

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Veränderungen im mRNA-Muster humaner Monozyten durch die Th2-Zytokine Interleukin-4/13

Frühere experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass die Th2-Zytokine Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-13 (IL-13) die Expression einer Reihe von Genen in peripheren humanen Monozyten regulieren [GRATCHEV *et al.*, 2001; HART *et al.*, 1989; HART *et al.*, 1990; CHEUNG *et al.*, 1990; DE WAAL MALEFYT *ET AL.*, 1993; BECKER und DANIEL, 1990; TE VELDE *ET AL.*, 1990; CONRAD *et al.*, 1992; NASSAR *et al.*, 1994]. Bereits in den frühen 90-iger Jahren des vergangenen Jahrhunderts konnte von mehreren Gruppen unabhängig voneinander gezeigt werden, dass IL-4/13 auch die Expression der 12/15-LOX drastisch hochreguliert [CONRAD *et al.*, 1992; NASSAR *et al.*, 1994]. Diese Ergebnisse wurden später in anderen experimentellen Modellen bestätigt [BRINCKMANN *et al.*, 1996; BRINCKMANN und KÜHN, 1997; SPANBROEK *et al.*, 2001]. Obwohl die derzeit verfügbaren Daten zur IL-4-induzierten Expressionsregulation mehrere Gene umfassen, ließen sich bisher noch keine eindeutigen Konsequenzen hinsichtlich der IL-4/13-induzierten funktionellen Veränderungen der Zellen ableiten. Um solche Schlussfolgerungen ziehen zu können, bedarf es zusätzlicher Informationen zur Expressionsregulation einer weitaus größeren Anzahl von Genen. Je mehr Gene in diese Untersuchungen einbezogen werden, desto sicherer können Voraussagen zu funktionellen Veränderungen getroffen werden. Um Expressionsprofile von unbehandelten und Zytokin-behandelten humanen Monozyten erstellen zu können, wurden Untersuchungen mit oligonukleotid-basierten Genchips der Firma Affymetrix durchgeführt. Die hier verwendeten Chips (*HG U133A Oligonukleotid Chip*) bestehen aus einem Glasträger, auf dem Oligonukleotide kovalent verankert sind, und mit denen die Expression von 22.284 Genen bzw. ESTs (*expressed sequence tags*) quantifiziert werden kann.

Für die geplanten Analysen wurde zunächst Gesamt-RNA aus den IL-4-behandelten, IL-13-behandelten und unbehandelten humanen Monozyten isoliert. Die verschiedenen mRNAs wurden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und dann gegen den Oligonukleotidchip hybridisiert. Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Oligonukleotid-Spots erlaubte anschließend Aussagen zur relativen Expressionshöhe unterschiedlicher Gene. Bei der Auswertung der Rohdaten wurden die Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Oligonukleotide auf die Fluoreszenz der GAPDH-Oligonukleotide bezogen und damit ein relatives (GAPDH-korrigiertes) Expressionsniveau für die einzelnen Gene er-

mittelt. Dabei wurde vorausgesetzt, dass die Expression der GAPDH durch die Stimulanzen (IL-4 und IL-13) nicht oder nur unwesentlich verändert wird.

Die durch Mikroarray-Analysen erhaltenen Daten betreffen in jedem Fall die Gleichgewichtskonzentrationen der entsprechenden mRNA-Spezies in den Zellen zum angegebenen Zeitpunkt. Aus diesen Daten lassen sich nicht automatisch Schlussfolgerungen hinsichtlich der Transkriptionsregulation der entsprechenden Gene ableiten, da die mRNA-Konzentrationen auch von der Kinetik mRNA-abbauender Prozesse abhängen. So kann z.B. die Konzentration einer mRNA erhöht sein, wenn abbauende Prozesse gehemmt wurden, ohne dass eine erhöhte Gentranskription vorliegt. Bei der im weiteren Verlauf der Arbeit vorgenommenen Interpretation der experimentellen Daten musste diese Tatsache immer berücksichtigt werden. Von den ca. 22.300 Genen, die auf dem Oligonukleotidchip vorhanden waren, wurden etwa 52% nicht bzw. nur auf sehr niedrigem Niveau exprimiert, unabhängig davon, ob die Zellen in Gegenwart oder in Abwesenheit von IL-4/13 kultiviert wurden. Unter den exprimierten Genen zeigten 93% keine differenzielle Expression, als die Expressionshöhen in Gegenwart und Abwesenheit von IL-4 verglichen wurden. Nur etwa 3% der exprimierten Gene (342 Gene) wurden durch IL-4 mehr als 2-fach hochreguliert, und etwa 4% (489 Gene) wurden mehr als 2-fach herunterreguliert. Dabei musste berücksichtigt werden, dass einige dieser „regulierten Gene“ auch im hochregulierten Zustand nur grenzwertig exprimiert wurden, so dass von einer funktionell bedeutsamen Expressionsregulation nur bedingt gesprochen werden kann. Ähnliches gilt für jene Gene, deren Expression nach IL-4-Stimulierung zwar formal herunterreguliert wurde (abnehmende Fluoreszenzintensitäten nach Zytokinstimulierung), die aber auch ohne Zytokineinfluss nur in geringem Maße exprimiert wurden. Dadurch verringerte sich die Anzahl jener Gene, die durch IL-4 funktionsrelevant reguliert werden, auf ca. 2,5% der exprimierten Gene. Diese Daten deuten darauf hin, dass IL-4 nicht zu einer globalen Veränderung der Genexpression führt, sondern selektiv eine Hoch- bzw. Herunterregulation bestimmter Gene induziert. Dieser selektive Charakter kommt auch dadurch zum Ausdruck, dass z.B. Th1-Zytokine (INF- $\gamma$ , TNF- $\beta$ ) die Expressionsregulation völlig anderer Gene beeinflussten als Th2-Zytokine (Daten nicht gezeigt).

In Tabelle 5 sind die acht in ihrer Expression am stärksten durch IL-4 hochregulierten Gene zusammengefasst. Es wird deutlich, dass die 15-LOX-1 der ausgeprägtesten Expressionsregulation unterliegt. Die Gleichgewichtskonzentration der entsprechenden mRNA wurde durch 72-stündige Inkubation von Monozyten in Gegenwart von IL-4 fast 300-fach erhöht. Danach folgten Fibronectin 1 (185-fache Hochregulation), der niedrig affine

Rezeptor für das Fc-Fragment des IgE (70-fache Hochregulation), CD1c (63-fache Hochregulation), die Monoaminoxidase-A (54-fache Hochregulation) und der Gerinnungsfaktor XIII-A (40-fache Hochregulation). IL-13 induzierte im Allgemeinen ähnliche regulatorische Effekte, jedoch war deren Ausmaß in den meisten Fällen geringer als beim IL-4.

Tabelle 5: Durch IL-4 am stärksten hochregulierte Genprodukte

Humane periphere Monozyten wurden präpariert und für 72 h in Gegenwart (10 ng/ml) bzw. Abwesenheit von IL-4 und IL-13 kultiviert. Die Gesamt-RNA wurde aus den Zellen präpariert und die relativen Expressionshöhen der einzelnen Genprodukte mittels Chip-Hybridisierung quantifiziert. Die GAPDH-korrigierten Fluoreszenzintensitäten sind in der Tabelle angegeben. In Klammern (Fett-druck) sind die relativen Veränderungen im Expressionsniveau (im Vergleich mit unbehandelten Monozyten) quantifiziert. Dabei bedeutet z.B. **(291)** eine 291-fache Hochregulation der Genexpression durch IL-4. Alle Zahlen sind auf- oder abgerundet.

Genname	Gen	Accession Nr.	Fluoreszenzintensität		
			-IL-4/13	+ IL-4	+ IL-13
15-Lipoxygenase	<i>ALOX15</i>	NM_001140	40	11.770 <b>(291)</b>	877 <b>(22)</b>
Fibronectin 1	<i>FN1</i>	BC005858	51	9.436 <b>(185)</b>	3.158 <b>(62)</b>
CD23A ( <i>low affinity Fc-receptor for IgE</i> )	<i>FCER2</i>	NM_002002	123	8.511 <b>(69)</b>	7.455 <b>(61)</b>
CD1c	<i>CD1C</i>	NM_001765	48	2.973 <b>(63)</b>	1.411 <b>(30)</b>
Monoaminoxidase A	<i>MAOA</i>	NM_000240	38	2.070 <b>(55)</b>	219 <b>(6)</b>
Gerinnungsfaktor XIII, A1	<i>F13A1</i>	NM_000129	1.172	47.012 <b>(40)</b>	5.506 <b>(5)</b>
CD20L1 ( <i>Membrane-Spanning 4-domains, subfamily A-4</i> )	<i>MS4A4A</i>	NM_024021	799	18.164 <b>(23)</b>	2.600 <b>(3)</b>
Chemokin (C-C-Motiv), Ligand 22	<i>CCL22</i>	NM_002990	1.657	29.696 <b>(18)</b>	14.428 <b>(9)</b>

Aus Tabelle 5 wird weiterhin deutlich, dass die fünf am stärksten hochregulierten Genprodukte (15-LOX-1, FN1, CD23a, CD1c, MAO-A) in unstimulierten Monozyten praktisch nicht exprimiert werden. Lediglich geringe Expressionshöhen wurden für FXIII-A, MS4A4A und CCL22 nachgewiesen. Die geringen Gleichgewichtskonzentrationen der entsprechenden mRNAs wurden auch bei semi-quantitativen RT-PCR-Analysen deutlich (Abbildung 10). Für alle genannten Genprodukte (Tafel A) konnten unter den experimentellen Bedingungen keine PCR-Signale nachgewiesen werden. In Gegensatz dazu erschienen nach Zytokinstimulierung für alle Genprodukte deutliche PCR-Banden. Die chemische Identität der PCR-Produkte

wurde generell durch Vergleich der Molekulargewichte und durch Nukleinsäuresequenzierung sichergestellt.

