

4. DISKUSSION

Zunächst sollen einige der verwendeten Methoden zur Transkriptomanalyse hinsichtlich ihres Prinzips sowie ihrer Vor- und Nachteile diskutiert werden. Anschließend werden wesentliche experimentelle Ergebnisse der Arbeit mit Blick auf ihre biologische Bedeutung besprochen.

4.1. Methoden der Transkriptomanalyse

Durch die komplette Sequenzierung des menschlichen Genoms wurde deutlich, dass der Mensch über 20.000 bis 25.000 Gene verfügt [CONSORTIUM, 2004], deren Expression gewebespezifisch räumlich und zeitlich differenziert reguliert wird. Damit kann davon ausgegangen werden, dass sowohl die Unterschiede zwischen verschiedenen Zellen (z.B. zwischen Leber und Muskelzelle) als auch der unterschiedliche Aktivitätszustand ein und derselben Zelle (z.B. ruhender und aktivierter Monozyt) vor allem auf die differenzielle Genexpression zurückzuführen sind. Die Genexpression und damit das Muster funktionsfähiger Proteine in einer Zelle zu einem gegebenen Zeitpunkt kann auf verschiedenen Stufen der Expressionskaskade reguliert werden. Dabei spielen transkriptionale (z.B. Aktivierung und Assemblierung von Transkriptionsfaktoren), post-transkriptionale (z.B. alternatives Spleißen, mRNA-Stabilität), translationale (Aktivierung und Assemblierung von Translationsfaktoren) und post-translationale (z.B. Phosphorylierung, Glykosylierung, limitierte Proteolyse u.a.) Regulationsmechanismen eine wesentliche Rolle. Die Charakterisierung des zellulären Transkriptoms (Gesamtheit der in einer Zelle bzw. in einem Gewebe vorkommenden mRNAs) liefert wesentliche Informationen über den Funktionszustand der Zellen. Deshalb ist es eine wichtige Aufgabe der modernen Zellphysiologie, den Zustand und die Veränderungen des Transkriptoms möglichst umfassend zu charakterisieren. Dafür steht eine Reihe von Methoden zur Verfügung, die im Weiteren kurz erläutert wird.

4.1.1. Northern-Blotting

Beim früheren Stand der Transkriptomanalyse wurden vor allem Methoden entwickelt, die den separaten Nachweis und die Quantifizierung einzelner mRNA-Spezies zum Ziel hatten. Eine der wichtigsten Methoden, die auch heute noch verbreitet angewandt wird, ist der Northern-Blot. Hierbei wird die Gesamtheit aller RNA-Spezies einer Zell- bzw. Gewebeprobe mittels Gelelektrophorese in seine Komponenten aufgetrennt. Danach werden die nach ihrem

Molekulargewicht aufgetrennten die RNA-Spezies mittels Elektroblotting auf eine spezielle Membran (meist Nitrozellulose oder Nylon) transferiert und mit spezifischen Sonden angefärbt [ALWINE *et al.*, 1979; THOMAS, 1980; LENNON und LEHRACH, 1991]. Die spezifische Färbung einer nachzuweisenden RNA-Spezies wird durch die Verwendung von markierten Sonden erreicht, deren Sequenz komplementär zu der RNA ist. Der Name Northern-Blot geht zurück auf die ältere Southern-Blot-Methode, die nach dem Biologen E. Southern benannt wurde. Bei dieser Methode werden statt RNA meist Restriktionsfragmente genomischer DNA analysiert. Northern-Blot Analysen sind semi-quantitativer Natur. Aus der Intensität der Färbung kann auf die zelluläre Konzentration der entsprechenden mRNA geschlossen werden. Für Standardisierungszwecke sollte immer eine entsprechende Kontrollsonde (meist GAPDH oder Aktin) mitgeführt werden, um die absoluten Messwerte korrigieren zu können.

4.1.2. Halbquantitative RT-PCR

Mit der Einführung der halbquantitativen RT-PCR wurde die Transkriptomanalytik wesentlich vereinfacht. Gleichzeitig trat die Bedeutung des Northern-Blottings zunehmend in den Hintergrund. Bei der RT-PCR [KLEPPE *et al.*, 1971; MULLIS *et al.*, 1986] werden zunächst alle in einer Zelle befindlichen mRNA-Spezies durch eine reverse Transkription in die entsprechenden cDNAs umgewandelt. Danach kann durch Auswahl spezifischer Primer gezielt eine cDNA amplifiziert und mittels Agarosegelelektrophorese quantifiziert werden. Dazu werden die Elektropherogramme densitometrisch ausgewertet und die Intensitäten der Bande des relevanten Gens zur Bandenintensität eines Bezugsgens (GAPDH bzw. β -Aktin) ins Verhältnis gesetzt. Diese Art der Quantifizierung ist jedoch nicht sehr genau (halbquantitative Aussage), da die Bandenintensität nicht streng exponentiell mit der Templatekonzentration ansteigt. Um eine exakte Quantifizierung zu erreichen, muss die PCR so gestaltet werden, dass sich die Amplifizierungsraten des relevanten Gens und des Kontrollgens im exponentiellen Bereich bewegen. Dazu ist es nötig, den Amplifizierungsprozess kinetisch verfolgen zu können (siehe 4.1.5. Echtzeit-PCR). Ähnlich wie der Northern-Blot ist auch die RT-PCR gen-spezifisch. Mit einem ausgewählten Primerpaar kann folglich nur die Expression eines einzigen Gens verfolgt werden. Um Expressionsanalysen verschiedener Gene simultan durchführen zu können, müssen verschiedene Primerpaare ausgewählt werden. Beim Northern-Blot sind dementsprechend mehrere Sonden nötig. Für die RT-PCR ist es jedoch möglich, ein und dieselbe RNA-Präparation als Matrix für multiple Amplifizierungsreaktionen zu benutzen, wenn entsprechend viele Primerpaare zur Verfügung stehen. Für den Northern-Blot werden dementsprechend mehrere Sonden benötigt.

4.1.3. „*Differential display*“

Wie oben besprochen, haben Northern-Blot und RT-PCR den großen Nachteil, dass mit diesen Methoden nur jeweils eine bestimmte mRNA quantifiziert werden kann. Will man simultan Informationen über die Expression unterschiedlicher Gene erhalten, müssen gleichzeitig mehrere Northern-Blots bzw. RT-PCRs durchgeführt werden, wobei jeweils gen-spezifische Sonden bzw. Primer verwendet werden müssen.

Durch die Entwicklung der *Differential-Display*-Methode war es möglich, die Expression einer Vielzahl von Genen simultan zu untersuchen. Beim *Differential Display* handelt es sich um eine PCR-basierte Methode, bei der unter Verwendung unspezifischer Primer eine Vielzahl von mRNA-Spezies amplifiziert werden [LIANG und PARDEE, 1992].

Die *Differential Display*-Methode dient zur Identifizierung von Genen, die in einem bestimmten Organismus oder Gewebe stärker oder schwächer als im entsprechenden Vergleichs-Organismus oder -Gewebe exprimiert werden. Hierfür werden zufällig gewählte Fragmente von cDNA-Molekülen über eine PCR vervielfältigt und anschließend über Gelelektrophorese aufgetrennt. Expressionsunterschiede in den zu vergleichenden Proben führen zu einem differenziellen Bandenmuster im denaturierenden Polyakrylamidgel. Die differenziellen Sequenzen können dann isoliert und sequenziert werden.

Diese Methode ist jedoch sehr arbeitsintensiv, schwer quantifizierbar und birgt die Gefahr in sich, dass einige mRNA-Spezies nicht amplifiziert werden. Damit ist der Anteil falsch negativer Ergebnisse relativ hoch.

4.1.4. *Mikroarray-Technologie*

4.1.4.1. *Prinzip der Mikroarray-Technologie und Charakteristik des verwendeten Genchips*

Als Alternative zum *Differential Display* wurde die Mikroarray-Technologie entwickelt. Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine Hybridisierungsmethode, bei der die Gesamtheit zellulärer mRNA-Spezies (zelluläres Transkriptom) auf ein Sortiment von immobilisierten Oligonukleotiden gegeben wird. RNA-Spezies, die mit passenden Oligonukleotiden hybridisieren, bleiben an der Chipmatrix gebunden und sind bei der Auswertung als fluoreszierende Punkte nachweisbar. Die Intensität der Fluoreszenz ist dabei ein Maß für die RNA-Menge. Bevor jedoch die Hybridisierung durchgeführt werden kann, müssen die RNA-Spezies mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Die Markierungsprozedur ist eines der Schlüsselprobleme der Mikroarray-Technologie, da eine zu geringe Fluoreszenzmarkierung keine hochwertigen Daten zulässt. Deshalb muss unbedingt die Intensität der RNA-Markierung vor der eigentlichen Hybridisierungsreaktion gemessen werden.

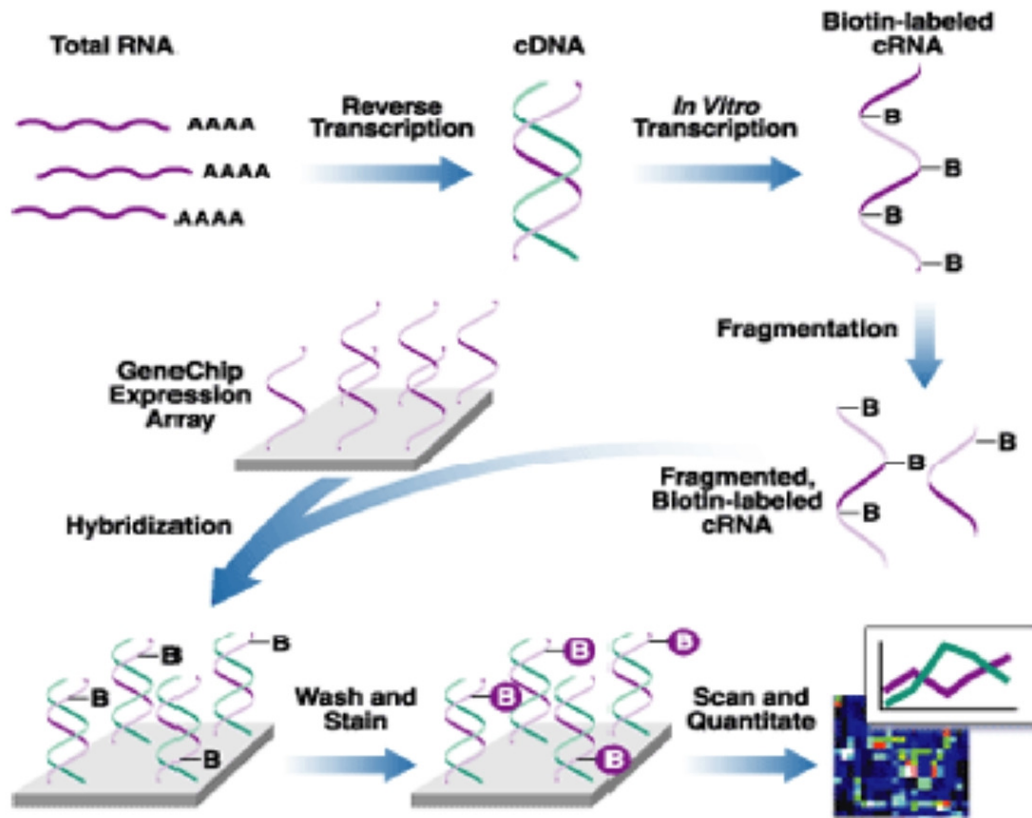


Abbildung 23: Schematischer Ablauf der Mikroarray-Analyse
[<http://www.affymetrix.com>]

Nach der Hybridisierung werden die Chips mit speziellen Lasergeräten abgetastet und die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Spots quantifiziert. Um Überblendungen schwächerer Signale durch stark exprimierte Gene in der Umgebung zu vermeiden, wurden die verschiedenen Sonden, die ein Genprodukt repräsentieren, großflächig über den Chip verteilt. Desweiteren werden hochauflösende konfokale Scanner eingesetzt, deren Auflösungsstärke ein Vielfaches der Sondendichte beträgt. Dadurch werden fluoreszierende Bereiche durch mehrere nicht-fluoreszierende Pixel von einander getrennt. Das hier eingesetzte konfokale Laserstrahl-Abtastgerät (*Gene Array Scanner* der Firma Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) ist mit einem Argonlaser ausgestattet. Er regt bei einer Auflösung von $3\ \mu\text{m}$ (Pixelgröße) die auf dem Genchip gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe der markierten und hybridisierten Nukleinsäuren mit Licht der Wellenlänge $488\ \text{nm}$ an und misst gleichzeitig die Intensität des emittierten Lichtes bei einer Wellenlänge von $570\ \text{nm}$.

Der in dieser Arbeit verwendete Affymetrix-Genchip HG-U133A kann mit seinen 22.308 SONDENSÄTZEN insgesamt 13.220 bekannte Gene und 5.413 ESTs (*expressed sequence tags*) quantifizieren. Damit werden mit einer Chip-Hybridisierung semi-quantitative Expressionsdaten von über 50% der menschlichen Gene (20.000 - 25.000 Gene) ermittelt, die den Funktionsstatus von Zellen bzw. Geweben unter den gewählten experimentellen Bedingungen

charakterisieren. Die Oligonukleotidsonden wurden vom Hersteller in ihrer Sequenz so ausgewählt, dass sie sich nicht überlappen. Als Sonden werden Oligonukleotide mit einer Länge von 25 Basen verwendet, die durch Computerprogramme so konstruiert sind, dass sie die Zielgene erkennen, mit Fremdgenen jedoch nicht oder nur geringfügig hybridisieren. Viele Gene bzw. EST werden auf dem Chip durch mehrere SONDENSÄTZE repräsentiert, deren Vertreter über den gesamten Chip verteilt sind. Ein SONDENSATZ besteht aus 16 gen-spezifischen Sonden, die in ihrer Sequenz eine komplette Übereinstimmung mit der entsprechenden cDNA aufweisen (*perfect matching probe*, PMP). Zu jeder dieser Sonden gibt es eine Kontrollsonde, bei der in der Mitte des Oligomers eine einzelne Base ausgetauscht wurde (*mismatching probe*, MMP). Durch die MMP-Sonden können unspezifische Bindungen quantifiziert werden. Weiterhin können durch Verwendung dieser Sonden Hintergrundsignale und das Rauschen des *Scanners* eliminiert werden. Durch statistische Verrechnung der Fluoreszenzintensitäten aller PMPs eines SONDENSATZES und durch Subtraktion der durchschnittlichen Intensitäten der entsprechenden MMPs kann die absolute Expressionshöhe eines bestimmten Gens abgeschätzt werden [LOCKHART *et al.*, 1996; WODICKA *et al.*, 1997].

4.1.4.2. Interne Standardisierung

Ein Vergleich der absoluten Expressionshöhen ist jedoch nur innerhalb eines Chips sinnvoll, da alle Sonden mit der gleichen RNA-Präparation hybridisiert werden. Wenn man jedoch unterschiedliche RNA-Präparationen verwendet, die aus unterschiedlichen zellulären Systemen präpariert wurden (z.B. Monozyten mit und ohne Zytokinstimulierung), müssen die ermittelten Fluoreszenzintensitäten intern normiert werden. Diese Normierung erfolgt in den meisten Fällen dadurch, dass Kontrollgene ausgesucht werden, von denen bekannt ist, dass sie konstitutiv exprimiert werden und keiner Regulation unterliegen. Eine solche interne Normierung ist auch für alle RT-PCR-Verfahren (semi-quantitative RT-PCR, Echtzeit-RT-PCR) üblich, wobei meist nur ein Referenzgen (*house keeping*-Gene wie GAPDH oder β -Aktin) verwendet wird. Für die statistische Auswertung eines Chip-Datensatzes empfiehlt es sich jedoch, mehrere solcher Kontrollgene einzubeziehen, die unter verschiedenen Stimulierungsbedingungen keiner Regulation unterliegen. Dieses Verfahren ist der Verwendung eines einzelnen Kontrollgens vorzuziehen, da unter bestimmten experimentellen Bedingungen auch „*house keeping*“-Gene einer Regulation unterliegen. Es ist jedoch wesentlich unwahrscheinlicher, dass eine ganze Familie von „*house keeping*“-Genen unter bestimmten experimentellen Bedingungen gleichzeitig und gleichsinnig reguliert wird. Diese Familie der Referenzgene kann individuell festgelegt werden und bedarf einer ständigen Aktualisierung.

Die Auswahl der Kontrollgene ist ein kritischer Schritt bei der Mikroarrayanalyse, der von der Erfahrung des Auswertepersonals abhängt und eine umfangreiche Datensammlung erfordert. Je größer die Anzahl der Kontrollgene ist und je mehr Daten zur Regulation eines Kontrollgenkandidaten vorliegen, desto höher ist der Wert dieses Kontrollgens. Die hier verwendeten Mikroarraydaten umfassten mehr als 10 Einzelgene der Familie der Kontrollgene.

4.1.4.3. Vorteile und Grenzen der Mikroarray-Technologie

Der größte Vorteil der Mikroarray-Technologie besteht darin, dass man mit einem Experiment halb-quantitative Daten zur Expression von Tausenden von Genen erhält. Mit den genom-deckenden Chips können Aussagen zur Expressionsregulation alle Gene einer Zell- bzw. Gewebepopulation gemacht werden. Diese Datenvielfalt ist jedoch Vor- und Nachteil zugleich. Da die biologische Funktion vieler Tausender Gene heute noch nicht bekannt ist, können auftretende Regulationseffekte in den meisten Fällen nicht sicher interpretiert werden. Ein weiteres Problem bei der Bewältigung der Datenvielfalt besteht darin, dass die Datenmengen nur noch mit entsprechenden Computerprogrammen zu bewältigen sind. Die komplexen Programme können nur von speziell geschulten Biostatistikern verwendet werden. Diese Personen haben aber in den meisten Fällen nicht das für die Auswertung erforderliche funktionelle Verständnis der biochemischen Prozesse. Auf der anderen Seite sind die komplizierten statistischen Auswerteverfahren und die damit erhaltenen Rohdaten von experimentell tätigen Wissenschaftlern kaum zu durchschauen. Deshalb sollte eine qualifizierte Chipauswertung immer in Zusammenarbeit von Experimentatoren und Biostatistikern erfolgen. Weiterhin sollten die Schlüsselergebnisse eines Experiments mit anderen Methoden (vor allem Echtzeit-PCR) überprüft werden. Ein weiterer Nachteil der Mikroarray-Technologie sind die derzeit noch hohen Kosten der Chips, der Auswertevorrichtungen und der entsprechenden Software. Mit der Produktion von themenspezifischen Mikroarrays, die eine begrenzte Anzahl von Genen enthalten, und dem damit zu erwartenden Wettbewerb auf dem Chipmarkt könnten zumindest die Chip-Preise in Zukunft drastisch fallen.

Wichtigste Voraussetzung für das Gelingen einer Mikroarray-Analyse ist die Verwendung qualitativ hochwertiger RNA-Präparationen. Dabei ist besonders darauf zu achten, dass die RNA nicht partiell abgebaut ist und keine DNA bzw. Proteine enthält. Um diese Qualitätskriterien zu erfüllen, werden die RNA-Präparationen zunächst hinsichtlich ihrer Intaktheit und Reinheit überprüft und dann nach Fluoreszenzmarkierung gegen einen Probierchip hybridisiert. Erst wenn sich bei der Testhybridisierung eindeutige Fluoreszenzsignale nachweisen lassen, werden die Präparationen für die eigentliche Chip-Hybridisierung vorbereitet.

Nach meinen Erfahrungen sind mehrere kommerziell erhältliche RNA-Präparationskits dazu geeignet, qualitative hochwertige RNA-Präparationen zu erhalten, die für eine Chip-Hybridisierung verwendet werden können.

Für eine qualitative hochwertige Chip-Analyse benötigt man in Abhängigkeit von der Art des Gen-Chips und vom Verlauf der Markierungsprozedur ca. 1-5 µg reine RNA. Solche Probenmengen können in der biochemischen Grundlagenforschung meist problemlos zur Verfügung gestellt werden. Für klinisch relevante Fragestellungen, z.B. bei der Verwendung von Biopsiematerial, kann die Probenmenge jedoch begrenzend werden. Für solche Problemfälle gibt es die Möglichkeit einer ein- bzw. mehrmaligen RNA-Amplifizierung. Solche Amplifizierungsreaktionen sind aber nicht ganz unproblematisch, da nicht von vornherein davon ausgegangen werden kann, dass alle RNA-Spezies gleichmäßig amplifiziert werden.

Prinzipiell gibt es zwei Arten von Genchips. Bei den cDNA-basierten Mikroarrays werden cDNAs als Sonden benutzt. Diese sind meist mehr als 100 Basen lang und gewährleisten eine feste Bindung der entsprechenden Genprodukte. Dadurch kann die Strenge der Waschprozeduren erhöht werden, was zu sichereren Signalen führt (weniger falsch positive Signale). Der Nachteil dieser cDNA-Felder besteht jedoch darin, dass die Synthese der Sonden sehr aufwendig ist. Weiterhin ist die Hybridisierung in vielen Fällen so effizient, dass sich die Konstruktion von MMPs (Negativkontrollen) schwierig gestaltet. Außerdem kann es bei der Verwendung von cDNAs als Hybridisierungssonden zu Kreuzhybridisierungen kommen, die darauf zurückzuführen sind, dass sich Fremd-RNAs an Sonden binden, die komplementäre Teilsequenzen enthalten.

