

Analyse der
transkriptionellen Regulation des C3a-Rezeptors
&
der Genexpression monozytärer Zellen nach
Anaphylatoxin-Stimulation

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Myriam Schaefer

geboren am 09.10.1975 in Hannover

2004

Referent:

Prof. Dr. Jürgen Alves

Koreferent:

Prof. Dr. Andreas Klos

Tag der Promotion:

18.05.2004

*Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen,
dass die Dinge so sind, wie sie sind.*

Aristoteles (384 - 322 v. Chr.)

Zusammenfassung

An der gemeinsamen Endstrecke der Komplementaktivierungswege erfolgt die Generierung der hochpotenten, proinflammatorisch und immunmodulatorisch wirksamen Anaphylatoxine C3a und C5a. Tiermodelle belegen ihre Bedeutung bei Krankheitsbildern wie Asthma oder allergischen Reaktionen, dem septischen Schock, bakterieller Pneumonie und Infarkt.

Die Kontrolle der Expression des C3a- und C5a-Rezeptors (C3aR, C5aR) stellt einen entscheidenden Mechanismus zur Regulation der Anaphylatoxin-Wirkungen dar. Daher konzentrierten sich die Untersuchungen in der vorliegenden Promotion auf die transkriptionelle Regulation dieser Rezeptoren, wobei sich das Augenmerk stärker auf den weniger erforschten C3aR richtete.

In der humanen Mastzelllinie HMC-1 sowie der myeloblastischen Zelllinie U937 wurden die Positionen von Haupt- und Nebentranskriptions-Startpunkt mittels RT-PCR identifiziert. Reporter-gen-Studien mit Mutationen in potentiellen TATA-Elementen zeigten keinen Aktivitätsverlust auf. Es scheint sich beim C3aR-Promotor wie bei anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren um einen TATA-losen Promotor mit multiplem Transkriptions-Start zu handeln. Bei der Eingrenzung des Promotors wies ein etwa 300 bp langer Bereich besonders hohe Aktivität auf, wobei eine etwa 50 bp lange Region mit Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-1 als Kernpromotor wirkt. 5' und 3' von diesem Kernbereich gelegen, wurden unterschiedlich stark positive sowie eine negativ-regulatorische Region identifiziert.

Die Überexpression von Ets-1 oder AP-1, in Gegenwart des zur Aktivierung benötigten Ha-Ras, führte synergistisch zu einer starken Erhöhung des Reportersignals. Nach Mutation der entsprechenden Bindungsmotive war dieser Effekt nicht mehr zu verzeichnen. Das nahverwandte Ets-2 konnte in Reporter-gen-Studien weder alleine noch in Kombination mit AP-1 eine Erhöhung der C3aR-Promotoraktivität erzielen. Ets-1 und AP-1 spielen eine wichtige Rolle bei der Mastzell-Entwicklung und Aktivierung. Die Hochregulation des C3aR könnte somit einen der zentralen Mechanismen des bei inflammatorischen Prozessen wie Asthma ablaufenden Aktivierungs-Programms darstellen.

Um die Rolle von Ets-1 im Kontext der C3aR-Induktion zu charakterisieren, wurde eine dominant negative Mutante dieses Transkriptionsfaktors (Ets-1-DN) in ein retrovirales Gentransfer- und Expressions-System eingebracht: Unterschiedliche Verpackungszelllinien sowie Expressionsvektoren - mit eGFP bzw. einem Selektionsmarker - wurden Zelllinien-spezifisch verglichen. Das optimierte System wurde benutzt um in U937-, HMC-1-, HEK293- und HeLaT-Zellen die Ets-1-DN stabil zu exprimieren. Anhand parallel etablierter eGFP-Linien wurde ermittelt, dass etwa 75 - 95 % der Zellen transduziert und selektiert worden waren. Die Ets-1-DN verhinderte die durch Bt_2 -cAMP-induzierte Hochregulation des C3aR in U937-Zellen, wie mittels *real-time* RT-PCR nachgewiesen werden konnte.

Das proinflammatorische Zytokin *Tumor-Nekrose-Faktor- α* (TNF- α), das ein Aktivator der beiden Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-1 ist, konnte als zweiter physiologischer Induktor der C3aR-Expression aufgezeigt werden. Er wirkte synergistisch mit IFN- γ . Dagegen führte das ebenfalls zu den proinflammatorischen Zytokinen zählende Interleukin-1 β nur zu einem schwachen Anstieg des Expressionsniveaus.

Um Einblicke in neue C3aR- und C5aR-nachgeschaltete Funktionen der anaphylatoxischen Peptide zu gewinnen, wurde mittels der Mikroarray-Technologie das Expressionsmuster monozytärer Zellen nach entsprechender Stimulation analysiert. Das hochpotente C5a induzierte in primären humanen Monozyten/Makrophagen die Expression zahlreicher Gene, wie dem essentiell am Entzündungsgeschehen beteiligten Chemokin *macrophage inflammatory protein-1 α* und dem Orphan-Rezeptor HM74. Die C5a-vermittelte Hochregulation des *putative chemokine receptor* HM74 legt seine Beteiligung an inflammatorischen Prozessen nahe. Weiterhin konnte eine Reduktion der LPS-induzierten IL-6-Antwort nach Stimulation mit C5a beobachtet werden, was bedeutsam für den pathophysiologischen Aspekt der Sepsis sein könnte.

Die hier vorgestellte Arbeit schafft neben diesen Hinweisen auf weitere Funktionen der Anaphylatoxin-Rezeptoren eine Grundlage zum Verständnis der transkriptionellen Regulation des C3aR.

Abstract

The anaphylatoxic peptides C3a and C5a are pro-inflammatory mediators generated during complement activation. Animal models prove that they play an essential role in asthmatic or allergic reactions as well as in septic shock, bacterial pneumonia and cardiac infarction.

The tightly controlled expression of the C3a- and C5a-receptors is one crucial mechanism to regulate the Anaphylatoxin-mediated effects. Therefore we investigated the transcriptional regulation of these receptors. Examination of the genetic expression was mainly focussed on the less analysed C3a-receptor (C3aR). In the human mast cell-line HMC-1 and the myeloblastic cell-line U937 the positions of the main- and the minor-transcription initiation sites were identified by RT-PCR. In reporter-gene studies, promoter-constructs with mutations in putative TATA-boxes revealed no lack of activity. Thus, like for other G-protein coupled receptors, the promoter of the C3aR is TATA-less with multiple transcription initiation sites. By deletion analysis a 300 bp promoter region with high activity was narrowed down. An approximately 50 bp long segment with binding sites for the transcription factors Ets-1 and AP-1 functions as the core-promoter. 5' and 3' of this region, several positive- and one negative-regulatory domain were identified.

In the presence of activating Ha-Ras, over-expression of Ets-1 or AP-1 led synergistically to an increase of the reporter-signal. Over-expression of these transcription factors had no effect after site directed mutagenesis of the corresponding binding motifs in the C3aR-promotor. The closely-related Ets-2 could not up-regulate the C3aR neither alone nor in combination with AP-1. Ets-1 and AP-1 play a critical role in mast cell growth regulation and activation suggesting that the up-regulation of the C3aR is part of a central activation programme in inflammatory processes such as asthma. To characterize the role of Ets-1 in the context of C3aR-induction a dominant negative mutant of the transcription factor Ets-1 (Ets-1-DN) was inserted into a retroviral genetransfer- and expression-system: Different packaging cell-lines and expression-vectors - for eGFP and a selection-marker - were compared in different cell-lines. The optimized system was used to generate stably Ets-1-DN-expressing U937-, HMC-1, HEK293 and HeLaT-cells. Parallel established eGFP-lines revealed that approximately 75 – 95 % of the cells were transduced and selected. Ets-1-DN prevented the C3aR-expression when Bt_2 -cAMP was used to induce C3aR-expression in mono-myeloblastic U937-cells as determined by real-time RT-PCR.

The pro-inflammatory cytokine tumour-necrosis-factor- α (TNF- α), an activator of the transcription factors Ets-1 and AP-1, induced synergistically with interferon- γ the increase of C3aR mRNA in native U937-cells. In contrast, Interleukin-1 β , another pro-inflammatory cytokine, could only slightly up-regulate C3aR-expression. Taken together, our data reveal part of the transcriptional regulation of the C3aR, and indicate Ets-1 and AP-1 as important transcription factors and TNF- α as one additional inductor of this receptor.

An additional part of this thesis was comprised by the analysis of the expression-pattern of anaphylatoxin-stimulated monocytic cells by micro-array technology to reveal evidence for new C3aR- and C5aR-mediated functions. In primary human monocytes/macrophages the powerful C5a induced the expression of numerous genes, such as the macrophage inflammatory protein 1- α , a chemotaxin which is essentially involved in inflammatory events and the orphan-receptor HM74. The C5a-mediated up-regulation of the putative chemokine receptor HM74 suggests its close participation in inflammatory processes. Furthermore a reduction of the LPS-induced IL-6-production after stimulation with C5a could be observed, possibly associated with sepsis.

Besides providing evidence for functions of the anaphylatoxin-receptors, this paper lays the foundation for understanding the transcriptional regulation of C3aR.

Schlagworte

Anaphylatoxin-Rezeptoren, Genregulation, Expressionsanalyse

Keywords

Anaphylatoxin-receptors, gene-regulation, expression-analysis

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS KOMPLEMENTSYSTEM	1
1.2	STRUKTUR UND FUNKTION DER ANAPHYLATOXINE	5
1.3	DIE ANAPHYLATOXIN-REZEPTOREN	8
1.3.1	<i>C5a-Rezeptor (CD88)</i>	9
1.3.2	<i>C3a-Rezeptor</i>	11
1.3.3	<i>C5L2</i>	14
1.4	LIPOLYPSACCHARID	15
1.5	NEU IDENTIFIZIERTE AT-REZEPTOR REGULIERENDE TRANSKRIPTIONSFAKTOREN UND IHRE SIGNALWEGE	17
1.5.1	<i>Der Transkriptionsfaktor Ets-1</i>	17
1.5.2	<i>Das Aktivatorprotein-1 (AP-1)</i>	18
1.5.3	<i>Das cAMP-response element (CRE)</i>	18
1.6	DAS PROINFLAMMATORISCHE ZYTOKIN TNF- α	19
1.7	ZIELSETZUNG	20
2	MATERIAL	23
2.1	GERÄTE	23
2.2	VERBRAUCHSMATERIAL	24
2.3	CHEMIKALIEN	25
2.4	PUFFER UND LÖSUNGEN	26
2.5	ENZYME UND KITS	28
2.6	PRIMER	29
2.7	VEKTOREN	31
2.8	NATÜRLICHE UND SYNTHETISCHE LIGANDEN	32
2.9	ANTIKÖRPER	32
2.9.1	<i>Monoklonale Antikörper</i>	32
2.9.1.1	Verwendung für durchflußzytometrische Analysen	32
2.9.2	<i>Polyklonale Seren (für FACS-Analysen)</i>	33
2.10	EUKARYOTISCHE ZELLINIEN	33
2.11	BAKTERIEN	34
3	METHODEN	35
3.1	METHODEN ZUR EXPRESSIONS- UND FUNKTIONSANALYSE VON EUKARYONTEN ZELLEN	35
3.1.1	<i>Durchflußzytometrie</i>	35
3.1.1.1	Untersuchung von humanen Monozyten auf C3aR bzw. C5aR-Expression	35
3.1.1.2	Untersuchung von transient transfizierten HEK293 auf C3aR-Expression	36
3.1.2	<i>Messung von freiem zytosolischen Ca^{2+}</i>	37
3.1.3	<i>ATP-Release-Assay (ARA)</i>	39
3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	40
3.2.1	<i>Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</i>	40
3.2.2	<i>Agarosegelelektrophorese</i>	40
3.2.3	<i>Isolierung von DNA aus Agarosegelen</i>	41
3.2.4	<i>Phenol-Chloroform-Extraktion</i>	41
3.2.4.1	Ethanolische Fällung	42
3.2.4.2	Isopropanolfällung	42

3.2.5	<i>Polymerase-Ketten-Reaktion</i>	43
3.2.6	<i>PCR-Mutagenese</i>	43
3.2.7	<i>Plasmid-Präparationen</i>	44
3.2.7.1	Plasmid-Midi/Maxi-Präparation	44
3.2.7.2	Plasmid-Mini-Präparation	45
3.2.8	<i>Klonierungsarbeiten</i>	45
3.2.8.1	Restriktionsverdau	45
3.2.8.2	Klenow-Behandlung	46
3.2.8.3	CIAP-Behandlung	46
3.2.8.4	Ligation	46
3.2.8.5	Transformation von Bakterien durch Elektroporation	47
3.2.8.6	Transformation von chemisch kompetenten Bakterien	47
3.2.9	<i>cDNA-Synthese</i>	48
3.2.10	<i>AtlasTM cDNA Expression Array</i>	49
3.2.11	<i>Real-time Quantitative PCR</i>	50
3.2.12	<i>Transiente Transfektion von humanen Zelllinien</i>	54
3.2.12.1	Transiente Transfektion nach der Lipofectamine TM -Methode	55
3.2.12.2	Transiente Transfektion nach der Effectene TM -Methode	55
3.2.12.3	Transiente Transfektion nach der Calciumphosphat-Methode	56
3.2.12.4	Überprüfung der Transfektionseffizienz mittels β -Galaktosidase-Assay	57
3.2.13	<i>Reportergen-Assay</i>	57
3.2.13.1	SEAP-Test	57
3.2.13.2	β -Gal-Assay	58
3.2.14	<i>Limulus-Amebocyte-Lysate-Test</i>	58
3.2.15	<i>Kompetitive ¹²⁵I-C3a/C5a-Bindungsstudien</i>	59
3.2.16	<i>RNA-Arbeiten</i>	60
3.2.16.1	Aufreinigung von Gesamt-RNA	61
3.2.16.2	Behandlung von Gesamt-RNA mit Desoxyribonuklease (DNase)	61
3.2.16.3	Elektrophorese von RNA in denaturierenden Agarosegelen	62
3.3	ETABLIERUNG EINES RETROVIRALEN GENTRANSFER- UND EXPRESSIONS-SYSTEMS	62
3.3.1	<i>Transfektion der Verpackungszelllinie zur Virusproduktion</i>	62
3.3.1.1	Verwendung der Phoenix-gp-Verpackungszelllinie	62
3.3.1.2	Verwendung der 293GPG-Verpackungszelllinie	64
3.3.2	<i>Bestimmung des Virustiters</i>	64
3.3.2.1	Verwendung der HT1080-Zelllinie	65
3.3.2.2	Verwendung der A549-Zelllinie	66
3.3.3	<i>Transduktion der Zielzellen</i>	66
3.4	ZELLKULTUR	67
3.4.1	<i>Präparation von primären humanen Monozyten</i>	67
3.4.2	<i>Kultivierung und Passage von adhärenen und Suspensionszellen</i>	67
3.4.3	<i>Bestimmung der Zellzahl und Vitalitätsprüfung</i>	68
3.5	BESTIMMUNG VON INTERLEUKINKONZENTRATIONEN IN ZELLÜBERSTÄNDEN	68
3.5.1	<i>ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)</i>	68
3.6	MATHEMATISCHE/STATISTISCHE VERFAHREN	69
3.6.1	<i>Fishers Exakter Test</i>	69
4	ERGEBNISSE	71
4.1	UNTERSUCHUNG DER TRANSKRIPTIONELLEN REGULATION DES C3AR	71
4.1.1	<i>Eingrenzung des Transkriptionsstartpunktes mittels RT-PCR</i>	71
4.1.2	<i>Mutation möglicher TATA-Boxen</i>	75

4.1.3	Optimierung der transienten Transfektion der humanen Mastzelllinie HMC-1 und des Reporter-Gen-Assays	76
4.1.4	Herstellung zusätzlicher Verkürzungsmutanten der 5'-UTR des C3aR	78
4.1.5	Identifizierung wichtiger regulatorischer Promotorbereiche mittels Reporter-Gen-Assay	79
4.1.6	Vorhersage möglicher Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen	81
4.1.7	Der Transkriptionsfaktor Ets-1 als ein Regulator des C3aR-Promotors	82
4.1.8	AP-1 – ein zusätzlicher Regulator des C3aR-Promotors in HMC-1-Zellen	83
4.1.9	Kooperation von Ets-1 und AP-1	84
4.1.10	Effekte von Ets-2 auf die „Ets-1-Bindungsstelle“	85
4.1.11	Mutation zweier putativer CREB-Bindungsdomänen im C3aR-Promotor	86
4.1.12	Aufbau verschiedener quantitativer real-time RT-PCRs	89
4.1.13	Induktion der C3aR-mRNA auf HEK293-Zellen durch die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-1	92
4.1.14	¹²⁵ I-C5a-Bindungsstudie nach Transfektion von HEK293 mit den Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-1	93
4.1.15	Durchflußzytometrische Untersuchung der Induktion des C3aR auf HEK293-Zellen nach Transfektion mit den Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-1	93
4.2	IDENTIFIZIERUNG NEUER INDUKTOREN DER C3aR-EXPRESSION	95
4.2.1	Screening mittels Reporter-Gen-Assay	95
4.2.2	Screening mittels semiquantitativer kompetitiver ¹²⁵ I-Bindungsstudie	95
4.2.3	TNF- α als ein neuer Induktor der C3aR-Expression	97
4.2.4	Quantitative real-time RT-PCR Analyse für den Transkriptionsfaktor Ets-1 an verschiedenen Zelllinien	98
4.2.5	Additive Induktion der C3aR-Expression durch IL-1 β und TNF- α	98
4.2.6	Zusammenspiel zwischen TNF- α und IFN- γ	99
4.3	ETABLIERUNG EINES RETROVIRALEN GENTRANSFER- UND EXPRESSIONS-SYSTEMS	100
4.3.1	Vergleich dreier Envelope-Proteine	102
4.3.2	Auswahl der geeigneten Verpackungszelllinie	105
4.3.2.1	Phoenix-gp-Verpackungszelllinie - Austestung der Virusüberstände in HT1080-Zellen	105
4.3.2.2	293GPG-Verpackungszelllinie - Austestung der Virusüberstände in A549-Zellen	108
4.3.3	Optimierung der retroviralen Infektion für verschiedene Zelllinien	109
4.3.3.1	Gegenüberstellung von Protaminsulfat und Polybrene	110
4.3.3.2	Verkürzung des Infektionszeitraumes	111
4.3.3.3	Mehrmalige Infektion	111
4.4	ANWENDUNG DES RETROVIRALEN GENTRANSFER- UND EXPRESSIONSSYSTEMS	112
4.4.1	Herstellung stabiler Ets-1-DN (und eGFP) Zelllinien unter Verwendung des retroviralen neo-Expressionsvektors	112
4.4.1.1	Aufnahme von „G418-Kill-Kurven“	112
4.4.1.2	Klonierung einer Ets-1 dominant negativen Mutante und des enhanced Green Fluorescent Proteins (Kontrolle) in den RetroX™-Vektor pQCXIN	112
4.4.1.3	Generierung der viralen Überstände	113
4.4.1.4	Überprüfung der viralen Überstände in A549-Zellen	113
4.4.1.5	Herstellung der stabilen Linien	114
4.4.2	Funktionsüberprüfung der Ets-1 dominant negativen Mutante	117
4.4.2.1	Untersuchung der inhibierenden Wirkung der Ets-1-DN auf die Stimuli-induzierte Hochregulation des C3aR in U937-Zellen	117
4.5	EXPRESSIONSANALYSE MONOZYÄRER ZELLEN MITTELS cDNA-ARRAY	118
4.5.1	Planung der cDNA Array-Experimente	118
4.5.2	Optimierung der Monozyten-Aufreinigung und Kultivierung	119

4.5.2.1	Monozyten-Aufreinigung – Verbesserung der Ausbeute und Reinheit -----	120
4.5.2.2	Auswahl des geeigneten Mediums zur Kultivierung von primären humanen Monozyten bei anschließender Stimulation mit den Anaphylatoxinen und/oder LPS -----	120
4.5.3	<i>Nachweis der C3aR- und C5aR-Expression auf monozytären Zellen bzw. Zelllinien mittels FACS-Analysen und ¹²⁵I-Bindungsstudien</i> -----	122
4.5.3.1	Durchflußzytometrische Untersuchung primärer humaner Monozyten -----	122
4.5.3.2	Überprüfung primärer humaner Monozyten auf Rezeptorexpression mittels kompetitiver ¹²⁵ I-C5a-Bindungsstudie -----	124
4.5.3.3	Überprüfung der Zelllinie J774A.1 auf Rezeptor-Expression mittels kompetitiver ¹²⁵ I-Bindungsstudie -----	125
4.5.4	<i>Nachweis der Funktionsfähigkeit des C3aR und C5aR auf monozytären Zellen mittels Ca²⁺-Test</i> -----	126
4.5.5	<i>ATP-Release-Assay zur Überprüfung der C3a-Stabilität in den Stimulationsmedien</i> -----	128
4.5.6	<i>Lipopolysaccharid-freies Arbeiten</i> -----	129
4.5.7	<i>Bestimmung einer LPS Dosis-Wirkungskurve mittels IL-8-ELISA</i> -----	130
4.5.8	<i>RNA-Extraktion</i> -----	132
4.5.9	<i>AtlasTM Mouse 1.2 cDNA Expression Array – Stimulation der J774A.1-Zelllinie und Durchführung des Array-Experimentes</i> -----	133
4.5.9.1	Auswertung der Atlas TM Mouse 1.2 cDNA Expression Arrays -----	134
4.5.10	<i>AtlasTM Human 1.2 cDNA Expression Array – Stimulation der primären humanen Monozyten und Durchführung des Array-Experimentes</i> -----	140
4.5.10.1	Durchführung des Stimulations-Experimentes „Variante 1“ -----	140
4.5.10.2	Durchführung des Stimulations-Experimentes „Variante 2“ -----	141
4.5.10.3	Auswertung der Atlas TM Human 1.2 cDNA Expression Arrays -----	141
4.5.11	<i>Überprüfung der Ergebnisse der AtlasTM Human 1.2 cDNA Expression Array-Daten durch unabhängige Verfahren</i> -----	147
4.5.11.1	Überprüfung der Mikroarray Ergebnisse mittels ELISA für IL-6 und IL-8 -----	147
4.5.11.2	Überprüfung der Mikroarray Ergebnisse mittels quantitativer real-time RT-PCR -----	149
5	DISKUSSION -----	153
5.1	UNTERSUCHUNG DER TRANSKRIPTIONELLEN REGULATION DES C3AR -----	153
5.1.1	<i>Bestimmung des Transkriptions-Startpunktes</i> -----	153
5.1.2	<i>Bei dem C3aR-Promotor handelt es sich um einen TATA-losen Promotor</i> -----	154
5.1.3	<i>Eingrenzung wichtiger regulatorischer Bereiche des C3aR-Promotors und Vorhersage putativer Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen</i> -----	154
5.1.4	<i>Die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-1 sind Regulatoren des C3aR</i> -----	155
5.1.4.1	Untersuchungen mittels Reporter-gen-Studien -----	155
5.1.4.2	Interagiert Ets-2 mit dem C3aR-Promotor? -----	157
5.1.4.3	Hochregulation der C3aR-mRNA in HEK293-Zellen durch Überexpression der Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-1 -----	157
5.1.4.4	Durchflußzytometrischer Nachweis der Induktion des C3aR nach Überexpression von Ets-1 und AP-1 -----	158
5.1.5	<i>Mutation zweier putativer ATF/CREB-Bindungsdomänen</i> -----	158
5.2	IDENTIFIZIERUNG NEUER INDUKTOREN DER C3AR-EXPRESSION -----	160
5.2.1	<i>TNF-α als ein neuer Induktor der C3aR-Expression</i> -----	160
5.3	ETABLIERUNG EINES RETROVIRALEN GENTRANSFER- UND EXPRESSIONS-SYSTEMS ZUR HERSTELLUNG EINER DOMINANT NEGATIVEN MUTANTE DES ETS-1 TRANSKRIPTIONSFAKTORS -----	162
5.3.1	<i>Wirkung der Ets-1-DN</i> -----	163
5.4	EXPRESSIONSANALYSE MONOZYTÄRER ZELLEN MITTELS CDNA-ARRAY -----	163
5.4.1	<i>Optimierung der Versuchs-/Stimulationsbedingungen für die Arrays</i> -----	163

5.4.2	<i>Auswertung der Array-Experimente</i> -----	165
6	ANHANG -----	173
6.1	GENERIERTE PLASMIDE -----	173
6.2	VOLLSTÄNDIGE ERGEBNISSE DER ARRAY-EXPERIMENTE -----	175
6.2.1	<i>Atlas™ Mouse 1.2 cDNA Expression Array</i> -----	175
6.2.1.1	Array I -----	175
6.2.1.2	Array II -----	177
6.2.2	<i>Atlas™ Human 1.2 cDNA Expression Array</i> -----	179
6.2.2.1	Experiment 1 -----	179
6.2.2.2	Experiment 2 -----	181
6.3	VOLLSTÄNDIGE ANALYSE DES BEREICHES VON – 18 BIS – 286 DER 5'-UTR DES HUMANEN C3AR UNTER ZUHILFENAHME DER MATINSPECTOR® PROFESSIONAL SOFTWARE VERSION 6.2 -----	186
	LITERATUR -----	189
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS -----	201
	TABELLENVERZEICHNIS -----	207

Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro (10 ⁻⁶)
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ACD	<i>acid-citrat-dextrose</i>
AK	Antikörper
Amp	Ampecillin
AMS	Aminosäure
AP	Alkalische Phosphatase
AT	Anaphylatoxin
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintri-phosphat
AT-R	Anaphylatoxin-Rezeptor
BCP	1-Bromo-3-Chloro-Propan
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cytosin
C3aR	C3a-Rezeptor
C5aR	C5a-Rezeptor
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre DNA
CDS	<i>Cell Dissoziation Solution</i>
Ci	Curie
cpm	registrierte Zerfälle pro Minute (counts per minute)
CRPG	(Chlorophenol Red-β-D-galactopyranoside)
CSPD	(Disodium 3-(4-methoxy Spiro[1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)-tricyclo[3.3.1.1]decan]-4-yl)phenyl phosphat)
C _T	Threshold-Cycle
CTP	Cytidintri-phosphat
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtri-phosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	enzym-linked immunosorbent assay
<i>env</i>	Gen, das für die Glykoproteine auf der Oberfläche von Retroviren kodiert
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i>
FcγR	Fcγ-Rezeptoren
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMLP	N-Formylmethionin-Leucin-Phenylalanin
FSC	Forwardscatter
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung 9,81m/s ²
<i>gag</i>	Gen, das für die gruppenspezifischen Antigene von Retroviren kodiert
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung
GEBS	Glycerin, EDTA, Bromphenolblau, Sarcosyl
GFP	<i>green fluorescent protein</i> ; Grün-fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Markrophagen koloniestimulierender Faktor
GTP	Guanosintri-phosphat
h	Stunde
HBSS	<i>Hank's basic salt solution</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IC	Immunkomplexe

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
K _D	Bindungskonstante
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LPS	Lipopolysaccharid
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
min	Minuten
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOPS	3-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mRNA	messengerRNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF	nuklearer Faktor
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
Oligo	Oligonukleotid
ORF	open reading frame, offener Leserahmen
p	pico (10 ⁻¹⁵)
PBL	periphere Bluteukozyten
PBMC	peripheral blood mononuclear cells, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	platelet derived growth factor
PE	Phycoerythrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonen-Konzentration
PKC	Proteinkinase C
PMNL	Polymorphkernige Leukozyten
<i>pol</i>	Gen, das für die enzymatische Aktivität von Retroviren kodiert
R	Rezeptor
RA	rheumatoide Arthritis
RAS	Reverse Antisense
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Sidescatter
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TGF	transforming growth factor, transformierender Wachstumsfaktor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
U	unit (Einheit der Enzymaktivität)
U	Uracil
UTP	Uridintriphosphat
UTR	nicht translatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen bei Prozentangaben
w/v	Masse pro Volumen bei Prozentangaben
x-Gal	5-Bromo-4-chloro-indoyl-β-D-Galactosid

1 Einleitung

1.1 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem stellt eine schnellwirksame, effektive Barriere des Organismus gegen eindringende Mikroorganismen dar; es ist somit ein unersetzbarer Teil der körpereigenen Abwehr. Als multifaktorielles Proteinkaskadensystem steht es im Zentrum der unspezifischen frühen Immunantwort. Im Wesentlichen erfüllt es drei Hauptaufgaben: Die Aktivierung zellulärer Abwehrmechanismen, die Opsonisierung von Fremdkörpern und die Zerstörung entsprechender Zielzellen.

Ähnlich wie bei der Gerinnungskaskade oder der Fibrinolyse kommt es nach Auslösung der Komplementkaskade zu einer sich verstärkenden Kettenreaktion, in deren Verlauf die Komplementkomponenten durch limitierte Proteolyse oder katalysierte Konformationsumwandlung in ihre enzymatisch aktive Form überführt werden.

Die aktivierten Komplementfaktoren fungieren entweder als Enzyme, Bindungsproteine, spezifische Rezeptoren oder als regulatorische Proteine. Sie wechselwirken untereinander und mit Faktoren des angeborenen Immunsystems und komplementieren damit die Immunantwort.

Die Aktivierung des Komplementsystems kann auf drei verschiedenen Wegen erfolgen. Entweder Antikörper-abhängig (klassischer Weg), durch Fremdoberflächen getriggert (alternativer Weg) oder über die Aktivierung eines Mannose-bindenden Lektins (Lektin-abhängiger Weg).

Die durch die Bindung von C1 an einen Antigen-Antikörper-Komplex ausgelöste Aktivierung der Komplementkaskade wurde zuerst erforscht und wird daher als **klassischer Weg** bezeichnet. Die Komplementkomponente C1 stellt einen Protein-Komplex aus zwei reversibel interagierenden Untereinheiten, C1q und C1r₂s₂, dar. Die autokatalytische Aktivierung dieses Komplexes wird durch die Bindung der globulären Domäne von C1q an die Fc-Region eines IgG- oder IgM-Moleküls initiiert. Es kommt zur Freisetzung der Serinprotease-Untereinheit von C1s, welche daraufhin C4 spaltet. Mehrere der entstandenen größeren Spaltprodukte (C4b) binden neben dem aktivierten C1-Komplex an Mikroorganismen oder Immunkomplexe. Gebundenes C4b stellt einen Akzeptor für C2 dar. Nachdem dieses ebenfalls vom C1s gespalten ist, verbleibt das größere C2a-Fragment an C4b gebunden. Dieser C4b2a-Komplex stellt die C3-Konvertase des klassischen Weges dar.

Neben der Antikörper-vermittelten Auslösung dieser Signalkaskade kann auch das C-reaktive Protein, das Lipid A der Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien, virale Glykoproteine oder polyanionische Strukturen wie DNA zu einer Aktivierung der C1-Komponente führen.

Das Schlüssel-molekül C3 des **alternativen Komplementaktivierungsweges** liegt in hoher Plasmakonzentration vor und ist Substrat für eine große Zahl proteolytischer Enzyme. So liegen ständig geringe Mengen an löslichem C3b vor. Dieses C3b bildet mit Faktor B unter Mithilfe von Faktor D das erste C3bBb-Enzym in der flüssigen Phase. Durch Spaltung weiterer C3-Moleküle kommt es zur verstärkten Generierung von C3b (und C3a). Dieses bindet an die Oberflächen von Komplement-aktivierten Mikroorganismen, wie z. B. an Teichoinsäuren von grampositiven Bakterien, LPS von gramnegativen Bakterien oder Zymosan auf Hefezellwänden. Weitere Bb-Fragmente lagern sich an und durch die Stabilisierung mit Properdin kommt es zur Ausbildung der C3-Konvertase des alternativen Weges (C3bBb). Beinahe explosionsartig werden weitere C3-Moleküle gespalten und die Oberfläche z. B. eines Bakteriums im Streukegel dieses Enzyms mit C3b bedeckt, d. h. opsonisiert. Die Zelle ist damit für die Phagozytose durch Granulozyten und Makrophagen präpariert. Bei diesem Prozess handelt es sich also um einen positiven Rückkopplungseffekt, wohingegen der Aktivierungsgrad der klassischen Komplementsequenz im Regelfall von der Menge des immunkomplexgebundenen Antikörpers bestimmt wird.

Der **Lektin-abhängige Weg** wird durch die Bindung eines Mannose-bindenden Lektins (MBL) an Mannose-haltige Proteine oder Kohlenhydrate auf bakteriellen oder viralen Oberflächen initiiert. Nach der Aktivierung zweier MBL-assoziiertes Serin-Proteasen (MASP-1 und -2) erfolgt die enzymatische Spaltung der Komplementkomponente C4. Auf dieser Ebene mündet der Lektin-abhängige in den klassischen Weg und führt ebenfalls zur Bildung der klassischen C3-Konvertase (C4b2a).

Alle drei Aktivierungswege konvergieren mit der Bildung der C3-Konvertasen, die C3 in das lösliche Anaphylatoxin C3a und die aktive Komplementkomponente C3b spaltet. Die C5-Konvertase des klassischen bzw. alternativen Weges wird durch die Addition von C3b an den Komplex aus C4b2a bzw. C3bBb generiert und spaltet daraufhin C5 in das anaphylatoxische Peptid C5a und das metastabile C5b. Das größere Spaltprodukt C5b fügt sich sogleich mit C6 zu einer bimolekularen Verbindung zusammen. Diese Reaktion stellt den ersten Schritt zur Bildung des **Membran-angreifenden Komplexes** (MAC) dar. Nach Addition eines C7-Moleküls unterliegt der Komplex C5b67 einer Konformationsänderung, wodurch eine hydrophobe Region von C7 exponiert und in die Lipiddoppelschicht des Mikroorganismus inseriert wird. Im nächsten Schritt lagert sich C8 β an den trimolekularen Komplex an, woraufhin C8 α - γ in die Lipiddoppelschicht eindringt. Als abschließendes Ereignis induziert C8 α - γ die Polymerisierung von zehn bis 16 C9-Molekülen zu einer ringförmigen Struktur, dem MAC, der eine Pore in der zytoplasmatischen Membran einer als fremd erkannten Zielzelle bildet und damit letztendlich deren Lyse einleitet.

Regulation des Komplementsystems:

Zur Vermeidung von überschießenden Reaktionen unterliegt das Komplementsystem einer strikten Regulation. So wird eine spontane Aktivierung der klassischen Komplementsequenz hauptsächlich durch den C1-Inhibitor unterdrückt. Dieser bindet an den Enzymteil von ungebundenem C1 (C1_rS₂), der dadurch von C1q abdissoziiert. Auf der Oberfläche von Mikroorganismen gebundenes C1 wird auf dieselbe Weise inaktiviert, d. h. die Zeit, in der C4 und C2 durch aktives C1s gespalten werden können, ist begrenzt.

Gerade wegen der starken Amplifikation des alternativen Weges unterliegt er sowie auch der klassische Weg der Aufsicht weiterer Plasmakontrollproteine, wie den Faktoren I und H und dem C4-bindenden Protein (C4BP). Bei dem Faktor I handelt es sich um eine Serinprotease, die unterstützt von Faktor H, MCP, C4BP oder CR1, C3b und C4b spaltet und damit inaktiviert. Der Faktor H bindet an C3b und ersetzt somit Bb. C4BP bindet an C4b und ersetzt dabei C2a, außerdem unterstützt er als Kofaktor die C4b-Spaltung durch I. Ebenso an der Regulation beteiligt sind die drei membranassoziierten Regulatorproteine Komplement-C3b-Rezeptor (CR1), Membran-Kofaktor-Protein (MCP) und der „decay-accelerating-faktor“ (DAF). Der CR1 bindet an C3b oder C4b und ersetzt Bb bzw. C2a. Er stimuliert die Phagozytose und regt den Erythrozytentransport von Immunkomplexen an. Der MCP stimuliert I zur Inaktivierung von C3b und C4b. DAF verdrängt Bb von C3b, sowie C2a von C4b. Da die membrangebundenen Kontrollproteine nicht auf Zellen mikrobiellen Ursprungs vorkommen, ist das ein weiterer Grund für den Selbstschutz der körpereigenen Zellen sowie die erhöhte Empfänglichkeit körperfremder Zellen für die Komplementattacke.

Vier weitere Regulatorproteine überwachen die Bildung des MAC: Das S-Protein und das Sp-40,40 verhindern jeweils zusammen die Insertion von C5b-C7 in die Zellmembran. Der membranverankerte homologe Restriktionsfaktor (HRF) wirkt durch Interferenz mit der Bindung von C8 und C9 an erythrozytenggebundene C5b-C7- oder C5b-C8-Komplexe maximal inhibitorisch auf die Lyse. Das CD59 vermindert den Einbau von C9 in C5b-C8-Komplexe.

Zusammenfassend erfüllt das Komplementsystem also im Wesentlichen drei Effektorfunktionen:

- Oponisierende Funktion

Die Oponisierung (wörtlich: Schmackhaftmachung) von Zielpartikeln über die Komplementspaltprodukte C3b, C4b und C5b erleichtert die rezeptorvermittelte Phagozytose. Die markierten Immunkomplexe oder Mikroorganismen binden an spezifische Komplementrezeptoren, die auf fast allen Immunzellen exprimiert sind. Anschließend werden sie über Phagozytose aus der Blutbahn entfernt.

- Zytotoxische Funktion

Durch die Ausbildung des Membran-angreifenden Komplexes und dessen Insertion in die Membran des Zielpartikels kommt es zum Verlust der zellulären Homöostase und damit zur Abtötung des Mikroorganismus.

- Entzündungsstimulierende Funktion
Die während der Komplementkaskade freigesetzten anaphylatoxischen Peptide C3a und C5a haben eine proinflammatorische Wirkung. Ihre Effektorfunktionen sollen im nächsten Abschnitt genauer betrachtet werden.

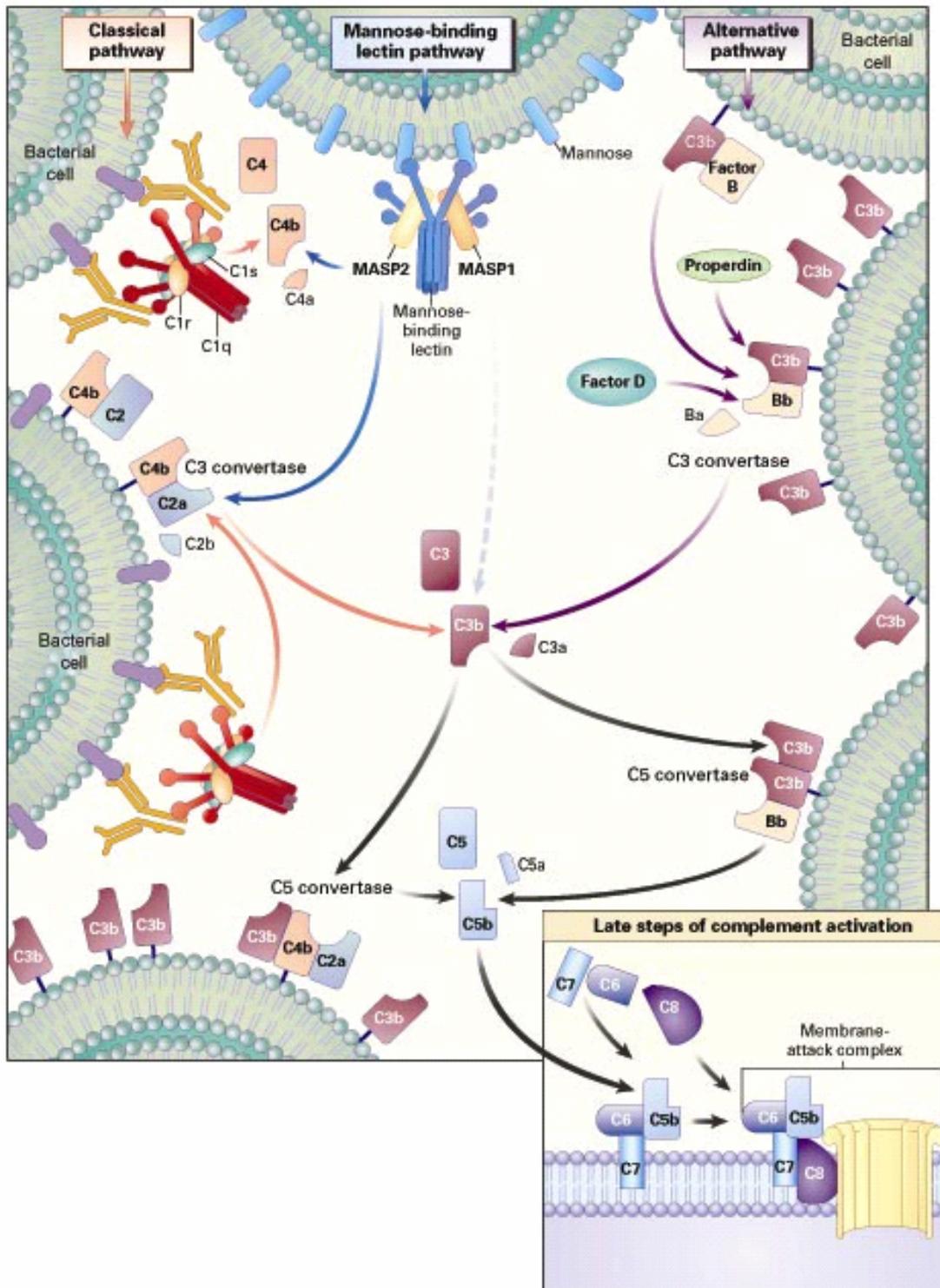


Abbildung 2.1: Die drei Aktivierungswege des Komplementsystems. Aus M. J. Walport, New England Journal of Medicine, Vol. 344, Nr. 14 (April 2001)[1].

1.2 Struktur und Funktion der Anaphylatoxine

Die Anaphylatoxine sind hochpotente proinflammatorisch und immunmodulatorisch wirksame Mediatoren. Ihre Generierung erfolgt an der gemeinsamen Endstrecke der unterschiedlichen Komplementaktivierungswege durch die proteolytische Abspaltung des N-terminalen Bereiches der α -Kette von C3 und C5. Ihre Wirkung entfalten sie über spezifische Rezeptoren, den C3a-Rezeptor (C3aR) und den C5a-Rezeptor (C5aR). Sie induzieren Kontraktionen der glatten Muskulatur, erhöhen die Gefäßpermeabilität und führen zur Freisetzung weiterer Mediatoren. Schmerz, Rötung, Temperaturerhöhung und Schwellung am Infektionsherd sind dabei Teil einer typischen lokalen Entzündung.

Die beiden Botenstoffe C3a und C5a weisen untereinander eine Sequenzhomologie von 35 – 40 % auf [2]. Dabei sind je fünf C-terminal gelegene Aminosäuren hoch konserviert und entscheidend an der Bindung und Interaktion mit dem Rezeptor beteiligt. Bei weiteren Strukturanalysen stellte sich heraus, dass der ausgeprägte α -Helix-Anteil von 45 % und die intramolekulare Vernetzung über drei Disulfidbrücken zu einer extremen Stabilität der anaphylatoxischen Peptide gegenüber hohen Temperaturen, pH und denaturierenden Salzkonzentrationen führt [3;4]. Auf molekularer Ebene unterscheiden sie sich insofern, dass C5a infolge von posttranslatorischer Glykosylierung um etwa 2 kDa schwerer ist als C3a, welches ein Molekulargewicht von 9 kDa aufweist [5]. Aufgrund des hohen Anteils an den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin liegen die 77 und 74 Aminosäure langen Anaphylatoxine C3a und C5a bei neutralem pH-Wert als Kationen vor.

Trotz dieser strukturellen Ähnlichkeit und eines wahrscheinlich gemeinsamen phylogenetischen Ursprungs unterscheiden sich die beiden anaphylatoxischen Peptide erheblich in ihrer proinflammatorischen Potenz, die beim C3a etwa 100 mal schwächer ausgeprägt ist als beim C5a [6]. Demgegenüber steht jedoch eine etwa 15-fach höhere Serumkonzentration des C3a (10^{-8} bis 10^{-10} M).

Eine örtliche Begrenzung des Entzündungsgeschehens erfolgt mittels spezifischer Desarginierung der beiden Mediatoren durch die Serumcarboxypeptidase N [7]. Das resultierende C3a_{desArg} kann als funktionell inaktiv angesehen werden [8], wohingegen das C5a_{desArg} mit einer etwa 10-100 mal verminderten Potenz immer noch zu den Anaphylatoxinen zählt [9]. Eventuelle Effektorfunktionen des C3a_{desArg} scheinen auf der Rezeptor-unabhängigen Interaktion zwischen dem stark positiv geladenen Liganden und der negativ geladenen Zelloberfläche zu basieren [10].

Die ausgesprochen vielfältigen Funktionen der Anaphylatoxine bei der Einleitung und Aufrechterhaltung des Entzündungsgeschehens sind letztendlich die Konsequenz der Expression ihrer Rezeptoren auf unterschiedlichen Zelltypen. Sie lassen sich in vier Hauptkategorien einteilen: Chemotaxis, veränderte Adhärenz, morphologische Zellreaktion und die Freisetzung von weiteren Mediatoren. Diese Aufgaben sollen im Folgenden, aufgrund ihrer Komplexität, für die beiden anaphylatoxischen Peptide isoliert betrachtet werden:

C5a ist ein hochpotentes Chemotaxin für alle Granulozyten, speziell der Neutrophilen [11] und Eosinophilen [12]. In diesen Zellen induziert es die Bildung verschiedenster sekretorischer Granula, die ihrerseits zu einer extrazellulären Freisetzung bestimmter inflammatorischer Mediatoren wie der Elastase, der Peroxidase und der Glucuronidase führen. In sämtlichen Granulozyten aktiviert C5a den NADPH-Oxidase-Weg, der zur Freisetzung toxischer Sauerstoffmetabolite, dem so genannten oxidativen Burst führt. Im Frühstadium einer Entzündungsreaktion kommt es zu Veränderungen auf der Zelloberfläche von Neutrophilen und Eosinophilen. Dies geht mit einer verstärkten Expression der β_2 -Integrine und einem Verlust an L-Selektinen einher [13], so dass die Leukozyten am Ort einer Entzündung festgehalten werden und ins Gewebe einwandern können. Auch auf Mastzellen löst C5a einen ausgeprägten chemotaktischen Reiz aus [14]. Ihre Aktivierung führt zur Degranulation der vasoaktiven Substanzen Histamin und Serotonin [7]. Die Synthese von Arachidonsäurederivaten induziert C5a direkt, wohingegen die Histamin-Freisetzung aus Mastzellen zur Produktion von Thromboxanen und Leukotrienen führt [15]. Im Gegensatz zu C3a verstärkt C5a die humorale und T-Zell-vermittelte Immunantwort [16].