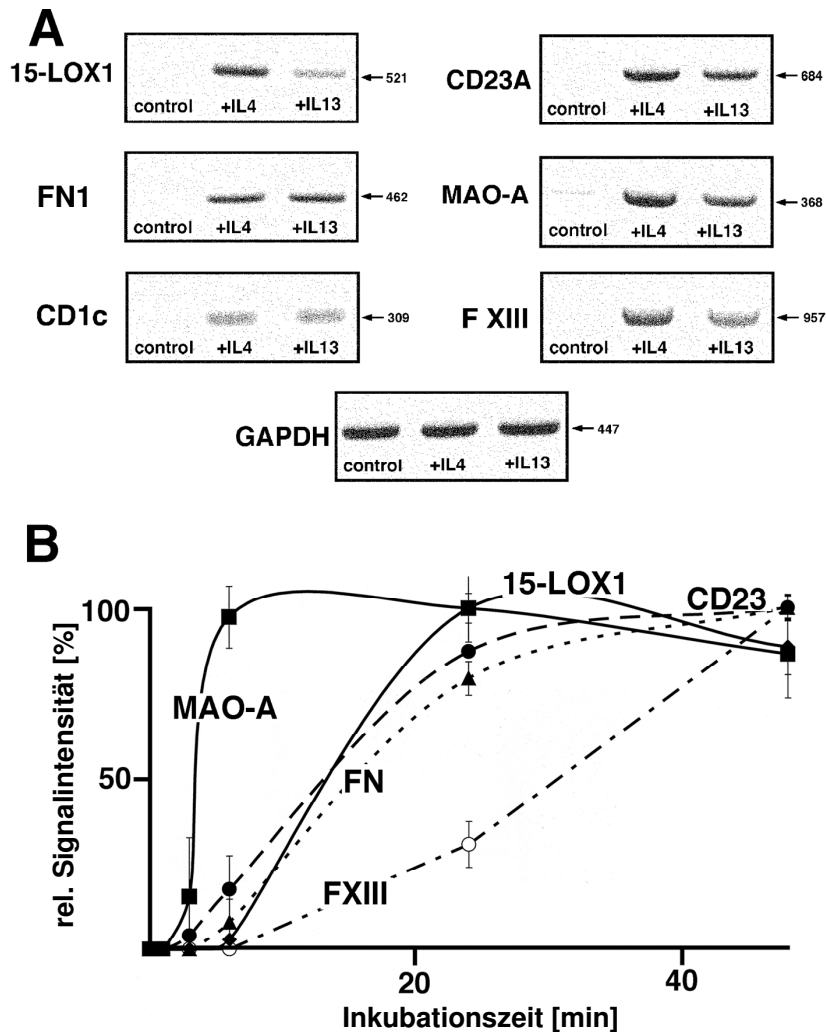


Abbildung 10: Semi-quantitative RT-PCR der am stärksten hochregulierten Genprodukte  
Humane periphere Monozyten wurden präpariert und für 72 h in Gegenwart (10 ng/ml) bzw. Abwesenheit von IL-4 und IL-13 kultiviert (siehe Material und Methoden). Die Gesamt-RNA wurde isoliert und die relativen Expressionshöhen der einzelnen Genprodukte mittels semi-quantitativer RT-PCR analysiert. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 4 spezifiziert. Entsprechende Experimente wurden mit drei verschiedenen Monozytenpräparationen durchgeführt und ein repräsentativer Datensatz wird hier gezeigt. A) Semi-quantitative RT-PCR, B) Zeitabhängigkeit der Expressionsregulation.

In Tafel B der Abbildung 10 sind die Ergebnisse zur Zeitabhängigkeit der Expressionsregulation zusammengefasst. Die Kinetiken zeigen, dass die Gleichgewichtskonzentration der MAO-A-mRNA bereits nach kurzer Stimulierung der Zellen mit IL-4 ansteigt. Für die 15-LOX-1, FN1 und CD23 war hingegen erst nach 24 h ein deutlicher Anstieg der mRNA nachweisbar. Für FXIII-A konnte die maximale mRNA Konzentration erst nach 48 h erreicht

werden. Längere Inkubationszeiten der Zellen mit IL-4 führten nicht zu einem weiteren Anstieg der mRNA Konzentration.

In Tabelle 6 sind die acht in ihrer Expression am stärksten durch IL-4 herunterregulierten Genprodukte zusammenfasst.

Tabelle 6: Durch IL-4 am stärksten herunterregulierte Genprodukte

Humane periphere Monozyten wurden präpariert und für 72 h in Gegenwart (10 ng/ml) bzw. Abwesenheit von IL-4 und IL-13 kultiviert. Die Gesamt-RNA wurde aus den Zellen präpariert und die relativen Expressionshöhen der einzelnen Genprodukte mittels Chip-Hybridisierung quantifiziert. Die GAPDH-korrigierten Fluoreszenzintensitäten sind in der Tabelle angegeben. In Klammern (Fettdruck) sind die relativen Veränderungen im Expressionsniveau (im Vergleich mit unbehandelten Monozyten) quantifiziert. Dabei bedeutet z.B. **(-99)** eine 99-fache Herunterregulation der Genexpression durch IL-4. Bei einigen Genprodukten kam es nach IL-13 Stimulierung zu einer leichten Hochregulation der Expression. Diese Daten sind mit + gekennzeichnet. Alle Zahlen sind auf- oder abgerundet.

Genname	Gen	Accession Nr.	Fluoreszenzintensität		
			-IL-4/13	+IL-4	+IL-13
Interferon-induzierbares Protein 44-like	<i>IFI44L</i>	NM_006820	3.499	36 <b>(-99)</b>	2.473 <b>(-1,4)</b>
CD 169 (Sialoadhesin)	<i>SN</i>	NM_023068	2.018	46 <b>(-44)</b>	634 <b>(-3,2)</b>
<i>Calmegin</i>	<i>CLGN</i>	NM_004362	758	26 <b>(-29)</b>	152 <b>(-5,0)</b>
<i>Orosomucoid 1</i>	<i>ORM1</i>	NM_000607	2.491	110 <b>(-23)</b>	517 <b>(-4,8)</b>
<i>Complement component 1, s subcomponent</i>	<i>C1S</i>	M18767	3.293	149 <b>(-22)</b>	2.081 <b>(-1,6)</b>
Indolamin-pyrrol-2,3-Dioxygenase	<i>INDO</i>	M34455	73.985	4.829 <b>(-15)</b>	55.163 <b>(-1,3)</b>
Interferon stimuliertes 20 kDa-Gen	<i>ISG20</i>	NM_002201	929	64 <b>(-15)</b>	1.305 <b>(+1,4)</b>
<i>Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J-15</i>	<i>KCNJ15</i>	U73191	1.089	87 <b>(-13)</b>	311 <b>(-3,5)</b>

Es wird deutlich, dass die Expression eines bisher unbekanntes Proteins, das große strukturelle Ähnlichkeit mit dem Interferon-induzierten Protein 44 hat, am deutlichsten herunterreguliert ist. Die Gleichgewichtskonzentration der entsprechenden mRNA wurde durch 72-stündige Inkubation von Monozyten in Gegenwart von IL-4 fast 100-fach herabgesetzt. Danach folgten Sialoadhesin (44-fache Herunterregulation), *Calmegin* (29-fache Herunterregulation) und *Orosomucoid 1* (23-fache Herunterregulation). IL-13 induziert bei den meisten Genen einen ähnlichen regulatorischen Effekt, wobei auch hier das Ausmaß geringer war als beim IL-4. Bei einigen Genprodukten (z.B. *interferon-stimulated gene 20kDa*) wurde

allerdings eine geringfügig gegenläufige Regulation beobachtet. Aus Tabelle 6 wird weiterhin deutlich, dass die meisten der aufgelisteten Genprodukte in stimulierten Monozyten praktisch nicht exprimiert wurden. Eine Ausnahme bildete lediglich die Indolamin-pyrrol-2,3-Dioxygenase. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Expression dieser Gene durch IL-4 komplett abgeschaltet wird, während es sich bei der Indolamin-pyrrol-2,3-Dioxygenase um eine graduelle Herunterregulation handelt.

### 3.2. Veränderungen im Protein-Expressionsmuster humaner Monozyten durch die Th2-Zytokine Interleukin-4/13

Um herauszufinden, ob die Hochregulation der Expression ausgewählter Genprodukte nicht nur auf der mRNA-, sondern auch auf der Protein-Ebene nachweisbar ist, wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Aus Abbildung 11 ist ersichtlich, dass Stimulierung von Monozyten mit IL-4 zu einer spezifischen Anfärbung der Zellen mit den Antikörpern gegen die 15-LOX-1, die MAO-A und den Gerinnungsfaktor XIII-A führte.