Im Gegensatz zu den cDNA-basierten Genchips werden bei den Oligonukleotid-Feldern wesentlich kürzere Sonden verwendet. Dabei hat sich in der Vergangenheit eine Sondenlänge zwischen 25-30 Nukleotiden bewährt. Mit der Verwendung solcher kurzer Oligonukleotide steigt jedoch die Gefahr der Fehlhybridisierung. Folglich würde man sowohl falsch positive als auch falsch negative Ergebnisse erhalten. Um die Wahrscheinlichkeit von Falschhybridisierungen zu minimieren, müssen die Hybridisierungen (vor allem die Strenge der Waschprozedur) für die Sonden genau ausgetestet werden. Oligonukleotid-Felder haben den Vorteil, dass die Sonden sequenzspezifisch aus dem gesamten Genom gezielt ausgewählt werden können. Damit lassen sich Kreuzhybridisierungen mit Fremd-RNAs weitestgehend vermeiden [GOLUB, 2001]. Der größte Vorteil von Oligonukleotid-basierten Mikroarrays ist sicherlich der geringere experimentelle Aufwand, der für deren Herstellung erforderlich ist. Damit sind die Herstellungskosten deutlich niedriger. An die Herstellung von cDNA-basierten Array sollte vor allem dann gedacht werden, wenn es darum geht, Chips für um-

schriebene Themengebiete zu erstellen. Dabei sollte die überwiegende Anzahl der auf dem Chip vorhandenen Gene funktionell bzw. strukturell bereits charakterisiert sein und die entsprechenden cDNAs sollten vorliegen. Für die Herstellung von genom-deckenden Mikroarrays ist die Verwendung der cDNA-Technologie derzeit nicht praktikabel.

Ein wesentlicher Nachteil der Mikroarraytechnologie ist ihr halbquantitativer Charakter. Gene, die nur auf geringem Niveau exprimiert werden, können bei der Quantifizierung unterschätzt oder gar als nicht-exprimiert eingestuft werden. Bei Genen mit hoher absoluter Expressionsrate kommt es häufig zur Unterschätzung des Expressionsniveaus, da die Fluoreszenzintensitäten beim Abtasten der Chips außerhalb des linearen Bereichs abgebildet werden. Um diesen Nachteil auszugleichen, sollte die Expression von Genprodukten, die aufgrund von Mikroarrayanalysen als regulierte Gene klassifiziert wurden, durch Echtzeit-PCR exakt quantifiziert werden.

4.1.5. Echtzeit-PCR (*Real time quantitative PCR, RTQ-PCR*)

Die Echtzeit-PCR [*Real time quantitative PCR (RTQ-PCR)*, *Real time Detektion PCR, (RTD-PCR)*] stellt heute die am besten quantifizierbare Methode zur Transkriptomanalytik dar. Sie basiert auf den Prinzipien der RT-PCR (siehe 2.2.7.4.), ist aber im Gegensatz zur einfachen, semi-quantitativen Variante, genauer quantifizierbar. Dies wird vor allem dadurch erreicht, dass der Amplifizierungsprozess kinetisch verfolgt werden kann und damit gesichert ist, dass die Auswertung der Signalintensitäten im linearen Amplifizierungsbereich erfolgt. Die Messung der Amplifizierungskinetik erfolgt durch den Einbau von Fluoreszenzfarbstoffen in die amplifizierte cDNA (nur eingebauter Farbstoff fluoresziert), so dass die Fluoreszenzintensität der Menge an amplifizierter cDNA entspricht. Diese Amplifizierungskinetiken werden sowohl für das ausgewählte Genprodukt als auch für das Kontrollgen aufgezeichnet. Die Abbildung 24 zeigt ein Beispiel für die Amplifizierungskinetiken eines Kontroll-Gens (GAPDH).

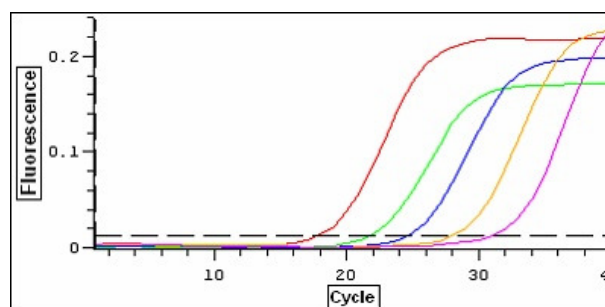


Abbildung 24: Amplifizierungskinetik des Kontroll-Gens GAPDH

Trotz sorgfältiger Auswahl der Amplifizierungsprimer kann es vor allem bei niedrig exprimierten Genen dazu kommen, dass Fremd-cDNAs mitamplifiziert werden. Sollte dies der Fall sein, kann anhand des Fluoreszenzsignals nicht entschieden werden, welcher Anteil des Signals auf die Amplifizierung des Zielgens und welcher auf die des Fremdgens zurückzuführen ist. Um solche Heterogenitäten auszuschließen, müssen die Schmelzkurven der PCR-Produkte aufgenommen werden. Handelt es sich um ein homogenes Produkt, kann ein eng umschriebener Schmelzpunkt festgestellt werden. Liegt eine Amplifizierungsheterogenität vor (Vorhandensein von mehreren PCR-Produkten), ergeben sich mehrere Schmelzbereiche. Diese können daran erkannt werden, dass die erste Ableitung der Schmelzkurven entweder ein breites Maximum aufweist oder sogar durch mehrere Maxima charakterisiert ist (Abbildung 25). Sollten solche Schmelzkurven auftreten, müssen die PCR-Bedingungen für das Zielgen optimiert werden (andere Primer, anderes Amplifizierungsprotokoll), so dass die Fremdgene nicht mehr amplifiziert werden.

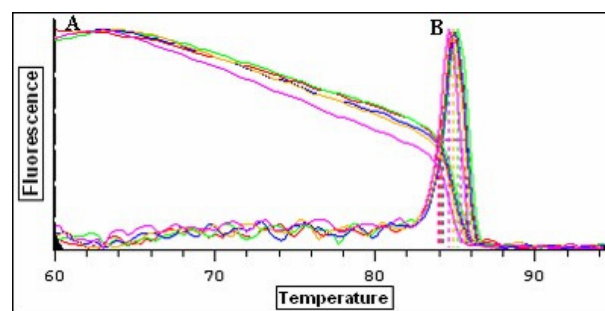


Abbildung 25: Schmelzkurven von den Amplifizierungsprodukten des GAPDH
A) Abnehmende Fluoreszenzintensität B) Schmelzpunkt T_m des amplifizierten Produktes

Das dritte Element, welches für die exakte Quantifizierung des Amplifizierungsprozesses notwendig ist, sind externe Standards (Amplikons). Im einfachsten Fall stellen diese Amplikons Oligonukleotide dar, die die gleichen Erkennungssequenzen für die verwendeten Primer besitzen wie die zu amplifizierenden cDNAs. Damit ist gewährleistet, dass sie im gleichen Maße wie die cDNAs amplifiziert werden. Da jeweils bekannte Mengen dieser externen Standards zu den Amplifizierungsansätzen hinzugegeben werden, kann die gemessene Fluoreszenzintensität exakt normiert werden. Wird diese Normierung dann auf die Ziel-cDNA übertragen, ist es möglich, die Anzahl der in der cDNA-Präparation enthaltenen Kopien der Ziel-cDNA zu berechnen. Da dies sowohl mit dem Zielgen als auch mit dem Kontrollgen durchgeführt wird, ist eine exakte Bestimmung der Kopienzahlen von Kontroll- und Ziel-RNA möglich. Der Quotient dieser beiden Größen kann als Maß für die Expressionshöhe eines Zielgens angesehen werden und ist mit Expressionsniveaus vergleichbar, die unter abweichenden experimentellen oder in anderen zellulären Systemen ermittelt wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Prinzip für eine Reihe von Genen angewandt und die quantitativen Aussagen der Echtzeit-PCR mit den halbquantitativen Daten der Mikroarray-Analysen und der semi-quantitativen RT-PCR verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass der Trend der Aussagen zur Expressionsregulation, der mit den drei unterschiedlichen Verfahren erreicht wurde, immer der gleiche war. Eine Hoch- bzw. Herunterregulation der Genexpression wurde mit allen drei Methoden bestätigt. Interessanterweise war auch der quantitative Vergleich bei den untersuchten Genen sehr ähnlich (Tabelle 11). Diese quantitative Übereinstimmung der drei Messmethoden sollte vor allem darauf zurückzuführen sein, dass es sich bei den zum Vergleich einbezogenen Genprodukten um Gene mittleren Expressionsniveaus handelt. Weiterhin wurden die Bedingungen der semi-quantitativen RT-PCR so gestaltet, dass die PCR-Signale sich im linearen Amplifikationsbereich befanden.

Tabelle 11: Vergleich der Quantifizierungsmethoden für das Expressionsniveau verschiedener Genprodukte der Leukotriensynthese-Kaskade

Die relativen Veränderungen im Expressionsniveau, die mit den verschiedenen Methoden quantifiziert wurden, sind fettgedruckt: Ein Vergleich der mit den verschiedenen Methoden erhaltenen Werte zeigt eine gute Übereinstimmung.

Proben	Mikroarray-Daten		Echtzeit-PCR			semi-quantitative-PCR		
			Threshold cycle C_T	Kopien	<i>Kopien/Kopie GAPDH</i>			
SLOX			SLOX-Standard $y = -0.23x + 10.63$ $r^2=0.995$					
Monos	20.836	1,00	20,081	966.319	1,00	<i>0,3674</i>	18.874	1,00
Monos+IL-4	8.395	0,40	21,419	502.341	0,52	<i>0,1910</i>	10.717	0,57
Monos+IL-13	11.607	0,56	21,086	601.436	0,62	<i>0,2287</i>	10.778	0,57
CysLT2R			CysLT2R-Standard $y = -0.21x + 9.72$ $r^2=0.999$					
Monos	854	1,00	23,212	74.383	1,00	<i>0,0283</i>	34.092	1,00
Monos+IL-4	485	0,57	25,016	33.109	0,45	<i>0,0126</i>	13.718	0,40
Monos+IL-13	541	0,63	24,446	43.672	0,59	<i>0,0166</i>	23.765	0,70
FLAP			FLAP-Standard $y = -0.20x + 10.06$ $r^2=0.987$					
Monos	12.368	1,00	19,738	1.588.900	1,00	<i>0,6041</i>	49.178	1,00
Monos+IL-4	4.671	0,38	21,359	811.252	0,51	<i>0,3085</i>	39.087	0,79
Monos+IL-13	6.237	0,50	21,182	881.025	0,55	<i>0,3350</i>	39.875	0,81

4.2. Die Rolle von Monozyten/Makrophagen bei der Entzündungsreaktion

Monozyten/Makrophagen und dendritische Zellen nehmen im menschlichen Immunsystem eine besondere Stellung ein, da sie sowohl als Bestandteile des adaptiven (erworbenen) als auch des nicht-adaptiven (angeborenen) Immunsystems betrachtet werden können. Als Antigen-präsentierende Zellen sind sie in der Lage, Antigenpeptide mittels MHC-I bzw. MHC-II auf ihrer Oberfläche zu präsentieren, die dann von T-Zellen mit Hilfe des T-Zellrezeptors erkannt werden. Gleichzeitig verfügen sie aber über Erkennungsstrukturen (z.B. „*toll-like*“-Rezeptoren, TLR), die es ihnen ermöglicht, typische Pathogenstrukturen zu erkennen und damit Krankheitserreger mit Mechanismen des angeborenen Immunsystems zu

bekämpfen. Durch diese Wirkung in den beiden Subsystemen der menschlichen Immunität verbinden sie die beiden Systeme miteinander. Ohne diese Verbindung wäre ein koordiniertes Wechselspiel des angeborenen bzw. erworbenen Immunsystems nicht möglich, was zu einem deutlichen Effektivitätsverlust der Pathogenabwehr führen würde.

Lange Zeit wurden Monozyten/Makrophagen ausschließlich als pro-inflammatorische Zellen angesehen. Diese Annahme begründete sich vor allem darauf, dass diese Zellen an der Beseitigung von Pathogenen beteiligt sind, was in den meisten Fällen mit einer lokalen bzw. generalisierten Entzündung einhergeht [RIEDE *et al.*, 2004]. In jüngerer Zeit mehren sich jedoch die Anzeichen dafür, dass Monozyten/Makrophagen auch anti-inflammatorische Wirkungen entfalten können und damit beim Heilungsprozess der Entzündung bedeutsam sein könnten [DUFFIELD, 2003; FUJIWARA und KOBAYASHI, 2005]. Warum und über welche Mechanismen sich naive Blutmonozyten in einem Falle zu pro-inflammatorischen im anderen Falle jedoch zu anti-inflammatorischen Zellen entwickeln, ist derzeit Gegenstand intensiver Untersuchungen [GOERDT und ORFANOS, 1999; CAVAILLON, 2001; DUFFIELD, 2003; GILROY *et al.*, 2004; FUJIWARA und KOBAYASHI, 2005].

4.2.1. Die Phasen der Entzündungsreaktion

Wie in der Einleitung beschrieben, stellt eine Entzündung die Reaktion eines Organismus auf einen entzündungsauslösenden Reiz dar. Die klassischen Entzündungssymptome bilden sich dabei als Konsequenz komplexer Stoffwechselveränderungen heraus, die sich in den Pathogenen, im Gewebsparenchym bzw. Gewebestroma und in den einwandernden Entzündungszellen vollziehen. Eine besondere Rolle kommt dabei den Entzündungszellen zu, die aus dem Blut auswandern können, um im entzündlich veränderten Gewebe Abwehrfunktionen wahrzunehmen.

4.2.1.1. Die Ausbildung von Entzündungs-Symptomen beruht auf die Stoffwechsel-Leistungen von Entzündungszellen

Für die Ausbildung der klassischen Entzündungssymptome (Calor, Dolor Tumor, Rubor) sind vor allem Mediatoren verantwortlich, die Stadien-abhängig in Entzündungszellen gebildet werden. Dabei spielen vor allem vasoaktive Metaboliten eine wesentliche Rolle [TILL, 1999], welche die Hämodynamik im entzündlichen Gewebe so verändern, dass es zu einer Hyperämie (gesteigerte Durchblutung) kommt. Diese Hyperämie induziert eine lokale Hyperthermie (Calor) sowie eine Rötung (Rubor) des entzündlichen Gewebes. Daneben werden Gewebshormone gebildet, die eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität induzieren, was zu

einem Austritt von Flüssigkeit (Ödembildung, Tumor) und Abwehrmolekülen (z.B. Immunglobuline, Komplementfaktoren) aus den Blutgefäßen führt [RIEDE *et al.*, 2004]. Dabei spielen vasoaktive Eikosanoide und verschiedene Chemokine eine wichtige Rolle. Gleichzeitig werden in den aktivierten Entzündungszellen chemotaktische Mediatoren synthetisiert, die weitere Entzündungszellen anlocken (Chemokinese) und die Richtung der Zellbewegung festlegen (Chemotaxis). Dabei verläuft die Wanderung von Entzündungszellen entgegen eines Mediatorgradienten zum Zentrum der Entzündungsreaktion [LUSTER *et al.*, 2005]. Neben den klassischen Entzündungszellen (B-Zellen, T-Zellen, Monozyten/Makrophagen, Granulozyten usw.) nehmen auch die Parenchym- bzw. Stromazellen des entzündeten Gewebes an der Symptombildung teil. Besondere Bedeutung kommt dabei den Bindegewebszellen (Fibroblasten, Fibrozyten) zu, die ebenfalls zur Mediatorsynthese angeregt werden. Ziel all dieser metabolischen Veränderungen ist die möglichst schnelle Beseitigung des entzündungsauslösenden Reizes.

4.2.1.2. Entzündungen heilen durch gezielte Stoffwechselveränderungen von Entzündungs- und Stromazellen

Ist der entzündungserregende Reiz beseitigt, bildet sich die Entzündung zurück. Diese Rückbildung besteht jedoch nicht einfach im Nachlassen der Symptome, sondern sie wird ebenfalls durch aktive Stoffwechselveränderungen ausgelöst. Dabei kommt es zu einer vollständigen Veränderung der Botenstoffe, wobei jetzt vor allem Heilungsmediatoren gebildet werden [HAN und ULEVITCH, 2005; SERHAN und SAVILL, 2005]. Weiterhin kommt es zu einer Veränderung der Zellpopulationen im entzündlichen Geweben, bei der die „destruktiv tätigen“ pro-inflammatorischen Zellen nach und nach durch „konstruktiv tätige“ anti-inflammatorische Zellen ersetzt werden, die durch eine hohe Synthese- und Reparaturkapazität gekennzeichnet sind. Diese Veränderungen vollziehen sich sowohl innerhalb einer Entzündungszellpopulation (z.B. innerhalb der Granulozyten) aber auch zwischen verschiedenen Arten von Entzündungszellen (z.B. Abnahme der Granulozyten bei gleichzeitiger Zunahme der Monozyten).

4.2.2. Pro- und anti-inflammatorische Zytokine regulieren den Funktionszustand von Monozyten/Makrophagen

Zytokine sind wichtige Entzündungsmediatoren, haben aber auch bedeutsame Funktionen außerhalb des Entzündungsgeschehens [CHUNG und BARNES, 1999]. Viele Zytokine sind

pleiotrop, d.h. sie lösen in Abhängigkeit von ihrer Umgebung (andere Botenstoffe), ihrer Konzentration und des Phänotyps ihrer Zielzelle mannigfaltige biologische Effekte aus.

Trotzdem ist die vereinfachende Einteilung in pro- bzw. anti-inflammatorische Zytokine für bestimmte Fragestellung wertvoll. Klassische pro-inflammatorische Zytokine, wie z.B. IL-1 oder TNF α , bewirken einen Phänotypwechsel naiver Monozyten hin zu pro-inflammatorischen Zellen. Im Gegensatz dazu sind die Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 als alternative Stimulatoren des Makrophagen-Metabolismus bekannt und scheinen naiven Monozyten einen entzündungshemmenden Phänotyp zu verleihen [DUFFIELD, 2003]. In der Literatur gibt es mehrere Arbeiten, die sich mit der IL-4/13-Stimulierung und den damit verbundenen Veränderungen im Genexpressionsmuster beschäftigen. Dabei wurden bisher nur Einzelgene bzw. spezifische Genfamilien quantifiziert [HART *et al.*, 1989; CHEUNG *et al.*, 1990; DE WAAL MALEFYT *et al.*, 1993; BECKER und DANIEL, 1990; TE VELDE *et al.*, 1990; NASSAR *et al.*, 1994; GRATCHEV *et al.*, 2001; CHAITIDIS *et al.*, 2004]. Mit Hilfe der Mikroarray-Technologie wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals die Komplexität der Veränderungen im Genexpressionsmuster beschrieben, die nach dreitägiger Behandlung der Monozyten mit IL-4/13 auftreten. Die relativ lange Kultivierungsperiode wurde deshalb gewählt, weil für Phänotypveränderungen nicht nur die direkt durch IL-4 ausgelösten Effekte berücksichtigt werden sollten, sondern auch sekundäre Wechselwirkungen von Interesse waren. Dabei fanden wir, dass IL-4 und IL-13 die Expression verschiedener Genprodukte, die mit der Heilung einer akuten Entzündungsreaktion zusammenhängen, anschalten, während es parallel zur Abschaltung der Expression klassischer pro-inflammatorischer Genprodukte kommt.

4.2.3. Anti-inflammatorische Makrophagen spielen bei der Entzündungsheilung eine wichtige Rolle

Monozyten/Makrophagen spielen eine wesentliche Rolle bei der Entzündungsheilung. Im Verlauf der akuten Entzündungsreaktion entstehen durch die Gewebszerstörung Zelltrümmer und Abbauprodukte der extrazellulären Matrix, die eine Neusynthese funktionsfähigen Gewebes behindern. Damit die meist partikulären Abbauprodukte beseitigt werden können, müssen Phagozyten ins entzündlich veränderte Gewebe einwandern, um die Abfallstoffe zu internalisieren und intrazellulär abzubauen (*clearing*). Diese Aufgabe wird zum einen von speziellen neutrophilen Granulozyten zum anderen aber auch von alternativ aktivierten Monozyten/Makrophagen erledigt [MADERNA und GODSON, 2003; LAUBER *et al.*, 2004]. Diese konstruktiv-tätigen Phagozyten synthetisieren außerdem ein anderes Muster von Botenstoffen, dass u.a. dazu führt, dass Fibroblasten und Parenchymzellen zur Proliferation angeregt

werden, um den Gewebsverlust auszugleichen und funktionsfähiges Gewebeparenchym herzustellen. Sollte die Gewebeerstörung während der akuten Entzündung zu weit fortgeschritten sein, um vollständig durch funktionsfähiges Parenchym ersetzt zu werden, kommt es in den Fibroblasten vorwiegend zur Kollagensynthese und damit zur Narbenbildung.

Während der akuten Entzündungsphase strömen Granulozyten massenhaft ins entzündete Gewebe ein und sterben nach der erfolgreichen Bekämpfung der pathogenen Erreger ab. In der Literatur wurde mehrfach darüber berichtet, dass Monozyten zur Phagozytose apoptotischer Granulozyten fähig sind [WARD und LENTSCH, 2002; SULLIVAN, 2003; DUFFIELD, 2003; GILROY *et al.*, 2004], dieser Prozess scheint ein wichtiges Element bei der Entzündungsheilung zu sein.

Zusammenfassend können somit festgestellt werden, dass alternativ aktivierte Monozyten/Makrophagen die destruktiven Vorgänge der akuten Entzündungsreaktion aktiv stoppen, gleichzeitig aber die konstruktiven Prozesse der Heilungsphase induzieren.

4.2.3.1. Veränderungen im Zytokinmuster während der alternativen Monozytenaktivierung

Unter unseren experimentellen Bedingungen wurde die Expression pro-inflammatorischer Zytokine herunterreguliert. Diese Ergebnisse passen 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. Im Gegensatz dazu wurde die Expression einiger anti-inflammatorischer Zytokine (IL-4, IL-10) durch IL-4/13 hochreguliert. Insgesamt deuten die Untersuchungen zur Expressionsregulation pro- und anti-inflammatorischer Zytokine darauf hin, dass die alternative Stimulierung von Monozyten zu einem anti-inflammatorischen Phänotyp der Zellen führt.