In humanen Monozyten spielt C5a ebenfalls eine Rolle als proinflammatorischer Mediator, so induziert es die IL-1 β mRNA-Synthese [17] und aktiviert den Transkriptionsfaktor NF- κ B [18]. Seine chemotaktische Potenz ist hoch [19] und führt zu einer verstärkten Expression der β_2 -Integrine und Adhäsion an kultivierte Endothelzellen [20]. Weiterhin führt die Stimulation von Monozyten/Makrophagen mit dem Entzündungsmediator C5a zur Verstärkung der LPS-induzierten Sekretion von IL-1 und dem Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) [21]. Im Gegensatz dazu unterdrückt C5a die IL-12-Produktion in IFN- γ -geprimten und LPS-vorstimulierten humanen Monozyten [22]. C5a ist ein potenter Auslöser sowohl der Gen-Expression, als auch der Protein-Synthese der beiden Interleukine IL-6 und IL-8 in PBMCs [23;24]. Die Immunglobulin-Sekretion wird auf der Ebene der T-Zellen, vermutlich über Rezeptor-vermittelte Mechanismen, erhöht [16]. In nicht-parenchymalen Leberzellen induziert C5a die Freisetzung von Prostaglandinen und verstärkt die LPS-abhängige Ausschüttung von IL-6 [25]. Eine erhöhte Expression von IL-1 β , IL-6, MCP-1, GM-CSF und IL-8 mRNA konnte in Epithelzellen der Retina gezeigt werden [26]. Die Empfindlichkeit von Monozyten/Makrophagen gegenüber einer HIV-Infektion wird durch die C5a (bzw. C5a_{desArg}) induzierte Ausschüttung von TNF- α und IL-6 erhöht [27]. Diese beiden Zytokine verstärken bekanntermaßen die Replikation des HIV. PMNs antworten normalerweise mit einer Degranulation auf eine Stimulation mit C5a (oder IL-8); diese Antwort bleibt in den Neutrophilen von HIV-1-infizierten Kindern aus. Diese verminderte Reaktivität könnte ein Grund für die erhöhte Anfälligkeit gegenüber mikrobiellen Sekundärinfektionen sein [28]. IL-1 α und TNF- α führen zu einem signifikanten Anstieg der IL-8 Synthese in *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC). Im Gegensatz dazu verringert C5a die IL-8 Produktion, verstärkt jedoch die Zellproliferation [29]. Ebenfalls in HUVEC-Zellen wurde nachgewiesen, dass eine Stimulation mit C5a (oder C3a) zu einer Hochregulation der IL-8, IL-1 β und

RANTES mRNA führt. Im Gegensatz dazu konnte eine Runterregulation der IL-6 mRNA nach Stimulation mit C5a beobachtet werden [30].

Es gibt Hinweise darauf, dass C5a eine neuroprotektive Wirkung zukommt. So schützt eine Vorstimulation mit diesem Mediator MAPK-abhängig vor einer Glutamat-induzierten Apoptose in Neuronen [31]. Zusätzlich inhibiert das Anaphylatoxin C5a Apoptose in Neutrophilen über den Phosphatidylinositol-3-Kinase-Weg [32]. Dieser protektive Mechanismus könnte möglicherweise die Lebensfähigkeit und Funktion der Neutrophilen im Entzündungsmilieu erhöhen.

Das potente Chemotaxin C5a spielt außerdem eine kritische Rolle bei der während inflammatorischen Prozessen auftretenden Veränderung des Expressionsmusters von FcγR. So führt es zur Induktion des aktivierenden FcγRIII und zur Suppression des inhibierenden FcγRII und verstärkt somit den durch ICs ausgelösten Effekt [33].

Kürzlich wurde noch eine weitere immunoregulatorische Funktion von C5a beschrieben. So rekrutiert es humane Monozyten in die Bauchhöhle von Nackt-Mäusen und bewirkt dort über einen TNF- α und Prostaglandin E2-abhängigen Mechanismus ihre Ausreifung zu Dendritischen Zellen [34].

Im Gegensatz zu den breit gefächerten Effekten des C5a, scheinen die von **C3a** selektiver zu sein. Seine proinflammatorische Potenz ist geringer, eine modulierende Komponente tritt in den Vordergrund. Die Effekte des Anaphylatoxins C3a auf Eosinophilen ähneln denen des C5a. C3a wirkt als Chemotaxin, induziert sowohl die Granula-Freisetzung als auch den oxidativen Burst [12;35] und reguliert die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle hoch. In Neutrophilen kommt es nach der Stimulation mit C3a lediglich zu einem Anstieg des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels sowie zur Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies [36]. Aufgrund der spezifischen Aktivierung von Eosinophilen sprach man dem C3a recht früh eine Beteiligung bei allergischen Reaktionen zu. Die höchste Potenz weist es jedoch als Mastzell-Aktivator auf [37]. Die beinahe quantitative Freisetzung zahlreicher Mediatoren, wie z. B. Histamin, wird induziert [10;38]. In physiologischen Konzentrationen unterdrückt C3a im Gegensatz zum C5a die Immunglobulin-Sekretion auf T-Zell-Ebene [39].

Auch C3a weist ein enges Zusammenspiel mit dem Zytokin-/Chemokinnetzwerk auf. So induziert es in LPS-geprimten humanen PBMCs eine Zytokinfreisetzung, die von der jeweiligen Adhäsionsstufe der Zellen abhängig ist. In nicht-adhärenen PBMCs unterdrückt C3a die LPS-induzierte Genexpression von TNF- α und IL-1 β , während es in adhärenen Zellen die Spiegel der beiden entsprechenden mRNAs hochreguliert [40]. In humanen adhärenen Monozyten konnte C3a (sowie C3a_{desArg}) sowohl die Produktion als auch die Freisetzung von IL-1 initiieren [41]. Eine durch C3a (sowie C3a_{desArg}) induzierte IL-6 mRNA- und Proteinsynthese konnte in mit IL-1 β oder LPS vorstimulierten humanen PBMCs gezeigt werden [42]. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass C3a auf aktivierten B-Lymphozyten zu

einer Unterdrückung der polyklonalen Immunantwort und einer verminderten Freisetzung von IL-6 und TNF- α führt [43].

In der epithelialen Zelllinie ECV40 konnte gezeigt werden, dass C3a eine Hochregulation von IL-8 bewirkt [44]. In Astrozyten kommt es nach Stimulation mit dem Anaphylatoxin zur Produktion von MCP-1- und IL-8 mRNA. Durch ein Priming der Zellen mit geringen Dosen an IL-1 β konnte auch die IL-8 Proteinsynthese angeschaltet werden [45]. Monsinjon und Kollegen bestätigten die C3a (oder C5a)-induzierte Hochregulation von IL-8, IL-1 β und RANTES mRNA in der *human umbilical vein endothelial cell-line* (HUVEC) [30].

Neuere Studien an C3^{-/-}- und C5^{-/-}-Mäusen offenbarten, dass die beiden Anaphylatoxine C3a und C5a eine essentielle Rolle bei der Leberregeneration spielen. Die C3- bzw. C5-defizienten Tiere wiesen eine erhöhte Mortalitätsrate und Parenchymzerstörung sowie eine verschlechterte Leberregenerationsfähigkeit nach teilweiser Entfernung des Organs auf. Diese Effekte konnten durch eine C3a und/oder C5a-Gabe nahezu aufgehoben werden. Wahrscheinlich ist die mangelnde Produktion an IL-6 und TNF- α , sowie die demzufolge geringere Aktivierung der *downstream* gelegenen Transkriptionsfaktoren NF- κ B und STAT-3, für die bei den Knock-out-Tieren auftretende schlechtere Leberregeneration verantwortlich [46].

Die beschriebenen Anaphylatoxin-Funktionen wirken primär protektiv. Jedoch führt eine überschießende Aktivierung, bei der zum Teil sogar systemisch erhöhte Spiegel der Anaphylatoxine zu vermessen sind, zu Krankheitsbildern wie dem *Acquired Respiratory Distress Syndrom* (ARDS), rheumatoider Arthritis, Sepsis/SIRS oder dem Systemischen Lupus Erythematodes (SLE).

Die Wirkungen der Anaphylatoxine werden über ihre spezifischen Rezeptoren, den C3a- und den C5a-Rezeptor, vermittelt. Die Expression, Regulation und Genetik dieser Rezeptoren wird im nächsten Abschnitt betrachtet.

1.3 Die Anaphylatoxin-Rezeptoren

Die beiden Anaphylatoxin-Rezeptoren gehören zur Rhodopsin-Superfamilie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren. Ein gemeinsames Kennzeichen aller Mitglieder dieser Rezeptorfamilie ist der strukturelle Aufbau aus sieben hydrophoben transmembranösen Helices, die durch hydrophile extra- und intrazelluläre Loops miteinander verbunden sind.

Die nächsten Verwandten sind der Rezeptor für das bakterielle FMLP sowie die Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2, die unter anderem IL-8 binden. Erst kürzlich wurde neben dem C3aR und dem C5aR (CD88) ein dritter Anaphylatoxin-Rezeptor, der C5L2 (GPR77), beschrieben, der eine 35%ige Sequenzhomologie zum C5aR aufweist.

1.3.1 C5a-Rezeptor (CD88)

Die Klonierung des 350 Aminosäuren langen C5a-Rezeptors gelang 1991 [47]. Nach Sequenzvergleichen stellte sich heraus, dass er eine 34%ige Homologie zum FMLP-Rezeptor aufweist. Das Molekulargewicht beträgt etwa 50-55 kDa. An der Ligandenbindung sind zwei Bereiche des Rezeptors beteiligt: Am N-Terminus erfolgt die Bindung des Kernbereiches vom C5a [48;49]. Die weitere, mit dem C-Terminus des Liganden interagierende Bindungsstelle, die wahrscheinlich auch die Aktivierungsstelle ist, wird im Bereich des zweiten extrazellulären Loops in Aminosäureposition Glu199 [50] und im Bereich der fünften transmembranen Domäne in Aminosäureposition Arg206 [51] beschrieben.

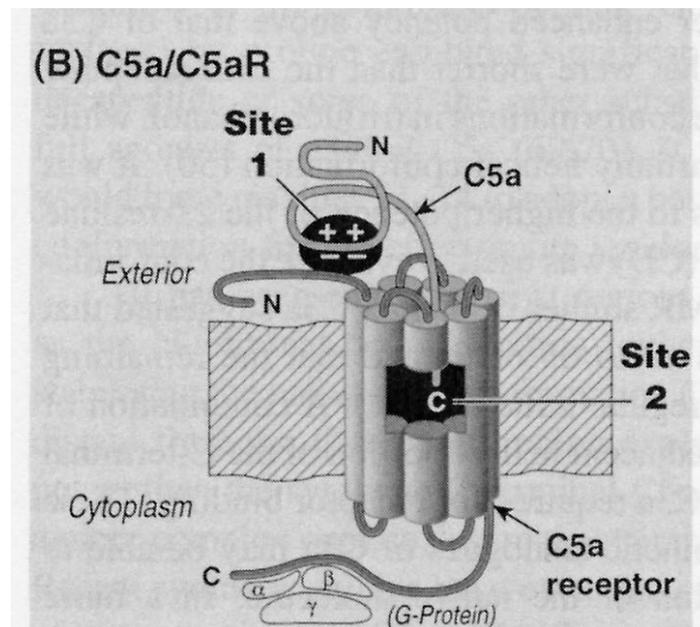


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des C5aR nach dem „Zwei-Seiten-Bindungsmodell“ von Siciliano 1994 [52]. Die erste Bindungsstelle (*Site 1*) des C5a-Moleküls interagiert mit dem N-terminalen Bereich des Rezeptors. Der C-terminale Bereich des Liganden durchdringt die Pore der sieben transmembranen Helices des C5aR (*Site 2*).

Nach der Ligandenbindung kommt es zur Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch das assoziierte Pertussistoxin-sensitive G-Protein $G\alpha_{i2}/G\alpha_{i3}$ aktiviert wird und eine Reihe von Signalkaskaden anschaltet. So werden unter anderem die Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipasen C und A2, die Phospholipase D [53], die Phosphoinositol-3-Kinase, sowie verschiedene Tyrosin- und MAP-Kinasen [54;55] aktiviert. Die durch diese Aktivierung ausgelösten zahlreichen Effekte sind bereits unter 1.2 beschrieben.

Neben diesen über das assoziierte G-Protein angestoßenen Signalwegen gibt es auch Hinweise für eine β -Arrestin vermittelte Aktivierung des MAP-Kinaseweges [56].

Das Gen für den C5aR ist auf Chromosom 19q13.3/4 lokalisiert [57]. Die beiden Exons werden durch ein etwa 9 kb großes Intron getrennt, welches direkt hinter dem ATG-

Startkodon liegt. Diese genomische Organisation ist untypisch für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die in der Regel eine Intron-freie Struktur aufweisen [58;59]. Jedoch zeigen sich ähnliche Merkmale beim FMLP-Rezeptor [60] sowie den weiter unten ausführlich beschriebenen C5L2 und C3a-Rezeptor.

Man glaubte lange die Expression der Anaphylatoxin-Rezeptoren sei auf Zellen myeloischen Ursprungs wie Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, Mastzellen oder auch Dendritischen Zellen beschränkt [61-64]. Neuere Studien zeigen jedoch in Mensch, Maus und Ratte eine breite Expression in vielen Geweben wie Leber, Lunge [65] und Hirn [66]. Man findet sie auf Kupffer-Zellen [67], Alveolarepithelzellen [68], Endothelzellen [69], den proximalen tubulären Zellen der Niere [70], Neuronen [71] sowie auf Astrozyten und Mikroglia [72]. Dabei ist der Rezeptor im normalen, nicht entzündeten Gehirn nur sehr schwach exprimiert, wohingegen sich seine Expression in Astrozyten und Mikroglia im entzündeten Hirn stark erhöht. Aufgrund dieser Befunde zeichnet sich eine immer größer werdende Bedeutung des Komplementsystems im Zusammenhang mit degenerativen Störungen und Krankheiten, die auf eine Demyelinisierung der Nervenzellen zurückgehen, ab [73].

Eine Induktion des Rezeptors konnte auf myeloblastischen U937-Zellen nach Stimulation mit IFN- γ , Bt₂-cAMP oder PMA nachgewiesen werden [74;75]. Durch eine LPS-Gabe wird er in Hepatozyten induziert. Dies geschieht wahrscheinlich indirekt über die IL-6-Produktion in Kupffer-Zellen [76]. In Mäusen mit experimenteller *Listeria monocytogenes* Meningoencephalitis kommt es zu einer TNF- α vermittelten Hochregulation in Neuronen [77]. Ferner ist dieser Anaphylatoxin-Rezeptor entscheidend an der Infektionsabwehr der Lungenschleimhaut beteiligt, wie ein *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionsmodell offenbarte [78].

Studien an C5aR^{-/-}-Mäusen bestätigten die Annahme, dass dem C5aR eine wichtige Rolle bei der passiven reversen Arthus-Reaktion in Haut und Lunge, sowie der Immunkomplex-peritonitis zukommt [79]. Durch die Blockade des Rezeptors mit einem spezifischen Antagonisten konnten diese Befunde gesichert werden. Auch die Schäden einer Ischämi/Reperfusion konnten durch die Inhibition des Rezeptors vermindert werden [80].

Experimente an Fc γ R^{-/-}-Mäusen legen den Schluss nahe, dass dieser Rezeptorgruppe eine vorherrschende Aufgabe bei der Beseitigung von Immunkomplexen zukommt. Im Jahre 2000 konnte jedoch dargelegt werden, dass sowohl die Fc γ RI/III-, sowie die C5aR-vermittelten Signalwege entscheidend an der Pathogenese von IC-Krankheiten beteiligt sind und dass sie nur in Kombination die volle Wirkung erzielen können [33;81].

Es wird immer deutlicher, dass dem C5aR eine Schlüsselfunktion bei der Sepsis zukommt. Die polymorphkernigen Neutrophilen (PMNs) von septischen Patienten weisen eindeutige Merkmale einer Dysfunktion auf. So zeigen sie verminderte Chemotaxis auf FMLP und C5a

sowie partielle Defekte bei der H_2O_2 -Produktion [82], welche bekanntermaßen essentiell für die bakterizide Wirkung der Neutrophilen ist. Der Einsatz eines anti-C5aR-Antikörpers konnte der verminderten H_2O_2 -Synthese entgegenwirken [83]. Die PMNs von Patienten, die an einem Sepsis-induzierten Multi-Organ-Versagen leiden, zeichnen sich weiterhin durch eine verringerte Fc γ R-Expression aus. Im Plasma liegen erhöhte Immunkomplex-Spiegel vor [84].

Der Einsatz eines kleinen (*small molecule*) C5aR-Antagonisten inhibiert die reverse passive Arthus-Reaktion und den Endotoxin-Schock in Ratten [85]. Ebenfalls in Ratten konnte im CLP-Modell (*cecal ligation and puncture*) gezeigt werden, dass ein anti-C5aR Antikörper protektiv gegen die letalen Folgen der Sepsis wirkt [86]. Es besteht die Möglichkeit, dass die oben beschriebene chemotaktische Dysfunktion der Neutrophilen eine Folge von mangelnden C5a-Bindungsstellen (CLP-Ratte < 5 % im Vergleich zu Kontroll-Neutrophilen) ist. Zellen, die mit einem blockierenden α -C5aR-Antikörper behandelt wurden, zeigten dieses Phänomen nicht, es besteht ein Schutz gegenüber den Folgen der Sepsis [87].

Eine Induktion des Rezeptors auf Lungenepithelzellen und den glatten Muskelzellen der Bronchien bei LPS-induzierter Sepsis sowie OVA-induziertem Asthma wurde 2001 im Tiermodell beschrieben [88]. Ein Jahr später konnten Riedemann und Kollegen zum ersten Mal darlegen, dass der C5aR in Lunge, Leber, Herz und Nieren während der frühen Phase einer Sepsis hochreguliert wird und dass eine Blockade des Rezeptors die Lethalitätsrate stark verringern kann [89]. Blockiert man den C5aR in Monozyten, so sinkt die Produktion an IL-12 (und TNF- α). Die Synthese von IL-10 steigt hingegen an. Da IL-12 (in Kombination mit IFN- γ) für die Differenzierung von nativen T-Zellen zu T_H1-Zellen verantwortlich ist und IL-10 diesen Prozess hemmt, führt die Inhibition der C5a-Antwort im Endeffekt zu einer verstärkten T_H2-Produktion und einer verminderten T_H1-Synthese. Daraus resultiert ein vermehrter Isotypwechsel von IgM zu IgE-Antikörpern, was die Empfänglichkeit für asthmatische Erkrankungen erhöht [90].

1.3.2 C3a-Rezeptor

Die Klonierung des humanen C3aR wurde 1996 parallel von zwei Arbeitsgruppen bewerkstelligt [91;92]. Das Molekulargewicht des 482 Aminosäure-langen Rezeptors beträgt 62 – 65 kDa. Im Vergleich zu allen anderen bisher bekannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren weist der C3aR einen außergewöhnlich großen zweiten extrazellulären Loop auf, der mit 172 Aminosäuren gut ein Drittel des gesamten Molekulargewichtes ausmacht. Die Bindung des Liganden erfolgt an zwei Bereichen des Rezeptors (siehe Abbildung 2.3). Kürzlich stellte sich heraus, dass dem Tyrosin in Aminosäureposition 174 eine ganz entscheidende Bedeutung bei der Ligandenbindung zukommt [93].

Die Liganden-induzierte Konformationsänderung des Rezeptors zieht ebenso wie beim C5aR eine Aktivierung Pertussistoxin-sensitiver G-Proteine nach sich, die über die Auslösung verschiedener Signalkaskaden die unter 1.2 beschriebenen Effekte zur Folge hat. Neben den

über das assoziierte G-Protein angestoßenen Signalwegen gibt es auch Hinweise für eine β -Arrestin vermittelte Aktivierung des MAP-Kinaseweges [56].

Bei Alanin-Substitutionsversuchen stellte sich heraus, dass die Aminosäuren Ser465/470 und Thr463/466 entscheidend an der Rezeptorinternalisierung beteiligt sind, wobei dem Thr463 die wichtigste Rolle zukommt. Mittels Ca^{2+} -Assay und ^{35}S -GTP- γ Bindung konnte weiterhin gezeigt werden, dass Ser449 in die G-Protein-Kopplung involviert ist [94].

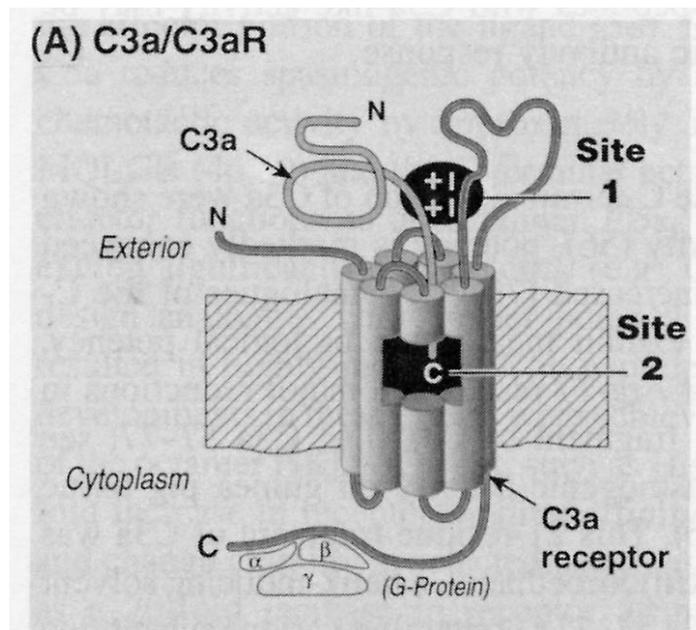


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des C3aR. Das C3a-Molekül weist ebenfalls zwei Hauptbindungsstellen auf. Die C-terminal gelegene helikale Region des Liganden stellt die „nicht-wirksame“ Bindungsstelle (*Site 1*) dar, sie interagiert entweder mit dem großen extrazellulären Loop oder mit dem N-terminalen Bereich des Rezeptors. Die C-terminal gelegene „wirksame“ Bindungsstelle des C3a (*Site 2*) bindet innerhalb der durch die sieben transmembranen Helices aufgespannten Pore des C3aR. (Design nach dem C5a/C5aR-Modell von Sicilano 1994).

Das Gen des humanen C3aR ist auf Chromosom 12p13 lokalisiert. In Analogie zum C5aR sind auch hier die beiden Exons durch ein Intron (~ 6 kb) getrennt, welches jedoch 18 Nukleotide 5' vom ATG-Startkodon liegt [95]. Auch die Organisation des murinen C3aR wurde 1998 beschrieben. Er ist auf Chromosom 6pF1 lokalisiert. Bei beiden handelt es sich um „single copy“ Gene [96].

Die Expression des C3aR konnte auf Meerschweinchen-Thrombozyten [97], Ratten-Mast-Zellen [98], humanen Mast-Zellen, Neutrophilen, Basophilen [99] und Eosinophilen [35] nachgewiesen werden. Hingegen scheinen unstimulierte B- und T-Lymphozyten den Rezeptor nicht zu tragen; eine Expression auf Neutrophilen und Monozyten konnte jedoch bestätigt werden [64;100]. Nach Stimulation mit *Staphylococcus aureus* Cowan strain und IL-2 antworten B-Lymphozyten auf eine C3a-Gabe mit Unterdrückung der polyklonalen Immunantwort und einer Reduktion der Freisetzung von TNF- α und IL-6 [43]. Drei Jahre später

konnte der C3aR auf CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellklonen aus Patienten mit atopischer Dermatitis und allergischer Kontaktdermatitis auf mRNA- und Proteinebene detektiert werden [101]. Northern Blot-Analysen zeigten hohe mRNA-Spiegel des humanen C3aR in Lunge und Milz. Geringere Spiegel wurden in Herz, Plazenta, Leber, Thymus und bestimmten Gehirnregionen nachgewiesen [91]. Bei Untersuchungen am gesunden Gehirn und an entzündeten Bereichen des Gehirns bei Multipler Sklerose und bakterieller Meningitis erwiesen sich fetale und adulte Astrozyten, Gliazellen und auch Neuronen als C3aR-positiv [102;103]. Auch auf einer Reihe von neuronalen Zelllinien, insbesondere Astrozytoma-Zelllinien, konnte eine C3aR-Expression durch FACS-Analysen und RT-PCR nachgewiesen werden [104;105].

Eine Induktion des Rezeptors konnte in den myeloblastischen Zelllinien HL-60, THP-1 und U937 durch die beiden nicht-physiologischen Stimuli PMA und Bt₂-cAMP gezeigt werden. IFN- γ stellte sich als erster physiologischer Regulator der C3aR-Expression heraus [75].

Im Jahre 2000 konnte an Meerschweinchen, die einen natürlichen Defekt im C3aR-Gen besitzen, nachgewiesen werden, dass die nach einer OVA-Gabe ausgelöste Bronchokonstriktion um etwa 30 % gegenüber den Wildtyp-Meerschweinchen verringert ist [106]. Humbles und Kollegen bestätigten diese Befunde im Mausmodell des allergischen Asthmas. Sie wiesen nach, dass die Deletion des C3aR-Gens einen schützenden Effekt gegenüber den Folgen der Allergen-Gabe hat [107]. Ferner beschrieben sie bei Asthmatikern extrem erhöhte C3a-Plasmaspiegel nach Allergen-Kontakt. Dies wurde von einer weiteren Arbeitsgruppe bestätigt [108]. Im Asthma-Mausmodell stellte sich heraus, dass der Rezeptor nach OVA-Gabe in den glatten Muskelzellen der Bronchien hochreguliert wird [88]. Studien an C3aR^{-/-}-Mäusen bestätigten, dass die Hyperresponsivität der Atemwege nach OVA-Gabe im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen vermindert ist. Ebenso ist der Einstrom von Eosinophilen sowie das Vorhandensein von IL-4-produzierenden T_H2-Lymphozyten geringer. In Übereinstimmung mit der verminderten Anzahl an T_H2-Zellen liegen die IL-5- und IL-13-Spiegel niedriger als bei den Wildtyp-Tieren und der IgE-Titer ist reduziert [109]. Diesen Daten zu Folge kommt dem C3aR eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese des Asthmas zu.

Wie oben schon beschrieben, löst die Bindung von C3a an seinen Rezeptor eine Reihe proinflammatorischer Reaktionen aus. In einigen *in vitro*-Experimenten wurde dem C3aR jedoch eher eine anti-inflammatorische Aufgabe zugesprochen. Aufgrund dieser doppeldeutigen Rolle war sein Beitrag zur Pathogenese des Endotoxin-Schocks lange unklar. Kildsgaard und Kollegen zeigten, dass die Sterblichkeitsrate bei C3aR^{-/-}-Mäusen nach einem Endotoxin-Schock im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen stark erhöht ist, so dass dem C3aR in diesem Zusammenhang eine schützende Rolle zugesprochen werden kann [110].

Weiterhin legten Studien nahe, dass sich die Bestimmung des C3a-Spiegels wesentlich besser zur Differenzierung zwischen Patienten mit einer Sepsis und dem *Systemic inflammatory*

response syndrome (SIRS) eignet, als die üblicherweise detektierten Spiegel an C-reaktivem Protein und Elastase [111]. Ferner wurde eine Hochregulation des C3aR auf bronchialen Epithel- und glatten Muskelzellen im Sepsis-Mausmodell nach LPS-Gabe präsentiert [88].

Die Synthese eines selektiven C3aR-Antagonisten eröffnet neue Möglichkeiten um die physiologische/pathophysiologische Rolle des Rezeptors in der Zukunft näher zu charakterisieren [112].

1.3.3 C5L2

Bei dem zunächst als Orphan-Rezeptor klonierten *C5a-like receptor 2* (C5L2) handelt es sich ebenfalls um einen Sieben-Transmembranrezeptor [113;114]. Im Bereich der Transmembrandomänen weist er eine 58 %-ige Homologie zum C5aR sowie eine 55 %-ige Homologie zum C3aR auf [114]. Abgesehen von einem Austausch weist C5L2 in der N-terminalen Domäne dieselben Aminosäuren auf, die beim C5aR an der Ligandenbindung beteiligt sind [115].

Das C5L2-Gen ist ebenso wie das des C5aR auf Chromosom 19(q13.4) lokalisiert. Die codierende Sequenz besteht aus 337 Codons und liegt innerhalb eines Exons. Das zweite Exon ist durch ein nahe dem ATG-Startkodon gelegenes Intron (~ 3,6 kb) abgetrennt, welches wie beim C3aR in der 5'-UTR lokalisiert ist [114].

Die Arbeitsgruppen von Cain und Okinaga bestätigten die Bindung von C5a sowie dem desarginierten Äquivalent, wobei die Bindung mit gleicher Affinität erfolgt [115;116]. Eine Interaktion des Rezeptors mit dem Anaphylatoxin C3a und seinem Abbauprodukt C3a_{desArg} sowie dem nicht mehr zu den Anaphylatoxinen zählenden C4a wird noch kontrovers diskutiert [115-117].

Anders als beim C3aR und C5aR scheint der C5L2 nach der Ligandenbindung nicht internalisiert zu werden [115]. Dieser Befund legt die Annahme nahe, dass der C5L2 lediglich zum „Abfangen“ von C5a_{desArg} dient, um am C5aR bei erhöhten Serumkonzentrationen an C5a_{desArg} eine Konkurrenz mit dem hochaktiven C5a zu verringern.

Eine Kopplung an G-Proteine ist derzeit noch nicht eindeutig beschrieben. So konnten Cain und Kollegen eine schwache Interaktion mit G_i-Proteinen feststellen, Gerard hingegen nicht. Bisher sind noch keine für die Anaphylatoxin-Rezeptoren üblichen Funktionen aufgezeigt, so kommt es nach Ligandenbindung weder zur Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels, noch zur Aktivierung der typischen Signalkaskaden.

Eine starke Expression des C5L2 konnte mittels Northern-Blot-Analysen in Leukozyten, Milz und Hoden, eine schwächere Expression in Herz, Plazenta, Lunge, Leber, Nieren, Ovarien und Dickdarm nachgewiesen werden. Die nähere Analyse des Gehirns bewies die Expression

im frontalen Cortex, Hippocampus, Hypothalamus und Pons [114]. Mittels RT-PCR wurde außerdem das Vorhandensein auf Granulozyten, unreifen Dendritischen Zellen, Adipozyten und Hautfibroblasten gezeigt [113;117].

Es bleiben also noch viele Fragen bezüglich des physiologischen Liganden und der Funktion dieses neuen Anaphylatoxin-Rezeptors offen.

1.4 Lipopolysaccharid

Lipopolysaccharid (LPS), ein Bestandteil der Zellwände gramnegativer Bakterien, ruft im infizierten Wirt eine Reihe proinflammatorischer Antworten hervor. So kommt es zur Generierung endogener Mediatoren wie Zytokine (IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α), Stickstoffoxide, Superoxidanionen und Lipidmediatoren. Die Transkription zahlreicher Gene, die bei inflammatorischen Reaktionen involviert sind, wird angeschaltet, indem bestimmte Transkriptionsfaktoren, speziell NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) aktiviert wird [118].

Lange Zeit war unklar über welchen spezifischen Rezeptor LPS-vermittelte Antworten ausgelöst werden. Im Jahre 2000 konnte eindeutig gezeigt werden, dass der *Toll-like receptor-4* (TLR-4) als Signal-transduzierender Rezeptor für LPS fungiert. Diese Entdeckung wurde einerseits durch die Klonierung des mutierten *Lps*-Gens in dem LPS-nicht-responsiven Mausstamm C3H/HeJ [119;120] sowie in der *Tlr4*^{-/-}-Maus gemacht [121].

Als erstes Mitglied der Toll-Familie wurde *Drosophila Toll* identifiziert, welches in der Fruchtfliege die dorsoventrale Axenformation während der Embryogenese kontrolliert. Der TLR-4 konnte als erstes Mitglied der Säugetiergruppe identifiziert werden [122].

Sämtliche Toll-like Rezeptoren zeichnen sich durch Vorhandensein einer extrazellulären *leucin-rich repeat* (LRR) Domäne sowie der intrazellulären Toll/IL-1-Rezeptor (TIR) Domäne aus. Die TLR-4 nachgeschaltete Signalkaskade über die Adapterproteine MyD88 und TOLLIP (*Toll-interacting protein*), die Kinase IRAK (*IL-1R-associated kinase*) sowie den weiteren Adapter TRAF6 (*TNF-receptor-associated factor 6*) wird von allen TLRs vermittelt und führt im Endeffekt zur Aktivierung von NF- κ B, JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) und der p38 MAP-Kinase. Der über TIRAP (*Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor protein*) laufende Signalweg scheint hingegen TLR-4-spezifisch zu sein und führt zur Aktivierung der Protein-Kinase PKR, über deren physiologische Bedeutung noch nicht viel bekannt ist.

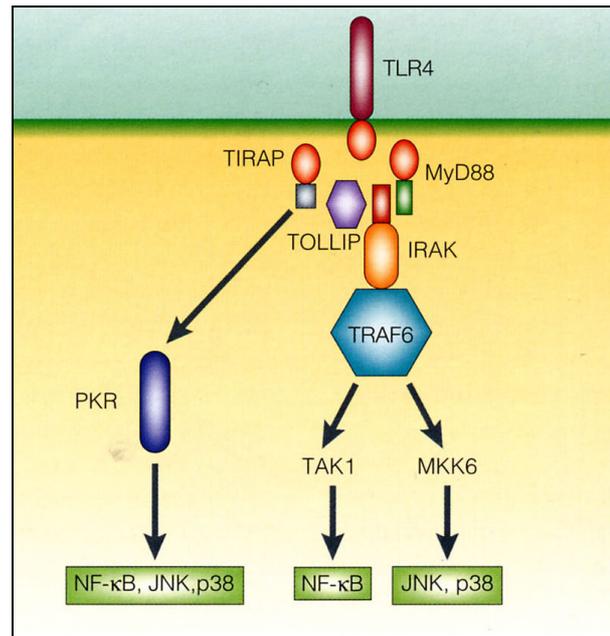


Abbildung 2.4: Die TLR-4 nach-geschalteten Signalkaskaden. Die Mitglieder der Toll-like/IL-1 Rezeptor-Familie teilen verschiedene Signalkomponenten, wie das Adapterprotein MyD88, das *Toll-interacting protein* (TOLLIP), die Protein-Kinase IRAK (*IL-1R-associated kinase*) und TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*). TRAF6 kann NF- κ B über TAK1 (*TGF- β -activated kinase*) und JNK (c-Jun N-terminal kinase) sowie die p38 MAP-Kinase über MKK6 (*mitogen-activated protein kinase kinase 6*) aktivieren. TLR-4-spezifische Signalkomponenten sind das TIRAP (*Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor protein*) und die Protein-Kinase PKR.

Die Erkennung von LPS durch den TLR-4 ist jedoch kein direkter Prozess, es werden weitere zusätzliche Moleküle benötigt. Zuerst wird LPS an ein Serum-Protein, das *LPS-binding protein* (LBP) gebunden und zum CD14 transferiert [123]. CD14 ist ein hochaffiner LPS-Rezeptor, der entweder ins Serum sezerniert wird oder als Glykophosphoinositol (GPI)-verankertes Protein auf der Oberfläche von Makrophagen exprimiert wird [124]. CD14^{-/-}-Mäuse zeigen einen schweren Defekt in ihrer Responsivität auf LPS, was die Bedeutung des CD14 bei der LPS-Erkennung bestätigt [125]. Eine weitere Komponente des LPS-Rezeptor-Komplexes ist MD-2 [126]. Hierbei handelt es sich um ein kleines Molekül, welches selbst keine Transmembrandomäne aufweist und stets in Assoziation mit der extrazellulären Domäne des TLR-4 auftritt. Die genaue Funktion von MD-2 ist noch nicht bekannt, jedoch ist es für die LPS-Erkennung des TLR-4 essentiell [127].

In dieser Arbeit richtet sich das Interesse auf LPS, da es wie unter 1.2 beschrieben, oftmals synergistische oder antagonistische Effekte in Verbindung mit den Anaphylatoxinen aufweist. Da es z. B. bei der Pathogenese des Septischen Schocks eine essentielle Rolle spielt und eine Blockade des C5aR diesem Krankheitsgeschehen (im Tiermodell) entgegenwirken kann, wird die Betrachtung des Wechselspiels zwischen LPS und den Anaphylatoxinen sicherlich neue Erkenntnisse aufzeigen.

1.5 Neu identifizierte AT-Rezeptor regulierende Transkriptionsfaktoren und ihre Signalwege

Zum besseren Verständnis werden die in dieser Arbeit untersuchten Transkriptionsfaktoren kurz vorgestellt:

1.5.1 Der Transkriptionsfaktor Ets-1

Ets-1 (*E26 transformation specific-1*) ist ein Mitglied der großen Ets-Familie von Transkriptionsfaktoren. Das *v-ets* Onkogen wurde 1983 als Teil eines Fusionsproteins entdeckt, welches von einem transformierenden Retrovirus exprimiert wird. Später stellte sich heraus, dass es von einem zellulären Gen transduziert wird [128;129]. Mittlerweile sind mehr als 30 verwandte Proteine beschrieben, denen die so genannte Ets-Domäne gemeinsam ist. Hierbei handelt es sich um die DNA-Bindungsdomäne, die spezifisch mit DNA-Bereichen interagiert, in deren Core sich das Triplet GGA befindet. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Ets-Proteine an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt sind und zum Großteil als Transkriptionsaktivatoren fungieren [130].

Sie sind an einer Vielzahl von Entwicklungsprozessen beteiligt: der Zellproliferation, Differenzierung, Migration, Apoptose und Zell-Zell-Interaktionen [131;132].

Kola und Kollegen konnten 1993 zeigen, dass Ets-1 im murinen Embryo bis zum Tag 15 in nahezu allen Organen exprimiert wird. In späteren fetalen Stadien ist es hauptsächlich in lymphoiden Geweben, im Gehirn und in der Lunge vorhanden, in anderen Organen wie Magen und Darm ist die Expression hingegen dramatisch verringert. Bei der neonatalen Entwicklung beschränkt sich die Expression lediglich auf die lymphoiden Organe und das Gehirn. Diesen Daten belegen die Beteiligung von Ets-1 an den verschiedenen Entwicklungsstadien der Maus [133]. Untersuchungen an Ets-1^{-/-}-Mäusen belegen zusätzlich seine Beteiligung an der Differenzierung von T- und B-Lymphozyten [134].

Bei der rheumatoiden Arthritis stimuliert *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) die Ets-1 Expression in kapillaren Endothelzellen, wo Ets-1 wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der entzündlichen Angiogenese spielt [135]. Seine Aktivierung erfolgt über die klassischen MAP-Kinasen Erk1/2 [136]. TNF- α und IL-1 bewirken seine Hochregulation bzw. Aktivierung in Synovialfibroblasten bei rheumatoider Arthritis [137]. Hier und beim humanen hepatozellulären Karzinom könnte die Ets-abhängige Hochregulation von Metalloproteinasen wichtig sein [138].

Ets-1 ist auch ein wichtiger Aktivator von Mastzellen, der dort nach Bindung an den Promotor die Bildung von GM-CSF erhöht [139]. Aufgrund dieser Tatsache und wegen seiner Expression in unterschiedlichsten Zellen, in denen die Regulation der Anaphylatoxin-Rezeptoren eine wichtige Rolle spielen könnte, wurde die Bindung von Ets-1 an den C3aR-

Promotor in dieser Arbeit näher untersucht. Der zweite Hinweis auf seine Relevanz bezüglich der transkriptionellen Regulation des C3aR-Promotors lag darin begründet, dass eine Ets-1 Bindungsstelle im Core-Bereich des Promotors vorhergesagt wurde.

1.5.2 Das Aktivatorprotein-1 (AP-1)

Es gibt klare Hinweise, dass AP-1 Proteine und speziell die der Jun-Gruppe über „Leben und Tod“ einer Zelle bestimmen, indem sie die Expression der Zellzyklusregulatoren wie Cyclin D1 und p53 regeln. C-Jun ist allein für die positive Regulation der Zellproliferation verantwortlich, indem es die Transkription von Cyclin D1 induziert. Seine Funktionen werden von JunB antagonisiert, indem es Tumorsuppressorgene hochreguliert und die Expression von Cyclin D1 unterdrückt.

AP-1 Proteine weisen ein *leucin-zipper* DNA-Bindemotiv auf. Es handelt sich um Homo- oder Heterodimere aus Jun (c-Jun, JunB und JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) und Mitgliedern der nahverwandten *activating transcription factor* (ATF) Subfamilie. Jun-Proteine können stabile Homodimere ausbilden, die das AP-1 Bindemotiv (TGAG auch *TPA-response element*) erkennen. Fos-Proteine sind nur in der Lage mit Jun-Proteinen Heterodimere auszubilden, die eine höhere Stabilität als die Jun-Homodimere aufweisen. ATF-Proteine können sowohl Homodimere, als auch Heterodimere mit Jun-Proteinen ausbilden, die vorzugsweise an das *cAMP-response element* binden [140;141].

TNF- α , IL-1, Wachstumsfaktoren und Onkogene regulieren AP-1 hoch. Hierbei spielen die MAP-Kinasewege eine wesentliche Rolle. Dabei wird in einer Phosphorylierungskaskade über Ras, Raf, Mek und Erk unter anderem der Transkriptionsfaktor Elk hochreguliert, der zur Fos-Expression führt. Jun wird über die Rac, Mekk, Jnk, Jnk-Kaskade phosphoryliert.

1.5.3 Das cAMP-response element (CRE)

Das *cAMP-response element binding-protein* (CREB) ist einer der am besten charakterisierten Stimulus-induzierten Transkriptionsfaktoren. Eine Vielzahl von Peptid-Hormonen (wie Adrenalin) und Wachstumsfaktoren (wie NGF oder FGF) sowie die Auslösung eines Aktionspotentials mit Erhöhung des freien Ca²⁺ führen zur Aktivierung der entsprechenden Protein-Kinasen: cAMP-abhängige Protein Kinase A (PKA), *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) und Ca²⁺/*calmodulin-dependent protein kinases* (CaMKs). Alle drei Wege bewirken durch Phosphorylierung die Aktivierung von CREB. Daraufhin wird hauptsächlich die Transkription der *immediate-early genes* (IEGs) wie z. B. c-Fos gestartet, die entscheidend an Zellproliferation und Differenzierung beteiligt sind [142].

Wie unter 1.5.2 bereits beschrieben besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass andere Transkriptionsfaktoren wie die Jun-ATF-Heterodimere an das *cAMP-response element* (TGACGTCA) binden und zur Aktivierung verschiedenster Gene führen.

1.6 Das proinflammatorische Zytokin TNF- α

Der Tumor-Nekrose-Faktor- α (sowie auch IL-1) wird unter physiologischen Bedingungen, als Reaktion auf eine Endotoxin-Stimulation, von einer Reihe myeloischer Zellen (Makrophagen, T-Zellen und NK-Zellen) sezerniert. Stimulierte polymorphkernige Neutrophile, aber auch nicht-stimulierte Zellen und ebenfalls eine Reihe transformierter Zelllinien, Astrozyten, glatte Muskel-Zellen und Fibroblasten sind ebenfalls zur Produktion dieses Zytokins befähigt. Die Synthese wird durch eine Vielzahl von Stimuli wie z. B. Interferone, IL-2 und GM-CSF angeregt. Hingegen wird die Produktion unter anderem durch IL-6, TGF- β , Prostaglandin E₂ und Dexamethason inhibiert.

TNF- α wirkt oft über Speziesgrenzen hinweg und weist ein breites Spektrum biologischer Funktionen auf: *In vitro* verursacht es die Zytolyse vieler Tumorzelllinien. Es induziert die hämorrhagische Nekrose von transplantierten Tumoren, verstärkt die Phagozytose und Zytotoxizität von polymorphkernigen Neutrophilen und moduliert die Expression verschiedenster Proteine wie c-Fos, IL-1 und IL-6. *In vivo* ist TNF- α im Zusammenspiel mit IL-1 für vielfältige Veränderungen des Endothels verantwortlich und spielt somit bei pathologischen Prozessen wie Arteriosklerose und Venenthrombose eine Rolle. Auf Neutrophile wirkt es stark chemotaktisch und induziert die Expression zahlreicher Oberflächenmoleküle, die zu einer erhöhten Adhärenz führen.

In ruhenden Makrophagen induziert es die Synthese von IL-1 und Prostaglandin E₂ und erhöht deren Phagozytosefähigkeit.

IL-6 supprimiert die durch bakterielle Endotoxine oder TNF-induzierte Synthese von IL-1 und die Endotoxin-induzierte Synthese von TNF- α .

TNF- α ist für eine normale Immunantwort essentiell, eine überschäumende Aktivierung hat jedoch schwerwiegende Folgen. So ist es der Hauptmediator für die bei Tumorpatienten beobachtete Kachexie und verantwortlich für die Toxizität bei gramnegativer Sepsis.

Klinische Relevanz zeigt es bei der Krebstherapie in Kombination mit IFN- γ [143].

Darüber hinaus induziert TNF- α die Expression bzw. aktiviert die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-1, so dass die Möglichkeit besteht, dass die nach TNF- α -Stimulation beobachtete Hochregulation des C3aR durch die Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren zustande kommt [136;137].

1.7 Zielsetzung

Die Anaphylatoxine C3a und C5a entstehen bei der Komplementaktivierung als hochpotente proinflammatorische und immunmodulatorische Botenstoffe. Tiermodelle belegen ihre Bedeutung bei Krankheitsbildern wie Asthma oder allergischen Reaktionen, dem septischen Schock, bakterieller Pneumonie und Infarkt. Gerade in den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die Anaphylatoxin-Rezeptoren auch außerhalb der myeloischen Reihe relativ breit exprimiert sind und einer starken Regulation unterliegen.