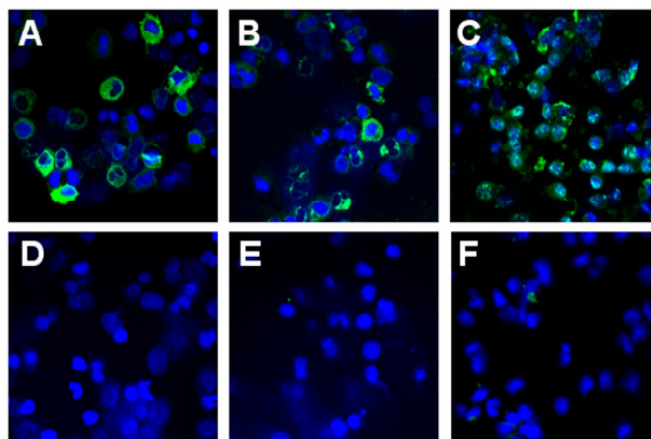


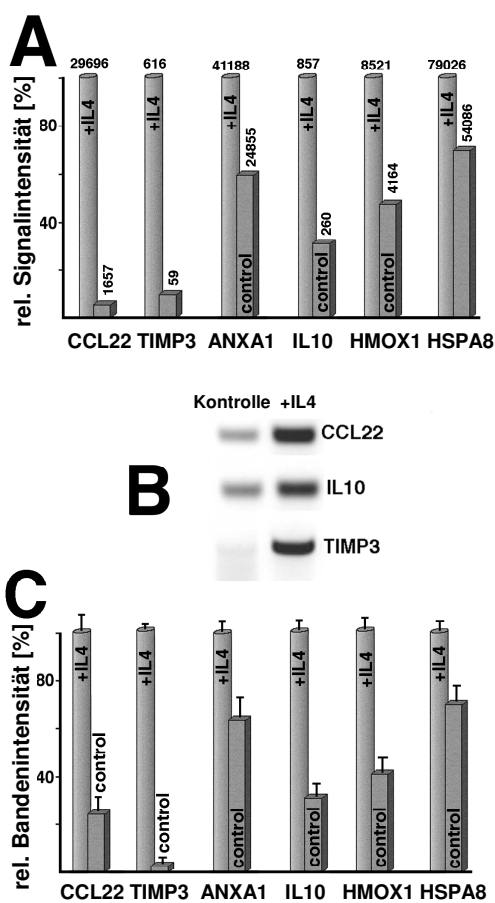
Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung von 15-LOX-1, MAO-A und Faktor XIII-A. Humane periphere Blutmonozyten wurden für 3 Tage in Anwesenheit von humanem IL-4 (10 ng/ml) kultiviert und danach immunhistochemisch angefärbt (siehe Material und Methoden). *Tafel A*: IL-4-behandelte Zellen angefärbt mit einem anti-15-LOX Antikörper. *Tafel B*: IL-4-behandelte Zellen angefärbt mit einem anti-MAO-A Antikörper. *Tafel C*: IL-4-behandelte Zellen angefärbt mit einem anti-FXIII-A Antikörper. *Tafeln D-F*, Kontrollfärbungen (keine Stimulierung der Zellen mit IL-4). Die spezifische Färbung des Antigens wird in Grün gezeigt, während die Zellkerne blau gefärbt sind. Die Teilabbildungen stellen eine Überlagerung der spezifischen Antikörperfärbungen und der Kernfärbungen dar.

Damit kann zumindest für diese drei getesteten Proteine festgestellt werden, dass sich die IL-4-abhängige Expressionsregulation nicht nur auf die mRNA beschränkt, sondern auch auf dem Proteinniveau nachweisbar ist.

### 3.3. IL-4-induzierte Hochregulation der Expression anti-inflammatorischer Gene

Pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-18, TNF $\alpha$  oder MCP-1 induzieren gewöhnlich eine klassische Aktivierung von Monozyten und damit einen pro-inflammatorischen Phänotyp der Zellen [DUFFIELD, 2003]. Im Gegensatz dazu scheinen die alternativen Aktivatoren TGF- $\beta$ , IL-10 und Glukokortikoide Monozyten einen anti-inflammatorischen Phänotyp zu verleihen [DUFFIELD, 2003]. Die Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 sind ebenfalls alternative Aktivatoren von Monozyten [DUFFIELD, 2003; GOERDT und ORFANOS, 1999; MADERNA und GODSON, 2003] und ihre Wirkung auf periphere native Monozyten induziert eine Herunterregulation der Expression pro-inflammatorischer Signalmoleküle. Weiterhin wird das Expressionsmuster von CD-Oberflächenantigenen verändert und es kommt zur verstärkten Expression von extrazellulären Matrixproteinen [GRATCHEV *et al.*, 2001].

Um die bisher verfügbaren Informationen zur IL-4/13-induzierten Expressionsregulation und die Mikroarray-Daten in ein einheitliches Konzept zur Rolle von IL-4/13 bei der Entzündungsreaktion zu integrieren, wurde die IL-4/13-induzierte Expressionsregulation mehrerer pro- und anti-inflammatorischer Genprodukte gezielt untersucht. Dabei wurde beobachtet,



dass IL-4/13 die Expression von klassischen pro-inflammatorischen Genen herunterreguliert, während anti-inflammatorische Gene verstärkt exprimiert wurden. Entsprechende Ergebnisse wurden sowohl von den Mikroarray-Untersuchungen, als auch von der semi-quantitativen RT-PCR (Abbildung 12 und Abbildung 13) erhalten.

Abbildung 12: Hochregulation anti-inflammatorischer Gene durch Interleukin-4

Humane periphere Monozyten wurden präpariert und für 72 h in Gegenwart (10 ng/ml) bzw. Abwesenheit von IL-4 und IL-13 kultiviert (siehe Material und Methoden). Die Gesamt-RNA wurde isoliert und die relativen Expressionshöhen der einzelnen Genprodukte mittels Chip-Hybridisierung und semi-quantitativer RT-PCR analysiert. A) Quantifizierung der Mikroarraysignale B und C) Semi-quantitative RT-PCR (ausgewählte Beispiele in B).

### 3.4. IL-4-induzierte Herunterregulation der Expression pro-inflammatorischer Gene

Traditionell wurden Interleukine in pro- bzw. anti-inflammatorische Vertreter unterteilt. Diese Klassifizierung ist jedoch stark vereinfachend, da die Wirkung eines gegebenen Interleukins in jeden Fall vom verwendeten Testsystem, vom zellulären Modell und von der Zytokinkonzentration abhängt [CAVAILLON, 2001]. Für eine Groborientierung ist diese einfache Klassifizierung jedoch durchaus brauchbar.

Die Interleukine 1, 6, 8 und 18 zählen zu den klassischen pro-inflammatorischen Zytokinen, da sie in den meisten Zielzellen eine Hochregulation der Expression pro-inflammatorischer Gene induzieren und die Expression von Akutphasenproteinen verursachen [CAVAILLON, 2001]. Unter unseren experimentellen Bedingungen wurde die Expression dieser klassischen pro-inflammatorischen Entzündungsmediatoren in IL-4/IL-13-behandelten Monozyten herunterreguliert. Diese Ergebnisse wurden sowohl in den Mikroarray-Untersuchungen (Abbildung 13), als auch durch die semi-quantitative RT-PCR erhalten. Die Herunterregulation pro-inflammatorischer Zytokine passt sich weitgehend in das Gesamtbild das durch IL-4/13 veränderten Genexpressionsmuster ein, welches einen anti-inflammatorischen Phänotyp der mit IL-4-behandelten Monozyten vorhersagt.

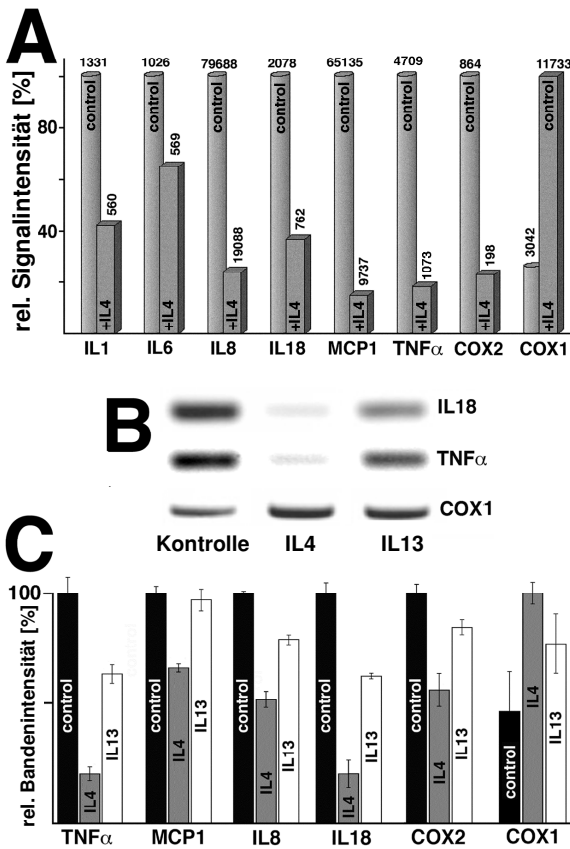


Abbildung 13: Herunterregulation pro-inflammatorischer Gene durch Interleukin-4/13

Humane periphere Monozyten wurden präpariert und für 72 h in Gegenwart (10 ng/ml) bzw. Abwesenheit von IL-4 bzw. IL-13 kultiviert (siehe Material und Methoden). Die Gesamt-RNA wurde isoliert und die relativen Expressionshöhen der einzelnen Genprodukte mittels Chip-Hybridisierung und semi-quantitativer RT-PCR analysiert. A) Quantifizierung der Mikroarraysignale B und C) Semi-quantitative RT-PCR (ausgewählte Beispiele in B).



Im Diskussionsteil werden diejenigen pro-inflammatorischen Proteine, die in ihrer Expression eine deutliche Veränderung nach IL-4-Stimulierung der Zellen aufwiesen näher charakterisiert. Es soll jedoch an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass nicht alle potenziell pro-inflammatorischen Genprodukte in Monozyten exprimiert werden und auch nicht in jedem Fall eine Herunterregulation der Expression zu beobachten war.