4.2.3.2. Mögliche anti-inflammatorische Rolle der 12/15-LOX

Eine Überexpression der 12/15-LOX in verschiedenen *in vivo*-Entzündungsmodellen schützt Ratten und Kaninchen vor einer ausgedehnten Entzündungsreaktion [MUNGER *et al.*, 1999; SERHAN *et al.*, 2003]. So konnte in einem *in vivo*-Glomerulonephritis-Modell der Ratte gezeigt werden, dass somatischer Gentransfer der 12/15-LOX in eine Niere, dieses Organ vor einer experimentellen Entzündung schützt. Demgegenüber zeigte das kontralaterale Organ, welches mit einem Kontrollplasmid transfiziert wurde, signifikant mehr Entzündungszeichen [MUNGER *et al.*, 1999]. Ähnliche Ergebnisse wurden mit transgenen Kaninchen erhalten, die die 12/15-LOX makrophagenspezifisch überexprimierten. Hier entwickelten 12/15-LOX überexprimierende Tiere deutlich weniger Peridontitis als entsprechende Kontrollkaninchen

[SERHAN *et al.*, 2003]. Die Mechanismen, die dem anti-inflammatorischen Effekt der 12/15-LOX-Expression zugrunde liegen, sind derzeit noch nicht aufgeklärt. Möglicherweise lassen sich diese Beobachtungen darauf zurückführen, dass die 12/15-LOX an der Biosynthese anti-inflammatorischer Eikosanoide (Lipoxine, Resolvine) beteiligt ist [LEVY *et al.*, 2001; GOH *et al.*, 2003]. Andererseits könnten Produkte der 12/15-LOX auch die Expression anti-inflammatorischer Proteine stimulieren. So konnte z.B. gezeigt werden, dass 12/15-LOX-Produkte den Transkriptionsfaktor PPAR γ aktivieren [HUANG *et al.*, 1999], der bei der Expression mehrerer anti-inflammatorischer Proteine eine Rolle spielt [JIANG *et al.*, 1998; CUZZOCREA *et al.*, 2004]. Zusätzlich zu den in der Literatur belegten Aktivierungseffekten der PPAR γ induzierten Transkriptionsregulation durch 12/15-LOX-Produkte wurde mit Hilfe der Mikroarray-Analysen gezeigt, dass es in IL-4-behandelten Monozyten zu einer mehr als zweifachen Hochregulation der PPAR γ -Expression kommt (900 rel. Fluoreszenzmaßeinheiten in der Kontrolle gegenüber 2.406 rel. Fluoreszenzmaßeinheiten in den IL-4-behandelten Zellen, mittleres Expressionsniveau). Damit werden sowohl das Expressionsniveau als auch die spezifische Aktivität von PPAR γ durch Expression der 12/15-LOX hochreguliert. Diese Expressionsdaten konnten durch semiquantitative RT-PCR (Daten nicht gezeigt) bestätigt werden.

Im Gegensatz zur 12/15-LOX wurden die meisten Enzyme des 5-LOX-Weges der Arachidonsäure-Kaskade herunterreguliert (Abbildung 14). 5-LOX-Produkte (besonders die Leukotriene) sind nach dem derzeitigen Wissensstand durchweg pro-inflammatorische Mediatoren. Die Herunterregulation der wichtigsten Leukotrien-synthetisierenden Enzyme kennzeichnet damit den anti-inflammatorischen Charakter der IL-4/13-Stimulierung.

4.2.3.3. Mögliche anti-inflammatorische Rolle der MAO-A

Da die Expression der beiden Isoformen der MAO (MAO-A und MAO-B) bisher in Monozyten/Makrophagen noch nicht beschrieben worden war, stand die Frage nach der funktionellen Relevanz dieses Enzyms für die Zellphysiologie von Monozyten bislang außerhalb der Betrachtung. Da jedoch die Analysedaten klar gezeigt haben, dass alternativ stimulierte Monozyten große Mengen an MAO-A exprimieren, gewinnt die Rolle dieses Phänomens an Bedeutung. Im Kontext unserer Expressionsdaten könnte die MAO-A als entzündungshemmendes Enzym betrachtet werden. Es katalysiert die oxidative Desaminierung von biogenen Aminen, wobei Serotonin ein bevorzugtes Substrat ist [SINGER und RAMSAY, 1995]. Da Serotonin in verschiedenen Entzündungsmodellen pro-inflammatorische Eigenschaften zeigt [PICHLER *et al.*, 2002; MOSSNER und LESCH, 1998], kann davon ausgegangen werden, dass

eine Hochregulation der MAO-A-Expression während der Heilungsphase den Abbau dieses Mediators beschleunigt. Möglicherweise werden auch andere entzündungsrelevante biogene Amine (z.B. Histamin) durch die MAO-A abgebaut.

Während der katalytischen Reaktion der MAO-A entsteht Ammoniak (NH_3) als Nebenprodukt [SINGER und RAMSAY, 1995]. NH_3 ist eine starke Base und kommt im Blutserum nur in geringen Konzentrationen (10-50 μM) vor. Im Blutplasma trägt das Puffersystem $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ wegen seiner geringen Konzentration kaum zur Konstanz der pH-Homöostase bei. Für die Aufrechterhaltung des Harn-pH ist dieses Puffersystem jedoch äußerst bedeutsam. Im entzündeten Gewebe herrscht im Allgemeinen ein saures Milieu ($\text{pH} < 7,2$). Die metabolische Produktion einer starken Base, wie z.B. Ammoniak (NH_3) kann deshalb als Gegenregulation betrachtet werden, die Auslenkung der pH-Homöostase wieder rückgängig zu machen und damit den Gewebs-pH wieder zu normalisieren. Damit könnte die MAO-A in zweifacher Weise in die Heilungsreaktion einbezogen sein.

4.2.3.4. Mögliche anti-inflammatorische Rolle des Fibronektins

Fibronektin 1 (FN1), dessen Expression in Monozyten durch IL-4/13 in einem ähnlichen Umfang wie die 15-LOX-1 heraufreguliert wird, ist ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix, kommt aber auch membrangebunden vor [ROMBERGER, 1997; MAO und SCHWARZBAUER, 2005;]. Funktionell ist es deshalb für eine geordnete Struktur der Matrix verantwortlich, scheint aber auch an der Regulation der Zell-Adhäsion, der Zell-Migration und der Proliferation beteiligt zu sein [POTTS und CAMPBELL, 1996]. Eine erhöhte Synthese könnte bei der Umstrukturierung der extrazellulären Matrix bedeutsam sein, da bei diesem Prozess neue Matrixproteine gebraucht werden [GILROY *et al.*, 2004].

Matrixproteine, wie Fibronektin oder Kollagen, liegen extrazellulär nicht als Monomere Proteine vor, sondern lagern sich zu Superstrukturen zusammen. Damit wird zum einen ein geordnetes Netzwerk von extrazellulären Fibrillen hergestellt und zum anderen eine erhöhte Stabilität gegenüber abbauenden Prozessen erreicht. Eine erhöhte Nettosynthese von Fibrinogen im Rahmen des Heilungsprozesses ist jedoch nur sinnvoll, wenn gleichzeitig die abbauenden Reaktionen gedrosselt werden. Aus den Expressionsdaten wurden zwei Anhaltspunkte erhalten, die auf eine solche gebremste extrazelluläre Proteolyse hindeuten: (i) Hochregulation der Expression eines Hemmstoffs (TIMP3) von Metalloproteinasen: Metalloproteinasen spielen bei der extrazellulären Proteolyse eine wichtige Rolle. Wie später noch erwähnt wird (Seite 125) besitzt TIMP3 keine ausgeprägte Spezifität in Bezug auf eine bestimmte Metalloproteinase. Damit ist seine Hochregulation ein guter Ansatzpunkt, um die

extrazelluläre Proteolysekapazität effektiv zu blocken. (ii) Erhöhte Expression von Transglutaminasen: Transglutaminasen sind Enzyme, die zu einer Quervernetzung von Proteinmonomeren führen und damit Proteinsuperstrukturen (z.B. Fibrillen oder das Fibrinnetzwerk) strukturell stabilisieren. Die Bildung solcher Superstrukturen macht die extrazellulären Proteine wesentlich resistenter gegenüber dem proteolytischen Abbau. Deshalb kann eine Hochregulation der Expression verschiedener Transglutaminasen als anti-inflammatorischer Effekt angesehen werden (siehe weiter 4.2.3.5.).

4.2.3.5. Mögliche anti-inflammatorische Rolle des Gerinnungsfaktors XIII

Im Gegensatz zu den meisten anderen Gerinnungsfaktoren, die überwiegend Proteinaseaktivität aufweisen, besitzt der Gerinnungsfaktor XIII (Fibrin-stabilisierender Faktor) Transglutaminaseaktivität. Mit dieser enzymatischen Aktivität ist er in der Lage, das nicht-kovalent assoziierte Fibrinpolymer kovalent zu vernetzen. Dadurch wird das Fibrinpolymer mechanisch belastbar zum anderen erhöht sich seine Stabilität gegenüber Fibrin-spaltenden Enzymen (Plasmin). FXIII führt aber nicht nur zur Quervernetzung von Fibrinogenmonomeren, sondern reagiert auch mit anderen extrazellulären Proteinen, wie z.B. dem Fibronectin [CUCUIANU und DICAN, 2003]. Durch die Erhöhung der Expression des FXIII kann während der Heilungsphase der Entzündung verhindert werden, dass neu gebildetes Fibronectin proteolytisch abgebaut wird, da es sofort kovalent vernetzt werden kann und damit extrazelluläre Superstrukturen ausbildet. Neben dem FXIII gibt es im menschlichen Organismus noch weitere Transglutaminasen, von denen einige in Monozyten nach IL-4-Behandlung ebenfalls hochreguliert werden (Tabelle 12).

Tabelle 12: Expressionsregulation verschiedener Transglutaminasen durch IL-4/13 in Monozyten
Die Zahlen repräsentieren die relative Fluoreszenzintensitäten der Mikroarrayanalysen.

Affymetrix-Nr.	Kontrollzellen	+IL-4	+IL-13	Genbezeichnung
206008_at	31	62	75	Transglutaminase 1
211573_x_at	901	3.019	1.925	Transglutaminase 2
211003_x_at	741	2.965	1.976	ähnlich der Transglutaminase
207911_s_at	266	666	316	Transglutaminase 5
205174_s_at	8.399	30.570	19.979	Glutaminylzyklase

Auch die Transglutaminasereaktion geht mit der Bildung von Ammoniak einher. Deshalb sind auch für den Faktor XIII jene Mechanismen zu diskutieren, die für die MAO-A hinsichtlich ihrer potenziellen Wirkung auf die pH-Homöostase im entzündeten Gewebe vorgeschlagen wurden.

4.3. Kurzcharakterisierung der am stärksten hochregulierten Genprodukte

4.3.1. 15-Lipoxygenase-1 (15-LOX-1)

Die biologische Rolle von LOXn ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Die 5-LOX ist als Schlüsselenzyme an der Biosynthese von Leukotrienen beteiligt und scheint damit für die Pathogenese der Entzündungsreaktion bedeutsam zu sein [FUNK, 2001]. Da Leukotriene auch wesentliche Mediatoren bei hyperallergisch-anaphylaktischen Reaktionen sind, kommt dem Enzym auch eine patho-physiologische Rolle beim *Asthma bronchiale* und der allergischen *Rhinitis* zu [FUNK, 2001]. Die 15-LOX-1 scheint an Reifungs- und Differenzierungsprozessen beteiligt zu sein [RAPOPORT und SCHEWE, 1986; VAN LEYEN, 1998], spielt aber auch eine Rolle bei der Pathogenese von Atherosklerose [KÜHN *et al.*, 1994; KÜHN *et al.*, 1997] und Osteoporose [ORWOLL und KLEIN, 1995; KLEIN *et al.*, 2004].

Das Gen *ALOX15*, das für die 15-LOX-1 (EC 1.13.11.33) kodiert wurde auf dem kleinen Arm des menschlichen Chromosoms 17 (Bereich der Banden 13.2) lokalisiert. Es ist Bestandteil einer größeren Gen-Anhäufung (*cluster*), das alle menschlichen LOX-Gene mit Ausnahme des *ALOX5*-Gens in diesem Bereich (ca. 3,5 Mio. Nukleotide) enthält. Die Struktur dieses Gen-Clusters ist in Abbildung 26 schematisch dargestellt.

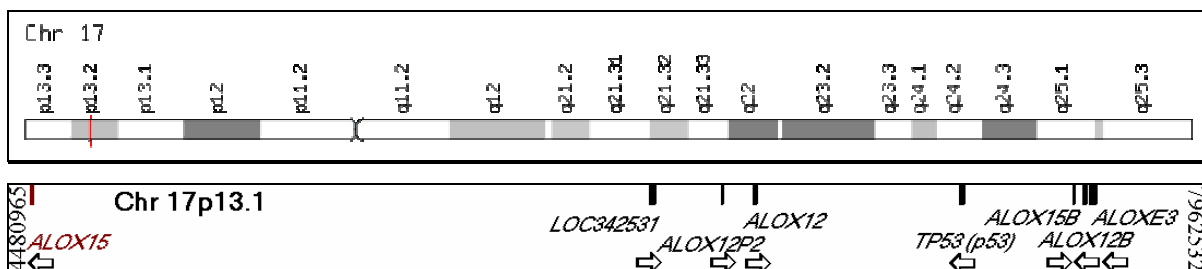


Abbildung 26: Lipoxygenase-Gen-Anhäufung (*gene-cluster*) auf dem menschlichen Chromosom 17

Das Gen der 15-LOX-1 besteht aus 14 Exons und kodiert für eine mRNA mit einer Länge von 2.707 Basen. Das letzte Exon enthält einen relative großen 3'-untranslatierten Bereich, der repetitive Sequenzen enthält, die eine wichtige Rolle bei der Translationsregulation des Enzyms spielen. Mit ihren 662 Aminosäuren weist die humane 15-LOX-1 eine theoretische Molmasse von etwa 74,8 kDa auf.

Aus Abbildung 26 geht hervor, dass es zwei separate humane 15-LOX-Gene (*ALOX15* und *ALOX15B*) gibt, die für unterschiedliche Isoenzyme kodieren [Übersicht in KÜHN und THIELE, 1995 und KÜHN, 1999]. *ALOX15* kodiert für den Retikulozyten-Typ der 15-LOX (15-LOX-1) [RAPOPORT *et al.*, 1979; KÜHN, 1999]. Das Gen *ALOX15B* hingegen kodiert für den epithelialen Typ der 15-LOX (15-LOX-2) [BRASH *et al.*, 1997; BRASH *et al.*, 1999]. Da die Expression der epidermalen 15-LOX-2 in peripheren Monozyten vernachlässigbar gering

ist und auch nicht durch IL-4 reguliert wird, wurde dieses Isoenzym im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht in Betracht gezogen.

4.3.2. Fibronektin 1 (FN1)

Fibronektin 1 (FN1) ist ein dimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 440 kDa. Es besteht aus zwei fast identischen Untereinheiten, die am karboxyterminalen Ende über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Es kommt in drei prinzipiellen Isoformen im tierischen Organismus vor, die durch alternatives Spleißen und/oder alternative Transkriptionstermination gebildet werden [HYNES und YAMADA, 1982].

1. *Plasma-Fibronektin*: Lösliche dimere Form des FN1, das im Blut und anderen Körperflüssigkeiten vorkommt und an der Blutgerinnung, der Wundheilung und der Phagozytose beteiligt ist. Mit 300 µg/ml bildet es etwa 1% aller Serumproteine.
2. *Oberflächenfibronektin*: Membranintegrierte Form des FN1, die in den Extrazellulärraum hineinragt und funktionell als Adhäsionsmolekül angesehen werden kann. In dieser Form spielt das Protein eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell-Interaktion und bei der Wechselwirkung von Zellen mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix.
3. *Matrixfibronektin*: Unlösliche dimere oder polymere Form des FN1, die als wesentlicher Bestandteil der extrazellulären Bindegewebsmatrix fungiert. Es ist in der Lage, unlösliche Fibronektin-Fibrillen zu bilden und tritt mit anderen Bestandteilen der extrazellulären Matrix (Proteine, Glukosaminoglykane) in Wechselwirkung.

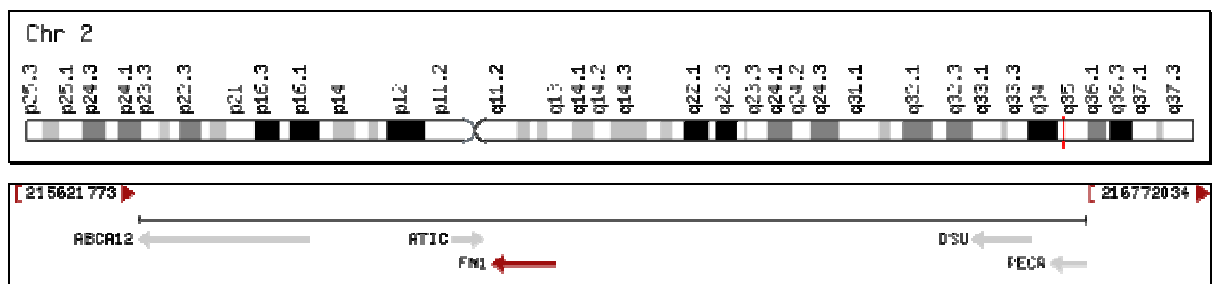


Abbildung 27: Lokalisation des Fibronektin-Gens auf dem Chromosom 2

Das Fibronektin-Gen ist eines der größten Gene des menschlichen Genoms. Es ist in einem 75.611 Basen langen Genabschnitt auf dem langen Arm des Chromosoms 2 im Bereich der Banden 34-35 lokalisiert (Abbildung 27). Das Gen besteht aus 47 Exons und 46 Introns und kodiert für unterschiedliche FN1-Isoformen, welche durch alternatives Spleißen aus dem Primärtranskript hervorgehen.

Dadurch entstehen unterschiedlich langem RNA- bzw. Protein-Isoformen, die 14 bis 47 Exons des ursprünglichen Gens umfassen. Bei den verschiedenen Spleißvarianten sind ein-

zelne Exons herausgeschnitten, so dass kürzere mRNA- bzw. Protein-Spezies entstehen. So unterscheiden sich z.B. die Isoformen 1 (vollständiges Transkript) und 4 dadurch, dass bei der Isoform 4 ein Exon des zentralen Teils des Primärtranskriptes herausgeschnitten wird. Die Isoform 3 unterscheidet sich andererseits von der Isoform 6 durch das Fehlen eines Exons im 3'-Bereich des Primärtranskriptes. Bei einigen Isoformen kommt es nicht zum Herauspleißen ganzer Exons, sondern zu einer Exonverkürzung. So unterscheiden sich die Isoformen 5 und 6 durch eine unterschiedliche Länge eines Exons im 3'-Bereich des Primärtranskriptes.

Tabelle 13: Isoformen des Fibronektins

Isoform	mRNA		Protein	
	Accession Nr.	Länge	Accession Nr.	Länge
Fibronectin 1 Isoform 1	NM_212482	8815 bp	NP_997647	2477 aa
Fibronectin 1 Isoform 2	NM_212475	8647 bp	NP_997640	2421 aa
Fibronectin 1 Isoform 3	NM_002026	8449 bp	NP_002017	2355 aa
Fibronectin 1 Isoform 4	NM_212478	8374 bp	NP_997643	2330 aa
Fibronectin 1 Isoform 5	NM_212476	8272 bp	NP_997641	2296 aa
Fibronectin 1 Isoform 6	NM_212474	7912 bp	NP_997639	2176 aa
Fibronectin 1 Isoform 7	NM_054034	2402 bp	NP_473375	657 aa

Für die Isoform 7, die nur den N-terminalen Anteil des Gesamtproteins darstellt, ist bisher noch nicht vollständig geklärt, ob es sich hierbei um reines Spleißphänomen handelt oder ob eine alternative Transkriptionstermination vorliegt [FRENCH-CONSTANT, 1995; ROMBERGER, 1997; MIYAMOTO *et al.*, 1998]. Die Translation dieser multiplen mRNAs führt zu unterschiedlichen Isoproteinen, deren Hauptvertreter in Tabelle 13 zusammengestellt sind.

4.3.3. CD23 (*niedrig affiner IgE-Rezeptor*)

Ig E umfasst eine Klasse von Immunglobulinen, die bei allergischen Erkrankungen eine besondere Rolle spielen. Für diese löslichen Plasmaproteine gibt es auf unterschiedlichen Zellen zwei prinzipielle Arten von Oberflächenrezeptoren, die für die IgE vermittelte funktionelle Veränderungen bedeutsam sind. Hoch-affine IgE-Rezeptoren werden vor allem in basophilen Granulozyten und Mastzellen exprimiert, während sich niedrig-affine IgE-Rezeptoren (CD23) besonders auf B-Zellen, aktivierten T-Zellen, Monozyten/Makrophagen, Eosinophilen, Thrombozyten, folliculären dendritischen Zellen und bestimmten Thymusepithelzellen nachweisen lassen [KIJIMOTO-OCHIAI, 2002]. CD23-defiziente Mäuse zeigen keine IgE-vermittelte antigenspezifische Verstärkung der Antikörperreaktion, was darauf hindeutet, dass CD23 in antigenpräsentierenden Zellen (B-Zellen, Makrophagen, dendritische

Zellen) eine Rolle bei der Antigenbindung bzw. Antigenpräsentation spielt [PAYET und CONRAD, 1999]. Weiterhin wirkt CD23 als Ligand für den CD19/CD21/CD81-Komplex, der als Korezeptor für den B-Zellrezeptor fungiert und scheint für die Regulation der IgE-Synthese bedeutsam zu sein.