In dieser Arbeit sollte die Genexpression der Anaphylatoxin-Rezeptoren untersucht werden. Es sollten neue Induktoren sowie entscheidende Transkriptionsfaktoren, die zu einer Hochregulation der Rezeptorexpression führen, ermittelt werden. Dabei richtete sich das Augenmerk stärker auf den weniger erforschten C3aR.

Andererseits sollten neue Rezeptor-nachgeschaltete Funktionen der Anaphylatoxine aufgedeckt werden. Bekanntermaßen lösen diese Mediatoren eine Vielzahl von Reaktionen in Rezeptor-tragenden Zellen aus, wie z. B. die Ausschüttung von Zytokinen, die Kontraktion der glatten Muskulatur und Chemotaxis. Um die Bedeutung der Anaphylatoxine im Krankheitsgeschehen besser verstehen zu können, sollte neben dem oben gewählten Ansatz das Expressionsmuster Anaphylatoxin-stimulierter monozytärer Zellen analysiert werden.

Die Arbeit gliedert sich somit in zwei Hauptbereiche auf. Es sollte zum einen die für die transkriptionelle Regulation entscheidende Promotorregion des C3aR kartiert werden. Der Transkriptions-Startpunkt sowie wichtige positiv- und negativ-regulatorische Bereiche sollten lokalisiert werden. Mittels einer Sequenzanalyse sollten mögliche Transkriptionsfaktoren identifiziert und ihre tatsächliche Beteiligung an der C3aR-Promotoraktivität in Ko-Transfektionsexperimenten untersucht werden. Mittels *site-directed Mutagenesis* konnten die entsprechenden Bindungsstellen mutiert und die resultierenden Promotorkonstrukte in Reporter-gen-Studien auf ihre Relevanz hin überprüft werden. Die Beteiligung interessanter Transkriptionsfaktoren sollte dann z. B. mittels *real-time* RT-PCR näher analysiert werden. Die tatsächliche Bindung an den C3aR-Promotor sollte bestätigt und mit einer dominant negativen Mutante unterbunden werden.

Neben wichtigen Transkriptionsfaktoren sollten auch neue Induktoren der C3aR-Expression gefunden werden. Dies kann prinzipiell ausgehend von einem breiten Screening möglicher Induktoren, wie Zytokinen, geschehen oder eventuell über bekannte Signalwege der zuvor identifizierten Transkriptionsfaktoren rückgeschlossen werden. Hierzu musste eine Vielzahl von Stimulationsversuchen durchgeführt werden und die Rezeptor-Hochregulation z. B. mittels *real-time* RT-PCR oder im FACS untersucht werden.

Für einen Großteil dieser Versuche sind Transfektionen unumgänglich. Da sich eine Vielzahl von Zelllinien jedoch nur mit extrem schlechter Effizienz transfizieren lässt, bestand eine weitere Aufgabe in der Etablierung eines retroviralen Gentransfer- und Expressionssystems. Dabei sollten die Vor- und Nachteile von zwei unterschiedlichen Systemen verglichen werden: Die Ko-Expression von eGFP zum einfachen durchflußzytometrischen Nachweis positiv-transduzierter Zellen und die Selektion transduzierter Zellen mit dem Antibiotikum G418.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte das Expressionsmuster monozytärer Zellen bzw. Zelllinien nach Anaphylatoxin-Stimulation mit der Mikroarray-Technologie untersucht werden. Hierzu mussten die optimalen Aufreinigungs- und Kultivierungsbedingungen für primäre humane Monozyten etabliert werden. Vor der Durchführung des Mikroarrays sollten möglichst viele Versuchsparameter in Vorexperimenten bestimmt werden. Es sollte der ideale Stimulationszeitpunkt ermittelt werden, an dem die Rezeptorexpression am stärksten ist und die funktionelle Kopplung am höchsten. Da eine Modulation der LPS-Antwort durch Anaphylatoxine beschrieben ist, sollten die Zellen zusätzlich mit Endotoxinen alleine und in Kombination mit C3a/C5a behandelt und analysiert werden. Eine Auswahl der im Mikroarray regulierten Gene sollte mittels *real-time* RT-PCR oder antigenetischen Studien verifiziert werden.

2 Material

2.1 Geräte

Bilddokumentationssystem:

E.A.S.Y.RH-3 (Herolab, Wiesloch)

β-Counter:

TopCount-β-Counter NXT (Canberra-Packard, Dreieich)

Brutschränke:

Modell B 5061 E-C02 (Heraeus, Osterode)

Modell function line (Heraeus, Osterode)

Durchflußzytometer:

FACScan™ (Becton Dickinson, Heidelberg)

Elektrophoresekammern:

Gelkammern für horizontale Agarosegele: verschiedene Modelle (Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Schweden und Biometra/Biomed, Göttingen)

Gelkammer für horizontale RNA-Agarosegele (Keutz Laborgeräte, Reiskirch)

Gelkammer für vertikale Acrylamid-Gele (Sigma, Deisenhofen)

Elektroporationsgerät:

Gene Pulser 1 und 2 (Bio-Rad, München)

Handcounter:

Radiocount, Nr. 233, (Herfurth), mit Zählrohr BZ 200 XK-P (Berthold, Herfurth)

LB 1210B (Berthol, Bad Wildbad)

Heizblock:

Modell BT3 (Techne-Driblock, Typ DB-3, Gesellschaft für Laborgeräte, Wertheim)

Hybridisierungsöfen:

Modell 400 HY (Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen), Modell Shake´n Stack (Hybaid, Heidelberg)

Kühlzentrifuge:

Modell J2-21 (Beckmann, Glenrothes, UK)

Typ Rotanta 96 RSC (Hettich Zentrifugen, Tutlingen)

Biofuge fresco (Kendro, Osterode)

Mikroskope:

Unterschiedliche Modelle (Zeiss, Jena)

Mikrotiterplattenscanner:

Titertek Multiskan MCC/340 (Labsystems, Finnland)

PCR-Thermocycler:

Modell TVC 5x9 (Landgraf, Langenhagen)

Techne PCR-Thermocycler (Techne, Cambridge)

T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen)

pH-Meter:

761 Calimatic, digital (Knick)

Photometer:

Ultrospec III (Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Schweden)

Luminescence Spectrometers LS 50B (Perkin Elmer, Beaconsfield, U.K.)

Phosphoimagingplatte:

BAS-MP 2040S (Fuji Photo Film, Japan)

Phosphoimager:

Fuji-BAS-2500 (Fuji Photo Film, Japan)

Real-time RT-PCR-Geräte:

ABI-Prism 7000 Sequence Detection System® (Applied Biosystems, Weiterstadt)

Schüttelinkubator:

Incubator Shaker Model G25 (New Brunswick Scientific, Edison, USA)

Spannungsgeräte:

Electrophoresis Power Supply, Phero Stab 200 (Biotech Fischer)

Standard Power Pack P25 (Biometra, Göttingen)

Speedvac:

Speedvac Concentrator SVC 100 (Savant, Faringdale, USA)

Spezielle Software:

Adobe Photoshop Version 5.0 (Adobe Systems)

Array Vision Version 5.1 (Imaging Research, St. Cathrines, Ontario, Kanada)

CELLQuestPro™ Version 3 (Becton Dickinson, Heidelberg)

Clone Manager 6.0 (Scientific & Education Software)

Edit Sequence, Meg Align, Primer Select (DNA Star Inc.)

Abi-Prism 7000 SDS Software (Applied Biosystems)

Office (Microsoft)

Referenzmanager Version 10 (Research Information Systems)

SigmaPlot™ Version (Jandel Scientific Software)

WinMDI 2.1.3 (Copyright® by Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla)

Szintilationszähler:

Win Spectral 1414 liquid scintillation counter (Wallac)

γ-Counter Cobra™ II (Canberra, Packard, Dreieich)

Taumelschüttler:

Modell WT (Biometra, Göttingen)

Ultraschallgerät:

Sonifer B12 (Branson, Danbury, USA)

Wasserbad:

Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel

Zentrifugen:

Biofuge 15R, Biofuge 13, Minifuge T (Heraeus Sepatech, Osterode)

Mikro 22 (Hettich Zentrifugen, Tutlingen)

2.2 Verbrauchsmaterial

Küvetten:

Quarzküvetten (Helman, LAT, Garbsen)

Material für die real-time RT-PCR:

Optical Adhesive Covers; MicroAmp Optical Tubes und Optical Caps (Applied Biosystems, Weiterstadt)

Plastikpipetten:

5 ml, 10 ml und 25 ml (Greiner, Frickenhausen)

Reaktionsgefäße:

0.5 ml, 1.5 ml (Sarstedt, Nümbrecht)

12 ml Plastikröhrchen, Rundboden, steril (Greiner, Frickenhausen)

15 ml und 50 ml Falcontubes, steril (Greiner, Frickenhausen)

Mikrotiterplatten, Polystyrol, Rund- und Flachboden, mit und ohne Deckel, steril (Greiner, Frickenhausen)

Spritzen und Kanülen:

S-Monovetten® KE, 2.7 ml, 1.6 mg EDTA/ml Blut (Sarstedt, Nümbrecht)

Spritzen: 5 ml, 10 ml, 20 ml, 25 ml (Braun, Melsungen)

Kanülen, Sterican® Luer-Lock (Braun, Melsungen)

Venofix® S, Luer-Lock, 30 cm, 0.8mm-21G (Braun, Melsungen)

Multi-Adapter für S- Monovetten® (Sarstedt, Nümbrecht)

Zellkulturflaschen für adhärenente Zellen:

25 cm² Polystyrol, 50 ml (Greiner, Frickenhausen)

75 cm² Polystyrol, 250 ml (Greiner, Frickenhausen)

182 cm² Polystyrol, 650 ml (Greiner, Frickenhausen)

2.3 Chemikalien

Agarose, ultraPure (Life Technologies, Eggenstein); SeaKem LE (Bio Whittaker, Apen)

6-Aminohexansäure (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn)

Ammoniumacetat (Merck, Darmstadt)

BCP, 1-Bromo-3-Chloro-Propan (Sigma, Deisenhofen)

Bromphenolblau (Serva, Heidelberg)

BSA (Boehringer, Mannheim)

Cell Dissociation Solution (CDS), nicht enzymatisch, (Sigma, St. Louis, USA)

DEPC, Diethyl-pyrocbonat (Applichem, Darmstadt)

DNA-Marker: 2-log DNA-Ladder (New England Biolabs, Frankfurt am Main)

DTT (Life Technologies, Eggenstein)

DL-2-Mercaptomethyl-3-guanidinoethylthiopropansäure (Plummer's Inhibitor) (Calbiochem-Novabiochem, Corporation, La Jolla, CA)

Ethidiumbromid (Boehringer, Mannheim)

Fetales Kälberserum (FCS) (Life Technologies, Eggenstein)

Ficoll-Paque™ (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)

Fura-2AM (Calbiochem, Bad Soden)

Glukose, ultraPure, (Life Technologies, Eggenstein)

Glycerin (Merck, Darmstadt)

G418 (Calbiochem, Bad Soden)

Lachssperm, gebrauchsfertige Lösung zum Hybridisieren (Boehringer, Mannheim)

Lipopolysaccharid *E. coli* 0127:B8 (Sigma, Deisenhofen)

MOPS (Merck, Darmstadt)

Penicillin (50 U/ml), (GibcoBRL, Eggenstein)

Plummer's Inhibitor (Calbiochem, Bad Soden)

RNA-Marker: 0,24 – 9,5 kb RNA-Ladder (Life Technologies, Eggenstein)

SDS (Serva, Heidelberg)

Streptomycin (50 µg/ml), (GibcoBRL, Eggenstein)

Tetracyclin

Tris (Serva, Heidelberg)

Trizol (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe)

Trypanblau (Boehringer, Mannheim)

Trypsin-EDTA (GibcoBRL, Eggenstein)

X-Gal (Boehringer, Mannheim)

Alle weiteren Chemikalien wurden in p.a. Qualität von Sigma Chemicals, Deisenhofen, bezogen.

2.4 Puffer und Lösungen

5 x GEBS:	20 %	Glycerin
	50 mM	EDTA
	0,05 %	Bromphenolblau
	0,5 %	N-Laurylsarcosyl
HAG-CM:	20 mM	HEPES pH 7,4
	125 mM	NaCl
	5 mM	KCl
	1 mM	CaCl ₂
	1 mM	MgCl ₂
	0,25 % [w/v]	BSA
	0,5 mM	Glucose
2xHBS:	280 mM	NaCl
	50 mM	HEPES
	1,5 mM	Na ₂ PO ₄ 2H ₂ O
	pH-Wert auf 7,2 einstellen	
HBSS:	120 mM	NaCl
	5 mM	KCl
	1 mM	MgCl ₂
	20 mM	Hepes pH 7,4
	(1 mM	CaCl ₂)
	10 mM	Glucose
	die Glucose wurde stets kurz vor Gebrauch zu der autoklavierten Lösung gegeben	
HEPES:	je 20 mM	Hepes Salz und Säure mit HCl auf pH 7,4 einstellen
	125 mM	NaCl
	5 mM	KCl
Kalium-Eisen(II)/Eisen(III)cyanid:	8,45 g	K ₄ Fe(CN) ₆ x 3 H ₂ O
	7,84 g	K ₃ Fe(CN) ₆
	auf 100 ml mit ddH ₂ O auffüllen, sterilfiltrieren und lichtgeschützt bei 4°C lagern	
5 x Laufpuffer (RNA):	0,1 M	MOPS, pH 7,0
	40 mM	Natriumacetat
	5 mM	EDTA, pH 8,0
Probenauftragspuffer (RNA):	50 %	Formamid
	2,2 M	Formaldehyd (37 %ig)
	10 mM	EDTA
	20 %	Glycerin (87 %ig)
	0,2 %	Bromphenolblau
	50 µg/ml	Ethidiumbromid
	die Lösung wird nach dem Durchmischen steril filtriert	

Puffer 1 (Mini-Präparation):

50 mM	Glucose	
25 mM	Tris-HCl, pH 8,0	
10 mM	EDTA, pH 8,0	
nach dem Autoklavieren 0,15 mg/ml RNase zufügen, bei 4°C lagern		

Puffer 2 (Mini-Präparation):

0,2 N	NaOH
1 % [w/v]	SDS
immer frisch ansetzen	

Puffer 3 (Mini-Präparation):

11,78 g	Natriumacetat	
35,4 ml	ddH ₂ O	
4,6 ml	Eisessig	Lagerung bei 4°C

PBS:

8 g	NaCl
0,2 g	KCl
1,44 g	Na ₂ HPO ₄
0,24 g	KH ₂ PO ₄
in 800 ml dH ₂ O lösen, auf pH 7,4 einstellen mit HCl, ad 1 l dH ₂ O	

20 x SSC:

175 g	NaCl ₂
88,2 g	MgSO ₄
in 800 ml ddH ₂ O lösen und auf pH 7,2 mit HCl einstellen, ad 1 l ddH ₂ O	

Substrat-Färbelösung (x-Gal-Assay):

100 µl	x-Gal-Lösung
100 µl	Kalium-Eisen(II)/Eisen(III)cyanid
8 µl	1 M MgCl ₂
3792 µl	PBS
immer frisch ansetzen	

50 x TAE:

2 M	Tris-Acetat pH 8
150 mM	EDTA pH 8,0

10 x TBE:

0,9 M	Tris
0,9 M	Borsäure
0,2 mM	EDTA pH 8,0

T/E-Puffer 10/1:

10 mM	Tris-HCl pH 8,0
1 mM	EDTA pH 8,0

x-Gal-Lösung:

40 mg/ml	x-Gal in N-N-Dimethylformamid
immer frisch ansetzen	

Folgende Lösungen wurden ausschließlich für den *ATP-Release-Assay* verwendet:

Stock I:

15,4 g	NaCl
0,4 g	KCl
2 g	NaHCO ₃
0,1 g	Na ₂ HPO ₄
ad 100 ml	dH ₂ O

Stock II:

100 mM	MgCl ₂
--------	-------------------

Stock III:

100 mM	CaCl ₂
--------	-------------------

TAS:	5 ml	Stock I
	1 ml	Stock II
	0,1 g	Glucose
	0,2 g	BSA
	ad 100 ml	dH ₂ O
Wash-Puffer:	40 ml	TAS
	ca. 3 ml ACD bis ein pH-Wert von 6,35 – 6,4 resultiert	
Tyrode Ø:	60 ml	TAS
	0,3 ml	Tris-HCl 1 M pH 7,5
	ca. 0,1 ml	HCl 1M bis ein pH-Wert von 7,3 – 7,4 resultiert
Tyrode ⊕:	10 ml	Tyrode Ø
	0,2 ml	Stock III
ACD:	2,2 g	Natriumcitrat
	0,74 g	Zitronensäure
	2,4 g	Dextrose
	ad 100 ml	dH ₂ O

2.5 Enzyme und Kits

RQ1 DNase, RNase-frei (Promega, Madison, USA)
 10 x RQ1 RNase-freier DNase-Puffer (Promega, Madison, USA)
 Ribonuklease Inhibitor, RNasin (Promega, Madison, USA)
 RNase A (Qiagen, Hilden)
 T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
 10 x Buffer for T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
 10 x EcoPol-Puffer (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
 DNA-Polymerase I, Large Fragment Klenow (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
 Calf intestinal alkaline phosphatase CIAP (Life Technologies, Eggenstein)
 T4 Polynucleotide Kinase (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
 NEBuffer for T4 Polynucleotide Kinase 10 x (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
 Superscript™ II RT (Life Technologies, Eggenstein)
 5 x *First Strand Buffer* (Life Technologies, Eggenstein)
Taq DNA-Polymerase (Life Technologies, Eggenstein)
 10 x *Taq*-Polymerase-Puffer ohne Magnesium (Life Technologies, Eggenstein)
Pfu und Turbo *Pfu* Polymerase (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)
 SYBR® *Green PCR Core Reagent Kit* und SYBR® *Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Weiterstadt)
 QuantiTect Probe PCR-Kit (Qiagen, Hilden)
 QPCR Master-Mix (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)
 Pre-developed TaqMan-Kit β-Actin (Applied Biosystems, Weiterstadt)
 Assay-on-Demand: 18S-rRNA, HS9999901_S1 (Applied Biosystems, Weiterstadt)
 Assay-on-Demand: humaner C3aR, Hs00269693_S1 (Applied Biosystems, Weiterstadt)
 TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Weiterstadt)
 Restriktionsenzyme und entsprechende Puffer (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
 Lipofectamine (Invitrogen, Karlsruhe)
 Effectene™ Transfektion Reagent (Qiagen, Hilden)
 High Sensitivity β-Galactosidase Assay Kit (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)

Great EscAPE™ SEAP Chemiluminescence Detektion Kit (BD Biosciences)
 GFX™ DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA)
 Plasmid-Aufreinigungs Midi/Maxi-Kit (Qiagen, Hilden)
 NucleoSpin Plasmid-Kit (Macherey&Nagel, Braunschweig)
 human IL-6 ELISA (R&D Systems, Wiesbaden)
 human IL-8 ELISA (R&D Systems, Wiesbaden)

2.6 Primer

Primer aus der 5'-UTR des humanen C3aR, eingesetzt zur Transkriptionsstart-Bestimmung:
 (Sämtliche Positionsangaben beziehen sich auf das ATG-Startcodon mit + 1)

BSS4	5'-ctcaggattataaaactctac-3'	Pos. -286 bis -267 (Sense-Primer)
BSS5	5'-cagaagaagagaaagctcag-3'	Pos. -114 bis -121 (Sense-Primer)
BSS6	5'-cttcatgacttctactgtggc-3'	Pos. -104 bis -85 (Sense-Primer)
BSS8	5'-gaaactcttctgtgaggtc-3'	Pos. -215 bis -196 (Sense-Primer)
BSS9	5'-gtggcttagagcataagac-3'	Pos. -190 bis -172 (Sense-Primer)
BSS10	5'-cggaaacacgagagagaac-3'	Pos. -159 bis -141 (Sense-Primer)
MS17	5'-ctacttctgttttctgctt-3'	Pos. -269 bis -248 (Sense-Primer)
MS18	5'-gctttgcctttctaagccat-3'	Pos. -253 bis -234 (Sense-Primer)
SK10	5'-aagccatttagaaatgactc-3'	Pos. -240 bis -221 (Sense-Primer)
SK11	5'-gaaatgactcactttgaaac-3'	Pos. -230 bis -211 (Sense-Primer)
TC8	5'-ctgcatcttcaggccagc-3'	Pos. 159 bis 142 im ORF des hC3aR (RAS-Primer)

Klonierungsprimer für die neu-generierten C3aR-Promotor-Konstrukte:

BSS13	5'-acgtccacgcgtgctagcctcaggattataaaactctac-3'	Pos. -286 bis -267 (Sense-Primer)
	<i>MluI</i> - <i>NheI</i> -Schnittstellen	
BSS21	5'-acgttcacgcgtgctagcgaatgactcactttgaaac-3'	Pos. -267 bis -230 (Sense-Primer)
	<i>MluI</i> - <i>NheI</i> -Schnittstellen	
BSS22	5'-acgttcacgcgtgctagcgaactcttctgtgaggtc-3'	
	<i>MluI</i> - <i>NheI</i> -Schnittstellen	
BSS25	5'-acgttcacgcgtgctagcataagacttaactattgccgg-3'	Pos. -178 bis -157 (Sense-Primer)
	<i>MluI</i> - <i>NheI</i> -Schnittstellen	
BSR11	5'-acgttctcgcgaagcttctgagacagtagctgaaggc-3'	Pos. -18 bis -37 (RAS-Primer)
	<i>NruI</i> - <i>HindIII</i> -Schnittstellen	
BSR25	5'-acgttctcgcgaagcttgaagtatggcaagaaaatttg-3'	Pos. -99 bis -121 (RAS-Primer)
	<i>NruI</i> - <i>HindIII</i> -Schnittstellen	
BSR26	5'-acgttctcgcgaagctttagccacagtgaagtcac-3'	Pos. -80 bis -100 (RAS-Primer)
	<i>NruI</i> - <i>HindIII</i> -Schnittstellen	

Primer zur Amplifikation des chicken-Ets-1 aus dem pcDNA3-Ets-1 Vektor:

MS23: 5'-ataagaatcggccgcgatgaaggcggcggtggac-3' (Sense-Primer mit *NotI*-Schnittstelle)

MS24: 5'-atagtttagcggccgctcactcatcagcatctggcttg-3' (RAS-Primer mit NotI-Schnittstelle)

Sequenzierprimer zur Überprüfung inklonierter Inserts in den pSF91-IRES-eGFP-PRE Vektor:

MS25: 5'-gttaagtaaatagtcctc-3' Pos. 1013 bis 1030 (Sense-Primer)

MS26: 5'-cggccagtaacgtaggg-3' Pos. 2415 bis 2432 (RAS-Primer)

Mutation des CREB-Bindemotives an Position **-96/-97** des humanen C3aR-Promotors (als Matrize für die PCR-Mutagenese wurde der Vektor pSEAP2-E-267 verwendet):

MS27 5'-cttgccatactcatgtgtcactgtggctaagtgtggg-3'

MS28 5'-cccacacttagccacagtgaacacatgaagtatggcaag-3'

Mutation des CREB-Bindemotives an Position **-197** des humanen C3aR-Promotors (als Matrize für die PCR-Mutagenese wurden die Konstrukte pSEAP2-E-187 und pSEAP2-E-206 verwendet).

SK08 5'-cttgaaactcttctgtgagcacagatagtggtctagagc-3'

SK09 5'-gctctagaccatctgtgctcacaggaagagttcaag-3'

Mutation des Ets-1-Bindemotives an Position **-207** des humanen C3aR-Promotors (als Matrize für die PCR-Mutagenese wurde der Vektor pSEAP2-E-267 verwendet):

SK04 5'-ctcacttgaaactcttctgtgaggtcagatagtggtc-3'

SK05 5'-gaccactatctgacctcacaagaagagttcaagtgag-3'

Mutation des AP-1-Bindemotives an Position **-235/236** des humanen C3aR-Promotors:

SK06 5'-gcctttctaagccatttagaaaacaactcactttgaaactctcc-3'

SK07 5'-ggaagagttcaagtgagtgttcttaaatggcggagaaaggc-3'

Mutation des TATAA-Bindemotives an Position **-275** des humanen C3aR-Promotors (als Matrize für die PCR-Mutagenese wurde der Vektor pSEAP2-E-1511 verwendet):

SK20 5'-ctgcagaaaatgtctcaggacgctaaactcctactctgtttcc-3'

SK21 5'-ggaaaacagaagtaggagtttagcgtcctgagacattttgcag-3'

Mutation des TATAA-Bindemotives an Position **-351** des humanen C3aR-Promotors (als Matrize für die PCR-Mutagenese wurde der Vektor pSEAP2-E-1511 verwendet):

SK22 5'-catttctaaacaaaaccgctaaagtgaaccctatgtacagagg-3'

SK23 5'-cctctgtacatagggttcaacttagcggttttgttagaatg-3'

Primer zur Amplifikation einer Ets-1 dominant negativen Mutante (Gallus gallus p54):

MS29: 5'-aaggaaaaagcggccgcccaccatggaactatgttcgagatcg-3' NotI-Schnittstelle
Pos. 916 bis 932 des Ets-1-Gens (Sense-Primer) **Kozak-Sequenz**

MS30: 5'-aaggaaaaagcggccgctcactcatcatcatctg-3' NotI-Schnittstelle
Pos. 1306 bis 1323 des Ets-1-Gens (RAS-Primer)

Primer zur Amplifikation von eGFP aus dem pSF91-IRES-eGFP-PRE Vektor:

JT32	5'-cgcggatccacaaccatggtgagc-3'	<u>BamHI-Schnittstelle</u>	Kozak-Sequenz
JT33	5'-ccggaattcttactgtacagctcgctcc	<u>EcoRI-Schnittstelle</u>	Stop

Real-time RT-PCR Primer & Probe zum Nachweis des humanen C3aR:

JP25	5'-ttggggaaaactctgatgac-3'	Pos. 1225 bis 1244 (Sense-Primer)
JP26	5'-ctgccttgctttctctctaa-3'	Pos. 1344 bis 1325 (RAS-Primer)
JP27	FAM-5'-aatcccttcctttatgccctcttg-3'-Tamra	Pos. 1291 bis 1314 (Sonde)

Real-time RT-PCR Primer & Probe zum Nachweis des humanen C5aR:

MS20	5'-aggtgacggggataatgat-3'	Pos. 776 bis 794 (Sense-Primer)
MS21	5'-ttgatgcagcagttgatgtag-3'	Pos. 887 bis 867 (RAS-Primer)
MS22	FAM-5'-agccatcgtcaccaccttct-3'-Tamra	Pos. 806 bis 827 (Sonde)

Real-time RT-PCR Primer für humanes Ets-1:

Sense	5'-gctgcctgccaaccacaa-3'
RAS	5'-ctagggcagcagcaggaatgaca-3'

Humane RPS9-Haushaltsgen-Primer:

Sense	5'-cgaagggtctccgcggggtcacat-3'
RAS	5'-cgcagggcagcagcaggtggaagc-3'

Murine RPS9-Haushaltsgen-Primer:

Sense	5'-tgacgttggcggatgagcaca-3'
RAS	5'-ctggacgagggcaagatgaagc-3'

2.7 Vektoren

- pCDNA3.1/HisB (Invitrogen, Karlsruhe)
Vektor (5,5 kb) mit CMV-Promotor und einer Polyhistidinsequenz vor der Einklonierungsstelle (*multiple cloning site*). Dieser Vektor wurde für einen Großteil der Versuche als Kontroll-Vektor (KV) eingesetzt.
- pCDNA3.1/His/lacZ (Invitrogen, Karlsruhe)
Vektor (8,6 kb), der auf dem pCDNA3.1/His-Vektor basiert und in die Klonierungsstelle eingefügt das Gen für LacZ (β -Galaktosidase) enthält
- pSEAP2-Enhancer (Clontech/BD, Heidelberg)
promotorloser Vektor (4,9 kb), der für eine ins Medium sezernierte alkalische Phosphatase (SEAP) kodiert. Zur Klonierung von Promotorkonstrukten verwendet.
- pCMV- β (Clontech/BD, Heidelberg)
Vektor (7,2 kb), der neben dem CMV-Promotor für das Reportergen β -Galactosidase kodiert. Eingesetzt zur Normalisierung schwankender Transfektionseffizienzen.
- pQCXIN, RetroX™-System (Clontech/BD, Heidelberg)
Hierbei handelt es sich um einen retroviralen Klonierungsvektor (7,4 kb), der für das Neomycin-Resistenzgen, den CMV-Promotor und IRES kodiert. Der virale 5'-LTR ist ein Hybrid aus dem CMV Typ I Enhancer und dem *Mouse Sarcoma Virus* Promotor. Bei den LTRs handelt sich um

selbst-inaktivierende Promotoren, da im 3'-LTR eine Deletion eingebaut ist, so dass es bei der späteren Integration nicht zur Interferenz mit dem CMV-Promotor, der vor das einzuklonierende Insert geschaltet ist, kommt.

- pSF91-IRES-eGFP-PRE
Dieser retrovirale Klonierungsvektor (7,1 kb) wurde freundlicherweise von Prof. Baum zur Verfügung gestellt. Er kodiert für das *enhanced green fluorescent proteine* und IRES. Der 5'-LTR stammt aus dem *spleen focus forming virus* SFFVp.
- Vitality[®] Mammalian Expression Vector phrGFP-1 (Stratagene, Amsterdam Niederlande)
Vektor (4,3 kb), der zum *Gating* positiv-transfizierter Zellen für durchflußzytometrische Analysen eingesetzt wurden. Er kodiert für das *humanized recombinant* GFP, welches sich im Vergleich zum eGFP durch eine geringe Toxizität auszeichnet.
- Die Plasmide pSEAP2-E-2342, -1903, -1795, -1690, -1607, -1511, -308, -267, -142, -125, -109, -86 und -17, sowie das Positivkontrollplasmid pSEAP2-E-308-hC3aR-234 wurden von Frau B. Sohns in ihrer Dissertation („Untersuchungen zur Expression des humanen C3a-Rezeptors“) generiert.
- Die Plasmide c-Jun, c-Fos, CMV-Ras und Ets-2 wurden freundlicherweise von Dr. A. Nordheim und Dr. B. Luescher zur Verfügung gestellt. Sie enthalten alle den CMV-Promotor, weitere Angaben sind jedoch nicht bekannt.

2.8 Natürliche und synthetische Liganden

Formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin, (Sigma Chemicals, Deisenhofen)

humanes aufgereinigtes C3a, (Advanced Research Technologies, San Diego, USA)

rekombinantes C5a, (Sigma Chemicals, Deisenhofen)

Lipopolysaccharid *E.coli* 055:B5 (Sigma Chemicals, Deisenhofen)

2.9 Antikörper

2.9.1 Monoklonale Antikörper

2.9.1.1 Verwendung für durchflußzytometrische Analysen

Maus-Anti-Human C3aR (IgG₁, Klon 8H1)

Maus-Anti-Human C5aR (IgG₁, Klon W17/1)

Maus-Anti-Human CD4-FITC (BD Pharmingen, Heidelberg)

Maus-Anti-Human CD4-PE (BD Pharmingen, Heidelberg)

Maus-Anti-Human CD8-FITC (BD Pharmingen, Heidelberg)

Maus-Anti-Human CD8-PE (BD Pharmingen, Heidelberg)

Maus-Anti-Human CD14-PE (DAKO, Hamburg)

Maus-Anti-Human CD14-FITC (BD Pharmingen, Heidelberg)

Maus-Kontroll-IgG1(DAKO, Hamburg)

Ziege-Anti-Kaninchen-IgG, FITC-markiert (Dianova, Hamburg)

Ziege-Anti-Kaninchen-IgG, R-PE-markiert (Caltag Laboratories, München)

Ziege-Anti-Maus-IgG, PE-markiert (DAKO, Hamburg)

Ziege-Anti-Maus-IgG, FITC-markiert (Becton Dickinson, Heidelberg)

2.9.2 Polyklonale Seren (für FACS-Analysen)

Anti-C3a-Rezeptor-Kaninchenserum, hergestellt durch Immunisierung von Kaninchen mit einem rekombinanten Fusionsprotein aus Gluthationtransferase und dem zweiten extrazellulären Loop des C3a-Rezeptors, Verdünnung 1:4000, zur Verfügung gestellt von Dr. Ames, bei Smith Kline Beecham, King of Prussia, USA

Kontrollserum vom gleichen Kaninchen vor Immunisierung, siehe Anti-C3a-Rezeptor-Serum. Das Kontrollserum wird nachfolgend auch als Präimmenserum bezeichnet.

2.10 Eukaryotische Zelllinien

Die eukaryotischen Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank gehalten. Die Inaktivierung des fetalen Kälberserums (Sigma) erfolgte durch 30minütiges Erhitzen bei 56°C. Die Zelllinien wurden zur Erhaltung in Antibiotika-freiem Medium kultiviert. Falls es die Versuchsbedingungen erforderten, wurde Penicillin in einer Endkonzentration von 50 U/ml und Streptomycin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml eingesetzt. Die verwendeten Medien wurden von Biochrom KG und GibcoBRL bezogen.

HEK293 (ATCC CRL 1573):

Permanente, adhärenzte Linie aus humanen, frühembryonalen Nierengewebe; transformiert mit gescherter DNA des humanen Adenovirus Typ 5, hypotriploid (modale Chromosomenzahl 64) [*J. Gen. Virol.* (1977): **36**: 59; *Virology* (1977): **77**: 319].

Medium: DMEM HAM's F12 (1:1), 10 % FCS, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM Glutamin

HeLa T (erhalten von Fr. Prof. Dr. R. Heilbronn, FU Berlin):

Humane Zelllinie epithel-artiger Morphologie, die aus einem Cervix-Karzinom isoliert wurde; weist hohe Transformationseffizienz auf.

Medium: MEM Eagle with Earle's BSS, 2,2 g/l Natriumbicarbonat, 2 mM Glutamin, 0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat, 10% FCS

HL-60 (ATCC CCL 240):

Etabliert aus Zellen einer 36jährigen Kaukasierin mit akuter promyelogener Leukämie [*Collins et al.* (1977): *Nature* **270**: 347 – 349].

Medium: RPMI 1640, 10 % FCS

HMC-1 [Butterfield, J. H. et al. (1988): *Leuk. Res.* **12**: 345]:

Humane Mastzelllinie, die aus leukämischen Mastzellen generiert wurde.

Medium: RPMI 1640, 10 % FCS

SK-N-MC (ATCC HTB 10):

Humane Neuroblastoma-Zelllinie aus einer Metastase des supra-orbitalen Bereichs einer 14jährigen Kaukasierin; Epithel-ähnliche Morphologie.

Medium: DMEM, 10% FCS, 1 mM Natriumpyruvat

U937 (ATCC CRL 1593):

Humane histiocytäre Lymphoma-Zelllinie, die aus malignen Zellen eines 37jährigen Kaukasiers gewonnen und charakterisiert wurde; Expression vieler monozytärer Zellmarker; Differenzierung in ein Monozyten-ähnliches Stadium; induzierbar.

[Sundstrom C., Nillson, K. (1976): *Int. J. Cancer* **17**: 565]

Medium: RPMI 1640, 10 % FCS

A549 (ATCC CCL-185):

Humane Zelllinie, die 1972 aus dem malignen Lungengewebe eines 58jährigen Kaukasiers gewonnen und charakterisiert wurden. Adhärenzte Zellen mit epithelialer Morphologie.

Medium: DMEM, 10 % FCS

J774A.1 (ATCC TIB-67):

Murine Zelllinie, die aus einem Retikulumsarcom einer Frau stammt. Adhärenzte Makrophagen-Zelllinie.

Medium: DMEM, 10 % FCS, 1mM Natriumpyruvat

HT1080 (ATCC CCL-121):

Humane Fibrosarcoma-Zelllinie, die aus den malignen Zellen eines 35jährigen Kaukasier gewonnen und charakterisiert wurde. Adhärenzte Zellen mit epithelialer Morphologie.

Medium: DMEM, 10 % FCS, HEPES

Phoenix-gp (siehe <http://www.stanford.edu/group/nolan/index.html>)

Phoenix-gp-Zellen sind Retrovirus produzierende Zellen der zweiten Generation. In ihnen können *ecotropic* und *amphotropic* Retroviren erzeugt werden. Sie basieren auf der 293T-Zelllinie.

Medium: DMEM mit Glutamin, 10 % FCS, 1 % Natriumpyruvat, 20 mM HEPES

293GPG [Ory, D. S. *et al.* (1996): *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 11400]

Die humane 293GPG-Zelllinie stellt eine Derivat der HEK293-Zelllinie dar. Sie ist stabil transfiziert mit den retroviralen Genen *gag* und *pol* und dient somit als Verpackungszelllinie zur Produktion von rekombinaten *Moloney murine leukemia* Viren. Zusätzlich ist das Envelope-Protein *vesicular stomatitis virus G* (VSV-G) stabil integriert, welches aufgrund seiner Toxizität bei dauerhafter Expression dem tet^R/VP 16 Transaktivierungs und tet⁰ Minimalpromotor-System unterliegt.

Medium: DMEM, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamine, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 1 µg/ml Tetracyclin, 2 µg/ml Puromycin, 0,3 mg/ml G418

2.11 Bakterien

***E. coli* GM2163** (New England Biolabs):

Genotyp: F- *ara-14 leuB6 thi-1 fhuA31 lacY1 tsx-78 galK2 galT22 supE44 hisG4 rpsL136(Str^R) xyl-5 mtl-1 dam13:Tn9(Cam^R) dcm-6 mcrB1 hsdR2(r_k⁻ m_k⁺) mcrA*

***E. coli* Top10F'** (Invitrogen):

Genotyp: F{*laqI^qTn10(Tet^R)*} *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)1697 galU galK rpsL endA1 nupG*

***E. coli* XL1-Blue** (Clontech):

Genotyp: *endA1 gyrA96 hsdR17(r_k⁻ m_k⁺) lac recA1 relA1 supE44 thi-1 F'[proAB lacI^qZΔM15 Tn10(Tet^R)]*

3 Methoden

3.1 Methoden zur Expressions- und Funktionsanalyse von eukaryonten Zellen

3.1.1 Durchflußzytometrie

Ein Durchflußzytometer stellt ein optisches Meßsystem dar, welches Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel analysiert.

Die Streulichtsignale geben Aufschluß über die Querschnittsfläche, den Refraktionsindex, die Struktur der Membran (Faltung) und über intrazelluläre Bestandteile (Granula, Vakuolen).

Das gestreute Licht wird einerseits im Kleinwinkelbereich ($0 - 10^\circ$, Vorwärtsstreulicht) und andererseits im rechten Winkel (Seitwärtsstreulicht) zum Anregungsstrahl des Argonlasers analysiert. Das Vorwärtsstreulicht (*Forward Angle Light Scatter*, FSC) beinhaltet Informationen über die Zellgröße, wohingegen das Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*, SSC) Hinweise über die Granularität der Partikel gibt.

Die Fluoreszenz ermöglicht Aussagen über die Bindung markierter monoklonaler Antikörper und damit über die Expression bestimmter Oberflächenproteine auf verschiedenen Zellpopulationen. So lassen sich z. B. Monozyten mittels eines Antikörpers gegen den Oberflächenmarker CD14 nachweisen.

Als Farbstoffe, deren Excitationsmaximum im Bereich der Emissionslinie des Argonlasers (488 nm) liegen, werden das Fluorescein (FITC) mit einem Fluoreszenzmaximum bei 525 nm und das Phycoerythrin (PE) mit einem Fluoreszenzmaximum bei 578 nm eingesetzt. Bei einer Mehrfarbenfluoreszenzanalyse stellt sich das Problem, daß die Emissionsspektren der beiden Fluorophore überlappen. Zur Korrektur des spektralen Überlapps muß die Probe kompensiert werden, das heißt, daß von jedem Signalpuls der durch die spektrale Überlappung verursachte Fluoreszenzanteil subtrahiert wird.

3.1.1.1 Untersuchung von humanen Monozyten auf C3aR bzw. C5aR-Expression

Vorbereitung der Zellen für die FACS-Analysen:

Die kultivierten Monozyten wurden nach der Entfernung des Mediums einmal mit PBS gewaschen. Die Ablösung der Zellen erfolgte mit der *Cell Dissoziation Solution* (CDS). Von diesem Zeitpunkt an wurde für alle weiteren Schritte eiskaltes PBS verwendet. Die abgelösten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen (1500 rpm, 4°C , 10 min) und auf eine Zellzahl von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Die Zellsuspension wurde bis zur weiteren Verwendung stetig auf Eis gelagert, da die Monozyten bei Raumtemperatur an die Plastikoberfläche der Reaktionsgefäße adhäreren würden.

Die Erythrozyten des als Kontrolle verwendeten EDTA-Blutes von gesunden Spendern wurden einer 30-minütigen NH_4Cl -Lyse bei 37°C (1 Vol. Blut + 9 Vol. 0,83 %ige NH_4Cl -Lösung) unterzogen. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen

(1500 rpm, 4°C, 10 min). Die nichtlysierten Leukozyten wurden in PBS resuspendiert und ebenfalls auf eine Zellzahl von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt.

a) Verwendung von polyklonalen Kaninchenseren:

Es wurden 100 $\mu\text{l/well}$ der zuvor in PBS verdünnten polyklonalen Seren (Anti-C3aR-Kaninchenserum 1:4000, Kontrollserum 1:4000, Anti-C5aR-Kaninchenserum 1:600) in gekühlte Mikrotiterplatten vorgelegt und mit je 50 $\mu\text{l/well}$ der entsprechenden Zellsuspension vermischt.

b) Verwendung von monoklonalen Antikörpern:

Die murinen monoklonalen Anti-C3aR bzw. Anti-C5aR Antikörper 8H1 bzw. W17/1 wurden mit PBS auf eine Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ eingestellt und dann eins zu eins mit der entsprechenden Zellsuspension verdünnt, so daß sich in einem Reaktionsvolumen von 100 μl eine endgültige Antikörper-Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ ergab.

Von diesem Zeitpunkt an wurden alle weiteren Inkubations- und Waschschrte bei 4°C in Mikrotiterplatten durchgeführt, die mit Hilfe von Polyacetatklebefolie dicht verschlossen wurden. Die Inkubation mit den primären Antikörpern wurde nach 30 Minuten durch zweimaliges Waschen mit PBS (1500 rpm, 2 min, 4°C) beendet. Parallel dazu wurden die Zellen als Negativkontrolle zusätzlich mit PBS (Kontrolle für unspezifische Bindung) und Präimmunserum (unspezifische Bindung von Kaninchen-IgG) bzw. Maus-Kontroll-IgG1 inkubiert. Nach der Seruminkubation wurden die Zellen mit 50 μl Fluoreszenzfarbstoffgelabeltem Ziege-Anti-Kaninchen-IgG bzw. Ziege-Anti-Maus-IgG (1:200 verdünnt in PBS) 30 Minuten lang inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrten wurden die Zellen in 200 μl kaltem PBS mit 1 % Formaldehyd resuspendiert und im Durchflußzytometer FACScan™ (Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert.

3.1.1.2 Untersuchung von transient transfizierten HEK293 auf C3aR-Expression

Als Positiv-Kontrolle wurde auch hier lysiertes Vollblut, wie oben beschrieben, verwendet. Von den HEK293-Zellen wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit CDS abgelöst. Von nun an wurden alle Schritte auf Eis bzw. mit 4°C kalten Reagenzien durchgeführt. Sämtliche Proben, die mit hrGFP (ko)-transfiziert waren, wurden lichtundurchlässig in Alufolie verpackt. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde zum Zählen abgenommen, der Rest bei 1500 rpm und 4°C für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in entsprechender Menge PBS resuspendiert, so dass eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml resultierte.

Die Proben wurden von nun an wie unter 3.1.1.1 beschrieben entweder mit monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern versetzt, inkubiert und gewaschen. Die Detektion des C3aR bzw. C5aR erfolgte hier stets mit Phycoerythrin gelabelten Antikörpern, da die Zellen

teilweise mit hrGFP ko-transfiziert waren, welches im FITC-Kanal fluoresziert. Anhand des hrGFP-Signals konnten positiv-transfizierte Zellen eingegrenzt und so die Detektion des C3aR bzw. C5aR verbessert werden.

3.1.2 Messung von freiem zytosolischen Ca^{2+}

Um die Existenz des C3aR und des C5aR auf humanen Monozyten auch funktionell zeigen zu können, wurde bei diesen Zellen der Anstieg der freien zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Stimulusgabe gemessen. Durch die Bindung des Liganden an den entsprechenden Rezeptor wird über die Aktivierung eines stimulierenden G-Proteins die Phosphoinosid-Kaskade in Gang gesetzt. Die Phospholipase C katalysiert die Hydrolyse des membranständigen Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphats (PIP_2) zum Diacylglycerin und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3). Das IP_3 verläßt die Plasmamembran und diffundiert ins Cytosol, wo es die Ausschüttung von Ca^{2+} aus speziellen intrazellulären Speichern bewirkt, weiterhin kommt es zur Öffnung von Ionenkanälen in der Zellmembran und somit zusätzlich zum Einstrom von Ca^{2+} .

Die Messungen des freien zytosolischen Calciums an Monozyten wurde in Suspension mit dem membrangängigen Fluoreszenzfarbstoff Fura-2AM (Calbiochem, Bad Soden/Taunus) unter Verwendung des Luminescence Spectrometers LS 50B (Perkin Elmer, Beaconsfield, U.K.) durchgeführt.

Bei dem Fura-2 handelt es sich um einen *dual wavelength indicator*, d. h. eine Änderung der Ca^{2+} -Konzentration kann im Excitationsspektrum bei zwei verschiedenen Wellenlängen betrachtet werden. Steigt der Spiegel des freien zytosolischen Ca^{2+} nach Stimulation an, so spiegelt sich das in einer Intensitätszunahme des einen Maximums und in einer Intensitätsabnahme des zweiten Maximums wieder. Der Detektor mißt im Sekundenabstand die Intensitäten der beiden Maxima und berechnet den Quotienten. Auf diese Weise kann das Hintergrundrauschen herausgefiltert und der Einfluß von Artefakten minimiert werden.