### 3.4.1. Herunterregulation von Enzymen der Leukotrienbiosynthese

Leukotriene sind pro-inflammatorische Eikosanoide, die über den LOX-Weg der Arachidonsäure-Kaskade synthetisiert werden. Leukotrien B<sub>4</sub> ist einer der wirksamsten Entzündungsmediatoren und wirkt vor allem auf neutrophile Granulozyten. Es besitzt auch starke chemotaktische Wirkung auf andere Entzündungszellen [SAMUELSSON *et al.*, 1987; FUNK, 2001].

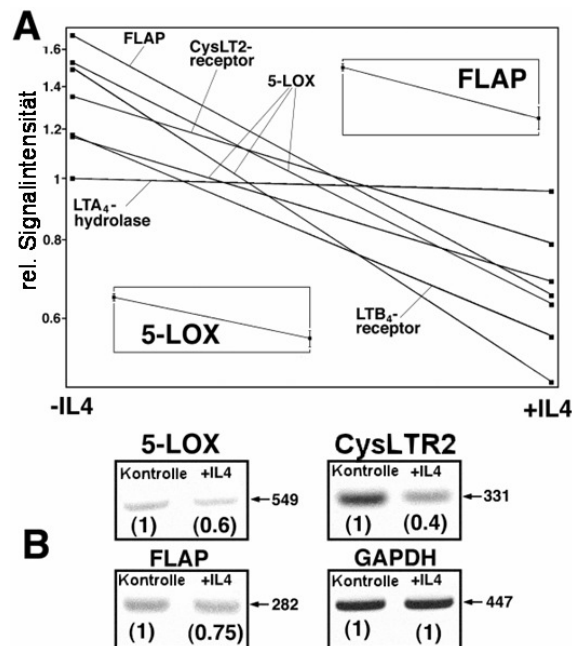


Abbildung 14: Herunterregulation von Enzymen der Leukotrienbiosynthese

Die Peptidoleukotriene LTC<sub>4</sub> und LTD<sub>4</sub> wirken als Vasokonstriktoren und vermitteln eine langanhaltende Kontraktion von Glattmuskelzellen, was besonders beim akuten Asthmaanfall bedeutsam ist. Leukotriene werden durch eine Kaskade enzymatischer Reaktionen vor allem in Entzündungszellen synthetisiert (siehe Einleitung). Die an der Leukotriensynthese beteiligten Enzyme sind auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert und zeigen häufig ähnliche Regulationsprinzipien. Das Initialenzym der Leukotriensynthese ist die 5-LOX, die freie Arachidonsäure zum linearen Fettsäurehydroperoxid 5-HpETE oxygeniert und auch die darauf folgende Umwandlung des 5-HpETE zum Epoxy leukotrien A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>) katalysiert. Dieses Enzym wird durch das 5-LOX-aktivierende Protein (FLAP) unterstützt, wobei die

molekulare Wirkung von FLAP noch nicht vollständig geklärt ist. Klar ist jedoch, dass die Leukotriensynthese in Abwesenheit von FLAP oder in Anwesenheit von FLAP-Antagonisten drastisch reduziert ist [PETERS-GOLDEN und BROCK, 2003].

Die Mikroarray-Daten zeigten, dass mehrere Enzyme, die an der Leukotriensynthese beteiligt sind (Abbildung 14 und Tabelle 11), durch IL-4 herunterreguliert wurden. Ein ähnliches Verhalten wurde auch für den Zysteinyleukotrien-Rezeptor 2 (CysLTR2) beobachtet. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die zelluläre Kapazität zur Produktion von pro-inflammatorischen Leukotrienen durch IL-4-Stimulierung abgesenkt wird. In der Tat konnten Aktivitätsmessungen der zellulären 5-LOX-Aktivität eine solche Herunterregulation nachweisen (Abbildung 15).

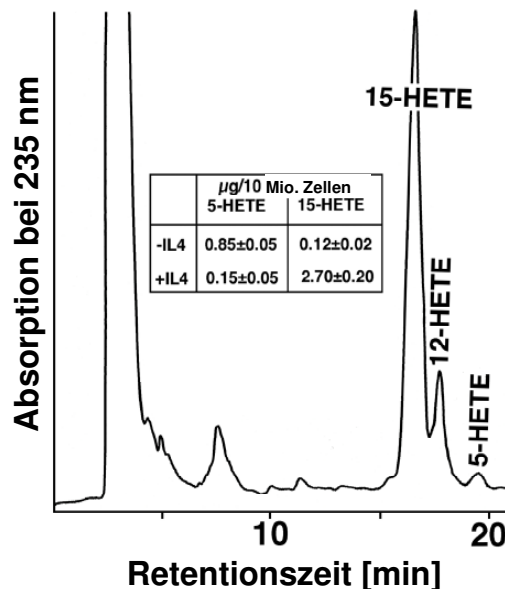


Abbildung 15: Inverse Regulation von 5- und 15-LOX-Aktivität in IL-4-behandelten Monozyten  
Humane periphere Monozyten wurden für 3 Tage in Anwesenheit von 10 ng/ml IL-4 kultiviert. Nach dem Ernten wurden die Zellen in PBS resuspendiert und Aktivitätsassays wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Eingefügte Tabelle: Quantifizierung der 5- und 15-HETE Bildung. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte einer zweifachen Aktivitätsbestimmung.

Die in Abbildung 15 gezeigten Daten belegen eine isoform-spezifische Regulation verschiedener LOXn als Teil der IL-4-induzierten Th2-Reaktion. Der starken Hochregulation der potenziell anti-inflammatorischen 15-LOX-1 (Tabelle 5) steht eine Herunterregulation der pro-inflammatorischen 5-LOX gegenüber (Abbildung 14). Eine ähnliche Situation wurde oben für die beiden COX-Isoformen beschrieben. Auch hier kam es zu einer Herunterregulation der pro-inflammatorischen COX-2, während die „physiologische COX-Isoform“ (COX-1) hochreguliert wurde. Diese gegenläufigen isoform-spezifischen Regulationsmechanismen stehen im Einklang mit den postulierten Phänotypveränderungen von Monozyten (IL-4 induziert einen anti-inflammatorischen Phänotyp).

### 3.5. Parallele Induktion von 15-LOX-1 und MAO-A nach Th2-Zytokinstimulierung

MAO-A und 15-LOX-1 sind Oxygenasen, die mit unterschiedlichen Substraten (Monoamine für die MAO-A, Polyenfettsäuren für die 15-LOX-1) unter Verwendung molekularen Sauerstoffs katalysieren. Die entsprechenden Gene sind auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert, und bislang bestanden keine Hinweise auf eine parallele Expressionsregulation der beiden Enzyme innerhalb der Th2-Antwort von Monozyten. Im Gegenteil, bislang wurde davon ausgegangen, dass die MAO-A zwar in verschiedenen peripheren Geweben und im Zentralnervensystem exprimiert wird, es lagen aber keine Hinweise für die Expression des Enzyms in Monozyten/Makrophagen vor.

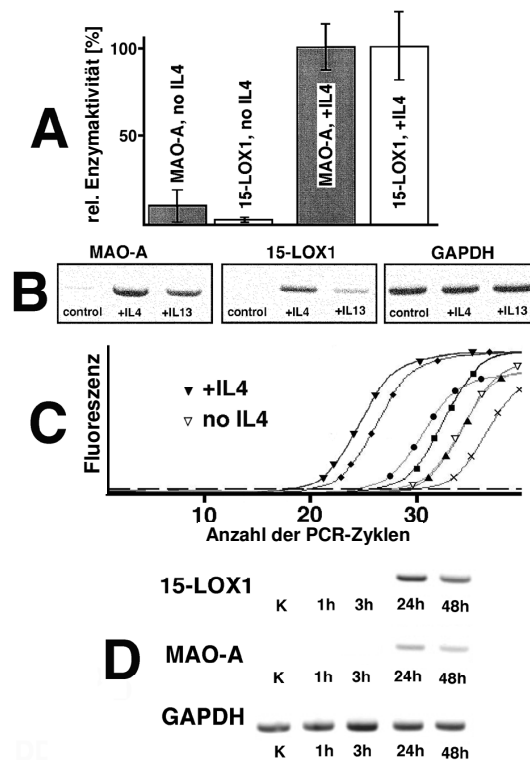


Abbildung 16: Parallele Expressionsregulation von 15-LOX-1 und MAO-A in IL-4-stimulierten Monozyten. Humane periphere Monozyten wurden präpariert und für 72 h in Gegenwart (10 ng/ml) bzw. Abwesenheit von IL-4 und IL-13 kultiviert (siehe Material und Methoden). Danach wurden die Zellen aufgeteilt und einerseits für Aktivitätsuntersuchungen andererseits für PCR-Analysen (semi-quantitativ bzw. Echtzeit) verwendet. Die methodischen Details für die Assay Systeme sind in Material und Methoden beschrieben. A) Aktivitätsassays, B) semiquantitative RT-PCR, C) Echtzeit-PCR für die MAO-A: ◆ -  $10^6$  Kopien, ● -  $2 \times 10^5$  Kopien, ■ -  $5 \times 10^4$  Kopien, ▲ -  $10^4$  Kopien, ✕ -  $2 \times 10^3$  Kopien an exogenem Standard. D) Kinetik der IL-4-Stimulierung von 15-LOX-1 und MAO-A analysiert durch semi-quantitative RT-PCR. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 4 (siehe 2.2.7.4) spezifiziert. Entsprechende Experimente wurden mit drei verschiedenen Monozytenpräparationen durchgeführt und ein repräsentativer Datensatz wird gezeigt.