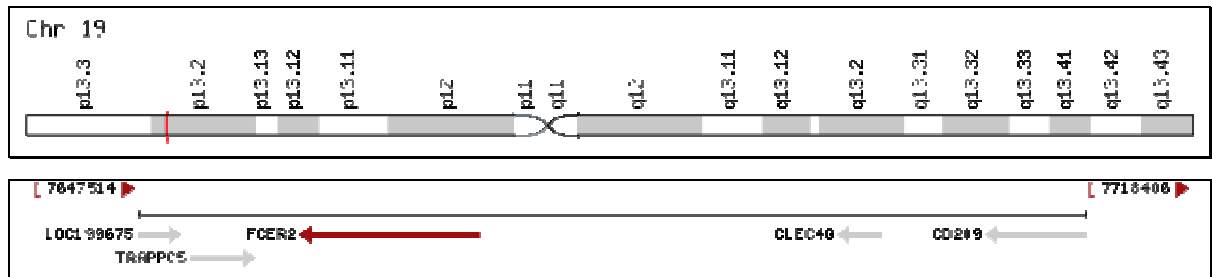


Abbildung 28: Lokalisation des *FCER2*-Gens (CD23) auf dem Chromosom 19

CD23 ist ein Typ-2-Membranprotein, das allerdings auch in löslicher Form sezerniert werden kann. Es besteht aus 321 Aminosäuren und hat ein theoretisches Molekulargewicht von ca. 34,5 kDa. Es ist stark glykosyliert und wandert in der Elektrophorese mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 45 kDa. Das *FCER2*-Gen, welches für CD23 kodiert, befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 19 im Bereich der Banden 13.3-13.2. (Abbildung 28). Es besteht aus 11 Exons und 10 Introns. Das erste Exon und Teile des 5'-Bereiches des zweiten Exons bilden die 5'-untranslatierte Region der CD23-mRNA. Auf genomischer Ebene ist dieser Bereich durch ein langes Intron (2.173 Basen) unterbrochen, das beim Spleißen normalerweise komplett herausgeschnitten wird.

4.3.4. *CD1c*-Antigen (*CD1c*)

Das CD1 Oberflächenantigen ist ein MHC (*Major Histocompatibility Complex*) ähnliches Protein, das von kortikalen Thymozyten und einigen antigenpräsentierenden Zellen wie B-Zellen, dendritischen Zellen und Langerhanszellen, sowie vom Darmepithel (Maus) exprimiert wird [PORCELLI und MODLIN, 1999; BLUMBERG *et al.*, 1991]. Beim Menschen existieren fünf Isoformen, die in zwei Gruppen unterteilt werden: Gruppe 1 (CD1a, CD1b, CD1c und eventuell auch CD1e) und Gruppe 2 (CD1d). CD1d kommt in allen bisher untersuchten Spezies vor. Bei der Maus gibt es nur zwei Isoformen (CD1.1 und CD1.2) [BLUMBERG *et al.*, 1995]. Wie MHC-I-Proteine sind auch die verschiedenen CD1-Proteine mit β_2 -Mikroglobulin nicht-kovalent assoziiert. Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit MHC-I-Proteinen scheint CD1c eine Rolle bei der Antigenpräsentation durch B-Zellen zu spielen. Dabei ist es jedoch nicht in der Lage, aufgearbeitete Antigenpeptide auf der

Zelloberfläche zu präsentieren. Vielmehr scheinen durch CD1c besonders Lipide und Glykolipide den T-Zellen präsentiert zu werden. [MELIAN *et al.*, 1996; BRIKEN *et al.*, 2000].

Andere Untersuchungen deuten auch darauf hin, dass CD1-Moleküle für die Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK1.1-CD4-T-Zellen) bedeutsam sind und damit eine wesentliche Rolle bei der angeborenen Immunantwort spielen. Werden NK1.1-CD4-T-Zellen bei unspezifischen Infektionen aktiviert, sezernieren sie große Mengen an IL-4, was zu einer Beschleunigung der Differenzierung von Th2-Zellen führt [SWAIN, 1993; RHIND, 2001]. Dadurch wird die Reaktion des erworbenen Immunsystems in ihrer Effektivität gesteigert, da nun verstärkt Immunglobuline (IgG, IgE) durch B-Zellen gebildet werden können. Gleichzeitig wird durch das IL-4 die Expression von CD1c in Monozyten hochreguliert und damit möglicherweise die Antigenpräsentation dieser Zellen effektiviert.

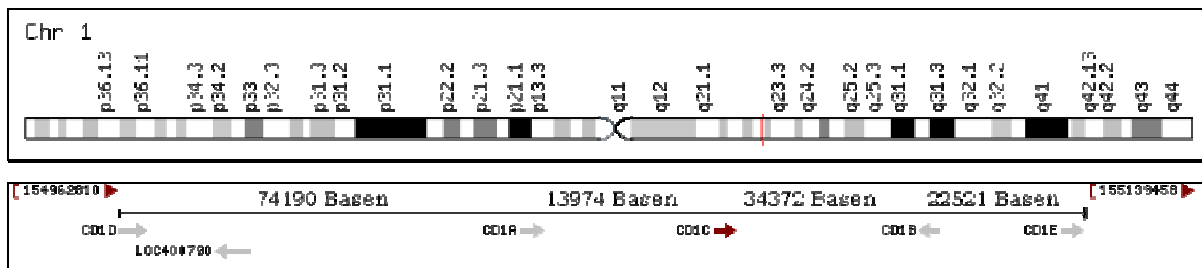


Abbildung 29: Lokalisation des CD1c-Gens auf dem Chromosom 1

Das Gen für CD1c liegt auf einem ca. 3.600 Basen langen Genabschnitt auf dem langen Arm des Chromosoms 1 im Bereich der Banden 22-23.1. (Abbildung 29). Neben dem CD1c befinden sich in unmittelbarer Nähe auch die Gene für CD1a (etwa 13.974 Basen entfernt), CD1b (etwa 34.372 Basen entfernt) und CD1e (etwa 60.372 Basen entfernt). Der Abstand zu CD1d ist größer und beträgt etwa 105.118 Basen.

Das *CD1c*-Gen besteht aus 6 Exons und 5 Introns. Die mRNA hat eine Länge von 1.207 Basen und kodiert für ein Type I Membranprotein, das aus 333 Aminosäuren besteht. Die theoretische Molmasse von CD1c ist ca. 37,6 kDa. Durch posttranslationale Modifizierung (Mehrfachglykosylierung) entsteht jedoch ein ca. 43 kDa schweres Glykoprotein, das in die Zellmembran eingebaut wird, wobei der Hauptanteil der Kohlenhydratreste in den Extrazellularraum ragt.

4.3.5. Monoaminoxidase A (MAOA)

Monoaminoxidasen katalysieren die oxidative Desaminierung von biogenen und xenobiotischen Monoaminen. Bei dieser Reaktion entstehen neben dem Aldehyd auch Ammoniak (NH₃) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Durch die Produktion von Wasserstoffperoxid wird das intrazelluläre Oxidationspotenzial erhöht.

Zusammen mit der semikarbazid-sensitiven Amin-Oxidase (SSAO, EC 1.4.3.6) regulieren die Monoaminoxidasen die systemische Konzentration biogener Amine, die als vasoaktive Hormone, Neurotransmitter und Entzündungsmediatoren wirken. Weiterhin metabolisieren sie xenobiotische Amine, die vor allem über die Nahrung aufgenommen werden und dadurch den Körper vor deren toxischen Wirkungen schützen.

Das *MAOA*-Gen besteht aus 15 Exons und 14 Introns und die zugehörige mRNA hat eine Länge von 4.090 Basen und kodiert für das funktionelle Enzym, das mit seinen 527 Aminosäuren eine theoretische Molmasse von etwa 60 kDa besitzt. Die ungewöhnliche Größe der 3'-UTR (2.300 Basen) deutet darauf hin, dass in diesem Bereich des Transkriptes Regulationssequenzen lokalisiert sind, die die Translation der mRNA kontrollieren. Das Exon 12 kodiert für den flavin-bindenden Bereich der MAO-A. Dieser Teil des Gens weist eine sehr hohe Sequenzhomologie zur MAO-B auf, während andere Strukturbereiche deutliche Isoform-spezifische Unterschiede zeigen. Obwohl die Promotoren beider MAO-Gene strukturell sehr ähnlich sind, gibt es ein unterschiedliches Muster an *cis*-regulatorischen Elementen [CHEN, 2004].

MAO-A-defiziente Mäuse zeigen einen erhöhten Plasmaspiegel an Serotonin, Norepinephrin und Dopamin und sind anfällig gegenüber stress-auslösenden Reizen. Außerdem wurde bei diesen Tieren eine Tendenz zu aggressivem Verhalten festgestellt [CASES *et al.*, 1995]. Beim Menschen steht ein Verlust der MAO-A-Aktivität im Zusammenhang mit verschiedenen Verhaltensanomalien (Brunner Syndrom). Dabei steht impulsives und aggressives Verhalten im Vordergrund [BRUNNER *et al.*, 1993]. Hemmstoffe der MAO-A werden auch als Antidepressiva eingesetzt.

4.3.6. Gerinnungsfaktor XIII-A (fibrinstabilisierender Faktor, F13A1)

Gerinnungsfaktoren sind spezifische Plasmaproteine, die überwiegend in der Leber gebildet werden. Durch Aktivierung dieser Faktoren kommt es zur Initiation der plasmatischen Gerinnungskaskade, die letztlich in der Polymerisation von löslichem Fibrinogen zum unlöslichen Fibrinpolymer gipfelt. Die einzelnen Gerinnungsfaktoren (I bis XIII) werden durch römische Zahlen symbolisiert. Bei der Fibrinpolymerisation kommt es zunächst zur Bildung eines nichtkovalent vernetzten Polymers, welches dann durch den Faktor XIII kovalent stabilisiert wird. Im Unterschied zu anderen Gerinnungsfaktoren, die meist als Proteinasen wirken, ist der Faktor XIII eine Transglutaminase und katalysiert die kovalente Vernetzung von Glutamyl- und Lysyl-Seitenketten unter Bildung einer Amidbindung [ADANY und BARDOS, 2003]. Die aktive Transglutaminase wird aus einer enzymatisch inaktiven Vorstufe (Pro-

Transglutaminase) durch limitierte Proteolyse aktiviert und diese Reaktion wird durch Thrombin katalysiert. Durch die kovalente Vernetzung erhöht sich die mechanische Stabilität des Fibrinpolymers.

Die Transglutaminaseaktivität des FXIII ist nicht auf das Fibrinpolymer beschränkt. So katalysiert FXIII auch die extrazelluläre kovalente Vernetzung anderer Proteine (Fibronectin, Kollagen, Osteopontin) und spielt damit für die Ausbildung der geordneten Struktur der extrazellulären Bindegewebsmatrix und des Knochens eine wichtige Rolle [PRINCE *et al.*, 1991; AESCHLIMANN *et al.*, 1996; CUCUIANU und DICAN, 2003]. Weiterhin reagiert FXIII auch mit Strukturproteinen, die z.B. beim Abheilen von Verletzungen (Fibronectin, Kollagen, Vinkulin) beteiligt sind. Damit scheint FXIII auch bei der Heilungsphase der Entzündung (*inflammatory resolution*) bedeutsam zu sein.

Proteinchemisch besteht FXIII (EC 2.3.2.13) aus zwei Polypeptidketten (A- und B-Kette), die sich zu einem A₂B₂-Tetramer zusammenlagern [MCDONAGH, 1994]. Die A-Kette ist für die katalytische Aktivität des Tetramers verantwortlich, während die B-Kette vorwiegend dem Schutz und der Stabilisierung der A-Kette dient [MARY *et al.*, 1988]. Intrazellulär kommt FXIII auch isoliert als A-Kettendimer im Zytosol von Thrombozyten, Megakaryozyten, Makrophagen bzw. Monozyten sowie in Plazenta, Uterus und Prostata vor [ADANY, 1996; KRADIN *et al.*, 1987; MUSZBEK *et al.*, 1999].

Das Gen für die A-Kette des FXIII ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 lokalisiert (Abbildung 30). Das Gen für die B-Kette liegt hingegen auf dem langen Arm von Chromosom 1 und besteht aus 12 Exons und 11 Introns. Die Expressionsdaten deuten darauf hin, dass das *F13B*-Gen in Monozyten weder vor noch nach IL-4-Stimulierung exprimiert wird.

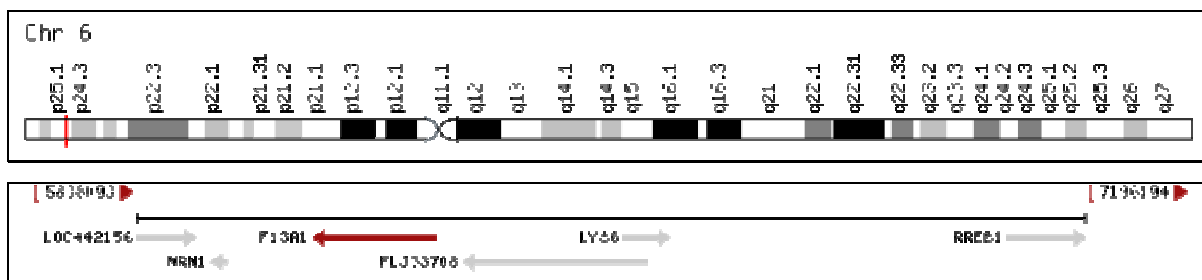


Abbildung 30: Lokalisation des FXIII-A-Gens auf dem Chromosom 6

Das *F13A1*-Gen besteht aus 15 Exons und 14 Introns und die dazu gehörige mRNA hat eine Länge von 3.833 Basen. Es kodiert für ein 732 Aminosäuren umfassendes Präprotein mit einem theoretischen Molekulargewicht von ca. 83,2 kDa. Das Protein ist in der Lage 1 Mol Kalzium pro Mol Polypeptid mit hoher Affinität zu binden und kommt im Zytosol vieler Zellen vor, kann aber auch nach extrazellulär exportiert werden. Klinisch wurde ein auto-

somal rezessiv vererbbarer FXIII-A Mangel beschrieben, der durch eine erhöhte Blutungsneigung, verschlechterte Wundheilung und spontane Aborte gekennzeichnet ist. Weitere Symptome, die fakultativ auftreten können, sind ausgedehnte subkutane und intramuskuläre Hämatome sowie intrakranielle Blutungen.

4.3.7. *CD20L1 (Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4, MS4A4A)*

CD20L1 ist ein Zelloberflächenprotein, welches zur Familie der membranspannenden A4-Gene gehört [LIANG und TEDDER, 2001]. Es wird vor allem auf B-Lymphozyten exprimiert, lässt sich aber auch auf nicht-lymphoiden hämatopoetischen Zellen nachweisen. Eine Reihe von *in vitro* kultivierten hämatopoetischen Zelllinien exprimiert unterschiedliche Vertreter dieser Enzymfamilie. Alle Repräsentanten dieser Proteinfamilie werden aus ähnlichen strukturellen Elementen aufgebaut und die kodierenden Gene weisen eine nahezu identische Exon/Intron-Organisation auf. Durch alternatives Spleißen der Primärtranskripte werden mehrere mRNA-Varianten erzeugt, was letztlich zur Expression einer Vielzahl von Isoformen führt [LIANG *et al.*, 2001].

CD20L1 ist ein 239 Aminosäuren umfassendes, integrales Membranprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 25,4 kDa. Bisher wurden zwei verwandte Transkripte nachgewiesen (siehe unten), die entweder durch alternatives Spleißen aus einem gemeinsamen Primärtranskript gebildet werden oder durch differenzielle Transkriptionsinitiation entstehen. Die biologische Funktion von CD20L1 sowie der anderen Vertreter dieser Proteinfamilie ist noch unklar. Möglicherweise bilden CD20-Oligomere in der Zellmembran einen Kalzium-Kanal, der bei der B-Zellaktivierung bedeutsam sein könnte. Andere experimentelle Daten deuten darauf hin, dass CD20-Isoformen, u.a. auch CD20L1, multimere Rezeptoren bildet, deren Funktion aber noch völlig unklar ist [ISHIBASHI *et al.*, 2001].

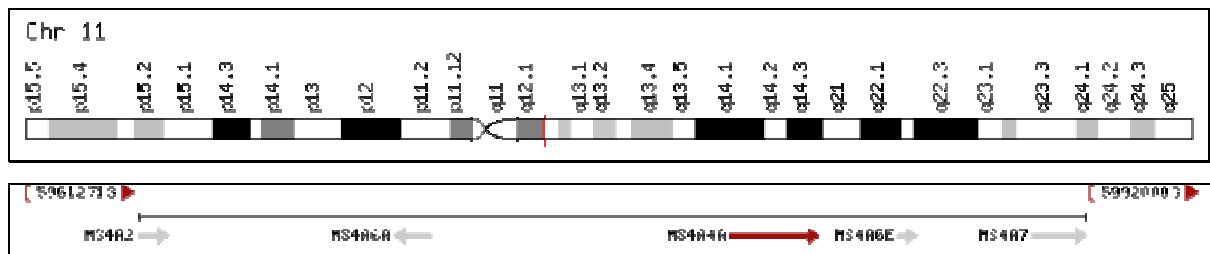


Abbildung 31: Lokalisation des CD20L1-Gens auf dem Chromosom 6

Das *CD20L1*-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 11 im Bereich der Bande 12 lokalisiert (Abbildung 31). Es ist Bestandteil eines größeren *Gen-Clusters* (ca. 0,75 Mio. Nukleotide), der elf Gene derselben Familie enthält. Das Gen besteht aus 7 Exons und 6 Introns. Wie oben erwähnt wurden bisher zwei alternative mRNA-Spezies des CD20L1 ent-

deckt. Die kurze mRNA, die das Exon 1 nicht enthält, hat eine Länge von 1.543 Basen und kodiert für ein Protein mit 220 Aminosäuren. Die lange mRNA besitzt eine Länge von 1.619 Basen und verschlüsselt ein Protein mit 239 Aminosäuren.

Auf Proteinebene bedeutet diese genetische Konstellation eine N-terminale Heterogenität. Bislang ist noch nicht abschließend geklärt, ob die Ursache für diese Transkriptduplizität ein alternatives Spleißen eines gemeinsamen Primärtranskripts ist oder ob es zu einer alternativen Transkriptionsinitiation kommt.

4.3.8. Chemokin-Ligand 22 (*Small inducible cytokine A22, CCL22*)

Small inducible cytokines sind kleine Sekretproteine, die überwiegend als Botenstoffe für Entzündungszellen fungieren und deren Migration bzw. Aktivitätszustand beeinflussen [ONO *et al.*, 2003]. Damit spielen sie bei der Pathogenese der akuten bzw. chronischen Entzündung eine wesentliche Rolle. CCL22 ist ein Vertreter dieser Proteinfamilie und hat ein theoretisches Molekulargewicht von 10,6 kDa. Es besteht aus 93 Aminosäuren und wird von Makrophagen, dendritischen Zellen, aktivierten B-Lymphozyten und Monozyten als Sekretprotein in den Extrazellulär-Raum abgegeben. Dort kommt es zu einer limitiert-proteolytischen Spaltung des Vorläuferproteins, wodurch mindestens 3 verschiedene bioaktive Spaltpeptide (*Makrophage-derived cytokine 3-69, Macrophage-derived cytokine 5-69 und Macrophage-derived cytokine 7-69*) entstehen [VULCANO *et al.*, 2001].

CCL22 wirkt chemotaktisch auf chronisch aktivierte T-Lymphozyten, Monozyten, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen. Dagegen wirkt es nicht auf neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie auf nicht-aktivierte T-Zellen. Interessanterweise entfalten die proteolytischen Spaltpeptide keine chemotaktische Wirkung auf die genannten Zellen, so dass die extrazelluläre limitierte Proteolyse als Abbaumechanismus des Biomediators angesehen werden kann.

CCL22 wird in einer großen Anzahl von Zellen exprimiert. Dazu gehören vor allem aktivierte Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen und verschiedene Arten von Thymozyten. Weiterhin konnten hohe Expressionsraten von CCL22 in Lymphknoten und in der *Appendix vermiformis* (Darmtonsille, „Wurmfortsatz“) nachgewiesen werden. In geringeren Mengen wird CCL22 auch in Lunge und Milz exprimiert. Eine erhöhte Expression des Proteins wurde in der Haut von Patienten beschrieben, die an atopischer Dermatitis, an allergischer Kontaktdermatitis oder Psoriasis leiden. Diese Daten belegen eine Bedeutung von CCL22 bei immunologischen Prozessen [YAMASHITA und KURODA, 2002].

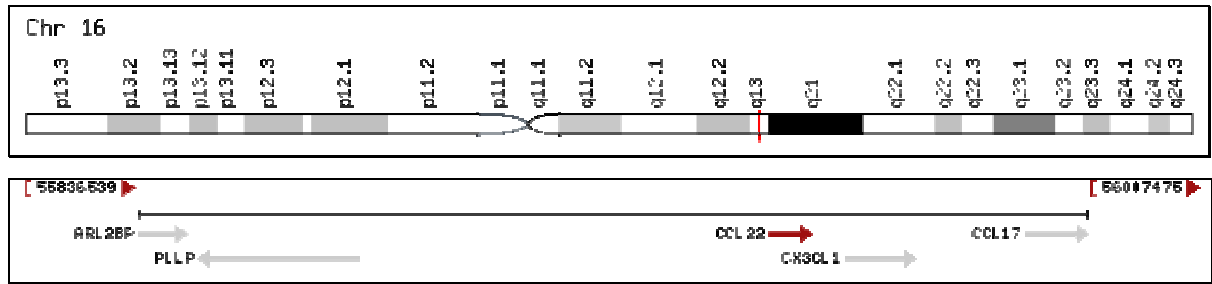


Abbildung 32: Lokalisation des CCL22-Gens auf dem Chromosom 16

Das Gen für CCL22 ist auf dem langen Arm des Chromosoms 16 im Bereich der Bande 13 lokalisiert (Abbildung 32). Es besteht aus 3 Exons und 2 Introns. Der größte Teil des Exons 3 bildet die 3'-UTR der CCL22-mRNA. Die ungewöhnliche Größe der 3'-UTR (2.600 Basen) deutet darauf hin, dass in diesem Bereich des Transkriptes Regulationssequenzen lokalisiert sind, die die Translation der mRNA kontrollieren.

