 min auf Eis inkubiert, wodurch unverdautes Poly:C ausgefällt wurde. Nach der Zentrifugation der Proben bei 15000 g und 4°C für 15 min erfolgte die photometrische Bestimmung der Absorption bei 260 nm im Überstand bzw. in den Mikrovesikelfractionen. Aus den gemessenen Absorptionswerten wurde nach folgender Formel die Aktivität der Proben berechnet:

$$\text{Aktivität (U/ml)} = A_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 0,5$$

Die ausgerechneten Aktivitätswerte wurden auf 1 mg Gesamtproteinmenge der noch intakten Zellen in der Probe bezogen. Die gemessene RNase-Aktivität repräsentiert die gesamte Aktivität der im Zellüberstand enthaltenen ribonukleolytisch aktiven RNasen.

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

3.4.7 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen

Die massenspektrometrische Analyse von Zellysaten und -überständen wurde im Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim durchgeführt. Zur Identifikation von Proteinen wurde der *Q Exactive™ Hybrid-Quadrupol-Orbitrap Massenspektrometer* (Thermo Fisher Scientific, USA) verwendet, der mit dem vorgeschalteten *EASY-nLC 1000 Flüssigchromatograph* (Thermo Fisher Scientific, USA) Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*High performance liquid chromato-*

graphy, HPLC) mit Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) und Massenspektrometrie (MS) vereint.

Im ersten Schritt erfolgte die Auftrennung von 40 µg Zellysat bzw. -überstand mittels SDS-PAGE und die Visualisierung der Proteine über die Färbung mit *Coomassie Brilliant Blue R250*. Hierzu inkubierte das Gel in der Coomassie-Färbelösung für 60 min unter leichtem Schwenken. Anschließend wurde das Gel so lange mit Entfärbelösung gewaschen bis der Hintergrund nahezu vollständig klar und die Banden gut sichtbar waren. Die Gelbanden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und die trypsinierten Peptide extrahiert. Im weiteren Verlauf wurden die Proben mittels HPLC separiert. Dabei handelt es sich um eine Trennmethode, bei der die gelöste Probe in der mobilen Phase (Eluent) unter hohem Druck über die stationäre Phase (Trennsäule) transportiert und währenddessen in ihre Einzelkomponenten aufgetrennt wird.

Im nächsten Schritt wurden mittels Elektrospray-Ionisierung (ESI) Ionen erzeugt, die im IMS in einem elektrischen Feld gegen die Strömungsrichtung eines Gases drifteten. Ionen unterschiedlicher Masse und Struktur erreichen unterschiedliche Driftgeschwindigkeiten und lassen sich dadurch voneinander unterscheiden, bis sie zeitlich nacheinander auf einen Detektor auftreffen. Nach der Separation mittels IMS erfolgte die weitere Auftrennung der Ionen im MS.

Im Massenspektrometer wurden die Ionen durch das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) analysiert. Das Prinzip beruht darauf, dass Substanzen eines Substanzgemisches mit unterschiedlichem Molekulargewicht und unterschiedlicher Ladung auch unterschiedlich stark in einem elektrischen Feld abgelenkt werden und so voneinander getrennt auf ein Detektionssystem treffen, wo deren qualitative und quantitative Erfassung stattfindet.

Im Anschluss wurden die generierten Spektren mit *MaxQuant* (Schaab et al., 2012) analysiert. In diesem Programm ist die Suchmaschine *Andromeda* integriert, mit der ein Vergleich identifizierter Proteine mit bekannten Aminosäuresequenzen aus der *UniProtKB*-Datenbank (Consortium, 2014) durchgeführt wurde.

Coomassie-Färbelösung	
Methanol	40% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)
<i>Coomassie Blue R 250</i>	0,1% (w/v)
Entfärbelösung	
Methanol	40% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)

3.4.8 Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Um die Lokalisation eines bestimmten Proteins innerhalb einer Zelle bzw. eines Gewebes zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Hierfür erfolgte die Kultivierung der Zellen im Wachstumsmedium in einem 8-Well Objektträger. Für die Färbung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, für 10 min mit 4% Paraformaldehyd (w/v) in PBS fixiert, erneut einmal mit PBS gewaschen und für 10 min in 0,1% Triton-X-100 (v/v) in PBS inkubiert. Paraformaldehyd gehört zu den präzipitierenden Fixativen, die zum Ausfällen der Proteine durch das Auflösen hydrophober Wechselwirkungen führen. Durch die Fixierung bleibt die Zellstruktur erhalten und das Antigen wird nicht ausgewaschen. Zusätzlich ermöglicht die Inkubation mit Triton-X-100 den Zugang des Antikörpers zum Antigen durch das Permeabilisieren der Zellmembran. Im Anschluss an die Fixierung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 1 h mit 3% BSA (w/v) in TBS-T inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

Nach einmaligem Waschen mit PBS erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers, der für 1 h bei Raumtemperatur auf den Zellen verblieb. Unspezifische aus der gleichen Spezies wie der Primärantikörper isolierte Immunglobuline G (IgGs) wurden als Negativkontrolle verwendet, um unspezifische Wechselwirkungen mit dem Zielgewebe zu erfassen. Die Zellen wurden erneut dreimal mit PBS gewaschen und inkubierten für 1 h bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden mit Alexa-Farbstoff gekoppelten Sekundärantikörper, der Spezies-spezifische Epitope des Primärantikörpers erkannt hat. Die Alexa-488 Farbstoffe haben ein Emissionsmaximum von 519 nm (grün), während die Alexa-568 ein Emissionsmaximum von 603 nm (rot) aufweisen. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS erfolgte das Einbetten des Objektträgers in das Eindeckmedium *Vecta-Shield* mit DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) und seine Abdeckung mit

einem Abdeckglas, dessen Ränder mit Nagellack fixiert wurden. Die Objektträger konnten langfristig gelagert werden, da das Eindeckmedium die Fluoreszenz vor einer rapiden Abschwächung schützte. Die Lokalisation des Zellkerns erfolgte durch das im Eindeckmedium vorhandene DAPI, das nach Bindung an DNA blau mit einem Absorptionsmaximum von 358 nm und einem Emissionsmaximum von 461 nm fluoresziert.

Für die Dokumentation der Färbungen wurden Objektive für zwanzigfache sowie vierzigfache Vergrößerungen eines *Leica DMR Fluoreszenzmikroskops* verwendet. Die Analyse der Färbungen erfolgte mit der *Metamorph Imaging Software (Version 7.0)*.

Primärantikörper (Name, Spezies, Verdünnung)	Sekundärantikörper (Name, Spezies, Verdünnung)
Angiogenin <i>Goat polyclonal-anti-human-Angiogenin</i> 1:100 in 1% BSA (w/v) in TBS-T	<i>Alexa-488 donkey anti-goat IgG</i> 1:200 in 1% BSA (w/v) in TBS-T
RNase 1 <i>Rabbit polyclonal-anti-human-RNase 1</i> 1:100 in 1% BSA (w/v) in TBS-T	<i>Alexa-568 goat anti-rabbit IgG</i> 1:200 in 1% BSA (w/v) in TBS-T
RNHI <i>Goat polyclonal-anti-human-RNHI</i> 1:50 in 1% BSA (w/v) in TBS-T	<i>Alexa-488 donkey anti-goat IgG</i> 1:200 in 1% BSA (w/v) in TBS-T

3.5 Isolation und Analyse von Mikrovesikeln

3.5.1 Reinigen und Isolation der Mikrovesikel

Die Isolation der Mikrovesikelfractionen erfolgte durch eine Reihe von Zentrifugationsschritten bei Raumtemperatur direkt nach der Beendigung der jeweiligen Stimulationen. Zunächst erfolgte die Zentrifugation des Zellüberstandes für 10 min bei 300 g, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Der in 2 ml Reaktionsgefäße verteilte zellfreie Überstand wurde für 60 min bei 21000 g zentrifugiert, der neuentstandene Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert und die pelletierten MV in PBS resuspendiert. Die Mikrovesikelfraktion wurde erneut für 60 min bei 21000 g zentrifugiert und anschließend das Pellet entweder in PBS für Proteinbestimmung (siehe 3.4.3), Western-Blot-Analyse (siehe 3.4.5), RNase-Aktivitätsmessung (siehe 3.4.6) und RNA-Isolation (siehe 3.3.1) oder in *Annexin V Binding Buffer* für durchflußzytometrische Untersuchung (siehe 3.5.2) resuspendiert.

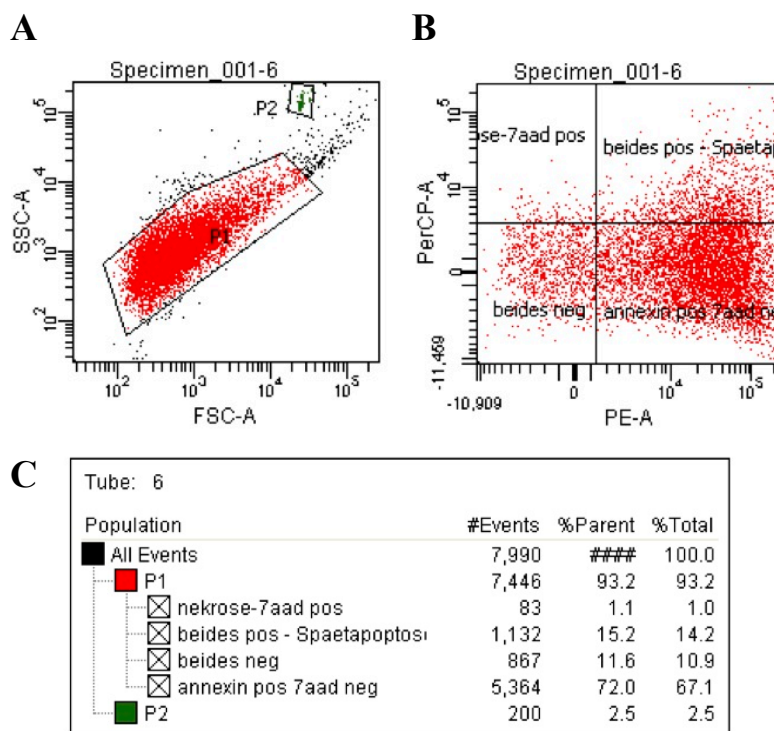
3.5.2 Charakterisierung von Mikrovesikeln mittels Durchflußzytometrie

Die Charakterisierung der isolierten MV erfolgte mittels durchflußzytometrischer Analyse. Diese auf Antigen-Antikörper-Reaktion beruhende Methode ermöglicht die quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen, intrazellulären Proteinen und DNA.

Zur Untersuchung der MV wurde das *PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I* von *BD Biosciences* verwendet. 90 µl der isolierten Fraktion wurden durch 15-minütige Inkubation mit 5 µl fluoreszenzmarkiertem Annexin V, das Ca²⁺-abhängig an anionische Phospholipide von Zellmembranen und vor allem an PS bindet, markiert (Koopman et al., 1994; Schutte et al., 1998). Zusätzlich wurden die Proben mit 5 µl 7-Aminoactinomycin D (7-AAD), einem fluoreszierenden Interkalator, versetzt. Seine Besonderheit besteht darin, dass er ausschließlich die DNA von nicht-lebenden Zellen färbt, da er nur in Zellen ohne intakte Zellmembran eindringen kann und somit als Marker für eine späte Phase der Apoptose und für Nekrose dient (Latt, 1977). Außerdem wurden den Proben 10 µl *SPHEROTM AccuCount Fluorescent Particles* (Zählpartikel) zur Quantifizierung der MV zugegeben. Nach der Überführung der Proben in für die Durchflußzytometrie geeignete Röhrchen erfolgte deren Analyse im *BD FACSCanto II Flow Cytometer (BD Biosciences)*. Während der Messung findet der Transport der Partikel über eine feine Kapillare in eine Meßkammer statt, in der jedes einzelne Partikel durch den Lichtstrahl eines Argonlasers (488 nm) erfasst wird. Sobald der Lichtstrahl auf ein Partikel trifft, wird er an seiner Oberfläche abgelenkt. Dadurch entsteht ein für jedes Partikel charakteristisches Streulicht, das von seiner Größe und Differenzierungsgrad abhängig ist. Das auf diese Weise gestreute Licht, sowie das zusätzlich emittierende Fluoreszenzlicht der Antikörper-gekoppelten Fluorophore werden über Linsen, Spiegel und Filtersysteme zu Photodetektoren geleitet, verstärkt und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Somit ist die Beurteilung der Partikel in Abhängigkeit von ihrer Größe (Vorwärtstreulicht, *Forward Scatter* (FSC)), ihrer Granularität und Struktur (Seitwärtstreulicht, *Side Scatter* (SCC)) und ihrer Fluoreszenzintensität möglich.

Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte über das Programm *FACSDiva Software Version 6.1.3 (BD Biosciences)*. Die Daten wurden als zweidimensionale „Punkt-Diagramme“ („*dot-plots*“) dargestellt und analysiert, wobei jedes gemessene

Partikel als Punkt an der x- und y-Position entsprechend seiner Intensität aufgetragen wurde. FSC- und SSC-Signale wurden in linearer, die Fluoreszenz-Signale in logarithmischer Darstellung präsentiert (Sack U, 2007).



In der durchflusszytometrischen Analyse der Proben erfolgte zuerst die Identifikation der MV anhand ihrer Größe bzw. Granularität durch Messung des FSC bzw. SSC, wie in der Abbildung A gezeigt wird. P1 stellt den Bereich dar, in dem sich MV befinden sollten, wobei alle diesen Kriterien entsprechenden gemessenen Partikel durch rote Punkte dargestellt werden. Alle anderen gemessenen Teilchen werden durch schwarze Punkte repräsentiert. Mithilfe von Feld P2 werden die Zählpartikel gezählt. Gestoppt wurden die Messungen immer dann, wenn 200 dieser Partikel gemessen wurden.

In der Abbildung B werden die gemessenen Fluoreszenzsignale der im Feld P1 detektierten Partikel wiedergegeben. Die x-Achse gibt hierbei Informationen über das an Annexin V gekoppelte *R-Phycoerythrin* (PE), während die y-Achse die Signale von an 7-ADD-gebundem *Peridinin-Chlorophyll-a* (PerCP) skaliert. Durch Einsetzen von Grenzen entstehen unterschiedlich große Quadrante, in denen die Anzahl der Partikel mit der jeweiligen Eigenschaft dargestellt wird.

Die Tabelle C präsentiert die Quantifizierung der gemessenen Partikel und anhand dieser kann die Anzahl an MV in einem Mikroliter Originallösung berechnet werden.

$$\text{Mikrovesikel}/\mu\text{l} = \frac{\text{Anzahl der Zählpartikel in } 10 \mu\text{l}}{\text{Testvolumen } (\mu\text{l})} \times \frac{\text{P1 Annexin positiv 7-AAD negativ}}{\text{P2 Zählpartikel}} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.6 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der hier vorliegenden Ergebnisse erfolgte unter Verwendung des Programms *GraphPad Prism 5 (Version 5.02)*.

Für die Prüfung der statistischen Signifikanz des Unterschiedes zwischen zwei Gruppen wurde der Einstichproben-t-Test verwendet. Der Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde mit der ein- bzw. zweifaktoriellen Varianzanalyse (*Analysis of variance*, ANOVA) und die Signifikanz durch den Bonferroni-Test geprüft. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als signifikantes Ergebnis angesehen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Reaktionen des Ribonuklease Inhibitor/Ribonuklease-Systems in Zellen der Tumorzelllinie HT1080 und der Endothelzelllinie EA.hy926 auf hypoxische, inflammatorische und apoptotische Stimuli

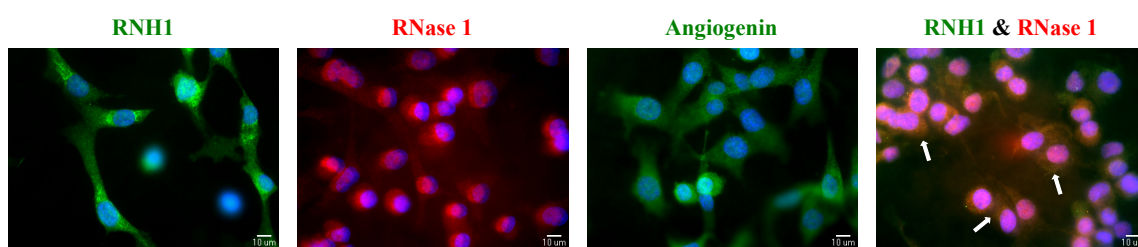
In der vorliegenden Arbeit sollten die intra- und extrazellulären vaskulären Funktionen des RNH1 unter Beteiligung von RNase 1 und 5 charakterisiert werden, um neue Erkenntnisse über die Beteiligung des RNH1 an der Regulation der vaskulären Homöostase und Angiogenese zu gewinnen.

4.1.1 Nachweis der Expression von Ribonuklease Inhibitor (RNH1), Ribonuklease 1 (RNase 1) und Angiogenin in HT1080- und EA.hy926-Zellen

Die Expression des RNH1 und seiner Interaktionspartner wurde in der Tumorzelllinie HT1080 und in der Endothelzelllinie EA.hy926 untersucht. Für die Lokalisierung von RNH1, RNase 1 und Angiogenin in diesen Zelllinien wurde zunächst die indirekte Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Aufgrund erhöhter Autofluoreszenz wurden keine Immunfluoreszenzfärbungen mit HT1080 durchgeführt. Stattdessen wurde die Tumorzelllinie HT29 verwendet, die eine ähnliche Morphologie und Eigenschaften wie die HT1080 aufweist. Die Färbung von unbehandelten Zellen zeigte die markante Verteilung von RNH1, RNase 1 und Angiogenin in HT29 und EA.hy926 unter Wachstumsbedingungen (Abbildung 12). Die weißen Pfeile markieren die Kollokalisierung von RNH1 und RNase 1 in den oben genannten Zelllinien.

Des Weiteren erfolgte der Nachweis von RNH1, RNase 1 und Angiogenin in Zelllysaten und -überständen von HT1080 und EA.hy926 mittels Western-Blot-Analysen, nachdem die Zellen 24 h mit Basalmedium behandelt wurden. Alle drei Proteine waren sowohl in den Lysaten als auch in den Zellüberständen beider Zelllinien detektierbar, was die intrazelluläre Verteilung und Freisetzung von RNH1, RNase 1 und Angiogenin durch die Tumor- und Endothelzellen bestätigte (Abbildung 13).

A



B

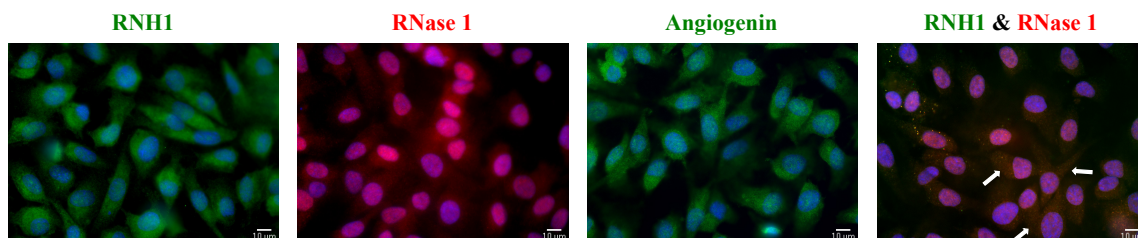


Abbildung 12: Fluoreszenzfärbung von HT29- oder EA.hy926-Zellen

(A) HT29- oder (B) EA.hy926-Zellen wurden auf 8-Well Objektträgern ausgesät, 24 h mit Wachstumsmedium behandelt und eine Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen RNH1 (grün), RNase 1 (rot) oder Angiogenin (grün) durchgeführt und mit 40-facher Vergrößerung analysiert. Die Aufnahmen entsprechen einem repräsentativen Versuch von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

A

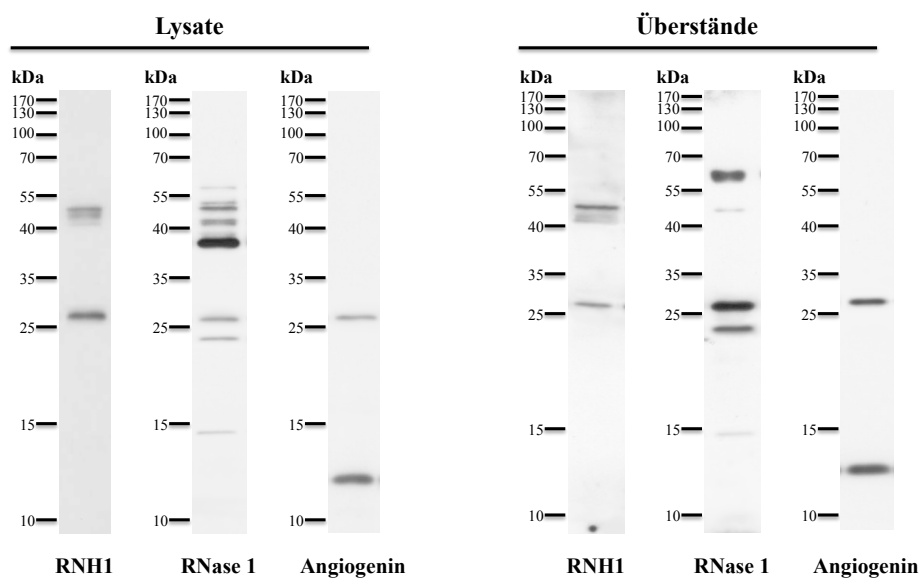
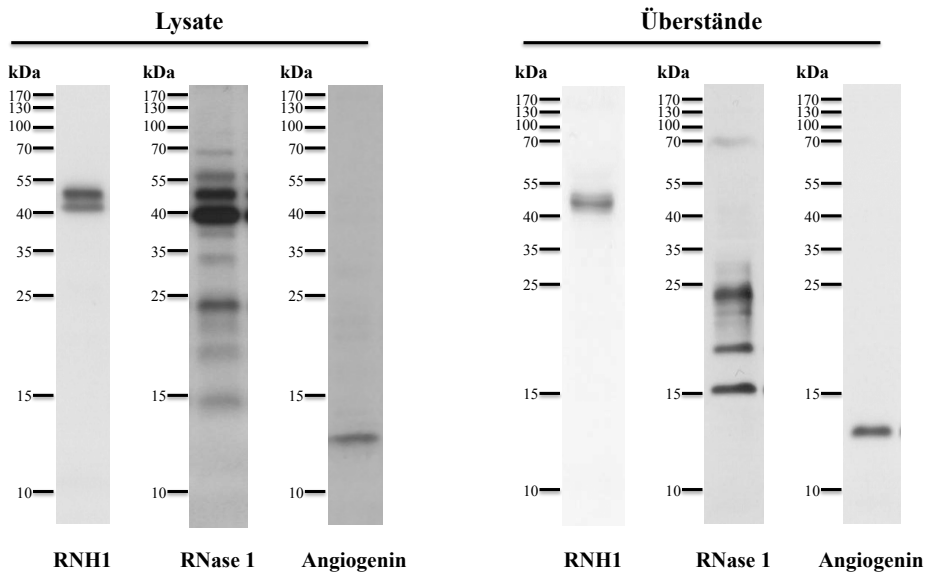


Abbildung 13: Western-Blots von Gelen nach SDS-PAGE von Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1 und Angiogenin aus Zelllysaten und -überständen von HT1080- und EA.hy926-Zellen

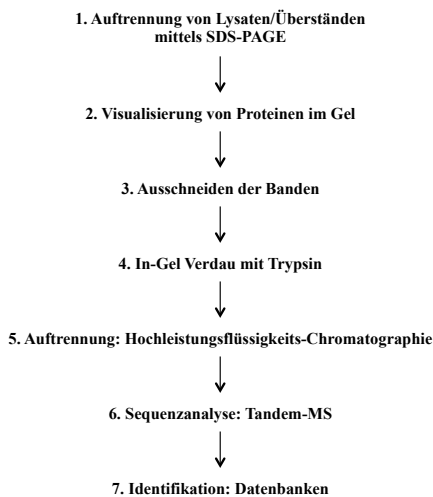
(A) HT1080- und (B, folgende Seite) EA.hy926-Zellen wurden über 24 h mit Basalmedium inkubiert. Zelllysate und konzentrierte Zellüberstände wurden mittels Western-Blot analysiert, wobei Primärantikörper gegen RNH1, RNase 1 und Angiogenin verwendet wurden. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

B



Bei der Anwendung von polyklonalen, gegen RNH1, RNase 1 oder Angiogenin gerichteten Antikörper, wurden in den Western-Blot-Analysen von Lysaten und Zellüberständen mehrere Banden detektiert. Um die Spezifität der verwendeten Antikörper zu überprüfen, wurden Lysate sowie Zellüberstände von HT1080 und EA.hy926 durch massenspektrometrische Methoden im Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim analysiert (Abbildung 14). Die für diese Arbeit relevanten identifizierten Proteine sind in der Tabelle 2 aufgelistet.

A



B

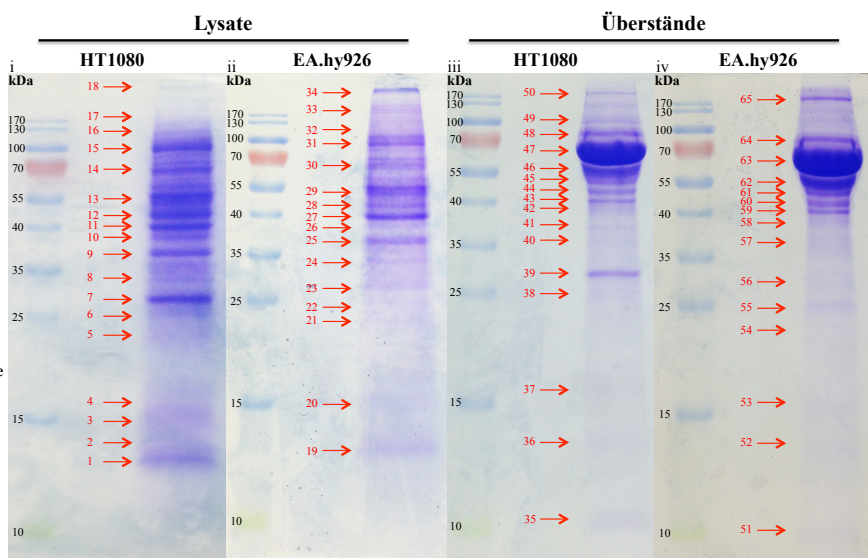


Abbildung 14: Identifikation von Proteinen im Zelllysat und -überstand von HT1080- und EA.hy926-Zellen

(A) Schematischer Ablauf der Teilschritte im Rahmen der Identifizierung der im Lysat und Überstand enthaltenen Proteine. (B) Zur Analyse ausgeschnittene Banden aus (i) HT1080- bzw. (ii) EA.hy926-Lysat und (iii) HT1080- bzw. (iv) EA.hy926-Überstand.

ERGEBNISSE

Tabelle 2: Mittels Massenspektrometrie identifizierte im Zelllysate oder -überstand von HT1080- und EA.hy926-Zellen enthaltene Proteine

Die Tabelle zeigt die anhand von Datenbankrecherchen identifizierten Proteine für die analysierten Banden 1-65 (Abbildung 16) aus Zelllysate oder -überstand von HT1080- und EA.hy926-Zellen.

Identifizierte Proteine	Lysate		Überstände	
	HT1080	EA.hy926	HT1080	EA.hy926
	Banden			
RNH1	9-13 (37-55 kDa) 18 (> 170 kDa)	25-29 (37-55 kDa) 33-34 (> 170 kDa)	42-44 (39-48 kDa) 50 (> 170 kDa)	59-62 (40-55 kDa) 64 (80 kDa) 65 (> 170 kDa)
RNH1, RNase 7	7 (26 kDa)		39 (26 kDa)	
RNase 1				54-55 (22-24 kDa)
RNase 1, RNase 4				53 (16 kDa)
RNase 4	4 (16 kDa)		37 (16 kDa)	
Angiogenin	1 (12 kDa)	19 (12 kDa)	36 (12 kDa)	52 (12 kDa)

Die Proteinbanden, die RNH1, RNase 1 bzw. Angiogenin im Western-Blot repräsentieren, wurden nach Vergleich der Molmassen der ausgeschnittenen Banden (Abbildung 14) mit den detektierten Signalen aus den Western-Blot-Analysen (Abbildung 13) zugeordnet. Dadurch wurden die 40-55 kDa Banden als RNH1 und die 12 kDa Banden als Angiogenin auf den entsprechenden Western-Blots von HT1080- bzw. EA.hy926-Lysaten oder -Überständen identifiziert und für die quantitative Auswertung eingesetzt.

Massenspektrometrische Analysen wiesen RNase 1 in Banden mit Molmassen zwischen 15 und 24 kDa in Zellüberständen von EA.hy926 nach, während in den EA.hy926- bzw. HT1080-Lysaten oder HT1080-Überständen keine RNase 1 detektiert werden konnte. Stattdessen wurde in den HT1080-Lysaten und -Überständen sowie in den EA.hy926-Überständen RNase 4 in der Bande mit einer Größe von 16 kDa massenspektrometrisch nachgewiesen. Für die Quantifizierung des RNase 1-Gehalts in den Endothelzellen wurden die Banden mit Molmassen zwischen 15 und 24 kDa densitometrisch ausgewertet. Da eine Trennung zwischen RNase 1 und der in diesem Größenspektrum von Proteinbanden (15-24 kDa) miterfaßten RNase 4 (16 kDa) durch die Anwendung von polyklonalen Antikörpern nicht machbar war, wurde bei der Quantifizierung der RNase 1-Konzentration der Begriff „RNase 1/(RNase) 4“ bzw. „RNase 1/RNase 4-immunoreaktives Material“ verwendet. Auch bei den nachfolgend beschriebenen

Versuchsserien, entsprechen die angegebenen RNH1- bzw. Angiogenin Konzentrationen der Menge an RNH1- bzw. Angiogenin-immunreaktivem Material.

Ein wichtiger Unterschied zwischen HT1080 und EA.hy926 bestand darin, dass die Western-Blot-Analyse der Lysate und Überstände von HT1080 eine zusätzliche ~26 kDa Bande beim Nachweis sowohl des RNH1 als auch der unterschiedlichen RNasen zeigte, die aber bei den Western-Blot-Analysen von EA.hy926-Lysaten und deren Überständen nicht detektiert wurde (Abbildung 13A vs. 13B). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um ein- und dieselbe Substanz, die mit allen drei polyklonalen Antikörpern nachgewiesen wurde. Mittels massenspektrometrischer Analyse wurden RNH1 und RNase 7 in dieser Bande identifiziert. Das gleichzeitige Vorkommen von RNH1 und RNase 7 in der 26 kDa Bande konnte ein Hinweis darauf sein, dass in dieser Bandenhöhe die durch Sonifikation entstandenen Fragmente der Bindungssequenz zwischen RNasen und RNH1 enthalten sind. Deswegen wurde dieses in den Banden mit einer Größe von 26 kDa nachgewiesene Protein-immunoreaktive Material bei der Western-Blot-Quantifizierung von RNH1 und der unterschiedlichen RNasen in HT1080-Lysaten und -Überständen mit berücksichtigt aber getrennt und von den für jedes Protein identifizierten Banden ausgewertet. Basierend auf den hier dargestellten Ergebnissen der Massenspektrometrie erfolgte die quantitative Auswertung der Western-Blot-Analysen auch bei allen weiteren Versuchen.

4.1.2 DNA (aus mRNA, Transkriptionsprodukt) und Protein-immunoreaktives Material (Translationsprodukt) von Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1 und Angiogenin in Zellüberständen und Zelllysaten von HT1080-Zellen innerhalb einer 24-stündigen Stimulation mit TNF α , LPS oder Hypoxie

4.1.2.1 Ribonuklease Inhibitor-immunoreaktives Material

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von proinflammatorischen Substanzen auf die Expression und Freisetzung von RNH1 und dessen Interaktionspartner RNase 1/4 und Angiogenin auf Gen- und Proteinebene analysiert. Hierzu wurden HT1080 zeitabhängig mit Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Lipopolysacchariden (LPS) stimuliert sowie

hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Im Anschluss wurden die Zelllysate und deren Überstände für Western-Blot-Analysen und RNase-Aktivitätstests verwendet.

Während LPS weder auf die Präsenz im Zelllysate noch auf die Freisetzung in den Zellüberstand der drei Proteine Einfluss hatte, führten TNF α und Hypoxie zu signifikanten Unterschieden in der intrazellulären Konzentration und Freisetzung von RNH1, RNase 1/RNase 4 und Angiogenin.

Im Einzelnen ergab die Stimulation mit TNF α bzw. Hypoxie bereits nach 12 h eine signifikante Zunahme der Freisetzung vom RNH1 auf 132% bzw. auf 160% bezüglich des Kontrollwertes. Die maximale Freisetzung vom RNH1 unter diesen Bedingungen wurde nach 24 h erreicht und betrug 142% nach TNF α - bzw. 186% nach hypoxischer Behandlung (Abbildungen 15a, 15b). In den Zelllysaten war nach diesen Stimulationen eine Abnahme der RNH1-Konzentration zu verzeichnen, die nach 24 h bei 71% bzw. bei 62% des Kontrollwertes lag (Abbildungen 16a, 16b).

A

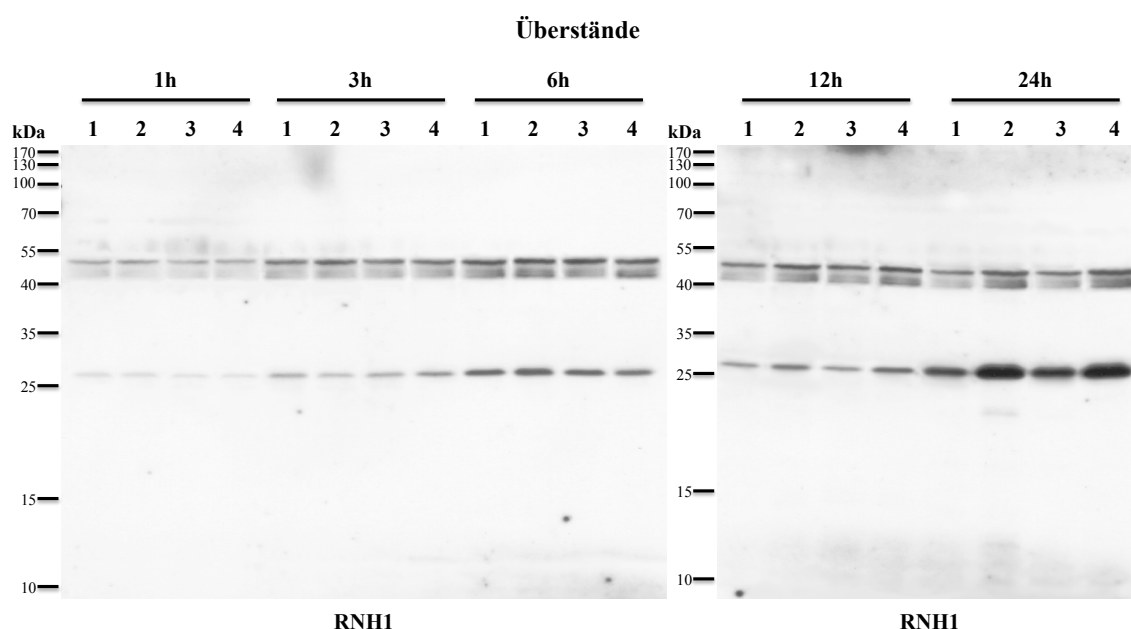
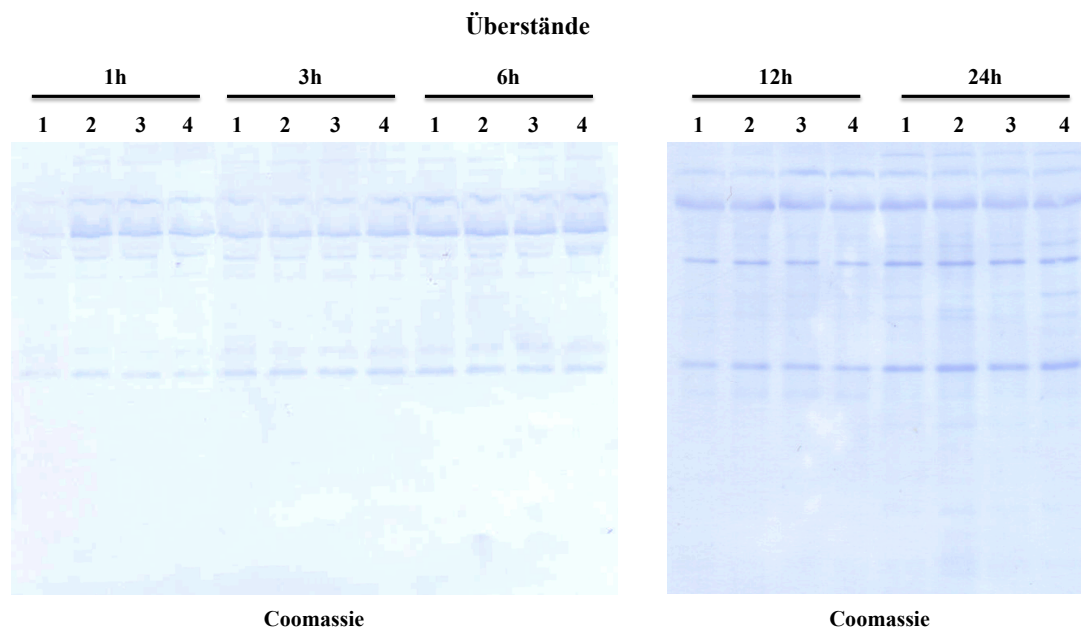


Abbildung 15a: Ribonuklease Inhibitor in Zellüberständen von HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation mit TNF α , LPS und unter Hypoxie

(A) HT1080-Zellen wurden 1, 3, 6, 12 oder 24 h mit (1) serumfreiem Medium (K), (2) TNF α (10 ng/ml), (3) LPS (500 ng/ml) oder (4) unter hypoxischen Bedingungen (2% O₂) inkubiert. Die konzentrierten Zellüberstände wurden mittels Western-Blot analysiert, wobei Primärantikörper gegen RNH1 verwendet wurden.

B



C

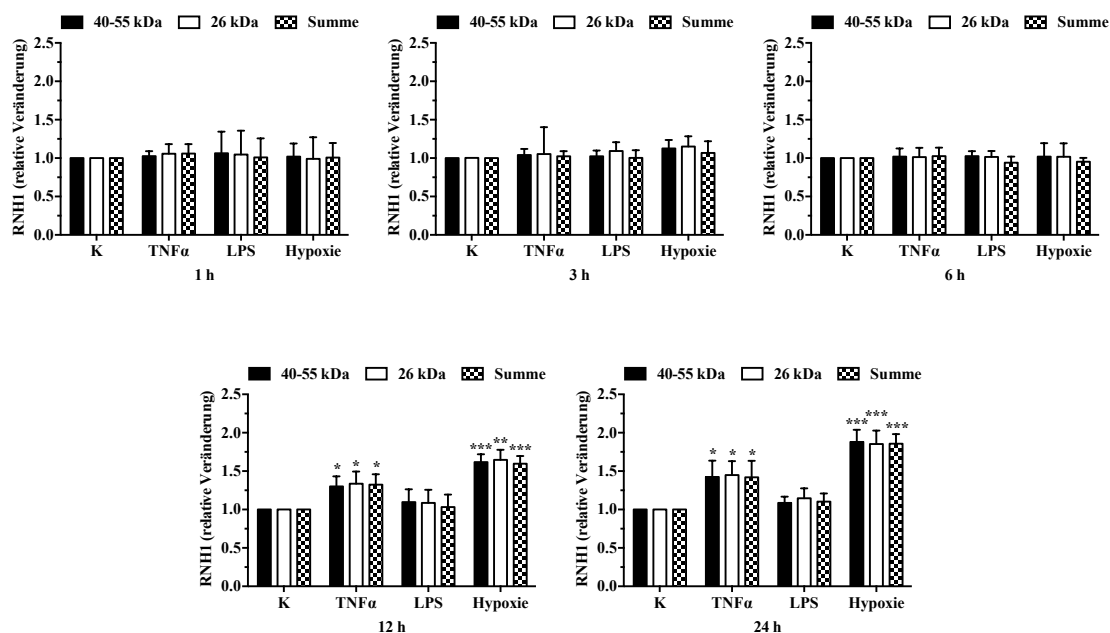


Abbildung 15b: Ribonuklease Inhibitor in Zellüberständen von HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation mit TNF α , LPS und unter Hypoxie

(B) Die Färbung der Membranen mit *Coomassie Brilliant Blue R250* diente als Ladekontrolle. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten. (C) Die Intensitäten der RNHI-Banden wurden densitometrisch mit Hilfe des Programms *LabImage 1D* quantifiziert. Dabei wurden die unbehandelten Kontrollen jeweils gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

A

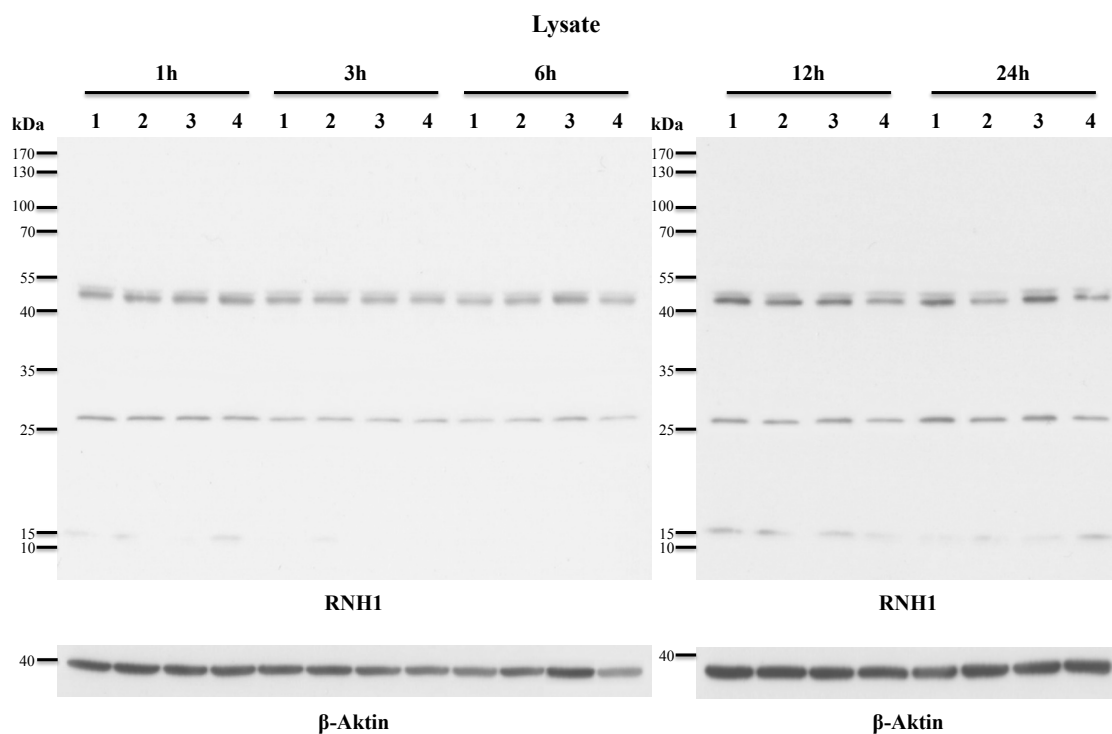


Abbildung 16a: Ribonuklease Inhibitor in Zelllysaten von HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation mit TNF α , LPS und unter Hypoxie

(A) HT1080-Zellen wurden 1, 3, 6, 12 oder 24 h mit (1) serumfreiem Medium (K), (2) TNF α (10 ng/ml), (3) LPS (500 ng/ml) oder (4) unter hypoxischen Bedingungen (2% O₂) inkubiert. Die Zelllysate wurden mittels Western-Blot analysiert, wobei Primärantikörper gegen RNHI und β -Aktin verwendet wurden. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

B

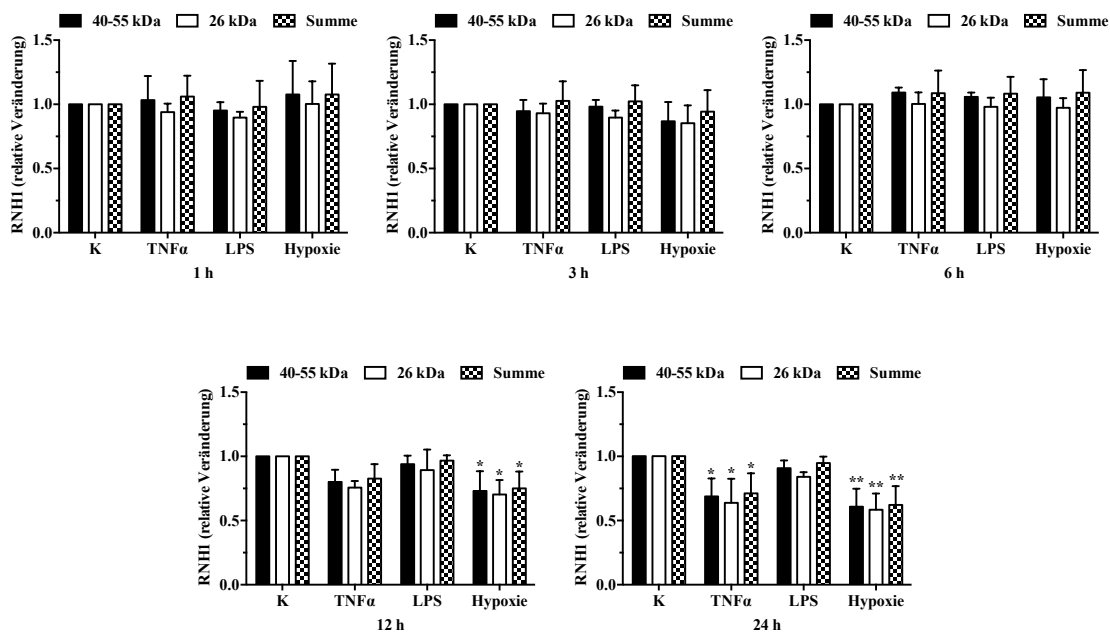


Abbildung 16b: Ribonuklease Inhibitor in Zelllysaten von HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation mit TNF α , LPS und unter Hypoxie

(B) Die Intensitäten der RNHI- und β -Aktin-Banden wurden densitometrisch mit Hilfe des Programms *LabImage 1D* quantifiziert. Die graphische Darstellung erfolgte als RNHI-Menge = RNHI/ β -Aktin. Dabei wurden die unbehandelten Kontrollen jeweils gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, *p<0,05, **p<0,01).