Fura-2 ist ein mehrfach negativ geladenes Carboxylat-Anion, welches aufgrund dieser Tatsache nicht dazu befähigt ist, Lipid-Membranen zu permeieren. Zur Abschirmung der negativen Ladungen wird das Chromophor an einen ungeladenen extrem hydrophoben Amylester (AM) gekoppelt, welcher leicht durch die Zellmembran diffundieren kann. Im Zytosol der Zellen wird die Bindung zwischen dem Fura-2 und dem Amylester schnell durch ubiquitär vorhandene Esterasen hydrolysiert, so daß die für die Ca^{2+} -Bindung essentiellen Carboxylatgruppen wieder freigesetzt werden.

Ein weiteres Problem stellt sich, da ungeladene organische Moleküle, wie die Amylester, nicht in wäßrigen Medien löslich sind. Um eine Präzipitation zu vermeiden, wird der Lösung das milde nichtionische Reagenz Pluronic F-127 (BASF Wyandotte Corporation, Wyandotte, Wisconsin, USA) zugesetzt. Es verpackt das Fura-2AM in Mizellen und stellt es somit für die Beladung der Zellen zur Verfügung.

Die beiden Chemikalien müssen gut durchgemischt und möglichst erst kurz vor der Benutzung zusammenpipettiert werden.

Zur Überprüfung der Beladung werden die Zellen zuerst mit dem nicht-ionischen Detergenz Triton X-100 behandelt, welches die Lipiddoppelschichten durchgängig macht und somit zu einem maximalen Ca^{2+} -Signal führt. Bei der anschließenden Gabe von EDTA werden alle Ca^{2+} -Ionen komplexiert, das Signal sinkt auf die Basislinie ab. Unter Zuhilfenahme dieser Kurve wird die resultierende Ca^{2+} -Konzentration der zu vermessenden Probe nach der Formel von Grynkiewicz [144] berechnet.

Die Proben wurden nach folgendem Protokoll für die Messung vorbereitet:

Nachdem das Medium der Zellkulturflasche abgenommen war, wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und daraufhin mit *Cell Dissoziation Solution* abgelöst. Die Zellen wurden in einer entsprechenden Menge (10 ml/mittlere Zellkulturflasche) an eiskaltem PBS aufgenommen und einmal mit 10 ml HBSS (an entsprechender Stelle wird erwähnt, ob dem HBSS Ca^{2+} zugesetzt wurde oder nicht), welches 0,5 % BSA enthielt, gewaschen (Zentrifugation für 10 min bei 1.500 rpm und 4°C). Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in HBSS resuspendiert, so daß eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml resultierte. Die Beladung erfolgte mit einer zuvor hergestellten Lösung aus 10 Teilen Fura-2AM (1 mM in DMSO) und einem Teil Pluronic F-127 (20 %-tig in DMSO), so daß eine Endkonzentration an Fura-2AM von 10 μM resultierte. Von diesem Schritt an muß die Zellsuspension stets vor Lichteinstrahlung geschützt werden. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur und ständigem leichtem Schwenkens auf dem Kipp-Wipp wurde die Zellsuspension 1:10 mit HBSS verdünnt und für weitere 30 Minuten unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für zehn Minuten bei 1.500 rpm und 4°C abzentrifugiert und einmal mit 5 ml HBSS gewaschen. Zuletzt wurden sie in HBSS resuspendiert, so daß wiederum eine Dichte von 1×10^7 Zellen/ml resultierte.

Für die Messung wurden 450 μl HBSS (1 mM CaCl_2) mit 50 μl der Zellsuspension in einer Küvette gemischt. Die mit einem Mikrorührfisch versehene Küvette wurde in das Lumineszenz Spektrometer gestellt und eine Minute bei 37°C vorinkubiert. 60 Sekunden nach dem Start der Messung wurden 25 μl HBSS (1 mM CaCl_2) und nach weiteren 60 Sekunden 25 μl des entsprechenden Stimulus zu der Lösung pipettiert.

Die Stimuli wurden in folgenden Endkonzentrationen eingesetzt:

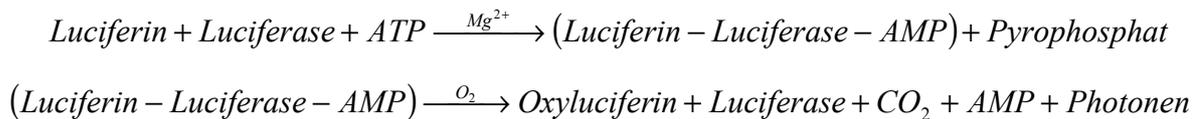
hC3a → 40 nM

hC5a → 20 nM

Zur Austestung der Beladung wurden zu obiger Lösung nach 20 Sekunden 50 μl Triton X-100 und nach weiteren 40 Sekunden 50 μl EDTA gegeben.

3.1.3 ATP-Release-Assay (ARA)

Der ARA basiert auf dem Nachweis von freigesetztem ATP. Meerschweinchenthrombozyten reagieren auf eine Stimulation mit humanem C3a mit einer Ausschüttung von ATP, welches von der Luciferase zur Umsetzung des luminogenen Substrates Luciferin und damit zur Freisetzung von Lichtenergie benötigt wird (Luciferin-Luciferase-System aus Glühwürmchen LUMAC B. V., Niederlande).



Die freigesetzte Lumineszenz wird mit dem Multi-Biolumat LB9505 (Berthold, Wildbad) mit Spektrofluorometrischem Detektor RF-551 (Shimadzu) photometrisch gemessen.

Unter optimalen Bedingungen wird pro freigesetztem ATP-Molekül ein Photon gebildet.

Zur Gewinnung der Thrombozyten wurde ein Meerschweinchen mit CO₂ getötet und anschließend einer Herzpunktion unterzogen. Hierbei wurde das gewonnene Blut 1:10 mit einer ACD-Lösung versetzt und sehr vorsichtig geschwenkt, da die Thrombozyten durch jegliche Erschütterung stimuliert werden. Nach der Überführung in spezielle Hartplastikröhrchen (Nunc) wurde das Blut für 20 Minuten bei RT und 1.200 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Das plättchenreiche Plasma (PRP) stellt die obere Phase dar und wurde in ein neues Röhrchen überführt. Pro ml PRP wurden 133 µl ACD-Lösung hinzugefügt. Die Thrombozyten wurden nun für zehn Minuten bei RT und 3.000 rpm mit Bremse sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml Wasch-Puffer resuspendiert und anschließend auf 10 ml aufgefüllt. Der Zentrifugations- und Waschschrift wurde ein zweites Mal wiederholt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig in 1 ml Tyrode Ø resuspendiert. Es wurde weiterhin Tyrode Ø zugefügt, bis sich eine OD bei 578 nm von 1,3 ergab.

Vor Beginn der Messung wurden die Thrombozyten für 30 Minuten erschütterungsfrei bei RT inkubiert.

Für die Messung wurden 50 µl Tyrode ⊕ und 50 µl Stimulus (gelöst in Tyrode Ø) in ein kleines Hartplastikröhrchen überführt, welches daraufhin in den Multi-Biolumat plaziert wurde. Auf das Signal hin wurden 50 µl der Thrombozyten-Suspension und nach 30 Sekunden 100 µl LUMAC-Reagenz zugefügt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren beruht auf deren Absorptionsmaximum bei 260 nm, für welches vor allem die aromatischen Ringe der Purin- und Pyrimidinbasen verantwortlich sind.

Die Nukleinsäurekonzentration kann nach dem Lambert Beerschen Gesetz mit folgender Formel berechnet werden:

$$c = E_{260} \times (d \times \epsilon)^{-1}$$

c = Konzentration der Nukleinsäure
 d = Schichtdicke der Quarzküvette (1 cm)
 ϵ = Extinktionskoeffizient der Nukleinsäure

Im neutralen pH-Bereich stellen sich die Extinktionskoeffizienten ϵ der einzelnen Basen und ihre Absorptionsmaxima wie folgt dar:

Adenin	$15,158 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$	(259nm)
Cytosin	$7,345 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$	(271 nm)
Guanin	$11,615 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$	(253 nm)
Thymin	$8,500 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$	(260 nm)
Uracil	$10,100 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$	(260 nm)

Eine Lösung, die 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngige DNA enthält, besitzt unter diesen Bedingungen einen Absorptionwert von eins (auch Optische Dichte, OD). Die Konzentration an einzelsträngiger DNA bzw. RNA ist aufgrund des hyperchromen Effektes bei einer OD von eins geringer (ssDNA = 40 $\mu\text{g/ml}$, RNA = 33 $\mu\text{g/ml}$).

Da das Absorptionsmaximum für Proteine, basierend auf der Absorption der aromatischen Aminosäuren, bei 280 nm liegt, kann die Bestimmung des Verhältnisses der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm Aufschluß über eventuelle Verunreinigungen der Nukleinsäure durch Proteine (oder Phenol) geben. Bei einer reinen DNA-Lösung ergibt sich der Quotient (Ratio) $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ zu 1,8. Bei reiner RNA-Lösung erhält man einen Wert von 2,0.

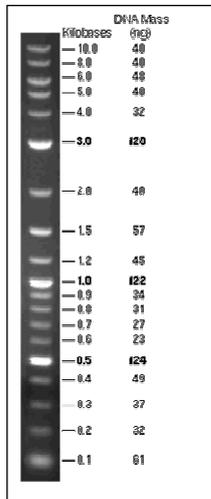
3.2.2 Agarosegelelektrophorese

Bei vielen natürlich vorkommenden Makromolekülen handelt es sich um geladene Teilchen, sie wandern daher im elektrischen Feld. Auf diesem Phänomen basiert eine sehr wichtige Methode zur Trennung und Analyse von Proteinen und Nukleinsäuren, die Elektrophorese.

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von Nukleinsäuregemischen nach Molekülgröße und elektrophoretischer Beweglichkeit. Die Temperatur, der pH-Wert und die Ionenstärke des Puffers, die Konformation der Nukleinsäure und vor allem die Dichte der Agarosegelmatrix bestimmen das Wanderungsverhalten.

Die Agarose wurde je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente (100 – 50.000 Bp) in einer Konzentration von 0,8 % - 2,0 % (w/v in TBE-Puffer) eingesetzt, wobei die

Wanderungsgeschwindigkeit annähernd proportional dem Logarithmus des Molekulargewichts der DNA ist. Die Feldstärke betrug ca. 5 V/cm.



Die DNA ist nach einer Färbung mit Ethidiumbromid auf UV-Illuminatoren bei 312 nm detektierbar. Ethidiumbromid ist ein planares, aromatisches Molekül, welches bevorzugt zwischen G:C-Basenpaare, interkaliert. Durch die reversible Einlagerung des Ethidiumbromids in den Nukleinsäurestrang erhöht sich dessen Fluoreszenzkraft etwa um den Faktor 20. Somit ist in Anwesenheit eines internen Standards eine semiquantitative Bestimmung der DNA-Konzentration möglich.

Zur Abschätzung der Fragmentgröße wurde die 2-log DNA-Ladder der Firma New England Biolabs eingesetzt (siehe links).

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über einen visuellen Vergleich der Banden, kann aber auch mit Hilfe der internen Quantifizierungsoption des E.A.S.Y.TM-Bildokumentationssystems durchgeführt werden.

Zur Herstellung des Gels wurde die entsprechende Agarosemenge in TBE-Puffer aufgekocht und nach einem Abkühlen auf ca. 60°C in die vorbereitete Gelform gegossen. Nachdem die Agarose auspolymerisiert war, wurde das Gel in eine mit TBE-Puffer gefüllte Horizontalgelkammer gelegt. Die Nukleinsäureproben wurden mit 5x GEBS (final 1x GEBS) versetzt, in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese gestartet. Nach Beendigung wurde das Gel für 15 Minuten in einem Ethidiumbromidbad (400 µl/300 ml H₂O) gefärbt, für 10 Minuten im Wasserbad das überschüssige Ethidiumbromid entfernt und das Gel auf dem UV-Tisch mit dem E.A.S.Y.-Bildokumentationssystem abgelichtet.

3.2.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der *GFXTM DNA and Gel Band Purification Kit* der Firma Amersham Biotech nach Herstellerangaben verwendet. Hierbei wurde die DNA nach Einlagerung von Ethidiumbromid auf dem UV-Tisch visualisiert und das interessierende Stück mit dem Skalpell herausgeschnitten. Anschließend wurde das Gelstück in Puffer gelöst und auf eine Trennsäule aufgetragen, welche die gelöste DNA unter den gegebenen Pufferbedingungen bindet. Zuletzt konnte die DNA auf der Säule gewaschen und durch Änderung des pH-Wertes eluiert werden.

3.2.4 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient der Entfernung von störenden Proteinverunreinigungen aus Nukleinsäurelösungen. Hierzu wird die DNA-Lösung mit dem gleichen

Volumen einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) versetzt und gut durchmischt. Zur Auftrennung von wässriger und organischer Phase erfolgt eine Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C für 3 min. Die obere, wässrige Phase, die die DNA enthält wird vorsichtig abgenommen, die denaturierten Proteine sammeln sich in der organischen oder der Interphase. Zur Entfernung verbliebenen Phenols kann eine Nachextraktion mit einem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) angeschlossen werden.

Da die DNA nach der Extraktion meist in viel zu geringen Konzentrationen vorliegt, schließt sich eine alkoholische Fällung an, die den positiven Nebeneffekt hat, dass störende Salze heraus gewaschen werden.

3.2.4.1 Ethanolische Fällung

Das Standardprotokoll der ethanolischen Fällung, unter Einsatz des monovalenten Natriumacetates, wurde hier zur Fällung sämtlicher DNA-Lösungen verwendet. Es bietet den großen Vorteil, dass das Ethanol nach der Fällung rasch verdampft und somit keine störenden Rückstände bleiben.

Die DNA-Lösung wird mit 1/10 ihres Volumens an 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und dem 2,5-fachen Volumen an eiskaltem 96 %igem Ethanol versetzt. Zusätzlich kann noch als Fällhilfe Glykogen (20 µg) zugegeben werden. Nach 30-minütiger Inkubation bei -80 °C werden die gefällten Nukleinsäuren bei 13000 rpm und 4°C für 30 min sedimentiert. Das Pellet wird anschließend mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen, um noch vorhandene Salze zu entfernen. Nach dem Trocknen in der Speedvac wird die DNA in Ampullen-Wasser oder TE-Puffer gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt.

3.2.4.2 Isopropanolfällung

Die Isopropanol- hat gegenüber der ethanolischen Fällung den Vorteil, dass sie nur ein geringes Fällungsvolumen benötigt. Der Nachteil liegt darin, dass Isopropanol einen relativ hohen Siedepunkt hat und so die Trocknung der Nukleinsäure recht lange dauert. Diese Art der Fällung wurde ausschließlich für RNA-Lösungen verwendet.

Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte bei Raumtemperatur durch die Zugabe eines Proben- volumens an Isopropanol (2-Propanol). Zusätzlich wurde hier 2 – 5 µg Glykogen als Fällhilfe zugesetzt. Nach dem sorgfältigen Durchmischen der Probe wird diese 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 15 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Es folgt ein Waschschrift mit 70%igem Ethanol. Die RNA wird im Heizblock bei 37°C getrocknet und in DEPC-Wasser gelöst, wozu sie 10 min auf 60 °C erhitzt wird.

3.2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion

[145]

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäure-Sequenzen. Mit Hilfe zweier synthetischer Oligonukleotid-Primer, die die terminalen Bereiche der zu amplifizierenden Sequenz komplementär flankieren, und einer thermostabilen DNA-Polymerase wird in einer sich wiederholenden dreiteiligen Reaktion aus Hitze-Denaturierung des Templates, Primer-Anlagerung (*Annealing*) und Elongation eine exponentielle, selektive Amplifikation erreicht. Die Denaturierung wird bei 94°C durchgeführt, um die vollständige Aufschmelzung auch GC-reicher Regionen zu gewährleisten, wird hier ein Zeitraum von 5 – 10 min gewählt. Die Annealing-Temperatur (T_M) hängt von der Länge und der Nukleotidzusammensetzung des Primers ab. Zur Optimierung von neuen Primern wurde sie nach der GC-Formel [$T_M = (\text{Anzahl G/C}) \cdot 4 + (\text{Anzahl A/T}) \cdot 2$] berechnet und eine PCR mit den drei Temperaturen T_M und $T_M \pm 4^\circ\text{C}$ durchgeführt. Die PCR-Amplifikate wurden im Agarosegel analysiert und die höchstmögliche Annealing-Temperatur gewählt, die ein eindeutiges Produkt ergab und möglichst keine zusätzlichen Banden aufwies. Die Elongation wird bei 72°C, dem Temperatur-Optimum der DNA-Polymerasen durchgeführt. Bei Verwendung der *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* YTI reicht eine Elongationszeit von 10 – 60 Sekunden (1 - 2 min/kb), wohingegen die *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* in der gleichen Zeit wesentlich weniger Nukleotide einbaut (0,5 – 1 min/kb), die Elongationszeit muß also in Abhängigkeit von der Amplifikatlänge berechnet werden. Die *Pfu*-Polymerase bietet jedoch einen großen Vorteil, sie verfügt über eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, die zu einer wesentlich geringeren Fehlerrate führt. Ein weiterer Unterschied besteht darin, daß die *Pfu*-Polymerase ein glattes Ende am neusynthetisierten DNA-Strang erzeugt, wohingegen die *Taq*-DNA-Polymerase einen Adenosin-Überhang bildet.

Der nächste Zyklus startet wiederum mit dem Denaturierungsschritt. Da im Idealfall nur die neu entstandenen Abschnitte doppelsträngig vorliegen, reicht ab dem zweiten Zyklus eine Zeitspanne von 10 – 60 Sekunden zur vollständigen Denaturierung der Doppelstrangbereiche aus. Aufgrund der exponentiellen Amplifikation des Templates liegt meist nach 30 Zyklen genug Produkt für weitere Analysen vor.

Die Reaktionsansätze wurden nach Herstellerangaben erstellt und gegebenenfalls optimiert.

3.2.6 PCR-Mutagenese

Das *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* der Firma Stratagene wurde zur gezielten Substitution einzelner Basenpaare eingesetzt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der vollständigen Amplifikation des Vektors, der das zu mutierende Gen enthält, wobei komplementäre Oligonukleotide eingesetzt werden, die den gewünschten Basenaustausch enthalten. Die mutationstragenden Primer müssen besondere Kriterien hinsichtlich der Länge, Schmelztemperatur und GC-Gehalt erfüllen. Das Design erfolgt nach Herstellerangaben. Der

Vektor, der für das zu mutierende Gen codiert, muss methyliert vorliegen, da dem PCR-Schritt ein Verdau mit dem Restriktionsenzym *DpnI* angeschlossen wird, welches selektiv methylierte DNA abbaut, so dass schließlich nur die neusynthetisierten, mutationstragenden Plasmide erhalten bleiben. Weiterhin ist zu beachten, dass hier als Polymerase die Turbo-*Pfu* eingesetzt werden muss, da sie in wesentlich kürzerer Zeit als die normale *Pfu* DNA-Stränge verlängert (bis 10 kb 1 min/kb) und nur so die vollständige Amplifikation des gesamten Vektors erreicht werden kann. Für jede Probe wurde folgender Reaktionsansatz erstellt:

2,5 µl		10x Reaction buffer
x µl	(25 ng bzw. 50 ng)	Plasmid-DNA (methyliert z. B. aus <i>E.coli</i> XL-1)
x µl	(62,5 ng)	Mutagenese-Primer 1
x µl	(62,5 ng)	Mutagenese-Primer 2
1 µl	5 mM	dNTP-Mix (0,2 mM Endkonzentration)
0,5 µl	2,5 U/µl	Turbo- <i>Pfu</i> (Stratagene)
ad 25 µl Endvolumen mit ddH ₂ O auffüllen		

Die PCR wurde im Landgraf Thermocycler durchgeführt:

Vorzyklus	}	20 s	95°C	(Denaturierung)
		120 s	95°C	
Hauptzyklus (15 x)	}	20 s	95°C	(Denaturierung)
		60 s	95°C	
		20 s	55°C	(Annealing)
		120 s	55°C	
		20 s	68°C	
900 s	68°C	(Extension)		

Anschließend wurde der gesamte Ansatz mit 0,5 µl *DpnI* versetzt und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle wurden 10 µl des Reaktionsansatzes nach dem Verdau in einem 0,8 % Agarosegel analysiert.

3.2.7 Plasmid-Präparationen

[146]

Die im Folgenden beschriebenen Plasmid-Präparationen beruhen alle auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Ein EDTA-haltiger Puffer komplexiert die für Stabilität der Bakterienzellwand essentiellen zweiwertigen Kationen. Natronlauge denaturiert chromosomale und Plasmid-DNA sowie Proteine. In Gegenwart von SDS bilden diese denaturierter Proteine und chromosomale DNA, sowie hochmolekulare RNA und bakterieller Zelldebris unlösliche Komplexe. Die kleinere Plasmid-DNA bleibt hingegen in Lösung und kann somit von der restlichen Suspension abgetrennt werden.

3.2.7.1 Plasmid-Midi/Maxi-Präparation

Für qualitativ hochwertige Plasmid-Präparationen wurde das Qiagen-Plasmid-Midi bzw. Maxi-Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wurden 50 - 200 ml

(Midi-Präp.) bzw. 300 - 500 ml (Maxi-Präp.) einer Übernachtskultur von Bakterien erst auf Eis abgekühlt und anschließend die Bakterien sedimentiert. Senkt man die Volumina der Bakterienkultur, so kann die Reinheit der Plasmide erhöht werden. Nachdem die Bakterien lysiert waren, wurden Zelltrümmer und Proteine durch Zentrifugation von der wässrigen Phase, die das Plasmid enthält, abgetrennt. Die eigentliche Aufreinigung erfolgte über eine im Kit mitgelieferte Säule. Die Plasmid-DNA wurde aus dem Eluat mittels einer Isopropanol-Fällung gewonnen. Nach der vollständigen Trocknung des Pellets wurde die DNA in 200 µl bis 1 ml Ampullen-Wasser aufgenommen und eine photometrische Konzentrationsbestimmung durchgeführt.

3.2.7.2 Plasmid-Mini-Präparation

Die Plasmid-Mini-Präparation wurde mit eigens hergestellten Puffern nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Von den plasmidhaltigen Bakterien einer 3 ml-Übernachtskultur wurden 2 ml nach Sedimentation (2 min, 13.000 rpm) und vollständiger Abnahme des Überstandes erst in 100 µl Puffer 1 resuspendiert und daraufhin durch Zugabe von 100 µl Puffer 2 alkalisch lysiert. Die Lyse wurde durch die Zugabe von 100 µl Puffer 3 gestoppt. Nach der Sedimentation von Zelltrümmern und Proteinen (5 min, 13.000 rpm) folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender ethanolischer Fällung. In der Regel wurde die Plasmid-DNA in 20 µl Ampuwa resuspendiert.

Da die Reinheit der so präparierten Plasmide eher gering ist, wurde diese Methode hauptsächlich für Vektoren angewandt, bei denen nach Ligation eine Restriktionskontrolle erfolgen sollte.

Qualitativ hochwertige Mini-Präparationen wurden mit dem NucleoSpin Plasmid-Kit der Firma Macherey&Nagel nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Reinheit der so erhaltenen Vektoren genügte, um sie z. B. für eine Sequenzierung einsetzen zu können.

3.2.8 Klonierungsarbeiten

3.2.8.1 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die kurze DNA-Sequenzen erkennen, diese sequenzspezifisch in beiden Strängen spalten. Man unterscheidet drei Gruppen von Restriktionsenzymen, die aus historischen Gründen als Typ I, II und III bezeichnet werden.

In der Molekularbiologie finden hauptsächlich die Typ II-Restriktionsenzyme Verwendung, sie erkennen kurze, meist palindrome Sequenzen (4-6 Bp) und spalten innerhalb oder in unmittelbarer Umgebung dieses Bereiches.

Alle Restriktionsendonukleasen benötigen Mg^{2+} -Ionen als Kofaktoren. Sie können den DNA-Strang entweder glatt durchschneiden, so dass „stumpfe“ Enden („*blunt-ends*“) entstehen oder sie spalten die beiden Stränge versetzt, wobei einzelsträngige komplementäre Enden („*sticky-ends*“) gebildet werden.

Für einen Restriktionsverdau wurden pro 1 μ g DNA 10 U des gewünschten Restriktionsenzym eingesetzt. Die Reaktion wurde unter den vom Hersteller (New England Biolabs) empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen durchgeführt, wobei der Glycerin-Gehalt im Gesamtvolumen maximal 5 % betrug. Je nachdem ob der Verdau zur Kontrolle einer Ligation oder zur Herstellung von geschnittenen Inserts bzw. Vektoren dienen sollte, wurde der Reaktionsansatz für ein bis 20 Stunden inkubiert und anschließend durch Zugabe von 5 x GEBS oder Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym gestoppt.

3.2.8.2 Klenow-Behandlung

Das Klenow-Fragment ist das größere Fragment der DNA-Polymerase I von *E. coli*, es kann zum Auffüllen von 5'-Überhängen an DNA-Stücken eingesetzt werden, die z. B. für eine „*blunt-end*“-Ligation benötigt werden, wenn sich Vektor und Insert nicht mit dem gleichen Restriktionsenzym schneiden lassen.

Hierzu wurde 16 μ l Vektor bzw. Insert mit 2 μ l 10 x EcoPol-Puffer (New England Biolabs), 1 μ l dNTP-Mix [2 mM] und 1 μ l (1 U/ μ g DNA) DNA-Polymerase I, Large Fragment Klenow (New England Biolabs) versetzt und für 15 min bei 25°C inkubiert. Das Enzym wurde bei einer anschließenden Erwärmung auf 75°C für 20 min. hitzeinaktiviert.

3.2.8.3 CIAP-Behandlung

Bei dem Restriktionsverdau eines Vektors entstehen kompatible Enden, die bei einer anschließenden Ligation mit sich selbst religieren können und somit den Anteil an Wunschklonen stark minimieren. Um dieses Problem zu verringern, kann der Vektor nach dem Verdau dephosphoryliert werden, d. h. die am 5'-Ende zurückbleibenden Phosphatreste, die für eine Ligation notwendig sind, werden abgespalten. Hierzu findet die *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* (CIAP) ihren Einsatz. Zu dem geschnittenen und eventuell mit Klenow aufgefüllten Vektor wurden je 1/10 des Endvolumens an Enzym und 10 x Dephosphorylierungspuffer gegeben und für 45 min bei 37°C inkubiert. Es schloss sich eine 10-minütige Hitzeinaktivierung bei 75°C an.

3.2.8.4 Ligation

DNA-Ligasen katalysieren die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-OH-Ende des einen DNA-Fragmentes und der 5'-Phosphatgruppe des anderen DNA-Stückes. Eine Ligation dient der Generierung neuer DNA-Konstrukte. Hierbei wird ein beliebiges entweder per PCR oder Restriktionsverdau hergestelltes Insert in einen durch enzymatische Spaltung

geöffneten Vektor eingebracht. Es kann zwischen einer „sticky“- und einer „blunt-end“-Ligation unterschieden werden. Von dem verdauten mit CIA-behandelten und wenn nötig mit Klenow-aufgefüllten Vektor wurden 10 µg/Ansatz in einem Gesamtvolumen von mindestens 10 µl eingesetzt. Das geschnittene Insert wurde in 3- bzw. 10-fachem molaren Überschuss zugegeben und bei „blunt-end“-Ligationen zuvor ebenfalls mit Klenow aufgefüllt. Die Ligation wurde in 1 x Ligationspuffer unter Zugaben von 200 U (bei „sticky-end“-) bzw. 400 U (bei „blunt-end“-Ligationen) T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) durchgeführt und über Nacht bei 16 °C inkubiert. Als Kontrollen wurden zusätzlich der unverdaute Vektor, der Vektor mit Ligase und der Vektor ohne Zugabe des Enzyms mitgeführt.

3.2.8.5 Transformation von Bakterien durch Elektroporation

Die Transformation von *E. coli* erfolgte gerade nach „blunt-end“-Ligationen über die sehr effiziente Methode der Elektroporation [147], bei der die Zellmembranen durch kurze elektrische Pulse hoher Feldstärke für DNA-Moleküle durchlässig gemacht werden.

Für diese Art der Transformation wurden 40 µl elektrokompente Bakterien auf Eis kurz aufgetaut, mit der vorbereiteten DNA (2 µl gefällter Ligationsansatz oder 5 – 10 ng Plasmid-DNA) vorsichtig vermischt und 2 min auf Eis inkubiert. Nach Überführung in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Invitrogen, d = 2 mm) erfolgte die Elektroporation unter folgenden Bedingungen im GenePulser (Biorad): Widerstand $R = 400 \Omega$, Kondensatorkapazität $C = 25 \mu\text{F}$ und Ausgangsspannung $U = 2,5 \text{ kV/cm}$. Die elektroporierten Zellen wurden sofort in 1 ml SOC-Medium überführt und bei 37°C zur Stabilisierung und zur Ausbildung der Plasmid-kodierten Antibiotikaresistenz 30 - 45 min im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz mit LB-Medium je nach erwarteter Kolonienzahl verdünnt und je 100 µl auf vorgewärmte Selektionsagar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.8.6 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien

Ein Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* (100µl) wurde in noch gefrorenem Zustand mit 2 – 5 µl Plasmid-DNA versetzt, gelegentlich gemischt und dabei für 30 – 60 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C, danach wurden die Zellen sofort auf Eis abgeschreckt und anschließend mit 900 µl LB-Medium (+ 20 mM Glucose) oder NZY-Medium versetzt und zur Expression der Antibiotikaresistenz für 30 - 60 min bei 37°C im Schüttelinkubator erwärmt. Je nach erwarteter Kolonienzahl wurden 100 µl unverdünnt, 1:10 verdünnt und eventuell der gesamte Rest (hierzu wurde die Suspension 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgegossen und die Zellen in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert) auf Selektionsagar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.9 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese wird über eine Reverse Transkription (RT) aus RNA ein komplementärer DNA-Strang (cDNA) erzeugt. Hierzu wird das Enzym Reverse Transkriptase verwendet, welches ebenso wie die DNA-Polymerase an einen kurzen doppelsträngigen Nukleotidstrang (hier aus DNA und RNA) bindet und den komplementären Gegenstrang zur RNA synthetisiert. Da sämtliche eukaryontische mRNA mit einem poly-A-Schwanz endet, kann hier ein 16-18 Nukleotide langes Oligo-dT-Stück als komplementäre DNA verwendet werden. Die RNA und Primer wurden in folgenden Volumina zusammen pipettiert und für zehn Minuten auf 70°C erhitzt, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen:

5 µg	Gesamt-RNA
1 µl	Oligo dT ₁₅ -Primer (0,5 mg/ml, Promega)
ad 12,6 µl	mit DEPC-Wasser

Die Proben wurden sofort für zwei Minuten auf Eis abgekühlt und mit einem zuvor hergestellten Mix aus nachstehenden Lösungen versetzt:

4 µl	5 x Superscript-Puffer
2 µl	0,1 M DTT
1 µl	10 mM Nukleotid-Mix
0,4 µl	RNase-Inhibitor (40 U/µl)

Nach einer zweiminütigen Vorinkubation auf 42°C wurde 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase (Invitrogen) zugegeben. Die gesamte Lösung wurde für weitere 35 Minuten auf 42°C erhitzt und danach mit 40 µl ddH₂O versetzt. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase folgte eine letzte Inkubation für fünf Minuten auf 90°C.

Zur Überprüfung der cDNA-Synthese und zur Kontrolle, ob eine Verunreinigung mit genomischer DNA vorliegt, wurde folgende PCR angeschlossen:

Reagenz	Volumen
10 x <i>Taq</i> -Polymerase-Puffer (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl, pH 8,4)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
dNTP-Mix (10 mM)	0,4 µl
Primer-Mix (enthält je 5 pmol/µl der beiden zusammengehörigen Primer)	1 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
ddH ₂ O	4,5 µl

Der Mix wurde auf Eis angesetzt. 0,2 – 5 µl der cDNA wurden ebenfalls auf Eis mit ddH₂O auf 10 µl aufgefüllt und mit dem Mix versetzt. Der Thermocycler wurde vor der Zugabe der Proben auf 94°C erhitzt und die PCR mit Zykluszeiten von 10 Sekunden sofort gestartet.

3.2.10 Atlas™ cDNA Expression Array

Zum Vergleich Anaphylatoxin-Rezeptor-vermittelter Regulationsvorgänge bietet sich der kommerziell erhältliche Atlas™ cDNA Expression Array der Firma Clontech/BD an. Auf mRNA-Ebene ist hier die Regulation von jeweils ~ 1200 Genen verschiedenster Gruppen, wie Zytokine, Oberflächenrezeptoren, Transkriptionsfaktoren und des Zellzyklus erfassbar.

Das Testverfahren besteht aus einem Southern-Dotblot, wobei die zur Detektion verwendeten cDNA-Fragmente (200 – 600 bp) auf Nylonmembranen fixiert sind. Zur Hybridisierung werden ³²P-markierte Sonden (cDNA) eingesetzt.

Die Sonden werden durch Reverse Transkription aus hochreiner RNA hergestellt, wobei ein spezielles, auf die Gene der Array-Membran abgestimmtes Primergemisch verwendet wird.

Das Atlas cDNA Expression Array stellt also eine Methode dar, mittels der transkriptionelle Regulationsvorgänge (und andere Regulationsvorgänge auf mRNA-Ebene) auf breiter Ebene zu erfassen sind. Im Gegensatz hierzu bietet die *real-time* Quantitative RT-PCR die Möglichkeit, gezielt die Veränderung des Expressionsmusters einzelner Gene zu betrachten

Die BD Atlas™ cDNA Expression Arrays wurden weitestgehend nach Herstellerangaben (Clontech) durchgeführt.

Es wurden je Probe 4 µg gesamt RNA mit 1 µl des Membran-spezifischen Primergemisches unter Verwendung der Superscript II Reversen Transkriptase (Invitrogen) in ³²P-markierte cDNA umgeschrieben. Die so erhaltenen cDNAs wurden unter Verwendung des Atlas™ NucleoSpin Extraction Kits (Clontech) von der freien Radioaktivität abgetrennt und im Szintillationszähler im Kanal für ³H gemessen und bei ausreichender Aktivität (mindestens 1 x 10⁶ cpm pro Probe) für die Hybridisierung eingesetzt.

Die Hybridisierung und das anschließende Waschen der Membranen erfolgten nach Herstellerangaben.

Die Atlas Array Membranen wurden zuerst über Nacht auf Phosphoimaging-Platten exponiert und anschließend die Platten mit einem Phosphoimager ausgelesen. Anhand der Signalstärke wurde entschieden, wie lange die eigentliche Exposition andauern musste (wenige Tage bis zu mehreren Wochen). Die nach dem endgültigen Auslesen digitalisiert vorliegende Signalstärke der einzelnen Gene (Membran-Punkte) wurde zuerst über die Intensität der auf den Membranen befindlichen Haushaltsgene normalisiert. Unter Zuhilfenahme der Array-Vision-Software wurde daraufhin die Signalintensität der ~ 1200 Gene, die sich auf einer Membran befinden, ausgewertet. Wiederum Computer-gestützt (Excel) wurden die Regulationsfaktoren zwischen den verschiedenen Proben für jedes einzelne Gen berechnet. Die so aufgezeigten Regulationen wurden zusätzlich visuell auf mögliche falsch-positive Ergebnisse durch Kontaminationen oder Artefakte auf den Membranen bzw. überstrahlende Radioaktivität von Nachbarpunkten kontrolliert.

Berechnung der Regulationsfaktoren bzw. Kriterien wann ein Gen als reguliert gilt

1. Die Signalintensität muss für jedes Gen größer als die Intensität des zugehörigen Hintergrundsignals sein.
2. Die Intensität des Messsignals mindestens einer der zu vergleichenden Proben muss 40 % über dem zugehörigen Hintergrundsignal liegen.
3. Die Intensität eines jeden Gens wird aus vielen Einzelsignalen berechnet, die proportional zur hybridisierten cDNA-Menge sind. Die Signalverteilung muss hierbei homogen sein, d. h. die Standardabweichung darf einen bestimmten Wert (500) nicht überschreiten.
4. Weiterhin muss das Signal-Rausch-Verhältnis (Wert wird von der Array-Vision-Software berechnet) für mindestens eine der zu vergleichenden Proben $> 0,2$ sein.
5. Die auf die Gesamtintensität des Arrays korrigierte Signalintensität einer Probe muss um mindestens 10 größer sein, als die der zu vergleichenden Probe (Absolutwerte).
6. Sind all diese Kriterien erfüllt, so muss sich ein Faktor $> 1,94$ bzw. $< - 1,94$ ergeben, damit ein Gen tatsächlich als reguliert gilt.

Es besteht die Möglichkeit die Nylon-Membranen der Atlas Arrays zu „Strippen“. Als „Strippen“ bezeichnet man das Entfernen der auf dem Array befindlichen radioaktiv markierten Proben, so dass die Membranen für ein weiteres Array-Experiment verwendet werden können. Die Prozedur wurde laut Herstellerangaben durchgeführt und die Membranen einmal wieder verwendet.

3.2.11 Real-time Quantitative PCR

Die *real-time* Quantitative PCR stellt eine geeignete Methode zur Untersuchung von Expressionskinetiken auf mRNA-Ebene dar.

Während der gesamten PCR wird die Menge an gebildetem Produkt über die Messung der Zunahme des Fluoreszenzsignals detektiert. Als Fluoreszenzfarbstoffe können z. B. so genannte TaqMan-Sonden oder interkalierende Heterozyklen eingesetzt werden. Bei den TaqMan-Sonden handelt es sich um Oligonukleotide, die sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende an Fluorophore gekoppelt sind. Ist die TaqMan-Sonde intakt, so befinden sich die beiden Fluorophore in räumlicher Nähe, wobei das eine als Donor beim Fluoreszenz Resonanzenergie Transfer (FRET) und das andere als Akzeptor fungiert. Die Fluoreszenz wird am Maximum des Donors aufgezeichnet, das heißt, solange der Energie-Transfer stattfindet und die Fluoreszenz „gequencht“ wird, ist das Signal minimal. Wird die Sonde während der Extension durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der *Taq*-DNA-Polymerase abgebaut, so nimmt das Fluoreszenzsignal der gebildeten Template-Menge entsprechend zu [148]. Interkalierende Farbstoffe wie Ethidiumbromid oder das innovative SYBR[®] Green, welches ein wesentlich besseres Signal-Rausch-Verhältnis liefert, werden unspezifisch in

doppelsträngige DNA eingelagert, wodurch es zu einer starken Erhöhung der Quantenausbeute kommt [149].

Die Quantifizierung erfolgt nicht über die Messung der absoluten Mengen an PCR-Produkt. Stattdessen nutzt man die Kinetik der PCR-Reaktion aus: In den frühen PCR-Runden findet eine weitgehend exponentielle Vermehrung der DNA-Fragmente statt. Akkumuliert das Produkt, so steigen auch die störenden Einflüsse. Der Prozess verlangsamt sich zu einem linearen Wachstum und kommt dann gar zum Stillstand. Zeichnet man das Fluoreszenzsignal gegen die Zyklenzahl auf, so erhält man einen Amplifikations-Plot. Die ABI Prism 7000 SDS Software (Copyright Applied Biosystems) analysiert diesen Plot und bestimmt den Zyklus der PCR, in dem die Fluoreszenz der Probe erstmals signifikant über einen bestimmten Schwellenwert hinaus ansteigt, dieser Wert wird als *Threshold Cycle* (C_T) bezeichnet. Der Schwellenwert ist als der Mittelwert des Fluoreszenzsignals der ersten Zyklen plus zehn Standardabweichungen definiert. Bei dem C_T -Wert handelt es sich um einen quantitativen Wert, je größer die Menge an anfänglich eingesetztem Template ist, desto früher steigt die Fluoreszenz über das Hintergrundrauschen hinaus, dies entspricht einem kleineren C_T -Wert.

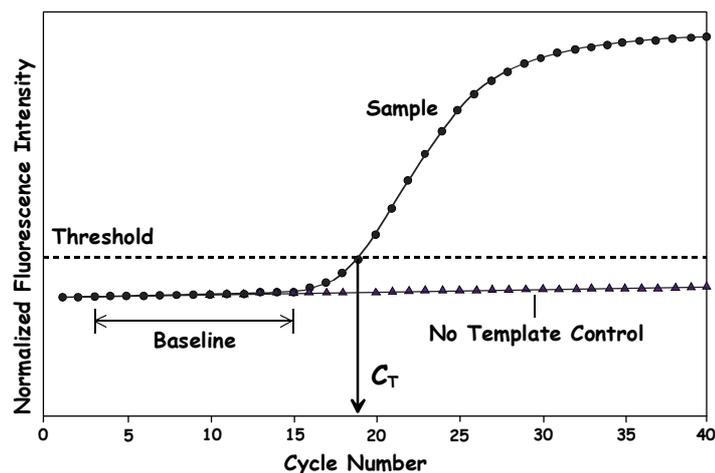


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Ergebnisses einer Fluoreszenz-Messung während einer real-time PCR. Aufgetragen ist die Zyklenzahl der PCR (Cycle Number) gegen die normalisierte Fluoreszenz-Intensität (Normalized Fluorescence Intensity) für eine Probe (Sample) und eine Negativ-Kontrolle ohne cDNA (No Template Control, NTC). Der C_T -Wert, die Zyklenzahl bei der das Fluoreszenzsignal der Probe aus dem Hintergrund (Threshold) heraustritt, wurde hier durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Eine Probe, welche bekannte Mengen an Template enthält, wird zur Erzeugung einer Standard-Kurve herangezogen werden. Den C_T -Werten kann damit die entsprechende Konzentration zugeordnet werden. Trägt man die C_T -Werte gegen den Logarithmus der Template-Konzentrationen auf, so erhält man eine Gerade. Mittels der Gradengleichung lässt sich für jeden beliebigen C_T -Wert die zugehörige Konzentration berechnen.

Hierzu musste die Gesamt-RNA wie unter 3.2.16.1 erläutert in cDNA umgeschrieben werden, um anschließend in einem speziellen Thermocycler der Firma Applied Biosystems (ABI Prism 7000) amplifiziert zu werden. Das Fluoreszenzsignal, welches die Menge an

gebildetem Template widerspiegelt, wird mit dem angeschlossenen ABI Prism 7000 Sequence Detektion System aufgezeichnet.

Bei Verwendung von SYBR[®] Green wird zusätzlich eine Schmelzkurve aufgezeichnet, anhand derer kontrolliert werden kann, ob tatsächlich nur ein spezifisches Produkt gebildet wurde. Die am häufigsten auftretenden unerwünschten Produkte entstehen bei der Amplifikation von sich teilweise überlappenden Primerteilstücken. Diese weisen jedoch einen niedrigeren Schmelzpunkt als die spezifischen Produkte auf und können in der Schmelzkurve identifiziert werden.

Generierung und Austestung der real-time PCR-Primer und Sonden

Die für die *real-time* quantitative PCR verwendeten Primer müssen einige spezielle Kriterien erfüllen:

- Sie sollten etwa zwischen 17 und 24 Nukleotide lang sein.
- Das Annealing sollte bei einer einheitlichen Temperatur stattfinden (60°C).
- Der von ihnen eingeschlossene Template-Bereich sollte zwischen 90 und 150 Bp lang sein.
- Der zu amplifizierende Bereich sollte eher am 3'-Ende des Gens liegen, um sicher zu sein, dass er während der Reversen Transkription in cDNA umgeschrieben wurde.
- Der zu amplifizierende Bereich sollte sich nach Möglichkeit über eine Intron-Exon-Grenze erstrecken, so dass ein Amplifikat aus genomischer DNA eine andere Länge aufweist als das gewünschte cDNA-Produkt.

Ebenso müssen die TaqMan-Sonden nach ganz speziellen Vorgaben designed werden:

- Die Schmelztemperatur sollte bei 70°C liegen (10°C über den Primern).
- Es dürfen maximal drei gleiche aufeinander folgende Nukleotide vorkommen.
- Die Sonde darf maximal 30 bp lang sein.
- Der Abstand zum Sense-Primer darf nicht größer als 50 bp sein.
- Am 5'-Ende darf kein G vorkommen (Quenching).

Zunächst wird in einer Standard-PCR überprüft, ob die Primer bei der gewünschten Annealing-Temperatur verwendbar sind und dabei keine weiteren unerwünschten Produkte entstehen. Daraufhin wird das Primerverhältnis gesucht, bei dem die Differenz der C_T -Werte mit und ohne Template möglichst groß ist, das heißt der ΔC_T -Wert. Bei ungünstigen Primerverhältnissen wird das Genstück wesentlich schlechter amplifiziert, und es können sogar unerwünschte Nebenprodukte aus Primerselbstamplifikation entstehen.

Die so genannte Primer-Matrix wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Von der nach folgendem Pipettierschema (Tabelle 1) erstellten Probe wurden in Doppelansätzen von je 25 µl eines Oligonukleotidgemisches mit angegebenem Verhältnis pro Ansatz mit 25 µl SYBR[®] Green PCR Mastermix (Applied Biosystems) versetzt und in einem *real-time* PCR-Lauf analysiert.