4.4. Kurzcharakterisierung der am stärksten herunterregulierten Genprodukte

4.4.1. Interferon-induzierbares Protein 44-like (*IFI44L*)

Bei diesem Genprodukt handelt es sich um ein bisher nicht näher charakterisiertes Protein, das aus 413 Aminosäuren besteht. Sein theoretisches Molekulargewicht liegt bei 47 kDa. Es weist eine 38%-ige Sequenzhomologie zum Interferon- γ -induzierten Protein 44 (IFI44) auf. Unklar ist jedoch, ob die Expression des IFI44L durch Interferon- γ (IFN- γ) stimuliert wird. Da Interferon- γ und IL-4 häufig gegenläufige Regulationsmechanismen induzieren, scheint eine Hochregulation von IFI44L durch Interferon- γ wahrscheinlich zu sein. Das Gen für dieses Protein liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 1 im Bereich der Bande 31.1. in unmittelbarer Nähe zum IFI44 (Abbildung 33). Die mRNA hat eine Länge von 2.058 Basen.

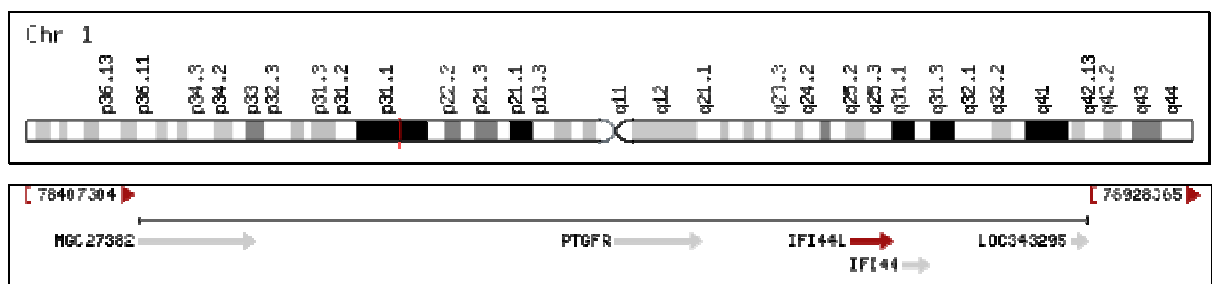


Abbildung 33: Lokalisation des IFI44L-Gens auf dem Chromosom 1

Das *IFI44L*-Gen besteht aus 9 Exons und 8 Introns. Das komplette erste Exon und ein Teil des zweiten Exons bilden die 5'-UTR der mRNA. Der Abstand zwischen Exon 1 und Exon 2 beträgt etwa 7.334 Nukleotide. Die 3'-UTR der mRNA wird von einem großen Teil des Exons 9 gebildet.

4.4.2. CD169 (Sialoadhesin, SN, SIGLEC1)

Sialoadhesin (SN, SIGLEC1) ist ein Vertreter der Immunglobulin-Superfamilie und stellt funktionell ein Lektin-ähnliches Adhäsionsmolekül dar, das in der Zellmembran von Makrophagen verankert ist (Isoform 1) [KELM *et al.*, 1994]. Es besteht aus 1.709 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von mehr als 180 kDa.

Struktur-Simulationen haben gezeigt, dass das vollständige Protein mehrere Immunglobulin-ähnliche C2-Domänen und eine Immunglobulin-ähnliche Typ-V-Domäne enthält. Als natürliche Liganden wurden unterschiedliche Glykokonjugate identifiziert, die Sialinsäure enthalten. Nach seiner Struktur ist Sialoadhesin ein Typ-2-Transmembranprotein, das bei der Zell-Zell-Interaktion bedeutsam zu sein scheint [CROCKER *et al.*, 1994]. Vermittelt durch dieses Protein können Makrophagen mit Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten und natürlichen Killerzellen in direkten Kontakt treten. Wahrscheinlich wird durch alternatives Spleißen ein zweites Isoprotein hergestellt, das nicht mehr membranassoziiert ist, sondern gelöst im Zytoplasma vorkommt. Große Mengen an Sialoadhesin wurden in der Milz, in Lymphknoten, in perivaskulären Makrophagen und im Gehirn nachgewiesen. In geringeren Konzentrationen wird das Protein im Knochenmark, in Kupferschen Sternzellen der Leber, im Kolon und in der Lunge exprimiert. Bei der entzündlichen rheumatoiden Arthritis wird es in großen Mengen von entzündlichen Makrophagen gebildet [HARTNELL *et al.*, 2001].

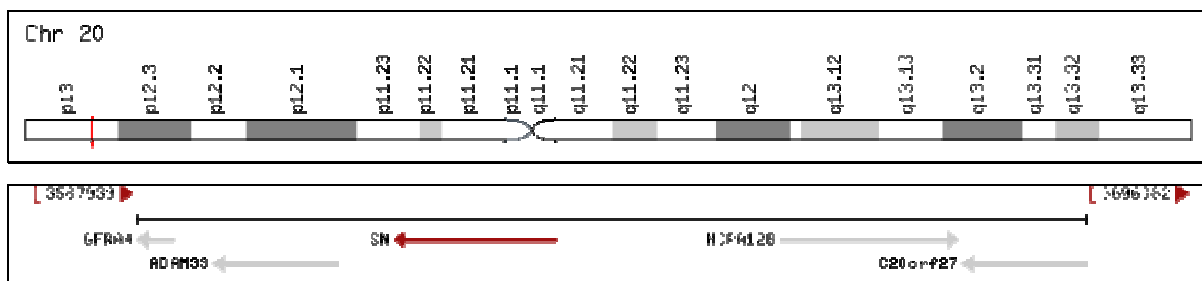


Abbildung 34: Lokalisation des SIGLEC1-Gens auf dem Chromosom 20

Das *SIGLEC1*-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 20 im Bereich der Bande 13 lokalisiert (Abbildung 34). Es besteht aus 21 Exons und 20 Introns und die komplett prozessierte mRNA hat eine Länge von 5.130 Basen.

4.4.3. Calmegin (CLGN)

Calmegin ist ein Testis-spezifisches Protein, das im endoplasmatischen Retikulum testikulärer Zellen gefunden wird [WATANABE *et al.*, 1994]. Es besitzt Chaperonaktivität und spielt eine Rolle bei der Spermatogenese und damit bei der männlichen Fertilität. Es wurde gezeigt, dass *Calmegin* kotranslational an entstehende Polypeptidketten während der Sperma-

togenese bindet und damit eine ordnungsgemäße Faltung des neusynthetisierten Proteins gewährleistet. *Calmegin* weist eine hohe Strukturhomologie zum *Calnexin* auf, das als ubiquitäres Chaperonprotein im endoplasmatischen Retikulum von Säugerzellen vorkommt und für das Aussortieren von inkomplett oder falsch gefalteten Proteinen bedeutsam ist [IKAWA *et al.*, 1997; TANAKA *et al.*, 1997].

Homozygote *Calmegin*-Mangel-Mäuse sind nicht fortpflanzungsfähig, obwohl die Spermatogenese scheinbar normal abläuft und auch keine Auffälligkeiten im Paarungsverhalten der Tiere nachzuweisen sind [IKAWA *et al.*, 2001]. *In vitro*-Fertilisationsexperimente zeigten jedoch, dass Spermien von diesen Tieren nicht an der *Zona pellucida* (Schutzhülle der Oozyte) haften. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Chaperonfunktion des *Calmegin* für die ordnungsgemäße Faltung von Spermienproteinen verantwortlich ist, die für den Kontakt zwischen Spermium und Eizelle bedeutsam sind [YAMAGATA *et al.*, 2002]. Über eine extratestikuläre Expression von *Calmegin* ist bisher nur wenig bekannt. In den Monozytenpräparationen fand sich die *Calmegin*-mRNA nur in geringen Konzentrationen und wurde durch Stimulierung mit IL-4/13 noch weiter abgesenkt.

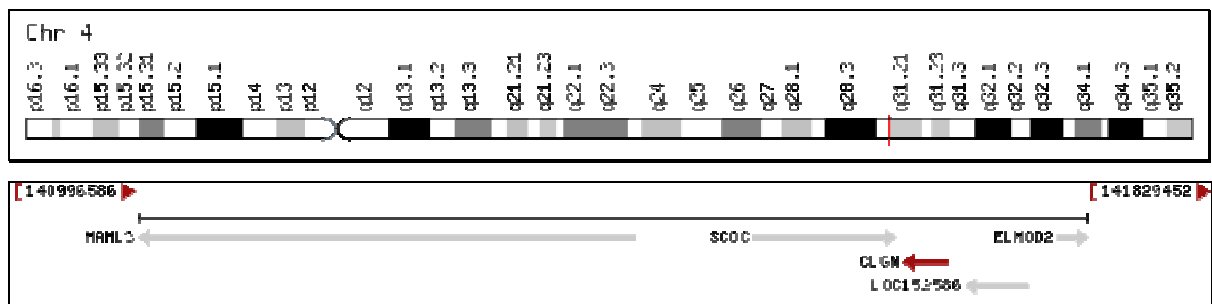


Abbildung 35: Lokalisation des CLGN-Gens auf dem Chromosom 4

Das *CLGN*-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 4 im Bereich der Banden 28.3-31.1 lokalisiert (Abbildung 35). Es besteht aus 15 Exons und 14 Introns, und die dazugehörige mRNA hat eine Länge von 2.710 Basen. Das erste Exon bildet die 5'-UTR der mRNA und große Teile des letzten Exons kodieren für die 3'-UTR. Der Abstand von Exon 1 zu Exon 2 beträgt etwa 14.450 Nukleotide. Das fertige Translationsprodukt besteht aus 610 Aminosäuren, besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von etwa 70 kDa und bindet Kalzium mit hoher Affinität.

4.4.4. *Orosomucoid 1 (ORM1)*

Orosomucoid 1 (saures α 1-Glykoprotein 1, ORM1) gehört der Lipokalin-Familie und ist ein klassisches Akutphasen-Protein, dessen Plasmaspiegel 5- bis 50-fach hochreguliert wird, wenn beim Patienten eine Entzündung oder ein ausgedehnter Gewebeschaden vorliegt

[FRIEDMAN, 1983]. Die Plasmakonzentration erreicht maximale Werte 3-5 Tage nach Einsetzen der Entzündung. Da *Orosomucoid*, wie die meisten Akutphasen-Proteine vor allem in der Leber synthetisiert und danach extrazellulär abgegeben wird, deutet ein verringerter Plasmaspiegel auf einen Leberschaden hin. Die hepatische Expression von *Orosomucoid* wird durch Glukokortikoide gehemmt und durch klassische pro-inflammatorische Zytokine (IL-1, IL-6) hochreguliert [PROWSE und BAUMANN, 1989; FOURNIER *et al.*, 2000]. Unsere Ergebnisse deuten auf eine Herunterregulation der monozytären *Orosomucoid*-Expression hin, was einen anti-inflammatorischen Charakter des IL-4 nahelegt. Obwohl die spezifische physiologische Funktion von *Orosomucoid* noch nicht geklärt ist, deuten vereinzelt experimentelle Daten auf eine Modulatorrolle bei der Immunreaktion hin.

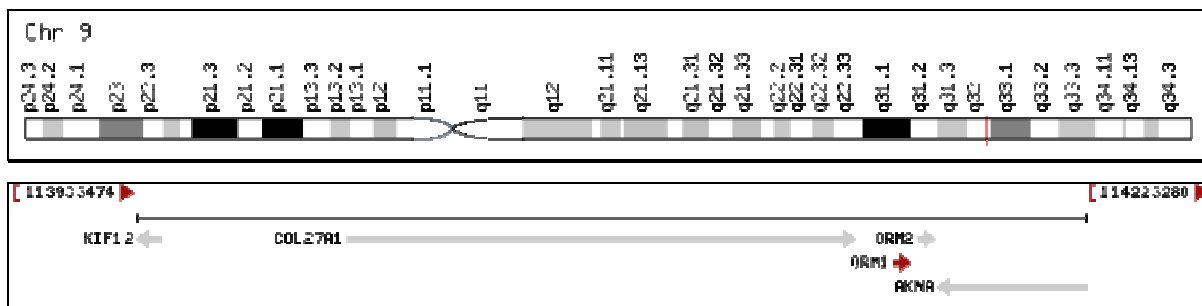


Abbildung 36: Lokalisation des ORM1-Gens auf dem Chromosom 9

Das *ORM1*-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 9 im Bereich der Banden 31-32 lokalisiert (Abbildung 36) in unmittelbarer Nachbarschaft zum *ORM2*-Gen. Es besteht aus 6 Exons und 5 Introns. Die komplett prozessierte mRNA hat eine Länge von 803 Basen und kodiert für das *Orosomucoid-1*-Präkursorprotein, das mit seinen 201 Aminosäuren ein theoretisches Molekulargewicht von etwa 23,5 kDa besitzt. Glykosyliert hat es eine Molmasse von etwa 41-43 kDa. Durch limitierte Proteolyse wird aus diesem Vorläufermolekül das im Plasma zirkulierende Akutphasenprotein hergestellt.

4.4.5. Komplement-Komponente 1s (C1-Esterase, C1s)

C1 ist ein wesentlicher Faktor des Komplement-Systems [VALET und COOPER, 1974; LOOS *et al.*, 1976], das dem humoralen Arm des angeborenen Immunsystems zuzurechnen ist. Dieses System besteht ähnlich wie das Gerinnungssystem aus mehreren Proteinfaktoren, die als inaktive Vorstufen im strömenden Blut kreisen. Die Komplement-Kaskade kann über einen klassischen (Immunglobulin-vermittelt) und/oder alternativen Weg (Pathogen-vermittelt) aktiviert werden. Dabei kommt es zur limitiert proteolytischen Spaltung einzelner Komplementfaktoren und zur Bildung hochmolekularer Komplementkomplexe in der Zellmembran der Pathogene, was letztlich zu einer osmotischen Lyse der Krankheitserreger

führt. C1 besteht aus 3 unterschiedlichen Komponenten (C1q, C1r und C1s im molaren Verhältnis von 1:2:2) und steht am Beginn des klassischen Weges der Komplementaktivierung [SIM *et al.*, 1977; LIN und FLETCHER, 1980; ARLAUD *et al.*, 1998]. Durch Assoziation von C1q an den Fc-Teil von IgG bzw. IgM, das auf der Pathogenoberfläche gebunden ist, wird die Proteinase C1r aktiviert. Diese ist nun in der Lage, C1s limitiert hydrolytisch zu spalten, wodurch die inaktive Serinproteinase C1s in eine enzymatisch aktive Form umgewandelt wird. Diese Aktivierung besteht im Wesentlichen in einer Erhöhung der Bindungsaffinität von C1s für seine physiologischen Substrate, die Komplementfaktoren C2 und C4. Damit werden C2 und C4 besser gebunden und können schneller proteolytisch gespalten werden. Die limitiert proteolytische Spaltung von C2 und C4 entspricht funktionell wiederum der Aktivierung inaktiver Proteinase, die dann ihrerseits andere Faktoren des Komplementsystems aktivieren können [ARLAUD *et al.*, 1998].

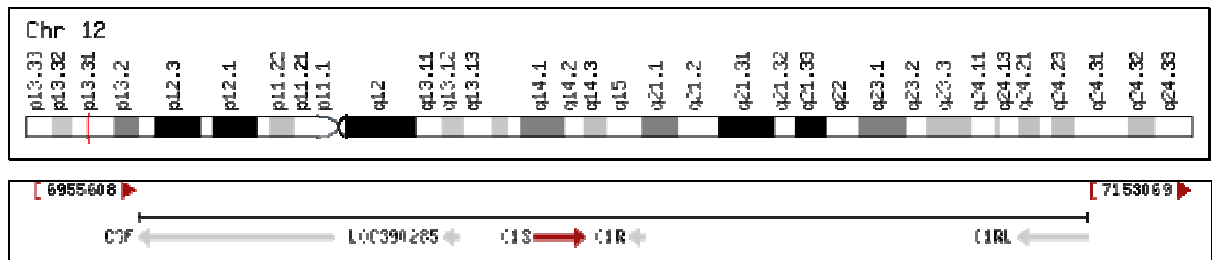


Abbildung 37: Lokalisation des C1s-Gens auf dem Chromosom 12

Das *C1s*-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12 im Bereich der Bande 13.31 lokalisiert (Abbildung 37). Es besteht aus 12 Exons und 11 Introns. Bisher wurden zwei unterschiedliche Transkriptvarianten nachgewiesen, die sich in der Länge des zweiten Exons unterscheiden. Da aber dieser Bereich in der 5'UTR der *C1s*-mRNA fällt, sind die entsprechenden Translationsprodukte nicht voneinander zu unterscheiden. *C1s* (EC 3.4.21.42) besteht aus 688 Aminosäuren und hat ein theoretisches Molekulargewicht von 76,7 kDa.

4.4.6. *CD107b* (Indolamin-pyrrol-2,3-Dioxygenase, *INDO*, *IDO*)

CD107b (EC 1.13.11.42) ist ein lysosomales Membranprotein, das nach Zellaktivierung auf der Zelloberfläche erscheint. Es ist vor allem auf aktivierten T-Zellen, aktivierten Neutrophilen und aktivierten Thrombozyten nachweisbar. Jüngere experimentelle Ergebnisse haben gezeigt, dass *CD107b* ein Enzym ist, das Indolamin-2,3-Dioxygenase-Aktivität aufweist [KANNAN *et al.*, 1996]. Damit ist es in der Lage, den Indolring des Tryptophans oxidativ zu spalten, wobei aus L-Tryptophan N-Formylkynurenin entsteht. Da es sich beim Tryptophan um eine essentielle Aminosäure handelt, sollte eine Überexpression des Enzyms zu Störungen im Aminosäurestoffwechsel und in der Proteinsynthese führen. Interferon- γ führt zu ei-

ner Hochregulation der Expression von CD107b. Da IL-4 und INF- γ häufig inverse Effekte auslösen, ist die von uns beobachtete Herunterregulation der CD107b-Expression durch IL-4 eine plausible Konsequenz [MUSO *et al.*, 1994].

Da CD107b in den Stoffwechsel der essentiellen Aminosäure Tryptophan eingreift, bedeutet eine Hochregulation des Enzyms eine Hemmung der zellulären Proteinbiosynthese durch einen relativen Tryptophan-Mangel. So konnte gezeigt werden, dass die INF- γ -induzierte Hochregulation der CD107b-Expression eine bedeutsame Rolle beim antiviralen Schutz von Epithel-, Endothel- und Astrogliazellen spielt [GRANT *et al.*, 2000; OBERDORFER *et al.*, 2003]. Durch Aktivierung des Enzyms kommt es zum relativen Tryptophan-Mangel und damit zur Repression der Synthese viraler Proteine. Ähnliche Vorgänge werden als mechanistische Grundlage für die bakteriostatische und antiproliferative Wirkung von CD107b vermutet [MACKENZIE *et al.*, 1999].

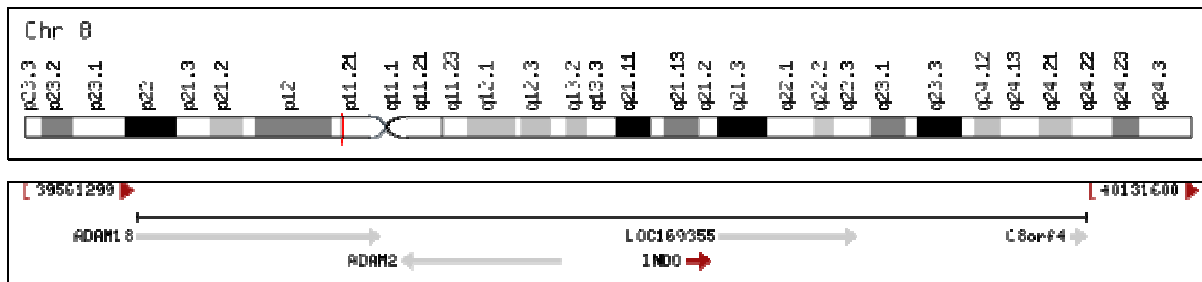


Abbildung 38: Lokalisation des CD107b-Gens auf dem Chromosom 8

Das *INDO*-Gen ist dem kurzen Arm des Chromosoms 8 im Bereich der Banden 12-11 lokalisiert (Abbildung 38). Es besteht aus 10 Exons und 9 Introns. Die zugehörige mRNA hat eine Länge von 1.655 Basen und kodiert eine funktionsfähige Indolaminpyrrol-2,3-Dioxygenase, die mit ihren 403 Aminosäuren ein theoretisches Molekulargewicht von etwa 45,3 kDa besitzt. Für die katalytische Funktion von CD107b ist eine Hämgruppe essentiell.