4.1.2.2 Ribonuklease 1-immunoreaktives Material, Ribonuklease-Aktivität

Ein ähnliches Verhalten zeigte RNase 1/RNase 4, deren Freisetzung nach 12-stündiger Behandlung mit TNF α bzw. Hypoxie auf 128% bzw. auf 156% bezüglich des Kontrollwertes zunahm und ein Maximum von 139% bzw. von 181% nach 24-stündiger Behandlung erreichte (Abbildungen 17a, 17b). Die maximale Freisetzung nach 24 h wurde von einer Abnahme der Konzentration des RNase 1/RNase 4-immunoreaktiven Materials in den Zelllysaten auf 70% bzw. auf 64% begleitet (Abbildungen 18a, 18b). Die zeitabhängigen Behandlungen von HT1080 mit TNF α , LPS oder Hypoxie führten zu keiner signifikanten Änderung der RNase-Aktivität in den Überständen der Zellen (Abbildung 19).

A

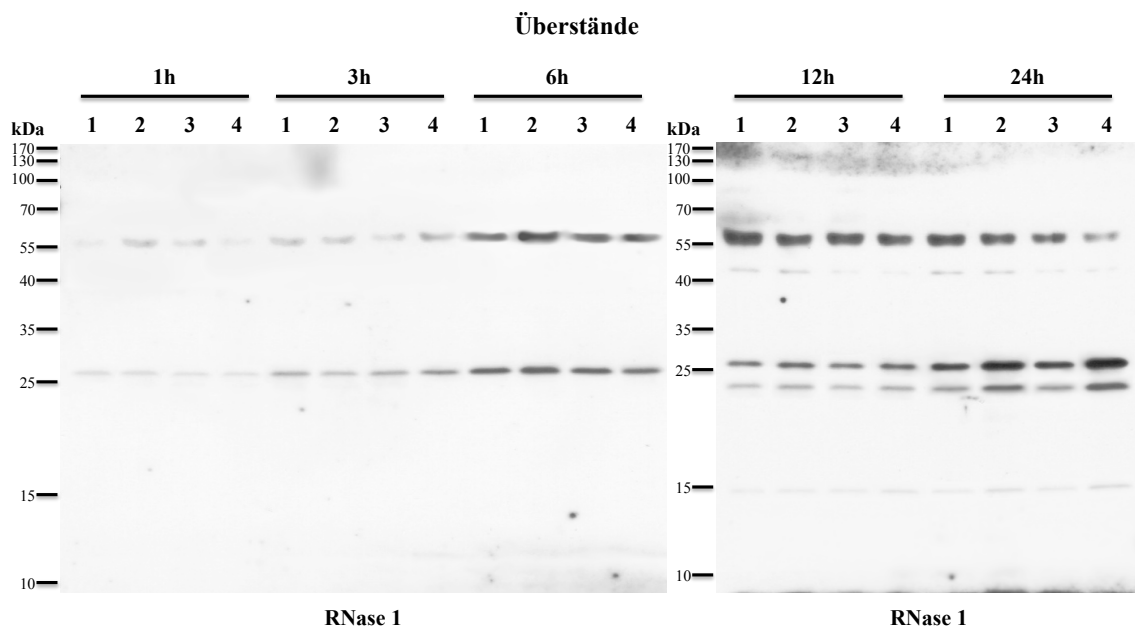
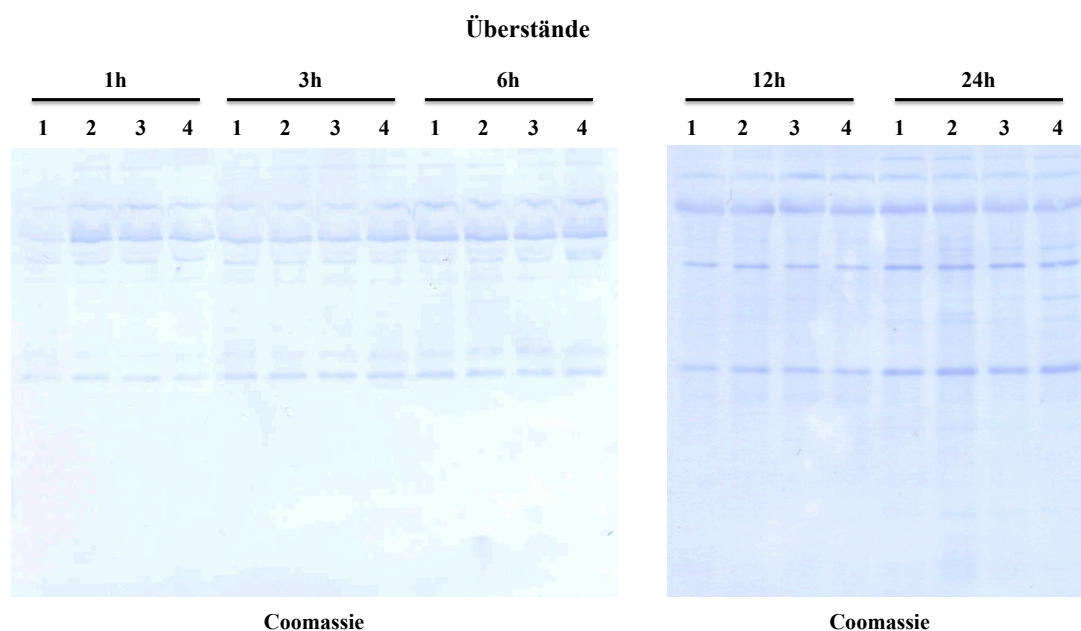


Abbildung 17a: Ribonuklease 1/Ribonuklease 4-immunoreaktives Material in Zellüberständen von HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation mit TNF α , LPS und unter Hypoxie (A) HT1080-Zellen wurden 1, 3, 6, 12 oder 24 h mit (1) serumfreiem Medium (K), (2) TNF α (10 ng/ml), (3) LPS (500 ng/ml) oder (4) unter hypoxischen Bedingungen (2% O $_2$) inkubiert. Die konzentrierten Zellüberstände wurden mittels Western-Blot analysiert, wobei Primärantikörper gegen RNase 1 verwendet wurden.

B



C

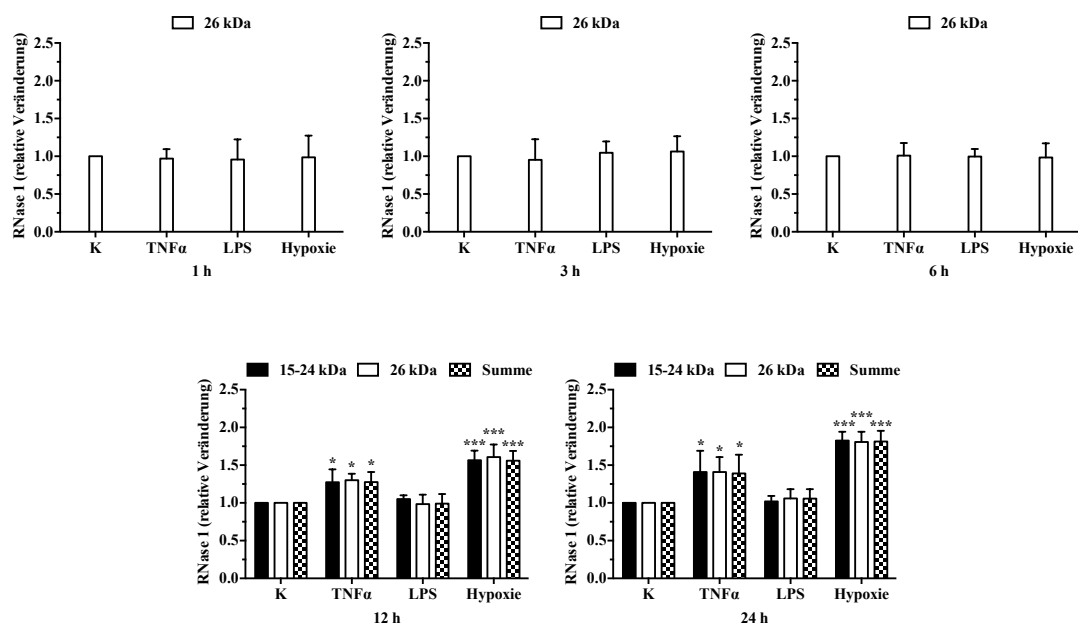


Abbildung 17b: Ribonuklease 1/Ribonuklease 4-immunoreaktives Material in Zellüberständen von HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation mit TNF α , LPS und unter Hypoxie (B) Die Färbung der Membranen mit *Coomassie Brilliant Blue R250* diente als Ladekontrolle. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten. (C) Die Intensitäten der RNase 1/RNase 4-Banden wurden densitometrisch mit Hilfe des Programms *LabImage 1D* quantifiziert. Dabei wurden die unbehandelten Kontrollen jeweils gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, *p<0,05, ***p<0,001).

A

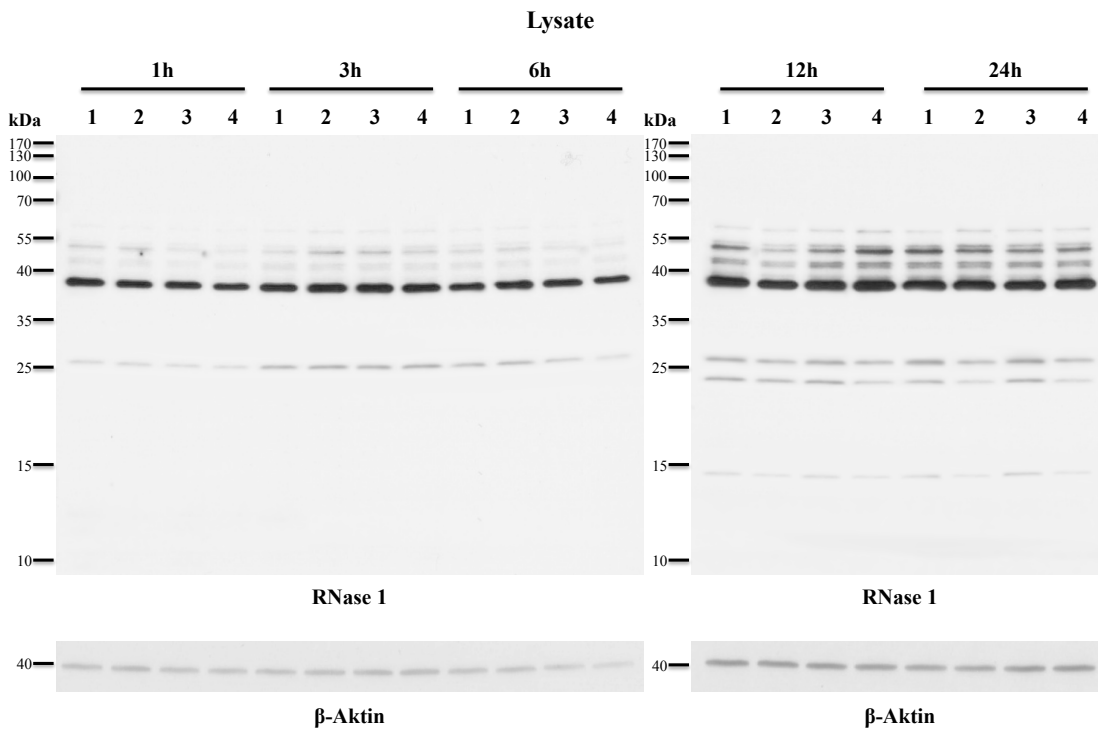


Abbildung 18a: Ribonuklease 1/Ribonuklease 4-immunoreaktives Material in Zelllysaten von HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation mit TNF α , LPS und unter Hypoxie (A) HT1080-Zellen wurden 1, 3, 6, 12 oder 24 h mit (1) serumfreiem Medium (K), (2) TNF α (10 ng/ml), (3) LPS (500 ng/ml) oder (4) unter hypoxischen Bedingungen (2% O $_2$) inkubiert. Die Zelllysate wurden mittels Western-Blot analysiert, wobei Primärantikörper gegen RNase 1 und β -Aktin verwendet wurden. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

B

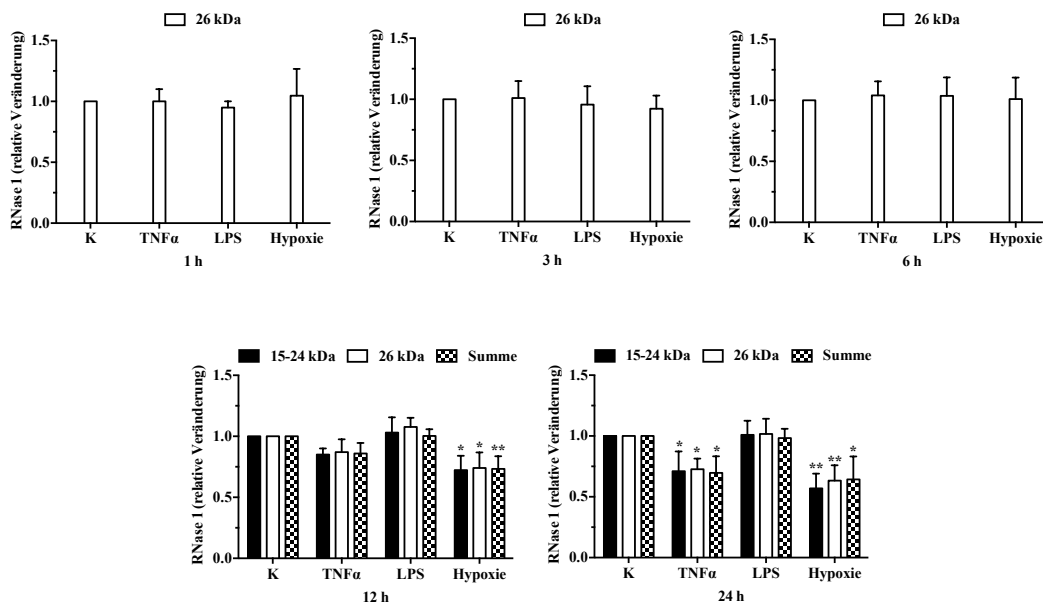


Abbildung 18b: Ribonuklease 1/Ribonuklease 4-immunoreaktives Material in Zelllysaten von HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation mit TNF α , LPS und unter Hypoxie (B) Die Intensitäten der RNase 1/RNase 4- und β -Aktin-Banden wurden densitometrisch mit Hilfe des Programms *LabImage 1D* quantifiziert. Die graphische Darstellung erfolgte als RNase 1/RNase 4-Menge = RNase 1/RNase 4/ β -Aktin. Dabei wurden die unbehandelten Kontrollen jeweils gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, *p<0,05, **p<0,01).

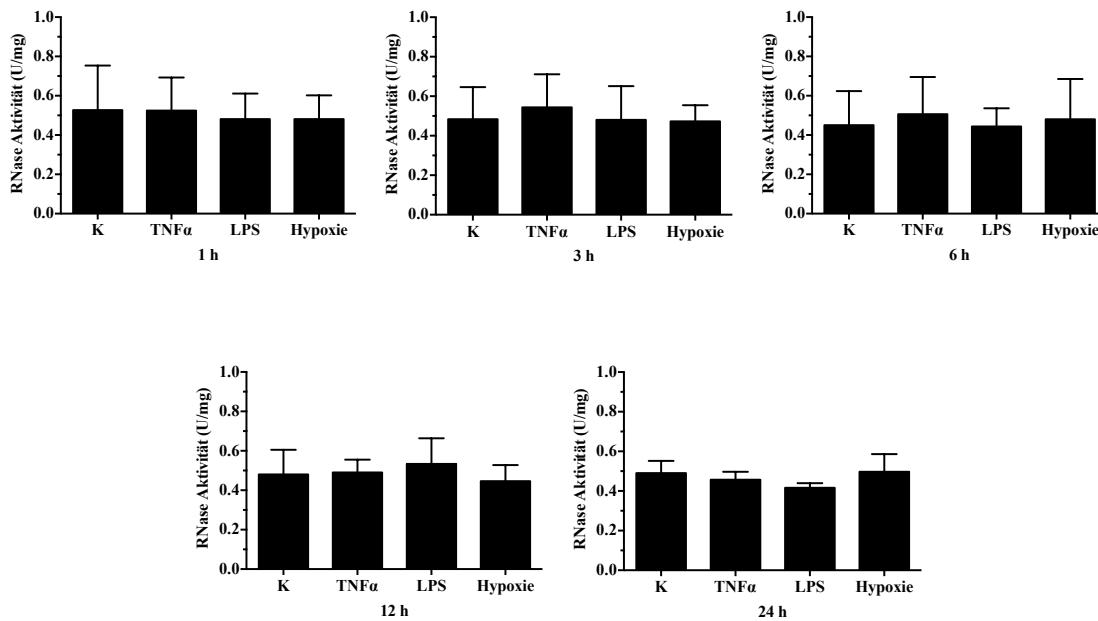


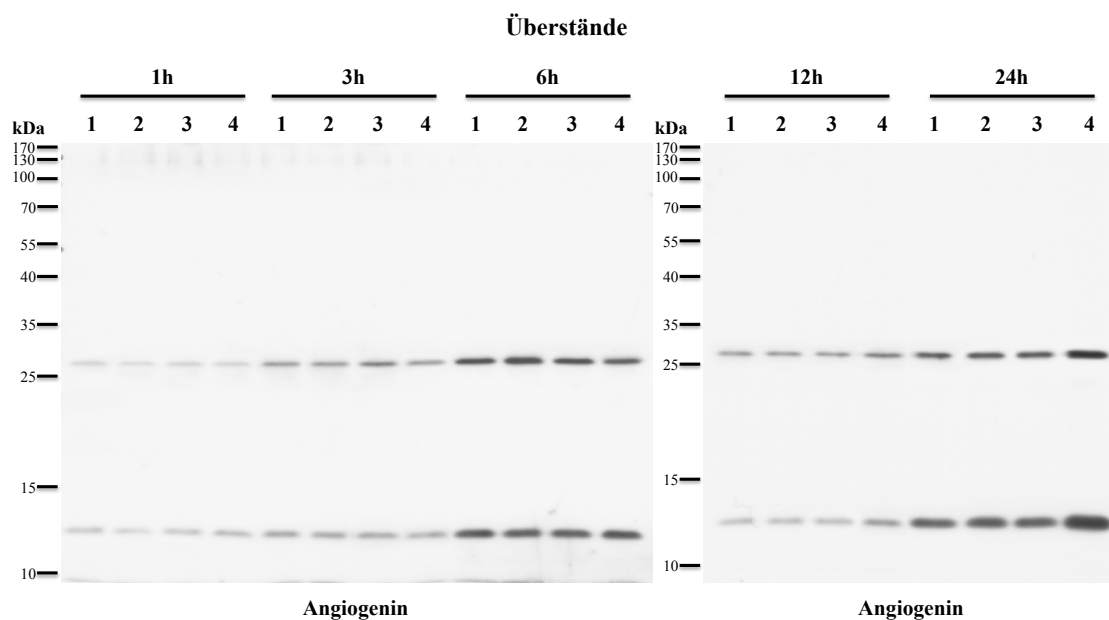
Abbildung 19: Ribonuklease-Aktivität in Zellüberständen von HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation mit TNF α , LPS und unter Hypoxie

HT1080-Zellen wurden 1, 3, 6, 12 oder 24 h mit serumfreiem Medium (K), TNF α (10 ng/ml), LPS (500 ng/ml) oder unter hypoxischen Bedingungen (2% O₂) inkubiert. Die RNase-Aktivität in den Zellüberständen wurde mittels eines Aktivitätstests detektiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3).

4.1.2.3 Angiogenin-immunoreaktives Material

TNF α hatte weder einen Einfluss auf die Konzentration von Angiogenin im Zelllysat noch auf dessen Freisetzung in den Zellüberstand. Unter hypoxischen Bedingungen nahm die Freisetzung von Angiogenin nach 12 h auf 165% bezüglich des Kontrollwertes zu und erreichte ein Maximum von 194% nach 24 h (Abbildungen 20a, 20b). In den Zelllysaten ergab sich eine signifikante Abnahme der Angiogenin-Konzentration auf 75% nach 12 h bzw. auf 64% nach 24 h hypoxischer Behandlung (Abbildungen 21a, 21b).

A



B

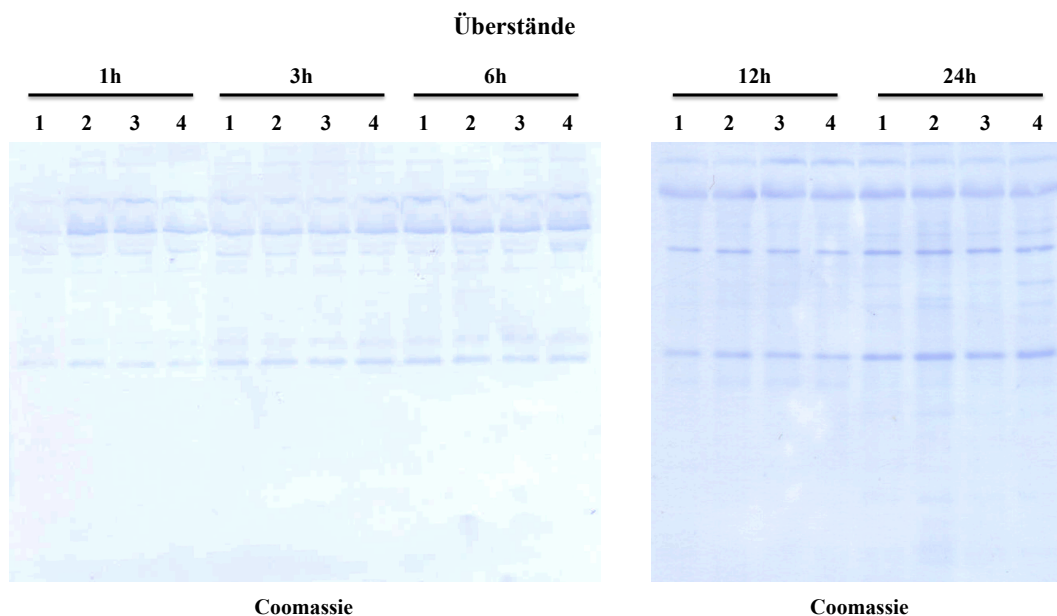


Abbildung 20a: Angiogenin in Zellüberständen von HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation mit TNF α , LPS und unter Hypoxie

(A) HT1080-Zellen wurden 1, 3, 6, 12 oder 24 h mit (1) serumfreiem Medium (K), (2) TNF α (10 ng/ml), (3) LPS (500 ng/ml) oder (4) unter hypoxischen Bedingungen (2% O $_2$) inkubiert. Die konzentrierten Zellüberstände wurden mittels Western-Blot analysiert, wobei Primärantikörper gegen Angiogenin verwendet wurden. (B) Die Färbung der Membranen mit *Coomassie Brilliant Blue R250* diente als Ladekontrolle. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

C

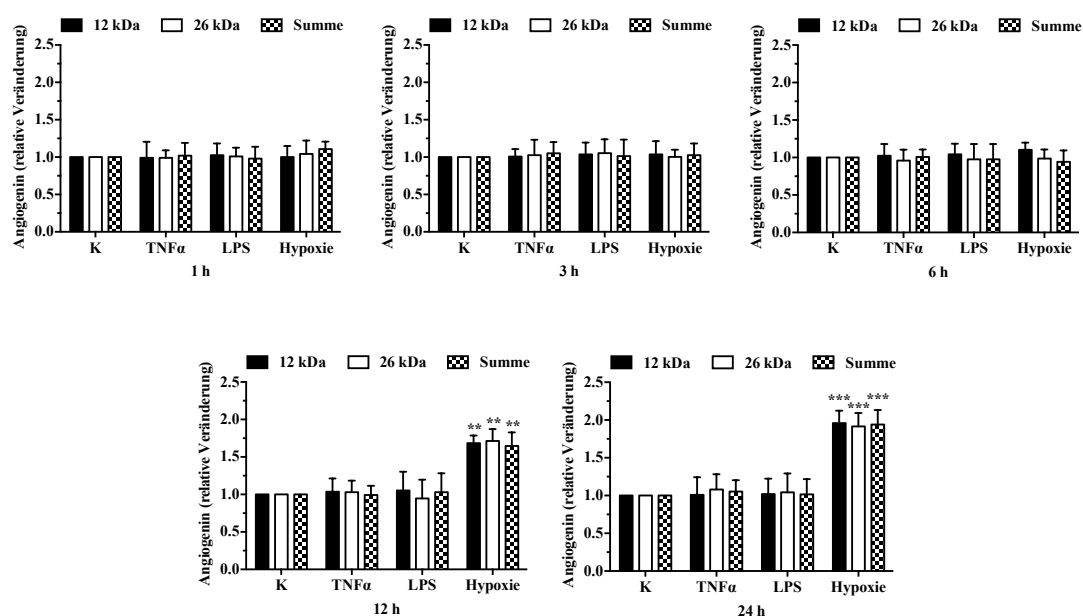


Abbildung 20b: Angiogenin in Zellüberständen von HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation mit TNF α , LPS und unter Hypoxie

(C) Die Intensitäten der Angiogenin-Banden wurden densitometrisch mit Hilfe des Programms *LabImage ID* quantifiziert. Dabei wurden die unbehandelten Kontrollen jeweils gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, **p<0,01, ***p<0,001).

A

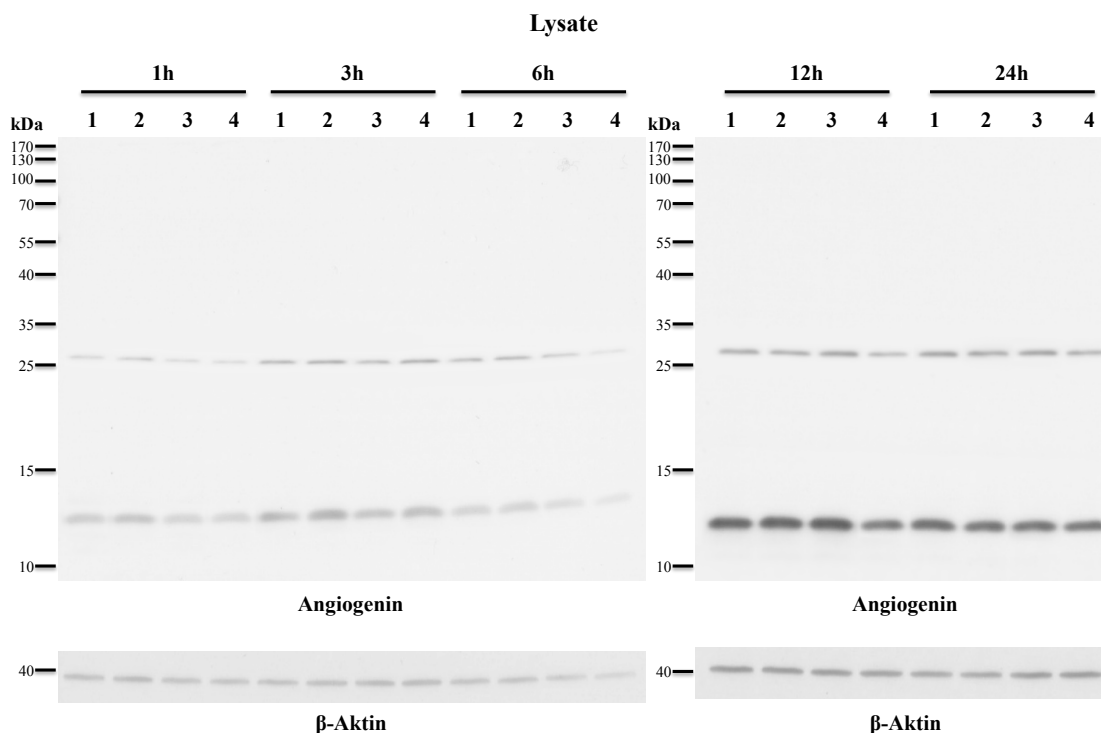


Abbildung 21a: Angiogenin in Zelllysaten von HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation mit TNF α , LPS und unter Hypoxie

(A) HT1080-Zellen wurden 1, 3, 6, 12 oder 24 h mit (1) serumfreiem Medium (K), (2) TNF α (10 ng/ml), (3) LPS (500 ng/ml) oder (4) unter hypoxischen Bedingungen (2% O $_2$) inkubiert. Die Zelllysate wurden mittels Western-Blot analysiert, wobei Primärantikörper gegen Angiogenin und β -Aktin verwendet wurden. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

B

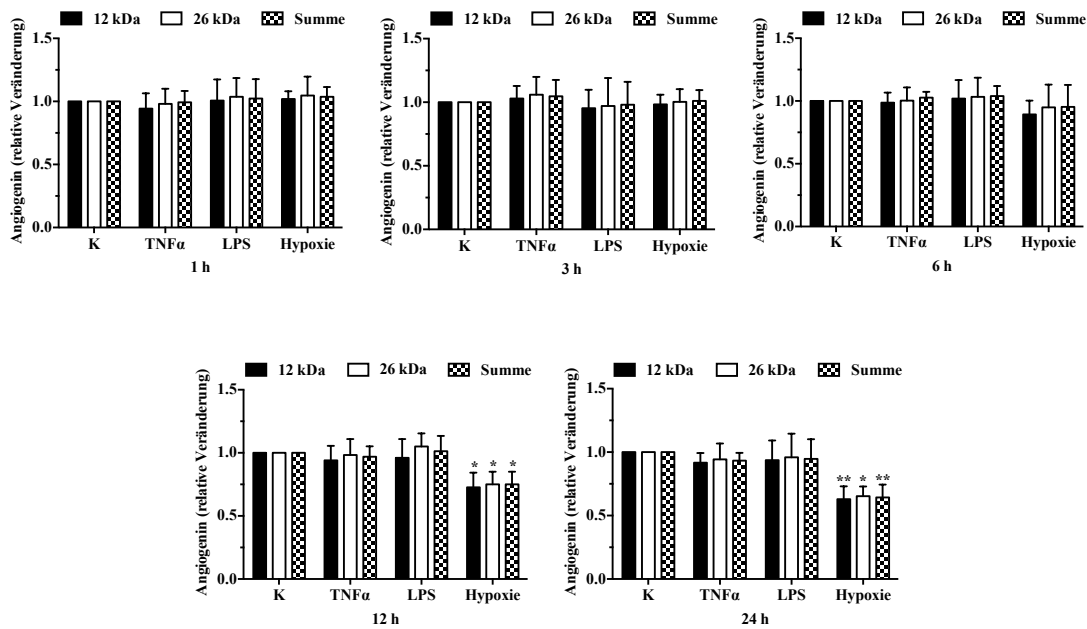


Abbildung 21b: Angiogenin in Zelllysaten von HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation mit TNF α , LPS und unter Hypoxie

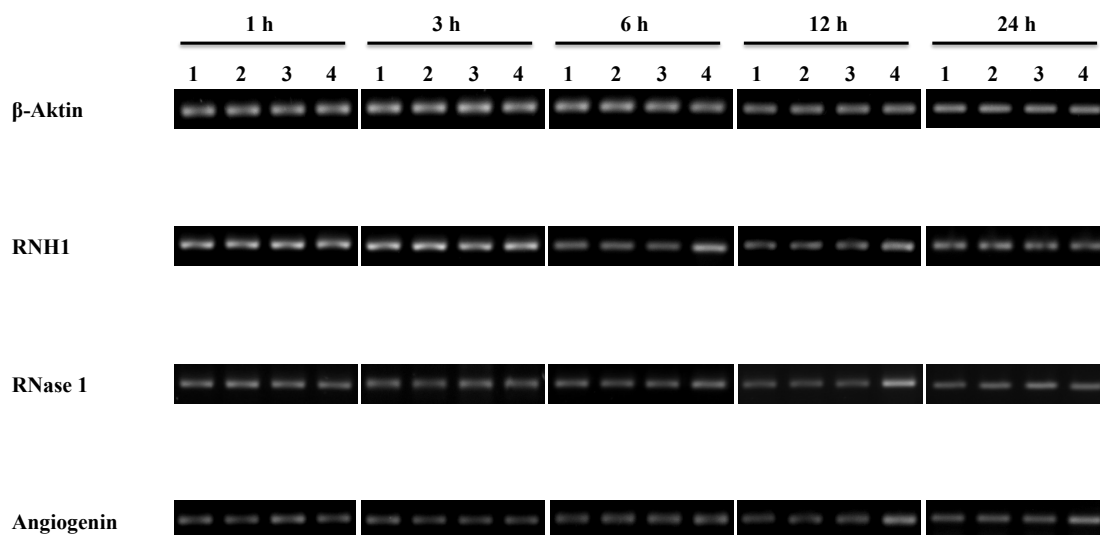
(B) Die Intensitäten der Angiogenin- und β -Aktin-Banden wurden densitometrisch mit Hilfe des Programms *LabImage 1D* quantifiziert. Die graphische Darstellung erfolgte als Angiogenin-Menge = Angiogenin/ β -Aktin. Dabei wurden die unbehandelten Kontrollen jeweils gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, *p<0,05, **p<0,01).

4.1.2.4 DNA (aus mRNA) von Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1 und Angiogenin

Um den Einfluss von TNF α , LPS und Hypoxie auf die mRNA-Expression von RNH1 und dessen Interaktionspartner zu analysieren, wurden HT1080 für 1, 3, 6, 12 und 24 h mit TNF α und LPS stimuliert sowie hypoxischen Bedingungen ausgesetzt und die entstandenen Lysate für semi-quantitative PCR verwendet.

Während TNF α und LPS keinen Einfluss auf die Genexpression der drei Proteine hatten, führte die Hypoxie-Exposition bereits nach 6 h zu einer signifikanten Zunahme der mRNA-Expression von RNH1, RNase 1 und Angiogenin auf 153%, 149% und 157% bezüglich des Kontrollwertes. Die mRNA-Expression aller drei Proteine wies nach 12 h Hypoxie ihr Maximum auf, welches für RNH1 157%, für RNase 1 165% und für Angiogenin 180% betrug. Nach 24 h zeigte die Genexpression von RNH1 und RNase 1 keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, während die mRNA-Expression von Angiogenin noch immer auf 166% bezüglich des Kontrollwertes erhöht war (Abbildung 22).

A



B

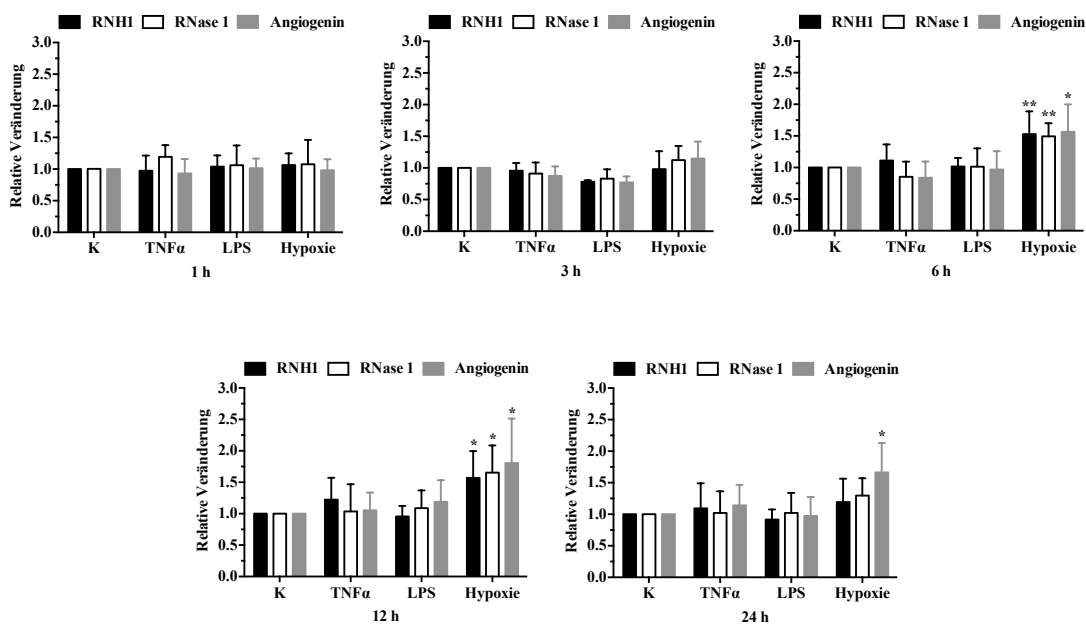


Abbildung 22: DNA aus reverser Transkription von Ribonuklease Inhibitor-, Ribonuklease 1- und Angiogenin-mRNA in HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation der Zellen mit TNF α , LPS und unter Hypoxie

(A) HT1080-Zellen wurden 1, 3, 6, 12 oder 24 h mit (1) serumfreiem Medium (K), (2) TNF α (10 ng/ml), (3) LPS (500 ng/ml) oder (4) unter hypoxischen Bedingungen (2% O₂) inkubiert. Die mRNA von RNH1, RNase 1 und des Angiogenins in HT1080-Zellen wurde unter Einsatz von reverser Transkription und semiquantitativer PCR in DNA überführt und diese nach DNA-Agarose-Gelelektrophorese optisch quantifiziert. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives von fünf unabhängigen Experimenten. (B) Die Intensitäten der RNH1-, RNase 1-, Angiogenin- und β -Aktin-Banden wurden densitometrisch mit Hilfe des Programms *LabImage ID* quantifiziert. Die Daten wurden normalisiert zu den Expressionsraten der β -Aktin mRNA und ausgedrückt als das Verhältnis der Expression des Zielgens zu β -Aktin. Die Expressionsrate in unbehandelten Zellen wurde als 1 definiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=5, *p<0,05, **p<0,01).

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass die Freisetzung des RNH1 aus HT1080 nach längerer Stimulationsdauer mit dem proinflammatorischen Agonist TNF α und bei Hypoxie zunahm, während sein intrazellulärer Gehalt sank. Ein ähnliches Verhalten zeigten unter diesen Bedingungen auch RNase 1/4 und Angiogenin. Nach der Stimulation der Tumorzellen mit TNF α , LPS bzw. Hypoxie blieb die RNase-Aktivität im Zellüberstand unverändert. Außerdem führte die hypoxische Behandlung zur Steigerung der Genexpression aller drei Proteine. Die unter 4.1.2 beschriebenen Ergebnisse wurden in der Tabelle 3 zusammengefasst dargestellt. Da hierbei die durch TNF α und Hypoxie vermittelten Effekte auf Proteinebene nach 24 h am stärksten ausgeprägt waren, wurde diese Stimulationsdauer für alle nachfolgenden Experimente verwendet, die sich auf die Analyse des involvierten Freisetzungsweges vom RNH1 fokussierten.

ERGEBNISSE

Tabelle 3: DNA (aus mRNA) und Protein-immunoreaktives Material von Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1, Angiogenin und Ribonuklease-Aktivität in Zelllysaten oder -überständen aus HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Behandlung mit TNF α , LPS oder Hypoxie

			Einträge in der Tabelle: Zunahme (↑), Abnahme (↓) oder keine Veränderung (---) gegenüber dem Kontrollwert							
ZELL-LINIE	STIMULATION	DAUER	ZELLYSAT				ZELLÜBERSTAND			
HT 1080			RNH1	RNase 1	Angiogenin	RNase-Akt.	RNH1	RNase 1	Angiogenin	RNase-Akt.
			mRNA	mRNA	mRNA					
	-	1h								
	TNF α	1h	---	---	---		---	---	---	---
	LPS	1h	---	---	---		---	---	---	---
	Hypoxie	1h	---	---	---		---	---	---	---
	-	3h								
	TNF α	3h	---	---	---		---	---	---	---
	LPS	3h	---	---	---		---	---	---	---
	Hypoxie	3h	---	---	---		---	---	---	---
	-	6h								
	TNF α	6h	---	---	---		---	---	---	---
	LPS	6h	---	---	---		---	---	---	---
	Hypoxie	6h	---	---	---		---	---	---	---
			↑	↑	↑					
	-	12h								
	TNF α	12h	---	---	---		↑	↑	---	---
	LPS	12h	---	---	---		---	---	---	---
	Hypoxie	12h	↓	↓	↓		↑	↑	↑	---
			↑↑	↑↑	↑↑					
	-	24h								
	TNF α	24h	↓	↓	---		↑↑	↑↑	---	---
	LPS	24h	---	---	---		---	---	---	---
	Hypoxie	24h	↓↓	↓↓	↓↓		↑↑	↑↑	↑↑	---
			↑							

4.1.3 DNA (aus mRNA) und Protein-immunoreaktives Material von Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1 und Angiogenin, RNA und Ribonuklease-Aktivität in Zelllysaten, Zellüberständen oder Mikrovesikeln aus HT1080-Zellen nach einer 24-stündigen Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS oder Hypoxie

Da das RNH1-Gen keine Signalsequenz enthält (Bond und Vallee, 1988), stellte sich die Frage, wie der RNH1 unter dem Einfluss von proinflammatorischen Substanzen aus der Zelle ausgeschüttet wird. Ein möglicher Weg wäre der Transport des RNH1 mittels MV. Um die mögliche Sekretion des RNH1 mittels MV zu untersuchen, wurden HT1080 Zellen für 24 h mit den proinflammatorischen Mediatoren TNF α und LPS stimuliert sowie hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Außerdem wurden die Zellen mit apoptotischen (Staurosporin, STP) und nekrotischen Substanzen (Ethanol, ETOH) behandelt, um den Einfluss von Apoptose und Nekrose auf die Bildung von MV vergleichen zu können. Im Anschluss wurden Zelllysate und -überstände, aus denen die MV-Fraktion aufgereinigt wurde, für Western-Blot-Analysen und RNase-Aktivitätstests verwendet.