Primer-Verhältnis (3' : 5'-Primer)	Template-Menge (1:100 von 10 ng/μl)	5'-Primer (5 pmol/μl)	3'-Primer (5 pmol/μl)	ddH ₂ O
50 : 50 K	—	1,25 μl	1,25 μl	60 μl
50 : 50	2,5 μl	1,25 μl	1,25 μl	57,5 μl
50 : 300 K	—	1,25 μl	7,5 μl	53,75 μl
50 : 300	2,5 μl	1,25 μl	7,5 μl	51,25 μl
50 : 900 K	—	1,25 μl	22,5 μl	38,75 μl
50 : 900	2,5 μl	1,25 μl	22,5 μl	36,25 μl
300 : 50 K	—	7,5 μl	1,25 μl	53,75 μl
300 : 50	2,5 μl	7,5 μl	1,25 μl	51,25 μl
300 : 300 K	—	7,5 μl	7,5 μl	47,5 μl
300 : 300	2,5 μl	7,5 μl	7,5 μl	45 μl
300 : 900 K	—	7,5 μl	22,5 μl	32,5 μl
300 : 900	2,5 μl	7,5 μl	22,5 μl	30 μl
900 : 50 K	—	22,5 μl	1,25 μl	38,75 μl
900 : 50	2,5 μl	22,5 μl	1,25 μl	36,25 μl
900 : 300 K	—	22,5 μl	7,5 μl	32,5 μl
900 : 300	2,5 μl	22,5 μl	7,5 μl	30 μl
900 : 900 K	—	22,5 μl	22,5 μl	17,5 μl
900 : 900	2,5 μl	22,5 μl	22,5 μl	15 μl

Tabelle 1: Pipettierschema für die Aufstellung der Primer-Matrix. In der ersten Spalte sind die unterschiedlichen Primer-Verhältnisse in fmol/Ansatz aufgeführt. Das K bedeutet, dass der Probe kein Template zugefügt wurde. Die Konzentrationsangaben der Primer beziehen sich auf die verwendete Vorverdünnung.

Messung der zu untersuchenden Gene

Für den eigentlichen Testlauf werden 0,5 oder 1 μl der zu untersuchenden cDNA auf 5 μl mit Ampuwa aufgefüllt, in spezielle *MicroAmp Optical Tubes* überführt und mit 20 μl des zugehörigen PCR-Mixes versetzt. Im Ergebnisteil ist an entsprechender Stelle angegeben welche Primer, Sonden und Kits im Einzelnen (nach Herstellerangaben) verwendet wurden. Für jedes Gen wird eine Standardreihe mitgeführt. Ein Mix aus sämtlichen zu testenden cDNAs wird hergestellt und im Folgenden als Test-cDNA bezeichnet. Von dieser Test-cDNA werden im Normalfall (Abweichungen sind im Ergebnisteil angegeben) 3,16; 1; 0,316; 0,1 und 0,0316 μl ebenfalls auf 5 μl mit Ampuwa aufgefüllt, in die speziellen Reaktionsgefäße überführt und mit 20 μl des PCR-Mixes versehen. Es ist zu beachten, dass für jedes Gen eine Normalisierung mit einem Haushaltsgen durchgeführt werden muss (siehe unten). Die *real-time* Quantitative PCR wird gestartet und mittels der ABI Prism 7000 SDS Software analysiert. Von den ermittelten C_T-Werten werden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Für die eigentliche Auswertung werden pragmatisch die C_T-Werte eingesetzt, bei denen die Summe der Standardabweichungen am geringsten ist.

Anhand einer Gradengleichung bei der der Logarithmus der C_T -Werte gegen die Konzentration der als Standardreihe mitgeführten Test-cDNA aufgetragen ist, kann für jede einzelne Probe aus dem C_T -Wert die Konzentration bestimmt werden.

Berechnung der Regulationsfaktoren

Die Berechnung der Regulationsfaktoren, welche die Unterschiede der Expressionsstärke der zu untersuchenden Gene widerspiegeln, ist im Folgenden beschrieben:

Zuerst wird ein Korrekturfaktor berechnet, der eventuelle Konzentrations-Schwankungen der eingesetzten RNA beschreibt. Hierzu wird die Konzentration an „Haushaltsgen“ (im Ergebnisteil ist an entsprechender Stelle angegeben welches Haushaltsgen Verwendung fand), des zu jedem Stimulationswert gehörigen Bezugswertes (bei Kinetiken werden die Zellen zu jedem Zeitpunkt mit PBS anstelle des verwendeten Stimulans behandelt) gleich eins gesetzt. Die Konzentrationen der einzelnen Werte werden nun ins Verhältnis zu den entsprechenden Bezugswerten gesetzt. Die Konzentrationen des eigentlich zu testenden Gens werden nun mit den erhaltenen Korrekturwerten multipliziert. Anschließend werden die berechneten Bezugswerte wiederum gleich eins und die Probenwerte hierzu ins Verhältnis gesetzt. Ist der so berechnete Faktor $>$ bzw. $= 1$, so entspricht er selbst dem Regulationsfaktor. Ist er hingegen < 1 , so ergibt sich der Regulationsfaktor zu dessen negativem Kehrwert.

3.2.12 Transiente Transfektion von humanen Zelllinien

Das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryote Zellen wird als Transfektion bezeichnet und kann über verschiedene Methoden (Calciumphosphat-, die DEAE-Dextran-, die Liposomen-Technik sowie die Elektroporation von Zellen) erfolgen. Es wird zwischen der transienten Transfektion, bei der ein Plasmid vorübergehend in die Zelle eingeschleust wird und der stabilen Transfektion, bei der die DNA dauerhaft in das Genom der Zielzelle integriert wird, unterschieden. In dieser Arbeit wurden ausschließlich transiente Transfektionen durchgeführt, stabile Zelllinien wurde unter Zuhilfenahme des retroviralen Systems wie unter 3.3 beschrieben hergestellt.

Die Wahl der Transfektions-Methode ist in erster Linie abhängig von der verwendeten Zelllinie. So lassen sich HMC-1-Zellen am besten mit der EffecteneTM-Methode transfizieren, wohingegen sich HEK293-Zellen besser nach der LipofectamineTM- oder Calciumphosphat-Methode transfizieren lassen. Hierbei ist zu beachten, dass LipofectamineTM toxisch sein kann und z. B. bei FACS-Analysen falsch-positive Signale liefern kann. Die Calciumphosphat-Methode bietet den eindeutigen Vorteil, dass sie am billigsten ist, da sämtliche Lösungen selbst hergestellt werden können, man hat jedoch mit höheren Schwankungen der Transfektionseffizienz zu rechnen.

Die Effizienz der transienten Transfektionen wurde mittels des β -Galaktosidase-Assays gemessen.

3.2.12.1 Transiente Transfektion nach der LipofectamineTM-Methode

Bei der LipofectamineTM-Methode handelt es sich um eine Liposomen-vermittelte Transfektions-Methode, welche auf der Interaktion zwischen negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA-Moleküle (hier Plasmiden) und der positiven Oberfläche von Liposomen beruht. Die Liposomen setzen sich hierbei aus kationischen und neutralen Lipiden zusammen. Der Weg auf dem die DNA anschließend in die Zelle gelangt, ist unklar: Wahrscheinlich interagieren die restlichen, freien positiven Ladungen auf den Liposomen mit Sialinsäureresten der Zelloberflächen und bringen so die DNA an die Zelle heran. Die Aufnahme der DNA in die Zelle erfolgt daraufhin durch Endozytose oder durch das Verschmelzen der Liposomen mit der Zellmembran.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich HEK293-Zellen mit dem LipofectamineTM-Reagenz der Firma Invitrogen transfiziert. Das folgende Protokoll bezieht sich auf eine mittlere Zellkulturflasche mit einer Wachstumsfläche von 75 cm². Falls in einem anderen Maßstab transfiziert wurde, so wurden sämtliche Volumina entsprechend der veränderten Wachstumsfläche umgerechnet. Am Vortag der Transfektion wurden 4*10⁶ Zellen ausgesät. Am nächsten morgen wurden in einem ersten Reaktionsgefäß 6 µg DNA auf 600 µl mit Optimem (bei Verwendung des Lipofectamine-Reagenz muss auf den Zusatz von Penicillin/Streptomycin verzichtet werden) aufgefüllt und gut durchmischt. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurde eine Lösung aus 36 µl Lipofectamine und 564 µl Optimem (Invitrogen) erstellt, ebenfalls gut durchmischt und vorsichtig auf den Untergrund geklopft, so dass sich die beiden Lösungen bei der tropfenweisen Zugabe der DNA-Lösung vermischen. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei RT. Kurz vor dem Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und daraufhin tropfenweise mit dem DNA/Lipofectamine-Gemisch versetzt, dem zuvor noch 4,8 ml Optimem zugefügt worden sind. Nach einer fünfstündigen Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ erfolgte eine Zugabe von 10 ml Medium mit 20 % FCS. 18 – 24 Stunden nach dem Transfektions-Start wurde das Medium komplett abgenommen und gegen 18 ml frisches Medium mit 10 % FCS und Penicillin/Streptomycin ausgetauscht.

Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ belassen.

3.2.12.2 Transiente Transfektion nach der EffecteneTM-Methode

Bei der EffecteneTM-Methode handelt es sich ebenfalls um eine Liposomen-vermittelte Transfektions-Methode (siehe oben). In dieser Arbeit wurde ausschließlich die Suspensionszelllinie HMC-1 nach der EffecteneTM-Methode unter Verwendung des *EffecteneTM Transfection Reagent Kits* der Firma Qiagen transfiziert. Hierzu wurden die Zellen 10 min bei 1000 rpm sedimentiert, der Überstand vollständig entfernt (das Fetale Kälberserum stört die Transfektion), 1 x mit PBS gewaschen, wiederum zentrifugiert und die Zellen in einer Dichte von 1 x 10⁶/well einer 6-well-Platte in 1,6 ml Optimem (Invitrogen) aufgenommen. Da die

Vektoren nicht steril präpariert worden sind, wurde dem Optimem Penicillin/Streptomycin zugesetzt.

Sämtliche Plasmide wurden auf eine Konzentration von 100 ng/µl verdünnt und im Gel überprüft. Pro Ansatz wurde 1 µg DNA (10 µl) mit Puffer EC auf 100 µl aufgefüllt. Zuerst wurden 3,2 µl Enhancer zu jeder Probe pipettiert, gevortext und für 5 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurde jeder Ansatz mit 5 µl Effectene versetzt, gevortext und für 10 – 15 min bei RT belassen. Es folgte eine Zugabe von 600 µl Optimem, der Ansatz wurde mit der Pipette durch einmaliges hoch- und runterziehen vorsichtig gemischt und tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nachdem die Platten geschwenkt wurden, wurden sie bis zur weiteren Verarbeitung bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.2.12.3 Transiente Transfektion nach der Calciumphosphat-Methode

Bei der Calciumphosphat-Methode wird die DNA mit Calciumchlorid und einer phosphathaltigen Pufferlösung vermischt. Dabei bilden sich feine DNA-Calciumphosphat-Kristalle, die sich, wenn sie mit Zellen in Kontakt kommen, auf der Zelloberfläche niederschlagen. Die eigentliche Einschleusung der DNA findet daraufhin über einen Endozytoseprozeß statt.

Die transiente Transfektion nach der Calciumphosphat-Methode wurde entweder unter Verwendung des CaPHOS-Kits der Firma Sigma oder des ProFection® Mammalien Transfektion System-Kits der Firma Promega nach Herstellerangaben durchgeführt oder mit eigens hergestellten Reagenzien nach folgendem Protokoll:

Sämtliche Angaben beziehen sich auf ein 6-well mit einer Wachstumsfläche von 9,6 cm². Bei Transfektionen in einem anderen Maßstab wurden sämtliche Volumina entsprechend der veränderten Wachstumsfläche umgerechnet, die optimale DNA-Menge wurde in Vorversuchen ermittelt.

Am Vortag der Transfektion wurden $2,7 \cdot 10^5$ Zellen/well (HEK293 oder HeLaT) bzw. 2 Tage vor der Transfektion ebenso viele 293GPG-Zellen in einer 6-well-Platte ausgesät.

Drei Stunden vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel (1,6 ml/well). Alle Puffer und Lösungen wurden auf RT erwärmt und gut gemischt. Pro Transfektions-Ansatz werden zwei Reaktionsgefäße benötigt:

- In das erste Reaktionsgefäß wurde insgesamt 7 – 10 µg DNA pipettiert (10 – 13 µg bei kleinen Flaschen) mit low TE-Puffer auf 132 µl aufgefüllt und gut gemischt. Zusätzlich wurden 19,2 µl 2 M CaCl₂-Lösung zugefügt und wiederum gut gemischt.
- In das zweite Reaktionsgefäß wurden pro Transfektion 151,2 µl 2 x HBS überführt.

Der Vortexer wurde nun so eingestellt, dass keine Lösung aus einem geöffneten Reaktionsgefäß beim vortexen herausspritzt. Die 2 x HBS-Lösung wurde gevortext und dabei tropfenweise die zuvor hergestellte DNA/CaCl₂-Lösung zugefügt. Nach vollständiger Zugabe der DNA waren feine Calciumphosphat-Präzipitate in der Lösung zu sehen. Es folgte eine 30-minütige Inkubationsphase. Bevor die Transfektions-Lösung tropfenweise auf die Zellen

gegeben wurde, wurde sie noch einmal bei geringer Stärke gevortext. Nach Möglichkeit sollte die Platte während der Zugabe der Transfektions-Lösung geschwenkt werden. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂. Nach ca. 20 h bei HEK293- und HeLaT-Zellen bzw. ca. 12 – 16 h bei 293GPG-Zellen wurde das Medium abgenommen und gegen 3,5 ml frisches ersetzt. Die Zellen wurden bis zur Weiterverarbeitung im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ gehalten.

3.2.12.4 Überprüfung der Transfektionseffizienz mittels β -Galaktosidase-Assay

Das *lacZ*-Gen aus *Escherichia coli* codiert ein Enzym, die β -Galaktosidase, welches die hydrolytische Spaltung von β -Galaktosiden in β -Galaktose und einen Rest katalysiert. So kann nach einer Transfektion überprüft werden, ob die Zellen β -Galaktosidase exprimieren und somit die Transfektion erfolgreich war. Als Reportermolekül wurde hier das x-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranose) verwendet, welches durch β -Galaktosidase in β -Galaktose und den tiefblauen Farbstoff 5-Bromo-4-chloro-indigo gespalten wird.

Für die Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden Zellen mit dem Plasmid pcDNA3.1-HisLacZ transient transfiziert. Um den Zellen Zeit zu geben, β -Galaktosidase zu exprimieren, erfolgte der Nachweis des entsprechenden Farbstoffs erst drei Tage nach der Transfektion. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit PBS-Glutaraldehyd für 10 min fixiert und nach anschließendem zweimaligem Waschen mit PBS mit der Substrat-Färbelösung bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Eine Blaufärbung der Zellen setzte nach 30 min bis zu mehreren Stunden ein, wobei in der Regel nach 24 h keine Änderung der Blaufärbung mehr auftrat.

Die Effizienz der (transienten) Transfektion entspricht dem Anteil der blau-gefärbten Zellen an der Gesamtheit der Zellen.

3.2.13 Reportergen-Assay

In dieser Arbeit sollte die Promotoraktivität unterschiedlich langer Fragmente aus der 5'-flankierenden Region des C3aR untersucht werden. Die Aktivität der verschiedenen Konstrukte wurde in einem so genannten Reportergen-Assay vermessen. Sämtliche zu untersuchende Konstrukte lagen schon in dem pSEAP2-E-Vektor der Firma Clontech vor oder wurden neu in diesen inkloniert. Der Vektor codiert das Enzym sezernierte alkalische Phosphatase (SEAP), welches von dem CSPDTM-Substrat einen chemilumineszierenden Stoff abspaltet, so dass die Promotoraktivität anhand der Signalstärke ermittelt werden kann.

3.2.13.1 SEAP-Test

Die SEAP-Aktivität der verschiedenen Promotor-Konstrukte wurde nach transients Transfektion unter Einsatz des *Great EscAPETM SEAP Chemiluminescence Detektion Kits* (BD Biosciences) bestimmt. Waren HMC-1-Zellen im 6-well-Maßstab wie unter 3.2.12.2 beschrieben, transfiziert worden, so wurde 2 x 1 ml der Zellsuspension bei 6500 rpm und 4°C

für 3 min abzentrifugiert. 100 µl des so erhaltenen Zellüberstandes wurden für den SEAP-Assay abgenommen. Die pelletierten Zellen wurden für den β-Galaktosidase-Assay eingesetzt. Bei den adhärent wachsenden HeLaT-Zellen wurde 1 ml des Überstandes abgenommen und von eventuell vorhandenen Zellen durch Zentrifugation (3 min, 6500 rpm, 4 °C) befreit. In Doppelwerten wurden je 10 µl des abzentrifugierten Zellüberstandes auf eine 96-*well*-Platte (Canberra Packard Opti Plate 96) gegeben, mit 30 µl 1 x Dilutionspuffer vermischt und nach dem Verschließen mit einer speziellen Klebefolie (Packard) für 30 min bei 65°C zur Inaktivierung endogener alkalischer Phosphatasen inkubiert. Nach Abkühlen der Proben auf RT wurde 40 µl/*well* Assay-Puffer (RT) zugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde zu jeder Probe 40 µl des 1,25 mM CSPD-Substrates (1:20 mit Chemiluminescent Enhancer verdünnt) gegeben und 15 min bei RT inkubiert. Die Messung der Chemilumineszenz erfolgte im TopCount β-Counter (Canberra-Packard).

3.2.13.2 β-Gal-Assay

Zum Ausgleich schwankender Transfektionseffizienzen wurde bei der Transfektion von pSEAP2-E-Konstrukten stets das Plasmid pCMV-β, welches für das Enzym β-Galaktosidase codiert, kotransfiziert. Die Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität erfolgte unter Verwendung des *High Sensitivity β-Galactosidase Assay Kits* der Firma Stratagene, wobei die β-Galaktosidase das gelb-orange CRPG-Substrat in Galactose und das tiefrote Chromophor Chlorophenol Red umsetzt, so daß die zuvor erhaltenen SEAP-Intensitäten mit diesen Werten normalisiert werden können.

Das Zellpellet aus 2 ml der transfizierten Zellen wurde in 85 µl Lysepuffer aufgenommen und für 30 min bei -20°C gefroren. Nach dem Auftauen wurden die Proben gemischt und die festen Zellbestandteile bei 15000 x g für 3 min abzentrifugiert. Je 20 µl der Proben wurden in Doppelwerten auf eine 96-*well*-Mikrotiterplatte (Greiner) gegeben und mit 60 µl der 1:25 in Puffer A verdünnten CPRG-Stammlösung vermischt. Bei 37°C erfolgte eine Inkubation der Platte bis zur Orange-Rot-Färbung der Proben (5 min bis 5 h). Die photometrische Bestimmung erfolgte im Mikrotiterplatten-Photometer Multiskan MCC/340 MK II (Titertek, Flow Laboratories) bei 595 nm.

3.2.14 Limulus-Amebocyte-Lysate-Test

Sämtliche Chemikalien, Medien und Lösungen, die in Versuchen verwendet wurden, bei denen Kontroll-Werte mit LPS-stimulierten Werten verglichen werden sollten, wurden nach Herstellerangaben von Frau Gerda Bartling im Endochrom™ Test der Firma Charles River Laboratories auf eventuelle Verunreinigungen mit Pyrogenen getestet.

3.2.15 Kompetitive ^{125}I -C3a/C5a-Bindungsstudien

Zur Untersuchung der Expression des C3aR bzw. C5aR auf verschiedenen Zelllinien wurden kompetitive Bindungsstudien mit ^{125}I -gelabeltem C3a bzw. C5a (NEN) durchgeführt. Das Prinzip der Methode stellt die kompetitive Verdrängung dar, so wird zuerst ein radioaktiv-markierter Ligand an den entsprechenden Rezeptor gebunden, der durch Zugabe von steigenden Konzentrationen des selben nicht-radioaktiv markierten (kaltem) Liganden verdrängt wird.

Folgende Vorarbeiten konnten im S1-Labor durchgeführt werden:

1. Zuerst wurde eine Verdünnungsreihe an kaltem C3a/C5a, ab einer Endkonzentration von 500 nM auf Eis erstellt (die Zwischenverdünnungen wurden bei jedem Experiment individuell ermittelt), wobei das HAG-CM in die Reaktionsgefäße vorgelegt war und die C3a/C5a-Stock-Lösungen nur mit silikonisierten Spitzen pipettiert wurden. Von jeder Konzentration wurden in Doppel-, Dreifach- oder Vierfachwerten je 20 μl C3a bzw. 10 μl C5a auf eine normale 96-well-Platte aufgetragen. Falls eine neue Zelllinie auf Rezeptorexpression überprüft werden soll, so muß stets eine Rezeptor-tragenden Zelllinie (wie HMC-1) als Positivkontrolle mitgeführt werden. Als Negativkontrolle wird stets der HAG-CM-Puffer verwendet. Die Platte wurde bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert.

2. Vorbereitung der Zellen:

Suspensionszellen wurden resuspendiert, abzentrifugiert (10 min, 1000 rpm, RT), 1 x mit 10 ml PBS gewaschen (Aliquot zum Zählen abnehmen) und wieder runterzentrifugiert.

Adhärente Zellen wurden mit CDS abgelöst (nicht Trypsin/EDTA), in 10 ml PBS aufgenommen (Aliquot zum Zählen abnehmen) und erneut sedimentiert.

Zum Schluss wurden alle Zellen in entsprechender Menge HAG-CM resuspendiert, so dass eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml resultierte. Bis zur Weiterverwendung wurden die Zellen auf Eis gelagert.

Ab dieser Stelle mussten die weiteren Arbeiten im radioaktiven Kontrollbereich durchgeführt werden, wobei stets eine Bleischürze zu tragen war und sämtliche radioaktive Lösungen in Bleigefäßen aufbewahrt wurden.

3. Als erstes wurde die Radioaktivität so eingestellt, daß in 20 μl ca. 20.000 cpm enthalten sind: Die ^{125}I -C3a/C5a-Stock-Lösung wurde aus dem Gefrierfach geholt und 1 - 2 Aliquots mit der Pinzette zum Auftauen in eine Bleikiste überführt, die restliche Stock-Lösung wurde sofort wieder eingefroren. Ein großes Plastikröhrchen wurde an der Markierung abgeschnitten und mit 2,2 ml/Platte HAG-CM befüllt. Anschließend wurde eine entsprechende Menge der ^{125}I -C3a/C5a-Stock-Lösung zu dem vorbereiteten HAG-CM gegeben, das Röhrchen gut verschlossen und gevortext. Bei Verwendung von ^{125}I -C3a wurden 20 μl und bei ^{125}I -C5a 10 μl in ein kleines Reaktionsgefäß überführt und im Cobra II Auto Gamma-Meßgerät (Canberra Packard) die cpm bestimmt. Es wurde solange Stock-Lösung zugefügt, bis die cpm tatsächlich bei 20.000 ± 1.000 lagen.

4. Zugabe des radioaktiv-markierten Liganden zum Kalten:

Die Platte mit der Verdünnungsreihe an kaltem C3a/C5a wurde hinter der Bleiabschirmung plaziert und mit der Multipette von der niedrigsten Konzentration beginnend, 20 μl ^{125}I -C3a bzw. 10 μl ^{125}I -C5a pro *well* pipettiert.

5. Zugabe der Zellen:

Nachdem die Zellen resuspendiert waren, wurden 25 $\mu\text{l}/\text{well}$ (bei C3a) bzw. 30 $\mu\text{l}/\text{well}$ (bei C5a) in die 96-*well*-Platte auf die entsprechenden Proben gegeben. Es folgte eine Inkubation der Zellen für eine Stunde (bei C3a) bzw. 30 Minuten (bei C5a) auf Eis in einer Bleibox.

6. Vorbereitung der Vakuumpumpe:

Unter die Metallabdeckung der Vakuumpumpe wurde eine "normale" 96-*well*-Platte zum Auffangen der radioaktiven Flüssigkeit gestellt. Die Filter der auf der Metallabdeckung befindlichen MultiScreen-Platte (0,45 μm Durapore-Membran, Millipore) wurden mit 50 $\mu\text{l}/\text{well}$ HAG-CM befeuchtet und die Vakuumpumpe zum Durchsaugen der Flüssigkeit angeschaltet.

7. Zugabe der Zellen auf die Filter:

Zum Resuspendieren der Zellen wurden diese mit der Mehrkanalpipette mehrfach hoch- und runtergezogen, danach wurden 50 $\mu\text{l}/\text{well}$ (bei C3a) bzw. 40 $\mu\text{l}/\text{well}$ (bei C5a) der Zellsuspension auf die Filter pipettiert, wobei die Zellen mit gebundenem C3a/C5a am Filter haften blieben, wohingegen freier Ligand beim Waschen weggespült wurde.

Anschließend wurde die Membran zweimal mit je 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ HAG-CM gewaschen.

8. Filter trocknen und Messung:

Nachdem sämtliche Flüssigkeit durch den Filter gesogen war, wurde die Vakuumpumpe ausgeschaltet, die MultiScreen-Platte auf ein Papiertuch gestellt und die untere Plastikplatte abgelöst. Die Membran wurde mit einem Papiertuch abgetupft und unter dem Abzug mit Hilfe einer Rotlichtlampe getrocknet. Zuletzt wurde die Filter-Platte in die zugehörige Bodenplatte gesteckt, mit 50/*well* Microscint O (Canberra Packard) versetzt, mit einem *Plate-Sealer* abgedeckt und im TopCount β -Counter (Canberra Packard) im Programm ^{125}I -Microscint gemessen.

3.2.16 RNA-Arbeiten

Bei Arbeiten mit RNA müssen besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden, da es sehr leicht zu einer Kontamination mit ubiquitären vorhandenen Ribonukleasen (RNasen) kommen kann, die in sehr kurzer Zeit sämtliche freie RNA abgebaut haben. Es sollte daher stets mit entsprechender Schutzkleidung (Handschuhe und Kittel) gearbeitet werden.

RNasen können durch DEPC (final 0,2 %) zerstört werden. Die Lösungen sollten erst nach der Zugabe und erfolgter Wirkung von DEPC autoklaviert werden, so dass das hochgiftige DEPC inaktiviert wird.

3.2.16.1 Aufreinigung von Gesamt-RNA

Zur Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Zellen wurde das Trizol-Reagenz der Firma Invitrogen verwendet und laut den Angaben des Herstellers eingesetzt.

Trizol stellt ein Gemisch aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat dar, wobei das Phenol zur Lyse der Zellen dient, während das Guanidiniumthiocyanat RNasen hemmt, ohne die Integrität der RNA zu beeinträchtigen.

Die Isolierung der RNA erfolgt durch Phenol-Chloroform bzw. Phenol-BCP-Extraktion und anschließende Isopropanolpräzipitation. Das üblicherweise verwendete Chloroform wurde an im Ergebnisteil angegebener Stelle durch BCP ersetzt, da es weniger toxisch ist und eine bessere Abtrennung von genomischer DNA gewährleistet.

Sämtliche Volumenangaben in nachstehendem Protokoll beziehen sich auf 1 ml Trizol-Reagenz, wobei diese für $0,5 - 1 \times 10^7$ Suspensionszellen bzw. 10 cm^2 Wachstumsfläche bei adhären Zellen eingesetzt werden.

Die Zellen wurden in der entsprechenden Menge an Trizol aufgenommen und zur vollständigen Lyse für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Isolierung der RNA wurden 100 μl Chloroform oder BCP zu der Lösung gegeben und diese für mindestens 15 Sekunden kräftig geschüttelt. Nach erfolgter dreiminütiger Inkubation wurden die Phasen durch Zentrifugation ($12.000 \times g$, 4°C , 15 min) getrennt. Die obere wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch die Zugabe von 500 μl Isopropanol und 2 – 5 μg Glykogen ausgefällt, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und durch Zentrifugation ($12.000 \times g$, 4°C , 10 min) sedimentiert.

Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde die RNA mit 1 ml 70 %-igem Ethanol versehen, kurz gevortext und erneut zentrifugiert ($12.000 \times g$, $2 - 8^\circ\text{C}$, 5 min). Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und die RNA im Heizblock bei 37°C getrocknet.

Die restlos getrocknete RNA wurde in einer durch die weiteren Versuche bestimmten Menge an DEPC-Wasser resuspendiert und anschließend für 10 – 15 Minuten im Wasserbad (65°C) gelöst.

3.2.16.2 Behandlung von Gesamt-RNA mit Desoxyribonuklease (DNase)

Um eventuell vorhandene DNA aus der RNA-Lösung zu entfernen, sollte diese einem DNase-Verdau unterzogen werden. Es ist darauf zu achten, daß eine RNase-freie DNase verwendet wird. Wird bei der RNA-Aufreinigung statt Chloroform BCP verwendet, so kann in den meisten Fällen auf einen DNase-Verdau verzichtet werden.

Der Verdau wurde in Anlehnung an die Angaben im Atlas™ cDNA Expression Array-Kit der Firma Clontech (Heidelberg) durchgeführt.

Es wurde folgender Ansatz zusammenpipettiert und für eine Stunde bei 37°C inkubiert:

- ca. 100 μg RNA
- 50 μl 10 x RQ1 RNase-freier DNase-Puffer (Promega, Madison, USA)
- 10 U RQ1 DNase I (Promega, Madison, USA)
- ad 500 μl DEPC-Wasser

Zur Abstopfung der Reaktion wurden 10 µl 0,5 M EDTA-Lösung pH 8,0 zugefügt. Zur Erhöhung des Reinheitsgrades der RNA wurde die Aufreinigung mit dem Trizol-Reagenz ein zweites Mal durchgeführt.

3.2.16.3 Elektrophorese von RNA in denaturierenden Agarosegelen

Die Elektrophorese von RNA in denaturierenden Agarosegelen verläuft nach dem gleichen Prinzip wie die Gelelektrophorese in nicht denaturierenden Gelen (siehe 3.2.2).

Da RNA allerdings zur Ausbildung von voluminösen Tertiärstrukturen neigt, die ihre Wanderungseigenschaften im Gel verändert, wird sie vor dem Auftragen auf das Gel denaturiert. Während der Gelelektrophorese werden denaturierende Bedingungen beibehalten, so dass ein Rückfalten in Sekundär- und Tertiärstrukturen verhindert wird.

Für ein 1 %iges Gel (80 ml) wurden 0,8 g Agarose in 61 ml DEPC-Wasser aufgeköcht, auf ca. 60°C abgekühlt und mit 16 ml 5 x Laufpuffer und 3,3 ml 37 %igem Formaldehyd versetzt, gut durchmischt und in die entsprechende Gelkammer gegossen.

Die Proben wurden 1:1 mit Probenauftragspuffer versetzt und für 10 - 15 Minuten im Wasserbad bei 65°C denaturiert. Anschließend wurde das Gel beladen und die Elektrophorese sofort gestartet (5 V/cm Elektrodenabstand). Nach Abschluss der Elektrophorese konnte die RNA auf dem UV-Tisch mit dem E.A.S.Y.-Bildokumentationssystem abgelichtet werden.

3.3 Etablierung eines retroviralen Gentransfer- und Expressions-Systems

3.3.1 Transfektion der Verpackungszelllinie zur Virusproduktion

Bei der Etablierung des retroviralen Systems standen zwei verschiedene Verpackungszelllinien zur Auswahl, die als Phoenix-gp und 293GPG bezeichnet werden. Beides sind Derivate der HEK293-Zelllinie, die stabil transfiziert sind mit den retroviralen Genen *gag* und *pol* sind. Die 293GPG Zelllinie ist zusätzlich noch mit dem *Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein* stabil transfiziert, so dass bei der Transfektion zur Virusproduktion lediglich der retrovirale Klonierungsvektor in die Zellen geschleust werden muss.

3.3.1.1 Verwendung der Phoenix-gp-Verpackungszelllinie:

Für die Transfektion der Phoenix-gp-Zellen zur Virusproduktion wurde der *Calcium Phosphate Transfection Kit* der Firma Sigma verwendet. Am Vortag der Transfektion wurden 5×10^6 Zellen pro 10 cm-Petrischale in entsprechendem Medium ausgesät. Vor der Transfektion wurden sämtliche Plasmide und Reagenzien aufgetaut und das Transfektions-Medium (DMEM mit Glutamin, 10 % FCS, 1 % Natriumpyruvat, 20 mM HEPES, Penicillin/Streptomycin) auf 37°C erwärmt.

Von den verschiedenen Vektoren wurden folgende Mengen eingesetzt:

retroviraler Klonierungs-Vektor	5 µg	
pGagpol	10 µg	
pEnv	$\left\{ \begin{array}{l} 0,5 \mu\text{g} \\ 5 \mu\text{g} \\ 2 \mu\text{g} \end{array} \right.$	VSV-G
		RD114
		GALV

Der für die Gene *gag* und *pol* kodierenden Vektor wurde dem Reaktionsansatz zugefügt, obwohl die Zelllinie schon mit diesen stabil transfiziert ist, da Erfahrungswerte anderer Gruppen zeigen, dass so die Virusproduktion verbessert werden kann.

Jeder Ansatz wurde zuerst mit ddH₂O auf 450 µl aufgefüllt um dann mit 50 µl 2 M CaCl₂ versetzt zu werden. Die Lösung wurde sanft mit der Pipette hoch- und runtergesogen. In ein zweites Reaktionsgefäß wurden 500 µl 2 x HBS-Lösung vorgelegt und mittels einer Plastikpipette dauerhaft mit Luft aufgeblubbert. Die zuvor bereitete CaCl₂/DNA-Lösung wurde tropfenweise in die blubbernde HBS-Lösung pipettiert und der gesamte Ansatz für 20 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde das Transfektions-Medium mit Chloroquine (Sigma) in einer Endkonzentration von 25 µM versetzt und nach der Abnahme des alten Mediums, je 10 ml pro Petrischale gegeben. Es folgte die tropfenweise Zugabe der DNA/Calciumphosphat-Lösung, ein Schwenken der Platte und nach einer 6 – 12-stündigen Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ ein Mediumwechsel gegen 8 ml normales Medium. Nach 24 Stunden wurde der Überstand mit einer Spritze abgenommen und durch einen 0,22 µm Sterilfilter (mit geringer Proteinbindung) in mehrere Reaktionsgefäße aliquotiert und bei – 80°C eingefroren [Kulturüberstand 1 = 24 h]. Es wurden sehr vorsichtig 8 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben.

Da sich der Titer der Virusüberstände bei jedem Einfrier- und Auftauzyklus etwa um die Hälfte verschlechtert, ist das sinnvolle Aliquotieren von besonderer Bedeutung, so sollte zur Austestung des Virustiters auf jeden Fall ein 1 ml-Aliquot gesondert weggefroren werden.

Die Kulturüberstände 2, 3, 4 und 5 wurden auf äquivalente Weise jeweils nach weiteren 12 Stunden geerntet, d. h. 36, 48, 60 und 72 Stunden nach dem Ende der Transfektion. Während der Kulturüberstand 5 von den Zellen entfernt, aliquotiert und eingefroren wurde, sollte man PBS auf die Zellen geben. Anschließend wurde das PBS von den Zellen abgesaugt und 2 ml/Petrischale Trypsin/EDTA gegeben, 5 min im Brutschrank inkubiert und daraufhin 1 ml der abgelösten Zellen in ein FACS-Röhrchen (Sarstedt) überführt, welches zuvor mit 1 ml Medium befüllt wurde. Die Zellen wurden für 5 min bei 1000 rpm sedimentiert, anschließend der Überstand verworfen und in 1 ml PBS resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (5 min bei 1000 rpm) wurde der Überstand abgegossen und die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen. Die Analyse erfolgte im Durchflußzytometer FACScan™ (Becton Dickinson). Falls die *events/s* > 1.000 sind, wurde die Probe stärker mit PBS verdünnt.

3.3.1.2 Verwendung der 293GPG-Verpackungszelllinie

Die 293GPG-Zelllinie bietet gegenüber der Phoenix-gp-Zelllinie den großen Vorteil, dass sie zusätzlich zu den stabil integrierten retroviralen Genen *gag* und *pol* auch mit dem VSV-G Envelope-Gen stabil transfiziert ist. Das heißt, dass bei der Transfektion lediglich der retrovirale Klonierungsvektor als einziges Plasmid eingesetzt werden muss und somit die Aufnahme in die Verpackungszelllinie erleichtert wird.

Die Transfektion wurde zu diesem Zweck mit selbst hergestellten Calciumchlorid- bzw. HBS-Lösungen in mittleren Zellkulturflaschen (75 cm²) durchgeführt.

Zwei Tage vor der Transfektion wurden $2,1 \times 10^6$ 293GPG-Zellen pro Zellkulturflasche ausgesät. Drei Stunden vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel gegen 13 ml frisches (DMEM + Tetracyclin). Alle Puffer und Lösungen wurden auf RT erwärmt und gut gemischt. Pro Transfektions-Ansatz werden zwei Reaktionsgefäße benötigt:

- In das erste Reaktionsgefäß wird insgesamt 20 µg DNA pipettiert, mit low TE-Puffer auf 1,03 ml aufgefüllt und gut gemischt. Zusätzlich wurden 150 µl 2 M CaCl₂-Lösung zugefügt und wiederum gut gemischt.
- In das zweite Reaktionsgefäß wurden pro Transfektion 1,18 ml 2 x HBS überführt.

Der Vortexer wurde nun so eingestellt, dass keine Lösung aus einem geöffneten Reaktionsgefäß beim vortexen herausspritzt. Die 2 x HBS-Lösung wurde gevortext und dabei tropfenweise die zuvor hergestellte DNA/CaCl₂-Lösung zugefügt. Nach vollständiger Zugabe der DNA waren feine Calciumphosphat-Präzipitate in der Lösung zu sehen. Es folgte eine 30-minütige Inkubationsphase. Bevor die Transfektions-Lösung tropfenweise auf die Zellen gegeben wurde, wurde sie noch einmal bei geringer Stärke gevortext. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ für maximal 16 h. Danach wurde das Medium abgenommen und gegen 18 ml frisches Tetracyclin-freies DMEM-Medium ersetzt. Da die Zellen nun nicht mehr unter Tetracyclin gehalten werden, kommt es zur Expression des VSV-G *envelope*-Gens und damit zur Virusproduktion. Nach weiteren 24 h Inkubation im Brutschrank wurde der Virusüberstand abgenommen und 18 ml frisches Tetracyclin-freies Medium auf die Zellen gegeben. Die selbe Prozedur wurde weitere vier Tage alle 24 h durchgeführt, wobei sämtliche Virusüberstände einer Probe in einer großen Zellkulturflasche vereinigt und bis zum Ende des Versuches im Kühlschrank gelagert wurden. Der gesamte Virusüberstand wurde vor dem Aliquotieren durch einen 0,22 µm Filter (mit geringer Proteinbindung) sterilfiltriert und bei -80°C weggefroren.

Die Zellen wurden wie unter 3.3.1.1 beschrieben für die FACS-Messung vorbereitet und anschließend im Durchflußcytometer FACScan auf ihre eGFP-Expression untersucht.

3.3.2 Bestimmung des Virustiters

Um die Anzahl an infektiösen Viruspartikeln im generierten Überstand ermitteln zu können, muss der Virustiter bestimmt werden. Hierzu wird eine gut transduzierbare Zelllinie gewählt

und mit verschiedenen Konzentrationen des Virusüberstandes versetzt. Kodiert der retrovirale Klonierungsvektor für ein fluoreszierendes Protein (z. B. eGFP), so kann der Virustiter anhand der Emission im entsprechenden Wellenlängenbereich im Vergleich zu nicht infizierten Zellen ermittelt werden.

$$\text{Titer pro ml} = \frac{\% \text{ GFP positive Zellen} * \text{Zellzahl (am Tag der Infektion)}}{\text{Volumen an eingesetztem Virusüberstand in ml}} * 2$$

Auch hier wurden zwei verschiedene Systeme verglichen, die im Folgenden beschrieben sind.

3.3.2.1 Verwendung der HT1080-Zelllinie

Am späten Nachmittag sollten 1×10^5 Zellen pro *well* in einer 12-*well*-Platte im entsprechenden Medium unter Zusatz von Penicillin/Streptomycin ausgesät werden, wobei pro zu testendem Virusüberstand vier *wells* benötigt werden.

Am nächsten Morgen wurde das Medium vorgewärmt, die zu testenden Virusüberstände bei RT aufgetaut und danach bis zur Versuchsdurchführung auf Eis gestellt.

Frisches Medium wurde mit Protaminsulfat (Endkonzentration im Ansatz: 4 µg/ml) versetzt und anschließend das alte Medium von den Zellen abgesogen. Es wurden 0, 10 µl, 50 µl und 200 µl Virusüberstand direkt auf die Zellen pipettiert und das zuvor erstellte Protaminsulfathaltige Medium (ad 500 µl pro 12-*well*) zugegeben. Die Zellkulturplatten wurden unter der Sterilwerkbank in die aerosoldichten Zentrifugeneinsätze gestellt und diese fest verschlossen. Es folgte eine einstündige Zentrifugation bei 37°C und 2000 rpm ohne Bremse. Nach Beendigung der Zentrifugation wurden die Zellen für sechs Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden 1,5 ml frisches Medium (ohne Protaminsulfat) auf die Zellen gegeben, hierbei wurde der Virusüberstand zuvor nicht entfernt. Am folgenden Morgen wurde das virushaltige Medium vollständig durch zwei ml pro *well* frisches Medium ersetzt.

Am Nachmittag des darauf folgenden Tages wurden die Zellen für die FACS-Untersuchung vorbereitet:

Dabei wurde das Medium von den Zellen entfernt, einmal mit PBS gewaschen und 0,5 ml Trypsin/EDTA in jedes *well* pipettiert. Nach fünf Minuten wurden die Zellen mit der Pipette aus der Zellkulturplatte gelöst und in ein FACS-Röhrchen überführt, welches zur Abstopfung der Trypsinierung 1 ml Medium enthielt. Die Zellen wurden für 5 min bei 1000 rpm und 20°C sedimentiert, die Pellets 1 x mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und daraufhin je nach Pelletgröße in 0,5 – 1 ml PBS resuspendiert und möglichst sofort für die FACS-Analyse eingesetzt.

3.3.2.2 Verwendung der A549-Zelllinie

Etwa 24 Stunden vor der Infektion wurden $5 \cdot 10^4$ A549-Zellen pro *well* einer 6-*well*-Platte im entsprechenden Medium unter Zugabe von Penicillin/Streptomycin ausgesät. Am späten Nachmittag des Folgetages wurde das Medium abgenommen und folgende Verhältnisse an Virusüberstand bzw. Medium auf die Zellen gegeben:

	Virusüberstand:	Medium:
1	2 ml	-
$\frac{1}{3}$	666 μ l	1333 μ l
$\frac{1}{10}$	200 μ l	1800 μ l
$\frac{1}{100}$	20 μ l	1980 μ l
nur Polybrene	-	2 ml
nur Medium	-	2 ml

Es erfolgte eine Zugabe von Polybrene (Hexadimethrine Bromide), einem Polykation in einer Endkonzentration von 8 μ g/ml zu sämtlichen Zellen außer denen, die als nicht behandelte Kontrolle (nur Medium) dienen. Die Platte wurde vorsichtig geschwenkt und für 16 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Virusüberstände bzw. das Medium entfernt und 3 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für weitere 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Vorbereitung der Zellen für die FACS-Messung:

Nach der Inkubationsphase wurde das Medium von den Zellen entfernt, einmal mit PBS gewaschen und 0,5 ml Trypsin/EDTA in jedes *well* pipettiert. Das Ablösen der Zellen wurde nach fünf Minuten unter Zugabe von 1 ml PBS gestoppt, die Zellsuspension in FACS-Röhrchen überführt und zentrifugiert (8 min, 2000 rpm, RT). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in einem ml PBS (2 % FCS) resuspendiert und daraufhin sofort im FACS-Gerät vermessen. Die Fluoreszenz des *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) wurde im FITC-Kanal aufgezeichnet. Anhand der statistischen Auswertung der Dot- oder Histogramm Plots konnte die prozentuale Infektionsrate bestimmt werden.

3.3.3 Transduktion der Zielzellen

Die Etablierung bzw. Optimierung des gesamten retroviralen Systems und damit auch die Transduktion von verschiedenen Zielzellen war ein großer Aufgabenbereich dieser Arbeit, so wurden verschiedenste Protokolle ausgetestet und auf ihre Effektivität hin verglichen. Als Ausgangsprotokoll dienen die zuvor beschriebenen Vorgehensweisen zur Virustiter-Bestimmung in HT1080- bzw. A549-Zellen. So wurde unter anderem die Zugabe von Protaminsulfat der von Polybrene gegenübergestellt. Verschieden lange Inkubationsphasen mit dem Virusüberstand und mehrmalige Transduktionen wurden verglichen. Weiterhin wurde untersucht, ob sich eine Aufzentrifugation der Viren und in welchem zeitlichen Rahmen bei den verschiedenen Zellen als sinnvoll erwies.

Die genauen Protokolländerungen sind im Ergebnisteil an entsprechender Stelle aufgeführt.

3.4 Zellkultur

3.4.1 Präparation von primären humanen Monozyten

Für die Präparation von PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) wurde das Blut aus einem *Buffy Coat* von gesunden Spendern 1:5 mit PBS (2 mM EDTA) verdünnt. Je 30 ml des verdünnten Blutes wurden sehr vorsichtig in einem 50 ml Polypropylenröhrchen über 20 ml Ficoll-Paque™ (Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Schweden) geschichtet. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 400 x g und 18°C wurde die Bande von mononukleären Zellen mit einer Kanüle abgenommen und in ein sauberes 50 ml Polypropylenröhrchen überführt. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS (2 mM EDTA) gewaschen (Zentrifugation für 10 min. bei 400 x g, 4°C) und in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/cm² in entsprechendem Medium (die Optimierung erfolgte in dieser Arbeit) in Zellkulturflaschen für adhärenente Zellen ausgesät.

Monozyten adhäreren im Gegensatz zu lymphozytären Zellen an Kunststoffoberflächen. Diese Eigenschaft kann ausgenutzt werden, um die beiden Zellfraktionen voneinander zu trennen.

Nachdem die Zellen für zwei Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert wurden, folgte ein zweimaliges Waschen mit vorgewärmtem PBS. Bei diesem Schritt wurde ein Großteil der nichtadhärenenten lymphozytären Zellen fortgespült. Die in der Zellkulturflasche verbleibenden adhärenenten Monozyten wurden erneut mit vorgewärmtem Medium bedeckt und bis zum Gebrauch bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

3.4.2 Kultivierung und Passage von adhärenenten und Suspensionszellen

Das Arbeiten mit Zelllinien erfolgte an einer sterilen Reinraumwerkbank. Alle Medien und Lösungen wurden steril angesetzt oder vor Gebrauch steril filtriert. Glasgeräte wurden vor dem Einsatz autoklaviert. Die Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen der Firma Greiner (Frickenhäusen) bei 37°C und 5 % CO₂ in gesättigter Wasserdampfatmosfera kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte etwa alle drei Tage.