4.4.7. Interferon-stimuliertes Exonuklease-Gen 20 kDa (*ISG20*)

Dieses nukleäre 20,3 kDa-Protein besitzt starke Exonukleaseaktivität (EC 3.1.13.1) für einzelsträngige RNA und ist auch in der Lage, DNA zu schneiden. Allerdings läuft die DNA-Einzelstrangspaltung mit 35-fach geringerer Geschwindigkeit ab [NGUYEN *et al.*, 2001]. Die Spaltung verläuft ausschließlich in eine Richtung (vom 3'-Ende zum 5'-Ende) und liefert Nukleosid-5'-phosphat. Das Protein wird in hohem Maße in peripheren Leukozyten, in der Milz, im Thymus, im Kolon und in der Lunge exprimiert. Durch Interferone wird die Expression von *ISG20* hochreguliert [MATTEI *et al.*, 1997; ESPERT *et al.*, 2003], dieser Befund stimmt mit der von uns beobachteten Herunterregulation durch IL-4 überein. Die

biologische Funktion von *ISG20* ist noch unklar, aber es wird vermutet, dass die Hochregulation durch Interferon einen Teil der zellulären Abwehrreaktion gegen Viren darstellt.

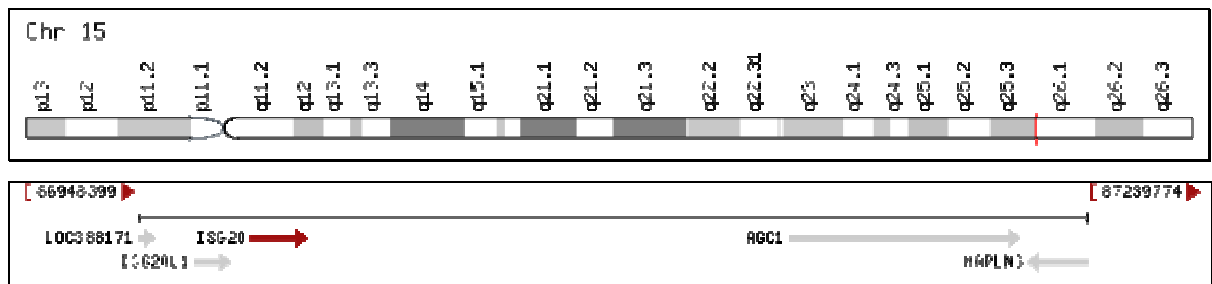


Abbildung 39: Lokalisation des ISG20-Gens auf dem Chromosom 15

Das *ISG20*-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 15 im Bereich der Bande 26 lokalisiert (Abbildung 39). Es besteht aus 4 Exons und 3 Introns, wobei das erste Exon komplett die 5'-UTR der zugehörigen mRNA kodiert. Die mRNA hat eine Länge von 974 Basen und kodiert ein Protein, welches aus 181 Aminosäuren besteht, eintheoretisches Molekulargewicht von etwa 20,4 kDa besitzt und zwei Mangan-Ionen als Kofaktor benötigt. Die Aminosäurereste Met14 und Arg53 sind für den katalytischen Mechanismus der Exonuklease-Aktivität von großer Bedeutung [NGUYEN *et al.*, 2001; HORIO *et al.*, 2004]. Sie scheinen Wasserstoffbrücken zur 2'-OH Gruppe der Uridin-5'-monophosphat-Ribose auszubilden und fixieren damit die Substrat-RNA am aktiven Zentrum des Enzyms. In Gegensatz dazu wird Desoxyribose nicht gebunden, was den Unterschied in der Nukleinsäurespezifität des Enzyms erklärt [HORIO *et al.*, 2004].

4.4.8. Einwärts-gleichrichtender Kalium-Kanal (Kir-Kanal, *KCNJ15*)

Kaliumkanäle werden sowohl in eukaryontischen als auch prokaryontischen Zellen exprimiert und spielen bei einer großen Anzahl von physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Über 120 verschiedene Kaliumkanal-Gene sind beim Menschen bekannt, die in allen Geweben und Organen vorkommen und multiple Funktionen, wie Osmoseregulation, K^+ -Homöostase, sekretorische Prozesse, Signaltransduktion und der Regulation des Membranpotenzials sowohl erregbarer als auch nicht-erregbarer Zellen ausüben können. Zwischen zwei Transmembrandomänen befindet sich die H5- oder P-Schleife, mit der hoch-konservierten Aminosäuresequenz TxxTxGYG, die in allen Kaliumkanälen gemeinsam ist. Dieser Abschnitt ist auch für die K^+ -Ionenselektivität verantwortlich [HEGINBOTHAM *et al.*, 1994]. Beim *KCNJ15* (*Kalium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 15*) handelt es sich um einen so genannten einwärts-gleichrichtenden Kalium-Kanal (Kir). Die Besonderheit dieses Kanals besteht darin, dass er sich bei einer Depolarisation der Zelle schließt und auf

diese Weise einem repolarisierenden Auswärtsstrom von Kalium-Ionen entgegenwirkt. In der Regel, ist er im Ruhepotenzial offen. Dabei werden Kalium-Ionen von der extrazellulären zur intrazellulären Seite geleitet. Ein Strom in umgekehrter Richtung findet hingegen kaum statt. Aufgrund dieser Eigenschaft spielen Kir-Kanäle eine zentrale Rolle bei der Stabilisierung des Ruhepotenzials, der K^+ -Homöostase, der Steuerung der Insulinsekretion und bei der Kontrolle der Erregbarkeit vieler Zellen. Längere Depolarisationsphasen, wie sie bei Herzmuskelzellen typisch sind, werden erst durch das Schließen der Kir-Kanäle ermöglicht. Das Schließen dieser Kanäle erfolgt über einen Verschluss der Pore durch intrazelluläre Mg^{2+} -Ionen oder positiv geladene Polyamine wie Spermin und Spermidin [LOPATIN *et al.*, 1994; FAKLER *et al.*, 1995].

Die Kir-Superfamilie besitzt 15 Mitglieder in sechs verschiedenen Gruppen, die alle unterschiedliche Eigenschaften und Funktionen besitzen.

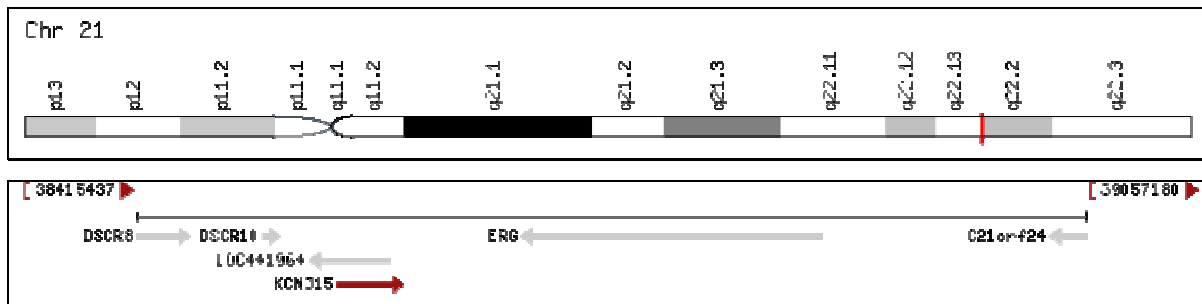


Abbildung 40: Lokalisation des KCNJ15-Gens auf dem Chromosom 21

Das *KCNJ15*-Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 21 im Bereich der Bande 22.2 (Abbildung 40). Es besteht aus 3 Exons und 2 Introns, wobei die proteinkodierenden Sequenzen ausschließlich im Exon 3 lokalisiert sind. Bisher wurden drei unterschiedliche Transkripte identifiziert, die jedoch alle für das gleiche Protein kodieren. Es ist noch nicht völlig geklärt, ob diese Heterogenität auf die variable Transkriptionsinitiation und/oder durch alternatives Spleißen eines gemeinsamen Primärtranskriptes zurückzuführen ist. Das vollständige Kanalprotein besteht aus 375 Aminosäuren und hat ein theoretisches Molekulargewicht von 42,6 kDa.

4.5. Kurzcharakterisierung einiger anti-inflammatorischer Gene

4.5.1. Chemokin-Ligand 22 (*CCL22*) siehe 4.3.8.

Der Chemokin-Ligand 22 vom C-C Motiv (*CCL22*) ist, wie andere Zytokine, ein sekretorisches Protein, das als Botenmolekül für Entzündungszellen wirkt und deren Migration

bzw. Aktivitätszustand beeinflusst [ONO *et al.*, 2003]. Eine Kurzcharakterisierung dieses Genproduktes wurde bereits unter 4.3.8. gegeben.

4.5.2. Spezifischer Metalloproteinase-Hemmer (*TIMP3*)

Während der akuten Phase einer Entzündungsreaktion sezernieren klassisch aktivierte Makrophagen und vor allem neutrophile Granulozyten verschiedene Metalloproteinasen, die extrazelluläre Matrixproteine im Entzündungsgebiet abbauen [CHANG und WERB, 2001; RAY und STETLER-STEVENSON, 1994]. Durch IL-4 wird in Monozyten jedoch die Expression eines endogenen spezifischen Metalloproteinase-Hemmers (*TIMP3*) induziert, der zur Termination dieser destruktiven Prozesse führen sollte. Durch die Hochregulation der *TIMP3*-Expression wird erreicht, dass die sich während der akuten Phase der Entzündungsreaktion im Entzündungsareal angereicherten Metalloproteinasen gehemmt werden und der weitere Abbau von extrazellulären Matrixproteinen zum Stillstand kommt. Diese metabolischen Veränderungen sind eine notwendige Voraussetzung für die während der Heilungsphase (*resolution phase*) einsetzenden Restrukturierung der extrazellulären Matrix. *TIMP3* tritt mit einer Reihe von Matrix-Metalloproteinasen (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-13, MMP-14 und MMP-15) in Wechselwirkung und besitzt somit keine ausgeprägte Spezifität. Die Expression von *TIMP3* wird als Reaktion auf mitogene Stimulierung von Zellen hochreguliert. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass *TIMP3* als Regulator in den Zellzyklus eingreift [WICK *et al.*, 1994].

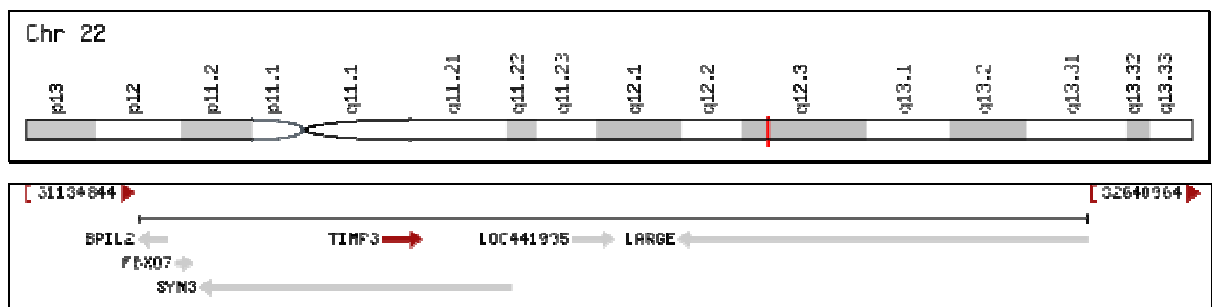


Abbildung 41: Lokalisation des *TIMP3*-Gens auf dem Chromosom 22

Das *TIMP3*-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 22 im Bereich der Bande 12.3. lokalisiert (Abbildung 41). Es besteht aus 5 Exons und 4 Introns und hat eine Länge von 5.496 Basen. Das fertige Translationsprodukt besteht aus 211 Aminosäuren und besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 24,1 kDa. Mutationen im *TIMP3*-Gen verursachen die autosomal vererbte Sorsby Dystrophy [WEBER *et al.*, 1994].

4.5.3. Annexin A1 (*Lipokortin-1*, *ANXA1*)

Annexin A1 gehört zur Familie der Kalzium-abhängigen Phospholipid-bindenden Proteine, die alle ein Molekulargewicht von etwa 35-40 kDa aufweisen. Sie sind vor allem auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran lokalisiert und jedes Annexin A1-Monomer besitzt sechs Bindungsstellen für Kalzium [WENG *et al.*, 1993].

Das primäre Translationsprodukt (Annexin A1) hat ein theoretisches Molekulargewicht von 38,7 kDa und ist in der Lage, die Phospholipase A₂ (PLA₂) zu hemmen. Da dieses Enzym für die Synthese von pro-inflammatorischen Eikosanoiden essentiell ist, ergibt sich für Annexin A1 eine anti-inflammatorische Wirkung [PARENTE und SOLITO, 2004]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Annexin A1 an den gleichen Zelloberflächenrezeptor wie das anti-inflammatorische Lipoxin A₄ bindet [PERRETTI *et al.*, 2002]. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Hochregulation der Expression von Annexin A1 im Rahmen der Th2-Reaktion von Monozyten passt somit ins Konzept der Phänotyp-Umschaltung von Monozyten im Sinne einer anti-inflammatorischen Veränderung.

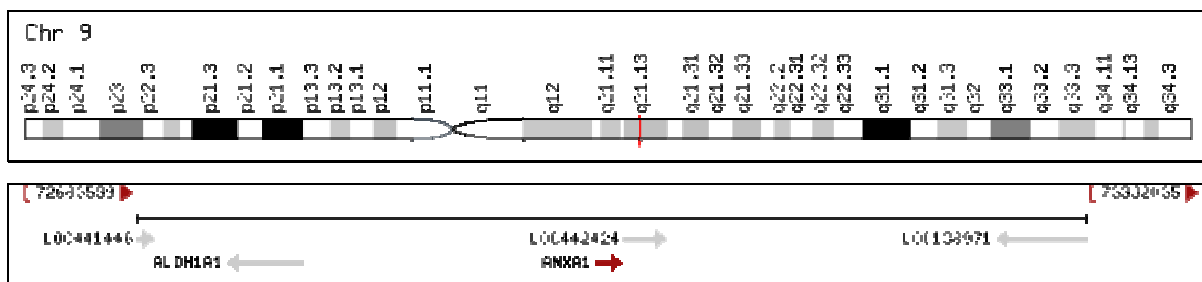


Abbildung 42: Lokalisation des ANXA1-Gens auf dem Chromosom 9

Das *ANXA1*-Gen wurde auf dem langen Arm des Chromosoms 9 im Bereich der Bande 21.2-21.13. lokalisiert (Abbildung 42). Es besteht aus 13 Exons und 12 Introns und hat eine Länge von 1.399 Basen. In einigen Geweben (z.B. Plazenta) liegt das aus 346 Aminosäuren bestehende Protein als Homodimer vor, wobei die beiden Monomeren durch Transglutaminierung kovalent verbunden sind. Die Hemmaktivität gegenüber der PLA₂ wird durch Proteinphosphorylierung (Proteinkinase C) reguliert, wobei die phosphorylierte Form keine Hemmaktivität mehr aufweist. Unabhängig von seiner Wirkung als PLA₂ Hemmstoff spielt Annexin A1 auch bei Membranfusionen (z.B. Endozytose) eine wichtige Rolle [PARENTE und SOLITO, 2004].

4.5.4. Interleukin-10 (*IL-10*)

Ähnlich wie IL-4 gehört IL-10 zur Familie der Th2-Zytokine, die zu einer alternativen Stimulierung von Monozyten führen. Es ist ein pleiotropes Zytokin, das die Synthese klassi-

scher pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, IL-18, TNF α , IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, MIP-1 α und IL-12) verhindert. In der Literatur werden für IL-10 häufig anti-inflammatorische Effekte beschrieben. So konnte z.B. bei IL-10-defizienten Mäusen eine chronische Enterokolitis nachgewiesen werden [KUHN *et al.*, 1993]. Weiterhin zeigten diese Tiere ein vermindertes Wachstum und eine Anämie. IL-10 wird vor allem von T-Zellen und Makrophagen sezerniert und hemmt eine Reihe pro-inflammatorischer Funktionen dieser Zellen. In Antigen-präsentierenden Zellen senkt IL-10 die Expression von MHC-II-Proteinen auf der Zelloberfläche [DE WAAL MALEFYT *et al.*, 1991B]. Da IL-10, wie IL-4, als alternativer Stimulator auf Monozyten wirkt [DE WAAL MALEFYT *et al.*, 1991A], kann die von uns beobachtete IL-4-induzierte Hochregulation der IL-10-Expression als endogene Verstärkung der alternativen Aktivierung von Monozyten angesehen werden (*pseudo-autokriner loop*).

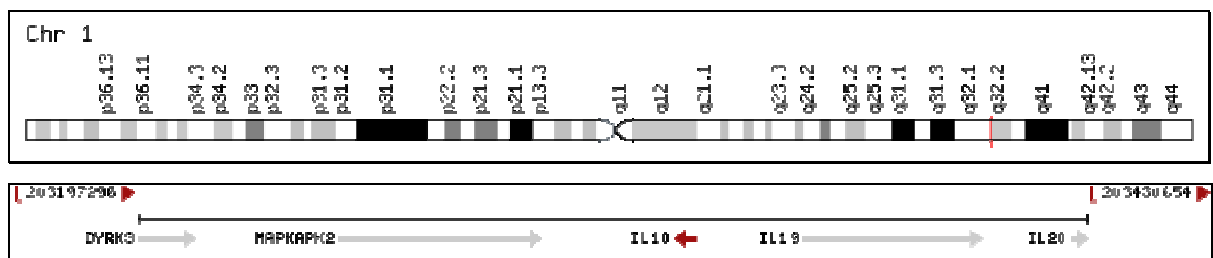


Abbildung 43: Lokalisation des IL-10-Gens auf dem Chromosom 1

Das *IL10*-Gen wurde auf dem langen Arm des Chromosoms 1 im Bereich der Banden 31-32.1 lokalisiert (Abbildung 43). Das zugehörige Primärtranskript besteht aus 5 Exons und 4 Introns und hat eine Länge von 1.629 Basen. Damit kodiert es für ein aus 178 Aminosäuren bestehendes Präprotein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 20,5 kDa.

4.5.5. Hämoxygenase-1 (*HMOX1*)

Die Hämoxygenase (EC 1.14.99.3) ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym beim Hämabbau: $\text{Häm} + 3 \text{AH}_2 + 3 \text{O}_2 \rightarrow \text{Biliverdin} + \text{Fe}^{2+} + \text{CO} + 3 \text{A} + 3 \text{H}_2\text{O}$.

Sie katalysiert die Oxidation der α -Methinbrücke des Hämgerüsts, welche die α -Pyrrolringe des Hämgerüsts mit den β -Pyrrolen verbindet und bewirkt dadurch eine Linearisierung des Hämskeletts. Das bei dieser Reaktion entstehende Biliverdin wird in einer Folgereaktion durch die Biliverdinreduktase zum Bilirubin reduziert. Die entstehenden Reaktionsprodukte (Biliverdin, Bilirubin) wirken sowohl als Antioxidanzien als auch als Sauerstoffradikal-Fänger [MAINES und PANAHIAN, 2001; WUNDER und POTTER, 2003] und ebenso als anti-inflammatorische Agenzien. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass das Kohlenmonoxid, welches bei der Hämoxygenasereaktion freigesetzt wird, eine Reihe von pro-inflammatorischen Reaktionen hemmt [MOORE *et al.*, 2003].

Unter physiologischen Bedingungen zeigt die Hämoxigenase ihre höchste Aktivität in der Milz, wo alte Erythrozyten aus dem Blutkreislauf eliminiert werden. Sie wird allerdings auch in vielen anderen Geweben exprimiert. Es existieren zwei Isoformen der Hämoxigenase, die induzierbare *HMOX1* und die konstitutiv exprimierte *HMOX2*. Die Expression der *HMOX1* wird durch ihr Substrat Häm [OSHIRO *et al.*, 1999], aber auch durch andere Stimulanzen (Schwermetalle, Endotoxin, Hitzeschock, Wasserstoffperoxid, oxidativer Stress) hochreguliert [MAINES, 1988; RYTER und CHOI, 2002; SCHIPPER, 2004].

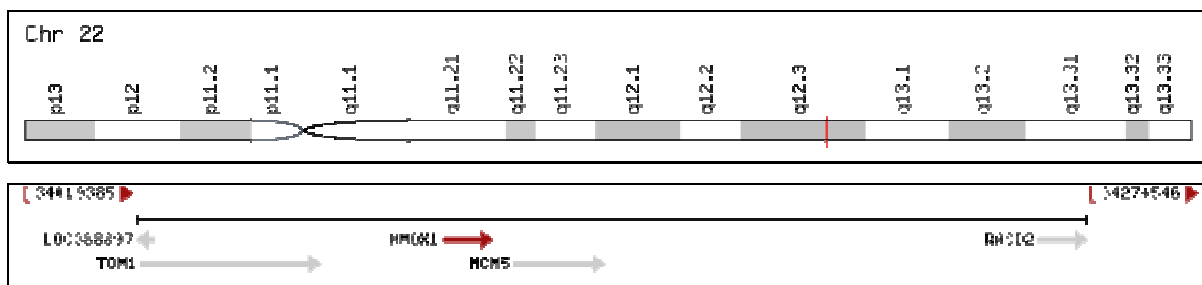


Abbildung 44: Lokalisation des HMOX1-Gens auf dem Chromosom 22

Das *HMOX1*-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 22 im Bereich der Banden 12.3-13.1. lokalisiert (Abbildung 44). Es besteht aus 5 Exons und 4 Introns und hat eine Länge von 1.550 Basen. Die reife mRNA kodiert für 288 Aminosäuren und das fertige Transkriptionsprodukt besitzt eine Molmasse von 32,8 kDa.

4.5.6. Hitzeschockprotein A8 (*HSPA8*)

Wenn kultivierte Zellen einer Temperaturerhöhung auf Werte höher als 40°C ausgesetzt werden, wird die Expression mehrerer Proteine hochreguliert, die als Hitzeschockproteine (HSPs) bezeichnet werden. Spätere Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Expressionsregulation nicht nur durch Hitzeschocks hervorgerufen wird, sondern auch als Abwehrreaktion auf andere plötzliche Milieuveränderungen, wie beispielsweise Sauerstoffmangel, Stoffwechselveränderungen oder toxische Chemikalien [LINDQUIST, 1986]. So konnte auch gezeigt werden, dass pro-inflammatorische Stimulanzen zu einer Induktion der Hitzeschockproteine führen, was überwiegend als Kompensationsreaktion von Zellen auf den Entzündungsstress betrachtet wird [SRIVASTAVA, 2002; KIANG, 2004]. *HSPA8* gehört zur Familie der 70 kDa-Hitzeschockproteine, die neben Hitze-induzierten Proteinen auch konstitutiv exprimierte Genprodukte (*heat-shock cognate proteins*) umfasst. *HSPA8* zählt man zu der letzten Gruppe, obwohl unsere Daten belegen, dass seine Expression zumindest in Monozyten reguliert wird.