4.1.3.1 Zellüberstände und Zelllysate: Protein-immunoreaktives Material

Wie auch unter 4.1.2 gezeigt, führte die 24-stündige Stimulation von HT1080 mit TNF α bzw. Hypoxie zur signifikanten Zunahme der RNH1-Freisetzung in den Zellüberstand, während die stärkste RNH1-Ausschüttung nach der STP-Behandlung erreicht wurde (Abbildungen 23A, 23E). In den Zelllysaten war nach den oben genannten Stimulationen eine Abnahme der RNH1-Konzentration zu verzeichnen (Abbildungen 24A, 24D). LPS und ETOH konnten weder die intrazelluläre Konzentration noch die Freisetzung des RNH1 in den Zellüberstand beeinflussen (Abbildungen 23A, 23E, 24A, 24D).

Während die Stimulation der Zellen mit LPS und ETOH keinen Einfluss auf die RNase 1/RNase 4-Freisetzung zeigte, war durch TNF α , Hypoxie und STP eine signifikante Zunahme ihrer Freisetzung in den Überstand detektierbar (Abbildungen 23B, 23F). Des Weiteren wurde durch diese Stimulationen die Konzentration von RNase 1/RNase 4 im Zelllysate vermindert (Abbildungen 24B, 24E).

ERGEBNISSE

Die 24-stündige Hypoxie-Exposition der Zellen war die einzige Behandlung, die eine Steigerung der Angiogenin-Freisetzung sowie eine Abnahme der Angiogenin-Konzentration in der Zelle bewirkte. STP, ETOH, TNF α und LPS hatten keinen signifikanten Einfluss auf den extra- oder intrazellulären Gehalt von Angiogenin (Abbildungen 23C, 23G, 24C, 24F).

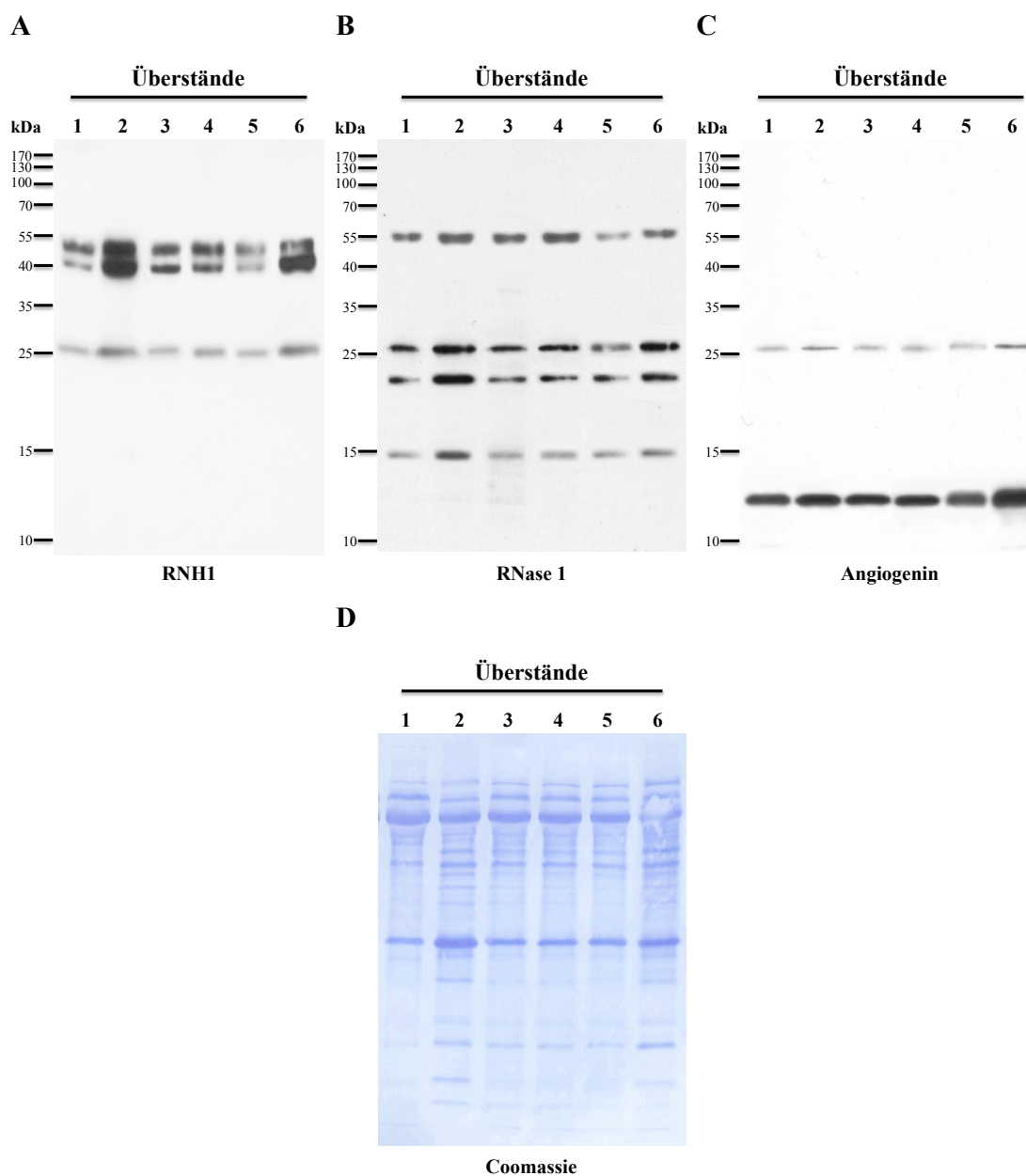


Abbildung 23a: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4-immunoreaktives Material und Angiogenin in Zellüberständen von HT1080-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie

HT1080-Zellen wurden 24 h mit (1) serumfreiem Medium (K), (2) STP (200 ng/ml), (3) ETOH (2% v/v), (4) TNF α (10 ng/ml), (5) LPS (500 ng/ml) oder (6) unter hypoxischen Bedingungen (2% O $_2$) inkubiert. Die konzentrierten Zellüberstände wurden mittels Western-Blot analysiert, wobei Primärantikörper gegen (A) RNH1, (B) RNase 1 und (C) Angiogenin verwendet wurden. (D) Die Färbung der Membran mit *Coomassie Brilliant Blue R250* diente als Ladekontrolle. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

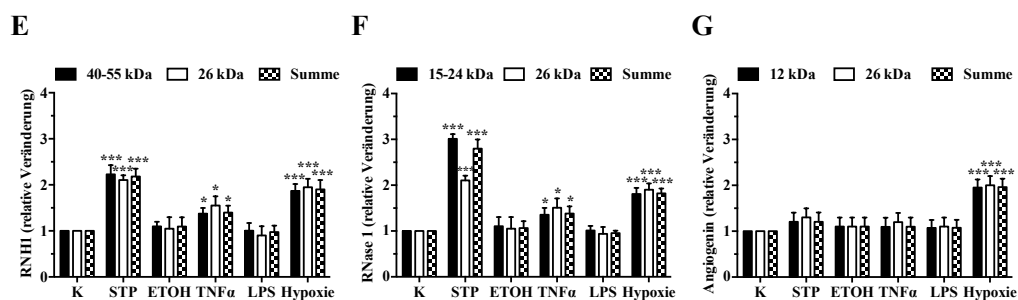


Abbildung 23b: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4-immunoreaktives Material und Angiogenin in Zellüberständen von HT1080-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie

Die Intensitäten der (E) RNHI-, (F) RNase 1/RNase 4- und (G) Angiogenin-Banden wurden densitometrisch mit Hilfe des Programms *LabImage 1D* quantifiziert. Dabei wurden die unbehandelten Kontrollen jeweils gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, *p<0,05, ***p<0,001).

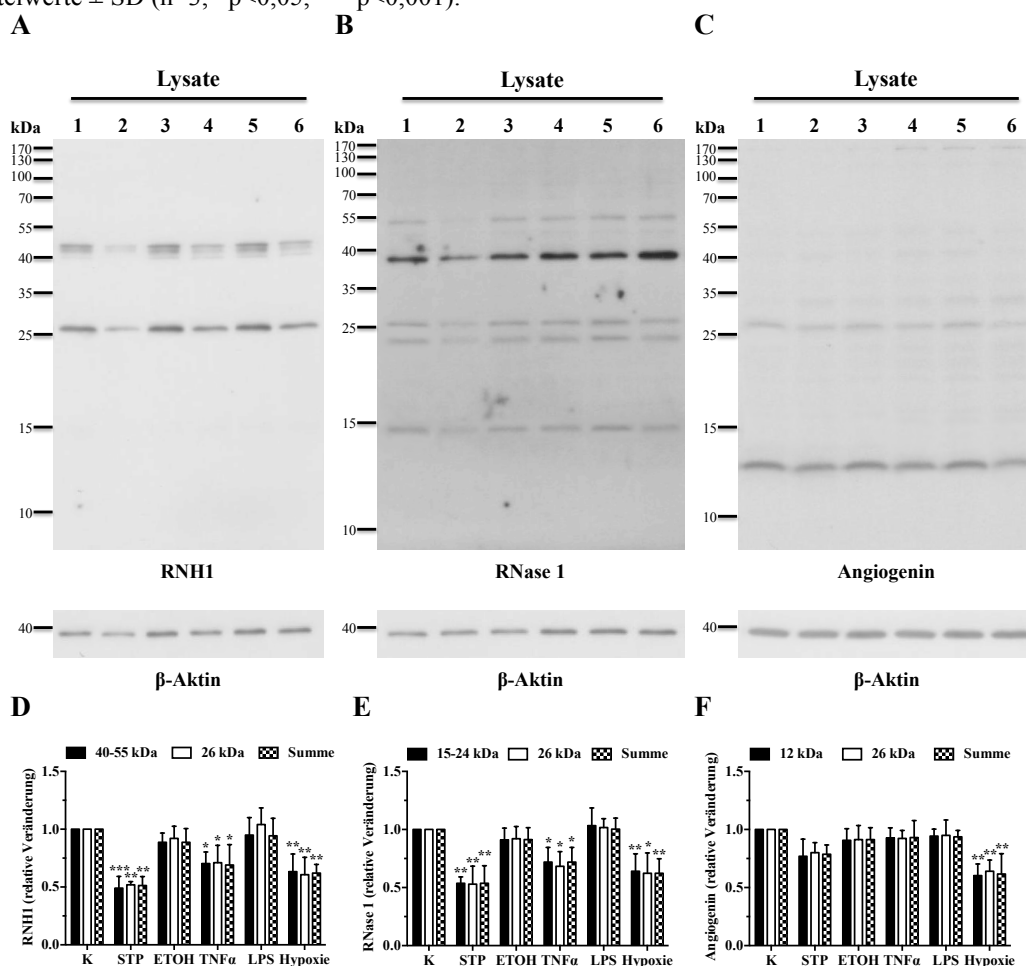


Abbildung 24: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4-immunoreaktives Material und Angiogenin in Zelllysaten von HT1080-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie

HT1080-Zellen wurden 24 h mit (1) serumfreiem Medium (K), (2) STP (200 ng/ml), (3) ETOH (2% v/v), (4) TNF α (10 ng/ml), (5) LPS (500 ng/ml) oder (6) unter hypoxischen Bedingungen (2% O $_2$) inkubiert. Die Zelllysate wurden mittels Western-Blot analysiert, wobei Primärantikörper gegen (A) RNHI, (B) RNase 1, (C) Angiogenin und β -Aktin verwendet wurden. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten. Die Intensitäten der RNHI-, RNase 1/RNase 4-, Angiogenin- und β -Aktin-Banden wurden densitometrisch mit Hilfe des Programms *LabImage 1D* quantifiziert. Die graphische Darstellung erfolgte als (D) RNHI-Menge = RNHI/ β -Aktin, (E) RNase 1/RNase 4-Menge = RNase 1/ β -Aktin und (F) Angiogenin-Menge = Angiogenin/ β -Aktin. Dabei wurden die unbehandelten Kontrollen jeweils gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

4.1.3.2 Mikrovesikel und Restüberstände: Protein-immunoreaktives Material

Die Western-Blot-Analyse der MV-Fraktion, die aus frischen Zellüberständen über mehrere Zentrifugationsschritte, wie unter 3.5.1 beschrieben, isoliert wurde, zeigte, dass ein Teil des RNH1 mit der MV-Fraktion assoziiert war. Die STP- und TNF α -Stimulation der Zellen förderten die Akkumulation vom RNH1 in den MV, in denen seine Konzentration auf 380% bzw. 203% bezüglich des Kontrollwertes stieg. Die stärkste Zunahme der RNH1-Konzentration in den MV fand nach 24 h unter Hypoxie statt und lag bei 479% des Kontrollwertes. Die aus ETOH- und LPS-behandelten Zellen stammenden MV enthielten RNH1 in gleichen Konzentrationen wie die unbehandelten Zellen (Abbildungen 25A, 25D). In den MV konnte kein RNase 1/RNase 4-Signal detektiert werden.

Neben RNH1 wurde auch Angiogenin in der MV-Fraktion detektiert. Die aus STP- bzw. hypoxisch behandelten Zellen isolierten MV zeigten eine signifikante Zunahme des Angiogeningehalts auf 308% bzw. auf 264% bezüglich des Kontrollwertes. Die Stimulationen mit ETOH, TNF α und LPS bewirkten keine Veränderung in der Angiogenin-Konzentration der MV-Fraktion (Abbildungen 25B, 25E).

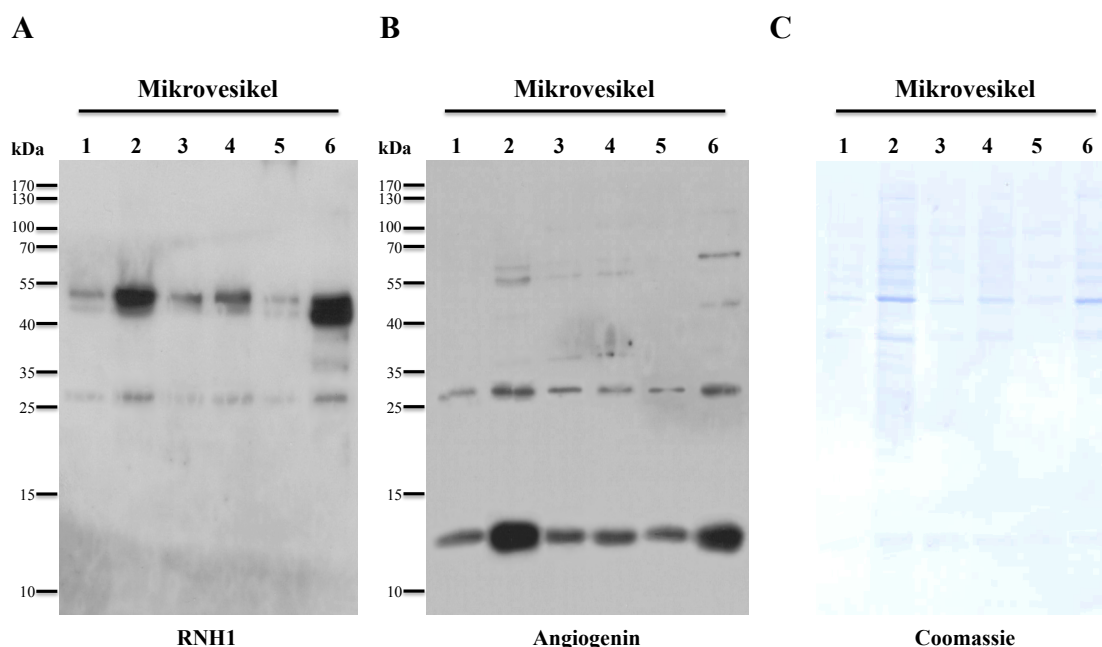


Abbildung 25a: Ribonuklease Inhibitor und Angiogenin in der Mikrovesikelfraktion von HT1080-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie

HT1080-Zellen wurden 24 h mit (1) serumfreiem Medium (K), (2) STP (200 ng/ml), (3) ETOH (2% v/v), (4) TNF α (10 ng/ml), (5) LPS (500 ng/ml) oder (6) unter hypoxischen Bedingungen (2% O $_2$) inkubiert. Die MV-Fraktion wurde aus Zellüberständen isoliert und mittels Western-Blot analysiert, wobei Primärantikörper gegen (A) RNH1 und (B) Angiogenin verwendet wurden. (C) Die Färbung der Membran mit *Coomassie Brilliant Blue R250* diente als Ladekontrolle. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

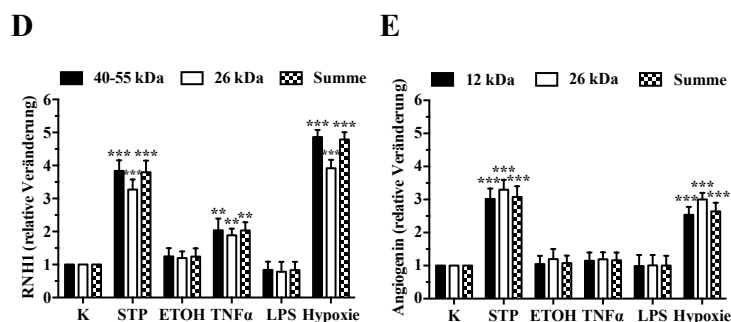


Abbildung 25b: Ribonuklease Inhibitor und Angiogenin in der Mikrovesikelfraktion von HT1080-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie

Die Intensitäten der (D) RNHI- und (E) Angiogenin-Banden wurden densitometrisch mit Hilfe des Programms *LabImage 1D* quantifiziert. Dabei wurden die unbehandelten Kontrollen jeweils gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, **p<0,01, ***p<0,001).

Der Restüberstand, der nach der Aufreinigung der MV-Fraktion aus dem Zellüberstand entstanden ist, wurde auch mittels Western-Blot analysiert. Die RNHI-Konzentration nahm nach der STP- bzw. TNF α -Stimulation im Restüberstand auf 208% bzw. auf 139% bezüglich des Kontrollwertes zu, während ETOH, LPS und Hypoxie keinen Einfluss auf die Gesamtmenge des RNHI hatten (Abbildungen 26A, 26E).

Eine signifikante Zunahme von RNase 1/RNase 4 wurde nach der Behandlung der Zellen mit STP, TNF α und Hypoxie auf 273%, 132% und 177% entsprechend im Restüberstand erreicht. Die RNase 1/RNase 4-Konzentration im Restüberstand blieb nach der Stimulation der HT1080-Zellen mit ETOH und LPS unverändert (Abbildungen 26B, 26F).

Die 24-stündige Behandlung der Zellen mit apoptotischen (STP), nekrotischen (ETOH) und inflammatorischen (TNF α , LPS) Mediatoren sowie die Hypoxie-Exposition der Zellen bewirkte keine Veränderung in der Gesamtkonzentration von Angiogenin im Restüberstand (Abbildungen 26C, 26G).

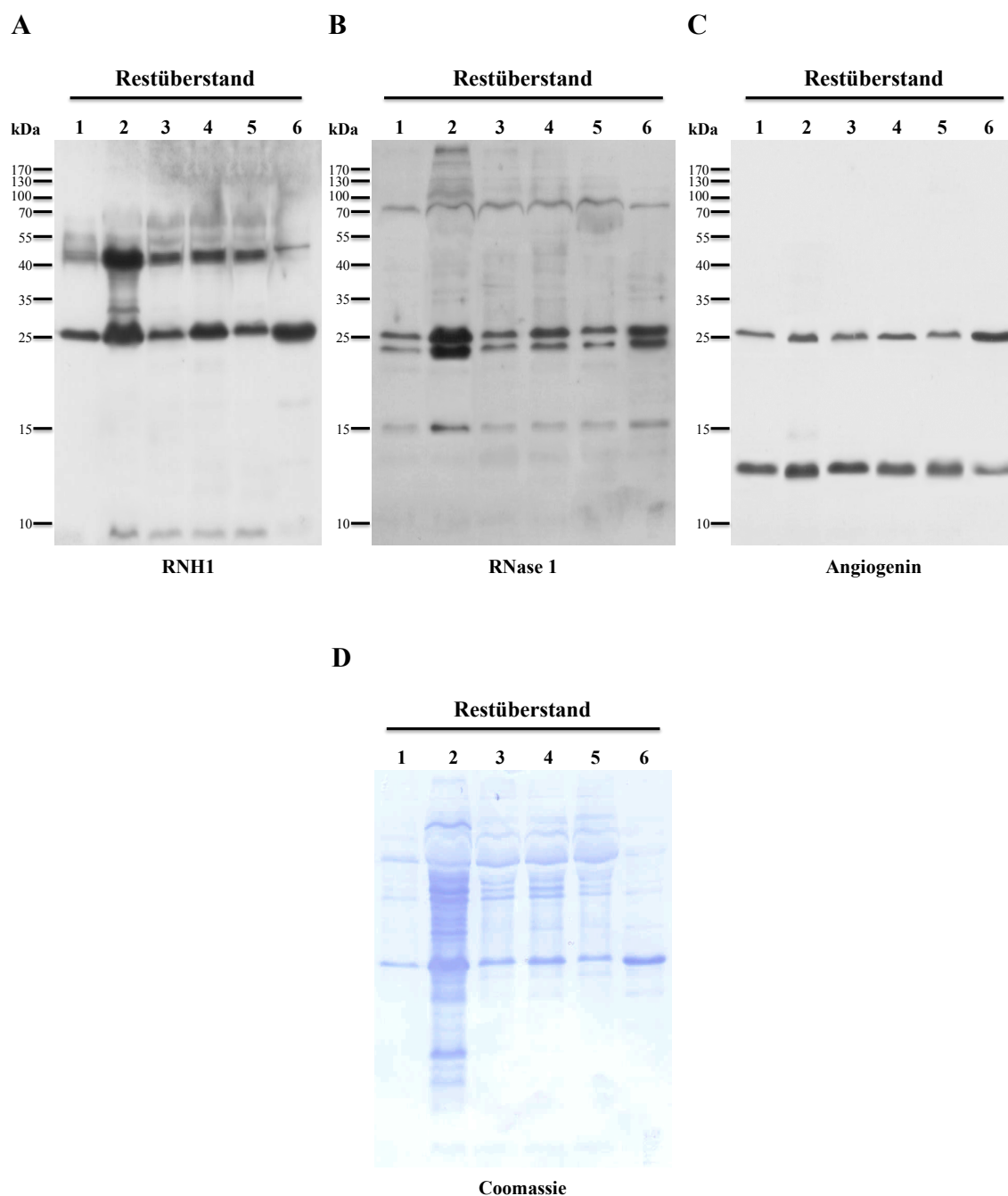


Abbildung 26a: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4-immunoreaktives Material und Angiogenin in Restüberständen von HT1080-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie

HT1080-Zellen wurden 24 h mit (1) serumfreiem Medium (K), (2) STP (200 ng/ml), (3) ETOH (2% v/v), (4) TNF α (10 ng/ml), (5) LPS (500 ng/ml) oder (6) unter hypoxischen Bedingungen (2% O₂) inkubiert. Die konzentrierten Restüberstände wurden mittels Western-Blot analysiert, wobei Primärantikörper gegen (A) RNH1, (B) RNase 1 und (C) Angiogenin verwendet wurden. (D) Die Färbung der Membran mit *Coomassie Brilliant Blue R250* diente als Ladekontrolle. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

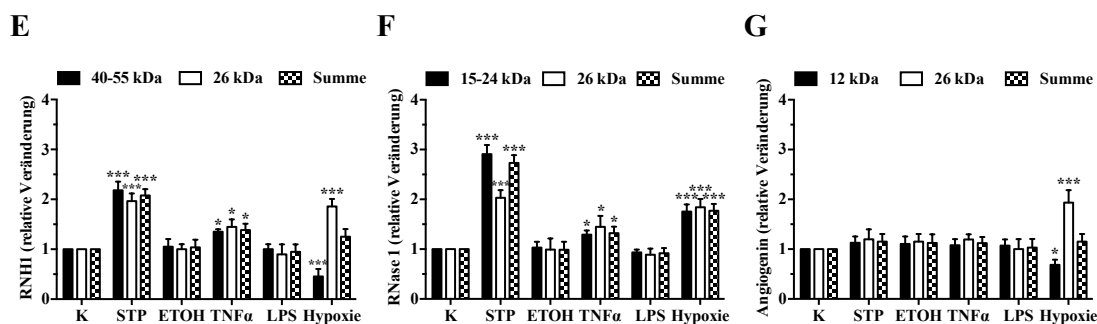


Abbildung 26b: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4-immunoreaktives Material und Angiogenin in Restüberständen von HT1080-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie

Die Intensitäten der (E) RNHI-, (F) RNase 1/RNase 4- und (G) Angiogenin-Banden wurden densitometrisch mit Hilfe des Programms *LabImage 1D* quantifiziert. Dabei wurden die unbehandelten Kontrollen jeweils gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, *p<0,05, ***p<0,001).

4.1.3.3 Zellüberstände, Mikrovesikel und Restüberstände: Ribonuklease-Aktivität und RNA

Die Messung der RNase-Aktivität in der MV-Fraktion bestätigte die bereits erwähnte Abwesenheit des RNase 1/RNase 4-Signals in der Western-Blot-Analyse der MV. In der MV-Fraktion war keine RNase-Aktivität nachweisbar. Nach Behandlung der HT1080-Zellen mit dem apoptotischen Agonist STP nahm die ribonukleolytische Aktivität im Überstand und im Restüberstand wesentlich zu. Andere Agonisten hatten keinen signifikanten Einfluss auf die RNase-Aktivität des Überstands bzw. des Restüberstands (Abbildung 27A).

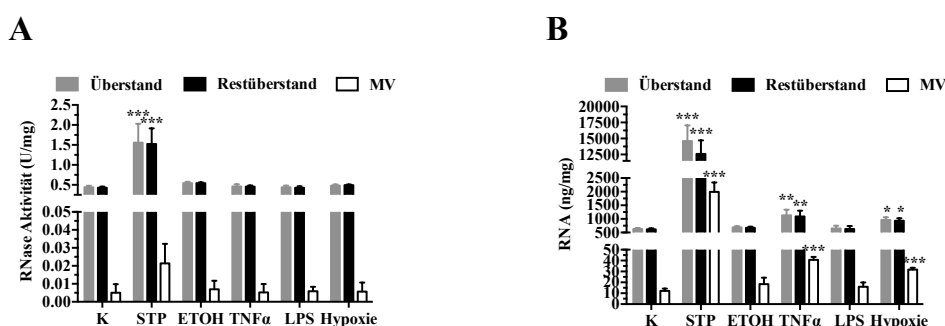


Abbildung 27: Ribonuklease-Aktivität und RNA-Gehalt in Zellüberstand, Restüberstand und MV-Fraktion von HT1080-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie

HT1080-Zellen wurden 24 h mit serumfreiem Medium (K), STP (200 ng/ml), ETOH (2% v/v), TNF α (10 ng/ml), LPS (500 ng/ml) oder unter hypoxischen Bedingungen (2% O $_2$) inkubiert. (A) Die RNase-Aktivität im Zellüberstand, Restüberstand und in der MV-Fraktion wurde mittels eines Aktivitätstests detektiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, ***p<0,001). (B) Der RNA-Gehalt im Zellüberstand, Restüberstand und in der MV-Fraktion wurde durch Anwendung des *MasterPure RNA Purification Kits* von *Epicentre* isoliert und mittels des *QubitTM RNA Assay Kits* von *Invitrogen* quantifiziert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Neben der RNase-Aktivität wurde auch der RNA-Gehalt in der MV-Fraktion, im Restüberstand sowie im gesamten Zellüberstand bestimmt. Die 24-stündige Stimulation der Zellen mit STP, TNF α oder Hypoxie führten zu einer signifikanten Zunahme der RNA-Konzentration sowohl in den MV als auch im Restüberstand und im gesamten Zellüberstand. Die ETOH- und LPS-Behandlungen bewirkten keine Veränderungen im RNA-Gehalt der MV-Fraktion bzw. des Restüberstands oder des gesamten Zellüberstands (Abbildung 27B).

4.1.3.4 Zelllysate: DNA (aus mRNA)

Der Einfluss von STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie auf die mRNA-Expression von RNH1, RNase 1 und Angiogenin wurde durch semi-quantitative PCR ermittelt. Während ETOH, TNF α und LPS keinen Einfluss auf die Genexpression der drei Proteine hatten, führte eine 24-stündige Stimulation von HT1080 mit STP zu einer signifikanten Abnahme der mRNA-Expression von RNH1 und RNase 1. Die mRNA-Expression von Angiogenin wurde von der STP-Behandlung nur minimal beeinflusst. Nach der 24-stündigen Hypoxie-Exposition der Zellen nahm die Angiogenin-Expression auf 168% bezüglich des Kontrollwertes zu, während die mRNA-Expression von RNH1 und RNase 1 unverändert blieb (Abbildung 28).

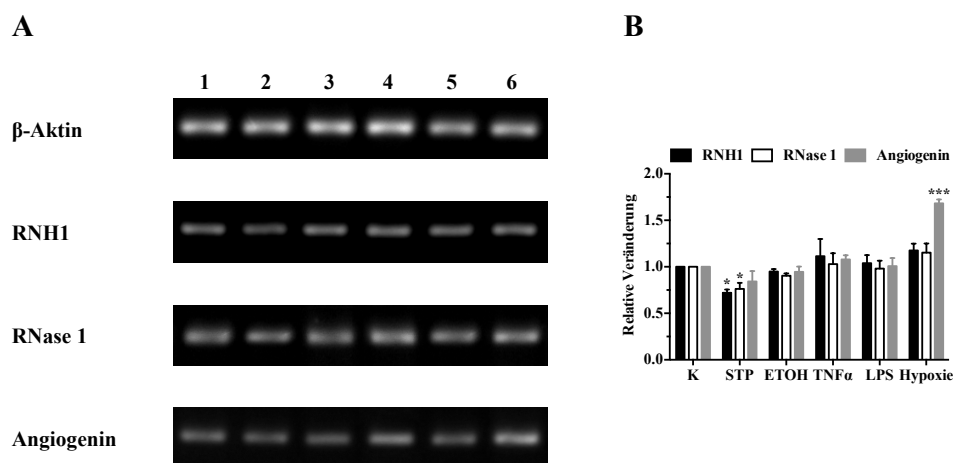


Abbildung 28: DNA aus reverser Transkription von Ribonuklease Inhibitor-, Ribonuklease 1- und Angiogenin-mRNA in HT1080-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie

(A) HT1080-Zellen wurden 24 h mit (1) serumfreiem Medium (K), (2) STP (200 ng/ml), (3) ETOH (2% v/v), (4) TNF α (10 ng/ml), (5) LPS (500 ng/ml) oder (6) unter hypoxischen Bedingungen (2% O $_2$) inkubiert. Die mRNA von RNH1, RNase 1 und des Angiogenins in HT1080-Zellen wurde unter Einsatz von reverser Transkription und semiquantitativer PCR in DNA überführt und diese nach DNA-Agarose-Gelelektrophorese optisch quantifiziert. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten. (B) Die Intensitäten der RNH1-, RNase 1-, Angiogenin- und β -Aktin-Banden wurden densitometrisch mit Hilfe des Programms *LabImage 1D* quantifiziert. Die Daten wurden normalisiert zu den Expressionsraten der β -Aktin mRNA und ausgedrückt als das Verhältnis der Expression des Zielgens zu β -Aktin. Die Expressionsrate in unbehandelten Zellen wurde als 1 definiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, *p<0,05, ***p<0,001).

4.1.3.5 Mikrovesikel: Charakteristika

Nach der Aufreinigung der MV-Fraktion aus den Zellüberständen erfolgte ihre Quantifizierung mittels Durchflußzytometrie, wie unter 3.5.2 beschrieben. Während ETOH und LPS keinen Einfluss auf die MV-Bildung hatten, wurde die MV-Freisetzung durch die Stimulation der Zellen mit STP wesentlich gesteigert. Die TNF α - bzw. hypoxische Behandlung der Zellen führte ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme der MV-Bildung (Abbildung 29A). Um auszuschließen, dass die MV-Bildung sowie die Freisetzung von RNH1, RNase 1/4 und Angiogenin aus den Zellen Folge einer Zellschädigung war, wurde die Zytotoxizität der verwendeten Stimulanzen gemessen, wobei nur die positive Kontrollbehandlung mit STP zytotoxisch wirkte (Abbildung 29B). Die apoptotische Wirkung von STP wurde auch durch die Reduktion des Proteingehaltes der Lysate bestätigt (Abbildung 29C).

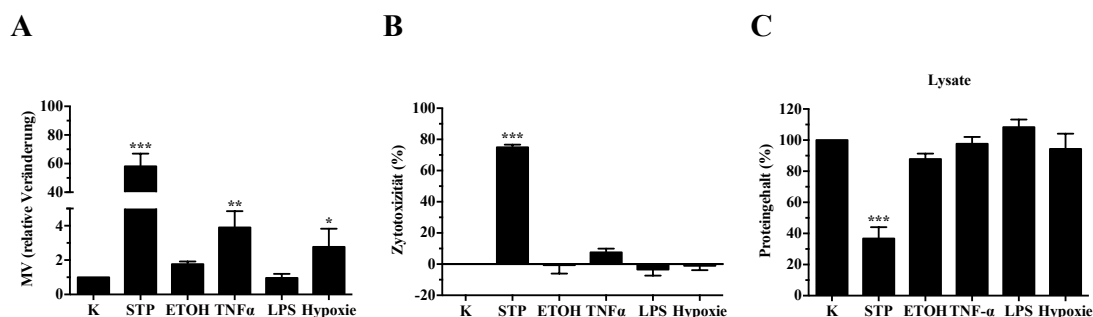


Abbildung 29: Analyse der Mikrovesikelfraktion in HT1080-Zellen

HT1080-Zellen wurden 24 h mit serumfreiem Medium (K), STP (200 ng/ml), ETOH (2% v/v), TNF α (10 ng/ml), LPS (500 ng/ml) oder unter hypoxischen Bedingungen (2% O $_2$) inkubiert. (A) Die MV-Fractionen wurden aus den Zellüberständen isoliert und durch Durchflußzytometrie quantifiziert. Dabei wurden die unbehandelten Kontrollen jeweils gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). (B) Die Zytotoxizität wurde über die Freisetzung von LDH in den Zellüberständen gemessen. Die durch Triton X-100 induzierte LDH-Freisetzung wurde gleich 100% gesetzt. Alle Werte wurden auf die unbehandelten Zellen bezogen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, ***p<0,001). (C) Der Proteingehalt der Zelllysate wurde photometrisch durch Anwendung des *Pierce BCA Protein Assay Kits* von *Thermo Scientific* bestimmt. Dabei wurden die unbehandelten Kontrollen jeweils gleich 100% gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, ***p<0,001).

Zusammenfassend zeigen die hier dargestellten Ergebnisse, dass die 24-stündige Behandlung der Tumorzellen mit apoptotischen und inflammatorischen Agonisten sowie unter Hypoxie die RNH1-Freisetzung induzierte, während gleichzeitig die intrazelluläre RNH1-Konzentration sank. Nach der Hypoxie-Exposition von HT1080-Zellen wurde eine signifikante Verschiebung des Angiogenins vom intrazellulären in das extrazelluläre Kompartiment beobachtet, die von einer Zunahme der mRNA-Expression von Angiogenin begleitet wurde. Die Freisetzung von RNH1 und

Angiogenin erfolgte teilweise über die Bildung von MV. Die Western-Blot-Analysen und Aktivitätstests bestätigten die Abwesenheit der RNase 1/RNase 4 in der MV-Fraktion. Das RNase 1/RNase 4-immunoreaktive Material wurde in hohen Konzentrationen im Restüberstand nach der 24-stündigen Behandlung der Zellen mit STP, TNF α und Hypoxie detektiert. Unter diesen Bedingungen blieb die RNase-Aktivität im Zell- bzw. im Restüberstand unverändert. Die durchflußzytometrische Analyse der MV-Fraktion zeigte, dass die MV-Bildung unter apoptotischen, inflammatorischen und hypoxischen Bedingungen gesteigert wurde. Diese Bedingungen führten parallel zu einer signifikanten Zunahme des RNA-Gehalts sowohl im Zellüberstand als auch in den MV. Die unter 4.1.3 beschriebenen Ergebnisse wurden in der Tabelle 4 zusammengefasst dargestellt.

ERGEBNISSE

Tabelle 4: DNA (aus mRNA) und Protein-immunoreaktives Material von Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1 und Angiogenin, RNA-Konzentration und Ribonuklease-Aktivität in Zelllysaten, Zellüberständen, Restüberständen oder Mikrovesikeln aus HT1080-Zellen nach einer 24-stündigen Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS oder Hypoxie

				Einträge in der Tabelle: Zunahme (↑), Abnahme (↓) oder keine Veränderung (---) gegenüber dem Kontrollwert														
ZELL-LINIE	STIMU-LATION	CYTO-TOX	MV	ZELLÜBERSTAND					RESTÜBERSTAND					MIKROVESIKEL				
				RNH1	RNase1	Angio-genin	RNase-Akt.	RNA	RNH1	RNase1	Angio-genin	RNase-Akt.	RNA	RNH1	RNase1	Angio-genin	RNase-Akt.	RNA
HT 1080																		
	-																	
	STP	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	---	↑	↑↑	↑↑	↑↑	---	↑	↑↑	↑↑	---	↑↑	---	↑↑
	ETOH	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	TNFα	---	↑	↑	↑	---	---	↑	↑	↑	---	---	↑	↑	---	---	---	↑
	LPS	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Hypoxie	---	↑	↑↑	↑↑	↑↑	---	↑	---	↑	---	---	↑	↑↑	---	↑↑	---	↑

ZELL-LINIE	STIMU-LATION	CYTO-TOX	MV	ZELLYSAT				
				RNH1	RNase1	Angio-genin	RNase-Akt.	RNA
				mRNA	mRNA	mRNA		
HT 1080								
	-							
	STP	↑↑	↑↑	↓	↓	---		
	ETOH	---	---	↓	↓	---		
	TNFα	---	↑	↓	↓	---		
	LPS	---	---	---	---	---		
	Hypoxie	---	↑	↓	↓	↓		

4.1.4 DNA (aus mRNA) und Protein-immunoreaktives Material von Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1 und Angiogenin, RNA und Ribonuklease-Aktivität in Zelllysaten, Zellüberständen oder Mikrovesikeln aus EA.hy926-Zellen nach einer 24-stündigen Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS oder Hypoxie

Die Tatsache, dass der RNH1 kein ausschließlich zytoplasmatisches Protein ist, konnte schon in Studien unserer Gruppe gezeigt werden, in denen der RNH1 nicht nur im Zytoplasma, sondern auch in Zellkulturüberständen von Endothelzellen nachgewiesen wurde (Gansler et al., 2014). Um zu untersuchen, ob die Sekretion des RNH1 aus Endothelzellen mittels MV wie bei den Tumorzellen erfolgt und ob die Expression und Freisetzung von RNH1 und dessen Interaktionspartnern auf Protein- und Genebene in Endothelzellen mit denen der Tumorzellen vergleichbar sind, wurden 24-stündige Experimente mit der EA.hy926-Zelllinie unter apoptotischen (STP), nekrotischen (ETOH), inflammatorischen (TNF α , LPS) und hypoxischen Bedingungen durchgeführt. Im Anschluss wurden Zelllysate, -überstände und die aufgereinigten MV-Fractionen für Western-Blot-Analysen und RNase-Aktivitätstests verwendet.

4.1.4.1 Zellüberstände und Zelllysate: Protein-immunoreaktives Material

Ähnlich wie bei den Tumorzellen unter 4.1.3 gezeigt, führte die 24-stündige Stimulation von EA.hy926 mit TNF α bzw. Hypoxie zur signifikanten Zunahme der RNH1-Freisetzung in den Zellüberstand. Die stärkste Freisetzung wurde nach der Behandlung der Zellen mit STP erreicht, bei der die Ausschüttung des RNH1 auf 201% bezüglich des Kontrollwertes zunahm (Abbildungen 30A, 30E). In den Zelllysaten war nach diesen Stimulationen eine Abnahme der RNH1-Konzentration zu verzeichnen, die nach TNF α -, hypoxischer bzw. STP-Behandlung auf 71%, 63% bzw. auf 53% des Kontrollwertes sank (Abbildungen 31A, 31D). LPS und ETOH hatten keinen Einfluss weder auf die intrazelluläre Konzentration noch auf die Freisetzung des RNH1 in den Zellüberstand (Abbildungen 30A, 30E, 31A, 31D).

Während die Stimulationen der Zellen mit LPS, ETOH oder Hypoxie keine Änderung der Freisetzung von RNase 1/RNase 4 bewirkten, war durch STP eine signifikante Zunahme ihrer Freisetzung in den Überstand detektierbar, die bei 165% des

Kontrollwertes lag (Abbildungen 30B, 30F). Im Gegensatz dazu führte die Behandlung der Zellen mit TNF α zu einer Abnahme der RNase 1/RNase 4-Ausschüttung auf 70% des Kontrollwertes. Gleichzeitig wurde durch die STP- bzw. TNF α -Stimulation die intrazelluläre Konzentration von RNase 1/RNase 4 im Zelllysate auf 62% bzw. auf 74% des Kontrollwertes vermindert (Abbildungen 31B, 31E).

Die 24-stündige Hypoxie-Exposition der Endothelzellen sowie die Behandlung der Zellen mit apoptotischen Agonisten (STP) bewirkten eine minimale Steigerung der Angiogenin-Freisetzung. Die Konzentration von Angiogenin nahm unter diesen Bedingungen gleichzeitig im Zelllysate minimal ab. ETOH, TNF α und LPS hatten keinen Einfluss weder auf den extrazellulären noch auf den intrazellulären Gehalt von Angiogenin (Abbildungen 30C, 30G, 31C, 31F).

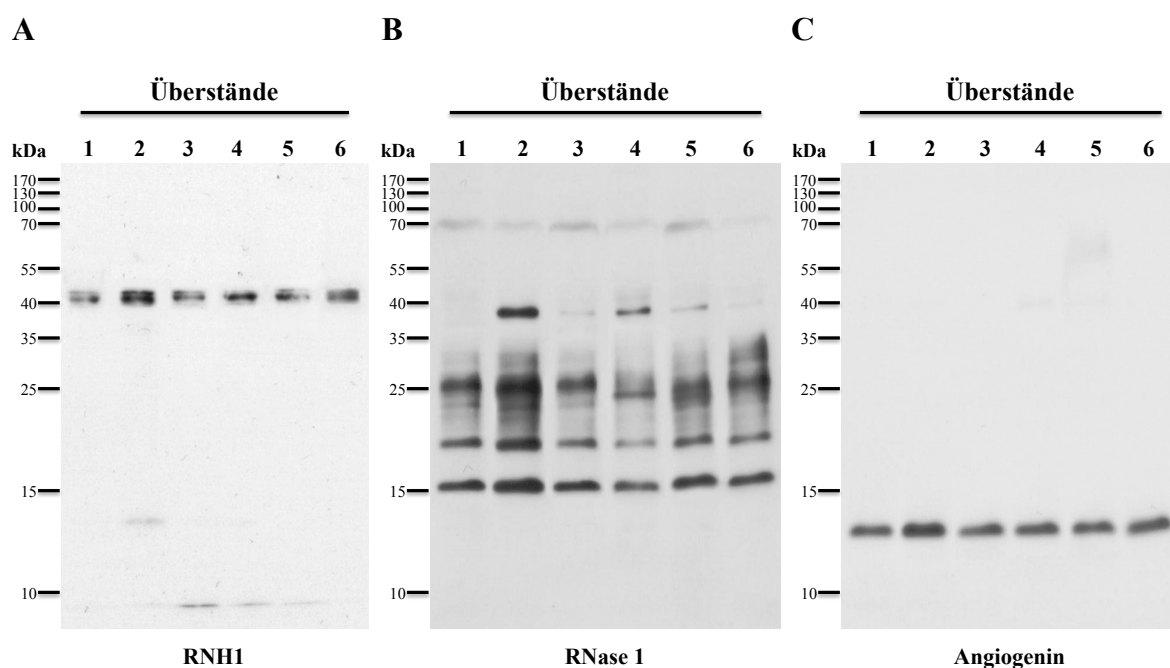
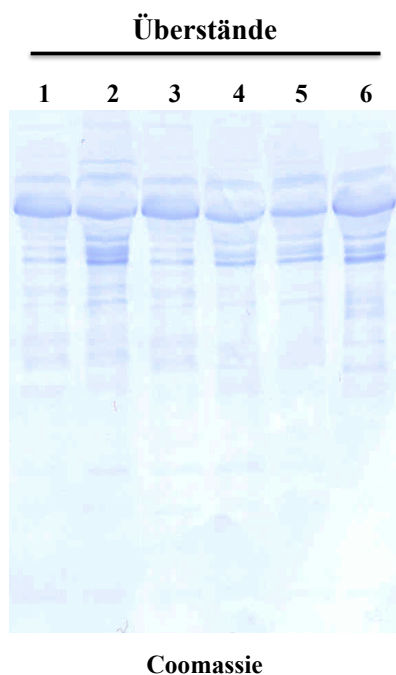


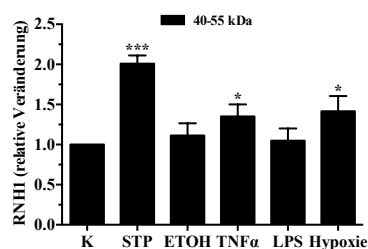
Abbildung 30a: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4-immunoreaktives Material und Angiogenin in Zellüberständen von EA.hy926-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie

EA.hy926-Zellen wurden 24 h mit (1) serumfreiem Medium (K), (2) STP (200 ng/ml), (3) ETOH (2% v/v), (4) TNF α (10 ng/ml), (5) LPS (500 ng/ml) oder (6) unter hypoxischen Bedingungen (2% O₂) inkubiert. Die konzentrierten Zellüberstände wurden mittels Western-Blot analysiert, wobei Primärantikörper gegen (A) RNH1, (B) RNase 1 und (C) Angiogenin verwendet wurden.