Sobald eine obere kritische Zelldichte erreicht war, wurden die Suspensions-Zellen etwa 1:10 bis 1:20 mit frischem Medium ausgedünnt. Bei adhärenenten Zellen wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma, Deisenhofen) überspült. Die Trypsin-EDTA-Lösung wurde fast vollständig wieder abgenommen und die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Beklopfen der Kulturflasche abgelöst und mit PBS abgespült. Zur Weiterkultivierung der Zellen wurde etwa 1/10 bis 1/20 der Zellsuspension in entsprechendem frischen Medium ausgesät, der Rest der Zellen wurde verworfen.

Bei HEK293, 293GPG und Phoenix-gp Zellen wurde an Stelle von Trypsin-EDTA PBS mit 2 mM EDTA verwendet, um die Zellen schonender abzulösen. Zur Vorbereitung für FACS-Messungen oder Bindungsstudien wurden die Zellen stets mit der CDS-Lösung abgelöst um die Oberflächenrezeptoren nicht zu zerstören.

3.4.3 Bestimmung der Zellzahl und Vitalitätsprüfung

Die Zellzahlbestimmung erfolgt in einem sogenannten Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer). Die Zellsuspension wird meist eins zu eins mit Trypanblau gemischt und in die Zählkammer pipettiert. Die Zellen werden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

Das saure Trypanblau diffundiert durch defekte Zellmembranen, so dass tote Zellen (blau) eindeutig von vitalen unterschieden werden können.

Die Zellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellen/ml} = (\text{Zellen} \times 1000) / (\text{Kammervolumen} \times \text{Verdünnungsfaktor})$$

Bei der verwendeten Neubauer-Zählkammer ergibt sich das Kammervolumen zu $0,4 \text{ mm}^3$.

3.5 Bestimmung von Interleukinkonzentrationen in Zellüberständen

Eine Konzentrationsbestimmung von Interleukinen in Zellkulturüberständen kann Aufschluß über die von den Zellen sekretierte Menge an diesen Mediatoren geben. Dazu wird das Zellkulturmedium von den entsprechenden Zellen entfernt und um eventuell abgelöste Zellen zu sedimentieren für zehn Minuten bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand aliquotiert und bis zur Interleukin-Messung bei -80°C gelagert.

3.5.1 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Ein ELISA ist ein serologischer Test, bei dem man gebundene Antigene oder Antikörper mit Hilfe eines gekoppelten Enzyms, das eine farblose Substanz in ein farbiges Produkt umwandelt, nachweist.

Der Mikro-ELISA wird in einer 96-well-Mikrotiterplatte durchgeführt. Antigene und Antikörper binden erstaunlich fest, wenn auch nicht kovalent, an das Plastik dieser Platten. Die Amplifikation erfolgt durch ein Enzym, welches eine Chromogenumwandlung katalysiert, bei der ein lösliches, farbloses Chromogen in einen löslichen, gefärbten und quantifizierbaren Farbstoff umgewandelt wird. Die Immobilisierung eines der Reaktionspartner an die Mikrotiterplatte erleichtert die Testdurchführung erheblich, da gebundene und nichtgebundene Reagenzien sehr leicht voneinander getrennt werden können. Mit Hilfe spezieller Photometer, sogenannter Mikro-ELISA-Reader, kann die Farbtiefe des Chromogens sehr leicht ermittelt und somit ein quantitatives Testergebnis erhalten werden.

Bei der sogenannten Sandwich-Anordnung bindet ein fixierter Antikörper gelöstes Antigen, bevor dieses mit Hilfe eines Antigen-detection-systems nachgewiesen wird. Die Antigenbindung durch einen fixierten Antikörper führt zu einer Antigenkonzentration, welche eine sehr starke Amplifikation bewirkt und damit auch den Nachweis von Antigenen in sehr geringen Konzentrationen ermöglicht.

Eine 96-*well*-Mikrotiterplatte wurde mit 100 $\mu\text{l/well}$ eines monoklonalen Antikörpers (*capture antibody*) für die nachzuweisende Substanz beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden für eine Stunde mit einem sogenannten Blocking-Reagenz (PBS + 1 % BSA + 5 % Sucrose) abgesättigt (300 $\mu\text{l/well}$). Nach einer zweistündigen Inkubation mit 100 $\mu\text{l/well}$ der Probe bzw. des Standards wurden 100 μl des zweiten biotinylierten Antikörpers (*detection antibody*) in jedes *well* pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde wiederum bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert. Es folgte eine zwanzigminütige Inkubation mit 100 $\mu\text{l/well}$ des an Streptavidin gekoppelten Enzyms Meerrettich-Peroxidase. In einer anschließenden Nachweisreaktion wurden 100 $\mu\text{l/well}$ der Substrat-Lösung (H_2O_2 + Tetramethylbenzidine, R&D Systems) gegeben. Die Farb-Reaktion wurde nach etwa 30 Minuten durch die Zugabe von 50 $\mu\text{l/well}$ der Stop-Lösung (1 M H_2SO_4) beendet.

Dreimaliges Waschen mit je 400 $\mu\text{l/well}$ des Waschpuffers (0,05 % Tween 20 in PBS, pH 7,4) nach jedem Inkubationsschritt gewährleistet die Entfernung von nicht gebundenen Substanzen. Demnach sollte der Substratumsatz direkt proportional zur Menge des eingesetzten Enzyms, also auch zur Menge der nachzuweisenden Substanz sein.

Zur Konzentrationsabschätzung wird eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen der nachzuweisenden Substanz verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende ELISA-Kits verwendet:

IL-6: R&D Systems (Wiesbaden)

IL-8: R&D Systems (Wiesbaden)

Die Messungen wurden an einem Mikro-ELISA-Reader (Titertek Multiskan MCC/340, Labsystems, Finnland) durchgeführt.

3.6 Mathematische/Statistische Verfahren

3.6.1 Fishers Exakter Test

Fishers Exakter Test [150] kann verwendet werden um zu bestimmen, inwieweit eine experimentell gefundene Korrelation – hier die Regulation bzw. Nichtregulation eines Gens in jeweils beiden Wiederholungsexperimenten – statistisch signifikant ist.

Dazu werden die tatsächlichen Anzahlen des Auftretens der möglichen Kombinationen pro Versuch - hier: „in beiden Experimenten reguliert“, „in beiden Experimenten nicht reguliert“, „im ersten, aber nicht im zweiten reguliert“ oder „im zweiten nicht aber im ersten reguliert“ – bestimmt und in einer Vier-Felder-Tafel dargestellt. Bei einem kausalen Zusammenhang sollten nun die Kombinationen mit gleichem Ergebnis in beiden Experimenten häufiger auftreten, als es bei einer rein zufälligen Verteilung zu erwarten ist.

Um dies zu quantifizieren, wird unter der Hypothese, dass die Ergebnisse im ersten und im zweiten Experiment unabhängig sind - die Regulation also rein zufällig auftritt, bestimmt, wie wahrscheinlich die gemessene oder eine noch extremere Verteilung der Kombination wäre.

4 Ergebnisse

Der erste Teil dieses Kapitels gliedert sich in drei Bereiche auf. Im ersten Abschnitt sind die Ergebnisse zur Untersuchung der transkriptionellen Regulation des C3aR dargestellt. Der zweite Abschnitt umfasst die Identifizierung wichtiger Induktoren der C3aR/C5aR-Expression. Die Etablierung eines retroviralen Gentransfer- und Expressions-Systems und seine Anwendung zur Herstellung stabiler Zelllinien sind im dritten Abschnitt erläutert. Zusammenfassend beschäftigt sich dieser Teil der Arbeit mit der Frage, warum, wann und wodurch der C3aR auf verschiedenen Zellen exprimiert wird und über welche Signalwege es zur Induktion kommen könnte.

Im zweiten Teil dieses Kapitels werden hingegen die durch Ligandenbindung ausgelösten, Rezeptor-nachgeschalteten Effekte in monozytären Zellen auf Transkriptionsebene im Mikroarray untersucht.

Teil 1:

4.1 Untersuchung der transkriptionellen Regulation des C3aR

In den ersten beiden Kapiteln wurde die von Frau Bettina Sohns in ihrer Dissertation („Untersuchungen zur Expression des humanen C3a-Rezeptors“) begonnene Aufklärung der komplexen Regulation des C3aR fortgeführt und teilweise überprüft, ob sich die Ergebnisse auf den C5aR übertragen lassen.

Um die Lokalisation des C3aR-Promotors bestimmen zu können, sollte zuerst der Transkriptionsstartpunkt identifiziert werden. Zur weiteren Eingrenzung des Promotorbereiches und speziell um mögliche Regulatoren der C3aR-Expression aufzeigen zu können, ist es essentiell, diese Versuche in einer Zelllinie durchzuführen, die den C3aR in hoher Kopienzahl auf ihrer Oberfläche trägt und von der man daher weiß, dass sie ein zelluläres Mikromilieu mit sämtlichen für die Expression dieses Rezeptors wichtigen Ko-Faktoren aufweist. Die humane Mastzelllinie HMC-1, die sich neben der Erfüllung dieser Kriterien [37] auch durch eine relativ gute transiente Transfizierbarkeit auszeichnet, wurde daher für die meisten Experimente eingesetzt.

4.1.1 Eingrenzung des Transkriptionsstartpunktes mittels RT-PCR

In der Dissertation von Frau Sohns wurde der Transkriptionsstartpunkt des C3aR in HMC-1- und U937-Zellen mittels RT-PCR und *Nuclease Protection Assay* (NPA) sowie in Marathon-Ready cDNA aus humaner Plazenta und fetalem Gehirn mittels *5'-Rapid Amplification of cDNA Ends* eingegrenzt. Da die Ergebnisse der unterschiedlichen Methoden nicht übereinstimmten, sollte hier eine genauere Lokalisierung mittels RT-PCR unter Zuhilfenahme weiterer Sense-Primer geschehen.

Die über Trizol aufgereinigte Gesamt-RNA aus HMC-1-Zellen wurde unter Verwendung von Oligo-d(T)-Primern in einer Reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Eine PCR, bei der zur Spezifizierung der Reaktion ein Vorzyklus mit einer 2°C höheren Annealing-Temperatur vorgeschaltet wurde, schloss sich an, wobei ein im codierenden Bereich des C3aR lokalisierter RAS-Primer (TC8) mit einer Vielzahl von Sense-Primern, die in der 5'-UTR hybridisieren, kombiniert wurde.

Da genomische DNA aufgrund des 6 kb großen Introns nicht zur Überprüfung der Primerpaare eingesetzt werden konnte, wurde für diese Austestungen der Primerpaare das Positivkontrollplasmid pSEAP2-E-308-hC3aR-234 als Matrize verwendet. In diesem Vektor sind die ersten 234 bp des offenen Leserahmens des C3aR mit einem 308 bp langen Bereiches der 5'-UTR vereinigt, so dass sowohl der RAS-Primer als auch sämtliche Sense-Primer binden können. Es zeigte sich, dass bei allen Primerpaaren das zu erwartende DNA-Fragment amplifiziert werden konnte.

Die Lage sämtlicher Sense-Primer in dem 5' vom Intron gelegenen genomischen Bereich des C3aR ist in der folgenden Abbildung dargestellt, wobei neu generierte Primer schwarz umrandet und stärker hervorgehoben sind.

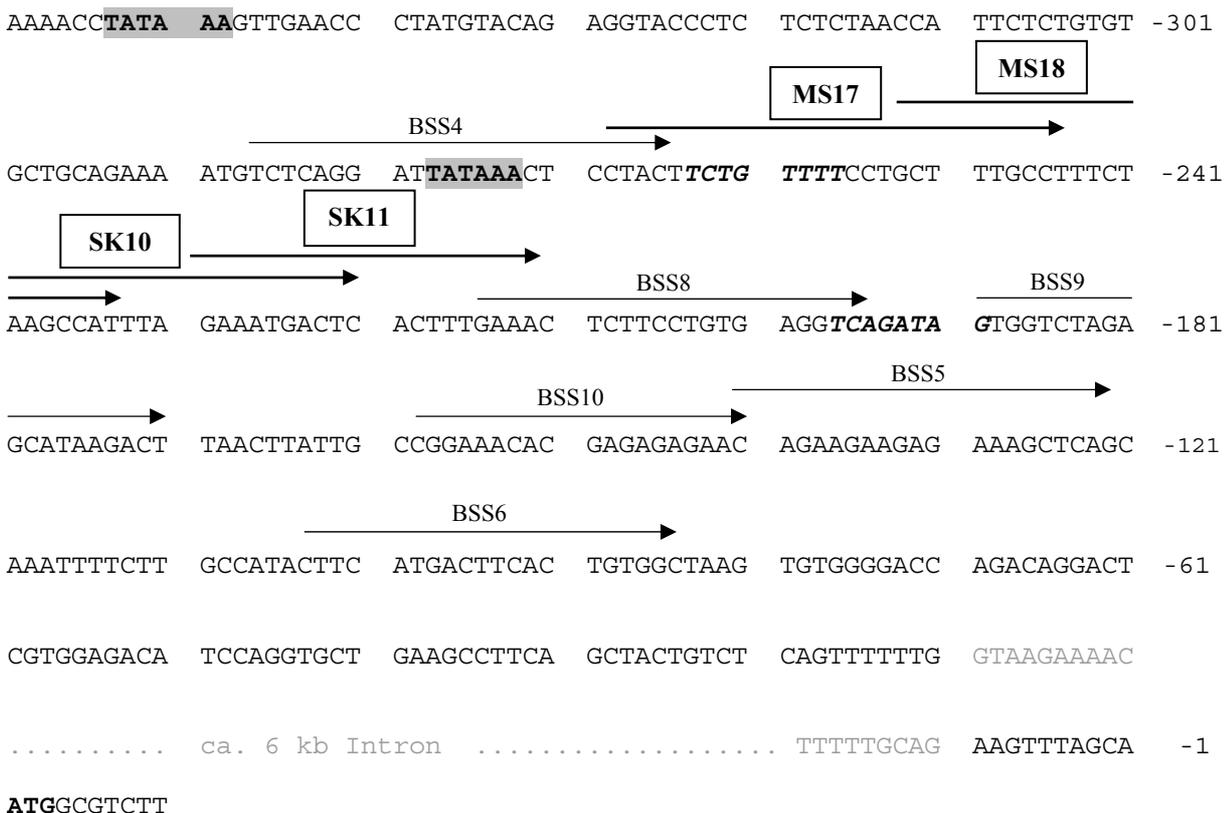


Abbildung 4.1: Anordnung der zur Eingrenzung des Transkriptionsstarts verwendeten Primer in der 5'-UTR des hC3aR. Potentielle Cap-Signale sind fett und kursiv, die Übergänge zum Intron grau und das ATG-Startcodon fett und die beiden potentiellen TATA-Box-Elemente fett und grau unterlegt dargestellt.

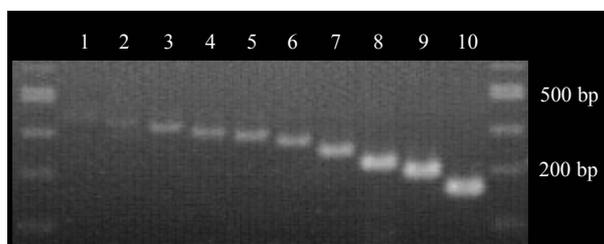
Bei Frau Sohns hatte das Primerpaar BSS8/TC8 ein Amplifikat ergeben, wohingegen mit dem Primerpaar BSS4/TC8 mit cDNA als Matrize keine doppelsträngige DNA erhalten werden konnte. Somit hätte der Transkriptionsstartpunkt in HMC-1-Zellen zwischen – 290 und – 210 liegen müssen. (Sämtliche Positionsangaben beziehen sich auf das ATG-Startcodon mit + 1). Zur näheren Eingrenzung dieses Bereiches wurden vier neue Primer generiert (MS17, MS18, SK10 und SK11), die in der 5'-UTR des C3aR zwischen den Primern BSS4 und BSS8 hybridisieren.

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Gesamt-RNA aus HMC-1-Zellen unter Verwendung von Chloroform, wie unter 3.2.17.1 beschrieben, aufgereinigt. Bei einem Teil der umgeschriebenen cDNA lieferte die PCR mit dem Primerpaar BSS9/TC8 das längste Amplifikat, wohingegen bei anderen Präparationen auch mit den Primerpaaren SK10/TC8 und SK11/TC8 sowie MS18/TC8 Produkte erhalten wurden.

Etwa zeitgleich wurde im Protokoll zur Isolierung von Gesamt-RNA aus primären humanen Monozyten die Phenol-*Chloroform*-Extraktion durch eine Phenol-*BCP*-Extraktion ersetzt (siehe 4.5.8). Dies hatte zur Folge, dass höhere Ausbeuten mit nahezu keiner (< 1 ng) detektierbaren Verunreinigung an genomischer DNA erhalten wurden.

Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse zur Transkriptionsstartbestimmung wurden drei neue unabhängige Präparationen von Gesamt-RNA aus HMC-1-Zellen unter Verwendung der beschriebenen Phenol-BCP-Extraktion gewonnen und mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Bei der sich anschließenden PCR konnte mit sämtlichen Primerpaaren, auch bei dem von B. Sohns als negativ getesteten BSS4/TC8, ein Amplifikat erhalten werden. Dabei lieferte die PCR mit den Primerkombinationen, bei denen der Sense-Primer im Bereich zwischen – 185 und ATG-Startcodon lag, starke Amplifikate. Unter Verwendung der Primerpaare, bei denen der Sense-Primer weiter 5' hybridisierte, wurden immer schwächer werdende Banden im Agarosegel detektiert. Zuvor wurde in einer PCR mit den Primern für das Haushaltsgen RPS9 ausgeschlossen, dass die RNA mit genomischer DNA verschmutzt war (Kontroll cDNA-Synthese ohne Reverse Transkriptase).

Das Ergebnis der RT-PCR mit einer der drei unabhängig gewonnenen RNA aus HMC-1-Zellen sei hier exemplarisch dargestellt:



Primerkombinationen:

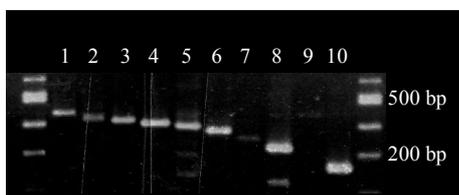
- | | |
|-------------|--------------|
| 1. BSS4/TC8 | 2. MS17/TC8 |
| 3. MS18/TC8 | 4. SK10/TC8 |
| 5. SK11/TC8 | 6. BSS8/TC8 |
| 7. BSS9/TC8 | 8. BSS10/TC8 |
| 9. BSS5/TC8 | 10. BSS6/TC8 |

Abbildung 4.2: Agarosegelelektrophorese nach RT-PCR von Gesamt-RNA aus HMC-1-Zellen mit verschiedenen Sense-Primern, die in der 5'-UTR des C3aR binden und dem RAS-Primer TC8, der im ORF bindet. Mit allen Primerpaaren konnte ein Amplifikat detektiert werden, wobei die Primerkombinationen BSS4/TC8 und MS17/TC8 sehr schwache Banden aufzeigten.

Es bleibt festzuhalten, dass durch die Umstellung des RNA-Aufreinigungsprotokolles qualitativ so hochwertige RNA extrahiert werden konnte, dass tatsächlich die mRNA in ihrer gesamten Länge, in cDNA umgeschrieben und in der anschließenden PCR detektiert werden konnte.

Die unterschiedliche Intensität der Banden im Agarosegel deutet auf einen Haupttranskriptionsstartpunkt bei etwa – 185 (starke Amplifikate) und einen Nebentranskriptionsstartpunkt bei etwa – 265 (schwächere Amplifikate) hin. In der Dissertation von Frau Sohns konnte der Transkriptionsstartpunkt in HMC-1-Zellen mittels NPA in etwa auf die Position - 185 bestimmt werden, was sich mit den obigen Ergebnissen gut deckt. Mit dieser Methode konnte anscheinend lediglich der am wenigsten 5'-gelegene Transkriptionsstartpunkt, also der Haupttranskriptionsstartpunkt, ermittelt werden.

Im zweiten Abschnitt richtet sich das Augenmerk auf die induzierbare Zelllinie U937. So wurde auch in diesen Zellen (differenziert mit 1 mM Bt_2 -cAMP, 72 h) mittels RT-PCR der Transkriptions-Startpunkt untersucht. Hierzu wurde die RNA ebenfalls nach der neuen Methode aufgereinigt. Bei Frau Sohns konnte lediglich mit den drei Primerpaaren BSS6/TC8, BSS5/TC8 und BSS10/TC8 ein Amplifikat nach der Reversen Transkription erhalten werden.



Primerkombinationen:

- | | |
|-------------|--------------|
| 1. BSS4/TC8 | 2. MS17/TC8 |
| 3. MS18/TC8 | 4. SK10/TC8 |
| 5. SK11/TC8 | 6. BSS8/TC8 |
| 7. BSS9/TC8 | 8. BSS10/TC8 |
| 9. BSS5/TC8 | 10. BSS6/TC8 |

Abbildung 4.3: Agarosegelelektrophorese nach RT-PCR von Gesamt-RNA aus Bt_2 -cAMP-differenzierten U937-Zellen mit verschiedenen Sense-Primern, die in der 5'-UTR des C3aR binden und dem RAS-Primer TC8, der im ORF bindet. Mit allen Primerpaaren konnte ein Amplifikat detektiert werden.

Bei unseren Untersuchungen (siehe Abbildung 4.3) zeigten hingegen alle zur Verfügung stehenden Primerpaare Amplifikate auf. Somit muss davon ausgegangen werden, dass der Transkriptions-Startpunkt in Bt_2 -cAMP-differenzierten U937-Zellen mindestens bei Position – 290 liegt und wahrscheinlich sogar noch weiter 5' lokalisiert ist. Die nicht bzw. kaum zu detektierenden Banden Nr. 9 und 7 sind am ehesten auf einen Pipettierfehler oder ein anderes technisches Problem zurückzuführen, da mit den weiter 5'-gelegenen Sense-Primern Amplifikate erhalten worden sind.

4.1.2 Mutation möglicher TATA-Boxen

Die Initiation der Transkription in Eukaryoten beginnt klassischerweise mit der Bindung des TATA-Bindeproteins (TBP) an die etwa 25 bp abwärts vom Transkriptionsstartpunkt gelegene TATA-Box. Für viele verschiedene Gene konnte jedoch gezeigt werden, dass sie diesem herkömmlichen Prinzip nicht folgen, sondern TATA-Box-unabhängig die Transkription initiieren.

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die mRNA-Synthese des C3aR klassisch oder unabhängig von der Bindung des TBP an die TATA-Box erfolgt. Hierzu wurden die beiden putativen TATA-Box-Elemente, die in der Abbildung 4.1 hervorgehoben sind, mittels spezifischer PCR-Mutagenese (siehe 3.2.6) so verändert, dass sie vom basalen Transkriptionsapparat nicht mehr als solche erkannt werden können. Unter Verwendung der Primer SK20/21 wurde die TATA-Box an Position –275 (1511_mutTATA-1) und unter Verwendung der Primer SK22/23 die putative TATA-Box an Position –351 (1511_mutTATA-2) mutiert. Bei der Amplifikation des als Matrize dienenden Plasmides pSEAP2-E-1511 wurden jeweils die Basen *tataaa* in *gctaaa* mittels Turbo-*Pfu*-DNA-Polymerase umgeschrieben. Nach dem *DpnI*-Verdau wurden die mutationstragenden Plasmide transformiert, die DNA isoliert und zur Überprüfung der Mutation sequenziert. Von jedem TATA-Box-Element wurden drei erfolgreich mutierte, unabhängige Klone ausgewählt. Zum Vergleich der Promotoraktivitäten verschiedener Konstrukte wurde in den nachfolgenden Experimenten der pSEAP-Vektor benutzt. Er kodiert für die sezernierte alkalische Phosphatase (Reporter) und ist selbst promotorlos. Die zu bestimmenden Promotorkonstrukte wurden in den Klonierungsbereich eingebracht, so dass anhand des Enzymumsatzes auf deren Aktivität geschlossen werden kann. Zum rechnerischen Ausgleich schwankender Transfektionseffizienzen wurde nach Möglichkeit der pCMV- β Vektor kotransfiziert. Er kodiert für die β -Galaktosidase und enthält einen CMV-Promotor.

Die TATA-Einzelmutanten wurden neben dem Kontrollvektor (kodiert nicht für das SEAP-Enzym) und dem nicht-mutierten pSEAP2-E-1511, wie unter 3.2.13.2 beschrieben, in HMC-1-Zellen in Doppelwerten transient transfiziert.

Der Reporteragen-Assay wurde grundsätzlich drei Tage nach der Transfektion durchgeführt. Hierbei wurden die Überstände für den SEAP-Test (3.2.14.1) und die Zellpellets für den β -Gal-Assay (3.2.14.2), jeweils in Doppelwerten, eingesetzt. Die erhaltenen SEAP-Signale wurden mit den β -Gal-Werten normalisiert.

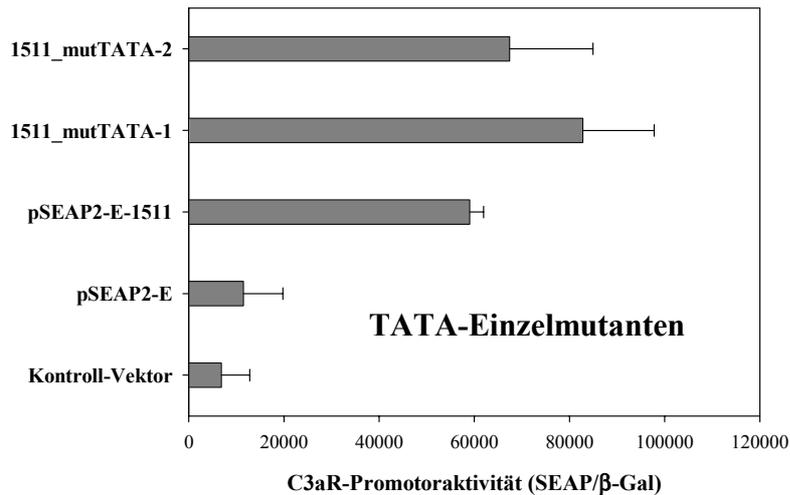


Abbildung 4.4: Ergebnis der Reporter-gen-Studie mit dem pSEAP2-E-1511 Wildtyp-Promotorkonstrukt und den beiden TATA-Einzelmutanten, 1511_mufTATA-1 bzw. 1511_mufTATA-2, des humanen C3aR in HMC-1-Zellen. Aufgeführt sind die gemittelten C3aR-Promotoraktivitäten (und Standardabweichung) aus zwei Experimenten, wobei von jedem Konstrukt zwei Klone in Doppelwerten vermessen worden sind.

Der Abbildung 4.4 ist zu entnehmen, dass die Mutation keiner der beiden TATA-Boxen einen Einfluss auf die Promotoraktivität der entsprechenden Konstrukte im Vergleich zum Wildtyp-Promotor hat.

Zur Bestätigung der obigen Ergebnisse, wurden von Frau Jessica Thalmann im Rahmen eines Großpraktikums TATA-Doppelmutanten hergestellt. Hierzu wurde in einem der drei Klone, die schon eine mutierte TATA-Box an Position – 275 besaßen, zusätzlich das TATA-Element an Position – 351 mutiert. Und an einem der Klone mit mutierter TATA-Box an Position - 351 wurde das TATA-Motiv an Position – 275 verändert.

Von jeder der auf verschiedene Weise erstellten TATA-Doppelmutanten wurden zwei Klone in HMC-1-Zellen transfiziert und anschließend im Reporter-gen-Assay vermessen. Auch hier zeigte sich kein Aktivitätsverlust im Vergleich zum Wildtyp-Promotor (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass es sich bei dem C3aR-Promotor um einen TATA-losen Promotor handelt, da sowohl die TATA-Einzel- als auch die TATA-Doppelmutanten keine signifikant abweichende Promotoraktivität im Vergleich zum pSEAP2-E-1511 Konstrukt aufzeigten.

4.1.3 Optimierung der transienten Transfektion der humanen Mastzelllinie HMC-1 und des Reporter-gen-Assays

Zu Beginn dieser Arbeit standen eine Reihe von Verkürzungsmutanten der 5'-UTR des humanen C3aR zur Verfügung (siehe 2.7). Sämtliche dieser Konstrukte waren in den Reporter-gen-Vektor pSEAP2-E kloniert und im Rahmen der Dissertation von Frau Sohns schon einmal auf ihre Promotoraktivität hin vermessen worden.

Eine spätere Überprüfung des Transfektionsprotokolls hatte jedoch erbracht, dass in den Messungen von Frau Sohns eine (zu hohe) Konzentration des Effectene™-Reagenz (25 µl/6-well) eingesetzt wurde, bei der > 50 % der Zellen starben. Aus diesem Grund fiel der Entschluss das Effectene™-Protokoll vor der Vermessung der bereits vorhandenen Promotorkonstrukte erneut zu optimieren. Dabei stellte sich heraus, dass der Anteil an vitalen Zellen bei einer Effectene™-Menge von 5 µl pro 6-well am höchsten war. Unter diesen Bedingungen zeigte eine Vitalfärbung kaum Zelltod. Außerdem konnten im β-Gal-Assay die stärksten Signale vermessen werden. Im Rahmen dieses Vortests wurde die für den β-Gal-Assay verwendete Substrat-Menge von 125 µl auf 60 µl herabgesetzt. Weiterhin wurde die eingesetzte Zellmenge verdoppelt, was ebenfalls eine höhere Transfektionseffizienz zur Folge hatte. (Die Daten dieser Optimierungsversuche sind nicht gezeigt.) Weiterhin wurden von sämtlichen Plasmiden neue Präparationen erstellt. Dabei wurde sehr genau darauf geachtet, dass die Konzentrationen im optimalen Messbereich des Photometers liegen. Zusätzlich wurden die Proben nach der Verdünnung auf 100 ng/ml noch einmal im quantitativen Agarosegel mittels λ-Hind III-Marker visuell auf die Äquivalenz der Konzentration überprüft.

Unter Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte wurden die bereits vorhandenen Promotorkonstrukte erneut in HMC-1-Zellen transifiziert und im Reporteragen-Assay auf ihre Aktivität hin vergleichend vermessen. Neben den zu untersuchenden Konstrukten wurde stets ein Kontrollvektor (KV, ohne Enzym) und der pSEAP2-E Leervektor (LV, kodiert für SEAP, ist jedoch promotorlos) mitgeführt.

Analyse der „langen“ C3aR-Promotorkonstrukte:

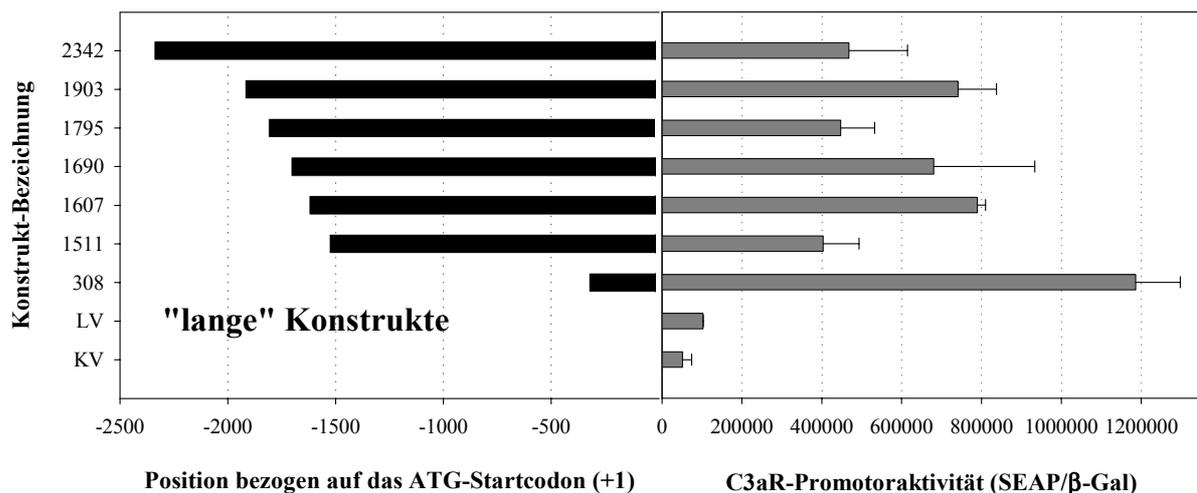


Abbildung 4.5: „Lange“ Promotorkonstrukte des humanen C3aR (links) und die Ergebnisse des zugehörigen Reporteragen-Assays in HMC-1-Zellen (rechts). Die x-Achse auf der linken Seite gibt die Nukleotidposition in Exon 1 des C3aR-Gens in Bezug zum ATG-Startcodon (mit +1) wieder. Die schwarzen Balken stellen die Bereiche der 5'-UTR dar, die in den pSEAP2-E-Reportervektor kloniert wurden. Die Konstrukt-Bezeichnung spiegelt die Länge des Promotorfragmentes wieder. Aufgezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (mit Doppelwerten in jedem Test).

Analyse der „kurzen“ C3aR-Promotorkonstrukte:

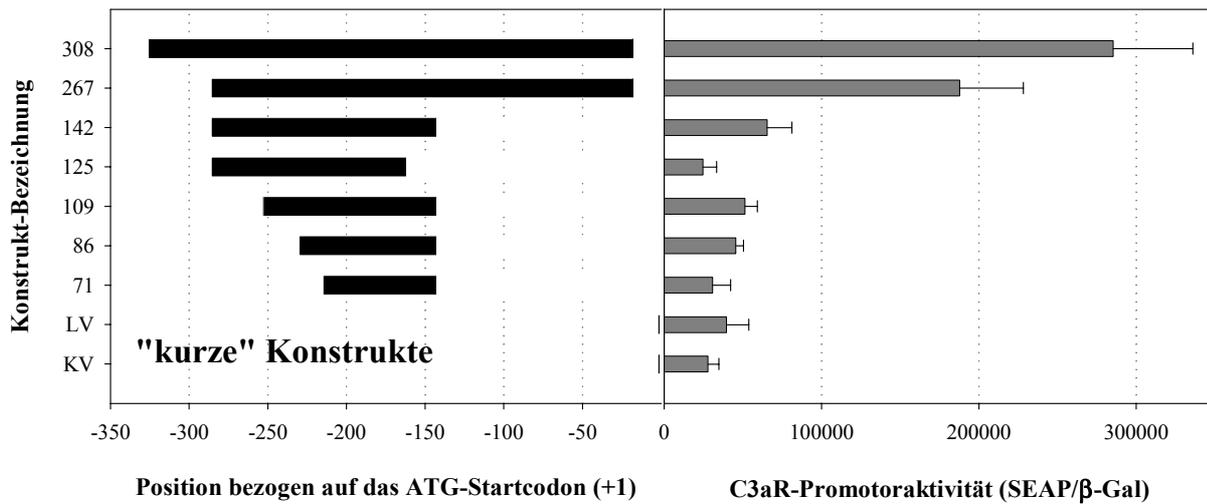


Abbildung 4.6: „Kurze“ Promotorkonstrukte des humanen C3aR (links) und die Ergebnisse des zugehörigen Reporteragen-Assays in HMC-1-Zellen (rechts). Die x-Achse auf der linken Seite gibt die Nukleotidposition in Exon 1 des C3aR-Gens in Bezug zum ATG-Startcodon (mit +1) wieder. Die schwarzen Balken stellen die Bereiche der 5'-UTR dar, die in den pSEAP2-E-Reportervektor kloniert wurden. Die Konstruktsbezeichnung spiegelt die Länge des Promotorfragmentes wieder. Aufgezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (mit Doppelwerten in jedem Test).

Da die Aktivität der „längeren“ Konstrukte keine signifikanten Unterschiede aufwies, sollten diese nicht weiter charakterisiert werden. Der extreme Abfall der Aktivität vom pSEAP2-E-267 zum pSEAP2-E-142 sollte hingegen näher untersucht werden (siehe 4.1.4). Die Verkürzung des Promotorkonstruktes pSEAP2-E-142 am 5'-Ende führt zu einer Abnahme der Aktivität, so dass die Konstrukte pSEAP2-E-86 und pSEAP2-E-71 im Vergleich zum Leervektor keine Aktivität mehr aufweisen. Die Verkürzung am 3'-Ende von Position – 143 (pSEAP2-E-142) auf – 162 (pSEAP2-E-125) geht ebenfalls mit einem Aktivitätsverlust einher.

4.1.4 Herstellung zusätzlicher Verkürzungsmutanten der 5'-UTR des C3aR

Zur näheren Eingrenzung der Promotorregion des C3aR wurden fünf weitere Fragmente der 5'-UTR in den Reporteragenvektor (pSEAP2-E) inkloniert. Dazu wurden die entsprechenden Bereiche über *Pfu*-PCR mit spezifischen Primern (siehe Legende Abbildung 4.7) amplifiziert und anschließend nach Restriktionsspaltung in den Vektor kloniert (siehe 3.2). Als Template wurde das pSEAP2-E-308-Konstrukt verwendet. Die 5'-UTR-Sequenz wurde bei allen Plasmiden durch Sequenzierung überprüft. Einen Überblick über die neu-generierten Konstrukte pSEAP2-E-162, -197, -212, -187 und -206 bietet die folgende Abbildung. Zum besseren Verständnis sind die bereits vorhandenen Plasmide pSEAP2-E-267 und -142 mit aufgeführt.

Überblick aller neu-generierten C3aR-Promotorkonstrukte:

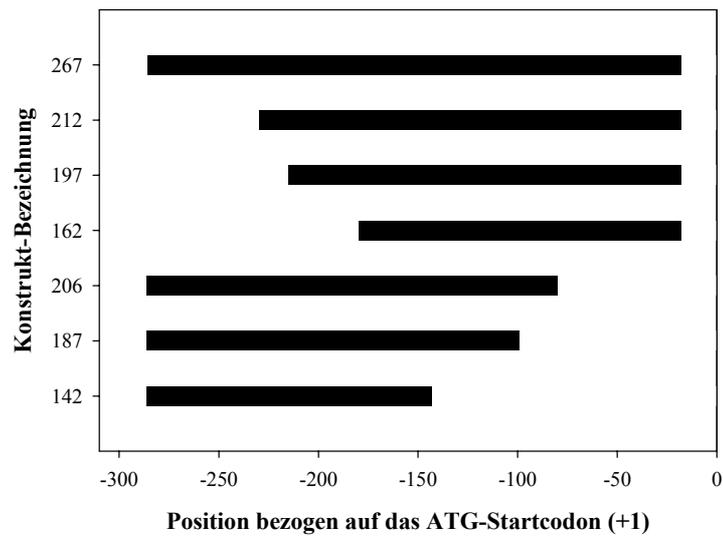


Abbildung 4.7: Übersicht aller neu-generierten C3aR-Promotorkonstrukte im Vergleich zum pSEAP2-E-267 und -142. Aufgeführt sind die Länge (Konstrukt-Bezeichnung) und die Position in der 5'-UTR. Folgende Primer wurden zur Amplifikation der Inserts verwendet: BSS21/BSR11 für pSEAP2-E-212, BSS22/BSR11 für pSEAP2-E-197, BSS25/BSR11 für pSEAP2-E-162, BSS13/BSR26 für pSEAP2-E-206 und BSS13/BSR25 für pSEAP2-E-187.

4.1.5 Identifizierung wichtiger regulatorischer Promotorbereiche mittels Reporteragen-Assay

Die neu-generierten C3aR-Promotorkonstrukte wurden in HMC-1-Zellen transient transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Überstände für den SEAP-Test und die Zellpellets für den β -Gal-Assay eingesetzt. Die mit den β -Gal-Werten normilisierten SEAP-Aktivitäten sind in den folgenden Abbildungen aufgezeigt.

Analyse der 5' Deletionsmutanten:

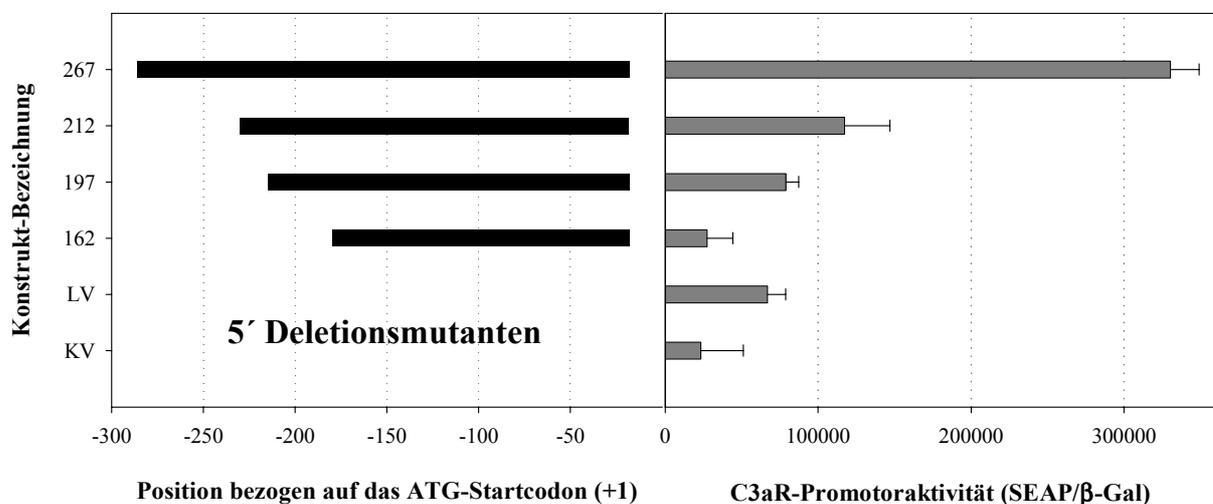


Abbildung 4.8: 5'-Deletionsmutanten des humanen C3aR (links) und die Ergebnisse des zugehörigen Reporteragen-Assays in HMC-1-Zellen (rechts). Neben den neu-generierten Plasmiden pSEAP2-E-212, -197 und -162 ist das pSEAP2-E-267 als Vergleichskonstrukt mit vermessen worden. Die x-Achse auf der linken Seite gibt die Nukleotidposition in Exon 1 des C3aR-Gens in Bezug zum ATG-Startcodon (mit +1) wieder. Die schwarzen Balken stellen die Bereiche der 5'-UTR dar, die in den pSEAP2-E-Reportervektor kloniert wurden. Die Konstrukt-Bezeichnung spiegelt die Länge des Promotorfragmentes wieder. Aufgezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (mit Doppelwerten in jedem Test).

Es wurden zuerst sämtliche neu-generierte Konstrukte analysiert, deren 3'-Ende an der Position – 18 der 5'-UTR beginnt. Um die Aktivität dieser Konstrukte in Bezug zu den bereits vorhandenen Plasmiden zu setzen, wurde das pSEAP2-E-267-Konstrukt mitgeführt.

Wie in Abbildung 4.8 ersichtlich ist, scheinen am 5'-Ende der Promotorregion zwischen Position – 180 und – 286 positiv-regulatorische Bereiche zu liegen, da mit abnehmender Konstruktlänge auch die Promotoraktivität sinkt.

Als nächstes wurden die an Position – 286 der 5'-UTR endenden neu-generierten Promotor-konstrukte untersucht. Auch hier wurde zum Vergleich der Aktivitäten das Plasmid pSEAP2-E-267 eingesetzt.

Analyse der 3' Deletionsmutanten:

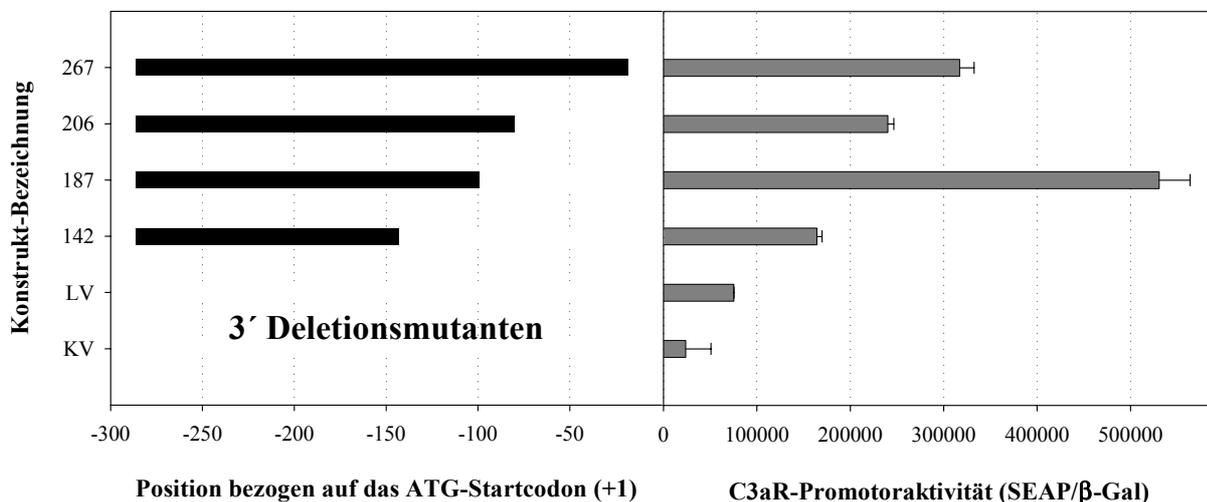


Abbildung 4.9: 3'-Deletionsmutanten des humanen C3aR (links) und die Ergebnisse des zugehörigen Reporteragen-Assays in HMC-1-Zellen (rechts). Neben den neu-generierten Plasmiden pSEAP2-E-206 und -187 sind die Konstrukte pSEAP2-E-267 und -142 zum Vergleich der Aktivitäten mit vermessen worden. Die x-Achse auf der linken Seite gibt die Nukleotidposition in Exon 1 des C3aR-Gens in Bezug zum ATG-Startcodon (mit +1) wieder. Die schwarzen Balken stellen die Bereiche der 5'-UTR dar, die in den pSEAP2-E-Reportervektor kloniert wurden. Die Konstrukt-Bezeichnung spiegelt die Länge des Promotorfragmentes wieder. Aufgezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (mit Doppelwerten in jedem Test).