Die molekulare Funktion der Hitzeschockproteine ist noch nicht restlos geklärt. Eine Reihe von experimentellen Beobachtungen deutet auf eine Chaperonaktivität von HSPs hin. So konnte für *HSPA8* gezeigt werden, dass es sich an die entstehende Polypeptidkette während der Translation anlagert und die kotranslationale Faltung neu synthetisierter Proteine gewährleistet [KIANG und TSOKOS, 1998]. *HSPA8* wirkt auch als ATPase und ist wahrscheinlich am intrazellulären Transport und an der Demontage von Klathrin-besetzten Vesikeln beteiligt. Weiterhin wurde eine anti-apoptotische Wirkung von HSPs beschrieben, die u.a. auf eine Hemmung der Stress-aktivierbaren Proteinkinase JNK (c-Jun N-terminale Kinase, SERK1) zurückzuführen ist. Welche dieser katalytischen Aktivitäten für die anti-inflammatorische Wirkung der HSPs im Einzelnen verantwortlich ist, kann derzeit noch nicht mit Sicherheit gesagt werden.

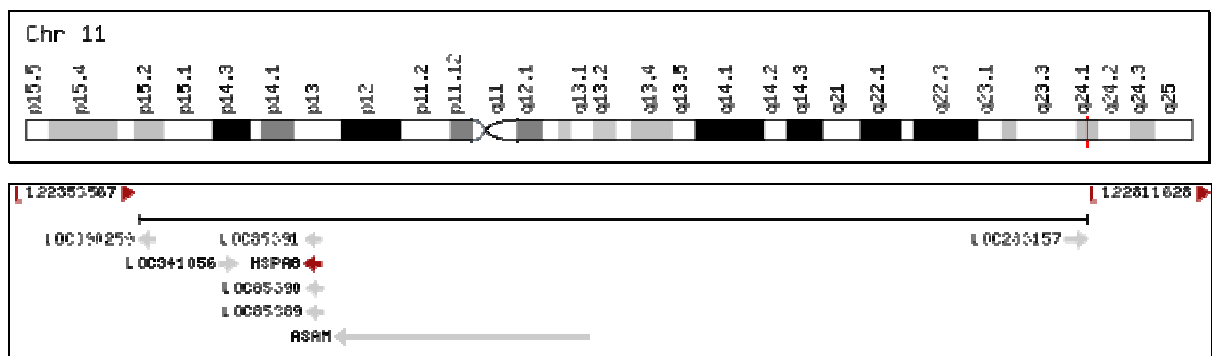


Abbildung 45: Lokalisation des HSPA8-Gens auf dem Chromosom 11

Das *HSPA8*-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 11 im Bereich der Bande 24.1 lokalisiert (Abbildung 45). Es besteht aus 9 Exons und 8 Introns, wobei das erste Exon für die komplette 5'-UTR kodiert. Bisher wurden zwei unterschiedlich lange Isoformen nachgewiesen, welche durch alternatives Spleißen aus dem Primärtranskript entstanden sind.

4.6. Kurzcharakterisierung klassischer pro-inflammatorischer Gene

4.6.1. Klassische pro-inflammatorische Interleukine (*IL-1*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-18*)

Interleukin-1 (*IL-1*) ist eine Zytokin-Familie bestehend aus zwei agonistisch wirkenden pleiotropen Proteinen *IL-1 α* und *IL-1 β* . Beide Zytokine werden anfangs als 31 kDa-Präproteine synthetisiert und später durch ihre spezifischen Proteinasen zu den reifen 17 kDa-Proteinen gespalten. *IL-1 α* ist als zelluläres an der Membran gebundenes Präprotein aktiver als in reifer gespaltenen Form. *IL-1 β* ist nur als reifes Sekretprotein aktiv und wird in großen Mengen von Makrophagen und Monozyten, aber auch von Epithelzellen sezerniert. Im Gesamtorganismus wirkt *IL-1* als Immunmodulator und beeinflusst die Hämatopoese. Es stimu-

liert die Proliferation von Thymozyten durch die Induktion einer IL-2-Freisetzung und aktiviert die Reifung und Proliferation von B-Zellen [APTE und VORONOV, 2002]. Im Zentralnervensystem (ZNS) wirkt IL-1 als endogenes Pyrogen. In peripheren Gelenken stimuliert es die Freisetzung pro-inflammatorischer Eikosanoide und auch von Kollagenase. Ein Polymorphismus im *IL1A*-Gen scheint von pathogenetischer Bedeutung für die rheumatoide Arthritis und die Alzheimer-Erkrankung zu sein [MCDOWELL *et al.*, 1995; MRAK und GRIFFIN, 2001; BASU *et al.*, 2004].

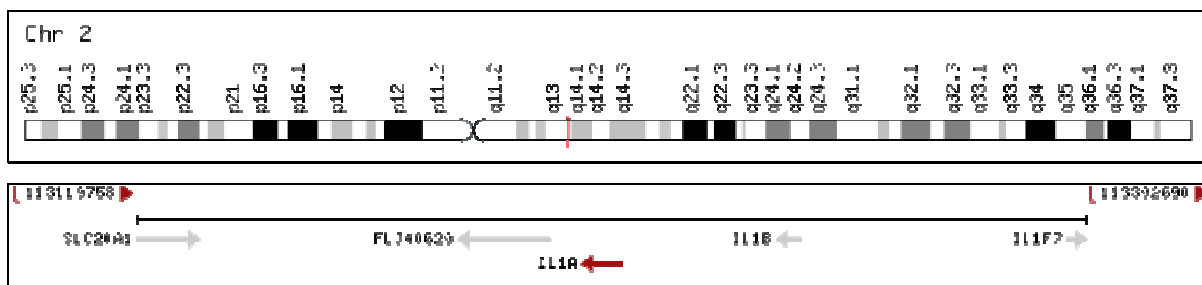


Abbildung 46: Lokalisation des IL-1 α - und IL-1 β -Gens auf dem Chromosom 2

Die *IL1A*- und *IL1B*-Gene befinden sich auf dem langen Arm des Chromosoms 2 im Bereich der Banden 13-14 etwa 44.366 Basen von einander entfernt (Abbildung 46). Beide bestehen aus 7 Exons und 6 Introns. IL-1 α hat eine Länge von 2.943 Basen. Das erste Exon und ein kleiner 5'-seitiger Anteil des zweiten Exons bilden die 5'-UTR (960 Basen). Die vollständig gespleißte mRNA kodiert für das IL-1 α -Präprotein, welches aus 271 Aminosäuren besteht. IL-1 β hat eine Länge von 1.498 Basen. Die vollständig gespleißte mRNA kodiert für das IL-1 β -Präprotein, welches aus 269 Aminosäuren besteht.

Interleukin 6 (IL-6, IFN β 2) ist ein pleiotropes Zytokin mit einem breiten Spektrum an biologischen Funktionen. Es spielt eine wesentliche Rolle bei der terminalen Differenzierung von B-Lymphozyten zu reifen Antikörper-produzierenden Plasmazellen. In Hepatozyten induziert es die Synthese von Akutphasenproteinen während die Differenzierung von Nervenzellen angeregt wird [GAULDIE *et al.*, 1987; KANDA und TAKAHASHI, 2004].

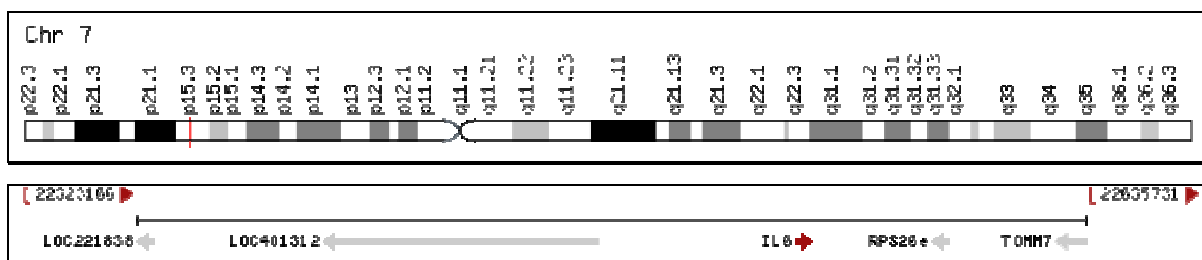


Abbildung 47: Lokalisation des IL-6-Gens auf dem Chromosom 7

Beim Non-Hodgkin-Lymphom verstärkt es die Aggressivität des Tumors durch starke Induktion verschiedener Metalloproteinasen (MMP2 und MMP9) [KOSSAKOWSKA *et al.*, 2000]. Das *IL6*-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 7 im Bereich der Banden 15.3-21 lokalisiert (Abbildung 47). Es besteht aus 5 Exons und 4 Introns, und die zugehörige mRNA hat eine Länge von 1.125 Basen. IL-6 setzt sich aus 212 Aminosäuren zusammen, und nach der posttranslationalen Modifikation (N- und O-Glykosylierung) weist es eine Molmasse von 21-28 kDa auf.

Interleukin-8 (IL-8, CXCL8) ist ein Vertreter der CXC-Familie von Zytokinen und wirkt als chemotaktischer Faktor für neutrophile und basophile Granulozyten sowie für T-Lymphozyten und führt in diesen Zellen zur Stoffwechselaktivierung. Es wird von einer Reihe von Zellen, insbesondere von klassisch aktivierten Monozyten, sezerniert und stellt einen starken pro-inflammatorischen Mediator dar. Daneben wirkt es auch pro-angiogen [XIE, 2001]. Es wird in Form eines Propeptids synthetisiert und dann post-translational durch limitierte Proteolyse zu verschiedenen Wirkformen umgewandelt [IL-8(1-77), IL-8(6-77), IL-8(7-77)]. IL-8(6-77) besitzt eine 5- bis 10-fach höhere molekulare Aktivität zur Aktivierung von Neutrophilen und IL-8(7-77) weist eine höhere Affinität zu den CXCR1- und CXCR2-Rezeptoren auf als IL-8(1-77).

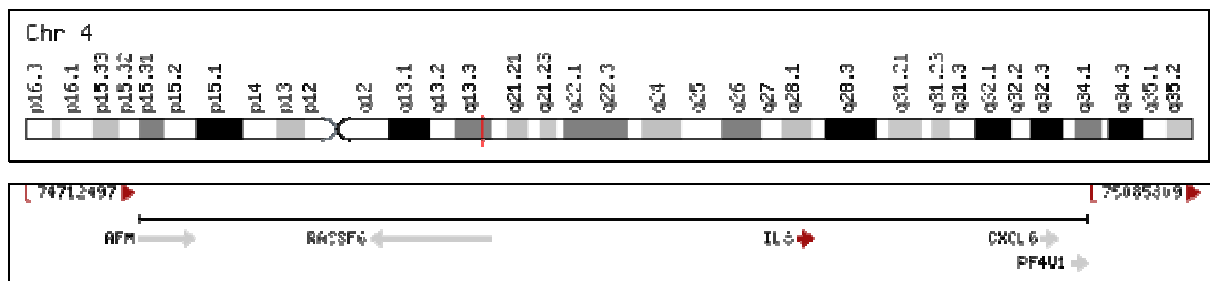


Abbildung 48: Lokalisation des IL-8-Gens auf dem Chromosom 4

Das *IL8*-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 4 im Bereich der Banden 13.3-21 lokalisiert (Abbildung 48). Es besteht aus 4 Exons und 3 Introns. Große Teile des 4 Exons (>95%, 1.250 Basen) kodieren die 3'-UTR der IL-8-mRNA, die möglicherweise regulatorische Sequenzen für die Translation enthält. Die reife mRNA (1.666 Basen) kodiert für ein Oligopeptid von 99 Aminosäuren, das ein theoretisches Molekulargewicht von 11,1 kDa aufweist.

Interleukin-18 (IL-18) gehört zur Interleukin-1 Familie und ist ebenfalls ein pro-inflammatorisches Zytokin, das in natürlichen Killerzellen eine Aktivierung induziert und in T-

Helferzellen die Synthese von Interferon- γ anschaltet. Deshalb wird es häufig auch als Interferon- γ -induzierender Faktor bezeichnet. In Kombination mit IL-12 hemmt IL-18 die durch IL-4-induzierte Synthese von IgE in B-Zellen [YOSHIMOTO *et al.*, 1997]. Das IL-18-bindende Protein (IL-18BP) kann spezifisch mit IL-18 interagieren und damit dessen biologische Funktion regulieren, indem es die Bindung des Zytokins an seinem Rezeptor verhindert [BUFLER *et al.*, 2002]. Das *IL18*-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 11 im Bereich der Banden 22.2-23.1 lokalisiert (Abbildung 49). Es besteht aus 5 Exons und kodiert für ein 193 Aminosäuren enthaltendes Polypeptid mit einer Molmasse von 22,3 kDa.

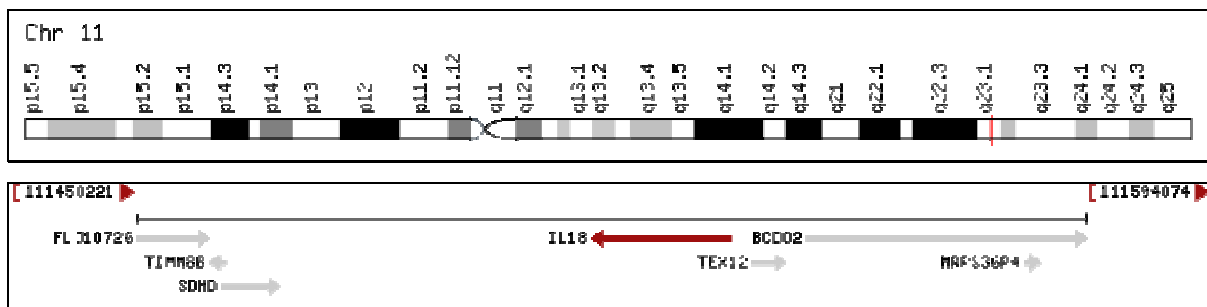


Abbildung 49: Lokalisation des IL-18-Gens auf dem Chromosom 11

In den durchgeführten Experimenten wurde die Synthese von IL-1, IL-6, IL-8 und IL-18 parallel mehr oder weniger stark herunterreguliert (Abbildung 13), was ins Bild des postulierten Phänotypumschaltung von IL-4-behandelten Monozyten passt.

4.6.2. Chemokin-Ligand 2 (*CCL2*, *MCP1*)

Der Chemokin-Ligand 2 vom C-C-Motiv (*CCL2*) ist ein kleines sezerniertes Zytokin, das eine stark chemotaktische Wirkung auf Monozyten ausübt. Aus diesem Grund wird es auch häufig als MCP-1 (*monocyte chemotactic protein 1*) bezeichnet [MATSUSHIMA *et al.*, 1989]. Interessanterweise wirkt es zwar chemotaktisch auf Monozyten und basophile Granulozyten, zeigt aber keine Wirkung auf neutrophile und eosinophile Granulozyten [ROLLINS, 1996].

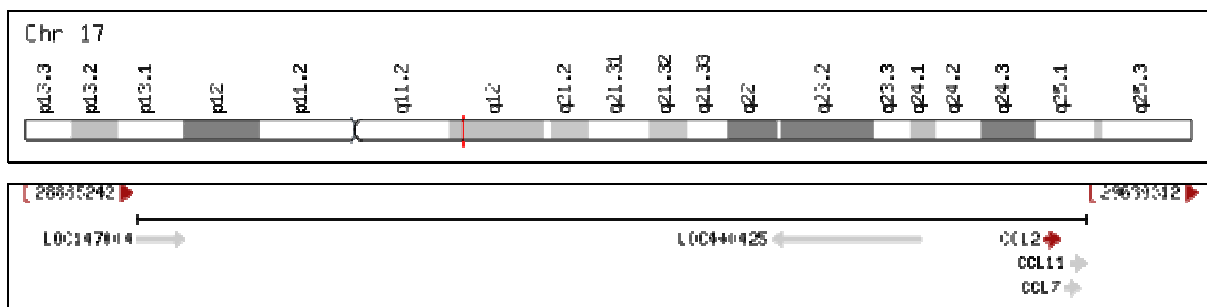


Abbildung 50: Lokalisation des CCL2-Gens auf dem Chromosom 17

CCL2 spielt eine patho-physiologische Rolle bei der Pathogenese verschiedener entzündlicher Erkrankungen, wie Psoriasis, rheumatoide Arthritis und Atherosklerose. Es bindet an

verschiedene Chemokinrezeptoren (CCR2 und CCR4) und induziert unterschiedliche intrazelluläre Signaltransduktionswege. Das *CCL2*-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 17 im Bereich der Banden 11.2-21.1. lokalisiert (Abbildung 50). Es besteht aus 3 Exons und hat eine Länge von 760 Basen. Es kodiert für ein Präprotein mit 99 Aminosäuren, das eine Molmasse von ca. 11 kDa aufweist. Große Teile des ersten und dritten Exons sind nicht kodierend und bilden die 5'- bzw. 3'-UTR. Diese Anteile könnten translational wirksame Regulationssequenzen enthalten, die bisher jedoch experimentell noch nicht identifiziert worden sind.

4.6.3. Tumor-Nekrose-Faktor alpha (*TNF α*)

TNF α ist ein stark pro-inflammatorisch wirkendes Zytokin, das in vielfältigerweise in die Regulation des Immunsystems eingreift, daneben aber auch Wirkungen auf das hämatopoetische System ausübt. Es wird vor allem von Makrophagen und T-Lymphozyten synthetisiert und beeinflusst als Homotrimer ein breites Spektrum physiologischer Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose, intrazellulären Lipidstoffwechsel und die plasmatische Gerinnungskaskade. TNF α induziert die Bildung von Akutphasenproteinen und wirkt als endogenes Pyrogen [CONTI *et al.*, 2004]. Auf der molekularen Ebene stimuliert es z.B. die Sphingomyelinase (SMPD1) in Immunzellen, erhöht aber auch die Insulinresistenz im peripheren Gewebe. Ein häufig vorkommender Polymorphismus im Promotor des *TNF*-Gens, der mit einem reduzierten Plasmaspiegel des Zytokins einhergeht, führt zu einer Verstärkung des Untergangs neuronalen Gewebes im verletzten Gehirn. Von patho-physiologischer Bedeutung ist das Gen bei einer Reihe unterschiedlicher Erkrankungen, wie Autoimmunkrankheiten, Typ-II-Diabetes und bei verschiedenen Krebsarten. Der Phänotyp TNF α -defizienter Mäuse deutet auf eine Rolle des Zytokins bei neurodegenerativen Erkrankungen hin [MARINO *et al.*, 1997; SCHERBEL *et al.*, 1999].

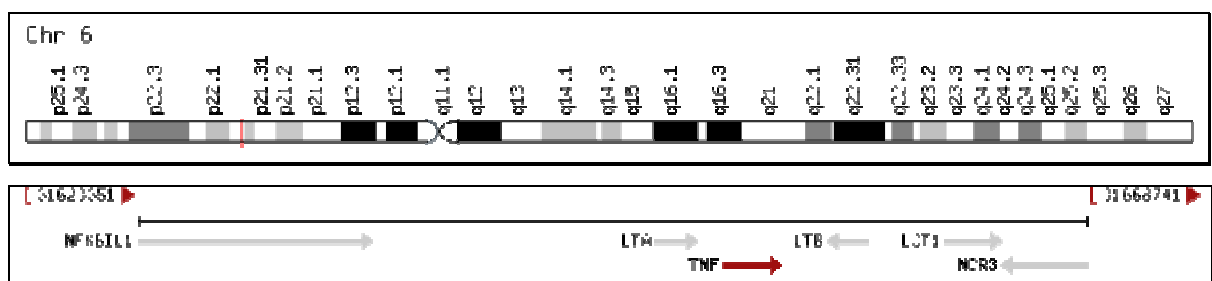


Abbildung 51: Lokalisation des TNF α -Gens auf dem Chromosom 6

Das *TNF*-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 im Bereich der Banden 21.3-21.33 lokalisiert (Abbildung 51). Es besteht aus 4 Exons und kodiert für ein 233 Aminosäu-

ren enthaltendes Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 25,6 kDa. Intrazellulär kommt es vor allem als membrangebundenes (Typ-2-Membranprotein) Homotrimer vor, kann aber auch nach extrazellulär sezerniert werden. Die sezernierte Form des TNF α geht durch limitierte Proteolyse aus der membrangebundenen Form hervor. Die membrangebundene aber nicht die lösliche Form des Zytokins kann durch Serinphosphorylierung post-translational modifiziert werden.

4.6.4. Prostaglandin-Endoperoxid Synthasen / Zyklooxygenasen (PTGS / COX)

Die beiden Zyklooxygenase-Isoformen COX-1 und COX-2 (EC 1.14.99.1) sind Schlüsselenzyme der endogenen Prostaglandinsynthese und katalysieren die Oxygenierung von linearen Polyenfettsäuren (vor allem Arachidonsäure) zu zyklischen Prostaglandinendoperoxiden. Weiterhin katalysieren beide Isoformen auch die Reduktion dieser Peroxide zu den entsprechenden Hydroxyverbindungen. Damit wirken beide COX-Isoformen sowohl als Oxygenase als auch als Peroxidase und beide enzymatische Aktivitäten wurden verschiedenen Domänen des fertigen Proteins zugeschrieben [SMITH und SONG, 2002]. Die COX-1 wird in den meisten somatischen Zellen konstitutiv exprimiert und ist für die Synthese physiologisch wirkender Prostaglandine zuständig. Im Gegensatz dazu, ist die COX-2, die durch pro-inflammatorische Stimulanzen hochreguliert werden kann, vor allem an der Biosynthese von inflammatorischen Prostaglandinen beteiligt. Beide COX-Isoformen sind Hämproteine mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa. Sie kommen als Homodimere in der Membran des endoplasmatischen Retikulums vor [SMITH *et al.*, 2000; MURAKAMI und KUDO, 2004].