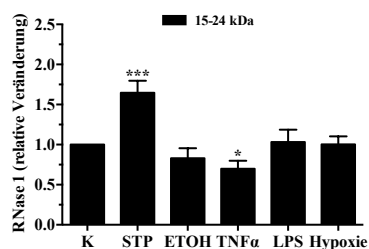
D



E



F



G

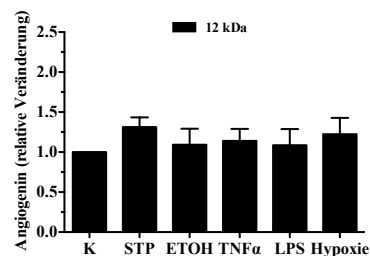


Abbildung 30b: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4-immunoreaktives Material und Angiogenin in Zellüberständen von EA.hy926-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie

(D) Die Färbung der Membran mit *Coomassie Brilliant Blue R250* diente als Ladekontrolle. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten. Die Intensitäten der (E) RNHI-, (F) RNase 1/RNase 4- und (G) Angiogenin-Banden wurden densitometrisch mit Hilfe des Programms *LabImage 1D* quantifiziert. Dabei wurden die unbehandelten Kontrollen jeweils gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, *p<0,05, ***p<0,001).

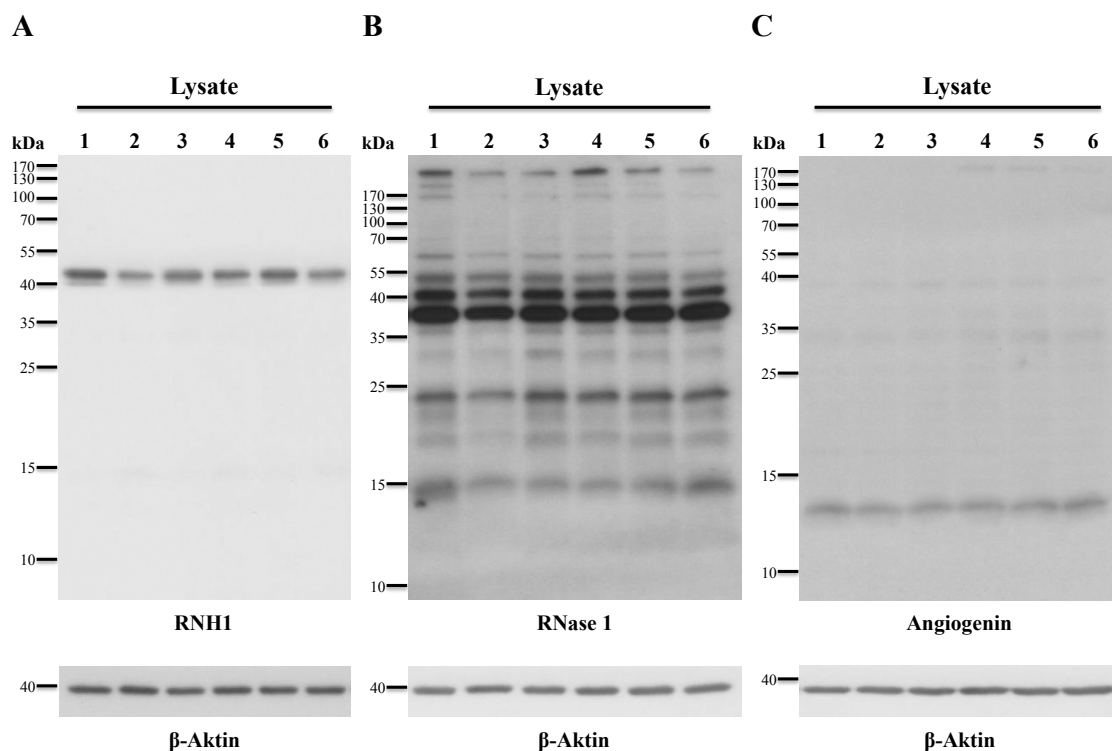


Abbildung 31a: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4-immunoreaktives Material und Angiogenin in Zelllysaten von EA.hy926-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie

EA.hy926-Zellen wurden 24 h mit (1) serumfreiem Medium (K), (2) STP (200 ng/ml), (3) ETOH (2% v/v), (4) TNF α (10 ng/ml), (5) LPS (500 ng/ml) oder (6) unter hypoxischen Bedingungen (2% O $_2$) inkubiert. Die Zelllysate wurden mittels Western-Blot analysiert, wobei Primärantikörper gegen (A) RNHI, (B) RNase 1, (C) Angiogenin und β -Aktin verwendet wurden. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

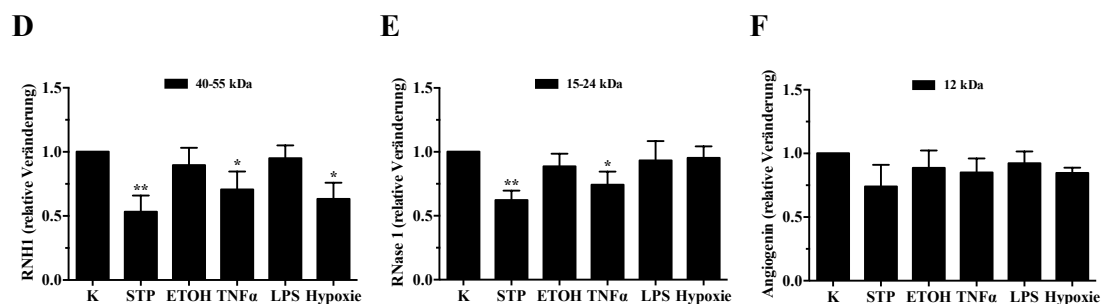


Abbildung 31b: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4-immunoreaktives Material und Angiogenin in Zelllysaten von EA.hy926-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie

Die Intensitäten der RNHI-, RNase 1/RNase 4-, Angiogenin- und β -Aktin-Banden wurden densitometrisch mit Hilfe des Programms *LabImage 1D* quantifiziert. Die graphische Darstellung erfolgte als (D) RNHI-Menge = RNHI/ β -Aktin, (E) RNase 1/RNase 4-Menge = RNase 1/RNase 4/ β -Aktin und (F) Angiogenin-Menge = Angiogenin/ β -Aktin. Dabei wurden die unbehandelten Kontrollen jeweils gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, *p<0,05, **p<0,01).

4.1.4.2 Mikrovesikel und Restüberstände: Protein-immunoreaktives Material

Aus Zellüberständen wurden MV aufgereinigt und mittels Western-Blot analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass auch hier ein Teil des RNH1 mit der MV-Fraktion assoziiert war. Die STP- und TNF α -Stimulation der Zellen sowie deren Hypoxie-Exposition förderten die Akkumulation vom RNH1 in den MV, in denen seine Konzentration auf 464%, 251% bzw. 374% bezüglich des Kontrollwertes stieg. Die aus ETOH- und LPS-behandelten Zellen stammenden MV enthielten RNH1 in gleichen Konzentrationen wie die unbehandelten Zellen (Abbildungen 32A, 32D). In den aus EA.hy926-Überständen isolierten MV war kein RNase 1/RNase 4-Signal detektierbar.

Außer RNH1 wurde auch Angiogenin in der MV-Fraktion nachgewiesen. Die aus STP- bzw. hypoxisch behandelten Zellen isolierten MV zeigten eine signifikante Zunahme im Angiogeningehalt auf 164% bzw. auf 144% bezüglich des Kontrollwertes. Die Stimulationen mit ETOH, TNF α und LPS bewirkten keine Veränderung in der Angiogenin-Konzentration der MV-Fraktion (Abbildungen 32B, 32E).

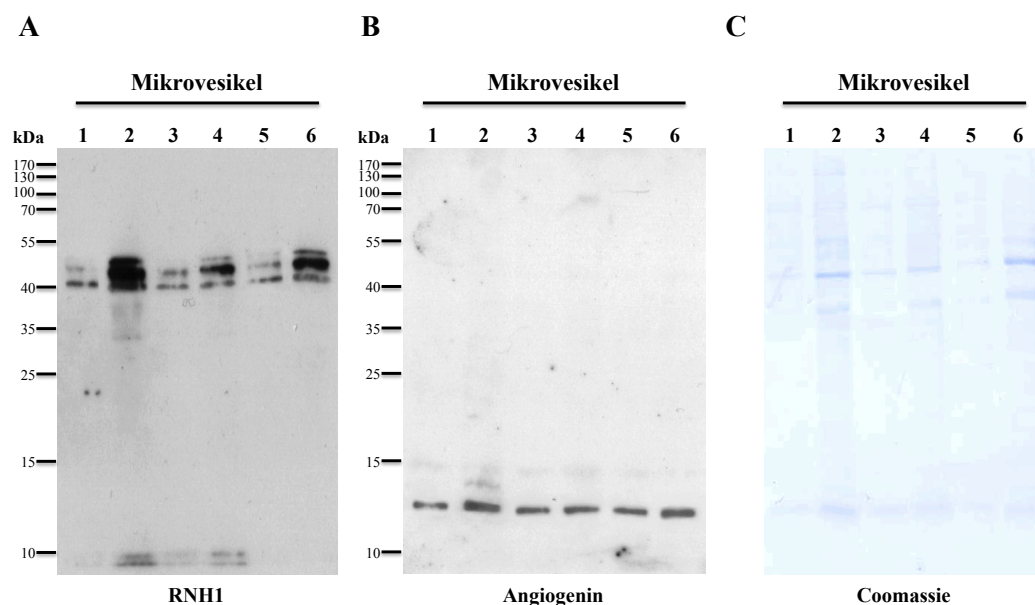


Abbildung 32a: Ribonuklease Inhibitor und Angiogenin in der Mikrovesikelfraktion von EA.hy926-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie

EA.hy926-Zellen wurden 24 h mit (1) serumfreiem Medium (K), (2) STP (200 ng/ml), (3) ETOH (2% v/v), (4) TNF α (10 ng/ml), (5) LPS (500 ng/ml) oder (6) unter hypoxischen Bedingungen (2% O $_2$) inkubiert. Die MV-Fraktion wurde aus Zellüberständen isoliert und mittels Western-Blot analysiert, wobei Primärantikörper gegen (A) RNH1 und (B) Angiogenin verwendet wurden. (C) Die Färbung der Membran mit *Coomassie Brilliant Blue R250* diente als Ladekontrolle. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

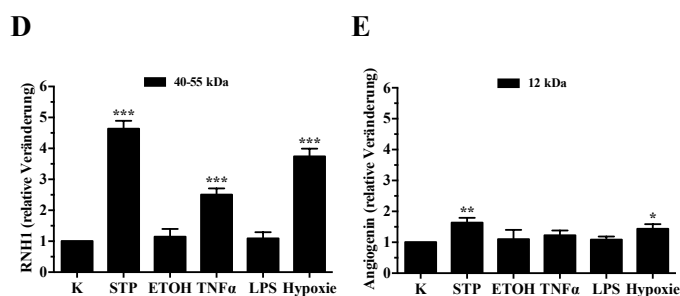


Abbildung 32b: Ribonuklease Inhibitor und Angiogenin in der Mikrovesikelfraktion von EA.hy926-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie

Die Intensitäten der (D) RNH1- und (E) Angiogenin-Banden wurden densitometrisch mit Hilfe des Programms *LabImage 1D* quantifiziert. Dabei wurden die unbehandelten Kontrollen jeweils gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Die Western-Blot-Analyse des Restüberstands, der nach der Aufreinigung der MV-Fraktion aus dem Zellüberstand entstanden ist, zeigte, dass der RNH1 auch außerhalb der MV detektierbar war. Die RNH1-Konzentration nahm nach der STP- bzw. TNF α -Stimulation im Restüberstand auf 190% bzw. auf 130% bezüglich des Kontrollwertes zu, während ETOH, LPS und Hypoxie keinen Einfluss auf den RNH1-Gehalt hatten (Abbildungen 33A, 33E).

Eine signifikante Zunahme von RNase 1/RNase 4 auf 162% des Kontrollwertes wurde nach der Behandlung der Zellen mit STP im Restüberstand erreicht. Wie im Zellüberstand nahm die RNase 1/RNase 4-Konzentration im Restüberstand nach der TNF α -Stimulation um 32% ab. Im Gegensatz dazu blieb der RNase 1/RNase 4-Gehalt des Restüberstands nach der Behandlung der Endothelzellen mit ETOH, LPS und Hypoxie unverändert (Abbildungen 33B, 33F).

Die 24-stündige Behandlung der Zellen mit apoptotischen (STP), nekrotischen (ETOH) und inflammatorischen (TNF α , LPS) Mediatoren sowie die Hypoxie-Exposition der Zellen bewirkten keine signifikante Änderung der Angiogenin-Konzentration im Restüberstand (Abbildungen 33C, 33G).

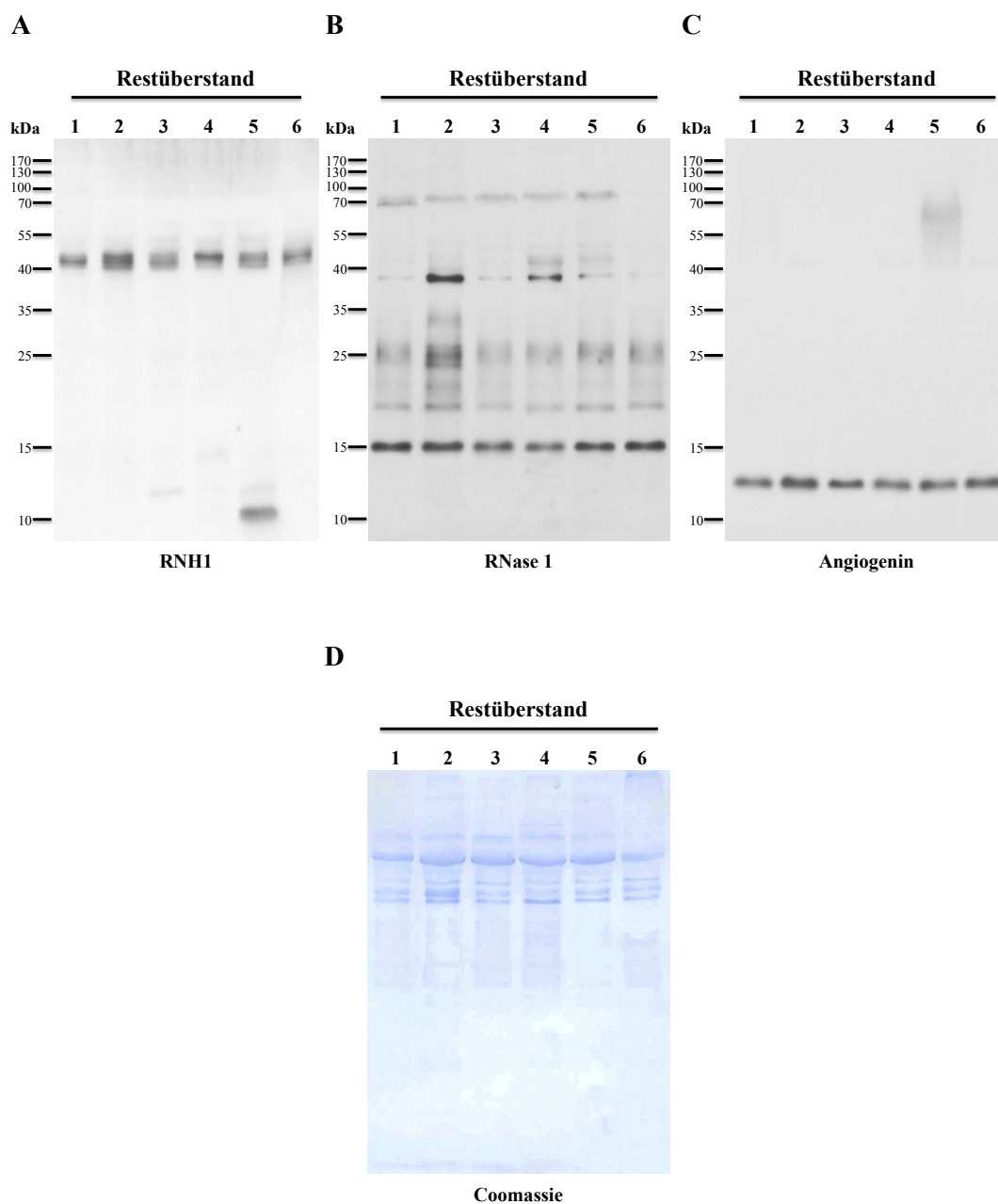


Abbildung 33a: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4-immunoreaktives Material und Angiogenin in Restüberständen von EA.hy926-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie

EA.hy926-Zellen wurden 24 h mit (1) serumfreiem Medium (K), (2) STP (200 ng/ml), (3) ETOH (2% v/v), (4) TNF α (10 ng/ml), (5) LPS (500 ng/ml) oder (6) unter hypoxischen Bedingungen (2% O $_2$) inkubiert. Die konzentrierten Restüberstände wurden mittels Western-Blot analysiert, wobei Primärantikörper gegen (A) RNH1, (B) RNase 1 und (C) Angiogenin verwendet wurden. (D) Die Färbung der Membran mit *Coomassie Brilliant Blue R250* diente als Ladekontrolle. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

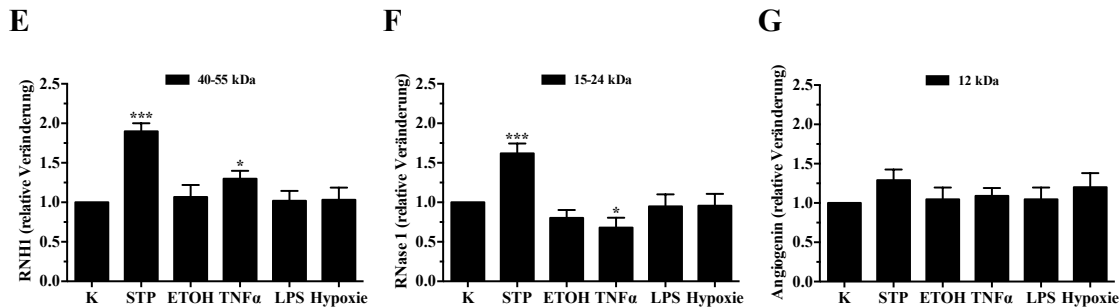


Abbildung 33b: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4-immunoreaktives Material und Angiogenin in Restüberständen von EA.hy926-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie

Die Intensitäten der (E) RNHI-, (F) RNase 1/RNase 4- und (G) Angiogenin-Banden wurden densitometrisch mit Hilfe des Programms *LabImage 1D* quantifiziert. Dabei wurden die unbehandelten Kontrollen jeweils gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, *p<0,05, ***p<0,001).

4.1.4.3 Zellüberstände, Mikrosvesikel und Restüberstände: Ribonuklease-Aktivität und RNA

In der MV-Fraktion war keine RNase-Aktivität nachweisbar, wodurch die bereits erwähnte Abwesenheit des RNase 1/RNase 4-Signals in der Western-Blot-Analyse der MV bestätigt wurde. Nach Behandlung der Endothelzellen mit STP oder TNF α war die ribonukleolytische Aktivität im Überstand bzw. im Restüberstand signifikant herunterreguliert. Andere Stimulanzen hatten keinen Einfluss auf die RNase-Aktivität des Überstands bzw. des Restüberstands (Abbildung 34A).

Neben der RNase-Aktivität wurde auch der RNA-Gehalt in der MV-Fraktion, im Restüberstand sowie im gesamten Zellüberstand gemessen. Während die ETOH- und LPS-Behandlung keine Änderung des RNA-Gehalts bewirkten, führten die 24-stündigen Stimulationen der Endothelzellen mit STP, TNF α oder Hypoxie zu einer signifikanten Zunahme der RNA-Konzentration sowohl in den MV als auch im Restüberstand und im gesamten Zellüberstand (Abbildung 34B).

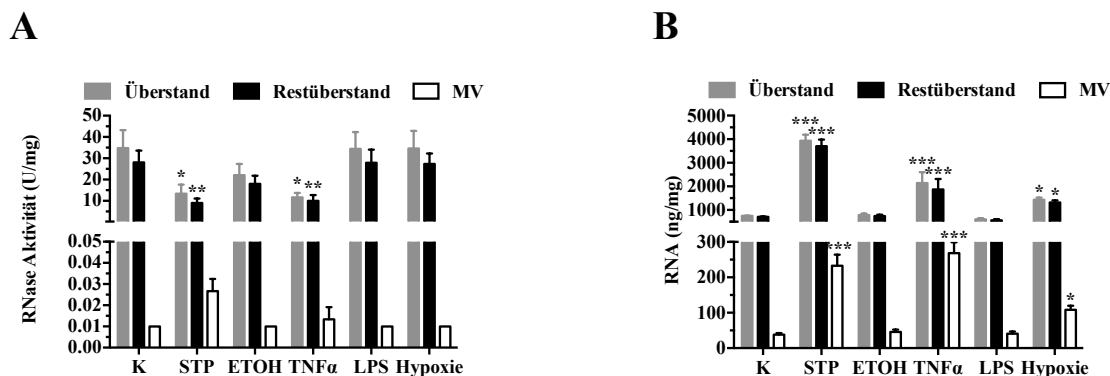


Abbildung 34: Ribonuklease-Aktivität und RNA-Gehalt in Zellüberstand, Restüberstand und MV-Fraktion von EA.hy926-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie

EA.hy926-Zellen wurden 24 h mit serumfreiem Medium (K), STP (200 ng/ml), ETOH (2% v/v), TNF α (10 ng/ml), LPS (500 ng/ml) oder unter hypoxischen Bedingungen (2% O₂) inkubiert. (A) Die RNase-Aktivität im Zellüberstand, Restüberstand und in der MV-Fraktion wurde mittels eines Aktivitätstests detektiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, *p<0,05, **p<0,01). (B) Der RNA-Gehalt im Zellüberstand, Restüberstand und in der MV-Fraktion wurde durch Anwendung des *MasterPure RNA Purification Kits* von *Epicentre* isoliert und mittels des *QubitTM RNA Assay Kits* von *Invitrogen* quantifiziert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, *p<0,05, ***p<0,001).

4.1.4.4 Zelllysate: DNA (aus mRNA)

Die Wirkung von STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie auf die mRNA-Expression von RNH1, RNase 1 und Angiogenin wurde durch semi-quantitative PCR ermittelt. Während ETOH, LPS und Hypoxie keinen Einfluss auf die Genexpression der drei Proteine hatten, führte eine 24-stündige Stimulation von EA.hy926 mit STP zu einer signifikanten Abnahme der mRNA-Expression von RNH1 und RNase 1. Die mRNA-Expression von Angiogenin wurde von der STP-Behandlung nur minimal beeinflusst. Nach der 24-stündigen Stimulation der Zellen mit TNF α nahm die RNase 1-Expression um ca. 30% ab, während die mRNA-Expression von RNH1 und Angiogenin unverändert blieb (Abbildung 35).

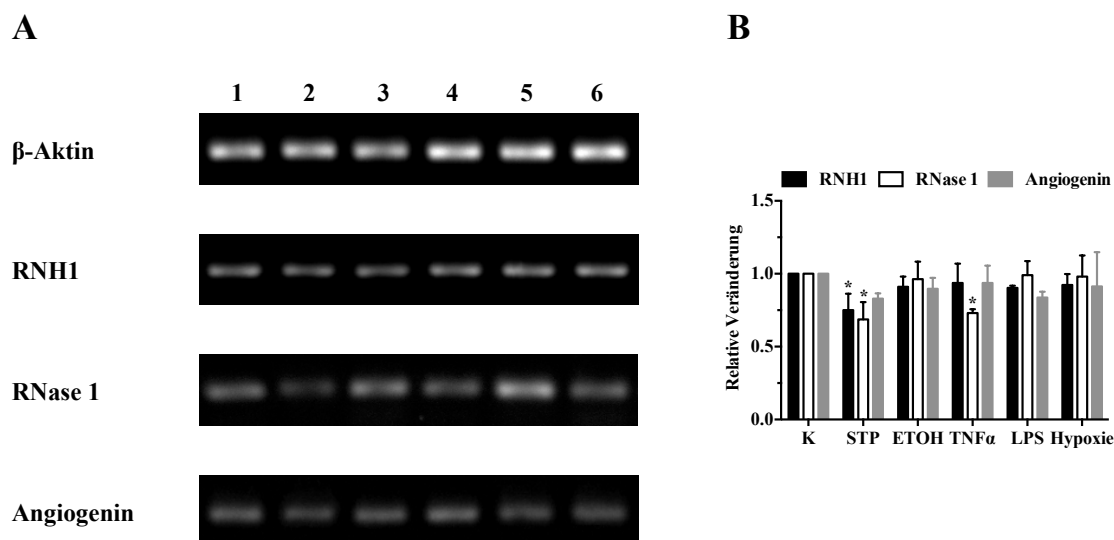


Abbildung 35: DNA aus reverser Transkription von Ribonuklease Inhibitor-, Ribonuklease 1- und Angiogenin-mRNA in EA.hy926-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie

(A) EA.hy926-Zellen wurden 24 h mit (1) serumfreiem Medium (K), (2) STP (200 ng/ml), (3) ETOH (2% v/v), (4) TNF α (10 ng/ml), (5) LPS (500 ng/ml) oder (6) unter hypoxischen Bedingungen (2% O₂) inkubiert. Die mRNA von RNHI, RNase 1 und des Angiogenins in EA.hy926-Zellen wurde unter Einsatz von reverser Transkription und semiquantitativer PCR in DNA überführt und diese nach DNA-Agarose-Gelelektrophorese optisch quantifiziert. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten. (B) Die Intensitäten der RNHI-, RNase 1-, Angiogenin- und β -Aktin-Banden wurden densitometrisch mit Hilfe des Programms *LabImage 1D* quantifiziert. Die Daten wurden normalisiert zu den Expressionsraten der β -Aktin mRNA und ausgedrückt als das Verhältnis der Expression des Zielgens zu β -Aktin. Die Expressionsrate in unbehandelten Zellen wurde als 1 definiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, *p<0,05).

4.1.4.5 Mikrovesikel: Charakteristika

Die aus Zellüberständen isolierten MV-Fraktionen wurden mittels Durchflußzytometrie quantifiziert. Die mit STP stimulierten Zellen zeigten eine wesentlich gesteigerte MV-Sekretion. Die TNF α - bzw. hypoxische Behandlung der Zellen führte auch zu einer signifikanten Zunahme der MV-Bildung, während ETOH und LPS keinen Einfluss auf die MV-Formation hatten (Abbildung 36A). Um auszuschließen, dass die MV-Bildung sowie die Freisetzung von RNHI, RNase 1/RNase 4 und Angiogenin im Zellüberstand durch den toxischen bzw. apoptotischen Effekt der Stimulanzen auf die Zellen getriggert wurden, erfolgte die Durchführung von Zytotoxizitäts- bzw. Apoptosetests. Aus den Ergebnissen dieser Tests ließ sich schlussfolgern, dass nur STP und TNF α eine starke apoptotische Wirkung auf die Endothelzellen hatten, wobei STP gleichzeitig zytotoxisch wirkte (Abbildungen 36B, 36C). Die apoptotische bzw. zytotoxische Wirkung von STP wurde auch durch die Verminderung der Proteinkonzentration der Lysate bestätigt (Abbildung 36D).

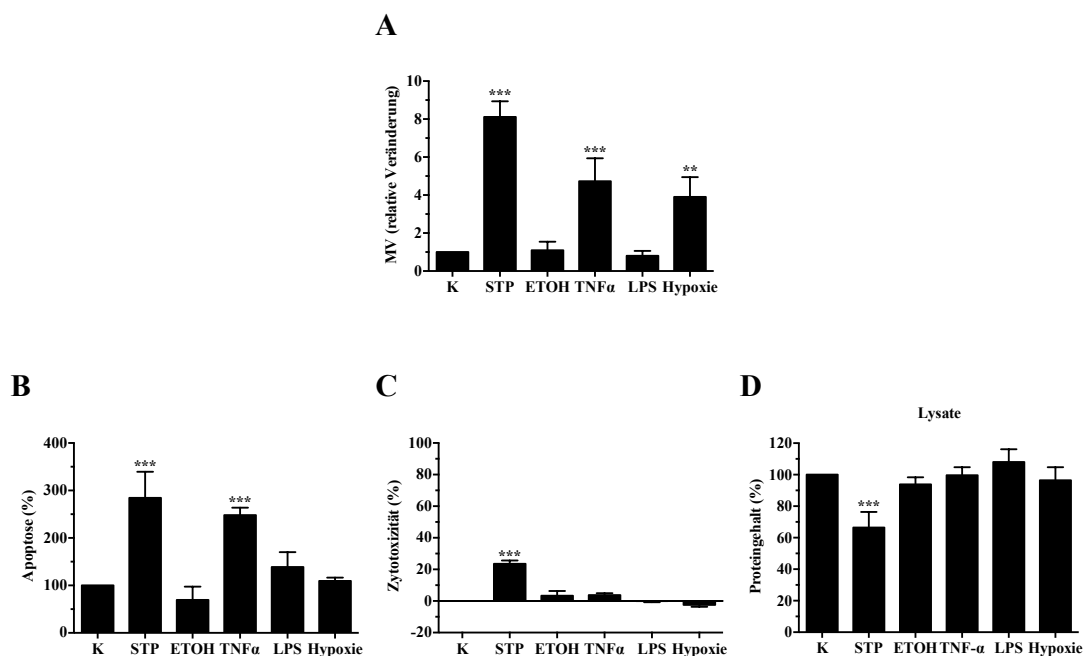


Abbildung 36: Analyse der Mikrovesikelfraktion in EA.hy926-Zellen

EA.hy926-Zellen wurden 24 h mit serumfreiem Medium (K), STP (200 ng/ml), ETOH (2% v/v), TNF α (10 ng/ml), LPS (500 ng/ml) oder unter hypoxischen Bedingungen (2% O₂) inkubiert. (A) Die MV-Fractionen wurden aus den Zellüberständen isoliert und durch Durchflußzytometrie quantifiziert. Dabei wurden die unbehandelten Kontrollen jeweils gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, **p<0,01, ***p<0,001). (B) Der apoptotische Effekt der Stimulanzen wurde über den Nachweis der Translokation von PS bestimmt. Dabei wurden die unbehandelten Kontrollen jeweils gleich 100% gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, ***p<0,001). (C) Die Zytotoxizität wurde über die Freisetzung von LDH in den Zellüberständen gemessen. Die durch Triton X-100 induzierte LDH-Freisetzung wurde gleich 100% gesetzt. Alle Werte wurden auf die unbehandelten Zellen bezogen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, ***p<0,001). (D) Der Proteingehalt der Zelllysate wurde photometrisch durch Anwendung des *Pierce BCA Protein Assay Kits* von *Thermo Scientific* bestimmt. Dabei wurden die unbehandelten Kontrollen jeweils gleich 100% gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, ***p<0,001).

Im Überblick zeigen die hier präsentierten Ergebnisse, dass die RNH1-Freisetzung aus den Endothelzellen unter apoptotischen, inflammatorischen Bedingungen sowie bei Hypoxie signifikant zunahm, während gleichzeitig der intrazelluläre RNH1-Gehalt sank. Die Freisetzung von RNH1 und Angiogenin erfolgte teilweise mittels MV. RNase 1/RNase 4-immunoreaktives Material war in der MV-Fraktion nicht nachweisbar. Diese Tatsache wurde auch durch die fehlende RNase-Aktivität in den MV bestätigt. In Endothelzellen verminderte TNF α die Expression, Freisetzung und Aktivität von RNase 1/RNase 4 auf Protein- und Genebene. Zusätzlich wiesen die Überstände von TNF α -behandelten EA.hy926 einen signifikant erhöhten RNA-Gehalt auf. Die durchflußzytometrische Analyse der MV-Fraktion zeigte, dass die MV-Bildung unter apoptotischen, inflammatorischen und hypoxischen Bedingungen gesteigert wurde. Die vermehrte MV-Bildung nach STP- und TNF α -Stimulation wurde durch den

apoptotischen Effekt dieser Stimulanzen auf die Endothelzellen unterstützt. Da Hypoxie keine apoptotische Wirkung auf die EA.hy926-Zellen ausübte, stellt die MV-Bildung unter hypoxischen Bedingungen einen aktiven Prozess dar, der nicht durch Apoptose induziert wird. Die Behandlungen der Zellen mit STP, TNF α oder Hypoxie führten zusätzlich zu einer signifikanten Zunahme des RNA-Gehalts sowohl im Zellüberstand als auch in den MV. Die unter 4.1.4 beschriebenen Ergebnisse wurden in der Tabelle 5 zusammengefasst dargestellt.

ERGEBNISSE

Tabelle 5: DNA (aus mRNA) und Protein-immunoreaktives Material von Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1 und Angiogenin, RNA-Konzentration und Ribonuklease-Aktivität in Zelllysaten, Zellüberständen, Restüberständen oder Mikrovesikeln aus EA.hy926-Zellen nach einer 24-stündigen Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS oder Hypoxie

				Einträge in der Tabelle: Zunahme (↑), Abnahme (↓) oder keine Veränderung (---) gegenüber dem Kontrollwert															
ZELL-LINIE	STIMU-LATION	CYTO-TOX	MV	ZELLÜBERSTAND					RESTÜBERSTAND					MIKROVESIKEL					
EA.hy 926				RNH1	RNase1	Angio-genin	RNase-Akt.	RNA	RNH1	RNase1	Angio-genin	RNase-Akt.	RNA	RNH1	RNase1	Angio-genin	RNase-Akt.	RNA	
	-																		
	STP	↑	↑↑	↑	↑	---	↓	↑↑	↑	↑	---	↓	↑↑	↑↑	---	↑	---	↑↑	
	ETOH	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	TNF α	---	↑	↑	↓	---	↓	↑↑	↑	↓	---	↓	↑↑	↑	---	---	---	---	↑↑
	LPS	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Hypoxie	---	↑	↑	---	---	---	↑	---	---	---	---	↑	↑↑	---	↑	---	↑	

ZELL-LINIE	STIMU-LATION	CYTO-TOX	MV	ZELLLYSAT				
EA.hy 926				RNH1	RNase1	Angio-genin	RNase-Akt.	RNA
				mRNA	mRNA	mRNA		
	-							
	STP	↑	↑↑	↓	↓	---		
	ETOH	---	---	---	---	---		
	TNF α	---	↑	↓	↓	---		
	LPS	---	---	---	---	---		
	Hypoxie	---	↑	↓	---	---		

4.1.5 Mikrovesikel aus normoxischer und hypoxischer Behandlung von HT1080-Zellen: Zytotoxizität und Einfluss auf die Zellproliferation von humanen primären Endothelzellen (HUVEC-Zellen)

Wie schon unter 4.1.3 und 4.1.4 gezeigt, war RNH1 im Zellüberstand von Tumor- und Endothelzellen nachweisbar. Insbesondere war ein Teil des extrazellulären RNH1 mit der MV-Fraktion beider Zelltypen assoziiert. Der MV-Anteil des RNH1 nahm nach hypoxischer Behandlung beider Zelllinien signifikant zu, wobei diese Zunahme bei den Tumorzellen stärker als bei den Endothelzellen ausgeprägt war. Um die extrazelluläre Wirkung der RNH1-haltigen MV näher zu erforschen, wurden zunächst die MV-Fraktionen aus Zellüberständen von HT1080 isoliert, nachdem die Zellen für 24 h mit serumfreiem Medium unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen behandelt wurden. Mittels durchflußzytometrischer Analyse erfolgte die Quantifizierung der isolierten MV. Weiterhin wurde die Zytotoxizität der aus normoxisch bzw. hypoxisch behandelten Tumorzellen stammenden MV sowie ihr Einfluss auf die Proliferation der Endothelzellen bestimmt.

4.1.5.1 Zytotoxizität

Um die Zytotoxizität der MV auf das Wachstum humaner primärer Endothelzellen zu untersuchen, wurden die Zellen für 24 h mit der gleichen Anzahl von aus normoxisch bzw. hypoxisch behandelten Tumorzellen stammenden MV inkubiert und anschließend die Zytotoxizität mittels LDH-Tests bestimmt. Die aus normoxisch behandelten Tumorzellen stammenden MV zeigten einen signifikanten zytotoxischen Effekt auf HUVEC, der nach der Inkubation von HUVEC mit den aus hypoxisch behandelten Tumorzellen stammenden MV weiter verstärkt wurde (Abbildung 37).

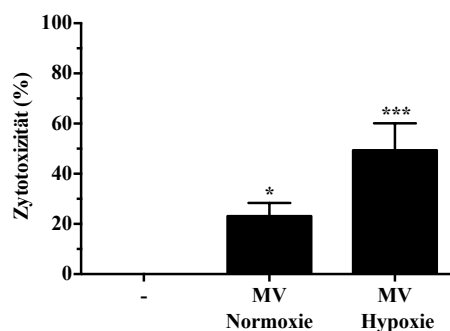


Abbildung 37: Zytotoxizität der Mikrovesikel

Die Zytotoxizität von 300000/ml aus normoxisch bzw. hypoxisch behandelten HT1080-Zellen stammenden MV auf HUVEC-Zellen wurde nach 24 h anhand der LDH-Aktivität ermittelt. Die durch Triton X-100 induzierte LDH-Freisetzung wurde gleich 100% gesetzt. Alle Werte wurden auf die unbehandelten Zellen bezogen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, *p<0,05, ***p<0,001).

4.1.5.2 Einfluss auf die Zellproliferation

Der Einfluss der MV auf die Zellproliferation von HUVEC wurde nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit der gleichen Anzahl von aus normoxisch bzw. hypoxisch behandelten Tumorzellen stammenden MV mittels BrdU-Proliferationstests bestimmt. Beide MV-Fraktionen führten zu einer signifikanten Abnahme der Proliferation von HUVEC, die nach 24-stündiger Stimulation mit der aus hypoxisch behandelten Tumorzellen stammenden MV-Fraktion noch stärker ausgeprägt war (Abbildung 38).

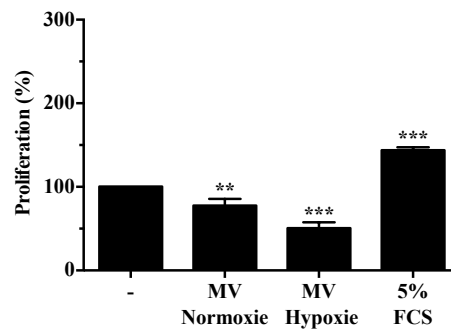


Abbildung 38: Einfluss der Mikrovesikel auf die Zellproliferation

Der Einfluss von 300000/ml aus normoxisch bzw. hypoxisch behandelten HT1080-Zellen stammenden MV auf die Proliferation von HUVEC-Zellen nach 24 h. Basalmedium mit 5% FCS diente als Positivkontrolle. Dabei wurden die unbehandelten Kontrollen jeweils gleich 100% gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, **p<0,01, ***p<0,001).

4.2 Eigenschaften des Ribonuklease Inhibitors

4.2.1 Instabilität des Ribonuklease Inhibitors in humanem Blutplasma

Die ausführliche Untersuchung des Expressionsmusters vom RNH1 während der letzten drei Jahrzehnte präsentierte den RNH1 als ein hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiertes Protein, das in extrazellulären Flüssigkeiten wie Plasma nicht detektiert worden ist (Nadano et al., 1994; Futami et al., 1997). Im Gegensatz zu RNH1 gelang der Nachweis von RNase 1 und Angiogenin im Blutplasma. Weiterhin sind die ribonukleolytische Aktivität und die RNase-Konzentrationen im Blutplasma sehr hoch (RNase 1 300-400 μ g/l und Angiogenin 250-360 μ g/l) (Fischer et al., 2011; Weickmann et al., 1984; Strydom, 1998; Fett et al., 1985). Anhand der unter 4.1.2.1, 4.1.3.1., 4.1.3.2., 4.1.4.1. und 4.1.4.2. präsentierte Ergebnisse wurde gezeigt, dass RNH1 auch extrazellulär vorkommt. Um Hinweise über die Nichtdetektierbarkeit von RNH1 im Plasma zu erhalten, wurde aus einer frisch entnommenen Blutprobe eines gesunden Probanden Plasma isoliert und mit rekombinantem RNH1 versetzt. Die gleiche

Konzentration von rekombinatem RNH1 wurde auch mit der Serinprotease Proteinase K vermischt. Die Proben wurden für 1 h bei 37°C inkubiert, um Körperbedingungen zu imitieren, und danach mittels Western-Blot analysiert (Abbildung 39).

Die Western-Blot-Analyse bestätigte die schon bekannte Abwesenheit vom RNH1 sowie die Anwesenheit von RNase 1 und Angiogenin im humanen Plasma. Interessanterweise konnte eine signifikante Abnahme der Konzentration des im Blutplasma hinzugefügten rekombinanten RNH1 beobachtet werden (rotes Rechteck). Nach der Inkubation des rekombinanten RNH1 mit der Proteinase K war das RNH1-Signal nicht mehr nachweisbar. Die mit schwarzen Pfeilen markierten Bandenhöhen sind durch die Kreuzreaktion der verwendeten Antikörper mit einem unbekanntem Plasmaprotein entstanden. Aus diesen Beobachtungen kann geschlussfolgert werden, dass die Abwesenheit vom RNH1 im Blutplasma auf seine Degradierung durch Plasmaproteasen zurückzuführen sein muss.