Die Mikroarray-Untersuchungen (Tabelle 5) haben jedoch gezeigt, dass die Expression der MAO-A-mRNA in Monozyten durch IL-4 stark hochreguliert wird, und diese Befunde konnten auf der Proteinebene bestätigt werden (Abbildung 11). Zur besseren Quantifizierung dieses Induktionseffektes wurden Aktivitätsassays und weiterführende PCR-Untersuchungen

(Abbildung 16) durchgeführt. Dabei ergab sich, dass sowohl die Aktivitäten der 15-LOX-1 als auch die der MAO-A durch IL-4 stark hochreguliert wurden (Tafel A). In ruhenden Zellen konnten nur sehr geringe Aktivitäten beider Enzyme nachgewiesen werden.

Die semi-quantitative RT-PCR (Tafel B) zeigte deutliche Signale in IL-4/13-stimulierten Zellen, die die hohe Konzentrationen an 15-LOX-1- und MAO-A-mRNA widerspiegeln. Im Unterschied dazu, wurden keine PCR-Signale in unbehandelten Zellen erhalten.

Um das Ausmaß der Hochregulation der beiden mRNA-Spezies exakt zu quantifizieren, wurden Echtzeit-PCR-Analysen für die 15-LOX-1 und die MAO-A (Tafel C) durchgeführt. Die Amplifizierungskinetiken verschiedener Mengen an MAO-A-Standards ist in Tafel C gezeigt. Zusätzlich wurde die Amplifikation der endogenen MAO-A-mRNA in einer Probe von IL-4-behandelten und unbehandelten Monozyten kinetisch verfolgt. Die Amplifizierungskinetiken zeigten, dass in IL-4-behandelten Zellen ein PCR-Signal bei einer relativ kleinen Anzahl von Amplifizierungszyklen nachweisbar war. Im Gegensatz dazu, waren spezifische MAO-A-Signale erst bei deutlich erhöhten Zykluszahlen nachweisbar. Diese Daten belegen, dass die aktuelle Konzentration von MAO-A-Transkripten in IL-4-behandelten Monozyten deutlich größer war als in unbehandelten Zellen. Eine exakte Quantifizierung der erhaltenen Daten unter Verwendung der externen Standards zeigte, dass in Abwesenheit von IL-4, periphere Monozyten ca.  $2,2 \times 10^3$  Kopien der MAO-A-mRNA pro  $10^6$  Kopien der GAPDH enthielten. Nach IL-4-Stimulierung wurde ein entsprechendes Verhältnis von  $4,6 \times 10^6$  Kopien MAO-A-mRNA pro  $10^6$  Kopien GAPDH ermittelt, was einem Anstieg um das 2000-fache entsprach. Damit wurde die MAO-A in IL-4-behandelten Monozyten auf einem Niveau exprimiert, welches das der GAPDH überstieg. Für die 15-LOX-1 wurde sogar eine Steigerung auf das 6000-fache errechnet. Das hohe Ausmaß der Konzentrationsveränderungen ergibt sich jedoch aus der Tatsache, dass in den unbehandelten Zellen nahezu keine MAO-A- bzw. 15-LOX-1-mRNA vorhanden war. Zusammenfassend belegen die aufgeführten Daten, dass IL4 die Expression der beiden Enzyme anschaltet, die im Ruhezustand der Zellen praktisch nicht exprimiert werden.

Der zeitliche Verlauf der Induktion der beiden Enzyme nach einmaliger Stimulierung der Zellen mit IL-4 wurde mittels semi-quantitativer RT-PCR untersucht (Tafel D). Dabei zeigte sich eine parallele Expressionsregulation von 15-LOX-1 und MAO-A, die erst nach 24-stündiger Stimulierung ihr maximales PCR-Signal zeigte. Bei kürzeren Stimulierungszeiten konnte unter den angewandten Bedingungen, keine Induktion der beiden Enzyme nachgewiesen werden.

### 3.5.1. Untersuchungen zum Mechanismus der IL-4-induzierten MAO-A-Expression

Die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade, die zur Hochregulation der 15-LOX-1 führt, ist gut erforscht. Durch Untersuchungen mit Rezeptorantagonisten konnte gezeigt werden, dass ein funktionsfähiger IL-4/13-Rezeptor für die Induktion nötig ist. Durch Verwendung von *knockout*-Mäusen und andere Funktionsverlust-Techniken (*loss of function*) wurde die Rolle verschiedener Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) bei der Signalumwandlung bewiesen. Weiterhin scheint eine Histonazetylierung bei der Aktivierung des 15-LOX-1-Gens beteiligt zu sein. Im Gegensatz zum umfangreichen Wissen über die Expressionsregulation der 15-LOX-1 gab es bislang keine Kenntnisse zu den entsprechenden Mechanismen für die MAO-A.

#### 3.5.1.1. Promotorvergleich

Um herauszufinden, ob die Gene der 15-LOX-1 und der MAO-A in ihren 5'-flankierenden Regionen (potenzielle Promotorbereiche) STAT-sensitive *cis*-regulatorische Elemente enthalten, wurden zunächst vergleichende *in silico*-Analysen der beiden Promotoren durchgeführt. Bei dieser Suche wurden zunächst die verfügbaren Daten zur Funktionalität der verschiedenen Promotorelemente nicht berücksichtigt. Da bekannt war, dass die Signalumwandlungskaskade für die IL-4-abhängige Induktion der 15-LOX-1 eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT6 enthält, wurde vor allem auf das Vorkommen von *cis*-regulatorischen Sequenzen für die Bindung dieses Transkriptionsfaktors gesucht. Unter Verwendung des Suchprogramms *MatInspector* wurden mehrere potenzielle STAT-bindende Regionen in den 5'-flankierenden Regionen der Gene von 15-LOX-1 und MAO-A gefunden (Tabelle 7).

Bei dieser Suche handelte es sich um ein rein strukturelles Verfahren, bei dem keinerlei funktionelle Aspekte berücksichtigt wurden. Deshalb können auch keine Schlussfolgerungen hinsichtlich der Funktionalität der identifizierten *cis*-regulatorischen Sequenzen abgeleitet werden. Entsprechende Experimente bleiben weiterführenden Arbeiten vorbehalten, bei denen funktionelle Promotorstudien unter Verwendung unterschiedlicher Reportergenkonstrukte durchgeführt werden sollten.

Für das Gen der 15-LOX-1 fällt auf, dass die erste gefundene Sequenz mehr als 500 Basen stromaufwärts des Transkriptionsinitiationssignals lokalisiert ist. Dieser relative große räumliche Abstand deutet darauf hin, dass die Sequenzen außerhalb des basalen Promotors liegen und damit kaum Relevanz für die konstitutive Expression des Enzyms haben. Für die Induktion des Enzyms nach IL-4-Stimulierung könnten sie jedoch bedeutsam sein. Im 5'-flankierenden Bereich des *MAOA*-Gens hingegen wurden potenziell regulatorische Sequenzen

mit hohem Ähnlichkeitsfaktor im Bereich des basalen Promotors identifiziert (Tabelle 7).  
Diese Sequenzen könnten bereits für die konstitutive Expression des Enzyms bedeutsam sein.

Tabelle 7: *In silico*-Promotor-Analyse mit MatInspector Release professional 7.4  
Bezüglich des 15-LOX-1- und des MAO-A-Promotors auf STAT-regulatorische Sequenzen.  
STAT6-Bindungs-Stelle: TTC(N)<sub>4</sub>GAA und STAT-Bindungs-Stelle: TTC(N)<sub>3</sub>GAA

15-LOX-1						
Familie/Matrix	Opt.	Position	Str.	Core sim.	Matrix sim.	Sequenz
V\$STAT/STAT.01	0,87	514 - 532	(-)	1,000	0,882	tggcatttga <b>GGA</b> aggtag
V\$STAT/STAT6.01	0,84	747 - 765	(-)	1,000	0,933	atgtg <b>TCC</b> ccgaaacccc
V\$STAT/STAT6.01	0,84	748 - 766	(+)	1,000	0,915	ggggg <b>TCC</b> gggaaacaca
V\$STAT/STAT6.01	0,84	873 - 891	(-)	1,000	0,927	atgtg <b>TCC</b> ccagaaacccc
V\$STAT/STAT6.01	0,84	874 - 892	(+)	0,793	0,849	tgggg <b>TCT</b> gggaaacaca
V\$STAT/STAT6.01	0,84	969 - 987	(-)	0,793	0,911	ccggt <b>TCT</b> cagaaagtc
V\$STAT/STAT6.01	0,84	970 - 988	(+)	1,000	0,967	agact <b>TCC</b> tgaaaccg
MAO-A						
Familie/Matrix	Opt.	Position	Str.	Core sim.	Matrix sim.	Sequenz
V\$STAT/STAT.01	0,87	62 - 80	(+)	0,807	0,766	gggagttgat <b>AGA</b> agggtc
V\$STAT/STAT5.01	0,89	62 - 80	(-)	1,000	0,814	gacc <b>TCT</b> atcaactccc
V\$STAT/STAT6.01	0,84	104 - 122	(-)	0,793	0,734	gatcc <b>TCT</b> tttgatacc
V\$STAT/STAT5.01	0,89	323 - 341	(-)	1,000	0,703	ggagg <b>TCT</b> Tgtattgaac
V\$STAT/STAT6.01	0,84	327 - 345	(+)	0,862	0,720	cgggg <b>TCA</b> atacaagaac
V\$STAT/STAT6.01	0,84	439 - 457	(+)	0,793	0,742	acct <b>TACC</b> caataacatt
V\$STAT/STAT.01	0,87	685 - 703	(-)	0,807	0,744	aacctgagg <b>AGA</b> aggcag
V\$STAT/STAT6.01	0,84	754 - 772	(-)	0,793	0,745	actaa <b>TACC</b> cagggaatgc
V\$STAT/STAT6.01	0,84	755 - 773	(+)	0,758	0,730	ggcat <b>TCC</b> tgggtattag
V\$STAT/STAT1.01	0,77	941 - 959	(-)	0,746	0,700	tggagctca <b>GGAG</b> gcggc
V\$STAT/STAT.01	0,87	1274 - 1292	(-)	0,730	0,726	tcatgtttct <b>GGAG</b> cacgc
V\$STAT/STAT.01	0,87	1312 - 1330	(+)	1,000	0,774	aagggtcgc <b>GGA</b> gcaga
V\$STAT/STAT.01	0,87	1342 - 1360	(+)	0,807	0,777	gtgggtaccg <b>AGA</b> acagcc
V\$STAT/STAT5.01	0,89	1342 - 1360	(-)	1,000	0,791	ggctg <b>TCT</b> cggtaaccac
V\$STAT/STAT.01	0,87	1431 - 1449	(+)	1,000	0,708	aggcaggccg <b>GGA</b> aggcgg
V\$STAT/STAT.01	0,87	1589 - 1607	(-)	0,769	0,800	tagtttaac <b>TGAA</b> agcta
V\$STAT/STAT5.01	0,89	1589 - 1607	(+)	0,845	0,817	tagct <b>TCA</b> gttaaaccta
V\$STAT/STAT.01	0,87	1619 - 1637	(-)	1,000	0,703	gtgactta <b>GGA</b> gcaga
V\$STAT/STAT.01	0,87	1912 - 1930	(+)	0,730	0,745	gtcactggg <b>GGAG</b> accag