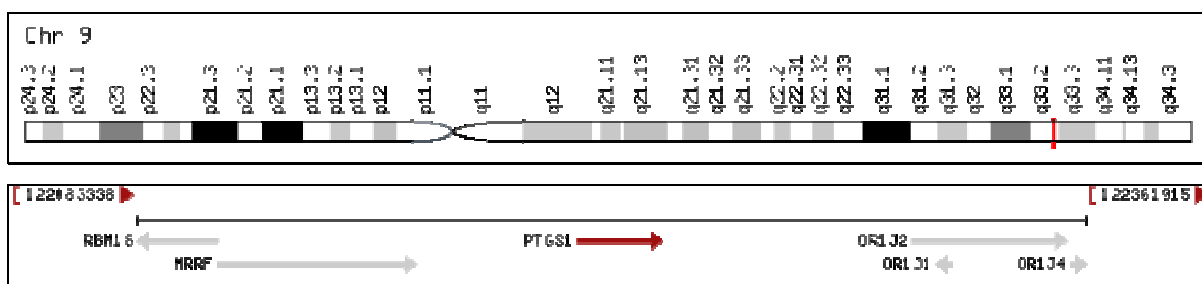


Abbildung 52: Lokalisation des PTGS1-Gens auf dem Chromosom 9

Durch alternatives Spleißen werden aus dem Primärtranskript der COX-1 zwei unterschiedliche Isoenzyme hergestellt. Das *PTGS1*-Gen der COX-1 ist auf dem langen Arm des Chromosoms 9 im Bereich der Banden 32-33.3 lokalisiert (Abbildung 52).

Im Gegensatz dazu befindet sich das *PTGS2*-Gen (Abbildung 53), welches für die induzierbare COX-2 kodiert, auf dem langen Arm des Chromosoms 1 im Bereich der Banden 25.2-31.1. Die Promotoren beider Gene sind unterschiedlich, so dass die differenzielle Ex-

pressionsregulation verständlich wird. Interessanterweise wird die Expression der COX-2 in verschiedenen neoplastischen Erkrankungen herunterreguliert.

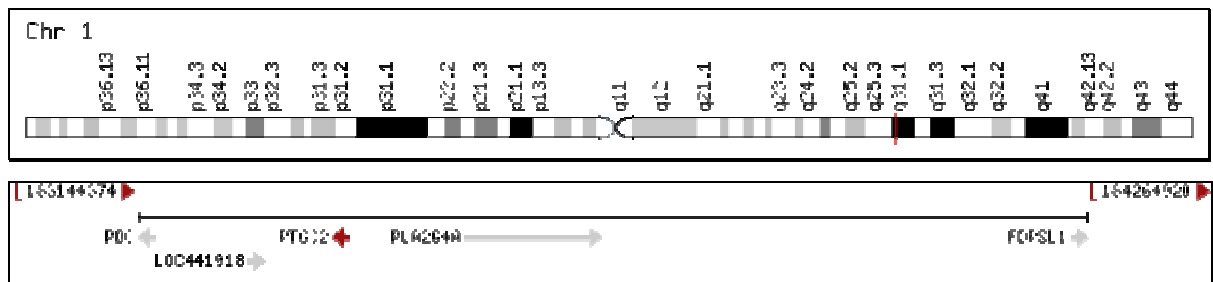


Abbildung 53: Lokalisation des PTGS2-Gens auf dem Chromosom 1

Die genaue Rolle des Enzyms bei der malignen Transformation konnte allerdings bislang noch nicht aufgeklärt werden. In den durchgeführten Experimenten konnte eine isoform-spezifische Expressionsregulation der beiden Isoenzyme feststellen werden. Die „pro-inflammatorische“ COX-2 wurde durch IL-4 in Monozyten herunterreguliert, was in das Bild der IL-4-induzierten Phänotyp-Umschaltung passt. In Gegensatz dazu wurde eine Hochregulation der COX-1 gemessen. Welche Rolle die konstitutive Expression der COX-1 für den Stoffwechsel und die Funktion von peripheren Monozyten spielt, ist bis heute noch weitgehend unklar.

4.7. Regulation der Genexpression durch Veränderungen des zellulären Redox-Status

4.7.1. Allgemeine Prinzipien der Expressions-Regulation eukaryontischer Gene unter Berücksichtigung des zellulären Redox-Status

Die Genexpression ist ein komplizierter Prozess, dessen Ablauf in mehrere Schritte eingeteilt werden kann. Im den folgenden Kapiteln sollen die wichtigsten dieser Prozesse kurz diskutiert werden, wobei besonderes Augenmerk auf Redox-abhängige Regulationsmöglichkeiten gelegt werden soll.

4.7.1.1. Veränderungen der Nukleosomenstruktur (Histon-Modifizierung)

Initiiert wird die Genexpression durch eine Auflockerung der Nukleosomenstruktur, die durch eine Schwächung der DNA-Histon-Interaktion eingeleitet wird. Dafür sind eine Reihe von Reaktionen beschrieben worden, die sowohl die DNA als auch die Histonproteine betreffen [BERGER, 2002]. Einer dieser Regulationsprozesse ist die reversible DNA-Methylierung (Bildung von 5-Methylzytosin). Unter den vier bekannten DNA-Basen kann nur das Zytosin methyliert werden. Die so modifizierte Base ist in der Lage, die Bindung von Transkriptionsfaktoren oder anderen DNA-bindenden Proteinen zu behindern und so die Transkription von

Genen zu blockieren. DNA-Methylierung bewirkt eine Kondensation der Nukleosomenstruktur (*repressive chromatin structure*) und blockiert damit die Gentranskription. Im Gegensatz dazu induziert eine Demethylierung eine Auflockerung der Nukleosomen und ermöglicht damit die Transkription. In diesem Sinn kann eine Zytosinmethylierung als reversible Geninaktivierung aufgefasst werden. Die Methylierung ist ein redox-sensitiver Prozess, da die Verfügbarkeit von aktiven Methylgruppen (C_1 -Stoffwechsel) mit dem Glutathionstoffwechsel eng verknüpft ist. So geht eine erhöhte Glutathionsynthese mit einem erhöhten Aufkommen an Adenosylmethionin einher, was eine wesentliche Voraussetzung für die DNA-Methylierung ist.

Weitere Prozesse die zu einer Auflockerung der Nukleosomenstruktur führen, betreffen vor allem die Histonproteine. Reversible Azetylierung (Lysinreste), Phosphorylierung (Serin- bzw. Tyrosinreste), Methylierung (Lysin- bzw. Argininreste), Ubiquitinierung (Lysinreste) bzw. Ribosylierung von Histonproteinen induzieren eine Veränderung der Chromatinstruktur, die letztlich dazu führt, dass die Transkription von Zielgenen induziert werden kann. Auch diese Modifizierungsreaktionen scheinen redox-sensitiv zu sein, wobei der Mechanismus in den meisten Fällen noch nicht eindeutig geklärt ist.

4.7.1.2. Transkriptionelle Regulation

Nachdem die Nukleosomenstruktur aufgelockert worden ist, kann sich im weiteren Verlauf der Genexpression am Promotor der zu exprimierenden Gene der transkriptionelle Initiationskomplex ausbilden. Dieser Komplex besteht aus einer Reihe basaler Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase II. Die Transkriptionsaktivität dieses Initiationskomplexes wird durch zusätzliche regulatorische Proteine modifiziert, die sich an „*Enhancer*-“ bzw. „*Silencer*-“ Elemente der DNA anlagern. Die Aktivität der Transkriptionsfaktoren, d.h. die Fähigkeit von DNA-bindenden Proteinen die Transkription zu fördern/verstärken (*enhance*) oder zu hemmen (*silence*), kann durch reversible chemische Modifizierung der Faktoren beeinflusst werden. So wurde für viele Transkriptionsfaktoren gezeigt, dass ihre Regulations-effizienz durch reversible Phosphorylierungs- bzw. Dephosphorylierungsprozesse modifiziert werden kann [WHITMARSH und DAVIS, 2000; KARIN und BEN-NERIAH, 2000; CLEVINGER, 2004; SCHMITZ *et al.*, 2004].

Ähnliche kovalente Modifizierungen von Transkriptionsfaktoren können auch durch Veränderungen des zellulären Redoxstatus induziert werden. So wurden z.B. bei Prokaryonten zwei Transkriptionsfaktoren (OxyR und SoxR) beschrieben, deren Regulationseffizienz durch Wasserstoffperoxid bzw. Superoxidanion modifiziert werden kann. In seiner reduzier-

ten Form liegt OxyR als transkriptional inaktives Monomer vor. Wenn es jedoch zur Erhöhung des zellulären Oxidationsstatus kommt, werden Oberflächen-exponierte Zysteine oxidiert und die Proteinmonomeren dimerisieren. Die Dimeren, die durch Ausbildung von Disulfidbrücken stabilisiert werden, besitzen eine erhöhte DNA-Bindungsaktivität und können damit effektiver als Transkriptionsfaktoren wirken [DEMPLE, 1998].

SoxR ist ein Transkriptionsfaktor, der Eisen-Schwefel [2Fe-2S]-Cluster enthält. In seiner intakten Form besitzt dieses Protein keine Regulationsaktivität. Häuft sich jedoch in der Zelle Superoxid an, kommt es zu einer oxidativen Zerstörung des Eisen-Schwefel-Clusters, wodurch das oxidierte SoxR DNA-Bindungsaktivität erhält. Das so aktivierte SoxR bindet dann an den Promotor des *SoxS*-Gens und aktiviert dessen Synthese. Das synthetisierte SoxS-Protein vermittelt dann eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress [HIDALGO *et al.*, 1997; POMPOSIELLO und DEMPLE, 2001].

Tabelle 14: Redox-sensitive Transkriptionsfaktoren und deren biologische Bedeutung [SEN, 1998]

Faktor	Biologische Rolle (Faktoren sind involviert in aufgeführte Prozesse)
<i>NF-kappa B</i>	Entzündung, Virusinfektion (z.B. HIV), NO Synthese, Zytokinfreisetzung, Pathogenabwehr
<i>AP-1</i>	Zellproliferation, Zelladhäsion, Glutathion S-transferase (GST)-Regulation, Multidrugresistenz
<i>HIF-1</i>	Genexpressionsregulation bei Hypoxie, Angiogenese, NO-Synthese, Tumorwachstum
<i>Sp-1</i>	Virusinfektion (z.B. HIV, Herpes simpl.), Muskeldifferenzierung, Expressions-regulation von Wachstumsfaktoren (VEGF, HGH) und Hitzeschockproteinen
<i>Egr</i>	Osteoblastendifferenzierung, Tumorwachstum, Strahlensensitivität
<i>Elk-1</i>	Zellproliferation, intrazelluläre Signalwandlung (RAS, c-Fos), Induktion des Serum Response Element
<i>P53</i>	Tumorwachstum (Tumor Suppressor Gen)
<i>NF-Y</i>	Virusinfektion (Hepatitis B), Multidrugresistenz, Aldehydstoffwechsel, FAS-Expression (Apoptose)
<i>PEBP2</i>	Osteogenese, Muskeldifferenzierung, Rekombination der T-Zellrezeptorgene, Regulation der Myeloperoxidaseexpression
<i>NF-AT</i>	Zytokinexpression (z.B. IL-2, IL-4), Ca ²⁺ signaling, T-Zell Aktivierung
<i>TTF-1</i>	Expression von Thyreoglobulin- und Thyreoperoxidase-Expression, Regulation der Epithelzellfunktion in der Lunge
<i>Ah receptor/arnt</i>	Metabolismus von Xenobiotika, Expressionsregulation von Cyt-P450 Isoformen (CYP1A1), HIF response
<i>HSF</i>	Expression von Hitzeschockproteinen

In eukaryontischen Zellen wurden ähnliche Mechanismen beschrieben. So wurde z.B. gezeigt, dass die Regulationskapazität des Transkriptionsfaktors AP-1 durch reversible Oxidation bzw. Reduktion essentieller SH-Gruppen modifiziert werden kann [EVANS *et al.*,

2000]. Ein weiteres Prinzip der redox-sensitiven Expressionsregulation ist die oxidative Zerstörung von Zinkfinger-Motiven, die häufig als Strukturelemente bei Transkriptionsfaktoren zu finden sind (z.B. EGR1 *early growth response*) [HUANG und ADAMSON, 1993; WEBSTER *et al.*, 2001]. In seiner intakten Struktur wird ein Zink-Ion durch vier Proteinliganden komplexiert, wobei zwei dieser Liganden durch Zysteine gebildet werden. Bei Erhöhung des zellulären Oxidationspotenzials können diese Zysteine oxidiert werden, wodurch die Zinkfingerstruktur zerstört und die Regulationsaktivität des entsprechenden Transkriptionsfaktors beeinträchtigt wird. In Tabelle 14 sind einige der bisher bekannten redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren zusammengefasst und deren biologische Bedeutung kurz charakterisiert.

4.7.1.3. Post-transkriptionelle und translationale Regulation

Neben den transkriptionellen Mechanismen der Expressionsregulation sind auch redox-abhängige post-transkriptionelle bzw. translationale Regulationen bekannt. Die bisher am besten untersuchten Beispiele dafür betreffen die Expressionsregulation einer Reihe von Genprodukten, die am Eisenstoffwechsel beteiligt sind [THEIL, 2003; PANTOPOULOS, 2004]. Die Expression dieser Proteine (z.B. Transferrin-Rezeptor, Ferritin, δ -Aminolävulinsäure-Synthase) wird durch die Bindung Eisen-regulatorischer Proteine (IRPs) an Eisenresponsible Elemente (IREs) der mRNA reguliert, was zum einen die Stabilität der mRNA erhöhen kann (Hochregulation der Genexpression), zum anderen jedoch auch deren Translation inaktiviert (Herunterregulation der Genexpression). Das Konsensus-IRE-Motiv (CAGUGN) bildet eine Schleife innerhalb der mRNA, an der Eisen-Ionen binden können. So wird z.B. die Translationsaktivität der Ferritin-mRNA (Ferritin ist ein intrazelluläres Eisenspeicherprotein [THEIL, 2003]) durch die Bindung eines IRPs (*iron responsive protein*) an der 5'-UTR dadurch gehemmt, dass sich kein Translationsinitiationskomplex ausbilden kann [THOMSON *et al.*, 1999; TORTI und TORTI, 2002]. Damit wird die Ferritinbiosynthese herunterreguliert. Im Gegensatz dazu, können aktivierte IRPs in der 3'-UTR der mRNA des Transferrin-Rezeptors binden. Diese Bindung stabilisiert die mRNA und verhindert einen schnellen Abbau. Damit kann das einzelne mRNA-Molekül häufiger übersetzt werden, was zu einer erhöhten Expression des Transferrin-Rezeptors führt. IRPs enthalten Eisen-Schwefel-Cluster und ihre mRNA-Bindungsaktivität hängt vom Eisengehalt ab [ROUAULT *et al.*, 1992; THEIL, 1993; PARASKEVA und HENTZE, 1996]. Eisen-arme IRPs besitzen eine hohe RNA-Bindungsaktivität, während Eisen-reiche IRP Enzyme darstellen (Akonitaseaktivität). Der Eisengehalt der IRPs und damit deren Expressions-regulatorische Aktivitäten hängen von verschiedenen Faktoren ab. Zum einen verringert eine reduzierte zelluläre Eisenkonzentra-

tion den Eisengehalt und erhöht damit die RNA-Bindungskapazität. Zum anderen führt ein erhöhter zellulärer Oxidationsstatus zur Zerstörung der Eisen-Schwefel-*Cluster*, was einen Eisenverlust nach sich zieht. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung der RNA-Bindungsaktivität und zur Hoch- bzw. Herunterregulation der Expression der verschiedenen Gene. Entsprechend diesem Konzept führt oxidativer Stress zur Erhöhung der zellulären Konzentration von eisenarmen IRPs, was zu einer Stabilisierung der Transferrin-Rezeptor-mRNA führt. Damit würde vermehrt Transferrin-Rezeptor gebildet. Im Gegensatz dazu kommt es zu einer Herunterregulation der Expression von Ferritin bzw. der δ -Aminolävulin säure-Synthase (Hämsynthese).

4.7.1.4. Post-translationale Regulation

Der hypoxie-induzierbare Faktor 1α (HIF- 1α) ist ein transkriptions-regulierendes Protein, das in vielen Zellen unter hypoxischen Bedingungen nachgewiesen werden kann [SCHUMACKER, 2005; HELLWIG-BURGEL *et al.*, 2005]. Es ist wesentlich an der Expressionsregulation hypoxie-relevanter Gene beteiligt und seine zytosolische Gleichgewichtskonzentration wird im Wesentlichen durch seinen proteolytischen Abbau reguliert. Unter normoxischen Bedingungen wird HIF- 1α ähnlich wie das Prokollagen, durch Prolyloxidasen oxyniert, danach ubiquitiniert und anschließend durch das Proteasom abgebaut. Unter Hypoxie ist die Oxidation der Prolylseitenketten herunterreguliert, was zum Stillstand der Ubiquitinierung und damit des proteasomalen Abbaus führt. Dadurch können sich große Mengen an nativem HIF- 1α im Zytosol ansammeln und in den Zellkern wandern, um dort die Transkription hypoxie-induzierbarer Gene freizugeben [WANG *et al.*, 1995]. Damit reguliert die redox-abhängige post-translationale Modifizierung von HIF α die Expression hypoxie-relevanter Gene. Ob ähnliche post-translationale Mechanismen bei der Expressionsregulation durch IL-4/13 eine Rolle spielen, muss in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Obwohl die Mikroarraydaten keine klaren Anhaltspunkte für eine veränderte Expression von HIF α liefern, könnte die effektive Proteinkonzentration durchaus verändert sein.

4.7.2. Mechanismen der IL-4/13 induzierten Expressionsregulation spezieller Gene

Die Gene, die durch IL-4/13 am stärksten hoch- bzw. herunterreguliert werden, befinden sich nicht in einer und derselben Region eines Chromosoms, sondern sind scheinbar wahllos über das gesamte Genom verstreut. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass Gene, die sich im Genom in unmittelbarer Nachbarschaft zu den am stärksten hoch- bzw. herunterregulierten Genen befinden, einer unterschiedlichen Expressionsregulation unterliegen.

Die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade der von IL-4/13-induzierten Expression der 12/15-LOX wurde in der Vergangenheit umfassend untersucht, und es konnten mehrere *cis*- bzw. *trans*-regulatorische Elemente identifiziert werden [ROY *et al.*, 2002; ROY und CATHCART, 1998; XU *et al.*, 2003; HEYDECK *et al.*, 1998; SHANKARANARAYANAN *et al.*, 2001]. Die Frage, ob die Expression anderer IL-4/13 abhängiger Gene von ähnlichen Mechanismen abhängt, kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht abschließend beantwortet werden. Die nahezu identischen Induktionskinetiken von 15-LOX-1, FN1 und CD23 lassen zwar einen hohen Grad an mechanistischer Ähnlichkeit vermuten, beweisen einen solchen jedoch nicht. Im Gegensatz dazu deuten die unterschiedlichen Zeitverläufe der Expressionsregulation von 12/15-LOX zum einen und von MAO-A und FXIII-A zum anderen auf unterschiedliche Regulationsmechanismen hin.

4.7.3. Regulation der MAO-A-Expression

MAO-A kann als entzündungshemmendes Enzym betrachtet werden. Es katalysiert die oxydative Desaminierung sowohl von biogenen als auch von xenogenen Aminen. Serotonin ist sein bevorzugtes Substrat. Bei verschiedenen Entzündungsarten zeigt Serotonin entzündungsfördernde Eigenschaften. Man kann davon ausgehen, dass eine Hochregulation der MAO-A-Expression während der Genesung (*resolution-phase*) den Abbau dieses entzündungsfördernden Mediators beschleunigt. Während der katalytischen Reaktion der MAO-A entsteht bei der Desaminierung Ammoniak als Nebenprodukt. Ähnlich wie bei der Transglutaminase-Aktivität von FXIII während der Vernetzung von Matrixproteinen. Wenn diese Reaktions-Prozesse während der *resolution-phase* ablaufen, könnten sie dazubeitragen, den zellulären pH-Wert, der in entzündetem Gewebe sauer ist, zu normalisieren.

4.7.4. Regulation der Expression von HIV-1-Korezeptoren

Die 15-LOX-1 ist ein oxidierendes Enzym und kann durch seine intrazelluläre Aktivität das Oxidationspotenzial einer Zelle verändern. Diese Veränderung ist für die Expressionsregulation der Chemokin-Rezeptoren CXCR5, CCR5 und des CD4 verantwortlich. Das gleiche Verhalten zeigen auch U937-Zellen, die einem oxidativem Stress ausgesetzt wurden. Somit ist auch das Oxidationspotenzial eine regulierende Größe für den HIV-1-Eintritt in die Zelle. An dieser Regulation ist wahrscheinlich der redox-sensitive Transkriptionfaktor NF- κ B (NF-kappa B) beteiligt (siehe auch Tabelle 14) [TAYLOR und KHALILI, 1994; RABSON und LIN, 2000]. Eine Senkung des Oxidationspotenzials z.B. durch Zugabe des Antioxidanz Pyrrolidindithiokarbamat, führte zur Expressions-Steigerung dieser Rezeptoren.