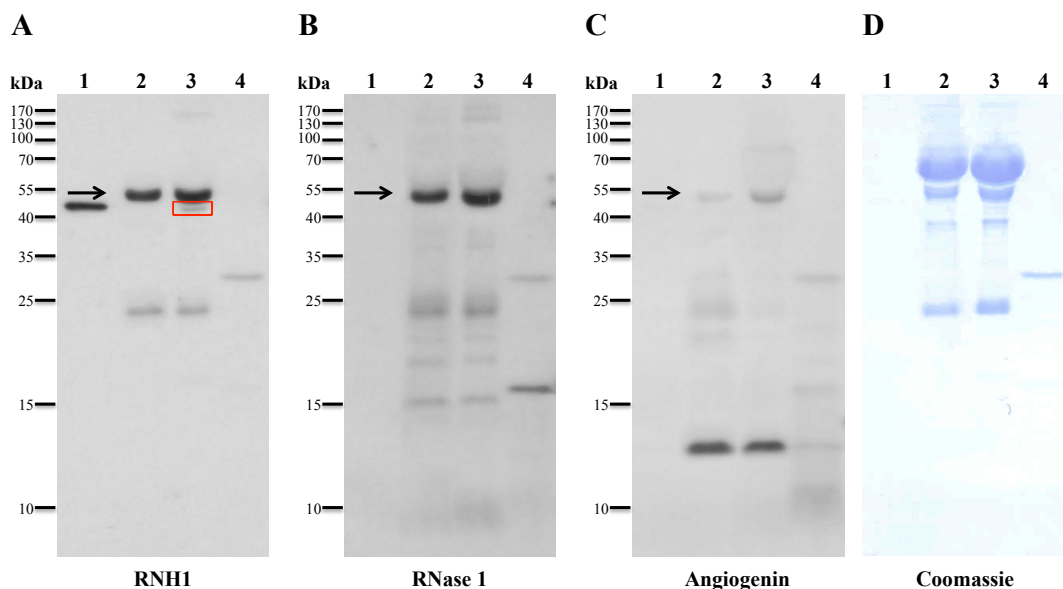


Abbildung 39: Degradierung von Ribonuklease Inhibitor im humanen Blutplasma

Um die Abwesenheit des RNH1 im Plasma näher zu untersuchen, wurden folgende Proben vorbereitet: (1) 500 ng rekombinantes RNH1, (2) 20 µg Plasma, (3) 20 µg Plasma mit 500 ng rekombinantes RNH1 versetzt (4) 500 ng rekombinantes RNH1 mit 6 µg Proteinase K versetzt. Alle Proben wurden in PBS gelöst und für 1 h bei 37°C inkubiert bevor sie mittels Western-Blot analysiert wurden, wobei Primärantikörper gegen (A) RNH1, (B) RNase 1 und (C) Angiogenin verwendet wurden. (D) Die Färbung der Membran mit *Coomassie Brilliant Blue R250* diente als Ladekontrolle. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

4.2.2 Zytotoxizität und Einfluss des Ribonuklease Inhibitors auf die Proliferation von HUVEC-, HT1080- und EA.hy926-Zellen

Wie unter 1.1.2 erläutert, gibt es über die biologische Funktion des RNH1 nur wenige und zum Teil sehr widersprüchliche Erkenntnisse. Zudem konnte keine physiologische Wirkung des RNH1 extrazellulär beschrieben werden. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Zytotoxizität vom RNH1 auf Endothel- und Tumorzellen untersucht und sein Einfluss auf die Proliferation dieser Zellen bestimmt.

Zytotoxizität:

Um die Zytotoxizität vom RNH1 auf das Wachstum von primären humanen Endothelzellen, EA.hy926 und HT1080 zu untersuchen, wurden Zellen für 24 h mit rekombinantem RNH1 in steigenden Konzentrationen (0 µg/ml, 0,4 µg/ml, 4 µg/ml, 10 µg/ml, 40 µg/ml und 100 µg/ml) stimuliert und anschließend die Zytotoxizität mittels LDH-Tests bestimmt. Für alle drei Zelllinien wirkte der rekombinante RNH1 ab einer Konzentration von 40 µg/ml im Vergleich zur Kontrolle signifikant zytotoxisch (Abbildung 40).

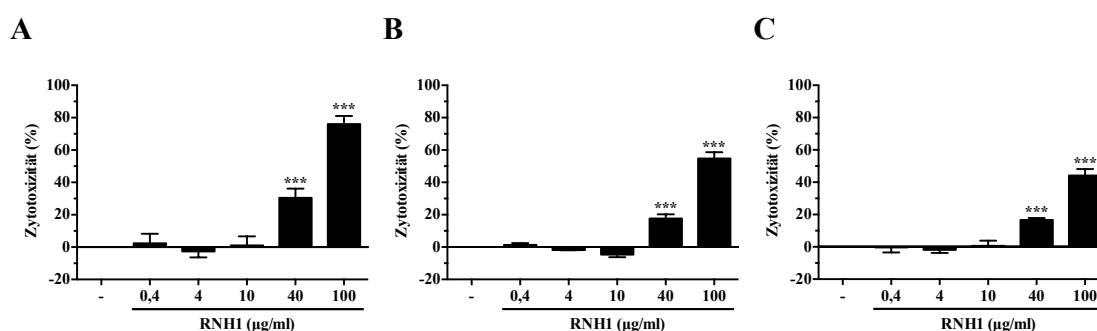


Abbildung 40: Zytotoxizität des Ribonuklease Inhibitors

Die Zytotoxizität steigender RNH1-Konzentrationen auf (A) HUVEC-, (B) EA.hy926- und (C) HT1080-Zellen wurde nach 24 h anhand der LDH-Aktivität ermittelt. Die durch Triton X-100 induzierte LDH-Freisetzung wurde gleich 100% gesetzt. Alle Werte wurden auf die unbehandelten Zellen bezogen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, ***p<0,001).

Einfluss auf die Zellproliferation:

Der Einfluss vom RNH1 auf die Zellproliferation von HUVEC und HT1080 wurde nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit steigenden, nicht toxisch wirkenden Konzentrationen (0 µg/ml, 0,4 µg/ml, 4 µg/ml, 10 µg/ml) von rekombinantem RNH1 mittels BrdU-Proliferationstests bestimmt. Bei der RNH1-Konzentration von 4 µg/ml nahm die Proliferation von HT1080 signifikant zu, während die gleiche Konzentration bei den HUVEC-Zellen einen minimalen proliferativen Effekt bewirkte (Abbildung 41).

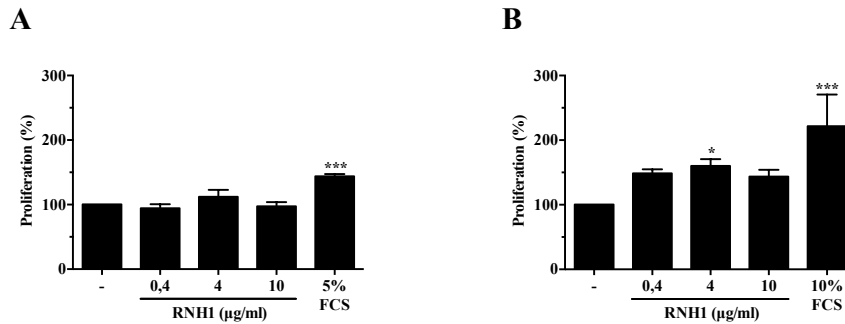


Abbildung 41: Einfluss von Ribonuklease Inhibitor auf die Zellproliferation

Der Einfluss steigender RNHI-Konzentrationen auf die Proliferation von (A) HUVEC- und (B) HT1080-Zellen nach 24 h. Basalmedium mit 5% bzw. 10% FCS diente als Positivkontrolle. Dabei wurden die unbehandelten Kontrollen jeweils gleich 100% gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, *p<0,05, ***p<0,001).

4.2.3 Hemmung der Expression des Ribonuklease Inhibitors mittels siRNA: Expressionshemmung der Ribonukleasen Angiogenin und Ribonuklease 1 und weitere Effekte in HT1080- und EA.hy926-Zellen

Hauptfunktion des intrazellulären RNHI ist der Schutz der Zelle vor der toxischen Wirkung von RNasen. Intrazellulär bindet RNHI mit hoher Affinität an die in die Zelle eingedrungenen exogenen RNasen der RNase A-Superfamilie und inaktiviert diese. Dadurch schützt der RNHI die Zelle vor einem ribonukleolytischen Abbau der RNA (Haigis et al., 2003). Außerdem kann der RNHI die Funktion intrazellulärer RNasen regulieren. Es wurde gezeigt, dass RNHI sowohl die intrazelluläre Lokalisierung als auch die Funktion von Angiogenin kontrolliert, welche z.B. unter Wachstumsbedingungen im Kern lokalisiert ist, wo sie nicht mit dem RNHI assoziiert und dadurch die Transkription von rRNAs induzieren kann (Pizzo et al., 2013). Um mehr Kenntnisse über intrazelluläre Funktionen des RNHI zu gewinnen, wurde untersucht, in wieweit die Expression des RNHI die Expression typischer RNHI-bindender RNasen der RNase A-Superfamilie (wie RNase 1 und Angiogenin) verändert. Dazu wurde die Genexpression des RNHI in Tumor- und Endothelzellen herunterreguliert, um zu erkennen, ob eine erniedrigte RNHI-Expression mit einer vermehrten Freisetzung von RNase 1 und Angiogenin und/oder mit einer veränderten Zytotoxizität verbunden ist.

4.2.3.1 Hemmung der Expression des Ribonuklease Inhibitors mittels siRNA in HT1080-Zellen

Um den Einfluss der RNHI-Expression auf die Expression von RNasen in der Tumorzelllinie HT1080 zu untersuchen, wurde die Genexpression des RNHI mittels

siRNA vermindert. Zur Etablierung dieser Methode wurden HT1080 mit steigenden Konzentrationen einer gegen RNH1 gerichteten siRNA sowie einer siRNA-Positivkontrolle, gerichtet gegen GAPDH, transfiziert und die Effizienz nach 48 h mittels semi-quantitativer PCR nachgewiesen. Die größte Abnahme der RNH1-Expression wurde bei einer siRNA-Konzentration von 75 nM erreicht, bei der die mRNA-Expression des RNH1 auf etwa 20% der Kontrolle sank. Die Transfektion mit einer siRNA gegen GAPDH zeigte keinen Einfluss auf die RNH1-Expression, während die Genexpression des Zielgens GAPDH reduziert wurde (Abbildung 42). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden alle weiteren Versuche mit einer siRNA-Konzentration von 75 nM durchgeführt.

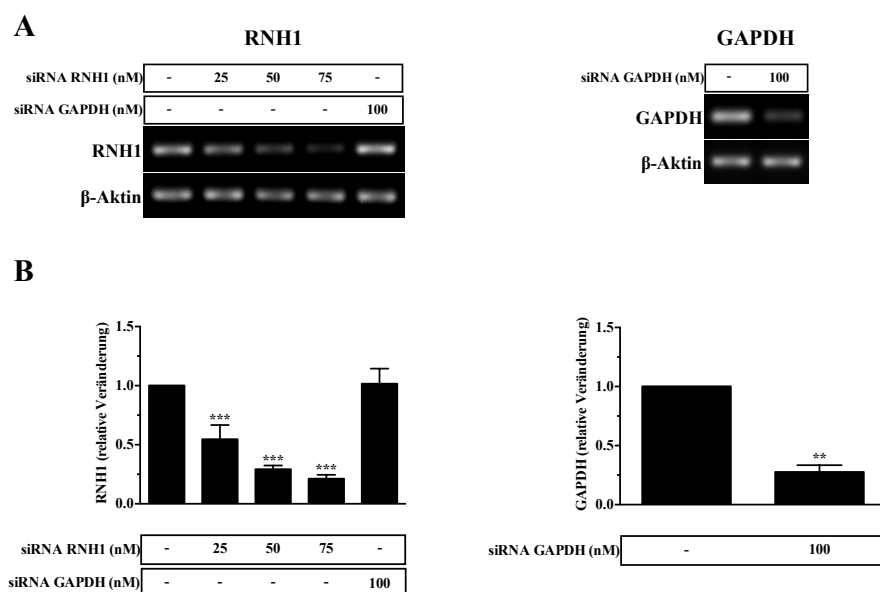


Abbildung 42: siRNA-vermittelte Herunterregulation der Ribonuklease Inhibitor-Expression in HT1080-Zellen

(A) HT1080-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen an siRNA gegen RNH1 bzw. GAPDH transfiziert und die Effizienz mittels semi-quantitativer PCR nachgewiesen. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten. (B) Die Intensitäten der RNH1-, GAPDH- und β -Aktin-Banden wurden densitometrisch mit Hilfe des Programms *LabImage 1D* quantifiziert. Die Daten wurden normalisiert zu den Expressionsraten der β -Aktin mRNA und ausgedrückt als das Verhältnis der Expression des Zielgens zu β -Aktin. Die Expressionsrate in untransfizierten Zellen wurde als 1 definiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD ($n=3$, $**p<0,01$, $***p<0,001$).

Der Einfluss der RNH1-Expression auf die Expression von RNase 1 und Angiogenin sowie auf deren Lokalisation in den Lysaten und Zellüberständen von HT1080 wurde durch die Herunterregulation der RNH1-Expression mittels siRNA analysiert. Die Zellen wurden mit einer gegen RNH1 gerichteten siRNA sowie mit einer *scrambled* siRNA-Kontrolle, deren Sequenz sich gegen kein Genprodukt richtet, transfiziert. Als Positivkontrolle wurde eine gegen GAPDH gerichtete siRNA verwendet. Die Zellen

wurden 48 h nach der Transfektion lysiert und Lysate sowie Überstände für semi-quantitative PCR, Western-Blot-Analysen und RNase-Aktivitätstests gesammelt.

Einfluss auf Genebene:

Die Transfektion der Zellen mit einer gegen RNH1 gerichteten siRNA führte zu einer Verminderung der RNH1-Expression auf 20% des Kontrollwertes und gleichzeitig zu einer signifikanten Abnahme der RNase 1- und Angiogenin-Expression auf ca. 72% des Kontrollwertes. Die Behandlungen der Zellen mit der *scrambled* oder mit der gegen GAPDH gerichteten positiven siRNA-Kontrolle zeigten keinen Einfluss auf die mRNA-Expression der drei Gene. Die positive siRNA-Kontrolle gegen GAPDH reduzierte die GAPDH-Expression auf 28%, bezogen auf die Kontrolle (Abbildung 43). Die Genexpressionswerte wurden jeweils auf die noch intakten Zellen der Kontrollgruppe bezogen.

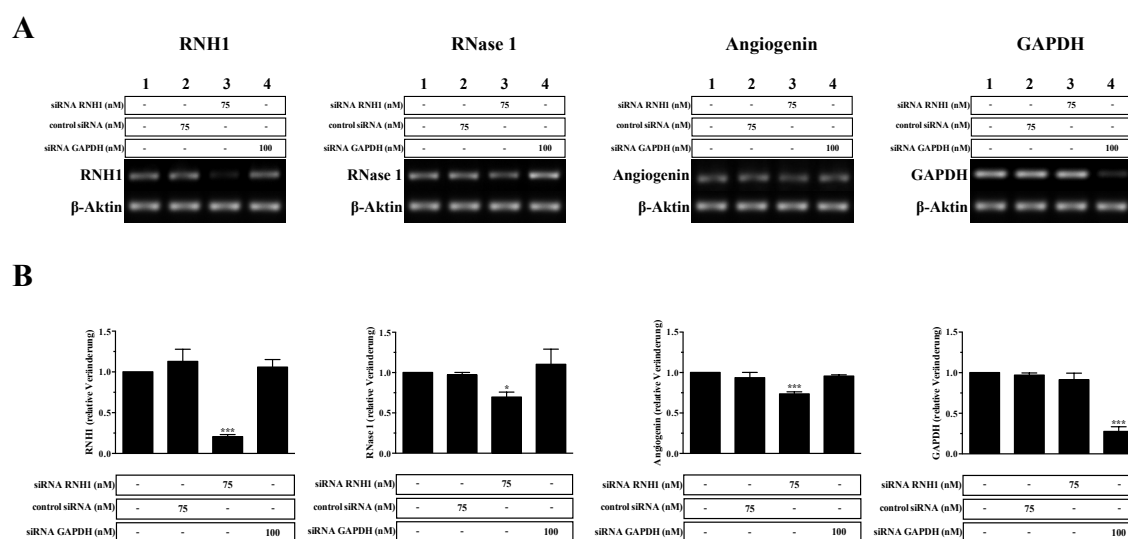


Abbildung 43: Einfluss der durch siRNA-vermittelte Herunterregulation der Ribonuklease Inhibitor-Expression auf die mRNA-Expression von Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1 und Angiogenin in HT1080-Zellen

(A) HT1080-Zellen wurden mit (1) Transfektionsreagenz-haltigem Medium, (2) einer *scrambled* siRNA-Kontrolle, (3) einer gegen RNH1 gerichteten siRNA sowie mit (4) einer gegen GAPDH gerichteten siRNA transfiziert und die Effizienz mittels semi-quantitativer PCR nachgewiesen. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten. (B) Die Intensitäten der RNH1-, RNase 1-, Angiogenin-, GAPDH- und β -Aktin-Banden wurden densitometrisch mit Hilfe des Programms *LabImage 1D* quantifiziert. Die Daten wurden normalisiert zu den Expressionswerten der β -Aktin mRNA und ausgedrückt als das Verhältnis der Expression des Zielgens zu β -Aktin. Die Expressionsrate in untransfizierten Zellen wurde als 1 definiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, *p<0,05, ***p<0,001).

Einfluss auf die Proteinexpression:

Um den Einfluss der Herunterregulation der RNH1-Expression auf die Proteinexpression von RNH1, RNase 1/RNase 4 und Angiogenin zu analysieren, wurden

HT1080 48 h nach ihrer Transfektion mit einer gegen RNH1 gerichteten siRNA sowie mit einer *scrambled* und positiven siRNA-Kontrolle lysiert und die entstandenen Lysate für Western-Blot-Analysen verwendet.

Die mit einer gegen RNH1 gerichteten siRNA transfizierten Zellen zeigten eine signifikante Verminderung ihrer intrazellulären RNH1-Gesamtkonzentration auf 47% des Kontrollwertes und gleichzeitig eine leichte Abnahme der RNase 1/RNase 4- und Angiogenin-Konzentration auf ca. 84% des Kontrollwertes. Die Behandlungen der Zellen mit der *scrambled* oder mit der gegen GAPDH gerichteten positiven siRNA-Kontrolle hatten keinen Einfluss auf die intrazelluläre Konzentration der drei Proteine in den Lysaten (Abbildungen 44a, 44b).

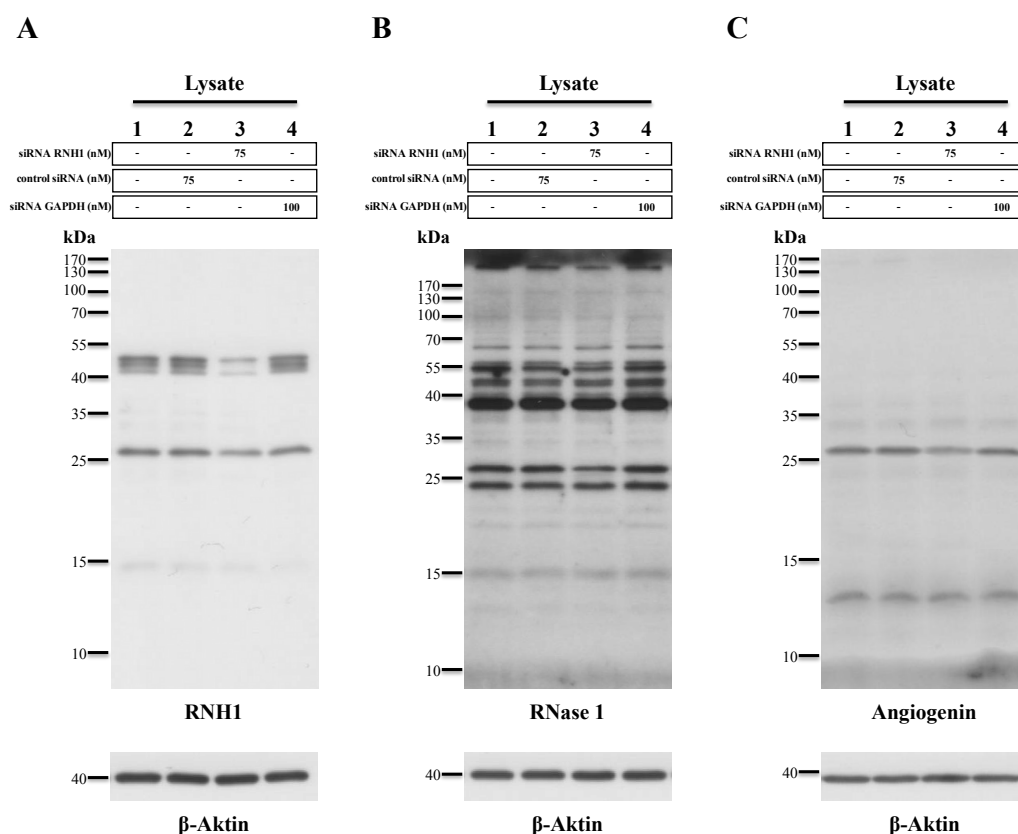


Abbildung 44a: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4-immunoreaktives Material und Angiogenin in Zelllysaten von HT1080-Zellen nach Herunterregulation der Ribonuklease Inhibitor-Expression mittels siRNA

HT1080-Zellen wurden 48h mit (1) Transfektionsreagenz-haltigem Medium, (2) einer *scrambled* siRNA-Kontrolle, (3) einer gegen RNH1 gerichteten siRNA sowie mit (4) einer gegen GAPDH gerichteten siRNA behandelt. Die Zelllysate wurden mittels Western-Blot analysiert, wobei Primärantikörper gegen (A) RNH1, (B) RNase 1, (C) Angiogenin und β -Aktin verwendet wurden. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

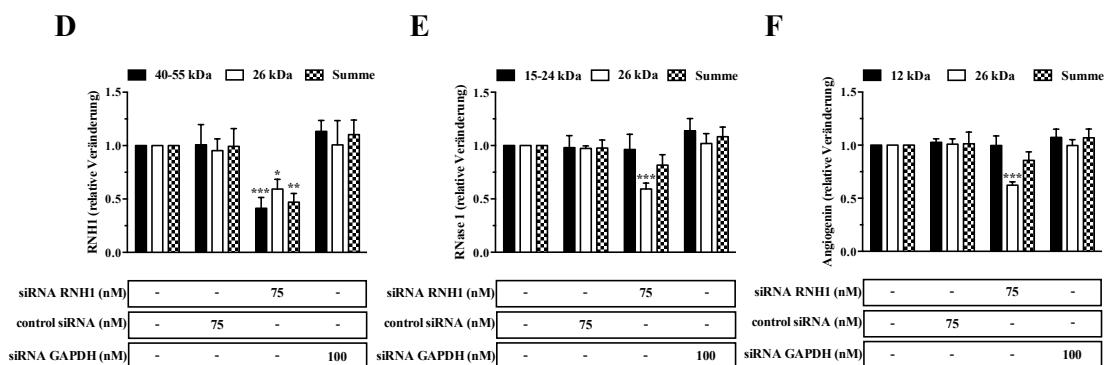


Abbildung 44b: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4-immunoreaktives Material und Angiogenin in Zelllysaten von HT1080-Zellen nach Herunterregulation der Ribonuklease Inhibitor-Expression mittels siRNA

Die Intensitäten der RNHI-, RNase 1/RNase 4-, Angiogenin- und β -Aktin-Banden wurden densitometrisch mit Hilfe des Programms *LabImage 1D* quantifiziert. Die graphische Darstellung erfolgte als (D) RNHI-Menge = RNHI/ β -Aktin, (E) RNase 1/RNase 4-Menge = RNase 1/RNase 4/ β -Aktin und (F) Angiogenin-Menge = Angiogenin/ β -Aktin. Dabei wurden die untransfizierten Kontrollen jeweils gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

RNase-Aktivität und RNA:

Des Weiteren wurden die RNase-Aktivität und der RNA-Gehalt in den gesammelten Zellkulturüberständen transfizierter Zellen bestimmt. Die Transfektion der Zellen mit der gegen RNHI gerichteten siRNA führte zu einer signifikanten Zunahme sowohl der RNase-Aktivität als auch des RNA-Gehalts im Überstand, während die *scrambled* siRNA-Kontrolle sowie die verminderte Genexpression von GAPDH keinen Einfluss auf die RNase-Aktivität oder die RNA-Konzentration hatten (Abbildung 45).

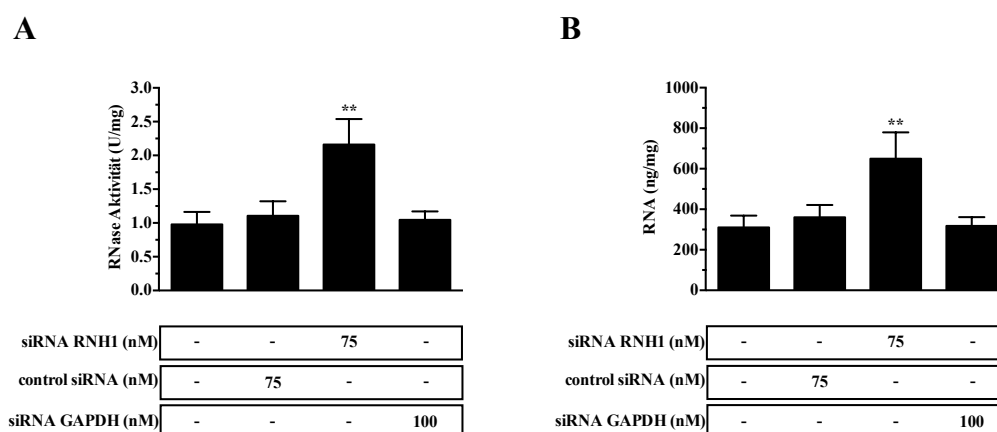


Abbildung 45: Ribonuklease-Aktivität und RNA-Gehalt in Zellüberständen von HT1080-Zellen nach Herunterregulation der Ribonuklease Inhibitor-Expression mittels siRNA

HT1080-Zellen wurden 48h mit Transfektionsreagenz-haltigem Medium, einer *scrambled* siRNA-Kontrolle, einer gegen RNHI gerichteten siRNA sowie mit einer gegen GAPDH gerichteten siRNA behandelt. (A) Die RNase-Aktivität in den Zellüberständen wurde mittels eines Aktivitätstests detektiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, **p<0,01). (B) Der RNA-Gehalt in den Zellüberständen von transfizierten HT1080-Zellen wurde durch Anwendung des *MasterPure RNA Purification Kits* von *Epicentre* isoliert und mittels des *QubitTM RNA Assay Kits* von *Invitrogen* quantifiziert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, **p<0,01).

Um zu prüfen, ob die erhöhte RNase-Aktivität sowie der gesteigerte RNA-Gehalt im Zellüberstand der mit einer gegen RNH1 gerichteten siRNA transfizierten Zellen Folge einer Zellschädigung war, wurde ein Zytotoxizitätstest durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Verminderung der mRNA-Expression des RNH1 einen zytotoxischen Effekt auf die Tumorzellen hatte, während die Transfektion mit anderen siRNAs nicht toxisch wirkte (Abbildung 46A). Die signifikante Abnahme der Anzahl lebender transfizierter Zellen bestätigte die zytotoxische Wirkung der Herunterregulation der RNH1-Expression in HT1080 (Abbildung 46B).

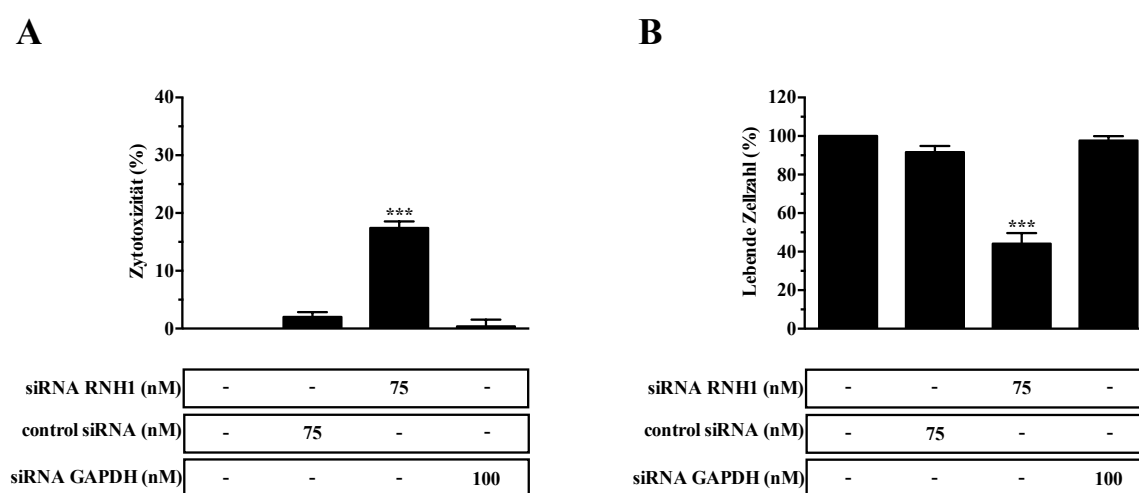


Abbildung 46: Einfluss der siRNA-vermittelte Herunterregulation der Ribonuklease Inhibitor-Expression auf das Wachstum von HT1080-Zellen

HT1080-Zellen wurden 48h mit Transfektionsreagenz-haltigem Medium, einer *scrambled* siRNA-Kontrolle, einer gegen RNH1 gerichteten siRNA sowie mit einer gegen GAPDH gerichteten siRNA behandelt. (A) Der zytotoxische Effekt der verwendeten Stimulanzen wurde anhand der LDH-Aktivität in den Zellüberständen ermittelt. Die durch Triton X-100 induzierte LDH-Freisetzung wurde gleich 100% gesetzt. Alle Werte wurden auf die untransfizierten Zellen bezogen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, ***p<0,001). (B) Der Einfluss der siRNA-vermittelte Herunterregulation der RNH1-Expression auf das Wachstum von HT1080-Zellen erfolgte durch Bestimmung der Anzahl der lebenden transfizierten Zellen 48 h nach der Transfektion unter Verwendung des *TC10TM Automated Cell Counters* von *Bio-Rad*. Dabei wurde die Anzahl der lebenden untransfizierten Zellen jeweils gleich 100% gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, ***p<0,001).

Zusammenfassend zeigen die hier präsentierten Ergebnisse, dass die Herunterregulation der RNH1-Expression zu einer Abnahme sowohl der mRNA-Expression als auch der intrazellulären Konzentration von RNase 1/RNase 4 und Angiogenin in Tumorzellen führte. Im Zellüberstand der mit einer gegen RNH1 gerichteten siRNA transfizierten

Zellen fand sich eine signifikant erhöhte RNase-Aktivität, die gleichzeitig mit einer Zunahme des RNA-Gehalts im Überstand auftrat. Dieses paradoxe Erscheinen erklärte sich durch die gesteigerten Werte der Zytotoxizität sowie durch die signifikante Verminderung der Anzahl von lebenden transfizierten Zellen. Diese Daten zeigen, dass die RNH1-Expression nicht nur die Expression von RNase 1/RNase 4 und Angiogenin sondern auch das Wachstum der Tumorzellen beeinflusst.

4.2.3.2 Hemmung der Expression des Ribonuklease Inhibitors mittels siRNA in

EA.hy926-Zellen

Um den Einfluss der RNH1-Expression auf die Expression von RNase 1 und Angiogenin auf Gen- und Proteinebene in der Endothelzelllinie EA.hy926 und der HT1080 zu vergleichen, erfolgte die Herunterregulation der RNH1-Expression in den Endothelzellen ähnlich wie bei den Tumorzellen mittels siRNA. EA.hy926 wurden mit einer gegen RNH1 gerichteten siRNA sowie mit einer *scrambled* siRNA-Kontrolle transfiziert. Als Positivkontrolle wurde eine gegen GAPDH gerichtete siRNA eingesetzt. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und Zelllysate sowie -überstände für semi-quantitative PCR, Western-Blot-Analysen und RNase-Aktivitätstests verwendet.

Einfluss auf Genebene:

Die mit einer gegen RNH1 gerichteten siRNA transfizierten Zellen zeigten eine Abnahme der RNH1-Expression auf 21% des Kontrollwertes und gleichzeitig eine signifikante Senkung der RNase 1- und Angiogenin-Expression auf ca. 73% des Kontrollwertes. Die Behandlungen der Zellen mit der *scrambled* oder mit der gegen GAPDH gerichteten positiven siRNA-Kontrolle bewirkten keine Änderung in der mRNA-Expression der drei Gene. Die positive siRNA-Kontrolle verminderte die GAPDH-Expression auf 28%, relativ zur Kontrolle (Abbildung 47). Die Werte der Genexpression wurden jeweils auf die noch intakten Zellen der Kontrollgruppe bezogen.

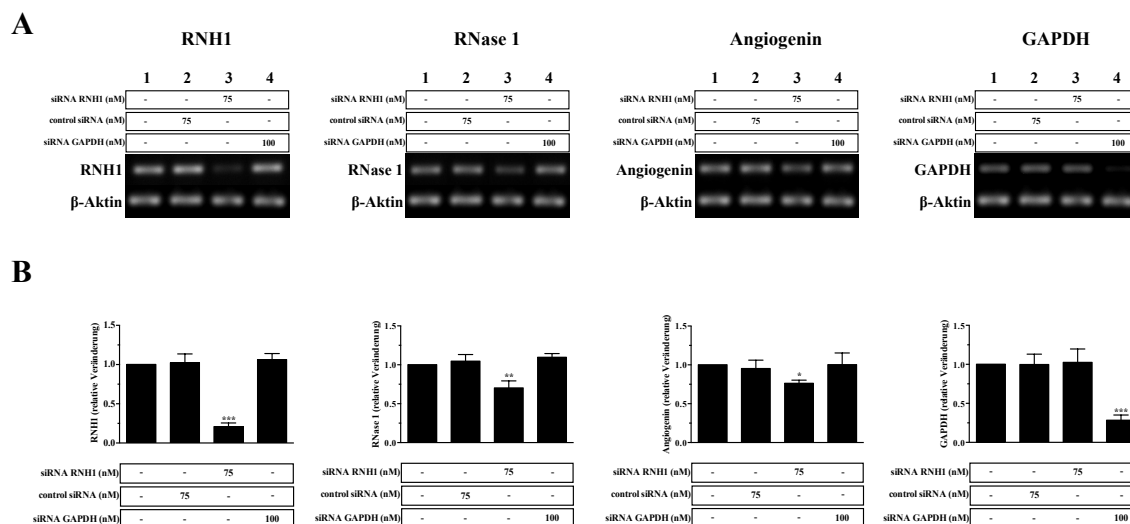


Abbildung 47: Einfluss der siRNA-vermittelten Herunterregulation der Ribonuklease Inhibitor-Expression auf die mRNA-Expression von Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1 und Angiogenin in EA.hy926-Zellen

(A) EA.hy926-Zellen wurden mit (1) Transfektionsreagenz-haltigem Medium, (2) einer *scrambled* siRNA-Kontrolle, (3) einer gegen RNHI gerichteten siRNA sowie mit (4) einer gegen GAPDH gerichteten siRNA transfiziert und die Effizienz mittels semi-quantitativer PCR nachgewiesen. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten. (B) Die Intensitäten der RNHI-, RNase 1-, Angiogenin-, GAPDH- und β -Aktin-Banden wurden densitometrisch mit Hilfe des Programms *LabImage 1D* quantifiziert. Die Daten wurden normalisiert zu den Expressionswerten der β -Aktin mRNA und ausgedrückt als das Verhältnis der Expression des Zielgens zu β -Aktin. Die Expressionsrate in untransfizierten Zellen wurde als 1 definiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Einfluss auf die Proteinexpression:

Um den Einfluss der Verminderung der RNHI-Expression auf die Proteinexpression von RNHI, RNase 1/RNase 4 und Angiogenin zu analysieren, wurden EA.hy926 48 h nach ihrer Transfektion mit einer gegen RNHI gerichteten siRNA sowie mit einer *scrambled* und positiven siRNA-Kontrolle lysiert und die entstandenen Lysate für Western-Blot-Analysen verwendet.

Die Transfektion der Zellen mit einer gegen RNHI gerichteten siRNA führte zu einer signifikanten Senkung der intrazellulären RNHI-Konzentration auf 45% des Kontrollwertes und gleichzeitig zu einer leichten Abnahme der RNase 1/RNase 4- und Angiogenin-Konzentration auf ca. 83% der Kontrolle. Die Behandlung der Zellen mit der *scrambled* oder mit der gegen GAPDH gerichteten positiven siRNA-Kontrolle zeigten keine Wirkung auf die intrazelluläre Konzentration der drei Proteine in den Lysaten (Abbildung 48).

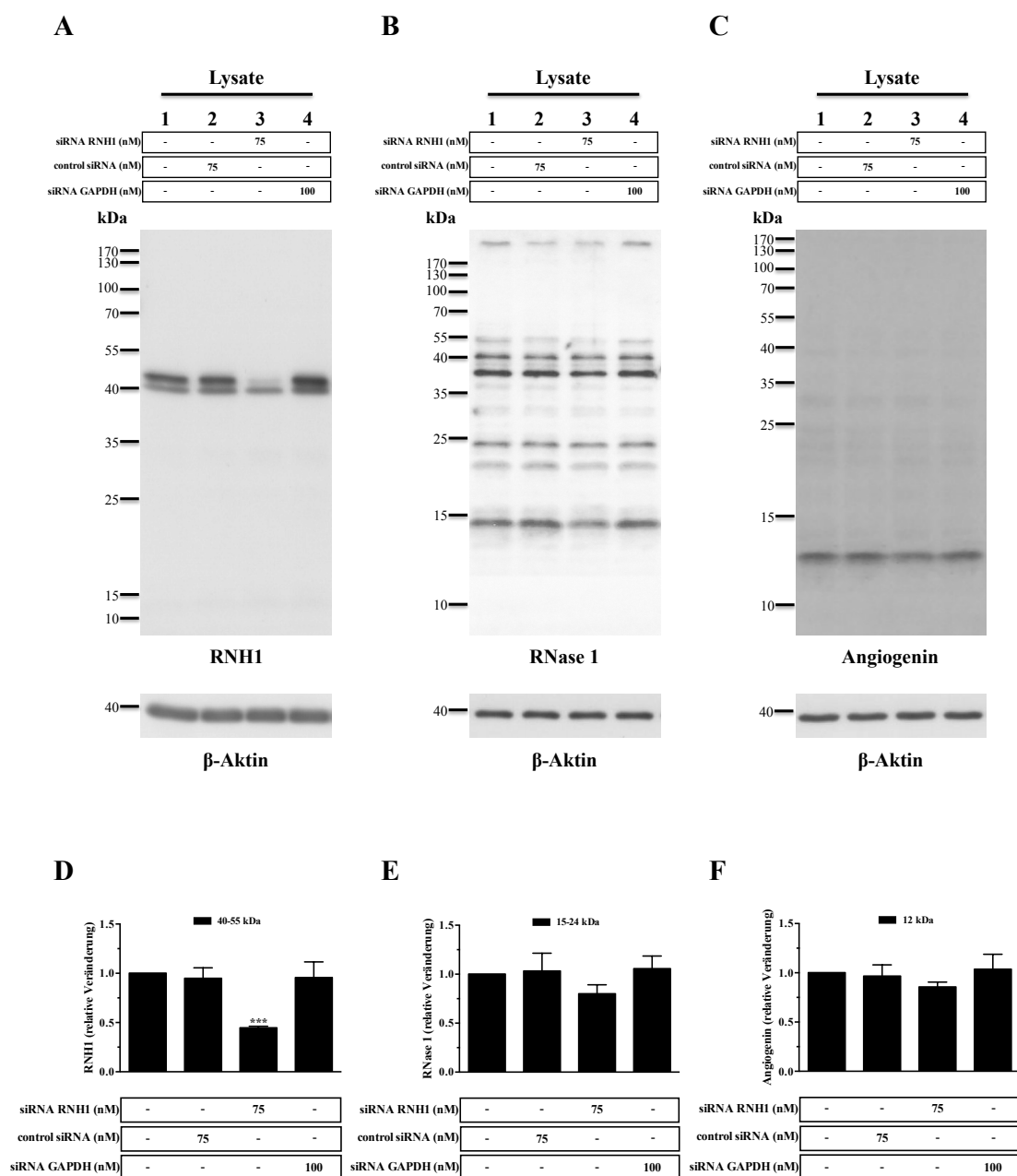


Abbildung 48: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4-immunoreaktives Material und Angiogenin in Zelllysaten von EA.hy926-Zellen nach Herunterregulation der Ribonuklease Inhibitor-Expression mittels siRNA

EA.hy926-Zellen wurden 48h mit (1) Transfektionsreagenz-haltigem Medium, (2) einer *scrambled* siRNA-Kontrolle, (3) einer gegen RNHI gerichteten siRNA sowie mit (4) einer gegen GAPDH gerichteten siRNA behandelt. Die Zelllysate wurden mittels Western-Blot analysiert, wobei Primärantikörper gegen (A) RNHI, (B) RNase 1, (C) Angiogenin und β-Aktin verwendet wurden. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten. Die Intensitäten der RNHI-, RNase 1/RNase 4-, Angiogenin- und β-Aktin-Banden wurden densitometrisch mit Hilfe des Programms *LabImage 1D* quantifiziert. Die graphische Darstellung erfolgte als (D) RNHI-Menge = RNHI/β-Aktin, (E) RNase 1/RNase 4-Menge = RNase 1/RNase 4/β-Aktin und (F) Angiogenin-Menge = Angiogenin/β-Aktin. Dabei wurden die untransfizierten Kontrollen jeweils gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SD (n=3, ***p<0,001).

RNase-Aktivität und RNA:

Schließlich erfolgte die Messung der RNase-Aktivität und des RNA-Gehalts in den gesammelten Zellkulturüberständen transfizierter Zellen. Die mit einer gegen RNH1 gerichteten siRNA transfizierten Zellen zeigten eine signifikante Zunahme sowohl der RNase-Aktivität als auch des RNA-Gehalts im Zellüberstand, während die *scrambled* siRNA-Kontrolle sowie die herunterregulierte Genexpression von GAPDH keinen Einfluss auf die RNase-Aktivität oder die RNA-Konzentration hatten (Abbildung 49).

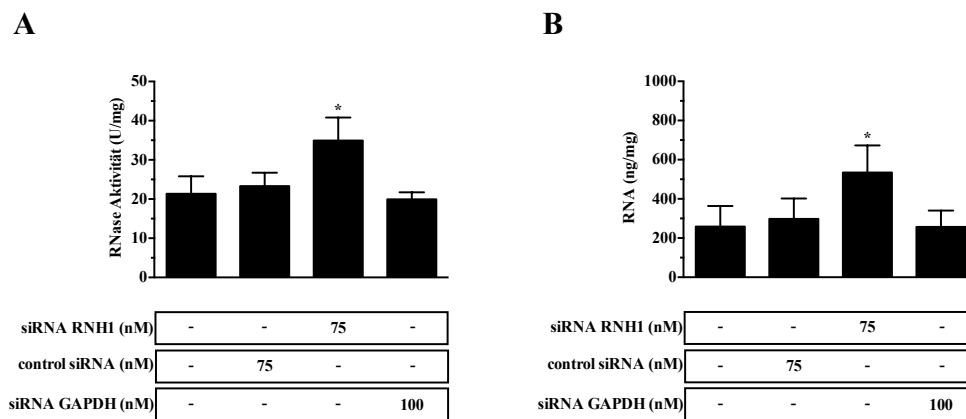


Abbildung 49: Ribonuklease-Aktivität und RNA-Gehalt in Zellüberständen von EA.hy926-Zellen nach Herunterregulation der Ribonuklease Inhibitor-Expression mittels siRNA

EA.hy926-Zellen wurden 48h mit Transfektionsreagenz-haltigem Medium, einer *scrambled* siRNA-Kontrolle, einer gegen RNH1 gerichteten siRNA sowie mit einer gegen GAPDH gerichteten siRNA behandelt. (A) Die RNase-Aktivität in den Zellüberständen wurde mittels eines Aktivitätstests detektiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, *p<0,05). (B) Der RNA-Gehalt in den Zellüberständen von transfizierten EA.hy926-Zellen wurde durch Anwendung des *MasterPure RNA Purification Kits* von *Epicentre* isoliert und mittels des *QubitTM RNA Assay Kits* von *Invitrogen* quantifiziert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, *p<0,05).