Zur Überprüfung der hohen Aktivität des pSEAP2-E-187-Konstruktes im Vergleich zum pSEAP2-E-267 wurden drei unabhängige Klone dieses Plasmides erneut in HMC-1-Zellen transfiziert und im Reporter-Gen-Assay vermessen. Das Ergebnis wurde bestätigt (die Daten sind hier nicht gezeigt).

Durch die Verkürzung des 3'-Endes von -18 (pSEAP2-E-267) auf -80 (pSEAP2-E-206) kommt es zu einer Verringerung der Promotoraktivität. Bei der weiteren Verkürzung auf -99 (pSEAP2-E-187) steigt die Promotoraktivität hingegen an, so dass hier möglicherweise ein negativ-regulatorischer Bereich vorliegt. Das pSEAP2-E-142 weist im Vergleich zum pSEAP2-E-187 eine schwächere Aktivität auf, so liegt zwischen Position -99 und -143 wahrscheinlich ein positiv-regulatorischer Bereich. Selbiges gilt für den Bereich zwischen -18 und -80 .

4.1.6 Vorhersage möglicher Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen

Die oben aufgeführten Ergebnisse der Promotoranalysen sind hier noch einmal graphisch zusammengefasst. Dabei wird der durch das pSEAP2-E-267-Konstrukt repräsentierte Bereich der 5'-UTR von Position -18 bis -286 wiedergegeben. Der schwarze Bereich stellt den vermuteten (und später durch Punktmutation bei längeren Konstrukten bestätigten) Core-Promotor dar. Bei einer weiteren Verkürzung dieses Kernbereiches von 5' oder 3' sinkt die Promotoraktivität auf den Basislevel des Leervektors ab. Die verschiedenen Graustufen geben die unterschiedlich stark regulatorisch wirksamen Bereiche wieder, wobei dunkelgrau für eine hohe Aktivität und weiß für nahezu keine detektierbare Aktivität steht. Der gepunktete Bereich zeigt eine möglicherweise negativ-regulatorische Region auf.



Abbildung 4.10: Graustufen-Darstellung der unterschiedlich stark regulatorisch wirksamen Bereiche des C3aR-Promotors von Position -18 bis -286 .

Unter Zuhilfenahme der MatInspector[®] Professional Software Version 6.2 wurden putative Transkriptionsfaktorbindungsstellen in dem aufgeführten Bereich identifiziert.

Die vollständige Analyse ist im Anhang unter 6.3 dargestellt. Eine Auswahl interessant erscheinender Bindungsmotive ist im Folgenden aufgezeigt:

Name	Position (Strang)	Sequenz
<i>ATF binding site (CREB-family)</i>	- 96 (-)	acttcatgacttcactgtggc
<i>Signal transducer and activators of transcription</i>	- 159 (-)	acttattgccggaacacg
<i>c-Ets-1 binding site</i>	- 207 (+)	ctcacaggaagagtttc
<i>AP-1 binding site</i>	- 221 (-)	agaaatgactcactttgaaac
<i>AP-1 binding site</i>	- 225 (+)	caaagtgagtcatttctaaat
<i>cellular and viral TATA box element</i>	-273 (-)	gattataaactcctact

Tabelle 4.1: Auflistung ausgewählter Transkriptionsfaktorbindungsstellen der 5'-UTR des C3aR zwischen Position – 18 und – 286. Aufgeführt ist der Name des Bindemotivs, die Position in der 5'-UTR und die zugehörige Sequenz, wobei die für die Bindung essentiellen Basen hervorgehoben sind.

4.1.7 Der Transkriptionsfaktor Ets-1 als ein Regulator des C3aR-Promotors

Die MatInspector[®] Professional Software sagt eine Ets-1 Bindungsstelle im C3aR-Core-Promotor (schwarzer Bereich in Abbildung 4.10) an Position – 211 bis – 202 vorher. Der Transkriptionsfaktor Ets-1 spielt sowohl in Mastzellen als auch in anderen Zellen, in denen der C3aR exprimiert ist, eine wichtige Rolle. Um die Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors an der Regulation des C3aR-Promotors aufzuklären, wurde *ets-1* in HMC-1-Zellen alleine und in Gegenwart von *Ha-Ras* zur Überexpression gebracht. Das *small GTP-binding protein* Ras wird zur Aktivierung von Ets-1 benötigt. Ha-Ras stellt eine konstitutiv aktive Form dieses Proteins dar.

Parallel wurde ein Reportergenkonstrukt mit mutiertem Ets-1 Bindemotiv analysiert. Die TF-Bindungsstelle wurde mittels spezifischer PCR-Mutagenese (siehe 3.2.6) unter Zuhilfenahme der Primer SK04/05 verändert (Basenaustausch von **agg**aa zu **aag**aa an Position – 207, Durchführung auf DNA-Ebene von Frau Dr. Konrad). Hierzu diente das Promotorkonstrukt pSEAP2-E-267 (Wildtyp) als Matrize. Die mutierte Variante wird im Folgenden als 267_mutEts-1 bezeichnet.

Im anschließenden Reportergen-Assay zeigte sich, dass die Überexpression von Ets-1 am Wildtyp-Promotorkonstrukt lediglich zu einer schwachen Erhöhung der Aktivität führte. Ha-Ras bewirkte einen größeren Effekt. Die Ko-Transfektion von *ets-1* und *Ha-Ras* ging mit einem 6-fachen Anstieg der Promotoraktivität des pSEAP2-E-267 einher (graue Säulen in Abbildung 4.11).

Das Konstrukt mit mutiertem Ets-1 Bindemotiv wies bereits eine geringere Basisaktivität auf, welche durch die Überexpression von Ha-Ras lediglich schwach erhöht werden konnte (schwarze Säulen in Abbildung 4.11).

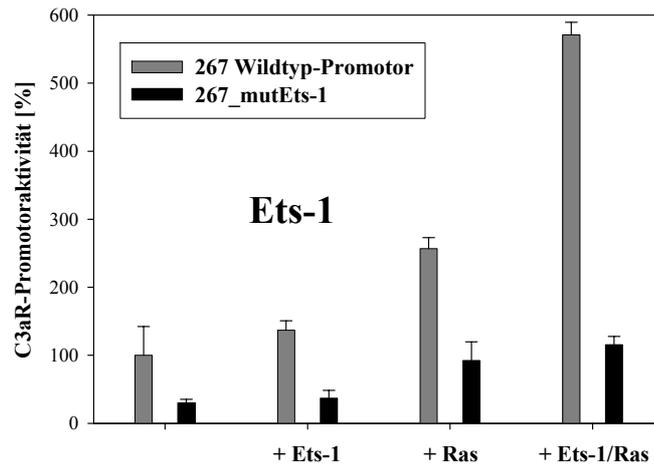


Abbildung 4.11: Effekt von transient überexprimiertem Ets-1 allein und in Gegenwart von Ha-Ras auf die Aktivität des pSEAP2-E-267 Wildtyp-Promotorkonstruktes und die Ets-1 Bindungsstellenmutante 267_mutEts-1 (mutiert an Position – 207) in HMC-1-Zellen. Die Prozentangaben der C3aR-Promotoraktivität beziehen sich auf die Aktivität des pSEAP2-E-267 mit 100 %. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (mit Doppelwerten in jedem Test).

4.1.8 AP-1 – ein zusätzlicher Regulator des C3aR-Promotors in HMC-1-Zellen

Eine AP-1 Bindungsstelle wurde von der MatInspector[®] Professional Software in räumlicher Nähe zum Ets-1 Bindemotiv vorhergesagt (Position – 227 bis – 219). Auch hier wurde ausgehend von dem Wildtyp-Promotorkonstrukt pSEAP2-E-267 eine Mutation der Bindungsstelle vorgenommen (Primer: SK06/07, Basenaustausch von *atgact* in *acaact* an Position – 225/226, Durchführung auf DNA-Ebene von Frau Dr. Konrad). Das resultierende Konstrukt wird im Folgenden als 267_mutAP-1 bezeichnet. Die Bezeichnung AP-1 und Jun/Fos werden als Synonyme verwendet.

Die Transkriptionsfaktoren Jun und Fos wurden alleine und in Gegenwart des aktivierend wirkenden Ha-Ras in HMC-1-Zellen überexprimiert. Die Ko-Transfektion aller drei Proteine führte zu einem 11-fachen Anstieg der Promotoraktivität des Wildtyp-Konstruktes. Jun alleine konnte keine Aktivitätssteigerung, Fos alleine lediglich eine sehr geringe und Ha-Ras alleine bereits einen 3-fachen Anstieg bewirken. Die Kombination aus Jun/Fos erzielte nahezu denselben Effekt wie Ras alleine. Eine Überexpression von Jun und Ras führt hingegen zu einer 5-fachen Erhöhung der Promotoraktivität (graue Säulen in Abbildung 4.12).

Schon die Basisaktivität des Konstruktes mit mutiertem AP-1 Bindemotiv war im Vergleich zum Wildtyp-Promotor verringert. Die Ko-Transfektion von AP-1 und/oder Ha-Ras konnte lediglich eine geringe Aktivitätssteigerung bewirken (schwarze Säulen in Abbildung 4.12).

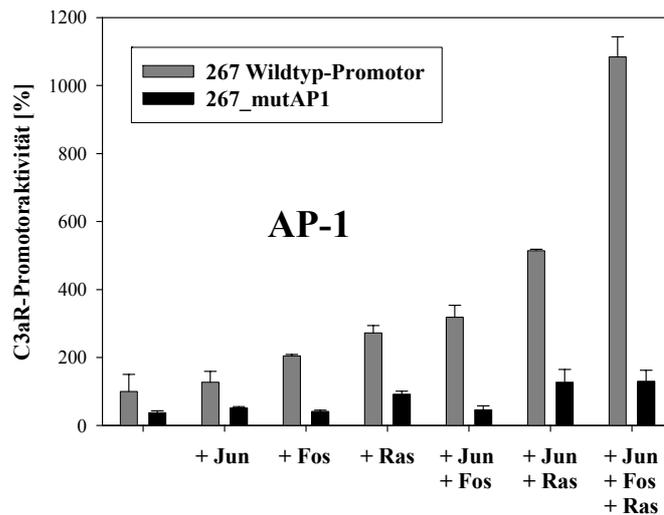


Abbildung 4.12: Effekt von transient überexprimiertem c-Jun und/oder c-Fos und/oder Ha-Ras auf die Aktivität des pSEAP2-E-267 Wildtyp-Promotorkonstruktes und die AP-1 Bindungsstellenmutante 267_mutAP-1 (mutiert an Position – 225/226) in HMC-1-Zellen. Die Prozentangaben der C3aR-Promotoraktivität beziehen sich auf die Aktivität des pSEAP2-E-267 mit 100 %. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (mit Doppelwerten im Test).

4.1.9 Kooperation von Ets-1 und AP-1

Zur Beantwortung der Frage ob Ets-1 und AP-1 kooperative Regulatoren des C3aR-Promotors sind, wurden HMC-1-Zellen mit den Plasmiden pSEAP2-E-267, 267_mutEts-1 und 267_mutAP-1 transient transfiziert. Alle drei Konstrukte wurden mit *ets-1* und *AP-1* alleine und in Gegenwart von *Ha-Ras* ko-transfiziert und im Reporteragen-Assay auf ihre Aktivität hin vermessen.

Die Überexpression beider Transkriptionsfaktoren führte, im Vergleich zu der alleinigen Ko-Transfektion mit Ets-1 oder AP-1, zu einer additiven Erhöhung der Promotoraktivität des Wildtyp-Konstruktes (hellgraue Säulen in Abbildung 4.13). Zur näheren Aufschlüsselung dieser Kooperation wurden die Konstrukte mit mutiertem Ets-1 bzw. AP-1 Bindemotiv ebenfalls in Gegenwart der Transkriptionsfaktoren untersucht.

Wie in der Abbildung 4.11 bereits ersichtlich war, bestätigt sich hier noch einmal, dass die Überexpression von Ets-1 am 267_mutEts-1-Konstrukt bzw. von Jun/Fos an der AP-1 Bindungsstellenmutante wie zu erwarten nicht zu einer Erhöhung der Promotoraktivität führt.

Überexprimiertes Ets-1 reguliert die Promotoraktivität des Konstruktes mit mutiertem AP-1 Bindemotiv hoch (dunkelgraue Säulen in Abbildung 4.13). Der durch Jun/Fos erzielte Effekt auf die Ets-1 Bindungsstellenmutante fällt hingegen wesentlich geringer aus (schwarze Säulen in Abbildung 4.13).

Die Überexpression beider Transkriptionsfaktoren führt an keinem der beiden Konstrukte mit mutiertem Bindemotiv zu einer höheren Promotoraktivität als die Überexpression mit dem zugehörigen einzelnen Transkriptionsfaktor.

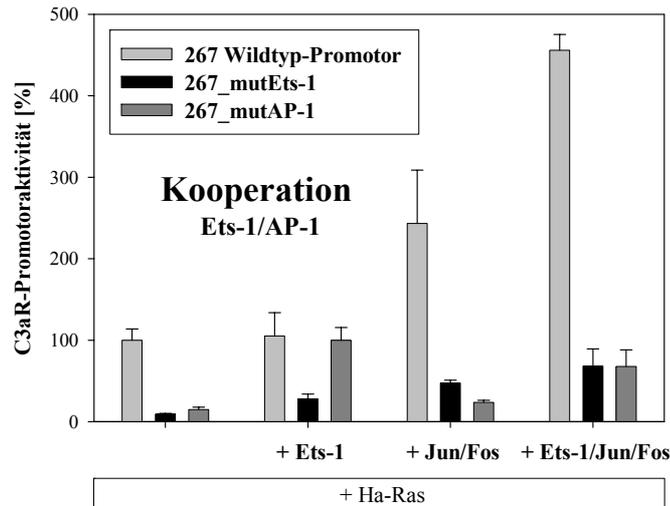


Abbildung 4.13: Effekt der transienten Überexpression von Ets-1 und/oder AP-1 in Gegenwart von Ha-Ras auf die Aktivität des pSEAP2-E-267 Wildtyp-Promotorkonstruktes und die Konstrukte mit mutiertem TF-Bindemotiv, 267_mutEts-1 (mutiert an Position – 207) bzw. 267_mutAP-1 (mutiert an Position – 225/226), in HMC-1-Zellen. Die Prozentangaben der C3aR-Promotoraktivität beziehen sich auf die Aktivität des pSEAP2-E-267 mit 100 %. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (mit Doppelwerten im Test).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Überexpression des Transkriptionsfaktors Ets-1 oder AP-1 (in Gegenwart von Ha-Ras) zu einer Steigerung der Promotoraktivität des humanen C3aR führt. Nach Mutation des jeweiligen Bindemotivs ist dieser Effekt nicht mehr zu verzeichnen. Diese Ergebnisse weisen stark daraufhin, dass exogen zugeführtes Ets-1 oder AP-1 an den C3aR-Promotor binden. Die Basispromotoraktivität der beiden mutierten Konstrukte 267_mutEts-1 und 267_mutAP-1 ist geringer als die des Wildtyp-Promotors. Dies legt nahe, dass die beiden entsprechenden Transkriptionsfaktoren auch endogen in HMC-1-Zellen vorhanden sind und auf das Promotorkonstrukt wirken.

Bei der kombinierten Überexpression von Ets-1 und AP-1 ist eine additive Erhöhung der Promotoraktivität des C3aR zu beobachten, so dass man von einer kooperativen Bindung dieser beiden Transkriptionsfaktoren ausgehen kann. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um einen gerichteten Effekt, da Ets-1 an dem Konstrukt mit mutiertem AP-1 Bindemotiv noch wirken kann, anders herum jedoch nicht. So besteht die Möglichkeit, dass zuerst der Transkriptionsfaktor Ets-1 gebunden haben muss, bevor es zur Bindung von AP-1 kommen kann.

4.1.10 Effekte von Ets-2 auf die „Ets-1-Bindungsstelle“

Das von der MatInspector[®] Professional Software vorhergesagte Ets-1 Bindemotiv wurde nach den Angaben von Santa Cruz so mutiert (siehe 4.1.7), dass spezifisch die Bindung des Ets-1 Transkriptionsfaktors inhibiert ist. Um zu überprüfen, ob ein weiteres Mitglied der Ets-Familie ebenfalls an den C3aR-Promotor bindet, wurde der Transkriptionsfaktor Ets-2 in

Gegenwart des Wildtyp-Promotors und des Konstruktes mit mutiertem Ets-1 Bindemotiv in HMC-1-Zellen zur Überexpression gebracht. Zusätzlich wurde auch hier der Effekt von AP-1 alleine und in Gegenwart von Ets-1 bzw. Ets-2 untersucht. Das zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren benötigte Ha-Ras wurde bei allen Ansätzen ko-transfiziert.

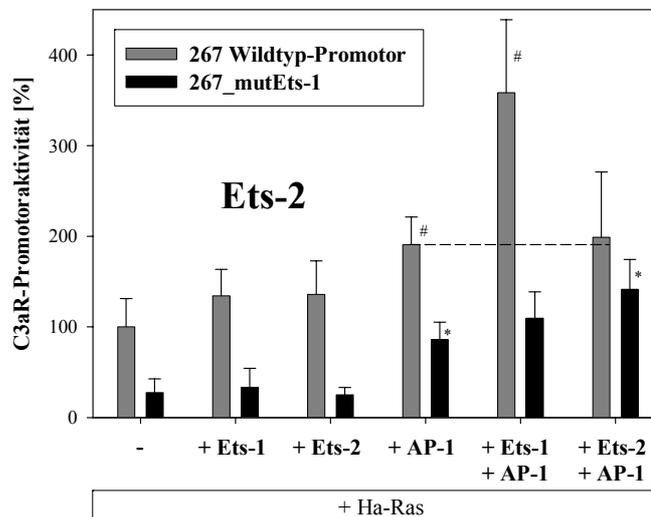


Abbildung 4.14: Effekt der transienten Überexpression von Ets-1 oder Ets-2 in Gegenwart von AP-1 auf die Aktivität des pSEAP2-E-267 Wildtyp-Promotorkonstruktes und das Konstrukt mit mutiertem Ets-1 Bindemotiv, 267_mutEts-1 (mutiert an Position – 207), in HMC-1-Zellen. Ha-Ras wurde bei allen Ansätzen ebenfalls ko-transfiziert. Die Prozentangaben der C3aR-Promotoraktivität beziehen sich auf die Aktivität des pSEAP2-E-267 mit 100 %. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (mit Dreifachwerten in jedem Test). Signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) sind mit # bzw. * gekennzeichnet. Bei denen durch eine gestrichelten Linie verbundenen Säulen konnte keine signifikante Abweichung detektiert werden ($p > 0,6$).

Während in der Kontroll-Transfektion Ets-1 und AP-1 synergistisch auf den C3aR-Wildtyp-Promotor wirken, ist dies bei Ets-2 und AP-1 nicht der Fall. Dies spricht dafür, dass Ets-2 nicht mit dem C3aR-Promotor interagiert. Erstaunlicherweise ist eine kleine, aber signifikante Steigerung der AP-1 Wirkung durch Ets-2 auf den C3aR-Promotor mit mutiertem Ets-1-Bindemotiv zu beobachten.

4.1.11 Mutation zweier putativer CREB-Bindungsdomänen im C3aR-Promotor

An den Positionen – 96 und – 197 der 5'-UTR des humanen C3aR wurden von der MatInspector® Professional Software Version 5.1 CREB-Bindungsstellen vorausgesagt. Eine Stimulation mit Bt₂-cAMP führt in der myeoblastischen Zelllinie U937 zu einer Induktion des C3aR [75]. cAMP-abhängige Signalwege führen unter anderem zu der Aktivierung des *cAMP-response element binding-proteins* (CREB) und dessen Bindung an das CRE-Motiv.

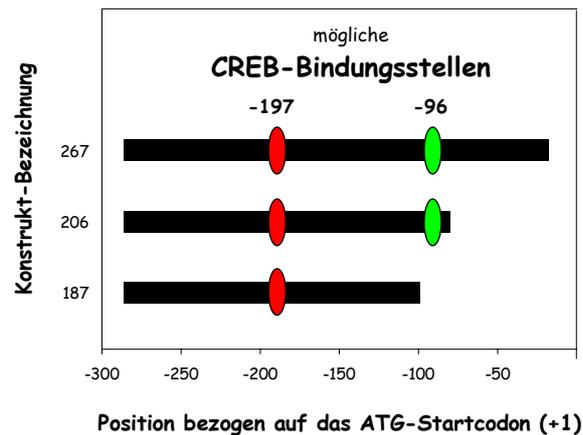


Abbildung 4.15: Darstellung der putativen CREB-Bindungsstellen in den drei Promotorkonstrukten pSEAP2-E-267, -206 und -187.

Das Promotorkonstrukt pSEAP2-E-206 enthält beide CREs, das pSEAP2-E-187 hingegen nur die an Position – 96. So wurde in einer ersten Versuchsreihe das CRE an Position – 197 in diesen beiden Konstrukten mittels spezifischer PCR-Mutagenese verändert (*tgacgtca* zu *tgttgtca*, Primer SK08/09). Die resultierenden Promotorkonstrukte 187_mutCREB und 206_mutCREB wurden neben den jeweiligen Wildtyp-Promotorkonstrukten transient in HMC-1-Zellen transfiziert und im Reporteragen-Assay analysiert. Zusätzlich wurden die transfizierten Zellen für 72 Stunden mit Bt₂-cAMP [1 mM] stimuliert.

Es zeigte sich, dass Bt₂-cAMP leider zu einer Induktion der β -Galaktosidase führte, so dass die Normalisierung der SEAP-Intensitäten mit den β -Gal-Werten in diesen Versuchen nicht sinnvoll war. In den nachfolgenden Experimenten wurden daher ausschließlich die SEAP-Intensitäten bestimmt.

Von den beiden CREB-Mutanten wurden jeweils zwei unabhängige Klone vermessen.

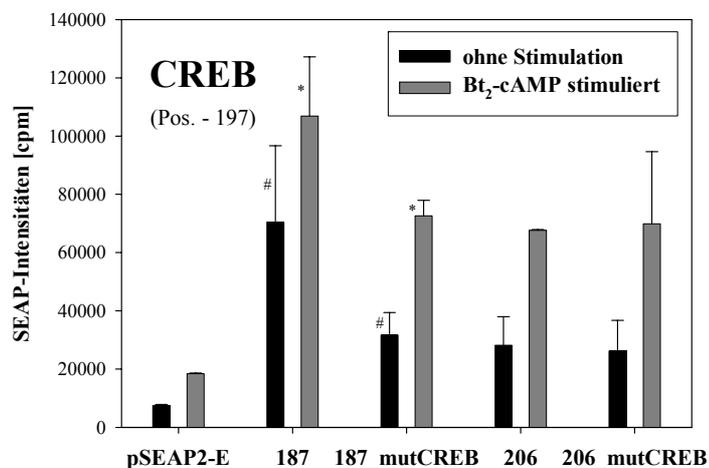


Abbildung 4.16: Ergebnisse des SEAP-Assays nach transienter Transfektion von HMC-1-Zellen mit dem Reportervektor pSEAP2-E, den Wildtyp-Promotorkonstrukten pSEAP2-E-206 und -187 sowie den CREB-Bindungsstellenmutanten 206_mutCREB und 187_mutCREB. Die CREB-Bindungsstelle wurde an

Position – 197/198 mutiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von je zwei unabhängigen Transfektionen (mit Doppelwerten im SEAP-Test), wobei die Intensitäten von je zwei unabhängigen Klonen mit mutiertem CREB-Bindemotiv zusätzlich gemittelt worden sind. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit # bzw. * gekennzeichnet.

In Abbildung 4.16 ist zu erkennen, dass die Promotoraktivität vom pSEAP2-E-187 zum 187_mutCREB sowohl in unbehandelten, als auch in HMC-1-Zellen, die mit Bt_2 -cAMP stimuliert waren, signifikant abfällt. Hingegen ist vom pSEAP2-E-206 zum 206_mutCREB sowohl in unstimulierten, als auch in Bt_2 -cAMP-behandelten Zellen, keine signifikante Abnahme zu verzeichnen. Nach Stimulation mit Bt_2 -cAMP verdoppeln sich die SEAP-Intensitäten aller Konstrukte. Die Promotoraktivität des Kontrollvektors (kodiert nicht für das SEAP-Enzym) stieg um ca. 20 % an (nicht gezeigt), somit scheint es sich dabei um einen unspezifischen, C3aR-Promotor unabhängigen Effekt zu handeln.

Bei der erneuten Analyse der 5'-UTR des humanen C3aR von Position – 18 bis – 286 mit einer neueren Version (6.2) des MatInspectors[®] wurde keine CRE-Motiv an Position – 197 vorhergesagt. Da jedoch, wie oben schon beschrieben wurde, eine Stimulation mit Bt_2 -cAMP zur Hochregulation des C3aR führt, wurde in einer zweiten Versuchsreihe das CRE an Position – 96 der 5'-UTR des humanen C3aR mutiert. Bei der spezifischen PCR-Mutagenese dieses Motivs wurde durch die Primer MS27/28 ein Basenaustausch von *tgactt* zu *tgtgtt* eingeführt. Das resultierende Promotorkonstrukt 267_mutCREB wurde wiederum neben dem Wildtyp-Konstrukt pSEAP2-E-267 transient in HMC-1-Zellen transfiziert und im Reporteragen-Assay auf seine Aktivität hin überprüft. Auch hier fand eine 72-stündige Stimulation mit Bt_2 -cAMP statt.

Es wurden zwei unabhängige Klone des 267_mutCREB-Konstruktes ohne (schwarze Säulen) und nach Stimulation mit Bt_2 -cAMP (graue Säulen) vermessen.

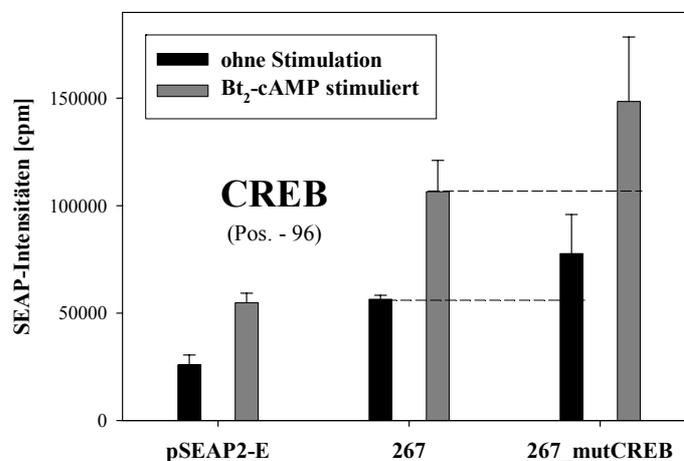


Abbildung 4.17: Ergebnisse des SEAP-Assays nach transienter Transfektion von HMC-1-Zellen mit dem Reportervektor pSEAP2-E, dem Wildtyp-Promotorkonstrukt pSEAP2-E-267 und der CREB-Bindungsstellenmutante 267_mutCREB. Die CREB-Bindungsstelle wurde an **Position – 96/97** mutiert. Dargestellt sind

Mittelwert und Standardabweichung von je vier unabhängigen Transfektionen (mit Doppelwerten im SEAP-Test), wobei die Intensitäten von zwei unabhängigen Klonen mit mutiertem CREB-Bindemotiv zusätzlich gemittelt worden sind. Bei den durch gestrichelte Linien verbundenen Säulen konnte keine signifikante Abweichung verzeichnet werden ($p > 0,05$).

Wie in Abbildung 4.17 anschaulich demonstriert ist, ist die Aktivität des 267_mutCREB-Konstruktes nicht signifikant niedriger als die des Wildtyp-Promotorkonstruktes (schwarze Säulen). Nach der Stimulation mit Bt₂-cAMP ist eine leichte Zunahme der Promotoraktivität des mutierten Konstruktes im Vergleich zum pSEAP2-E-267 zu beobachten (graue Säulen), die jedoch aufgrund der vorliegenden Fehler nicht signifikant ist. Auch hier führt die Stimulation mit Bt₂-cAMP nahezu zu einer Verdopplung aller Promotoraktivitäten. Die Intensität des Kontrollvektors (kodiert nicht für das SEAP-Enzym) stieg wiederum um etwa 20 % an (nicht gezeigt).

4.1.12 Aufbau verschiedener quantitativer *real-time* RT-PCRs

Mittels quantitativer *real-time* RT-PCR wurde einerseits die konstitutive Expression von Genen (Ets-1) auf verschiedenen Zelllinien überprüft. Andererseits bietet diese Technologie die Möglichkeit, quantitativ die Expression eines bestimmten Gens zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen zu bestimmen (C3aR-mRNA, C5aR-mRNA). Drittens wurden mit dieser Methode einige Ergebnisse der Atlas™ cDNA Expression Arrays überprüft (siehe 4.5.11).

Die unter 2.6 aufgezeigten Primer und Sonden wurden nach den unter 3.2.11 beschriebenen Kriterien generiert. An dieser Stelle sei exemplarisch für ein Gen, den humanen C5aR, das Verfahren zur Überprüfung der Primer für die Verwendbarkeit in der *real-time* RT-PCR beschrieben. Zuerst wurde ausgetestet, ob die Primer bei der gewünschten Annealing-Temperatur in einer herkömmlichen PCR ein Amplifikat entsprechender Länge ergaben. Nach diesem Test wurde eine Primermatrix erstellt, um die bestmögliche Kombination der Primerkonzentrationen im Ansatz zu ermitteln. In Tabelle 4.2 ist das Ergebnis der Primermatrix dargestellt. Hier hat sich eine Primerkonzentration von 900 pmol/ml im Endansatz von beiden Primern als die günstigste mit dem größten Signal-Rauschabstand (≥ 40 versus 19 Zyklen) erwiesen. Zusätzlich wurden die einzelnen Proben im Agarosegel daraufhin überprüft, ob sich außer dem gewünschten Amplifikat noch weitere gebildet haben. Dies ist in der Regel eine unerwünschte Amplifikation der Primer selbst (Primer-Dimere). Als Qualitätskontrolle dienten weiterhin die Dissoziationskurven der PCR-Läufe, die von der ABI-Prism 7000 SDS-Software aufgenommen wurden. Aus diesen Dissoziationskurven lässt sich ebenfalls auf das Vorhandensein von unerwünschten, zusätzlichen Amplifikaten schließen.

Für die verwendeten Primer für den humanen C5aR wurden keine anderen Amplifikate als das gewünschte 112 bp-Amplifikat aus der cDNA gefunden (Daten nicht gezeigt).

Primerverhältnis	C _T -Wert	Mittelwert	Standardabweichung	Differenz C _T K- C _T
50/50 K	40 40	40	0	14,5
50/50	25,58 25,35	25,47	0,17	
50/300 K	40 40	40	0	16,9
50/300	23,11 23,11	23,11	0,00	
50/900 K	40 40	40	0	18,1
50/900	22,2 21,66	21,93	0,389	
300/50 K	40 27,12	33,56	9,11	12,5
300/50	21,13 21,09	21,11	0,03	
300/300 K	34,57 38,4	36,49	2,71	17,2
300/300	19,28 19,31	19,30	0,03	
300/900 K	40 40	40	0	21,0
300/900	18,99 18,95	18,97	0,02	
900/50 K	34,04 34,32	34,18	0,20	13,2
900/50	21,31 20,65	20,98	0,46	
900/300 K	40 39,99	40,00	0,01	20,9
900/300	19,05 19,17	19,11	0,09	
900/900 K	40 40	40	0	21,3
900/900	18,69 18,79	18,74	0,07	

Tabelle 4.2: Ergebnisse der Primermatrix für den humanen C5aR. In der ersten Spalte stehen das Primerverhältnis (in pmol/ml im Endansatz) und die Angabe, ob der Ansatz cDNA enthält oder nicht (K). Es folgen die C_T-Werte der einzelnen Primerkombinationen, deren Mittelwerte und Standardabweichungen. In der letzten Spalte sind die Differenzen der C_T-Werte der gleichen Primerkombination mit und ohne cDNA aufgeführt, der Wert mit der größten Differenz ist hervorgehoben. Er wird für die späteren eigentlichen Messungen verwendet. Für Proben, bei denen kein Amplifikat entstand, wurde die maximale Zykluszahl (40) eingesetzt.

Die Ergebnisse aller Primermatrixes sind in der

Tabelle 4.3 aufgelistet.

Primerpaar (Gen)	Primer-Bezeichnung	Primerverhältnis im Ansatz [pmol/ml]	C _T -Primer K – C _T -Primer
C5aR hs	MS20-22	900/300	21
C3aR hs	JP25-27	900/900	14
RPS9 hs	RPS9 Sense + RAS	50/50	17
IL-6 hs	IL-6 Sense + RAS	900/900	9
Ets-1 hs	Ets-1 Sense + RAS	300/900	15
CCL3 hs	MS37-38	900/300	25
HM74 hs	MS33-34	300/300	20
GEM hs	MS35-36	50/300	18

Tabelle 4.3: Ergebnisse der Primermatrizes für die verwendeten Primerpaare. Das IL-6 Primerpaar wurde von J. Buer (GBF, Braunschweig) übernommen. Die Ets-1 Primermatrix wurde freundlicherweise von Frau K. Endlich durchgeführt.

Vorbereitung der Proben:

Grundsätzlich wurde die RNA aus unbehandelten, stimulierten oder transfizierten Zellen, wie unter 3.2.17.1 beschrieben, aufgereinigt und je 5 µg in cDNA umgeschrieben (siehe 3.2.9). Es erfolgte stets eine Überprüfung der RNA im denaturierenden Agarosegel, um eine Degradation auszuschließen. In einer PCR mit Primern für das Haushaltsgen RPS9 wurde die Güte der cDNA überprüft. Bei jeder Versuchsreihe wurde mindestens eine Probe während der cDNA nicht mit Reverser Transkriptase versetzt, so dass in der anschließenden PCR überprüft werden konnte, ob eine Verunreinigung mit genomischer DNA vorliegt.

Überprüfung des Systems:

Zur Überprüfung der aufgebauten quantitativen *real-time* RT-PCR wurden U937 Zellen für 72 Stunden mit Bt₂-cAMP stimuliert und die Hochregulation des C3aR bzw. C5aR analysiert. Wie in der Literatur beschrieben [74;75] konnte für den C5aR ein Regulationsfaktor von ~ 100 und für den C3aR ein Regulationsfaktor von ~ 10 erhalten werden. Nach Möglichkeit wurde die cDNA aus Bt₂-cAMP-stimulierten Zellen bei folgenden *real-time* RT-PCR Analysen als Positivkontrolle mitgeführt.

In den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurde die hier etablierte quantitative *real-time* RT-PCR sowohl zur Untersuchung der Regulation des C3aR (und C5aR) auf mRNA-Ebene sowie zur Überprüfung einiger Gene, die sich bei der Expressionsanalyse monozytärer Zellen im Atlas™ Array als reguliert erwiesen hatten (siehe 4.5.11), eingesetzt.

4.1.13 Induktion der C3aR-mRNA auf HEK293-Zellen durch die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-1

In HMC-1-Zellen kann eine Hochregulation des endogenen C3aR-Gens durch transient transfiziertes *ets-1*, *AP-1* und (*Ha-Ras*) aufgrund der geringen Transfektionseffizienz und dem hohen Hintergrund an konstitutiv vorhandener C3aR-mRNA nicht untersucht werden.

Deshalb wurden die beiden Transkriptionsfaktoren und das zur Aktivierung benötigte Ha-Ras in der humanen frühembryonalen Zelllinie HEK293 zur Überexpression gebracht und mittels *real-time* RT-PCR die möglicherweise resultierende Hochregulation des C3aR analysiert.

Die HEK-Zellen wurden nach der Lipofectamine™-Methode, wie unter 3.2.13.1 beschrieben, transient transfiziert und die RNA nach 48 h bzw. 72 h geerntet. Die *real-time* RT-PCR für den humanen C3aR wurde unter Verwendung der Primer JP25/26 und der TaqMan®-Sonde JP27 mit dem QuantiTect Probe PCR-Kit (Qiagen) durchgeführt (siehe 4.1.12). Zur Normalisierung wurde das humane Haushaltsgen RPS9 verwandt (SYBR® *Green PCR Core Reagent Kit*, Applied Biosystems).

Der Tabelle 4.4 ist zu entnehmen, dass die für den C3aR kodierende mRNA aus TF-exprimierenden HEK-Zellen ungefähr um den Faktor 10 im Vergleich zu nicht-transfizierten, aber ansonsten gleich behandelten Zellen, erhöht ist (drei unabhängige Experimente).

Zeitpunkt nach Transfektion von Ets-1, AP-1 und Ha-Ras in HEK293-Zellen	C3aR-mRNA		
	[Induktionsfaktor im Vergleich zur Kontroll- Transfektion; bestimmt mittels <i>real-time</i> RT-PCR]		
	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3
48 h	11	7,5	9,5
72 h	8,6	10,5	5,4

Tabelle 4.4: *Real-time* RT-PCR Analyse der nach transienter Überexpression von Ets-1, AP-1 und Ha-Ras in HEK293-Zellen resultierenden Hochregulation der C3aR-mRNA. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten (je Mittelwert aus Doppelwerten).

Parallel wurde untersucht, ob die Überexpression von Ets-1, AP-1 und Ha-Ras in HEK293-Zellen ebenfalls zu einer Hochregulation des humanen C5aR führt. Hier konnte jedoch kein Effekt verzeichnet werden, so dass die regulierende Wirkung der Transkriptionsfaktoren spezifisch für den C3aR zu sein scheint.

4.1.14 ¹²⁵I-C5a-Bindungsstudie nach Transfektion von HEK293 mit den Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-1

Mittels quantitativer *real-time* RT-PCR konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-1 in HEK293-Zellen zu einer Induktion der C3aR-mRNA führt (Faktor ~ 10). Diese relativ geringe Induktion kann auf Proteinebene mittels ¹²⁵I-C3a-Bindungsstudie nicht untersucht werden, da der Hintergrund an unspezifischer Bindung für C3a dafür zu hoch ist.

Auf mRNA-Ebene konnte für den C5aR keine Induktion durch die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-1 gezeigt werden. Mittels semiquantitativer ¹²⁵I-C5a-Bindungsstudie wurde überprüft, ob sich dieser Befund auf Proteinebene bestätigen lässt. Da es sich hierbei um ein wesentlich präziseres System handelt als bei den ¹²⁵I-C3a-Bindungsstudien und der Hintergrund an unspezifischer Bindung bei diesem Anaphylatoxin um ein Vielfaches geringer ist, war eine Messung möglich.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen unter 4.1.13 wurde keine Induktion des C5aR auf HEK293-Zellen, die mit Ets-1 und AP-1 transfiziert waren, im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen detektiert (Daten nicht gezeigt).

4.1.15 Durchflußzytometrische Untersuchung der Induktion des C3aR auf HEK293-Zellen nach Transfektion mit den Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-1

Zur Überprüfung der Induktion des C3aR durch die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-1 auf Proteinebene wurde eine durchflußzytometrische Analyse durchgeführt.

Die HEK293-Zellen wurden hierzu, wie unter 3.2.13.3 beschrieben, im 6-well-Maßstab mit selbst hergestellter Calcium-Phosphat-Lösung transfiziert. Zum Ausgleich schwankender Transfektionseffizienzen wurden pro Bedingung jeweils drei *wells* transfiziert und später für die FACS-Analyse gepoolt.

Obwohl man in HEK293-Zellen mit dieser Methode etwa 30 – 40 % der Zellen positiv transfiziert, besteht das Problem, dass bei der Untersuchung der durch Ets-1 und AP-1 ausgelösten Effekte alle vier Plasmide parallel in die Zellen eingebracht werden müssen (c-Jun, c-Fos, Ets-1 und Ha-Ras). Die Wahrscheinlichkeit, eine Zelle mit allen vier Plasmiden zu erreichen, ist natürlich geringer, als wenn nur mit einem Plasmid transfiziert wird. Aufgrund dieser Problematik wurde parallel untersucht, ob ein *Gating* der positiv-transfizierten Zellen mittels hrGFP möglich ist (Vektor phrGFP-1, Stratagene). Hierbei handelt es sich um ein Derivat von eGFP, welches sich durch eine verringerte Toxizität auszeichnet. Dieser Vektor wurde in die Zellen ko-transfiziert. Von jedem Vektor wurde $\frac{1}{4}$ (ohne hrGFP) bzw. $\frac{1}{5}$ (mit hrGFP) der DNA-Menge eingesetzt (insgesamt 10 µg). Als Negativkontrolle wurde der

Vektor pcDNA3.1/HisB und als Positivkontrolle der Vektor pcDNA3-hC3aRwt jeweils alleine bzw. in Kombination mit hrGFP transfiziert.

Die FACS-Analyse wurde, wie unter 3.1.1.2 beschrieben, durchgeführt.

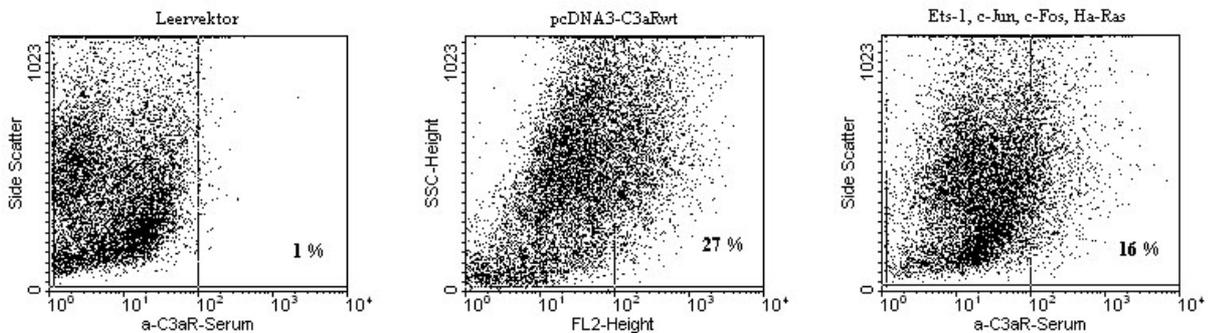


Abbildung 4.18: FACS-Analyse der transfizierten HEK293-Zellen. Der erste Dotplot spiegelt die Negativkontrolle (Leervektor/pcDNA3.1HisB-transfizierte Zellen) und der zweite Dotplot die Positivkontrolle (pcDNA3-C3aRwt-transfizierte Zellen) wieder. Im dritten Dotplot sind die nach Transfektion mit den vier Plasmiden pcDNA3-Ets-1, c-Jun, c-Fos und Ha-Ras markierten Zellen aufgeführt. Die Prozentzahlen geben die Anzahl der Zellen wieder, die den C3aR exprimieren, gefärbt mit dem polyklonalen anti-C3aR-Antiserum.

In der Abbildung 4.18 ist anschaulich dargestellt, dass etwa 26 % der Zellen nach Transfektion mit dem Positivkontrollplasmid (pcDNA3-C3aRwt) den C3aR exprimieren. Nach Transfektion mit den vier Plasmiden pcDNA3-Ets-1, c-Jun, c-Fos und Ha-Ras konnte bei etwa 15 % der Zellen eine Induktion des C3aR durchflußzytometrisch nachgewiesen werden.

Bei zusätzlicher Ko-Transfektion mit dem hrGFP-Plasmid wurden die FL-1-positiven Zellen *gated* und anschließend erneut die Expression des C3aR im FL-2-Kanal analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass der Prozentsatz an C3aR-exprimierenden Zellen durch das *Gaten* nicht weiter erhöht wurde (Daten nicht gezeigt).

ZUSAMMENFASSEND konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass der C3aR, zumindest in HMC-1-Zellen, höchstwahrscheinlich einen multiplen Transkriptionsstart aufweist. Mutationen von potentiellen TATA-Sequenzen weisen auf einen TATA-losten Promotor hin. Im Reporter-gen-Assay konnte der C3aR-Promotor mittels eines Sets von Verkürzungsmutanten eingegrenzt werden. Ein etwa 300 bp langer Bereich 5' vor dem ATG-Startkodon stellte sich hierbei als wichtig für die transkriptionelle Regulation des Rezeptors heraus. Nach Analyse mit entsprechender Software (MatInspector[®]) wurde eine Reihe potentieller Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in diesem Bereich aufgezeigt. Durch die Überexpression des Transkriptionsfaktors Ets-1 (in Gegenwart des zur Aktivierung benötigten Ha-Ras) wurde die Expression eines Reporter-genkonstruktes drastisch erhöht. Nach

Zerstörung des Ets-1 Bindemotivs war dies nicht mehr der Fall. Die Promotoraktivität des mutierten Konstruktes war auch schon ohne Ko-Transfektion stark vermindert. Dies legt die Beteiligung von endogenem Ets-1 nahe. In unmittelbarer Nähe zur Bindungsstelle von Ets-1 befindet sich ein Bindemotiv für AP-1. Eine Kooperation dieser beiden Transkriptionsfaktoren ist häufig beschrieben. In Analogie zum Ets-1 steigerten die überexprimierten AP-1 Komponenten c-Jun und c-Fos (in Kombination mit Ha-Ras) die Aktivität des C3aR-Promotors. Über PCR-Mutagenese konnte auch hier die vorhergesagte Bindungsstelle bestätigt werden. Ets-1 und AP-1 wirkten bei der C3aR Regulation synergistisch.

In HEK293-Zellen konnte eine Induktion des C3aR durch die beiden Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-1 auf mRNA-Ebene mittels quantitativer *real-time* RT-PCR sowie auf Proteinebene mittels FACS-Analyse gezeigt werden.

4.2 Identifizierung neuer Induktoren der C3aR-Expression

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde hauptsächlich die Regulation der konstitutiven Expression des C3aR auf der humanen Mastzelllinie HMC-1 sowie die Überexpression von Transkriptionsfaktoren untersucht.

Nachfolgend wurde im Unterschied dazu die Induktion des C3aR (und C5aR) durch verschiedene Stimuli auf der myeloblastischen Zelllinie U937 analysiert. Unstimulierte U937-Zellen exprimieren diese Rezeptoren nur in sehr geringem Maße.