### 3.5.1.2. Überexpression der 15-LOX-1 führt zur Hochregulation der MAO-A-Expression

Die Parallelität der IL-4-induzierten Expressionskinetik der beiden Enzyme könnte u.a. damit erklärt werden, dass die Expression der 15-LOX-1 und deren zelluläre Aktivität zu einer Induktion der MAO-A-Expression führen bzw. umgekehrt. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden U937-Zellen mit 15-LOX-1 permanent transfiziert und die Expression der MOA-A durch RT-PCR und Aktivitätsassays quantifiziert. Dabei muss vorausgeschickt werden, dass U937-Zellen weder 15-LOX-1 noch MAO-A konstitutiv exprimieren und dass auch nach IL-4-Stimulierung keine 15-LOX-1-mRNA nachweisbar war.

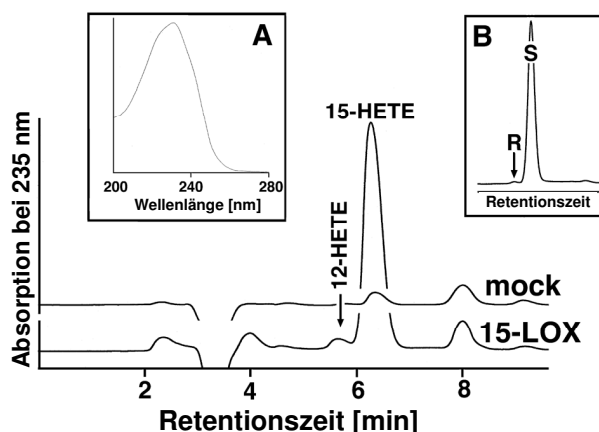


Abbildung 17: Aktivitätsassays von 15-LOX-1-transfizierten und *mock*-transfizierten U937-Zellen. U937-Zellen wurden mit 15-LOX-1 permanent transfiziert (siehe Material und Methoden) und zusammen mit entsprechenden Kontrolltransfektanten (*Mock*-Zellen) zur Messung der zellulären 15-LOX-1-Aktivität eingesetzt. Der Aktivitätsassay und die HPLC-Analytik werden im Kapitel Material und Methoden beschrieben. A) UV-Spektrum der 15-HETE B) Chiralphasen-HPLC-Analytik der 15-HETE

Um herauszufinden, ob durch die Transfektion eine enzymatisch aktive 15-LOX-1 in den Zellen exprimiert wird, wurden zunächst 15-LOX-1-Aktivitätsassays durchgeführt. Dazu wurden die Transfektanten und entsprechende Kontrollzellen (*Mock*-Transfektante) mit exogenem LOX-Substrat inkubiert und die dabei entstandenen 15-LOX-1 Produkte mittels HPLC analysiert (siehe Material und Methoden). Aus Abbildung 17 wird deutlich, dass die Kontrollzellen keine 15-LOX-1-Aktivität aufwiesen, während die 15-LOX-1-Transfektanten erwartungsgemäß große Mengen an 15-LOX-1-Produkten bilden. Eine quantitative Auswertung der Produktbildung und zusätzliche RT-PCR-Daten zeigten, dass das Expressionsniveau der 15-LOX-1 in den 15-LOX-1-Transfektanten ähnlich dem in IL-4-behandelten Monozyten war.

Nachdem gesichert war, dass die 15-LOX-1-transfizierten Zellen ein funktionelles Enzym exprimieren, wurde die MAO-A-Aktivität dieser Zellen gemessen. Aus Abbildung 18, Tafel A kann geschlussfolgert werden, dass die 15-LOX-1-transfizierten Zellen eine deutliche MAO-A-Aktivität aufwiesen. In Gegensatz dazu zeigten die entsprechenden *mock*-trans-

fizierten Zellen nur eine geringe basale enzymatische Aktivität. Ähnliche Schlussfolgerungen konnten aus den Ergebnissen der RT-PCR gezogen werden (Tafel B). Zusammenfassend scheinen diese Ergebnisse zu belegen, dass durch die 15-LOX-1 die Expression der MAO-A induziert wird.

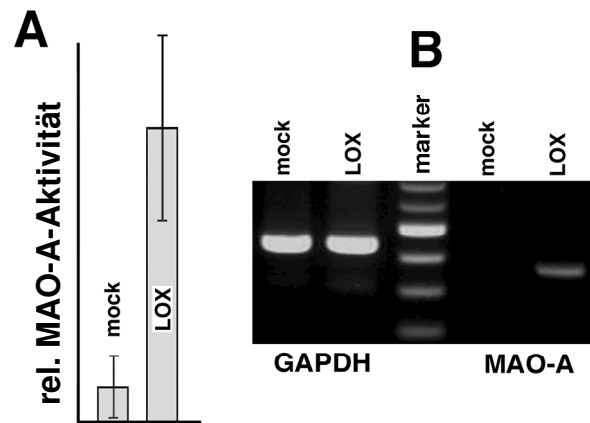


Abbildung 18: Induktion der MAO-A-Expression in U937-Zellen durch permanente Transfektion mit 15-LOX. U937-Zellen wurden mit 15-LOX permanent transfiziert (siehe Material und Methoden) und zusammen mit entsprechenden Kontrolltransfektanten (*Mock*-Zellen) für Aktivitätsassays und semi-quantitative RT-PCR vorbereitet. Die entsprechenden Analysemethoden sind im Kapitel Material und Methoden genauer beschrieben.

### 3.5.1.3. In U937-Zellen induziert IL-4 eine 15-LOX-1 unabhängige Hochregulation der MAO-A-Expression

Die Ergebnisse der Experimente mit der 15-LOX-1-transfizierten Zelllinie belegen, dass die Expression der 15-LOX-1 ausreicht, um die MAO-A zu induzieren. Allerdings deuteten Echtzeit-PCR-Untersuchungen darauf hin, dass keine so hohen Anstiegsraten der MAO-A-Expression gefunden wurden, wie sie für IL-4-behandelte Monozyten zutreffen. Daraus könnte geschlussfolgert werden, dass es eventuell einen IL-4-abhängigen Anteil an der MAO-A-Expressionsregulation gibt, der nicht auf die Induktion der 15-LOX-1 zurückzuführen ist. Um zu testen, ob U937-Zellen einen solchen 15-LOX-1-unabhängigen, aber IL-4-abhängigen Anteil an der MAO-A-Expression zeigen, wurden Wildtyp-U937-Zellen, 15-LOX-1-Transfektanten und die *Mock*-Transfektanten über 3 Tage unter An- bzw. Abwesenheit von IL-4 kultiviert und die Expression der MAO-A mittels RT-PCR quantifiziert. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 19 zusammengestellt. Wildtyp-U937-Zellen (rechte Seite des Bildes) exprimierten im Ruhezustand weder 15-LOX-1 noch MAO-A. Nach IL-4-Stimulierung konnte jedoch die Expression der MAO-A nachgewiesen werden. In der gleichen mRNA-Präparation war jedoch keine 15-LOX-1-mRNA nachweisbar (nicht gezeigt). Diese Daten deuten darauf hin, dass IL-4 in U937-Zellen eine 15-LOX-1-



unabhängige Expression der MAO-A induziert. Identische Ergebnisse wurden auch mit den *Mock*-Transfektanten erhalten (Bildmitte). Auch hier war eine Expression der 15-LOX-1 nicht nachweisbar. Die 15-LOX-1-transfizierten Zellen exprimierten sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von IL-4 die MAO-A (linke Bildseite). Da eine halbquantitative Abschätzung der Signalintensitäten keine Unterschiede der MAO-A-Bande von IL-4-behandelten und nichtbehandelten Zellen zeigte, scheinen der IL-4-abhängige und der 15-LOX-1-abhängige Effekt nicht additiv zu sein. Diese Schlussfolgerung muss allerdings mit Vorsicht gezogen werden, da eine exakte Quantifizierung der PCR-Produkte (Echtzeit-PCR) nicht durchgeführt wurde.