Um auszuschließen, dass die erhöhte RNase-Aktivität sowie der gesteigerte RNA-Gehalt im Zellüberstand der mit einer gegen RNH1 gerichteten siRNA transfizierten Zellen durch den zytotoxischen Effekt der verwendeten Substanzen getriggert wurden, erfolgte die Durchführung eines Zytotoxizitätstests. Aus den Ergebnissen dieses Tests ließ sich schlussfolgern, dass die Herunterregulation der mRNA-Expression des RNH1 toxisch für die Endothelzellen war, während die Transfektion mit anderen siRNAs keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen hatte (Abbildung 50A). Die signifikante Abnahme der Anzahl der lebenden transfizierten Zellen bestätigte die zytotoxische Wirkung der Verminderung der RNH1-Expression in EA.hy926 (Abbildung 50B).

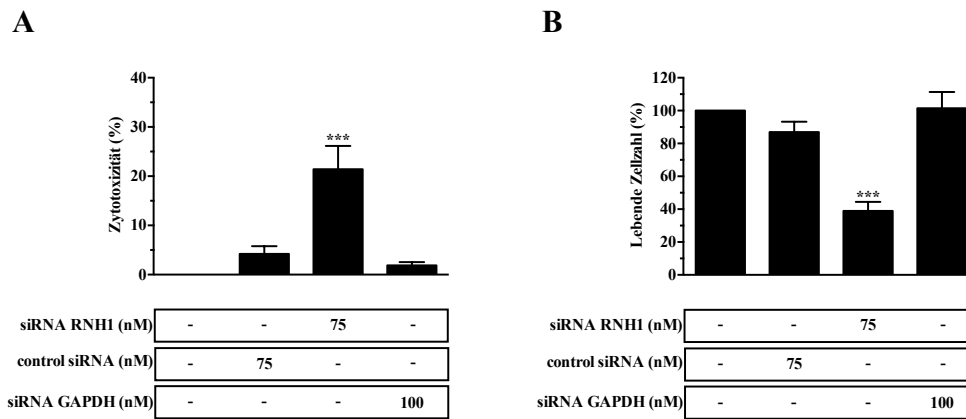


Abbildung 50: Einfluss der siRNA-vermittelte Herunterregulation der Ribonuklease Inhibitor-Expression auf das Wachstum von EA.hy926-Zellen

EA.hy926-Zellen wurden 48h mit Transfektionsreagenz-haltigem Medium, einer *scrambled* siRNA-Kontrolle, einer gegen RNH1 gerichteten siRNA sowie mit einer gegen GAPDH gerichteten siRNA behandelt. (A) Der zytotoxische Effekt der verwendeten Stimulanzen wurde anhand der LDH-Aktivität in den Zellüberständen ermittelt. Die durch Triton X-100 induzierte LDH-Freisetzung wurde gleich 100% gesetzt. Alle Werte wurden auf die untransfizierten Zellen bezogen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, ***p<0,001). (B) Der Einfluss der siRNA-vermittelte Herunterregulation der RNH1-Expression auf das Wachstum von EA.hy926 erfolgte durch Bestimmung der Anzahl der lebenden transfizierten Zellen 48 h nach der Transfektion unter Verwendung des *TC10TM Automated Cell Counters* von *Bio-Rad*. Dabei wurde die Anzahl der lebenden untransfizierten Zellen jeweils gleich 100% gesetzt und die übrigen Werte darauf bezogen. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, ***p<0,001).

Im Überblick zeigen die hier dargestellten Ergebnisse, dass die Herunterregulation der RNH1-Expression zu einer Abnahme sowohl der mRNA-Expression als auch der intrazellulären Konzentration von RNase 1/RNase 4 und Angiogenin in Endothelzellen führte. Im Zellüberstand der mit einer gegen RNH1 gerichteten siRNA transfizierten Zellen ermittelte sich eine signifikant erhöhte RNase-Aktivität sowie eine relevante Zunahme des RNA-Gehalts. Gleichzeitig wurde eine gesteigerte Zytotoxizität begleitet von einer signifikanten Verminderung der Anzahl von lebenden transfizierten Zellen dokumentiert. Im Gegensatz zu den Tumorzellen wiesen die Endothelzellen eine deutlich höhere RNase-Aktivität in deren Überständen auf, die mit einer niedrigeren extrazellulären RNA-Konzentration einherging (Abbildung 51). Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass der RNH1 bei der Regulation sowohl der Expression von RNasen als auch der Viabilität von Endothelzellen beteiligt ist.

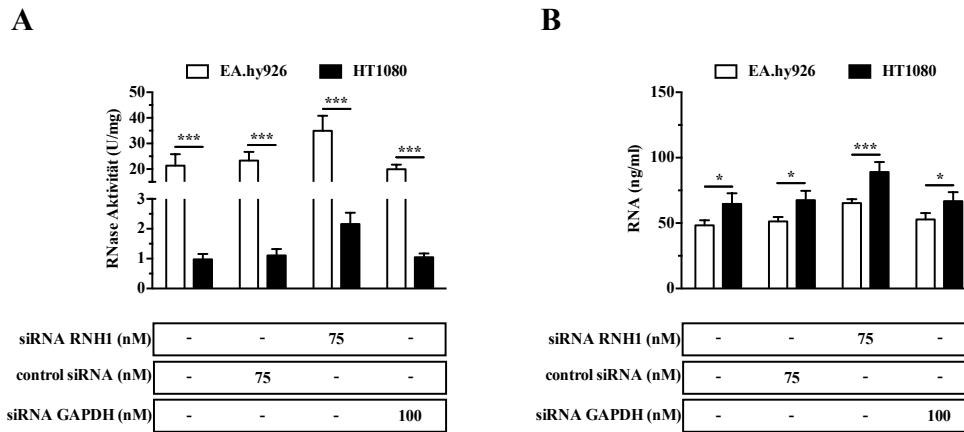


Abbildung 51: Ribonuklease-Aktivität und RNA-Gehalt in Zellüberständen von EA.hy926- und HT1080-Zellen nach Herunterregulation der Ribonuklease Inhibitor-Expression mittels siRNA
 EA.hy926- bzw. HT1080-Zellen wurden 48h mit Transfektionsreagenz-haltigem Medium, einer *scrambled* siRNA-Kontrolle, einer gegen RNH1 gerichteten siRNA sowie mit einer gegen GAPDH gerichteten siRNA behandelt. (A) Die RNase-Aktivität in den Zellüberständen beider Zelllinien wurde mittels eines Aktivitätstests detektiert und miteinander verglichen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, ***p<0,001). (B) Der RNA-Gehalt in den Zellüberständen von transfizierten EA.hy926- bzw. HT1080-Zellen wurde bestimmt und im Vergleich gesetzt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD (n=3, *p<0,05, ***p<0,001).

5 DISKUSSION

Bisher wurde der RNH1 nur als intrazelluläres Protein beschrieben, da er weder in Plasmaproben nachgewiesen wurde noch eine Beschreibung von extrazellulären Wirkungen vorliegt (Futami et al., 1997; Nadano et al., 1994). Erstmalig wurde anhand der hier präsentierten Ergebnisse gezeigt, dass RNH1 auch extrazellulär vorkommt, da er in Zellkulturüberständen von HT1080-Tumorzellen und EA.hy926-Endothelzellen nachweisbar war. Die hohe Proteaseempfindlichkeit des RNH1 könnte ein Grund dafür sein, dass er bisher in Plasmaproben nicht nachweisbar war (siehe 4.2.1) (Roth, 1962).

5.1 Extrazelluläre Wirkung des Ribonuklease Inhibitors

Bislang gibt es keine Untersuchungen, die die extrazellulären Funktionen des RNH1 darstellen. Deswegen wurde in dieser Arbeit zunächst der Einfluss des extrazellulären RNH1 auf die Viabilität von Zellen bestimmt. Die Ergebnisse der Proliferationstests zeigten, dass niedrige RNH1-Konzentrationen (0,4-10 µg/ml) die Vitalfunktionen verschiedener Zelltypen positiv beeinflussen könnten, da die Proliferation der Tumorzellen stark und die der Endothelzellen schwach erhöht wurden (Abbildung 41). Im Gegensatz dazu wirken hohe RNH1-Konzentrationen (ab 40 µg/ml) unabhängig vom Zelltyp zytotoxisch (Abbildungen 40, 52A). Die physiologische Funktion des extrazellulären RNH1 muss in zukünftigen Studien weiter charakterisiert werden, wobei die extrazellulär verabreichten RNH1-Konzentrationen niedrig waren im Vergleich zum intrazellulären RNH1-Gehalt von 4 µM (Rutkoski und Raines, 2008), der einer Konzentration von ca. 200 µg/ml entspricht. Die extrazellulären Effekte des RNH1 spielen wahrscheinlich keine große Rolle, da freier RNH1 schnell im Plasma abgebaut wird (siehe 4.2.1).

Wie schon unter 4.2.2 beschrieben, hatte der exogen verabreichte rekombinante RNH1 nur einen minimalen proliferativen Einfluss auf primäre Endothelzellen (Abbildung 41), was auch daran liegen könnte, dass RNH1 nicht in die Zelle transloziert wurde. Bisher gibt es keine Angaben über die Existenz eines zellulären RNH1-Rezeptors. Deswegen ist es nicht bekannt, ob RNH1 an der Plasmamembran bindet und/oder von der Zelle aufgenommen wird. Da unsere Versuche gezeigt haben, dass von Zellen freigesetzter

RNH1 mit der MV-Fraktion assoziiert ist, wurde weiterhin die Wirkung von RNH1-enthaltenden MV auf die Viabilität von primären Endothelzellen untersucht. In diesem Fall wäre die Internalisierung des RNH1 durch die Aufnahme der MV in die Zellen wahrscheinlicher im Vergleich zu dem exogen verabreichten isolierten rekombinanten RNH1.

Es ist bekannt, dass MV eine wichtige Rolle im interzellulären Informationsaustausch spielen (Mause und Weber, 2010). Aus Leukozyten stammende MV können zum Beispiel Leukozyten-spezifische Antigene auf Endothelzellen übertragen und die Gefäßwandzellen somit aktivieren. Dadurch resultiert eine phänotypische Umwandlung der Endothelzelle, die zu einer Änderung der Phosphorylierung von zellulären Proteinen und deren gesteigerter Adhäsion führt (Mesri und Altieri, 1998; Tabibzadeh et al., 1994). Außerdem sind hämatopoetische Zellen in der Lage MV von Thrombozyten aufzunehmen und somit biologisch aktive Komponenten zu internalisieren. Infolgedessen können MV in der Regulation und Stimulation der Zellproliferation und der Chemotaxis hämatopoetischer Zellen beteiligt sein (Baj-Krzyworzeka et al., 2002).

Sowohl die aus normoxisch als auch aus hypoxisch behandelten HT1080-Zellen stammenden MV waren zytotoxisch für die primären Endothelzellen und führten zu einer signifikanten Senkung ihrer Proliferation (Abbildungen 37, 38, 52B). Der antiproliferative Effekt war im Fall der Zugabe der unter Hypoxie gebildeten MV stärker ausgeprägt als bei der Zugabe der unter Normoxie generierten MV, was unter anderem auch mit der höheren MV-Akkumulation des RNH1 unter hypoxischen Bedingungen (siehe 4.1.3) zusammenhängen könnte.

Um festzustellen, ob die antiproliferativen Effekte des MV-assoziierten RNH1 ausschließlich auf den RNH1 und nicht auf andere Komponenten der MV zurückzuführen sind, sollten in weiteren Experimenten MV aus Zellüberständen von Tumorzellen isoliert werden, in denen die RNH1-Expression beispielsweise durch siRNA herunterreguliert wurde. Die Stimulation von Endothelzellen mit aus RNH1-*Knockout*-Tumorzellen stammenden MV und mit aus hypoxisch behandelten Tumorzellen stammenden MV würde eindeutigere Erkenntnisse über die Wirkung des extrazellulären RNH1 auf die Viabilität der Zellen vermitteln, die eventuell in der Tumorthherapie genutzt werden könnten.

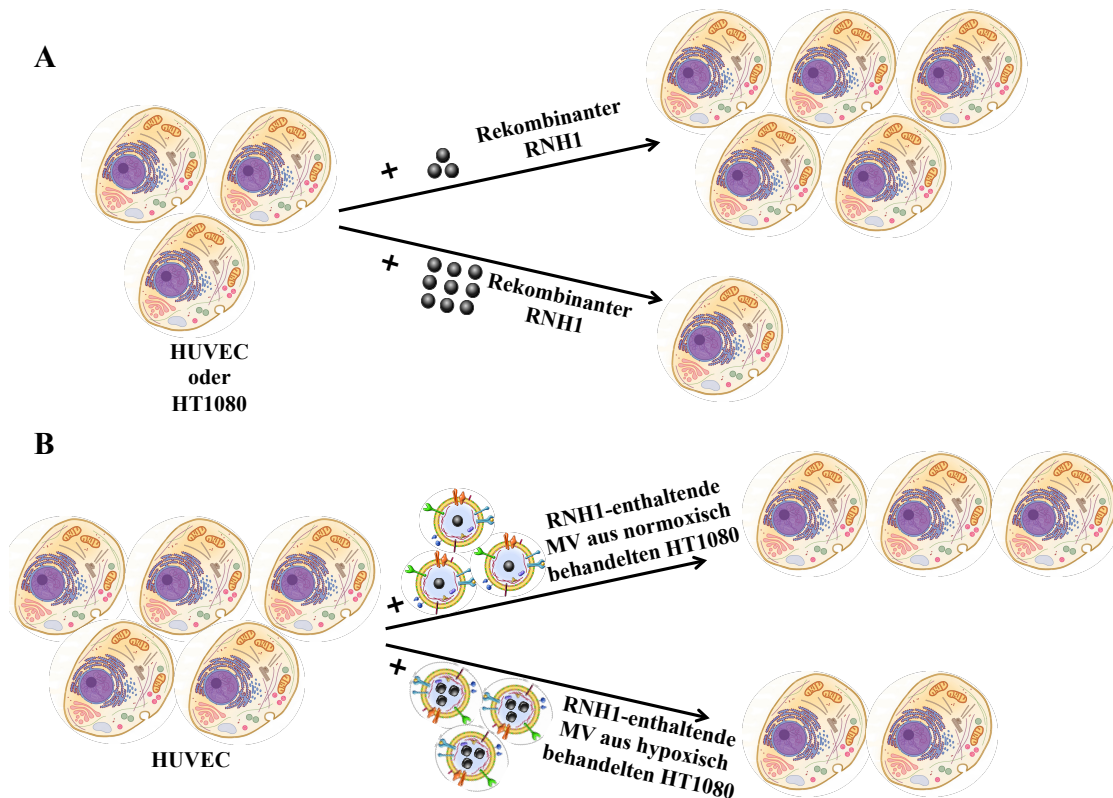


Abbildung 52: Einfluss des extrazellulären Ribonuklease Inhibitors auf die Proliferation von Tumor- und Endothelzellen

(A) Während niedrige Konzentrationen von rekombinantem RNHI (0,4-10 $\mu\text{g/ml}$) die Proliferation der humanen primären Endothelzellen (HUVEC) schwach und die der Tumorzellen (HT1080) stark erhöhen, wirken höhere RNHI-Konzentrationen (40-100 $\mu\text{g/ml}$) unabhängig vom Zelltyp zytotoxisch. (B) Sowohl die aus normoxisch als auch aus hypoxisch behandelten Tumorzellen (HT1080) stammenden Mikrovesikel sind zytotoxisch für HUVEC-Zellen und führen zu einer signifikanten Senkung ihrer Proliferation.

Die Sekretion des in MV verpackten RNHI könnte als Schutz vor seiner Degradierung durch Plasmaproteasen dienen. Da inflammatorische und hypoxische Bedingungen zur gesteigerten MV-Akkumulation des RNHI bei Endothel- (Abbildungen 32A, 32D) und Tumorzellen führten (Abbildungen 25A, 25D), sollte die RNHI-Konzentration im Plasma von Tumorpatienten bzw. Patienten mit chronisch-inflammatorischen Erkrankungen bestimmt werden.

5.2 Intrazelluläre Wirkung des Ribonuklease Inhibitors

Trotz der Untersuchung des Expressionsmusters vom RNHI in den letzten Jahrzehnten ist die Literatur bezüglich seiner physiologischen Rolle nicht widerspruchsfrei. Zum einen korreliert der intrazelluläre RNHI positiv mit anabolischen Aktivitäten wie der Zellproliferation (Wojnar und Roth, 1965; Suzuki und Takahashi, 1970). Zum anderen gibt es Studien, die zeigten, dass RNHI die Zellproliferation weder positiv noch negativ

beeinflusst (Kyner et al., 1979). Zudem zeigen neue Untersuchungen, dass RNH1 durch die Inhibierung der Gefäßneubildung antiproliferative Effekte ausübt (Botella-Estrada et al., 2001).

Auf jeden Fall scheint die Abwesenheit des RNH1 letal für Zellen zu sein. Zellen, in denen ein effektiver RNH1-*Knockout* mittels CRISPR-Cas 9 auf genomischer Ebene durchgeführt wurde, waren anfälliger als die Wildtypzellen für die hohe ribonukleolytische Aktivität von RNase 1 (Thomas et al., 2016). Zudem wurde gezeigt, dass sogar Angiogenin, trotz ihrer sehr geringen enzymatischen Aktivität, in Abwesenheit von RNH1 ein potentes Zytotoxin sein kann. Ihre Lokalisation im Zytosol sowie die fehlende Inaktivierung ihrer ribonukleolytischen Aktivität durch RNH1 in RNH1-*Knockout*-Zellen trug zur Akkumulation spezieller tRNA-Fragmenten bei, die in physiologischen Konzentrationen hoch zytotoxisch wirkten (Thomas et al., 2018).

5.3 Expression des Ribonuklease Inhibitors unter inflammatorischen Bedingungen

In der vorliegenden Arbeit wurden u.a. die Gen- und Proteinexpression von RNH1, RNase 1/RNase 4 und Angiogenin unter apoptotischen, inflammatorischen und hypoxischen Bedingungen in Tumor- und Endothelzellen untersucht. Insbesondere wurden die Expressionsunterschiede des RNH1 und dessen Interaktionspartner zwischen den beiden Zelllinien verdeutlicht. Des Weiteren wurden mögliche Freisetzungsmechanismen von RNH1, Angiogenin und RNA vorgeschlagen.

RNH1 erfüllt als effizienter Gegenspieler von Mitgliedern der RNase A-Superfamilie wichtige zellprotektive Aufgaben. Als *molecular sentry* schützt er zytosolische RNA vor einem Abbau durch in die Zelle eingedrungene exogene RNasen (Haigis et al., 2003). Da RNH1 auch intrazelluläre Aktivitäten von RNasen (Angiogenin) reguliert (Pizzo et al., 2013), ist er an angiogenen und Tumor-assoziierten Prozessen beteiligt (Polakowski et al., 1993; Shapiro und Vallee, 1987; Peng et al., 2014). Außerdem trägt er zur Regulation der intrazellulären Redox-Homöostase bei, indem er die Zelle vor oxidativem Stress beschützt (Monti et al., 2007).

5.3.1 Expressionsunterschiede von Ribonuklease Inhibitor und Ribonukleasen der Ribonuklease A-Superfamilie zwischen Tumor- und Endothelzellen

Studien unserer Gruppe haben gezeigt, dass eRNA im vaskulären System (a) prothrombotische (Kannemeier et al., 2007), (b) gefäßpermeabilitätssteigernde (Fischer et al., 2007; Fischer et al., 2009) und (c) proinflammatorische (Fischer et al., 2007; Fischer et al., 2009; Fischer et al., 2012) Funktionen ausübt sowie (d) vergleichbar mit anderen proinflammatorischen Agonisten die Exozytose der endothelialen Weibel-Palade-Granula induziert (Fischer et al., 2011). eRNA wird im vaskulären System durch zirkulierende RNasen abgebaut, von denen RNase 1 der stärkste Gegenspieler von eRNA ist. Die Applikation von RNase 1 hemmt sowohl prokoagulatorische, inflammatorische als auch permeabilitätserhöhende Aktivitäten der eRNA, womit das eRNA/RNase1-System eine neue Komponente bei der Regulation der vaskulären Homöostase darstellt (Fischer et al., 2011; Fischer et al., 2007; Kannemeier et al., 2007; Fischer et al., 2012; Fischer und Preissner, 2013; Walberer et al., 2009). Aufgrund dessen war für die hier vorliegende Arbeit insbesondere die Beteiligung des RNH1 an der Regulation der intra- und extrazellulären RNase 1-Expression und -Aktivität von Interesse. Als Modellsysteme wurden Zelllinien mit niedriger (HT1080-Tumorzellen) und hoher (EA.hy926-Endothelzellen) RNase 1-Expression und -Freisetzung verwendet.

Ein wichtiger Unterschied zwischen den HT1080-Tumorzellen und den EA.hy926-Endothelzellen besteht darin, dass die Tumorzellen eine viel niedrigere RNase 1-Expression im Vergleich zu den Endothelzellen aufweisen. Dies kann anhand der Abbildung 51A festgestellt werden, in der die RNase-Aktivität aus Tumorzell- und Endothelzell-Überständen gegenübergestellt wurde. Dabei wird zusätzlich gezeigt, dass die niedrigere RNase-Aktivität der HT1080-Überstände zu höheren extrazellulären RNA-Konzentrationen im Vergleich zu Endothelzellen führte (Abbildung 51B).

Damit können auch die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse von HT1080- und EA.hy926-Proben begründet werden, denn RNase 1 wurde weder in HT1080-Lysaten noch in HT1080-Überständen detektiert. Im Gegensatz dazu gelang der Nachweis der extrazellulären RNase 1 in EA.hy926-Überständen (Abbildung 14, Tabelle 2). Eine Studie unserer Gruppe zeigte durch den Vergleich verschiedener

Endothelzelltypen, dass die stärkste Expression und Freisetzung von RNase 1 in HUVEC vorliegt (Fischer et al., 2011), was die hohe RNase-Aktivität von EA.hy926 stützt. Zudem wird RNase 1 in unterschiedlichen Geweben wie Pankreas, Testis, Ovarien und Gehirn exprimiert (Futami et al., 1997; Sasso et al., 1999) und zirkuliert in hohen Konzentrationen im Plasma (Fischer et al., 2011; Weickmann et al., 1984). Landré *et al.* haben die Expression von RNase 1 in verschiedenen Zelllinien untersucht und sind zu der Schlussfolgerung gekommen, dass Endothelzellen signifikante Mengen an RNase 1 exprimieren, während Fibroblasten nur eine minimale RNase 1-Expression aufweisen (Landr e et al., 2002).

Des Weiteren unterscheiden sich HT1080 und EA.hy926 bezuglich des Protein-Expressions-musters von RNH1 und dessen Interaktionspartner. Die Western-Blot-Analyse der HT1080-Lysate und -Überstände wies eine zusätzliche ~26 kDa Bande beim Nachweis sowohl des RNH1 als auch der RNasen 1 und 5, die bei der Western Blot Analyse der EA.hy926-Proben nicht detektiert wurde (Abbildung 13A vs. Abbildung 13B). In dieser Bande wurde mittels Massenspektrometrie RNase 7 identifiziert (Tabelle 2), eine RNase mit antimikrobiellen Aktivitäten (Harder und Schroder, 2002; Spencer et al., 2011; Mun et al., 2013; Amatngalim et al., 2015). Die einzige bekannte ribonukleolytische Eigenschaft von RNase 7 betrifft den Verdau von Hefe-tRNA (Zhang et al., 2003; Huang et al., 2007). In der Literatur gibt es noch keine Daten bzgl. der RNase 7-Expression in Bindegewebszellen. Die gleichzeitige Identifizierung des RNH1 in der 26 kDa Bande (Tabelle 2) führte zur Annahme, dass in dieser Proteinbande die durch Sonifikation entstandenen Fragmente der Bindungssequenz zwischen RNase 7 und RNH1 enthalten sein könnten, da RNase 7 als Mitglied der RNase A-Superfamilie feste Bindungen an RNH1 bildet.

Für den Nachweis von RNH1, RNase 1 und Angiogenin in Zelllysaten und -überständen von HT1080 und EA.hy926 mittels Westen-Blot-Analyse wurden polyklonale Antikörper verwendet. Die Detektion von RNH1 und Angiogenin gelang problemlos: Die Western-Blot-Analyse (Abbildung 13) zeigte jeweils nur eine oder zwei Banden und deren massenspektrometrische Untersuchung (Abbildung 14, Tabelle 2) bestätigte die Präsenz der betreffenden Proteine in einem bestimmten kDa-Bereich. Bei der Anwendung des gegen RNase 1 gerichteten polyklonalen Antikörpers zeigten sich in der Western-Blot-Analyse mehrere Banden, in denen bei den EA.hy926-

Überständen massenspektrometrisch neben RNase 1 auch RNase 4 und bei den HT1080-Lysaten/-Überständen RNase 4 und RNase 7, aber keine RNase 1 identifiziert wurde. Hier handelt es sich um eine Kreuzreaktion des gegen RNase 1 gerichteten polyklonalen Antikörpers mit RNase 4 und RNase 7, die in der Proteomanalyse erkennbar ist. Alle Mitglieder der RNase A-Superfamilie weisen eine Sequenzhomologie von 30-80% auf (Pai et al., 2006). Außerdem unterliegen diese in verschiedenen Organen und Geweben exprimierten Proteine einer posttranslationalen Glykosylierung, so dass verschiedene Varianten eines einzigen Genprodukts entstehen (Sorrentino, 2010). Dadurch könnten identische oder sehr ähnliche Bindungsstellen (Epitope) unterschiedlicher RNasen (Antigene) entstehen, an die ein und derselbe polyklonale Antikörper bindet.

Obwohl sich RNase 1 in HT1080-Lysaten bzw. -Überständen anhand der massenspektrometrischen Analyse nicht nachweisen ließ (Abbildung 14, Tabelle 2), wurde RNase 1 auf mRNA-Ebene identifiziert (Abbildungen 22, 28, 43). In der Literatur wurden verschiedene Gründe für die mangelhafte Korrelation zwischen Gen- und Proteinexpression beschrieben. Einerseits gibt es viele unterschiedliche und komplizierte posttranskriptionale Mechanismen, die an der Umwandlung von mRNA in Protein beteiligt sind und noch nicht ausreichend definiert sind, um Proteinkonzentrationen aus mRNA berechnen zu können. Andererseits besitzen Proteine aufgrund unterschiedlicher Proteinsynthese und -abbau sehr unterschiedliche Halbwertszeiten. Der Proteinumsatz kann in Abhängigkeit von verschiedenen Bedingungen erheblich variieren. Die Zelle kann die Abbau- oder Syntheseraten eines bestimmten Proteins steuern, und selbst innerhalb von Proteinen mit ähnlichen Funktionen gibt es eine signifikante Heterogenität. Außerdem gibt es eine erhebliche Menge an Störfaktoren sowohl in Protein- als auch in mRNA-Experimenten, die unsere Fähigkeit einschränken, ein klares Bild zu bekommen (Greenbaum et al., 2003).

RNH1 ist ein ~50 kDa großes Protein, das keine bekannte Untereinheiten besitzt. Deswegen hätte man erwartet, dass in den Western-Blot-Analysen von HT1080- bzw. EA.hy926-Proben eine einzige RNH1-Bande nachgewiesen wird. Trotzdem wurden bei den Western-Blot-Analysen von HT1080-Proben jeweils zwei (Abbildung 23A) und bei denen von EA.hy926-Proben sogar drei immunoreaktive Banden (Abbildung 32A) beim Nachweis von RNH1 detektiert, die sich um einige kDa voneinander unterschieden. Durch Massenspektrometrie konnte in diesen Banden Fragmente von RNH1

identifiziert werden. Die Detektion von mehreren RNH1-Banden könnte mit der posttranslationalen Glykosylierung des Proteins zusammenhängen, die je nach Zelltyp unterschiedlich erfolgt. Zelluläre Mechanismen, die auch Proteinen ohne Signalpeptid, wie der RNH1, erlauben ins ER zu translozieren und dort glykosyliert zu werden, müssen in weiteren Studien untersucht werden.

5.3.2 Einfluss proinflammatorischer und hypoxischer Bedingungen auf die Expression und Freisetzung des Ribonuklease Inhibitors in Tumor- und Endothelzellen

5.3.2.1 Freisetzung des Ribonuklease Inhibitors

In der Regel sind sekretorische oder Membran-Proteine durch ein N-terminales Signalpeptid charakterisiert, das ihre Translokation über das ER, den Golgi-Apparat und sekretorischen Vesikeln den Transport zur Plasmamembran vermittelt (Nickel und Rabouille, 2009). Da das RNH1-Gen keine Signalsequenz enthält (Bond und Vallee, 1988), gehört RNH1 anscheinend zu der Gruppe extrazellulärer Proteine, die unkonventionelle, das ER umgehende Freisetzungsmechanismen nutzt (Nickel, 2005). Sekretierte Proteine, die kein Signalpeptid besitzen, werden entweder vesikelabhängig oder vesikelunabhängig in den extrazellulären Raum transloziert. Bei den nicht vesikulären Transportmechanismen wird zwischen Transporter-abhängigen und -unabhängigen, selbstvermittelten Transportprozessen unterschieden (Rabouille et al., 2012). Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF2) ist das am besten untersuchte Protein, das über einen selbstvermittelten Translokationsmechanismus ausgeschüttet wird (Nickel, 2011). Die Transporter-abhängige Freisetzung lipidiertes Peptide und Proteine erfolgt über ABC- (*ATP-binding-cassette*) Transporter (Nickel, 2005). Bei den unkonventionellen vesikulären Transportmechanismen kann man zwischen sekretorischen Lysosomen, den MV, in denen der RNH1 schon im Rahmen dieser Arbeit detektiert wurde (Abbildungen 25A, 25D, 32A, 32D), und den aus Endosomen gereiften MVBs (*multivesicular bodies*) differenzieren (Rabouille et al., 2012). Die MVBs enthalten interne 50 nm- bis 100 nm-Vesikel, die nach der Fusion von MVBs mit der Plasmamembran in Form von Exosomen sekretiert werden (Nickel und Rabouille, 2009; Mause und Weber, 2010). Da nach Abtrennung der MV-Fraktion aus den Zellüberständen noch RNH1 in den Restüberständen nachweisbar war, müssen weitere Untersuchungen zeigen, ob RNH1 auch in Exosomen vorhanden ist (Abbildung 53).

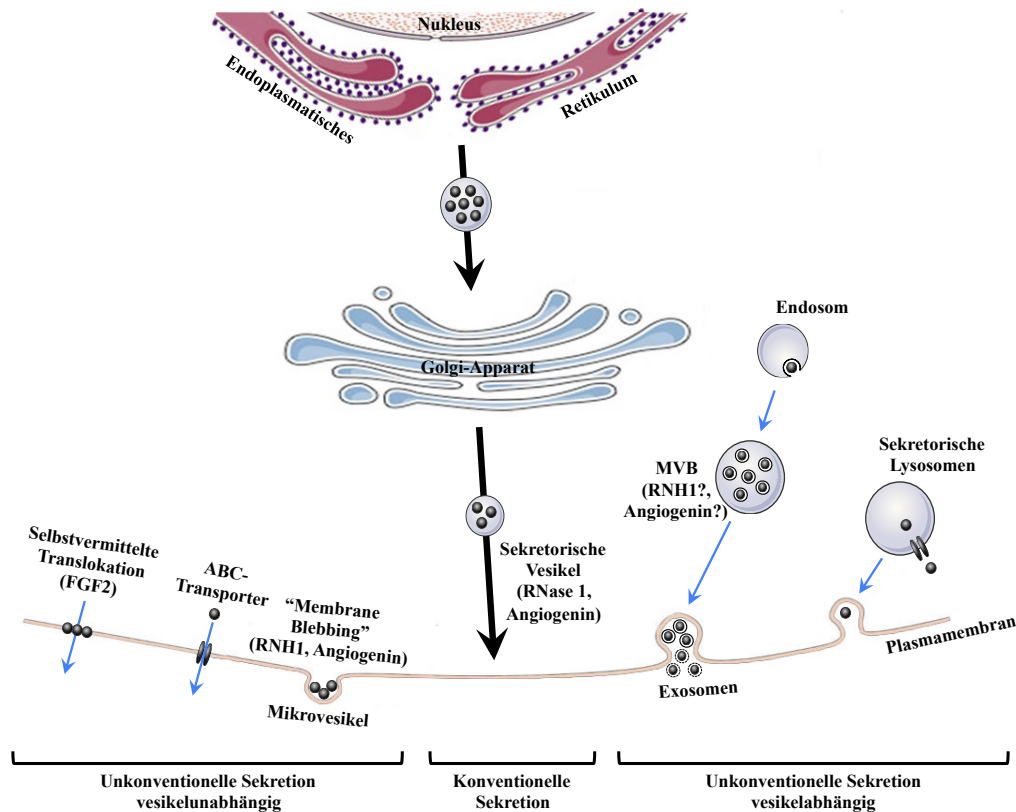


Abbildung 53: Schematische Darstellung der möglichen Freisetzungswege von Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1 und Angiogenin

Unkonventionelle Freisetzungswege, wie die selbstvermittelte Translokation, die Freisetzung über ABC-Transporter oder über *Membrane Blebbing*, die ohne die Beteiligung von intrazellulären Vesikeln erfolgen können, sind links dargestellt. Der klassische konventionelle Sekretionsmechanismus über ER, Golgi-Apparat und sekretorische Vesikel wird mittig gezeigt. Unkonventionelle vesikelabhängige Sekretionsmechanismen über Endosomen/MVBs und über sekretorische Lysosomen sind rechts dargestellt. Die blauen Pfeile zeigen den Verlauf unkonventioneller Freisetzungswege und die breiten, schwarzen Pfeile den konventioneller Sekretionswege an.

In den Zellüberständen von Tumor- und Endothelzellen wurde RNH1 sowohl frei (Abbildungen 26A, 26E, 33A, 33E) als auch in der aufgereinigten MV-Fraktion (Abbildungen 25A, 25D, 32A, 32D) nachgewiesen. In dieser Arbeit wurde die MV-Fraktion nach den jeweiligen 24-stündigen Stimulationen der Tumor- und Endothelzellen durch Zentrifugation des zellfreien Überstandes bei 21000 g gewonnen. MV sollten von Exosomen und apoptotischen Körpern unterschieden werden. Die MV-Isolierung erfolgte durch Inkubation der MV-Fraktion mit fluoreszenzmarkiertem Annexin V, das Ca^{2+} -abhängig an anionische Phospholipide von Zellmembranen wie dem PS bindet (Koopman et al., 1994; Schutte et al., 1998). Exosomen sind aus intrazellulären Kompartimenten abstammende Vesikel, die kein PS an der Außenseite ihrer Membran tragen (Stoorvogel et al., 2002; Théry et al., 2002). Dadurch kann man isolierte MV von Exosomen differenzieren. Das Gleiche gilt nicht für apoptotische Körper, da diese genau wie die MV eine PS-Externalisierung als gemeinsames

Charakteristikum aufweisen (Mause und Weber, 2010). Um in zukünftigen Experimenten die MV von den apoptotischen Körpern besser zu unterscheiden, könnte man die Donorzellen mit der zellpermeablen Substanz Y-27632 (ein Pyridin-Derivat) inkubieren. Diese Substanz inhibiert die katalytische Aktivität der Rho-assoziierten Kinase ROCK-I, die für die Ausstülpung der Membran und die Bildung apoptotischer Körper essenziell ist (Ishizaki et al., 2000). Insbesondere wird ROCK-I während der Apoptose durch Caspasen gespalten und aktiviert. Anschließend trägt sie zur Phosphorylierung von Myosin und zur Bindung von Aktin-Myosin-Filamenten an die Plasmamembran bei (Coleman et al., 2001).

Es ist bekannt, dass inflammatorische (TNF α) (Combes et al., 1999), hypoxische (Puddu et al., 2010) und apoptotische (STP) (VanWijk et al., 2003) Bedingungen die Bildung von MV induzieren, welche zytoplasmatische Bestandteile und Nukleinsäuren wie z.B. rRNA und mRNA transportieren können (Deregibus et al., 2007; Zampetaki et al., 2010; Ullal et al., 2010). Im Gegensatz zur STP-Behandlung zeigte die Hypoxie-Exposition von HT1080 und EA.hy926 weder eine zytotoxische noch eine apoptotische Wirkung auf die Zellen (Abbildungen 25B, 32B, 32C). Deswegen würde man in der nach Hypoxie-Exposition der Zellen isolierten MV-Fraktion keine apoptotischen Körper erwarten. Die in MV verpackte RNA sollte vor dem Verdau plasmatischer RNasen geschützt sein und könnte somit langfristige und auch systemische Effekte vermitteln. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigten, dass unter den oben genannten Bedingungen die vermehrte MV-Bildung (Abbildungen 29A, 36A) mit einer gesteigerten MV-Akkumulation von RNA (Abbildungen 27B, 34B) und RNH1 (Abbildungen 25A, 25D, 32A, 32D) korrelierte.

Eine mögliche Funktion des MV-assoziierten RNH1 könnte darin bestehen, RNAs, die über MV zu anderen Zellen transferiert werden, vor der Degradation durch das ebenfalls mit MV assoziierte Angiogenin (Abbildungen 25B, 25E, 32B, 32E) zu schützen (Pizzo et al., 2013). Im Gegensatz zu RNH1 und Angiogenin war RNase 1/RNase 4-immunoreaktives Material in der MV-Fraktion nicht nachweisbar, was durch die fehlende RNase-Aktivität in den MV (Abbildungen 27A, 34A) bestätigt wurde. RNase 1 sowie Angiogenin sind extrazelluläre Proteine, die durch Endothelzellen exprimiert und freigesetzt werden (Fischer et al., 2011; Landré et al., 2002; Moenner et al., 1997). Beide besitzen ein sekretorisches Signalpeptid in ihrer Aminosäuresequenz und

zirkulieren in hohen Konzentrationen im humanen Plasma (Beintema et al., 1984; Seno et al., 1994; Fischer et al., 2011; Weickmann et al., 1984; Strydom, 1998; Fett et al., 1985; Riordan und Vallee, 1988). Durch ihre erhöhte ribonukleolytische Aktivität sowie ihre starke Affinität an eRNA besitzt RNase 1 u.a. antithrombotische und kardioprotektive Wirkungen (Libonati und Sorrentino, 2001; Sorrentino und Libonati, 1994; Fischer et al., 2014; Fischer et al., 2007; Kannemeier et al., 2007; Nakazawa et al., 2005; Simsekylmaz et al., 2014). Im Gegenteil dazu zirkuliert Angiogenin frei im Plasma ohne proliferativen Effekt. Unter bestimmten Bedingungen (Hypoxie, Inflammation, Wundheilungsprozesse) bindet Angiogenin an seinen Endothelzellrezeptor, wird durch Endozytose in die Zelle aufgenommen und schließlich in den Nukleus transportiert, wodurch verschiedene Signaltransduktionskaskaden ausgelöst werden, die zur Angiogenese beitragen (Tello-Montoliu et al., 2006).

Es gibt Studien, die die Rolle von MV in der Angiogenese untersuchen (Martinez et al., 2011). Die Beteiligung des Angiogenins in den MV-vermittelten angiogenen Prozessen muss allerdings weiter definiert werden. Außerdem haben einige Arbeitsgruppen gezeigt, dass MV proinflammatorische und prokoagulatorische Funktionen ausüben sowie Prozesse induzieren, die in einer vaskulären Dysfunktion resultieren können (Puddu et al., 2010; VanWijk et al., 2003). Inwiefern die in den MV eingeschlossene eRNA, die durch den RNH1 stabilisiert wird, an der möglichen Vermittlung dieser MV-Effekte beteiligt ist, wurde bislang nicht geklärt.

5.3.2.2 Einfluss proinflammatorischer Mediatoren

Während die Stimulation von HT1080 und EA.hy926 mit LPS keine Auswirkungen auf die Expression von RNH1 oder dessen Interaktionspartner besaß, bewirkten langfristige Stimulationen von HT1080 mit TNF α eine signifikante Zunahme der Freisetzung von RNH1 und RNase 1/RNase 4 (Abbildungen 23A, 23E, 23B, 23F), bei gleichzeitiger Abnahme ihrer intrazellulären Konzentrationen (Abbildungen 24A, 24D, 24B, 24E). Parallel dazu führte TNF α zu einer Zunahme der RNA-Konzentration sowohl im Zellüberstand als auch in den MV. Der Vergleich zwischen dem RNA-Gehalt des Zellüberstands mit dem der MV-Fraktion zeigte, dass nur ein kleiner Anteil der eRNA mit den MV assoziiert ist, während ihr größerer Anteil im Restüberstand freigesetzt wird (Abbildung 27B). Ob ein Teil der im Restüberstand nachweisbaren eRNA mit

Exosomen assoziiert ist, muss in zukünftigen Experimenten untersucht werden. Es ist mittlerweile bekannt, dass Exosomen u.a. auch verschiedene RNA-Formen (mRNA, miRNA, circRNA) beinhalten und somit die Genexpression in Säugetieren regulieren könnten (Pant et al., 2012; Li et al., 2015). Das gleichzeitige Vorkommen des RNH1 im Restüberstand in höheren Konzentrationen als in den MV wäre auch sinnvoll, um die frei sezernierte RNA vor dem Verdau durch RNasen zu schützen und somit ihre extrazellulären Funktionen zu stabilisieren. Das scheint auch der Fall zu sein, da die Zunahme der RNase 1/4-Freisetzung in den Restüberstand (Abbildungen 26B, 26F) nicht zu einer Senkung des eRNA-Gehalts führte, weil die gleichzeitige Zunahme der RNH1-Freisetzung (Abbildungen 26A, 26E) den Überschuss von RNase 1/4 inaktivierte, was durch die unveränderte RNase-Aktivität bestätigt wurde (Abbildung 27A). Da die angewandte Western Blot-Analyse nur eine semiquantitative Nachweismethode von Proteinen darstellt, sollten zur Bestimmung der genauen RNH1-Konzentration im Restüberstand bzw. in den MV quantitative Nachweismethoden wie ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) verwendet werden.

Im Gegensatz zu Tumorzellen führte die TNF α -Stimulation in Endothelzellen zu einer signifikanten Herunterregulation von RNase 1(/4) auf mRNA- und Proteinebene (Abbildungen 30B, 30F, 31B, 31E, 33B, 33F, 34A, 35). Unsere Arbeitsgruppe analysierte bereits den Signalweg, der unter inflammatorischen Bedingungen zur Verminderung der RNase 1-Expression in HUVEC führt. Insbesondere wurde gezeigt, dass dieser Mechanismus Acetylierungs-abhängige posttranslationale Modifikationen von Histonen oder anderen DNA-bindenden Proteinen umfasst und dass er von einer NF κ B gesteuerten Regulation unabhängig ist (Gansler et al., 2014). Die TNF α -abhängige Verminderung der RNase 1-Expression und -Aktivität unterstützte in Kombination mit der gesteigerten RNH1-Freisetzung (Abbildungen 33A, 33E) die Akkumulation von freier, nicht mit MV assoziierter eRNA (Abbildungen 34B, 54). Das könnte im vaskulären System bei chronisch-inflammatorischen Situationen (1) die VEGF-abhängige gefäßerweiternde Aktivitäten von eRNA verstärken oder stabilisieren (Fischer et al., 2007), (2) die Freisetzung von Zytokinen und weiteren proinflammatorischen Faktoren aus Monozyten/Makrophagen induzieren (Fischer et al., 2013; Cabrera-Fuentes et al., 2015) sowie (3) zur Aktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems beitragen (Kannemeier et al., 2007).

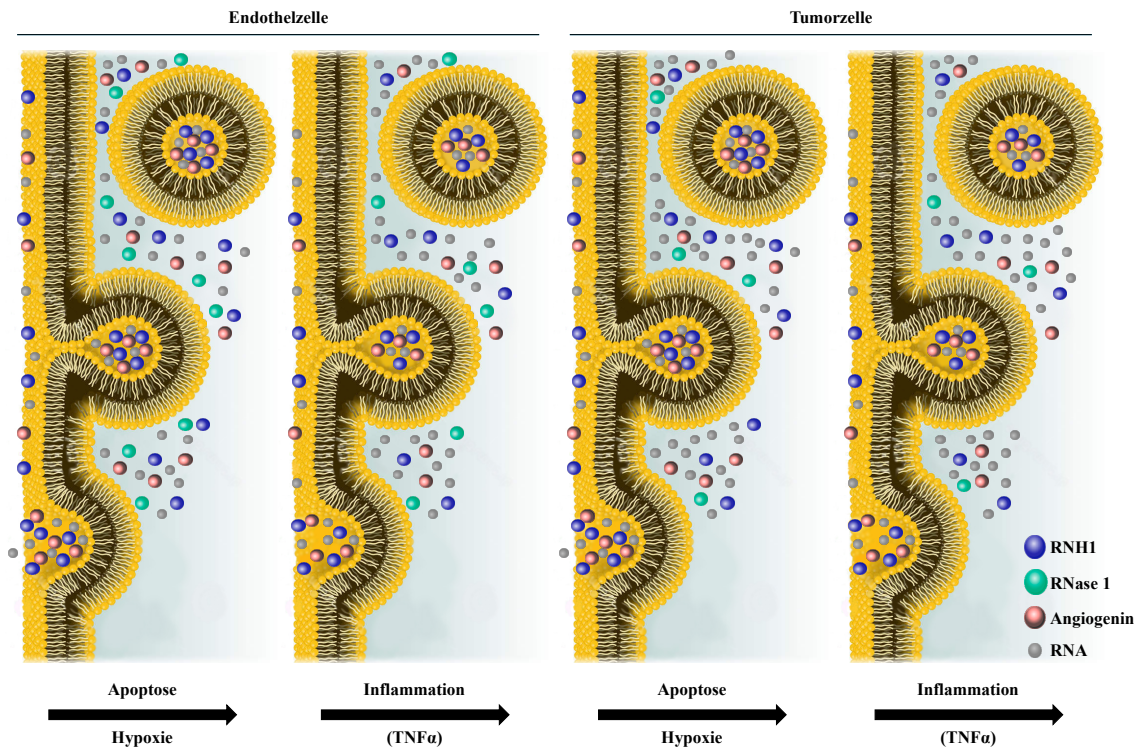


Abbildung 54: Expressions- und Verteilungsunterschiede von Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4 und Angiogenin in Tumor- und Endothelzellen

Sowohl in Tumor- (HT1080) als auch in Endothelzellen (EA.hy926) bewirken apoptotische und hypoxische Bedingungen eine erhöhte Freisetzung von RNH1, RNase 1/RNase 4, Angiogenin und RNA. Die Freisetzung von RNH1, Angiogenin und RNA erfolgt nicht nur frei in den Zellüberstand, sondern ein Anteil von RNH1, Angiogenin und RNA (nicht aber der RNase 1/RNase 4) ist mit der Mikrovesikelfraktion assoziiert. Im Gegensatz zu Tumorzellen (HT1080) führt die TNF α -Stimulation in Endothelzellen (EA.hy926) zu einer signifikanten Herunterregulation der RNase 1/RNase 4-Expression.

5.3.2.3 Einfluss hypoxischer Bedingungen

Während der Einfluss von Hypoxie auf die Expression von RNH1 und RNase 1 bis heute in keinen Studien beschrieben worden ist, gibt es Daten bezüglich der Hypoxie-induzierten Hochregulation der Gen- und Proteinexpression von Angiogenin. Insbesondere scheint die Hochregulation der Angiogenin-Expression unter hypoxischen Bedingungen sowohl in gesunden Geweben wie beispielsweise im renalen Interstitium, retinalen Pigmentepithel oder in placentaren Trophoblasten, als auch in manchen soliden Tumoren inklusive malignes Melanom, Gebärmutterhalskrebs, Brustkrebs und Mundschleimhautkrebs von einem HIF1 α -vermittelten Mechanismus abhängig zu sein (Rajashekhar et al., 2005; Nakamura et al., 2006; Hartmann et al., 1999; Kishimoto et al., 2012; Campo et al., 2005; Pilch et al., 2001; Lai et al., 2016). Da es auch in der Promotorregion des RNH1 mögliche Bindestellen für den Transkriptionsfaktor HIF1 α gibt, wäre eine Hypoxie-induzierte HIF1 α -abhängige Regulation des RNH1-Gens möglich (Abbildung 55).

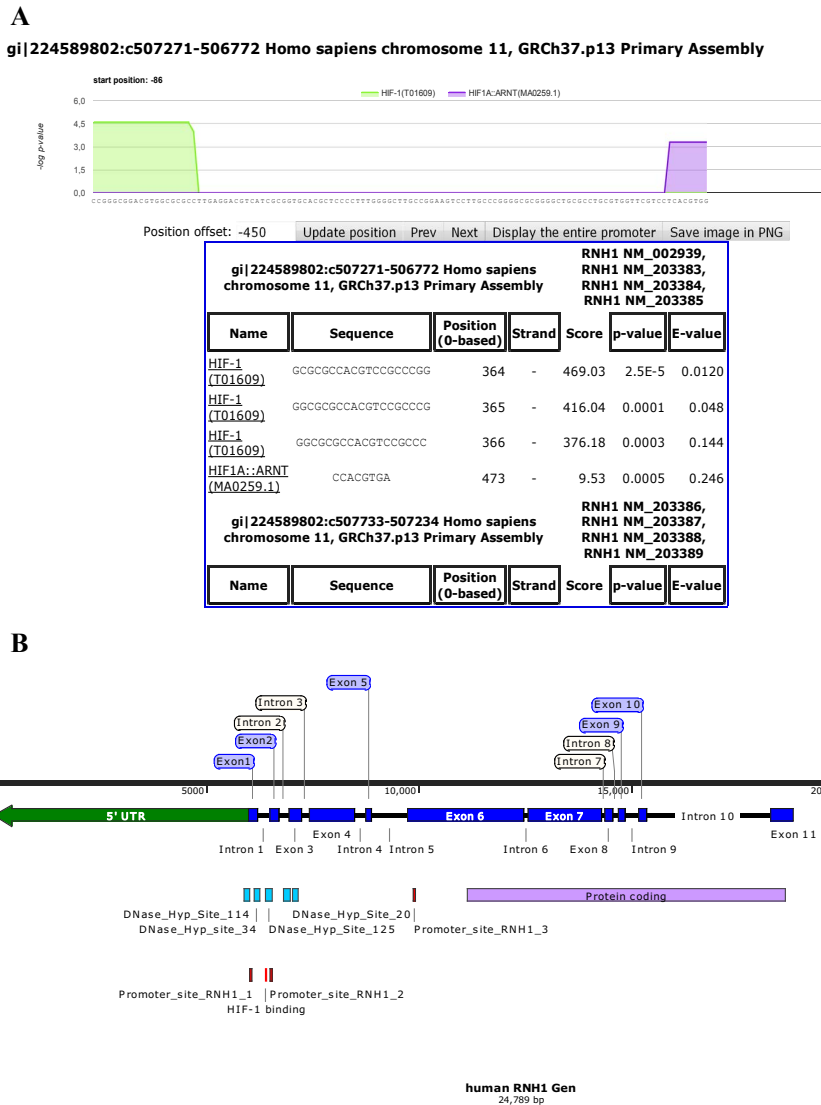


Abbildung 55: In silico-Analyse der Sequenz des humanen Ribonuklease Inhibitors und Illustration des Ribonuklease Inhibitor-Gens

(A) Analyse der Bindestellen für Transkriptionsfaktoren mittels *Lasagna Recherche* (http://biogrid-lasagna.engr.uconn.edu/lasagna_search/lasagna_search_varlen_ajax.php). Die Datenbank stellt eine HIF1 und HIF1-ARNT-Bindestelle dar. (B) Model des RNH1-Gens in *SnapGene*, in dem die wahrscheinlichen Promotorbereiche und HIF-Bindestellen enthalten sind.

Bei den Experimenten mit Tumorzellen wurde unter hypoxischen Bedingungen eine signifikante Verschiebung von RNH1, RNase 1/4 und Angiogenin vom intrazellulären in das extrazelluläre Kompartiment beobachtet, die von einer Hochregulierung der mRNA-Expression der drei Proteine begleitet wurde. Die maximale Freisetzung aller drei Proteine (Abbildungen 15a, 15b, 17a, 17b, 20a, 20b) bzw. die maximale Abnahme ihrer intrazellulären Konzentration (Abbildungen 16a, 16b, 18a, 18b, 21a, 21b), die jeweils nach 24 h Hypoxie erreicht wurde, induzierte die gesteigerte Genexpression der drei Proteine (Abbildung 22), die ihr Maximum nach 12 h Hypoxie zeigte. Nachdem die mRNA-Expression des RNH1 nach 12 h Hypoxie ihr Maximum erreichte, nahm sie

danach wieder ab bis sie nach 24 h Hypoxie keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle aufwies. Die gleiche fallende Tendenz zeigte die mRNA-Expression von RNase 1 und Angiogenin mit der Ausnahme, dass die Angiogenin-Expression nach 24 h noch immer im Vergleich zur Kontrolle erhöht blieb. Zusammenfassend scheint die RNH1-Expression die Genexpression von RNase 1 und Angiogenin zu beeinflussen.

Die langfristige Hypoxie-Exposition von HT1080 induzierte eine gesteigerte Ausschüttung von RNH1, RNase 1/RNase 4 und Angiogenin in den Zellüberstand (Abbildungen 23a, 23b). Insbesondere wurde ein signifikanter Anstieg der MV-assoziierten RNH1- bzw. Angiogenin-Sekretion beobachtet (Abbildungen 25a, 25b), wohingegen die RNH1- bzw. Angiogenin-Konzentration im Restüberstand (Abbildungen 26A, 26E, 26C, 26G) nur leicht zunahm. Trotz der signifikanten Zunahme der RNase 1/RNase 4-Freisetzung (Abbildungen 26B, 26F) blieb die RNase-Aktivität des Restüberstands unverändert (Abbildung 27A), wobei der eRNA-Gehalt gleichzeitig anstieg (Abbildung 27B). Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Zunahme der RNH1-Ausschüttung ausreicht, um diesen höheren RNase 1/RNase 4-Anstieg zu inhibieren. Um festzustellen, ob diese Konstellation stimmt, sollten mittels quantitativer Nachweismethoden (ELISA) die Konzentrationen von RNH1 und RNase 1 im Restüberstand bestimmt werden. Daraus könnte man indirekt auch Schlussfolgerungen über die Affinität des RNH1 zu RNasen im extrazellulären Raum ziehen und somit überprüfen, ob diese im Vergleich zu der hohen Bindungsaffinität in Zelllysaten vermindert ist. Intrazellulär erfolgt die feste Bindung beider Proteinen mit einer Stöchiometrie von 1:1 (Rutkoski und Raines, 2008), sie ist jedoch gleichzeitig recht labil, da sie schnell durch erhöhte Proteasenaktivität, Hitze, pH- und zelluläre Redoxpotentialveränderungen aufgehoben werden kann (Fominaya und Hofsteenge, 1992; Roth, 1962).

Unter hypoxischen Bedingungen erfolgte eine gesteigerte RNH1-Ausschüttung aus Endothelzellen, die jedoch nicht von einer erhöhten Freisetzung seiner Interaktionspartner begleitet wurde (Abbildungen 30a, 30b), wie dies der Fall bei den Tumorzellen war. Die Untersuchung der Protein- und Genexpression von RNH1, RNase 1 und Angiogenin nach Hypoxie-Exposition der Endothelzellen für kürzere Zeitabstände würde die Interaktionen zwischen diesen Proteinen mehr verdeutlichen. Zudem blieb die Genexpression von Angiogenin nach 24-stündiger Hypoxie-Exposition

in Endothelzellen (EA.hy926) im Gegensatz zu Tumorzellen (HT1080) unverändert (Abbildung 35). Dieser Unterschied könnte in Kombination mit den Ergebnissen von Pilch *et al.* ein Hinweis für den essentiellen Beitrag der vom Tumor abstammenden Fibroblasten zu dem komplexen Prozess der Tumor-Angiogenese sein (Pilch *et al.*, 2001). Die gleichbleibende RNase 1/RNase 4-Freisetzung bzw. RNase-Aktivität (Abbildung 34A) sowie die gleichzeitige RNH1-Freisetzung trugen zur Akkumulation freier eRNA bei (Abbildung 34B). Somit könnten unter chronisch-hypoxischen Bedingungen ähnlich wie bei chronisch-inflammatorischen Situationen die prokoagulatorische (Kannemeier *et al.*, 2007), proinflammatorische (Fischer *et al.*, 2013; Cabrera-Fuentes *et al.*, 2015) und gefäßpermeabilitätssteigernde (Fischer *et al.*, 2007) eRNA-Aktivitäten im vaskulären System gefördert werden.

5.4 Einfluss der Ribonuklease Inhibitor-Expression auf die Expression von Ribonukleasen der Ribonuklease A-Superfamilie

Die Tatsache, dass die RNH1-Expression die Genexpression von RNasen entscheidend beeinflusst, wurde durch die RNH1-*Knockdown*-Experimente in Tumor- (siehe 4.2.3.1) und Endothelzellen (siehe 4.2.3.2) bestätigt. Insgesamt kann aus den Ergebnissen dieser Experimente geschlossen werden, dass die Verminderung der RNH1-Expression zur Abnahme der Gen- und Proteinexpression von RNasen führte (Abbildungen 43, 44a, 44b, 47, 48). Zudem wurde gezeigt, dass RNH1 unentbehrlich für die Viabilität von Endothel- und Tumorzellen ist, da die Herunterregulation der mRNA-Expression des RNH1 zur signifikanten Verminderung der Anzahl von lebenden Zellen führte (Abbildungen 46B, 50B). Insbesondere wirkt nicht die siRNA-Behandlung der Zellen toxisch, wie die Kontrollen mit gleicher Konzentration anderer siRNAs zeigten, sondern das Fehlen von RNH1 ist für die Zellen toxisch. Die Abwesenheit des RNH1 ließ die Zellen anfällig für die katalytische Aktivität von RNasen werden, bedingt durch die verminderte Komplexierung und dadurch vermehrte Freisetzung der RNasen, was durch die signifikant erhöhte RNase-Aktivität im Zellüberstand (Abbildungen 45A, 49A) sowie die gesteigerten Werte der Zytotoxizität (Abbildungen 46A, 50A) und der vermehrten eRNA-Freisetzung (Abbildungen 45B, 49B) gezeigt wurde. Die Abwesenheit des RNH1 scheint somit lethal für die Zellen zu sein (Abbildung 56), was auch in den RNH1-*Knockout*-Experimenten von Thomas *et al.* dargestellt wurde (Thomas *et al.*, 2016).

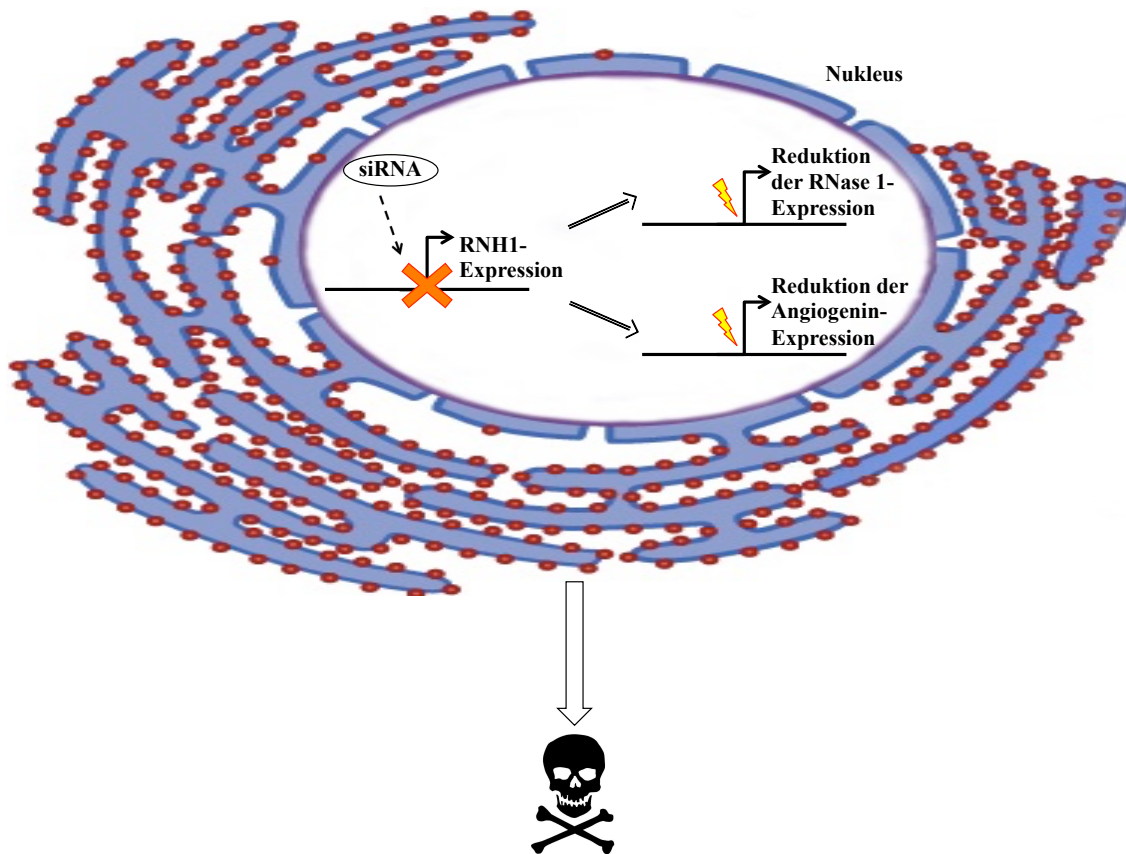


Abbildung 56: Einfluss der Ribonuklease Inhibitor-Expression auf die Expression von Ribonuklease 1/4 und Angiogenin in Tumor- und Endothelzellen

Sowohl in Tumor- (HT1080) als auch in Endothelzellen (EA.hy926) führt die Herunterregulation der RNH1-Expression zur Abnahme sowohl der mRNA-Expression als auch der intrazellulären Konzentration von RNase 1/4 und Angiogenin. Außerdem wird dadurch die Zunahme der RNase-Aktivität sowie des RNA-Gehalts in den Zellüberständen induziert. Die gleichzeitige Abnahme der Anzahl der lebenden transfizierten Zellen bestätigt die zytotoxische Wirkung der Herunterregulation der RNH1-Expression in diesen Zelllinien.

5.5 Schlussfolgerungen und klinische Relevanz des Ribonuklease Inhibitors

Zusammenfassend geben die Ergebnisse dieser Arbeit neue Einblicke in die Rolle des RNH1 in der Regulation der intra- und extrazellulären Expression von RNasen und beschreiben eine mögliche Rolle des RNH1 in inflammatorischen bzw. hypoxischen Situationen im vaskulären System sowie im Rahmen tumoraler Prozesse. Chronisch-inflammatorische Bedingungen, assoziiert mit hohen $\text{TNF}\alpha$ -Konzentrationen sowie langfristige hypoxische Zustände führten zu einer gesteigerten RNH1-Freisetzung, wodurch wahrscheinlich die Akkumulation von eRNA induziert und der Ablauf inflammatorischer Prozesse stimuliert wurde. Der erhöhte RNH1-Gehalt der MV, der zur Stabilisierung der in den MV eingeschlossenen RNA beizutragen scheint, könnte an

der Vermittlung der prokoagulatorischen und proinflammatorischen MV-Effekte sowie an der MV-induzierten vaskulären Dysfunktion beteiligt sein. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Expression der RNasen von der RNH1-Expression abhängig ist und dass RNH1 ein unerlässlicher Bestandteil für das Überleben von Tumor- und Endothelzellen ist.

Wie in der Einleitung beschrieben wurde, hat RNH1 zudem eine große klinische Relevanz, da er unter anderem auch antitumorale Eigenschaften besitzt (siehe 1.1.2). Es liegen vielversprechende Ergebnisse dazu vor, dass durch den Einsatz des RNH1 z.B. als möglicher Tumormarker (Tang et al., 2015; Yuan-Hui Wu, 2016; Zhuang et al., 2016; Yao et al., 2013; Rucksaken et al., 2014) oder das Blockieren von Angiogenin bzw. der EMT durch RNH1, eine Antagonisierung von Tumorwachstum und Metastasierung erreicht werden könnte (Polakowski et al., 1993; Shapiro und Vallee, 1987; Peng et al., 2014; Chen et al., 2011; Xiong et al., 2014; Li et al., 2014; Pan et al., 2012; Zhuang et al., 2016; Yao et al., 2013). Insgesamt lassen die Ergebnisse dieser Arbeit schlussfolgern, dass RNH1 als eRNA-Protector nicht nur eine wichtige Rolle bei der Regulation von koagulatorischen und inflammatorischen Prozessen spielt, sondern in Zukunft auch für die Tumorforschung von großer Bedeutung sein könnte.

5.6 Perspektiven

Weiterführende Studien sollten (a) die Signaltransduktionswege aufdecken, die an der RNH1-Freisetzung bzw. an seiner Translokation vom Zytosol zur Membran beteiligt sind, (b) die extrazellulären Wirkungen und den Beitrag des MV-assoziierten RNH1 sowie der MV-assoziierten eRNA an der Vermittlung der MV-Effekte verdeutlichen, (c) die Beteiligung des Angiogenins in den MV-vermittelten angiogenen Prozessen definieren, (d) die Freisetzung von RNH1 bzw. eRNA mittels Exosomen untersuchen, (e) die Affinität des RNH1 zu RNasen im extrazellulären Raum bestimmen, (f) die RNH1-Konzentration im Blut von Krebspatienten sowie von Patienten mit chronisch-inflammatorischen Erkrankungen analysieren und diese zur Verbesserung der Diagnostik und Therapiemöglichkeiten verwenden, (g) die Promotorregion des RNH1 auf Bindestellen für den Transkriptionsfaktor HIF1 α *in silico* und *in vitro* untersuchen und (h) der Herstellung von endothelzell-spezifischem konditionellem RNH1- und

RNase 1-*Knockout* in der Maus dienen, um die physiologische Bedeutung des Verlustes der RNH1- bzw. RNase 1-Expression im Endothel zu untersuchen.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Ribonuklease Inhibitor (RNH1) und dessen Interaktionspartner, Ribonuklease 1 und 4 (RNase 1/RNase 4) und Angiogenin (= RNase 5), auf mRNA- und Proteinebene in Endothel- (EA.hy926) und Tumorzellen (HT1080) mittels semiquantitativer PCR, Western-Blots und Aktivitätstests untersucht. Beide Zelllinien wurden für 24 h mit apoptotischen (Staurosporin), nekrotischen (Ethanol) und inflammatorischen Agonisten (Tumornekrosefaktor α (TNF α), Lipopolysaccharide) sowie Hypoxie behandelt.

Western-Blot-Analysen zeigten, dass die Stimulation beider Zelllinien mit Staurosporin, TNF α und Hypoxie die RNH1- und Angiogenin-Freisetzung aus den Zellen induzierte, während die intrazelluläre RNH1- und Angiogenin-Konzentration abnahm. Ein ähnliches Verhalten zeigte auch die RNase 1/RNase 4 unter diesen Bedingungen aber nur in den Tumorzellen. Die Freisetzung des RNH1 und Angiogenins erfolgte nicht nur frei in den Zellüberstand, sondern ein Anteil von RNH1 und Angiogenin (nicht aber der RNase 1/RNase 4) war, besonders unter hypoxischen Bedingungen, mit der Mikrovesikelfraktion assoziiert.

Die erhöhte Mikrovesikelfreisetzung unter inflammatorischen und hypoxischen Bedingungen korrelierte mit einem gesteigerten Ribonukleinsäure- (RNA-) sowie RNH1-Gehalt der Mikrovesikel.

Die 24-stündigen Behandlungen der Zellen mit Ethanol, Lipopolysacchariden und Hypoxie hatten keinen Einfluss auf die Genexpression von RNH1 und RNase 1. Unter hypoxischen Bedingungen nahm die mRNA-Expression von Angiogenin in den Tumorzellen zu, während in den Endothelzellen keine signifikante Änderung beobachtet wurde. Die Stimulation der Endothelzellen mit TNF α zeigte keine Wirkung auf die Genexpression von RNH1 und Angiogenin. Im Gegensatz dazu wurde die Expression, Freisetzung und Aktivität von RNase 1/RNase 4 auf Protein- und Genebene reduziert.

Um den Einfluss der RNH1-Expression auf die Expression von RNasen in Tumor- und Endothelzellen zu untersuchen, wurden RNH1-*Knockdown*-Experimente mit siRNA durchgeführt. In beiden Zelllinien führte die Herunterregulation der RNH1-Expression zur Abnahme sowohl der mRNA-Expression als auch der intrazellulären Konzentration von RNase 1/RNase 4 und Angiogenin. Außerdem wurde dadurch die Zunahme der RNase-Aktivität sowie des RNA-Gehalts in den Zellüberständen induziert. Die gleichzeitige Abnahme der Anzahl der lebenden transfizierten Zellen bestätigte die zytotoxische Wirkung der Herunterregulation der RNH1-Expression in diesen Zelllinien.

Des Weiteren wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit der Einfluss des extrazellulären RNH1 auf unterschiedlichen Zelltypen mittels Zytotoxizitäts- und Proliferationstests untersucht. Während niedrige Konzentrationen von rekombinantem RNH1 (0,4-10 µg/ml) die Proliferation der humanen primären Endothelzellen (HUVEC) schwach und die der Tumorzellen (HT1080) stark erhöhten, wirkten höhere RNH1-Konzentrationen (40-100 µg/ml) unabhängig vom Zelltyp zytotoxisch. Zudem wurde die Wirkung von RNH1-enthaltenden Mikrovesikeln auf humane primäre Endothelzellen beobachtet. Sowohl die aus normoxisch als auch aus hypoxisch behandelten Tumorzellen (HT1080) stammenden Mikrovesikel waren zytotoxisch für HUVEC und führten zu einer signifikanten Senkung ihrer Proliferation.

Zusammenfassend lässt sich aus den gezeigten Ergebnissen schlussfolgern, dass der unter pathologischen Bedingungen aus unterschiedlichen Zelllinien freigesetzte RNH1 eine wichtige Rolle in der Viabilität von Zellen sowie in der Regulation der Gen- und Proteinexpression von RNasen und ihrer Funktion auch im extrazellulären Raum spielt.

SUMMARY

In the present study the expression of ribonuclease inhibitor (RNH1) and its interaction partners, ribonuclease 1 and 4 (RNase 1/RNase 4) and angiogenin (= RNase 5), was investigated at mRNA and protein level in endothelial (EA.hy926) and tumor cells (HT1080) by semiquantitative PCR, Western blots and activity tests. Both cell lines were treated for 24 h with apoptotic (staurosporine), necrotic (ethanol) and inflammatory agonists (tumor necrosis factor α (TNF α), lipopolysaccharides) as well as hypoxia.

Western blot analysis showed that the stimulation of both cell lines with staurosporine, TNF α and hypoxia induced RNH1 and angiogenin release from the cells, while intracellular RNH1 and angiogenin concentration decreased. RNase 1/RNase 4 showed a similar behavior under these conditions but only in the tumor cells. The release of RNH1 and angiogenin did not only take place free in the cell supernatant, but a proportion of RNH1 and angiogenin (but not of RNase 1/RNase 4) was associated with the microvesicle fraction, especially under hypoxic conditions.

The increased microvesicle release under inflammatory and hypoxic conditions correlated with the increased ribonucleic acid (RNA) and RNH1 content of the microvesicles.

The 24-hour treatments of the cells with ethanol, lipopolysaccharides and hypoxia had no effect on the gene expression of RNH1 and RNase 1. Under hypoxic conditions the mRNA expression of angiogenin increased in the tumor cells while in the endothelial cells no significant change was observed. The stimulation of endothelial cells with TNF α had no effect on the gene expression of RNH1 and angiogenin. In contrast, the expression, release and activity of RNase 1/RNase 4 was reduced at protein and gene level.

In order to investigate the influence of RNH1 expression on the expression of RNases in tumor and endothelial cells, RNH1-knockdown experiments with siRNA were performed. The downregulation of RNH1 expression in both cell lines lead to a

decrease of mRNA expression and intracellular concentration of both RNase 1/RNase 4 and angiogenin. In addition, it induced the increase of RNase activity as well as the RNA content in the cell supernatants. The simultaneous decrease of the number of live transfected cells confirmed the cytotoxic effect of downregulation of RNH1 expression in these cell lines.

Furthermore, the influence of extracellular RNH1 on different cell types was investigated by cytotoxicity and proliferation tests in the context of the present work. While low levels of recombinant RNH1 (0.4-10 µg/ml) strongly increased the proliferation of tumor cells (HT1080) and only weakly increased those of human primary endothelial cells (HUVEC), higher RNH1 concentrations (40-100 µg/ml) were cytotoxic for both cell types. In addition, the effect of RNH1-containing microvesicles on human primary endothelial cells was observed. From normoxic- as well as from hypoxic-treated tumor cells (HT1080) produced microvesicles were cytotoxic to HUVEC and led to a significant reduction of their proliferation.

In summary, these results demonstrate that RNH1, released from different cell lines under pathological conditions, plays an important role in the viability of cells, as well as in the regulation of gene and protein expression of RNases and their function also in extracellular space.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
~	circa
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
A	Absorption
A549	<i>Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells</i>
ABC	<i>ATP-Binding-Cassette</i>
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i>
ADAM17	<i>ADAM metalloproteinase domain 17</i>
ANG	Angiogenin
ANOVA	Varianzanalyse (<i>Analysis of variance</i>)
ARNT	<i>Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator</i>
ATP	Adenosintriphosphat
b-FGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2'-Deoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calcium
ca.	circa
Cas9	<i>CRISPR associated protein 9</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD62E	<i>CD62 antigen-like family member E</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
circRNA	<i>circular RNA</i>
CO ₂	Kohlendioxid
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	<i>double stranded DNA</i>
EA.hy926	<i>Human endothelial hybrid cell line</i>
ECP	<i>Eosinophil cationic Protein</i>
EDN	<i>Eosinophil-derived Neurotoxin</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMT	Epithel-Mesenchym Transition
ER	endoplasmatisches Reticulum
eRNA	extrazelluläre RNA
ESI	Elektrospray-Ionisation
et al.	<i>et alteri</i> (und andere)
ETOH	Ethanol

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum (<i>Fetal calf serum</i>)
FGF2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2
FSAP	Faktor VII-aktivierende Protease
FSC	Vorwärtstreulicht (<i>Forward Scatter</i>)
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HCl	Salzsäure
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor (<i>Hypoxia-inducible factor</i>)
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>High performance liquid chromatography</i>)
HPR	Humane pankreatische Ribonuklease
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HT1080	<i>Human fibrosarcoma cell line</i>
HT29	<i>Human colon adenocarcinoma cell line</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
ICAM-1	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1
IgG	Immunglobulin G
IMS	Ionenmobilitätsspektrometrie
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LC	Flüssigchromatographie (<i>Liquid chromatography</i>)
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
LRRs	<i>Leucin-Rich-Repeats</i>
M	Molar (Mol pro Liter)
m	milli
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MF	Multiplikationsfaktor
mg	Milligramm
min	Minute
miRNA	mikroRNA
ml	Milliliter
mol	<i>Mole</i> ($6,023 \times 10^{23}$ Teilchen)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
MV	Mikrovesikel
MVB	<i>multivesicular body</i>
n	nano oder Anzahl
NAD ⁺	oxidierte Form von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH/H ⁺	reduzierte Form von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NFκB	Nukleärer Faktor κB
nm	Nanometer
NMR	kernmagnetische Resonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
p	Wahrscheinlichkeit oder Population

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	Protein-Datenbank (<i>Protein Data Bank</i>)
PE	<i>R-Phycoerythrin</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PerCP	<i>Peridinin-Chlorophyll-a</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
POD	Peroxidase
Poly I:C	Polyribocytidyl-Polyriboinosinsäure
Poly:C	Polyribocytidylsäure
Poly:U	Polyribouracylsäure
PS	Phosphatidylserin
RIPA	<i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNH1	Ribonuklease Inhibitor
ROCK-I	Rho-assoziierte Kinase I (<i>rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase I</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>Revolutions per minute</i>)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
SCC	Seitwärtsstreulicht (<i>Side Scatter</i>)
SD	<i>Standard deviation</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfalte</i>)
sec	Sekunde
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
ssDNA	<i>single stranded DNA</i>
STP	Staurosporin
TACE	TNF α -konvertierendes-Enzym
TAE	Tris EDTA Acetat
TAPI	<i>TNFα protease inhibitor</i>
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)
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer RNA</i>
U	Unit
u.a.	unter anderem
UniProtKB	<i>Universal protein knowledgebase</i>
USA	<i>United States of America</i>
UV	ultraviolett
V	Volt

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	vaskulär-endothelialer Wachstumsfaktor (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)
vs.	Gegenüber (<i>Versus</i>)
vWF	von-Willebrand-Faktor
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
μ	Mikro

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Dreidimensionale Struktur des Ribonuklease Inhibitors.....	2
Abbildung 2:	Dreidimensionale Struktur des humanen Ribonuklease Inhibitors im Komplex mit verschiedenen Ribonukleasen.....	3
Abbildung 3:	Phylogenetische Unterteilung der Ribonuklease A-Superfamilie.....	6
Abbildung 4:	Vergleich der Aminosäuresequenzen der Ribonuklease A- Superfamilienmitglieder	7
Abbildung 5:	Dreidimensionale Struktur der humanen Ribonuklease 1	9
Abbildung 6:	Dreidimensionale Struktur der humanen Ribonuklease 5.....	11
Abbildung 7:	Vorgeschlagene Mechanismen für die Freisetzung und Funktion der extrazellulären RNA in der zytokinvermittelten inflammatorischen Aktivität	14
Abbildung 8:	Bildung und funktionelle Eigenschaften von zellulären Mikrovesikeln	17
Abbildung 9:	Zelluläres Mikrovesikel	19
Abbildung 10:	Einfluss von Stimulationen auf die Struktur der Plasmamembran und die Bildung von Mikrovesikeln bei einer eukaryotischen Zelle	20
Abbildung 11:	Mögliche Interaktionen zwischen Mikrovesikeln und Zielzellen.....	22
Abbildung 12:	Fluoreszenzfärbung von HT29- oder EA.hy926-Zellen	62
Abbildung 13:	Western-Blots von Gelen nach SDS-PAGE von Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1 und Angiogenin aus Zelllysaten und -überständen von HT1080- und EA.hy926-Zellen.....	62
Abbildung 14:	Identifikation von Proteinen im Zelllysate und -überstand von HT1080- und EA.hy926-Zellen.....	63
Abbildung 15a:	Ribonuklease Inhibitor in Zellüberständen von HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation mit TNF α , LPS und unter Hypoxie.....	66
Abbildung 15b:	Ribonuklease Inhibitor in Zellüberständen von HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation mit TNF α , LPS und unter Hypoxie.....	67

Abbildung 16a: Ribonuklease Inhibitor in Zelllysaten von HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation mit TNF α , LPS und unter Hypoxie.....	68
Abbildung 16b: Ribonuklease Inhibitor in Zelllysaten von HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation mit TNF α , LPS und unter Hypoxie.....	68
Abbildung 17a: Ribonuklease 1/Ribonuklease 4-immunoreaktives Material in Zellüberständen von HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation mit TNF α , LPS und unter Hypoxie	69
Abbildung 17b: Ribonuklease 1/Ribonuklease 4-immunoreaktives Material in Zellüberständen von HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation mit TNF α , LPS und unter Hypoxie	70
Abbildung 18a: Ribonuklease 1/Ribonuklease 4-immunoreaktives Material in Zelllysaten von HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation mit TNF α , LPS und unter Hypoxie	71
Abbildung 18b: Ribonuklease 1/Ribonuklease 4-immunoreaktives Material in Zelllysaten von HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation mit TNF α , LPS und unter Hypoxie	71
Abbildung 19: Ribonuklease-Aktivität in Zellüberständen von HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation mit TNF α , LPS und unter Hypoxie.....	72
Abbildung 20a: Angiogenin in Zellüberständen von HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation mit TNF α , LPS und unter Hypoxie.....	73
Abbildung 20b: Angiogenin in Zellüberständen von HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation mit TNF α , LPS und unter Hypoxie.....	74
Abbildung 21a: Angiogenin in Zelllysaten von HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation mit TNF α , LPS und unter Hypoxie.....	74
Abbildung 21b: Angiogenin in Zelllysaten von HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation mit TNF α , LPS und unter Hypoxie.....	75
Abbildung 22: DNA aus reverser Transkription von Ribonuklease Inhibitor-, Ribonuklease 1- und Angiogenin-mRNA in HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Stimulation der Zellen mit TNF α , LPS und unter Hypoxie	76

Abbildung 23a: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4- immunoreaktives Material und Angiogenin in Zellüberständen von HT1080-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie.....	80
Abbildung 23b: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4- immunoreaktives Material und Angiogenin in Zellüberständen von HT1080-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie.....	81
Abbildung 24: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4- immunoreaktives Material und Angiogenin in Zelllysaten von HT1080- Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie.....	81
Abbildung 25a: Ribonuklease Inhibitor und Angiogenin in der Mikrovesikelfraktion von HT1080-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie	82
Abbildung 25b: Ribonuklease Inhibitor und Angiogenin in der Mikrovesikelfraktion von HT1080-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie	83
Abbildung 26a: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4- immunoreaktives Material und Angiogenin in Restüberständen von HT1080-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie.....	84
Abbildung 26b: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4- immunoreaktives Material und Angiogenin in Restüberständen von HT1080-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie.....	85
Abbildung 27: Ribonuklease-Aktivität und RNA-Gehalt in Zellüberstand, Restüberstand und MV-Fraktion von HT1080-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie.....	85
Abbildung 28: DNA aus reverser Transkription von Ribonuklease Inhibitor-, Ribonuklease 1- und Angiogenin-mRNA in HT1080-Zellen nach 24- stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie	86
Abbildung 29: Analyse der Mikrovesikelfraktion in HT1080-Zellen.....	87

Abbildung 30a: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4- immunoreaktives Material und Angiogenin in Zellüberständen von EA.hy926-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie	91
Abbildung 30b: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4- immunoreaktives Material und Angiogenin in Zellüberständen von EA.hy926-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie	92
Abbildung 31a: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4- immunoreaktives Material und Angiogenin in Zelllysaten von EA.hy926-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie	93
Abbildung 31b: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4- immunoreaktives Material und Angiogenin in Zelllysaten von EA.hy926-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie	93
Abbildung 32a: Ribonuklease Inhibitor und Angiogenin in der Mikrovesikelfraktion von EA.hy926-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie	94
Abbildung 32b: Ribonuklease Inhibitor und Angiogenin in der Mikrovesikelfraktion von EA.hy926-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie	95
Abbildung 33a: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4- immunoreaktives Material und Angiogenin in Restüberständen von EA.hy926-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie	96
Abbildung 33b: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4- immunoreaktives Material und Angiogenin in Restüberständen von EA.hy926-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie	97
Abbildung 34: Ribonuklease-Aktivität und RNA-Gehalt in Zellüberstand, Restüberstand und MV-Fraktion von EA.hy926-Zellen nach 24- stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie	98

Abbildung 35: DNA aus reverser Transkription von Ribonuklease Inhibitor-, Ribonuklease 1- und Angiogenin-mRNA in EA.hy926-Zellen nach 24- stündiger Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS und Hypoxie	99
Abbildung 36: Analyse der Mikrosvesikelfraktion in EA.hy926-Zellen.....	100
Abbildung 37: Zytotoxizität der Mikrosvesikel.....	103
Abbildung 38: Einfluss der Mikrosvesikel auf die Zellproliferation.....	104
Abbildung 39: Degradierung von Ribonuklease Inhibitor im humanen Blutplasma..	105
Abbildung 40: Zytotoxizität des Ribonuklease Inhibitors	106
Abbildung 41: Einfluss von Ribonuklease Inhibitor auf die Zellproliferation	107
Abbildung 42: siRNA-vermittelte Herunterregulation der Ribonuklease Inhibitor- Expression in HT1080-Zellen.....	108
Abbildung 43: Einfluss der durch siRNA-vermittelte Herunterregulation der Ribonuklease Inhibitor-Expression auf die mRNA-Expression von Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1 und Angiogenin in HT1080- Zellen	109
Abbildung 44a: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4- immunoreaktives Material und Angiogenin in Zelllysaten von HT1080- Zellen nach Herunterregulation der Ribonuklease Inhibitor-Expression mittels siRNA	110
Abbildung 44b: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4- immunoreaktives Material und Angiogenin in Zelllysaten von HT1080- Zellen nach Herunterregulation der Ribonuklease Inhibitor-Expression mittels siRNA	111
Abbildung 45: Ribonuklease-Aktivität und RNA-Gehalt in Zellüberständen von HT1080-Zellen nach Herunterregulation der Ribonuklease Inhibitor- Expression mittels siRNA.....	111
Abbildung 46: Einfluss der siRNA-vermittelte Herunterregulation der Ribonuklease Inhibitor-Expression auf das Wachstum von HT1080-Zellen.....	112
Abbildung 47: Einfluss der siRNA-vermittelten Herunterregulation der Ribonuklease Inhibitor-Expression auf die mRNA-Expression von Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1 und Angiogenin in EA.hy926-Zellen.....	114

Abbildung 48: Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4- immunoreaktives Material und Angiogenin in Zelllysaten von EA.hy926-Zellen nach Herunterregulation der Ribonuklease Inhibitor- Expression mittels siRNA.....	115
Abbildung 49: Ribonuklease-Aktivität und RNA-Gehalt in Zellüberständen von EA.hy926-Zellen nach Herunterregulation der Ribonuklease Inhibitor- Expression mittels siRNA.....	116
Abbildung 50: Einfluss der siRNA-vermittelte Herunterregulation der Ribonuklease Inhibitor-Expression auf das Wachstum von EA.hy926-Zellen.....	117
Abbildung 51: Ribonuklease-Aktivität und RNA-Gehalt in Zellüberständen von EA.hy926- und HT1080-Zellen nach Herunterregulation der Ribonuklease Inhibitor-Expression mittels siRNA.....	118
Abbildung 52: Einfluss des extrazellulären Ribonuklease Inhibitors auf die Proliferation von Tumor- und Endothelzellen.....	121
Abbildung 53: Schematische Darstellung der möglichen Freisetzungswege von Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1 und Angiogenin.....	127
Abbildung 54: Expressions- und Verteilungsunterschiede von Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1/Ribonuklease 4 und Angiogenin in Tumor- und Endothelzellen.....	131
Abbildung 55: In silico-Analyse der Sequenz des humanen Ribonuklease Inhibitors und Illustration des Ribonuklease Inhibitor-Gens.....	132
Abbildung 56: Einfluss der Ribonuklease Inhibitor-Expression auf die Expression von Ribonuklease 1/4 und Angiogenin in Tumor- und Endothelzellen	135

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Unterschiede zwischen Exosomen, Mikrovesikeln und apoptotischen Körpern	16
Tabelle 2:	Mittels Massenspektrometrie identifizierte im Zelllysate oder -überstand von HT1080- und EA.hy926-Zellen enthaltene Proteine	64
Tabelle 3:	DNA (aus mRNA) und Protein-immunoreaktives Material von Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1, Angiogenin und Ribonuklease-Aktivität in Zelllysaten oder -überständen aus HT1080-Zellen nach 1-, 3-, 6-, 12- und 24-stündiger Behandlung mit TNF α , LPS oder Hypoxie	78
Tabelle 4:	DNA (aus mRNA) und Protein-immunoreaktives Material von Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1 und Angiogenin, RNA-Konzentration und Ribonuklease-Aktivität in Zelllysaten, Zellüberständen, Restüberständen oder Mikrovesikeln aus HT1080-Zellen nach einer 24-stündigen Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS oder Hypoxie.....	89
Tabelle 5:	DNA (aus mRNA) und Protein-immunoreaktives Material von Ribonuklease Inhibitor, Ribonuklease 1 und Angiogenin, RNA-Konzentration und Ribonuklease-Aktivität in Zelllysaten, Zellüberständen, Restüberständen oder Mikrovesikeln aus EA.hy926-Zellen nach einer 24-stündigen Behandlung mit STP, ETOH, TNF α , LPS oder Hypoxie.....	102

LITERATURVERZEICHNIS

1. **Abid Hussein, M.N., et al.** (2003) Antigenic characterization of endothelial cell-derived microparticles and their detection *ex vivo*. *J. Thromb. Haemost.* 1: 2434-2443.
2. **Alexander, C. and ET. Rietschel** (2001) Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J. Endotoxin Res.* 7: 167-202.
3. **Allen, S.C., et al.** (1994) A comparison of the predicted and X-ray structures of angiogenin. Implications for further studies of model building of homologous proteins. *J. Protein Chem.* 13: 649-658.
4. **Amatngalim, G.D., et al.** (2015) Basal cells contribute to innate immunity of the airway epithelium through production of the antimicrobial protein RNase 7. *J. Immunol.* 194: 3340-3350.
5. **Anker, P., et al.** (2001) Circulating nucleic acids in plasma or serum. *Clin. Chim. Acta.* 313: 143-146.
6. **Anker, P. and M. Stroun** (2002) Progress in the knowledge of circulating nucleic acids: Plasma RNA is particle-associated. Can it become a general detection marker for a cancer blood test? *Clin. Chem.* 48: 1210-1211.
7. **Armstrong, M.J., J. Storch, and N. Dainiak** (1988) Structurally distinct plasma membrane regions give rise to extracellular membrane vesicles in normal and transformed lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta., Biomembr.* 946: 106-112.
8. **Baj-Krzyworzeka, M., et al.** (2002) Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp. hematol.* 30: 450-459.
9. **Barker, R.L., et al.** (1989) Eosinophil cationic protein cDNA. Comparison with other toxic cationic proteins and ribonucleases. *J. Immunol.* 143: 952-955.
10. **Barnard, E.A.** (1969) Biological function of pancreatic ribonuclease. *Nature.* 221: 340-344.
11. **Barry, O.P., et al.** (1997) Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J. Clin. Invest.* 99: 2118-2127.
12. **Barry, O.P., et al.** (1998) Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J. Clin. Invest.* 102: 136-144.