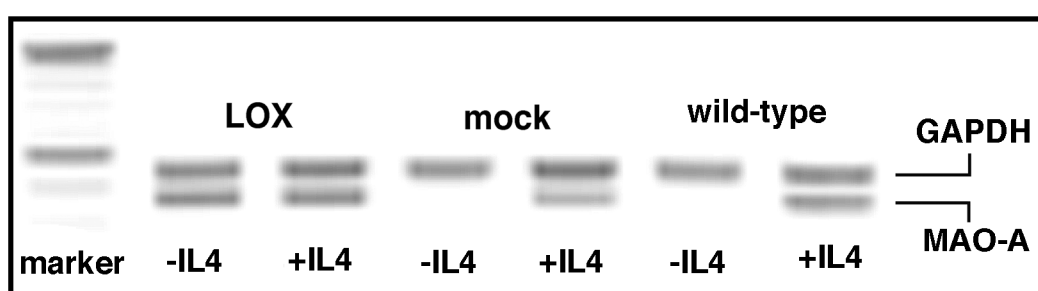


Abbildung 19: Induktion der MAO-A-Expression durch IL-4-Behandlung verschiedener U937-Zellen Wildtyp-U937-Zellen (rechts), Kontrolltransfektanten (Mitte) und 15-LOX-1-transfizierte U937-Zellen wurden mit IL-4 für 3 Tage inkubiert und die Expressionshöhe der MAO-A-mRNA durch semi-quantitative RT-PCR bestimmt. Die Analysenmethode und die verwendeten Primer sind im Kapitel Material und Methoden beschrieben.

#### 3.5.1.4. 15-LOX-1-Produkte und Wasserstoffperoxid induzieren die Expression der MAO-A

Die Hochregulation der MAO-A-Expression durch Transfektion von U937-Zellen mit 15-LOX-1 deutet darauf hin, dass allein die Expression des Lipid-peroxidierenden Enzyms eine Induktion der MAO-A hervorruft. Über den molekularen Mechanismus für diesen Effekt gaben die Daten jedoch keine Auskunft. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Produkte der 15-LOX-1-Reaktion die MAO-A-Expression induzieren. Wenn dem so wäre, sollte die Inkubation von Wildtyp-U937-Zellen bzw. von *Mock*-Transfektanten mit 15-LOX-Produkten ebenfalls eine Hochregulation der MAO-A-Expression bewirken. Um diese Arbeitshypothese zu testen, wurden U937-Zellen mit verschiedenen Produkten der 15-LOX-1-Reaktion inkubiert und dann die MAO-A-Expression mittels RT-PCR analysiert. Als 15-LOX-1-Produkte wurden zunächst die Primärprodukte der 15-LOX-1-katalysierten Oxygenierung von Arachidonsäure (15*S*-HpETE) und der Linolsäure (13*S*-HpODE) ausgewählt. Aus Abbildung 20 (Tafel A) ist zu sehen, dass die beiden Produkte zu einer dosisabhängigen Hochregulation der MAO-A-Expression führten. Ähnliche Veränderungen waren auch für Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) nachweisbar, obwohl eine Verdopplung der Konzentration des Stimulators (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

keine zusätzlichen Effekte hervorrief. Wenn allerdings die Reduktionsprodukte der verwendeten Hydroperoxyfettsäuren (15S-HETE und 13S-HODE) als Stimulatoren eingesetzt wurden, konnten keine Veränderungen in der MAO-A-mRNA Gleichgewichtskonzentration nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

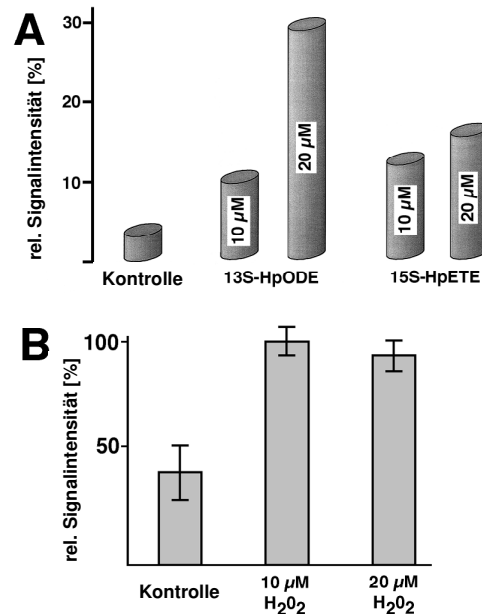


Abbildung 20: Induktion der MAO-A-Expression durch 15-LOX-1-Produkte und Wasserstoffperoxid Wildtyp-U937-Zellen wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von 15-LOX-1 Produkten (Tafel A) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tafel B) inkubiert und die Expressionshöhe der MAO-A-mRNA durch semi-quantitative RT-PCR bestimmt. Die Analysenmethode und die verwendeten Primer sind im Kapitel Material und Methoden beschrieben.

Aus den in Abbildung 20 dargestellten Daten kann geschlossen werden, dass die Hydroperoxygruppe essentiell für den Induktionseffekt ist. Da Hydroperoxide zu einer Erhöhung des zellulären Oxidationspotenzials führen, scheint der Redox-Status der Zelle für die Expression der MAO-A bedeutsam zu sein.

### 3.6. Einfluss der 15-LOX-Überexpression auf die Expression von HIV-Korezeptoren

In der Literatur gibt es nur vereinzelte Berichte darüber, ob und wie HIV-1-Infektion den Eikosanoidstoffwechsel infizierter T-Zellen beeinflusst. Weiterhin wurde berichtet, dass IL-13, welches in peripheren Monozyten zu einer Hochregulation der 15-LOX-1-Expression führt, die Expression verschiedener HIV-1-Rezeptoren herunterreguliert [BAILER *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 1998; WANG, J. *et al.*, 2001]. Obwohl diese Daten auf eine Verknüpfung von HIV-1-Infektion und Arachidonsäuremetabolismus hindeuten, gab es bisher keine gesicherten Erkenntnisse zu einer möglichen Rolle der 15-LOX-1-Expression in diesem Prozess. Um

diese Wissenslücke zu schließen, wurden orientierende Arbeiten zur Rolle der 15-LOX-1 bei der Expression von HIV-1-Rezeptoren durchgeführt.

### **3.6.1. Behandlung von humanen Monozyten mit IL-4 und GM-CSF induzieren eine Herunter-Regulation der Expression von HIV-1-Korezeptoren**

Eine nähere Untersuchung der Mikroarray-Daten von IL-4-behandelten Monozyten deutete darauf hin, dass die Expression des CXCR-Rezeptors 4 (CXCR4) durch IL-4 herunterreguliert wurde. Der  $\alpha$ -Chemokinrezeptor CXCR4, der  $\beta$ -Chemokinrezeptor CCR5 und CD4 stellen Korezeptoren für das HIV-1-Virus dar. *M-trophe* HIV-1 (R5-Viren) benutzen CCR5 und CD4 als Rezeptoren für die Zellinfektion, während *T-trophe* HIV-1 (X4-Viren) an CXCR4 und CD4 binden. Eine Herunterregulation der Expression einer dieser Rezeptoren könnte den Zellen eine Infektionsresistenz verleihen. Da die nach 3-tägiger Inkubation von Monozyten mit IL-4 beobachtete Herunterregulation von CXCR4 nicht sehr ausgeprägt war, wurde auf ein anderes Modell zurückgegriffen, um Untersuchungen zur Regulierbarkeit der HIV-Korezeptoren durchzuführen. Wenn periphere humane Monozyten für 7 Tage *in vitro* in Anwesenheit von IL-4 und GM-CSF kultiviert werden, differenzieren sie zu dendritischen Zellen.

Tabelle 8: Expression von HIV-1-Korezeptoren nach Stimulierung humaner Monozyten mit IL-4 und GM-CSF  
Humane periphere Monozyten wurden präpariert und für 72 h in Gegenwart bzw. Abwesenheit von IL-4 + GM-CSF (50 ng/ml und 100 ng/ml) kultiviert. Die Gesamt-RNA wurde aus den Zellen präpariert und die relativen Expressionshöhen der einzelnen Genprodukte mittels Echtzeit-PCR quantifiziert. Die Präparations- und Analysenmethoden sind im Abschnitt Material und Methoden genauer beschrieben. +92,7 bedeutet eine 92,7-fache Hochregulation der zellulären mRNA-Konzentration; -2,2 hingegen zeigt eine 2,2-fache Herunterregulation der zellulären mRNA-Konzentration an.

Protein	Anzahl an mRNA Kopien/ 10 <sup>6</sup> GAPDH-Kopien		Regulation
	- Zytokine	+ Zytokine	
15-LOX-1	7.317	678.598	+ 92,7-fach
CXCR4	517.462	236.046	- 2,2-fach
CCR5	268.613	160.181	- 1,7-fach
CD4	223.026	189.307	- 1,2-fach

Die Expression verschiedener HIV-1-Korezeptoren wurde mittels Echtzeit-PCR in IL-4+GM-CSF-behandelten Monozyten quantifiziert. IL-4+GM-CSF-behandelte Monozyten exprimierten die 15-LOX-1 auf einem vielfach höheren Niveau als entsprechende Kontrollzellen (Tabelle 8). Dieses Ergebnis war nicht überraschend, da es bereits bekannt war, dass IL-4 allein eine Hochregulation der Enzymexpression induziert.

Die Quantifizierung der HIV-1-Korezeptor-Expression zeigte im Gegensatz zur 15-LOX-1 eine deutliche Herunterregulation der Rezeptoren für R5-Viren (Bindung an CCR5 und CD4)

sowie X4-Viren (CXCR4 und CD4). Kritisch muss eingeschätzt werden, dass die beobachteten Effekte jedoch eher graduell waren und es nicht zu einer vollständigen Abschaltung der Rezeptorexpression kam. Ob die graduellen Unterschiede eine partielle Resistenz gegen HIV-1-Infektion vermitteln, kann derzeit nicht gesagt werden, da entsprechende funktionelle Experimente nicht durchgeführt wurden.