13. **Bauer, J., et al.** (1992) *In vitro* model of angiogenesis using a human endothelium-derived permanent cell line: Contributions of induced gene expression, G-proteins, and integrins. *J. Cell. Physiol.* 153: 437-449.
14. **Beintema, J.J.** (1998) Introduction: The ribonuclease A superfamily. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 763-765.
15. **Beintema, J.J., et al.** (1988a) Differences in glycosylation pattern of human secretory ribonucleases. *Biochem. J.* 255: 501-505.
16. **Beintema, J.J., et al.** (1988b) Amino acid sequence of the nonsecretory ribonuclease of human urine. *Biochem.* 27: 4530-4538.
17. **Beintema, J.J., et al.** (1984) The amino acid sequence of human pancreatic ribonuclease. *Anal. Biochem.* 136: 48-64.
18. **Berckmans, R.J., et al.** (2001) Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb. haemost.* 85: 639-646.
19. **Beyer, C. and D.S. Pisetsky** (2010) The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 6: 21-29.
20. **Bicknell, R. and B.L. Vallee** (1988) Angiogenin activates endothelial cell phospholipase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 5961-5965.
21. **Black, R.A., et al.** (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature.* 385: 729-733.
22. **Blackburn, P. and B.L. Jaikhani** (1979) Ribonuclease inhibitor from human placenta: Interaction with derivatives of ribonuclease A. *J. Biol. Chem.* 254: 12488-12493.
23. **Blackburn P, M.S.** (1982) Pancreatic ribonuclease, in *The Enzymes*, Boyer, P.D., editor, *Academic Press: New York.* XV: 317-433.
24. **Blazquez, M., J.M. Fominaya, and J. Hofsteenge** (1996) Oxidation of sulfhydryl groups of ribonuclease inhibitor in epithelial cells is sufficient for its intracellular degradation. *J. Biol. Chem.* 271: 18638-18642.
25. **Blood, C.H. and B.R. Zetter** (1990) Tumor interactions with the vasculature: Angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1032: 89-118.
26. **Bond, M.D. and B.L. Vallee** (1988) Isolation of bovine angiogenin using a placental ribonuclease inhibitor binding assay. *Biochem.* 27: 6282-6287.
27. **Bos-Vreugdenhil, A.P., et al.** (1985) Study on membrane fragments released from the sublingual glands of the mouse during secretion *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Buccale.* 13: 317-332.

28. **Botella-Estrada, R., et al.** (2001) Antitumor effect of B16 melanoma cells genetically modified with the angiogenesis inhibitor rnasin. *Cancer Gene Ther.* 8: 278-284.
29. **Cabrera-Fuentes, H.A., et al.** (2015) Regulation of monocyte/macrophage polarisation by extracellular RNA. *Thromb. haemost.* 113: 473-481.
30. **Campo, L., et al.** (2005) Angiogenin is up-regulated in the nucleus and cytoplasm in human primary breast carcinoma and is associated with markers of hypoxia but not survival. *J. Pathol.* 205: 585-591.
31. **Cavalli L, G.D., Pesando P, Bracchi PG, Campanini G, Maraini G.** (1979) Control of ribonuclease activity in the human lens during ageing and cataract formation. *Ophthalmic Res.* 11: 416-422.
32. **Chan, A.K., R.W. Chiu, and Y.M. Lo** (2003) Cell-free nucleic acids in plasma, serum and urine: A new tool in molecular diagnosis. *Ann. Clin. Biochem.* 40: 122-130.
33. **Chen, J., et al.** (2011) Knockdown of ribonuclease inhibitor expression with siRNA in non-invasive bladder cancer cell line BIU-87 promotes growth and metastasis potentials. *Mol. Cell. Biochem.* 349: 83-95.
34. **Chen, X.Q., et al.** (2000) Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 6: 3823-3826.
35. **Cho, S., J.J. Beintema, and J. Zhang** (2005) The ribonuclease A superfamily of mammals and birds: Identifying new members and tracing evolutionary histories. *Genomics.* 85: 208-220.
36. **Chopra, V., T.V. Dinh, and E.V. Hannigan** (1996) Angiogenin, interleukins, and growth-factor levels in serum of patients with ovarian cancer: Correlation with angiogenesis. *Cancer J. Sci. Amer.* 2: 279-285.
37. **Cieslak, M., et al.** (2002) DNazymes to $\beta 1$ and $\beta 3$ mRNA down-regulate expression of the targeted integrins and inhibit endothelial cell capillary tube formation in fibrin and matrigel. *J. Biol. Chem.* 277: 6779-6787.
38. **Coleman, M.L., et al.** (2001) Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.* 3: 339-345.
39. **Combes, V., et al.** (1999) *In vitro* generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J. Clin. Invest.* 104: 93-102.
40. **Consortium, T.U.** (2014) Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* 42: D191-D198.

41. **Crawford, D., K. Hagerty, and B. Beutler** (1989) Multiple splice forms of ribonuclease-inhibitor mRNA differ in the 5'-untranslated region. *Gene*. 85: 525-531.
42. **Cui, X.Y., et al.** (2003) The antioxidant effects of ribonuclease inhibitor. *Free Radic. Res.* 37: 1079-1085.
43. **D'Alessio, G., et al.** (1991) Seminal RNase: A unique member of the ribonuclease superfamily. *Trends Biochem. Sci.* 16: 104-106.
44. **Davizon, P., A.D. Munday, and J.A. López** (2010) Tissue factor, lipid rafts, and microparticles. *Semin. thromb. hemost.* 36: 857-864.
45. **Decker, T. and M.L. Lohmann-Matthes** (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: 61-69.
46. **Deregibus, M.C., et al.** (2007) Endothelial progenitor cell-derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood.* 110: 2440-2448.
47. **Diamant, M., et al.** (2002) Elevated numbers of Tissue-Factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Circulation.* 106: 2442-2447.
48. **Diamant, M., et al.** (2004) Cellular microparticles: New players in the field of vascular disease? *Eur. j. clin. invest.* 34: 392-401.
49. **Dickson, K.A., M.C. Haigis, and R.T. Raines** (2005) Ribonuclease inhibitor: Structure and function. *Progr. nuc. ac. res. mol. biol.* 80: 349-374.
50. **Domachowske, J.B., et al.** (1998a) 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: 5327-5332.
51. **Domachowske, J.B., et al.** (1998b) Recombinant human eosinophil-derived neurotoxin/RNase 2 functions as an effective antiviral agent against respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* 177: 1458-1464.
52. **Edgell, C.J., C.C. McDonald, and J.B. Graham** (1983) Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 3734-3737.
53. **Elbashir, S.M., et al.** (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 411: 494-498.

54. **Eppenberger, U., et al.** (1998) Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independently define high- and low-risk subsets of node-negative breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 16: 3129-3136.
55. **Faille, D., et al.** (2012) Endocytosis and intracellular processing of platelet microparticles by brain endothelial cells. *J. cell. mol. med.* 16: 1731-1738.
56. **Felgner, J.H., et al.** (1994) Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J. Biol. Chem.* 269: 2550-2561.
57. **Felgner, P.L., et al.** (1987) Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 7413-7417.
58. **Feng, N., et al.** (2016) HIF-1 α and HIF-2 α induced angiogenesis in gastrointestinal vascular malformation and reversed by thalidomide. *Scientific Rep.* 6: 27280-27290.
59. **Ferreras, M., et al.** (1995) Thiol-disulfide exchange of ribonuclease inhibitor bound to ribonuclease A. Evidence of active inhibitor-bound ribonuclease. *J. Biol. Chem.* 1995. 270: 28570-28578.
60. **Fett, J.W., et al.** (1985) Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochem.* 24: 5480-5486.
61. **Fischer, S., et al.** (2014) Impact of extracellular RNA on endothelial barrier function. *Cell Tissue Res.* 355: 635-645.
62. **Fischer, S., et al.** (2007) Extracellular RNA mediates endothelial-cell permeability via vascular endothelial growth factor. *Blood.* 110: 2457-2465.
63. **Fischer, S., et al.** (2013) Extracellular RNA liberates tumor necrosis factor- α to promote tumor cell trafficking and progression. *Cancer Res.* 73: 5080-5089.
64. **Fischer, S., et al.** (2012) Extracellular RNA promotes leukocyte recruitment in the vascular system by mobilising proinflammatory cytokines. *Thromb. haemost.* 108: 730-741.
65. **Fischer, S., et al.** (2011) Expression and localisation of vascular ribonucleases in endothelial cells. *Thromb. haemost.* 105: 345-355.
66. **Fischer, S., et al.** (2009) Signaling mechanism of extracellular RNA in endothelial cells. *FASEB J.* 23: 2100-2109.
67. **Fischer, S. and K.T. Preissner** (2013) Extracellular nucleic acids as novel alarm signals in the vascular system. Mediators of defence and disease. *Hamostaseol.* 33: 37-42.
68. **Flaumenhaft, R., A.T.A. Mairuhu, and J.E. Italiano** (2010) Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles. *Semin. thromb. hemost.* 36: 881-887.

69. **Folkman, J.** (1985) Tumor angiogenesis. *Adv. Cancer Res.* 43: 175-203.
70. **Fominaya, J.M. and J. Hofsteenge** (1992) Inactivation of ribonuclease inhibitor by thiol-disulfide exchange. *J. Biol. Chem.* 267: 24655-24660.
71. **Fox, J.E., et al.** (1991) Evidence that agonist-induced activation of calpain causes the shedding of procoagulant-containing microvesicles from the membrane of aggregating platelets. *J. Biol. Chem.* 266: 13289-13295.
72. **Furia, A., et al.** (2011) The ribonuclease/angiogenin inhibitor is also present in mitochondria and nuclei. *FEBS Letters.* 585: 613-617.
73. **Futami, J., et al.** (1997) Tissue-specific expression of pancreatic-type RNases and RNase inhibitor in humans. *DNA Cell Biol.* 16: 413-419.
74. **Gansler, J., K.T. Preissner, and S. Fischer** (2014) Influence of proinflammatory stimuli on the expression of vascular ribonuclease 1 in endothelial cells. *FASEB J.* 28: 752-760.
75. **Garcia-Olmo, D.C., R. Ruiz-Piqueras, and D. Garcia-Olmo** (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: 575-583.
76. **Gaur, D., D. Seth, and J.K. Batra** (2002) Glycine 38 is crucial for the ribonucleolytic activity of human pancreatic ribonuclease on double-stranded RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297: 390-395.
77. **Gaur, D., S. Swaminathan, and J.K. Batra** (2001) Interaction of human pancreatic ribonuclease with human ribonuclease inhibitor: Generation of inhibitor-resistant cytotoxic variants. *J. Biol. Chem.* 276: 24978-24984.
78. **George, J., et al.** (1982) Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. *Blood.* 60: 834-840.
79. **George, J.N., et al.** (1986) Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery. *J. Clin. Invest.* 78: 340-348.
80. **Gleich, G.J., et al.** (1986) Biochemical and functional similarities between human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein: Homology with ribonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 3146-3150.
81. **Gonchoroff, N.J., et al.** (1985) A monoclonal antibody reactive with 5-bromo-2-deoxyuridine that does not require DNA denaturation. *Cytometry.* 6: 506-512.
82. **Greenbaum D., Colangelo C., Williams K., Gerstein M.** (2003) Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol.* 4: 117-124.

83. **Gultekin, H. and K.H. Heermann** (1988) The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal. Biochem.* 172: 320-329.
84. **Haigis, M.C., E.S. Haag, and R.T. Raines** (2002a) Evolution of ribonuclease inhibitor by exon duplication. *Mol. Biol. Evol.* 19: 959-963.
85. **Haigis, M.C., et al.** (2002b) KFERQ Sequence in ribonuclease A-mediated cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 277: 11576-11581.
86. **Haigis, M.C., E.L. Kurten, and R.T. Raines** (2003) Ribonuclease inhibitor as an intracellular sentry. *Nucl. Ac. Res.* 31: 1024-1032.
87. **Hamann, K.J., et al.** (1989) Sequence of human eosinophil-derived neurotoxin cDNA: Identity of deduced amino acid sequence with human nonsecretory ribonucleases. *Gene.* 83: 161-167.
88. **Hamilton, A.J. and D.C. Baulcombe** (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science.* 286: 950-952.
89. **Harder, J. and J.M. Schroder** (2002) RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J. Biol. Chem.* 277: 46779-46784.
90. **Hartmann, A., et al.** (1999) Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin in human malignant melanoma. *Cancer Res.* 59: 1578-1583.
91. **Hofsteenge, J.** (1997) Ribonuclease inhibitor, in Ribonucleases: Structures and functions, R.J.F. D' Alessio G., editor, *Academic Press: New York.* 621-658.
92. **Hofsteenge, J., et al.** (1988) Amino acid sequence of the ribonuclease inhibitor from porcine liver reveals the presence of leucine-rich repeats. *Biochem.* 27: 8537-8544.
93. **Hofsteenge, J., A. Vincentini, and S.R. Stone** (1991) Purification and characterization of truncated ribonuclease inhibitor. *Biochem. J.* 275: 541-543.
94. **Horstman, L.L., et al.** (2004) New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *Keio J. Med.* 53: 210-230.
95. **Hu, G.F., J.F. Riordan, and B.L. Vallee** (1997) A putative angiogenin receptor in angiogenin-responsive human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 2204-2209.
96. **Huang, Y.C., 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: 4626-4633.
97. **Huang, Y.F., et al.** (2010) Pharmacological and genetic accumulation of Hypoxia-Inducible Factor-1 α enhances excitatory synaptic transmission in hippocampal neurons through the production of vascular endothelial growth factor. *J. Neurosci.* 30: 6080-6093.

98. **Hugel, B., et al.** (2005) Membrane microparticles: Two sides of the coin. *Physiology*. 20: 22-27.
99. **Idriss, H.T. and J.H. Naismith** (2000) TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc. Res. Tech.* 50: 184-195.
100. **Ishizaki, T., et al.** (2000) Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of Rho-associated kinases. *Mol. Pharmacol.* 57: 976-983.
101. **Jaffe, E.A., et al.** (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* 52: 2745-2756.
102. **Janin, J.** (1994) Proteins with a ring. *Structure*. 2: 571-573.
103. **Johnson, P.J. and Y.M. Lo** (2002) Plasma nucleic acids in the diagnosis and management of malignant disease. *Clin. Chem.* 48: 1186-1193.
104. **Johnson, R.J., L.D. Lavis, and R.T. Raines** (2007) Intraspecies regulation of ribonucleolytic activity. *Biochem.* 46: 13131-13140.
105. **Joop, K., et al.** (2001) Microparticles from patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through multiple mechanisms. *Thromb. haemost.* 85: 810-820.
106. **Kajava, A.V.** (1998) Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. *J. Mol. Biol.* 277: 519-527.
107. **Kannemeier, C., et al.** (2007) Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 6388-6393.
108. **Kim, B.M., L.W. Schultz, and R.T. Raines** (1999) Variants of ribonuclease inhibitor that resist oxidation. *Protein Sci.* 8: 430-434.
109. **Kishimoto, K., et al.** (2012) Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin, besides VEGF, is related to progression of oral cancer. *Oral Oncol.* 48: 1120-1127.
110. **Kobe, B. and J. Deisenhofer** (1993) Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. *Nature.* 366: 751-756.
111. **Kobe, B. and J. Deisenhofer** (1994) The leucine-rich repeat: A versatile binding motif. *Trends Biochem. Sci.* 19: 415-421.
112. **Kobe, B. and J. Deisenhofer** (1995) A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature*, 374: 183-186.

113. **Kobe, B. and J. Deisenhofer** (1996) Mechanism of ribonuclease inhibition by ribonuclease inhibitor protein based on the crystal structure of its complex with ribonuclease A. *J. Mol. Biol.* 264: 1028-1043.
114. **Kobe, B. and A.V. Kajava** (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11: 725-732.
115. **Koopman, G., et al.** (1994) Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 84: 1415-1420.
116. **Kopreski, M.S., et al.** (1999) Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clin. Cancer Res.* 5: 1961-1965.
117. **Korzeniewski, C. and D.M. Callewaert** (1983) An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J. Immunol. Methods.* 64: 313-320.
118. **Koulov, A.V., et al.** (2003) Detection of apoptotic cells using a synthetic fluorescent sensor for membrane surfaces that contain phosphatidylserine. *Cell Death Differ.* 10: 1357-1359.
119. **Kövér, K.E., 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: 953-965.
120. **Kraft, N. and K. Shortman** (1970) The phylogeny of the ribonuclease-ribonuclease inhibitor System: Its distribution in tissues and its response during leukaemogenesis and aging. *Aust. J. Biol. Sci.* 23: 175-184.
121. **Kraft, N., K. Shortman, and D. Jamieson** (1969) The effect of x-irradiation on the balance between the alkaline ribonuclease and the alkaline ribonuclease inhibitor of mammalian tissues. *Radiat. Res.* 39: 655-668.
122. **Kriegler, M., 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.
123. **Kyner, D., J.K. Christman, and G. Acs** (1979) The effect of 12-O-tetradecanoyl-phorbol 13-acetate on the ribonuclease activity of circulating human lymphocytes. *Eur. J. Biochem.* 99: 395-399.
124. **Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
125. **Lai, K., et al.** (2016) Regulation of angiogenin expression and epithelial-mesenchymal transition by HIF-1 α signaling in hypoxic retinal pigment epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta., Mol. Basis Dis.* 1862: 1594-1607.

126. **Landré, J.B.P., et al.** (2002) Human endothelial cells selectively express large amounts of pancreatic-type ribonuclease (RNase 1). *J. Cell. Biochem.* 86: 540-552.
127. **Latt, S.A.** (1977) Fluorescent probes of chromosome structure and replication. *Can. J. Genet. Cytol.* 19: 603-623.
128. **Lee, F.S., et al.** (1988) Primary structure of human placental ribonuclease inhibitor. *Biochem.* 27: 8545-8553.
129. **Lee, F.S. and B.L. Vallee** (1990) Modular mutagenesis of human placental ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 1879-1883.
130. **Lee, F.S. and B.L. Vallee** (1993) Structure and action of mammalian ribonuclease (angiogenin) inhibitor. *Prog. Nuc. Ac. Res. Mol. Biol.* 44: 1-30.
131. **Leland, P.A., et al.** (1998) Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 10407-10412.
132. **Lhermusier, T., H. Chap, and B. Payrastre** (2011) Platelet membrane phospholipid asymmetry: From the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome. *J. Thromb. Haemost.* 9: 1883-1891.
133. **Li, L., et al.** (2014) Ribonuclease inhibitor up-regulation inhibits the growth and induces apoptosis in murine melanoma cells through repression of angiogenin and ILK/PI3K/AKT signaling pathway. *Biochim.* 103: 89-100.
134. **Li, Y., et al.** (2015) Circular RNA is enriched and stable in exosomes: A promising biomarker for cancer diagnosis. *Cell Res.* 25: 981-984.
135. **Libonati, M. and S. Sorrentino** (2001) Degradation of double-stranded RNA by mammalian pancreatic-type ribonucleases. *Methods Enzymol.* 341: 234-248.
136. **Lieber, M., et al.** (1976) A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer.* 17: 62-70.
137. **LiotÉ, F., 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: 163-168.
138. **Liu, S., et al.** (2001) Angiogenin activates Erk1/2 in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287: 305-310.
139. **Mack, M., et al.** (2000) Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: A mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat. Med.* 6: 769-775.

140. **Mallat, Z., et al.** (2000) Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 101: 841-843.
141. **Martinez, M.C., et al.** (2011) Microparticles in angiogenesis. *Circulation Res*. 109: 110-119.
142. **Matousek, J., et al.** (2003) Antitumor activity and other biological actions of oligomers of ribonuclease A. *J. Biol. Chem.* 278: 23817-23822.
143. **Mause, S.F. and C. Weber** (2010) Microparticles. Protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circulation Res*. 107: 1047-1057.
144. **Maynard, M.A., et al.** (2003) Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. *J. Biol. Chem.* 278: 11032-11040.
145. **McVey, M., A. Tabuchi, and W.M. Kuebler** (2012) Microparticles and acute lung injury. *Amer. J. physiol., Lung cell. molec. physiol.* 303: L364-L381.
146. **Mesri, M. and D.C. Altieri** (1998) Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J. immunol.* 161: 4382-4387.
147. **Miyake, H., et al.** (1999) Increased angiogenin expression in the tumor tissue and serum of urothelial carcinoma patients is related to disease progression and recurrence. *Cancer*. 86: 316-324.
148. **Mizuta, K., et al.** (1990) Purification and characterization of three ribonucleases from human kidney: Comparison with urine ribonucleases. *Arch. Biochem. Biophys.* 281: 144-151.
149. **Moenner, M., E. Hatzi, and J. Badet** (1997) Secretion of ribonucleases by normal and immortalized cells grown in serum-free culture conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 33: 553-561.
150. **Moenner, M., et al.** (1998) Ribonuclease inhibitor protein of human erythrocytes: Characterization, loss of activity in response to oxidative stress, and association with heinz bodies. *Blood Cell. Mol. Dis.* 24: 149-164.
151. **Monti, D.M. and G. D'Alessio** (2004) Cytosolic RNase inhibitor only affects RNases with intrinsic cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 279: 39195-39198.
152. **Monti, D.M., et al.** (2007) The cytosolic ribonuclease inhibitor contributes to intracellular redox homeostasis. *FEBS Letters*. 581: 930-934.
153. **Morel, O., et al.** (2011) Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 31: 15-26.

154. **Moroianu, J. and J.F. Riordan** (1994) Nuclear translocation of angiogenin in proliferating endothelial cells is essential to its angiogenic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 1677-1681.
155. **Mullis, K.B. and F.A. Faloona** (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction, in *Methods in Enzymology*, W. Ray, editor, *Academic Press: New York*. 335-350.
156. **Mun, J., et al.** (2013) MicroRNA-762 is upregulated in human corneal epithelial cells in response to tear fluid and pseudomonas aeruginosa antigens and negatively regulates the expression of host defense genes encoding RNase 7 and ST2. *PLOS ONE*. 8: e57850-e57857.
157. **Nadano, D., et al.** (1994) Purification and characterization of human brain ribonuclease inhibitor. *Arch. Biochem. Biophys.* 312: 421-428.
158. **Naddeo, M., et al.** (2005) Interactions of the cytotoxic RNase A dimers with the cytosolic ribonuclease inhibitor. *FEBS Letters*. 579: 2663-2668.
159. **Nakamura, M., et al.** (2006) Hypoxic conditions stimulate the production of angiogenin and vascular endothelial growth factor by human renal proximal tubular epithelial cells in culture. *Nephrol. Dial. Transplant*. 21: 1489-1495.
160. **Nakazawa, F., et al.** (2005) Extracellular RNA is a natural cofactor for the (auto-)activation of Factor VII-activating protease (FSAP). *Biochem. J.* 385: 831-838.
161. **Nickel, W.** (2005) Unconventional secretory routes: Direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic*. 6: 607-614.
162. **Nickel, W.** (2011) The unconventional secretory machinery of fibroblast growth factor 2. *Traffic*. 12: 799-805.
163. **Nickel, W. and C. Rabouille** (2009) Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 148-155.
164. **Nieuwland, R., et al.** (2000) Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood*. 95: 930-935.
165. **Nieuwland, R., et al.** (1997) Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. *Circulation*. 96: 3534-3541.
166. **Ohashi, A., et al.** (2017) The expression and localization of RNase and RNase inhibitor in blood cells and vascular endothelial cells in homeostasis of the vascular system. *PLOS ONE*. 12: e0174237-e0174251.
167. **Omura, S., et al.** (1995) Staurosporine, a potentially important gift from a microorganism. *J. Antibiotics*. 48: 535-548.

168. **Pai, T.W., et al.** (2006) Unique peptide identification of RNase A superfamily sequences based on reinforced merging algorithms. *J. Bioinform. Comput. Biol.* 4: 75-92.
169. **Pan, X., et al.** (2012) Up-regulating ribonuclease inhibitor inhibited epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis in murine melanoma cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44: 998-1008.
170. **Pant, S., H. Hilton, and M.E. Burczynski** (2012) The multifaceted exosome: Biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochem. Pharmacol.* 83: 1484-1494.
171. **Paweletz, N. and M. Knierim** (1989) Tumor-related angiogenesis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 9: 197-242.
172. **Peng, Y., et al.** (2014) Angiogenin interacts with ribonuclease inhibitor regulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in bladder cancer cells. *Cell. Signal.* 26: 2782-2792.
173. **Pilch, H., et al.** (2001) Hypoxia-stimulated expression of angiogenic growth factors in cervical cancer cells and cervical cancer-derived fibroblasts. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 11: 137-142.
174. **Pizzo, E., et al.** (2013) Ribonuclease/angiogenin inhibitor 1 regulates stress-induced subcellular localization of angiogenin to control growth and survival. *J. Cell Sci.* 126: 4308-4319.
175. **Polakowski, I.J., et al.** (1993) A ribonuclease inhibitor expresses anti-angiogenic properties and leads to reduced tumor growth in mice. *Amer. J. Pathol.* 143: 507-517.
176. **Porstmann, T., T. Ternynck, and S. Avrameas** (1985) Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: An enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *J. Immunol. Methods.* 82: 169-179.
177. **Preissner, K. T., Fischer, S. & Deindl, E. (2020)** Extracellular RNA as a Versatile DAMP and Alarm Signal That Influences Leukocyte Recruitment in Inflammation and Infection. *Frontiers in cell and developmental biology.* 8: 619221-619221.
178. **Puddu, P., et al.** (2010) The involvement of circulating microparticles in inflammation, coagulation and cardiovascular diseases. *Can. J. Cardiol.* 26: e140-e145.
179. **Quesenberry, P.J. and J.M. Aliotta** (2010) Cellular phenotype switching and microvesicles. *Advanc. drug deliv. rev.* 62: 1141-1148.

180. **Rabouille, C., V. Malhotra, and W. Nickel** (2012) Diversity in unconventional protein secretion. *J. Cell Sci.* 125: 5251-5255.
181. **Rajashekhar, G., et al.** (2005) Hypoxia up-regulated angiogenin and down-regulated vascular cell adhesion molecule-1 expression and secretion in human placental trophoblasts. *J. Soc. Gynecol. Invest.* 12: 310-319.
182. **Rank, A., et al.** (2010) Cellular origin of platelet-derived microparticles *in vivo*. *Thromb. Res.* 126: e255-e259.
183. **Rasheed, S., et al.** (1974) Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer.* 33: 1027-1033.
184. **Riordan, J.F. and B.L. Vallee** (1988) Human angiogenin, an organogenic protein*. *Bri. J. Cancer.* 57: 587-590.
185. **Rosenberg, H.F. and K.D. Dyer** (1995) Human ribonuclease 4 (RNase 4): coding sequence, chromosomal localization and identification of two distinct transcripts in human somatic tissues. *Nucleic Acids Res.* 23: 4290-4295.
186. **Rosenberg, H.F. and K.D. Dyer** (1996) Molecular cloning and characterization of a novel human ribonuclease (RNase k6): increasing diversity in the enlarging ribonuclease gene family. *Nucleic Acids Res.* 24: 3507-3513.
187. **Roth, J.S.** (1962) Ribonuclease. IX. Further studies on ribonuclease inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta.* 61: 903-915.
188. **Roth, J.S.** (1967) Some observations on the assay and properties of ribonucleases in normal and tumor tissues, in *Methods in Cancer Research*, H. Busch, editor, *Academic Press: New York.* 153-242.
189. **Roth, J.S., W.t.t.a.o.D. Bachmurski, and L. Inglis** (1958) Ribonuclease: VII. Partial purification and characterization of a ribonuclease inhibitor in rat liver supernatant fraction. *J. Biol. Chem.* 231: 1085-1096.
190. **Rozmyslowicz, T., et al.** (2003) Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. *AIDS.* 17: 33-42.
191. **Rucksaken, R., et al.** (2014) Plasma autoantibodies against heat shock protein 70, enolase 1 and ribonuclease/angiogenin inhibitor 1 as potential biomarkers for cholangiocarcinoma. *PLOS ONE.* 9: e103259-e103272.
192. **Rudolph, B., et al.** (2006) Identification of RNase 8 as a novel human antimicrobial protein. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 50: 3194-3196.
193. **Rugeles, M.T., et al.** (2003) Ribonuclease is partly responsible for the HIV-1 inhibitory effect activated by HLA alloantigen recognition. *Aids.* 17: 481-486.

194. **Russo, N., et al.** (1994) Role of glutamine-117 in the ribonucleolytic activity of human angiogenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 2920-2924.
195. **Rutkoski, T.J. and R.T. Raines** (2008) Evasion of ribonuclease inhibitor as a determinant of ribonuclease cytotoxicity. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9: 185-201.
196. **Sabatier, F., et al.** (2002) Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes.* 51: 2840-2845.
197. **Sack U, T.r.A., Rothe G (Hrsg)** (2007) Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methode und klinische Anwendung der Durchflusszytometrie. *Basel: Karger.* 27-70.
198. **Sasso, M.P., et al.** (1999) The differential pattern of tissue-specific expression of ruminant pancreatic type ribonucleases may help to understand the evolutionary history of their genes1. *Gene.* 227: 205-212.
199. **Sayers, T.J., et al.** (1987) The production of tumor necrosis factor by mouse bone marrow-derived macrophages in response to bacterial lipopolysaccharide and a chemically synthesized monosaccharide precursor. *J. Immunology.* 138: 2935–2940.
200. **Schaab, C., et al.** (2012) Analysis of high accuracy, quantitative proteomics data in the MaxQB Database. *Mol. Cell Proteomics.* 11: M111.014068-1 - M111.014068-10.
201. **Schutte, B., et al.** (1998) Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells. *J. Neurosci. Methods.* 86: 63-69.
202. **Semenza, G.L.** (2011) Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *New England J. Medicine.* 365: 537-547.
203. **Seno, M., et al.** (1994) Nucleotide sequence encoding human pancreatic ribonuclease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1218: 466-468.
204. **Shapiro, R.** (2001) Cytoplasmic ribonuclease inhibitor. *Methods Enzymol.* 341: 611-628.
205. **Shapiro, R., et al.** (1986a) Isolation and characterization of a human colon carcinoma-secreted enzyme with pancreatic ribonuclease-like activity. *Biochem.* 25: 7255-7264.
206. **Shapiro, R., J.F. Riordan, and B.L. Vallee** (1986b) Characteristic ribonucleolytic activity of human angiogenin. *Biochem.* 25: 3527-3532.
207. **Shapiro, R., J.F. Riordan, and B.L. Vallee** (1995) LRRning the Rlte of springs. *Nat. Struct. Biol.* 2: 350-354.

208. **Shapiro, R. and B.L. Vallee** (1987) Human placental ribonuclease inhibitor abolishes both angiogenic and ribonucleolytic activities of angiogenin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 2238-2241.
209. **Shapiro, R. and B.L. Vallee** (1991) Interaction of human placental ribonuclease with placental ribonuclease inhibitor. *Biochem.* 30: 2246-2255.
210. **Shet, A.S.** (2008) Characterizing blood microparticles: Technical aspects and challenges. *Vascul. health risk manag.* 4: 769-774.
211. **Shimoyama, S., et al.** (1996) Increased angiogenin expression in pancreatic cancer is related to cancer aggressiveness. *Cancer Res.* 56: 2703-2706.
212. **Shimoyama, S. and M. Kaminishi** (2003) Angiogenin in sera as an independent prognostic factor in gastric cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 129: 239-244.
213. **Shimoyama, S., et al.** (1999) Increased serum angiogenin concentration in colorectal cancer is correlated with cancer progression. *Clin. Cancer Res.* 5: 1125-1130.
214. **Simsekyilmaz, S., et al.** (2014) Role of extracellular RNA in atherosclerotic plaque formation in mice. *Circulation.* 129: 598-606.
215. **Smith, P.K., et al.** (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.
216. **Sorrentino, S.** (2010) The eight human “canonical” ribonucleases: Molecular diversity, catalytic properties, and special biological actions of the enzyme proteins. *FEBS Letters.* 584: 2194-2200.
217. **Sorrentino, S. and D.G. Glitz** (1991) Ribonuclease activity and substrate preference of human eosinophil cationic protein (ECP). *FEBS Letters.* 288: 23-26.
218. **Sorrentino, S., et al.** (1992) Eosinophil-derived neurotoxin and human liver ribonuclease. Identity of structure and linkage of neurotoxicity to nuclease activity. *J. Biol. Chem.* 267: 14859-14865.
219. **Sorrentino, S. and M. Libonati** (1994) Human pancreatic-type and nonpancreatic-type ribonucleases: A direct side-by-side comparison of their catalytic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 312: 340-348.
220. **Sorrentino, S., et al.** (2003) Degradation of double-stranded RNA by human pancreatic ribonuclease: Crucial role of noncatalytic basic amino acid residues. *Biochem.* 42: 10182-10190.
221. **Sorrentino, S., G.K. Tucker, and D.G. Glitz** (1988) Purification and characterization of a ribonuclease from human liver. *J. Biol. Chem.* 263: 16125-16131.

222. **Spencer, J.D., et al.** (2011) Ribonuclease 7 is a potent antimicrobial peptide within the human urinary tract. *Kidney Int.* 80: 174-180.
223. **Spencer, J.D., et al.** (2014) An endogenous ribonuclease inhibitor regulates the antimicrobial activity of ribonuclease 7 in the human urinary tract. *Kidney Int.* 85: 1179-1191.
224. **Stoorvogel, W., et al.** (2002) The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic.* 3: 321-330.
225. **Strober, W.** (2001) Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.* 21: A.3B.1-A.3B.2.
226. **Strydom, D.J.** (1998) The angiogenins. *Cell Mol. Life Sci.* 54: 811-824.
227. **Sugiura, N., et al.** (1983) Percutaneous intratumoral injection of ethanol under ultrasound imaging for treatment of small hepatocellular carcinoma. *Acta. Hepatol. Jpn.* 24: 920-930.
228. **Suzuki, Y. and Y. Takahashi** (1970) Developmental and regional variations in ribonuclease inhibitor activity in brain. *J. Neurochem.* 17: 1521-1524.
229. **Tabibzadeh, S.S., Q.F. Kong, and S. Kapur** (1994) Passive acquisition of leukocyte proteins is associated with changes in phosphorylation of cellular proteins and cell-cell adhesion properties. *Amer. J. pathol.* 145: 930-940.
230. **Tang, Y., et al.** (2015) Overexpression of ribonuclease inhibitor defines good prognosis and suppresses proliferation and metastasis in human colorectal cancer cells via PI3K/AKT pathway. *Clin. Transl. Oncol.* 17: 306-313.
231. **Tello-Montoliu, A., J.V. Patel, and G.Y.H. Lip** (2006) Angiogenin: A review of the pathophysiology and potential clinical applications. *J. Thrombo. Haemost.* 4: 1864-1874.
232. **Théry, C., et al.** (2002) Indirect activation of naïve CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Immunol.* 3: 1156-1162.
233. **Thomas, S.P., et al.** (2018) Human angiogenin is a potent cytotoxin in the absence of ribonuclease inhibitor. *RNA.* 24: 1018-1027.
234. **Thomas, S.P., et al.** (2016) Knockout of the ribonuclease inhibitor gene leaves human cells vulnerable to secretory ribonucleases. *Biochem.* 55: 6359-6362.
235. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4350-4354.
236. **Tracey, K.J., et al.** (1989): Cachectin/tumour necrosis factor. *Lancet (British edition).* 1: 1122–1126.

237. **Tsui, N.B., E.K. Ng, and Y.M. Lo** (2002) Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin. Chem.* 48: 1647-1653.
238. **Turcotte, R.F. and R.T. Raines** (2008) Interaction of onconase with the human ribonuclease inhibitor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 512-514.
239. **Ugurel, S., et al.** (2001) Increased serum concentration of angiogenic factors in malignant melanoma patients correlates with tumor progression and survival. *J. Clin. Oncol.* 19: 577-583.
240. **Ullal, A.J., D.S. Pisetsky, and C.F. Reich** (2010) Use of SYTO 13, a fluorescent dye binding nucleic acids, for the detection of microparticles in *in vitro* systems. *Cytometry Part A.* 77: 294-301.
241. **Vanderlaan, M. and C.B. Thomas** (1985) Characterization of monoclonal antibodies to bromodeoxyuridine. *Cytometry.* 6: 501-505.
242. **VanWijk, M.J., et al.** (2003) Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc. Res.* 59: 277-287.
243. **Walberer, M., et al.** (2009) RNase therapy assessed by magnetic resonance imaging reduces cerebral edema and infarction size in acute stroke. *Curr. Neurovasc. Res.* 6: 12-19.
244. **Wang, G.L., et al.** (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 5510-5514.
245. **Warnecke, C., et al.** (2003) Activation of the hypoxia-inducible factor-pathway and stimulation of angiogenesis by application of prolyl hydroxylase inhibitors. *FASEB J.* 17: 1186-1188.
246. **Weickmann, J.L., E.M. Olson, and D.G. Glitz** (1984) Immunological assay of pancreatic ribonuclease in serum as an indicator of pancreatic cancer. *Cancer Res.* 44: 1682-1687.
247. **Wiechelman, K.J., R.D. Braun, and J.D. Fitzpatrick** (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* 175: 231-237.
248. **Wieczorek, A.J., C. Rhyner, and L.H. Block** (1985) Isolation and characterization of an RNA-proteolipid complex associated with the malignant state in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 3455-3459.
249. **Wojnar, R.J. and J.S. Roth** (1965) Ribonuclease inhibitor and latent ribonuclease in rat liver during feeding of 2-acetamidofluorene. *Cancer Res.* 25: 1913-1918.
250. **Wolf, P.** (1967) The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br. j. haematol.* 13: 269-288.

251. **Xiong, D., et al.** (2014) Down-regulating ribonuclease inhibitor enhances metastasis of bladder cancer cells through regulating epithelial-mesenchymal transition and ILK signaling pathway. *Exp. Mol. Pathol.* 96: 411-421.
252. **Yao, X., et al.** (2013) A novel role of ribonuclease inhibitor in regulation of epithelial-to-mesenchymal transition and ILK signaling pathway in bladder cancer cells. *Cell Tissue Res.* 353: 409-423.
253. **Yasuda, T., et al.** (1990) Purification and characterization of a ribonuclease from human spleen. Immunological and enzymological comparison with nonsecretory ribonuclease from human urine. *Eur. J. Biochem.* 191: 523-529.
254. **Ying, S. and G. Häcker** (2007) Apoptosis induced by direct triggering of mitochondrial apoptosis proceeds in the near-absence of some apoptotic markers. *Apoptosis.* 12: 2003-2011.
255. **Yuan-Hui Wu, P.-D.H., Guo-Zhi Aa, Xiang-Zhao Zhou** (2016) Detection of ribonuclease inhibitor (RI) expression in melanoma tissue and the regulating effect of overexpression RI on B16-F10 cell growth *in vivo* and *in vitro*. *J. Hainan Med. Univ.* 22: 1-4.
256. **Zampetaki, A., et al.** (2010) Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial MiR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circulation Res.* 107: 810-817.
257. **Zhang, J., K.D. Dyer, and H.F. Rosenberg** (2002) RNase 8, a novel RNase A superfamily ribonuclease expressed uniquely in placenta. *Nucleic Acids Res.* 30: 1169-1175.
258. **Zhang, J., K.D. Dyer, and H.F. Rosenberg** (2003) Human RNase 7: A new cationic ribonuclease of the RNase A superfamily. *Nucleic Acids Res.* 31: 602-607.
259. **Zheng, J.Y., et al.** (2008) The C-terminal transmembrane domain of Bcl-xL mediates changes in mitochondrial morphology. *Biophys. J.* 94: 286-297.
260. **Zhou, H.M. and D.J. Strydom** (1993) The amino acid sequence of human ribonuclease 4, a highly conserved ribonuclease that cleaves specifically on the 3' side of uridine. *Eur. J. Biochem.* 217: 401-410.
261. **Zhuang, X., et al.** (2016) Interplay between integrin-linked kinase and ribonuclease inhibitor affects growth and metastasis of bladder cancer through signaling ILK pathways. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 35: 130-144.
262. **Zimmerman SB, S.G.** (1965) A sensitive assay for pancreatic ribonuclease. *Anal. Biochem.* 10: 444-449.

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Lasch, M., E.C. Kleinert, S. Meister, K. Kumaraswami, J.-I. Buchheim, T. Grantzow, T. Lautz, S. Salpisti, S. Fischer, K. Troidl, I. Fleming, A. M. Randi, M. Sperandio, K. T. Preissner and E. Deindl (2019) Extracellular RNA released due to shear stress controls natural bypass growth by mediating mechanotransduction in mice. *Blood* 134: 1469-1479.

S. Salpisti, K.T. Preissner, S.Fischer, Institute of Biochemistry, Medical School, Justus-Liebig University Giessen, Germany (2016) Cellular release of ribonuclease inhibitor under inflammatory conditions. Poster im Rahmen des Kongresses ECCPS Retreat 2016 in Bad Nauheim

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

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

Ort, Datum

Unterschrift

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Klaus T. Preissner danke ich für die Überlassung dieses interessanten Themas, die Betreuung meiner Dissertationsarbeit und für die Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas.

Frau Dr. Silvia Fischer danke ich für die ständige Gesprächsbereitschaft, ihr stetes Interesse an meiner Arbeit und die hilfreichen Anregungen und Diskussionen.

Der gesamten Arbeitsgruppe des Rundlabors danke ich für die freundliche und freundschaftliche Atmosphäre im Labor und die hilfreichen Assistenzen. Vor allem danke ich Silke, die immer wieder viele Ideen und Anregungen geliefert hat.

Ganz besonders möchte ich mich bei Julia, Bärbel, Barbara, Susanne, Sabrina, Uwe und Dimi für die vielen nützlichen Ratschläge, sowie die kleinen und großen Hilfen bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Kanse und Wygrecka für ihre Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und die wichtigen Denkanstöße bedanken.

Ein herzliches Dankeschön gilt vor allem meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichen haben, mir stets zur Seite standen und mich in jeder Hinsicht tatkräftig unterstützt haben. Bei meinen Geschwister möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir immer wieder Mut gemacht haben.