### 3.6.2. *Überexpression der 15-LOX-1 reduziert die Expression von HIV-1-Korezeptoren in U937-Zellen*

Die unter 3.6.1. beschriebenen Daten lassen auf die Möglichkeit schließen, dass die Expression der 15-LOX-1 für die Regulation der HIV-1-Korezeptorexpression bedeutsam sein könnte. Um diese Frage genauer zu prüfen, wurden die 15-LOX-1 exprimierende U937-Transfektante und die entsprechende *Mock*-Transfektante auf die Expression von HIV-1-Korezeptoren (CD4, CXCR4, CCR5) untersucht. Die mit Echtzeit-PCR erhaltenen Daten zur Expressionshöhe der entsprechenden mRNAs sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Expression von HIV-1-Korezeptoren in verschiedenen U937-Zellen  
Wildtyp-U937-Zellen, sowie 15-LOX-1 Transfektanten und die entsprechenden Kontrolltransfektanten wurden *in vitro* kultiviert. Nach Zellkonfluenz wurde Gesamt-RNA präpariert und die Gleichgewichtskonzentrationen der entsprechenden mRNAs mittels Echtzeit-PCR bestimmt. Die Präparations- und Analysenmethoden sind im Abschnitt Material und Methoden beschrieben. n.b. – nicht bestimmt

Rezeptor	Anzahl an mRNA Kopien/ 10 <sup>6</sup> GAPDH-Kopien		
	Wildtyp-U937-Zellen	<i>Mock</i> -Transfektante	15-LOX-Transfektante
CD4	206.125	219.538	18.026
CXCR4	456.161	446.206	26.148
CCR5	25.497	n.b.	n.b.

Diese Daten belegen, dass U937-Zellen große Mengen an CD4 und CXCR4 exprimieren, während die Gleichgewichtskonzentration der CCR5-mRNA um mindestens eine Größenordnung geringer ist. Damit ist zu vermuten, dass U937-Zellen vor allen durch HIV-1-X4-Stämme infiziert werden könnten. Deshalb wurden im weiteren Verlauf der Untersuchungen die Konzentrationen der CCR5-mRNA in den transfizierten Zellen nicht untersucht (n.b.). Die Expressionshöhen von CD4- und CXCR4-mRNA waren in Wildtyp-Zellen und in den *Mock*-Transfektanten nahezu identisch. Diese Daten belegen, dass eventuelle Veränderungen in den Expressionshöhen der relevanten Gene bei 15-LOX-1 transfizierten Zellen keine Transfektionsartefakte darstellten. Interessanterweise lagen die Expressionsniveaus von CD4- und CXCR4-mRNA bei den 15-LOX-1-transfizierten Zellen um mehr als eine Größen-

ordnung unter den entsprechenden Niveaus von *Mock*-Transfektanten bzw. Wildtypzellen. Diese Daten konnten durch semi-quantitative RT-PCR bestätigt werden (Abbildung 21).

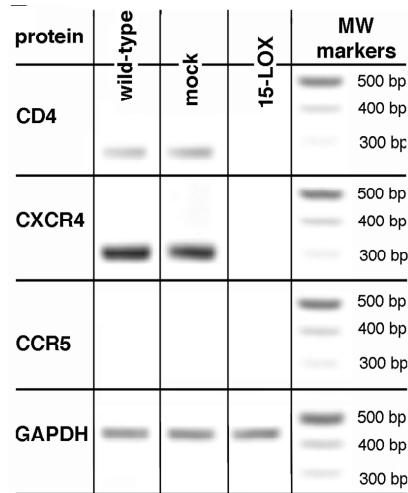


Abbildung 21: Expression von HIV-1-Korezeptoren in verschiedenen U937-Zellen (RT-PCR) Wildtyp-U937-Zellen, sowie 15-LOX-1 Transfektanten und die entsprechenden Kontrolltransfektanten wurde *in vitro* kultiviert. Gesamt-RNA wurde präpariert und Konzentrationen der entsprechenden mRNAs mittels semi-quantitativer RT-PCR bestimmt. Die Präparations- und Analysenmethoden sind im Abschnitt Material und Methoden beschrieben.

Um die durch PCR ermittelten Unterschiede auch auf dem Proteinniveau zu bestätigen wurden FACS-Analysen durchgeführt. Aus Abbildung 22 geht hervor, dass Wildtyp-Zellen und die *Mock*-Transfektanten große Mengen an CD4 und CXCR4 exprimierten.

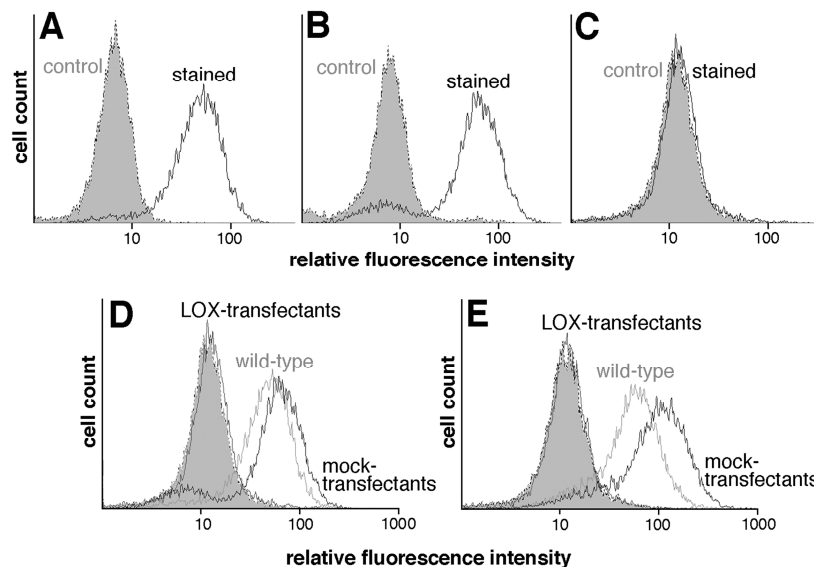


Abbildung 22: Expression der HIV-1-Rezeptoren in verschiedenen U937-Zellen (FACS-Analyse) Die FACS-Analysen wurde wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Die grauen Flächen zeigen Kontrollmessungen (Hintergrundfluoreszenz der Zellpräparationen ohne spezifisches Antiserum) an. Obere Abbildungen: Fluoreszenzmarkierung mit einem anti-CD4 Antikörper. (A) Wild-typ-U937-Zellen, (B) Mock-Transfektante, (C) 15-LOX-Transfektante. Untere Abbildung: Überlagerung der erhaltenen Histogramme (A-C) unter Verwendung eines CD4-Antikörpers (D) und eines CXCR4-Antikörpers (E) [CHAITIDIS und KÜHN, 2005].

Wildtyp-Zellen und die *Mock*-Transfektanten unterschieden sich nur wenig hinsichtlich der Menge der exprimierten Oberflächenproteine. Im Gegensatz dazu zeigten die 15-LOX-1-transfizierten Zellen eine deutlich reduzierte Expression von CD4 und CXCR4. Diese Daten beweisen, dass die auf mRNA-Ebene beobachtete Expressionsregulation sich auch auf Proteinebene widerspiegelt.

### 3.6.3. Veränderungen des Oxidations-Status von U937-Zellen regulieren die Expression von HIV-1-Korezeptoren

Die 15-LOX-1 ist ein oxidierendes Enzym und kann durch ihre intrazelluläre Aktivität das Oxidationspotenzial von Zellen erhöhen. Sollten diese Veränderungen für die 15-LOX-1-abhängige Expressionsregulation von CD4 und CXCR4 verantwortlich sein, müssten ähnliche Unterschiede bei U937-Zellen nachweisbar sein, die einem oxidativem Stress auf andere Weise ausgesetzt werden. Um diese Arbeitshypothese zu überprüfen wurden U937-Zellen zunächst für 24 h mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  inkubiert und die CD4- bzw. CXCR4-mRNAs mittels Echtzeit-PCR quantifiziert. Dabei wurde eine 75%-ige Reduktion der CD4-mRNA und eine 16%-ige Reduktion der CXCR4-mRNA beobachtet (Tabelle 10). Wenn das Oxidationspotenzial der 15-LOX-1-Transfektanten durch die Zugabe von 1 mM Pyrrolidindithiokarbamat (Antioxidanz) gesenkt wurde, konnten mit der Echtzeit-PCR eine 85%-ige Steigerung der CXCR4-Expression gezeigt werden

Tabelle 10: Expression von HIV-1-Korezeptoren in U937-Zellen nach Wasserstoffperoxid-Stimulierung Wildtyp-U937-Zellen wurde mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  in vitro kultiviert. Gesamt-RNA wurde präpariert und die Gleichgewichtskonzentrationen der entsprechenden mRNAs mittels Echtzeit-PCR bestimmt. Die Präparations- und Analysenmethoden sind im Abschnitt Material und Methoden beschrieben.

Rezeptor	Anzahl an mRNA-Kopien/ $10^6$ GAPDH-Kopien		Regulation
	U937-Zellen	U937-Zellen + 10 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	
CD4	84.470	21.438	-75%
CXCR4	23.490	19.627	-16%
CCR5	7.576	6.153	-19%

Diese Daten deuten darauf hin, dass CD4 und CXCR4 in ihrer Expression durch den zellulären Oxidationsstatus reguliert werden können. Ob an dieser Regulation darüber hinaus noch andere, eventuell spezifischere Mechanismen beteiligt sind, muss in fortführenden Untersuchungen geklärt werden. Da 15-LOX-1-Produkte als Koaktivatoren von nukleären Rezeptoren wie z.B. PPAR $\gamma$  (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor, gamma*) beschrieben worden sind [CHAWLA *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 1999], könnten PPAR $\gamma$ -abhängige Regulationsprozesse beteiligt sein.