4.2.1 Screening mittels Reporteragen-Assay

Frau Bettina Sohns beschrieb in ihrer Dissertation den mittels Reporteragen-Assay detektierten Aktivitätsanstieg verschiedener C3aR-Promotorkonstrukte nach Stimulation mit Zytokinen. Dieses System sollte hier weiter ausgebaut werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Stimulation mit den verwandten Zytokinen eine Induktion der zur Normalisierung eingesetzten β -Galaktosidase zur Folge hatte (Daten nicht gezeigt). Daher wurde von weiteren Untersuchungen mit dieser Methode abgesehen.

4.2.2 Screening mittels semiquantitativer kompetitiver ^{125}I -Bindungsstudie

Mittels semiquantitativer kompetitiver ^{125}I -Bindungsstudie wurde die durch verschiedene Stimuli induzierte Induktion der Anaphylatoxin-Rezeptoren auf der myeloblastischen Zelllinie U937 untersucht. Konstitutiv exprimierende HMC-1-Zellen stellen wegen des hohen Rezeptor-Hintergrundes kein geeignetes System für diese Untersuchungen dar.

Aufgrund der geringen unspezifischen Bindung von ^{125}I -C5a, die in der Regel zu klareren Ergebnissen führt als die von ^{125}I -C3a, wurde hier mit Bindungsstudien begonnen.

Der Abbildung 4.19 ist zu entnehmen, dass die bereits beschriebene Induktion des C5aR durch Bt_2 -cAMP und $\text{IFN-}\gamma$ [74;75] bestätigt werden konnte. Eine Induktion durch den Wachstumsfaktor GM-CSF und das Zytokin $\text{TNF-}\alpha$ konnte nicht detektiert werden. Die

Zytokine IL-1, IL-3 und IL-6 führten zu verschiedenen Zeitpunkten zu einer schwachen Erhöhung der Rezeptorenzahl. Die Signaldifferenz mit und ohne unmarkierten Verdränger ist jedoch im Vergleich zu den für den physiologischen Induktor IFN- γ erhaltenen Intensitäten sehr gering.

Aufgrund dieser Ergebnisse und der oben angesprochenen technischen Limitierung wurde von einem Screening mittels ^{125}I -C3a-Bindungsstudie abgesehen.

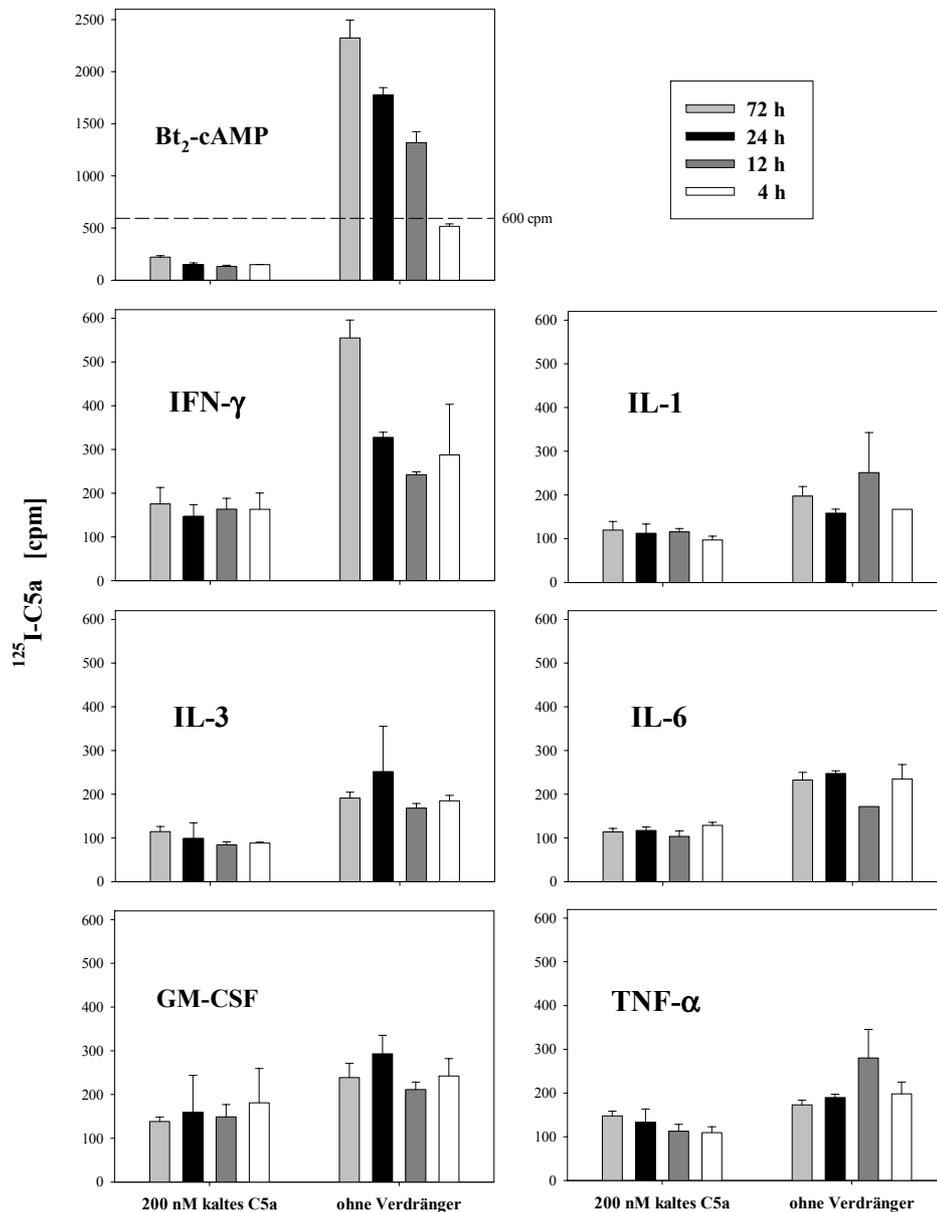


Abbildung 4.19: Ergebnisse der zum Screening eingesetzten semiquantitativen kompetitiven ^{125}I -C5a-Bindungsstudie. U937-Zellen wurden für 72, 24, 12 und 4 h (siehe Legende, rechts oben) mit Bt₂-cAMP [1 mM], IFN- γ [300 U/m], IL-1 [10 ng/ml], IL-3 [50 ng/ml], IL-6 [100 ng/ml], GM-CSF [50 ng/ml] und TNF- α [100 ng/ml] stimuliert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von Dreifachwerten aus einem Experiment. Die spezifische Bindung als Maß für die Anzahl der induzierten C5aR ergibt sich aus der Differenz von Gesamtbindung (ohne Verdränger) und unspezifischer Bindung (mit 200 nM nicht-markiertem C5a). Auf die abweichende Skalierung bei der Graphik für die Bt₂-cAMP stimulierten Zellen ist zu achten (600 cpm sind mit gestrichelter Linie hervorgehoben).

4.2.3 TNF- α als ein neuer Induktor der C3aR-Expression

Der Transkriptionsfaktor Ets-1 wird in unterschiedlichen Zellen durch das proinflammatorische Zytokin TNF- α hochreguliert [136;137]. Somit bestand die Annahme, dass dieses auch in U937-Zellen der Fall sein könnte und dass es dadurch zu einer Hochregulation der C3aR-mRNA kommt.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden U937-Zellen, die den C3aR nur sehr schwach exprimieren, für verschieden lange Zeiträume mit 50 ng/ml TNF- α (oder Puffer zur Kontrolle) stimuliert. Die Expressionskinetik der C3aR-mRNA wurde mittels *real-time* RT-PCR wie unter 4.1.13 geschildert analysiert.

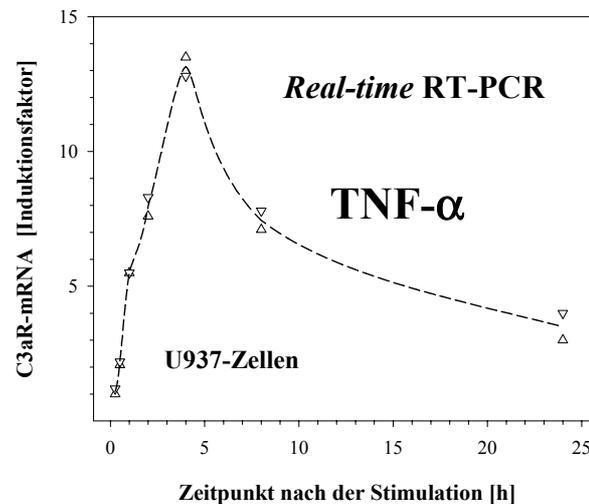


Abbildung 4.20: Resultat der TaqMan[®] *real-time* RT-PCR der durch 50 ng/ml TNF- α induzierten Hochregulation der C3aR-mRNA in U937-Zellen (Kinetik). Dargestellt ist der Mittelwert aus Doppelwerten eines repräsentativen Tests aus einer Reihe von drei unabhängigen Experimenten. Die errechneten Induktionsfaktoren beziehen sich immer auf die für den jeweiligen Zeitpunkt mitgeführte Pufferkontrolle.

Der Abbildung 4.20 ist zu entnehmen, dass eine Stimulation von U937-Zellen mit TNF- α zu einer zeitabhängigen Induktion der C3aR-mRNA führt. In dem dargestellten Versuch wurde der maximale Induktionsfaktor (~ 13) nach vier Stunden detektiert. Bei Wiederholungsexperimenten wurde das Maximum teilweise schon nach zwei Stunden erreicht. Der restliche Verlauf bestätigte sich.

Um zu überprüfen, ob eine Stimulation von U937-Zellen mit TNF- α auch zu einer Induktion der C5aR-mRNA führt, wurde dieselbe cDNA einer *real-time* RT-PCR mit den Primern MS20-22 unterzogen. Dabei zeigte sich, dass keine Hochregulation der für den C5aR kodierenden mRNA verzeichnet werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Aus den unter 4.1.14 genannten technischen Gründen ist eine Überprüfung der durch TNF- α induzierten Hochregulation des C3aR mittels ¹²⁵I-C3a-Bindungsstudie nicht sinnvoll. Mittels

kompetitiver ^{125}I -C5a-Bindungsstudie konnte auf Proteinebene bestätigt werden, dass die Expression des C5aR durch eine Stimulation mit dem Zytokin TNF- α nicht erhöht werden kann (Daten nicht gezeigt).

Festzuhalten bleibt somit, dass es sich bei der Induktion der C3aR-mRNA durch TNF- α um einen für diesen AT-Rezeptor relativ spezifischen Effekt zu handeln scheint.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die durch TNF- α induzierte Hochregulation des humanen C3aR durch die verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors Ets-1 zustande kommt.

4.2.4 Quantitative *real-time* RT-PCR Analyse für den Transkriptionsfaktor Ets-1 an verschiedenen Zelllinien

Aufgrund der zuvor beschriebenen Resultate wurde eine *real-time* RT-PCR für den Transkriptionsfaktor Ets-1 aufgebaut.

In unbehandelten U937-Zellen konnte die für Ets-1 kodierende mRNA detektiert werden. Eine durch TNF- α induzierte Hochregulation war hingegen nicht zu verzeichnen (Daten nicht gezeigt). Damit bestünde die Möglichkeit, dass dieser Transkriptionsfaktor zwar nicht erhöht transkribiert, jedoch bei Rezeptorinduktion aktiviert wird.

Der Transkriptionsfaktor Ets-1 ist in humanen Mastzellen konstitutiv exprimiert [139]. Mittels der etablierten quantitativen *real-time* RT-PCR wurde überprüft, ob auch die humane Tumorzelllinie HMC-1 diesen Faktor exprimiert. Wie zu erwarten konnte die Ets-1-mRNA nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

4.2.5 Additive Induktion der C3aR-Expression durch IL-1 β und TNF- α

Das ebenfalls zu den proinflammatorischen Zytokinen zählende IL-1 wird im Entzündungsgeschehen oftmals in „Kombination“ mit TNF- α sezerniert. An dieser Stelle wurde untersucht, ob eine Stimulation von U937-Zellen mit IL-1 β ebenfalls zu einer Hochregulation der C3aR-mRNA führt.

Zur Überprüfung dieser Fragestellung wurden U937-Zellen für verschieden lange Zeiträume mit 10 ng/ml IL-1 β (oder Puffer zur Kontrolle) stimuliert. Die Expressionskinetik der C3aR-mRNA wurde mittels *real-time* RT-PCR wie unter 4.1.13 geschildert analysiert.

Zeitraum der Stimulation mit IL-1 β [10 ng/ml]	C3aR-mRNA [Induktionsfaktor im Vergleich zu Puffer-stimulierten Zellen; bestimmt mittels <i>real-time</i> RT-PCR]
24 h	1,7
8 h	2,5 (+/- 0,44)
4 h	2,2 (+/- 0,42)
2 h	3,7 (+/- 0,18)
30 min	1,7
15 min	1,3

Tabelle 4.5: Ergebnis der *real-time* RT-PCR der durch 10 ng/ml IL-1 β induzierten Hochregulation der C3aR-mRNA in U937-Zellen (Kinetik). Für die Zeitpunkte 8 h, 4 h und 2 h sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen mit Doppelwerten im Test dargestellt. Die Zeitpunkte 24 h, 30 min und 15 min wurden lediglich einmal in Doppelwerten vermessen.

Der Tabelle 4.5 ist zu entnehmen, dass die für den C3aR kodierende mRNA durch eine Stimulation mit IL-1 β lediglich nach zwei Stunden um den Faktor 3,7 induziert wird.

Aufgrund der relativ schwachen C3aR-Induktion durch eine Einzelstimulation mit IL-1 β wurden U937-Zellen zusätzlich mit einer Kombination aus TNF- α [50 ng/ml] und IL-1 β [10 ng/ml] für zwei und vier Stunden behandelt. Dabei zeigte sich, dass die unter 4.2.3 beschriebene TNF- α -induzierte Hochregulation der C3aR-mRNA durch IL-1 β nicht erhöht wird (Daten nicht gezeigt).

4.2.6 Zusammenspiel zwischen TNF- α und IFN- γ

In vivo treten Zytokine nie isoliert auf, es herrscht stets ein Zusammenspiel zwischen verschiedenen Mitgliedern dieser großen Familie.

An dieser Stelle wurde somit untersucht, ob die durch TNF- α induzierte Expression der C3aR-mRNA in U937-Zellen durch eine zusätzliche Stimulation mit IFN- γ weiter erhöht werden kann.

Hierzu wurden die Zellen mit 1000 U/ml IFN- γ für 72 h (was bekanntermaßen zu der höchsten C3aR-Expression führt, [75]) vorstimuliert. Es folgte eine Weiterbehandlung mit 50 ng/ml TNF- α für 4 h. Zur Kontrolle wurden die Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten ebenfalls mit Puffer „stimuliert“.

Die *real-time* RT-PCR für den humanen C3aR wurde wie unter 4.1.13 geschildert, durchgeführt.

Der Abbildung 4.21 ist zu entnehmen, dass die beiden Zytokine IFN- γ und TNF- α synergistisch die Expression der C3aR-mRNA erhöhen.

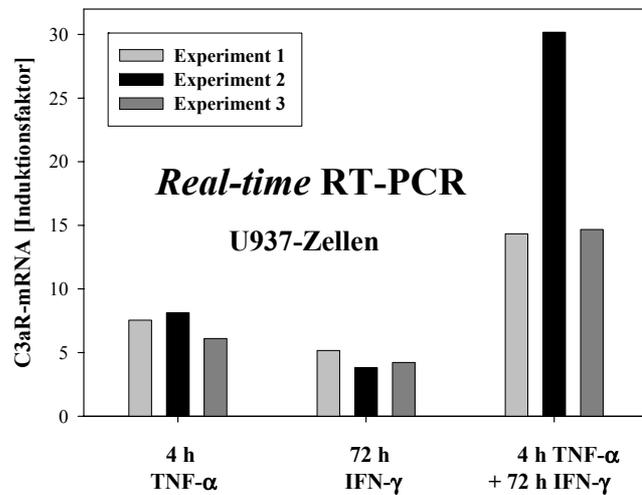


Abbildung 4.21: TaqMan[®] real-time RT-PCR: Kooperative Induktion der C3aR-mRNA durch TNF- α und IFN- γ . Die U937-Zellen wurden für 72 h mit 1000 U/ml IFN- α (oder Puffer) und/oder für 4 h mit 50 ng/ml TNF- α (oder Puffer) behandelt. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert aus Doppelwerten).

ZUSAMMENFASSEND bleibt festzuhalten, dass in diesem Teil der Arbeit mit TNF- α ein zweiter physiologischer Induktor der C3aR-Expression aufgezeigt werden konnte. Ein Anstieg der Ets-1-Expression konnte in diesem Zusammenhang nicht nachgewiesen werden, da es sich bei dem Aktivierungsprozess um eine Phosphorylierung handelt.

Ein Synergismus zwischen dem proinflammatorischen Zytokin TNF- α und IFN- γ bezüglich ihrer Kompetenz die C3aR-Expression zu erhöhen, wurde dargestellt.

4.3 Etablierung eines retroviralen Gentransfer- und Expressions-Systems

Retrovirale Expressions-Vektoren dienen zur Transduktion nicht-viraler Gene in mitotische Zellen. Sie besitzen die Fähigkeit die eingeschleusten Gene stabil in das Wirtszellgenom zu inserieren.

Durch transiente Transfektion wird oftmals nur ein geringer Prozentsatz der Zielzellen erreicht. Der große Hintergrund nicht-transfizierter Zellen bereitet teilweise große Probleme bei anschließenden Untersuchungen. Durch stabile Transfektionen kann dieses Problem umgangen werden, jedoch handelt es sich hierbei um ein langwieriges Verfahren, da zunächst bis auf Einzelklonebene selektiert werden muss. Außerdem lassen sich zahlreiche Zelllinien, beispielsweise U937, nur extrem schlecht stabil transfizieren.

Im Kapitel 4.1 wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor Ets-1 mit dem C3aR-Promotor interagieren kann. Um diesen Befund näher aufzuschlüsseln sollte eine Ets-1 dominant negative Mutante (Ets-1-DN) hergestellt werden, die zwar an das Ets-1 Bindemotiv bindet, jedoch funktionell inaktiv ist. Die Bindungsdomäne von Ets-1 (AMS 306 bis 441) erfüllt diese Funktion [151]. Der Transkriptionsfaktor Ets-1 sollte sowohl in der C3aR-konstitutiv exprimierenden Zelllinie HMC-1 als auch in der induzierbaren Zelllinie U937 mittels der Ets-1-DN ausgeschaltet werden. Hierzu musste sie stabil in die jeweiligen Genome integriert werden. Aufgrund der bereits erwähnten Problematik bei der Herstellung stabiler Zelllinien, gerade an U937-Zellen, sollte hierfür ein retrovirales Gentransfer- und Expressionssystem verwendet werden. Dieses bietet den großen Vorteil, dass nahezu alle Zellen mit retroviren transduzierbar sind. In dieser Arbeit sollten zwei unterschiedliche Systeme, die auf verschiedene retrovirale Expressionsvektoren zurückgreifen, etabliert und verglichen werden. Bei dem ersten System wird das gewünschte Konstrukt in einen für eGFP kodierenden retroviralen Klonierungsvektor eingebracht (pSF91-IRES-eGFP-PRE). Das einklonierte Insert ist über eine *internal ribosome entry site* (IRES) mit dem eGFP verbunden, so dass eine gleichzeitige Expression beider Gene gesichert ist. Mittels des eGFP kann per FACS- oder fluoreszenzmikroskopischer Analyse relativ einfach detektiert werden, wie viele Zellen positiv transduziert worden sind. Dieses System ist für die hier geplanten Versuche jedoch nur in Zelllinien effektiv einsetzbar, in denen mindestens 70 – 80 % der Zellen von den retroviren erreicht werden. Ursprünglich sollten in diesem Expressionssystem sowohl Ets-1 als auch die dominant negative Mutante als Insert verwendet werden. Da sich in HMC-1 und U937-Zellen eine zu niedrige Transduktionsrate zeigte, wurde später auf die Herstellung der Ets-1-DN in diesem Vektor verzichtet.

Für den Fall, dass in wesentlichen Zelllinien diese Transduktionsrate nicht erreicht würde, sollte ein zweites System etabliert und zur Herstellung der Ets-1-DN eingesetzt werden. Bei dem zugehörigen retroviralen Expressionsvektor steht an Stelle des eGFP ein selektierbares Resistenzgen. Hier wurde der für Neomycin kodierende Vektor pQCXIN des RetroX™-Systems der Firma Clontech/BD verwendet. Durch eine etwa zweiwöchige Behandlung mit dem Antibiotikum G418 können so positiv transduzierte Zellen von nicht transduzierten getrennt werden, ohne dass eine Selektion auf Einzelklonebene erfolgen muss. Da das einklonierte Insert bei diesem Expressionsvektor ebenfalls über eine IRES mit dem Resistenzgen verbunden ist, wird auch bei diesem System eine kooperative Expression des Neomycin- und des interessierenden Gens erreicht.

Neben diesen beiden unterschiedlichen Expressionsvektorsystemen wurde zusätzlich die Tauglichkeit zweier verschiedener Verpackungszelllinien, die zur Produktion der retroviren nötig sind, getestet.

Da das retrovirale System in der Arbeitsgruppe später auch für andere Zelllinien als HMC-1 und U937 eingesetzt werden soll, wurden diese in der Etablierungsphase teilweise mitgeführt. Es sei noch erwähnt, dass es sich bei beiden Expressionssystemen um „3-Plasmid Sicherheitssysteme“ handelt. Das heißt, die für die unterschiedlichen retroviralen Gene (*gag*:

gruppenspezifische Antigene, *pol*: enzymatische Aktivität und *env*: Glykoproteine) kodierenden Sequenzen sind auf verschiedene Plasmide verteilt. Eine weitere Erhöhung der Sicherheitsstufe ist durch die stabile Integration der Gene *gag* und *pol* (bei Phoenix-gp-Zellen) bzw. sogar aller drei Gene (*gag*, *pol* und *env*, bei 293GPG-Zellen) in die zur Virusproduktion verwendete Verpackungszelllinie gewährleistet.

4.3.1 Vergleich dreier *Envelope*-Proteine

Vor der eigentlichen Optimierungsphase musste für die drei Suspensionszelllinien U937, HL-60 und HMC-1 ausgetestet werden, welches Glykoprotein die Viruspartikel in ihrer Zellmembran tragen müssen, so dass sie von den Oberflächenrezeptoren der jeweiligen Zelle bestmöglich erkannt werden. Diese Glykoproteine, die aus einem externen und einem transmembranösen Teil bestehen, werden von den *env*-Genen kodiert. Freundlicherweise stellte uns Prof. Baum (Molekulargenetik, MHH) drei Virusüberstände, die alle mit dem für eGFP kodierenden Expressionsplasmid pSF91-IRES-eGFP-PRE in Phoenix-gp-Zellen produziert worden waren, zur Verfügung:

A)	RD114	Titer: $1,3 \times 10^6$
B)	VSV-G	Titer: 4×10^5
C)	GALV	Titer: $1,2 \times 10^6$

Es handelt sich dabei um die *env*-Gene aus folgenden retroviren: RD114 aus dem *Feline Endogenous Virus*, um das *Vesicular Stomatitis Virus(-Glycoprotein)* und das *Gibbon Ape Leukemia Virus*.

Als Positivkontrolle bei der Infektion wurde die Zelllinie HT1080 verwendet. Im Wesentlichen erfolgte die Durchführung wie unter 3.3.2.1 beschrieben, jedoch wurde von den Suspensionszellen nicht das gesamte Medium entfernt, sondern lediglich 1 ml abgenommen. Pro *well* wurden die Zellen mit je 1 ml des entsprechenden Virusüberstandes bzw. Medium als Negativkontrolle versetzt. Nach einstündiger Zentrifugation wurden die Zellen für 16 Stunden mit den Viren im Brutschrank inkubiert. Die Suspensionszellen wurden im Eppendorfreaktionsgefäß 5 min. bei 5000 rpm zentrifugiert, vom Überstand befreit, in frischem Medium resuspendiert und zurück in die 12-*well*-Platte überführt.

Zur durchflußzytometrischen Analyse wurden die HT1080-Zellen wie unter 3.3.2.1 geschildert vorbereitet. Die Suspensionszellen wurden hingegen direkt in die FACS-Röhrchen überführt, abzentrifugiert, 1 x gewaschen und in PBS resuspendiert.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Histogrammen wiedergegeben:

Positivkontrolle: HT1080-Zellen

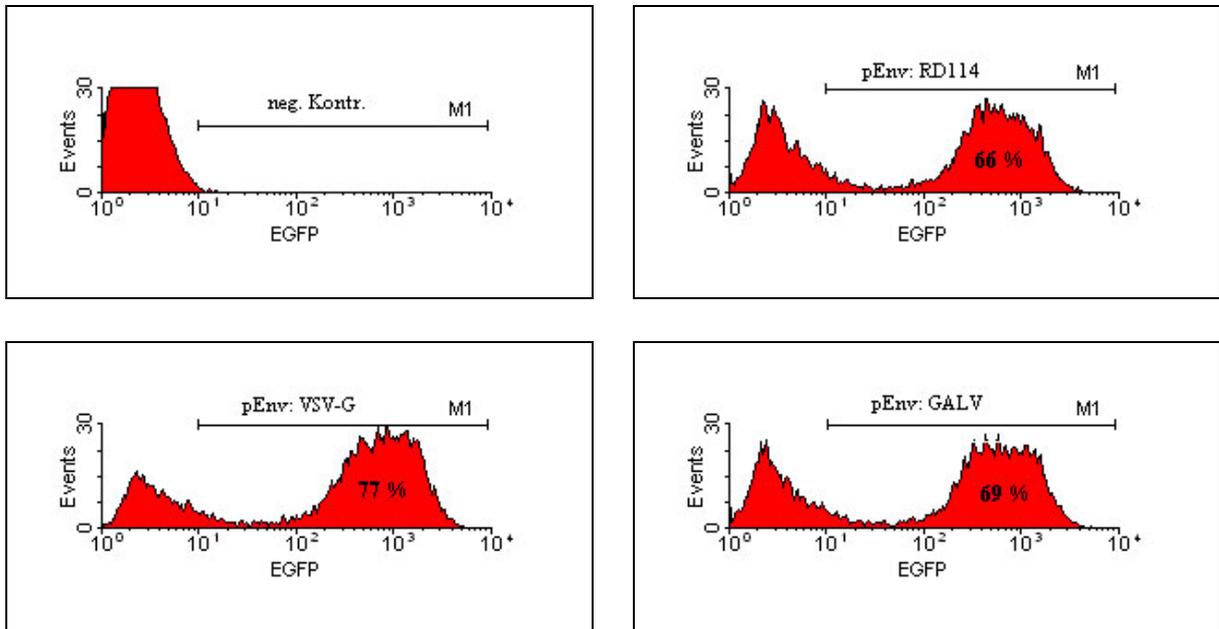


Abbildung 4.22: Durchflußzytometrischer Nachweis der eGFP-positiven Zellen nach retroviraler Infektion mit dem Expressionsvektor pSF91-IRES-eGFP-PRE und den drei verschiedenen *Env*-Plasmiden RD114, VSV-G und GALV an HT1080-Zellen.

U937-Zellen:

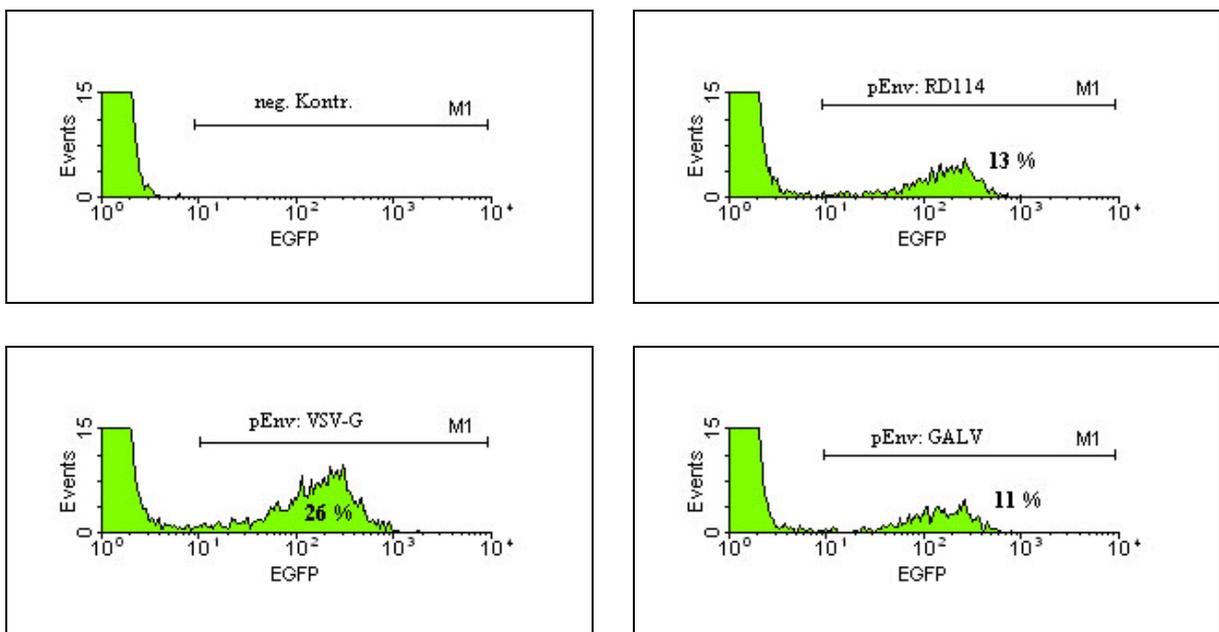


Abbildung 4.23: Durchflußzytometrischer Nachweis der eGFP-positiven Zellen nach retroviraler Infektion mit dem Expressionsvektor pSF91-IRES-eGFP-PRE und den drei verschiedenen *Env*-Plasmiden RD114, VSV-G und GALV an U937-Zellen.

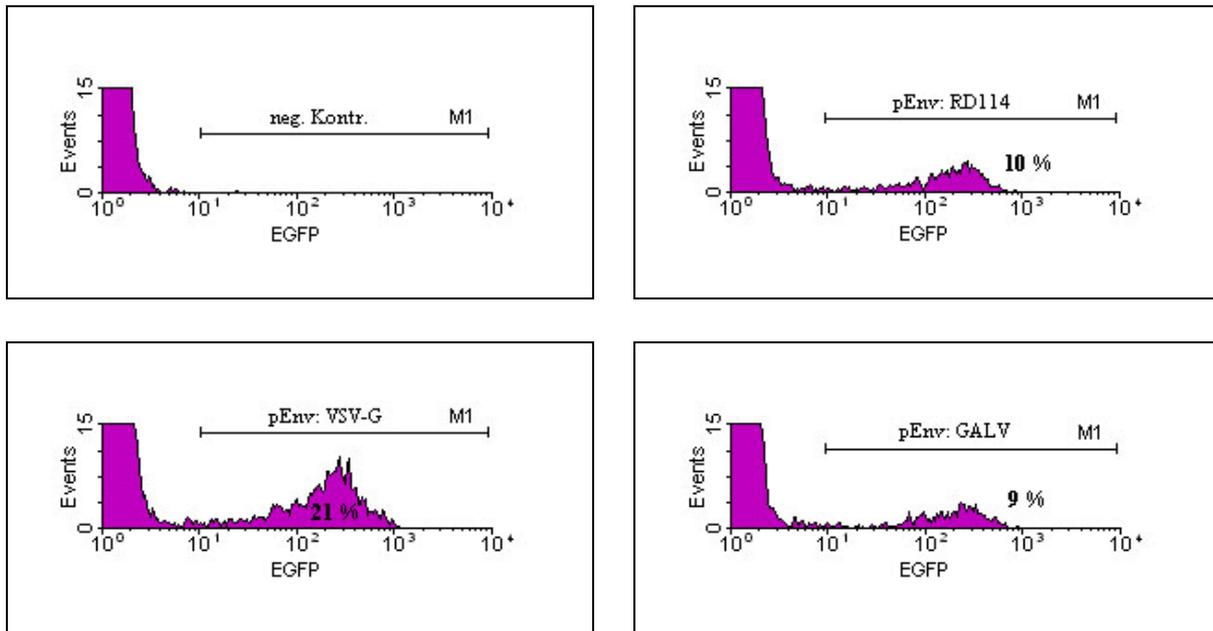
HL-60-Zellen:

Abbildung 4.24: Durchflußzytometrischer Nachweis der eGFP-positiven Zellen nach retroviraler Infektion mit dem Expressionsvektor pSF91-IRES-eGFP-PRE und den drei verschiedenen *Env*-Plasmiden RD114, VSV-G und GALV an HL-60-Zellen.

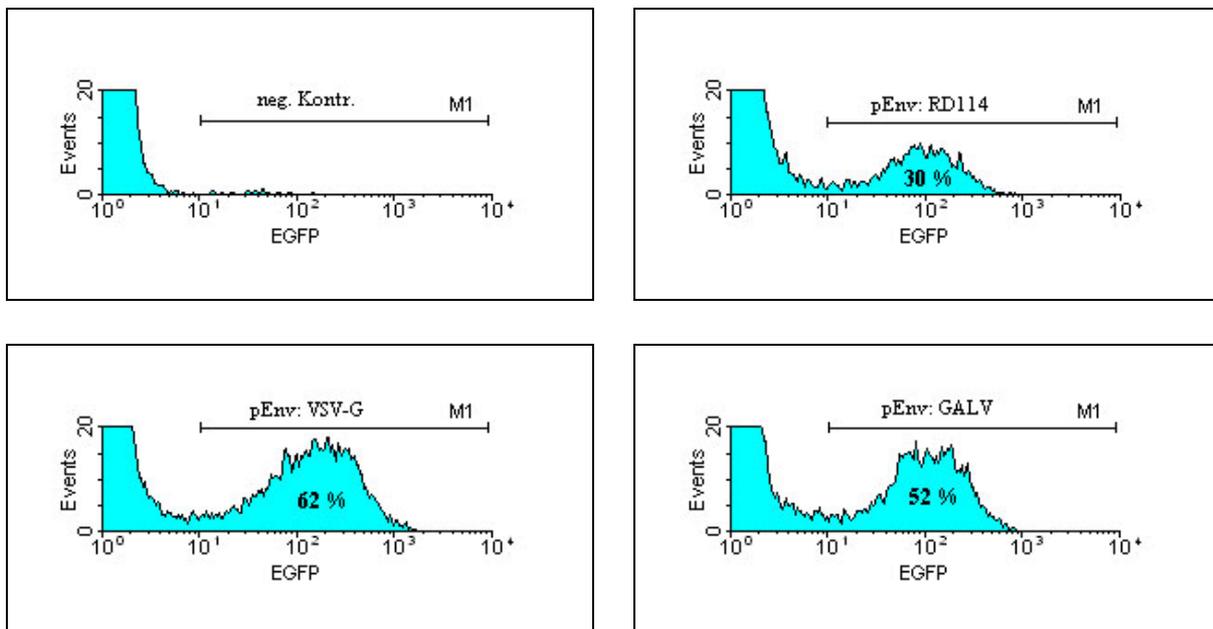
HMC-1-Zellen:

Abbildung 4.25: Durchflußzytometrischer Nachweis der eGFP-positiven Zellen nach retroviraler Infektion mit dem Expressionsvektor pSF91-IRES-eGFP-PRE und den drei verschiedenen *Env*-Plasmiden RD114, VSV-G und GALV an HMC-1-Zellen.

Wie in der Abbildung 4.22 anschaulich dargestellt ist, lässt sich sowohl die als Positivkontrolle eingesetzte Zelllinie HT1080 als auch die drei untersuchten Suspensionszelllinien mit Viruspartikeln, die das VSV-G Glykoprotein auf ihrer Oberfläche exprimieren, mit höchster Effizienz (siehe eGFP-Fluoreszenz in %) infizieren. Bedenkt man zusätzlich, dass der Virustiter der VSV-G enthaltenen Viren nur $\frac{1}{3}$ so hoch ist, wie der der beiden anderen Virusüberstände, so ist der Unterschied der Transduzierbarkeit noch markanter.

Festzuhalten bleibt außerdem, dass sich die Zelllinie HMC-1 fast so gut infizieren lässt wie die Positivkontrolle (62 % zu 77 %). Die Effizienz bei U937- und HL-60-Zellen beträgt allerdings nur etwa $\frac{1}{3}$ bzw. $\frac{1}{4}$ (26 % und 21 %).

4.3.2 Auswahl der geeigneten Verpackungszelllinie

Als Verpackungszelllinien standen Phoenix-gp- und 293GPG-Zellen zur Auswahl. Beide Zelllinien sind Derivate der HEK293-Zellen und sind stabil transfiziert mit den retroviralen Genen *gag* (gruppenspezifische Antigene) und *pol* (enzymatische Aktivitäten). Die 239GPG-Zelllinie bietet zusätzlich den Vorteil, dass das *Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein* stabil inseriert ist. Somit muss zur Virusproduktion lediglich der retrovirale Expressionsvektor in die Verpackungszelllinie eingebracht werden.

Zur Etablierung des Systems bzw. zum Vergleich der beiden Verpackungszelllinien wurde zuerst der retrovirale eGFP-Expressionsvektor eingesetzt. Da von vornherein noch nicht entschieden werden konnte, welche Zellen eventuell mittels des retroviralen Systems transduziert werden sollen, war auch nicht bekannt, ob die Promotoren der *Long-Terminal-Repeats* (LTR) in diesen Zellen wirksam wären. Deshalb wurde einerseits der Transkriptionsfaktor Ets-1 ohne Promotor und andererseits in Verbindung mit dem CMV-Promotor in diesen Vektor inkloniert. Es resultierten die beiden Konstrukte 1. pSF91-IRES-eGFP-PRE-Ets-1 und 2. pSF91-IRES-eGFP-PRE-CMV-Ets-1. Die genaue Klonierungsstrategie ist im Anhang unter 6.1 aufgeführt.

4.3.2.1 *Phoenix-gp-Verpackungszelllinie - Austestung der Virusüberstände in HT1080-Zellen*

Für diese erste Versuchsreihe wurden Phoenix-gp-Zellen mit dem Calcium Phosphate Transfection Kit der Firma Sigma, dem ProFection Mammalian Transfection System der Firma Promega und selbst hergestellten Calcium-Phosphat-Lösungen transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde mittels β -Galaktosidase-Assay (siehe 3.2.13.4) überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass die Transfektionseffizienz unter Verwendung der selbst hergestellten Calcium-Phosphat-Lösungen am höchsten war (Daten nicht gezeigt). So wurden die Phoenix-gp-Zellen wie unter 3.2.13.3 beschrieben transfiziert. Die eingesetzten Plasmid-

Mengen (pEnv: VSV-G, pGagPol und Expressionsvektor) sowie die Vorgehensweise zur Sammlung der Virusüberstände entsprechen jedoch dem unter 3.3.1.1 geschilderten Protokoll. Die Infektion zur Virustiter-Bestimmung erfolgte in HT1080-Zellen (siehe 3.3.2.1) im *12-well*-Maßstab. Die Viren wurden standardmäßig eine Stunde bei 37°C und 2000 rpm aufzentrifugiert. Zur besseren Aufnahme der Viren wurde das Medium mit Protaminsulfat versetzt. Nach sechs Stunden wurde das Virus-enhaltene Medium 1:1 mit frischem Virus-freiem Medium versetzt. Nach weiteren 12 Stunden erfolgte ein kompletter Mediumwechsel. Per FACS-Analyse wurden die Virusüberstände 2 (36 h), 3 (48 h) und 4 (60 h, post Transfektion), wobei jeweils 10 µl, 50 µl und 200 µl auf die Zellen gegeben wurden, überprüft. Als Negativkontrolle wurden nicht infizierte HT1080-Zellen mitgeführt.

Die durchflußzytometrische Analyse wurde zwei Tage nach dem Mediumwechsel durchgeführt. Die Zellen wurden laut Protokoll vorbereitet.

Als Histogramm sind hier nur die Ergebnisse der Infektionen mit den Ets-1 Überständen im 200 µl-Maßstab aufgeführt. Die vollständigen Ergebnisse sind der Tabelle 4.6 zu entnehmen.

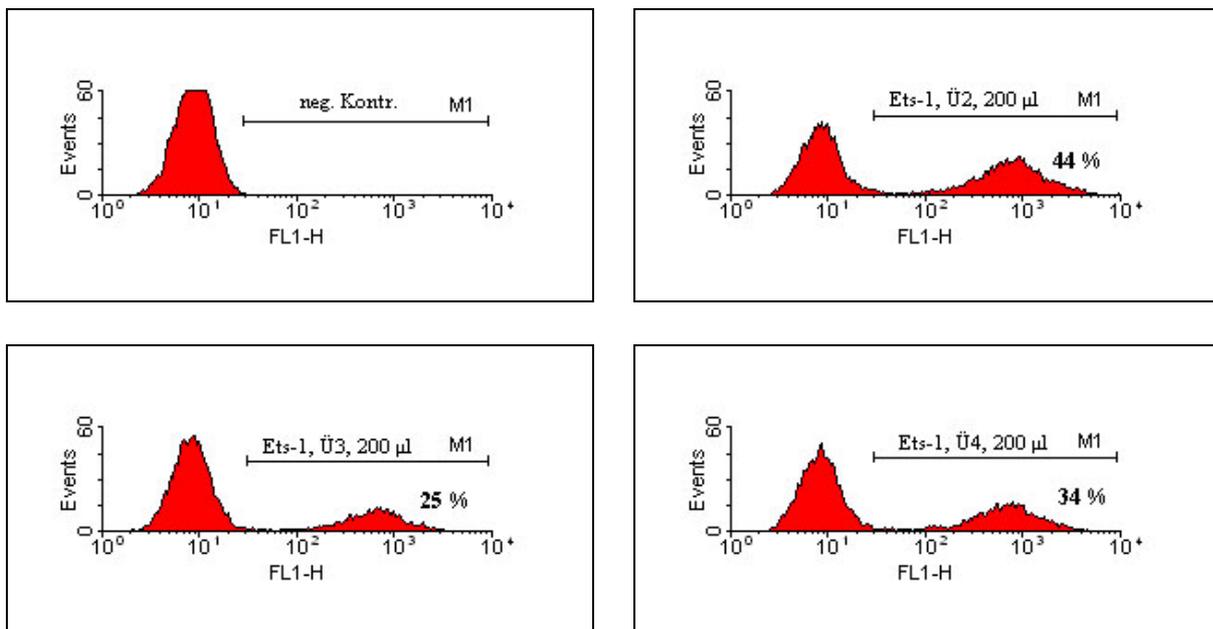


Abbildung 4.26: Durchflußzytometrische Untersuchung der in Phoenix-gp-Zellen generierten pSF91-IRES-eGFP-PRE-Ets-1 Virusüberstände 2, 3 und 4 (200 µl Infektionsvolumen) an HT1080-Zellen. Die hervorgehobenen Prozentzahlen geben die eGFP-positiven Zellen wieder.

Retrovirales Expressionsplasmid	Volumina an Virusüberstand	Bezeichnung des Virusüberstandes	eGFP-positive Zellen [%]
pSF91-IRES-eGFP-PRE	10 µl	Ü 2	4,0
		Ü 3	4,7
		Ü 4	4,5
	50 µl	Ü 2	20,4
		Ü 3	17,3
		Ü 4	17,9
	200 µl	Ü 2	51,9
		Ü 3	49,9
		Ü 4	48,2
pSF91-IRES-eGFP-PRE- <u>Ets-1</u>	10 µl	Ü 2	3,7
		Ü 3	1,9
		Ü 4	3,5
	50 µl	Ü 2	16,7
		Ü 3	8,4
		Ü 4	13,5
	200 µl	Ü 2	44,4
		Ü 3	24,9
		Ü 4	34,1
pSF91-IRES-eGFP-PRE-CMV- <u>Ets-1</u>	10 µl	Ü 2	0,3
		Ü 3	0,1
		Ü 4	0,2
	50 µl	Ü 2	1,6
		Ü 3	0,5
		Ü 4	1,4
	200 µl	Ü 2	5,4
		Ü 3	2,1
		Ü 4	4,2

Tabelle 4.6: Vollständige Ergebnisse der durchflußzytometrischen Untersuchung der drei in Phoenix-gp-Zellen generierten retroviralen Virusüberstände pSF91-IRES-eGFP-PRE, -Ets-1 und -CMV-Ets-1 an HT1080-Zellen. Aufgeführt sind die Infektionsvolumina, die Bezeichnung des Virusüberstandes, sowie die Anzahl an eGFP-positiven Zellen [%]. Hervorgehoben ist der Ets-1-Überstand, mit dem die meisten (44,4 %) HT1080-Zellen transduziert worden sind.

Wie aus Tabelle 4.6 hervorgeht, werden mit dem Ets-1 Virusüberstand etwa gleich viele Zellen transduziert wie mit dem pSF91-IRES-eGFP-PRE Virusüberstand. Hingegen ist die Transduktionsrate des CMV-Ets-1 Virusüberstandes nur etwa $\frac{1}{10}$ so gut. Im Folgeexperiment wurde ein zweiter Klon dieses Vektors zur Virusproduktion eingesetzt. Bei der anschließenden FACS-Analyse nach Infektion von HT1080-Zellen konnten diese Ergebnisse reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).

4.3.2.2 293GPG-Verpackungszelllinie - Austestung der Virusüberstände in A549-Zellen

Um die beiden Systeme direkt vergleichen zu können, wurden hier dieselben retroviralen Expressionsvektoren wie bei der ersten Versuchsreihe eingesetzt.

Da der Virusüberstand, der mit dem CMV-Ets-1 Konstrukt generiert wurde, eine sehr geringe Infektiosität aufwies, wurde hier von einer weiteren Austestung abgesehen.

Die 293GPG-Zellen wurden zwei Tage vor der Transfektion ausgesät und wie unter 3.3.1.2 beschrieben ebenfalls mit selbst hergestellten Calcium-Phosphat-Lösungen transfiziert. Im Gegensatz zu dem Protokoll unter Verwendung der Phoenix-gp-Zellen wird hier fünf Tage lang nur alle 24 Stunden der Virusüberstand gesammelt. Ferner werden die Überstände vereinigt und nicht getrennt weiterverarbeitet. Die Überprüfung der Transduktionsrate erfolgte in A549-Zellen (siehe 3.3.2.2). Zur Verbesserung der Virusaufnahme wurde bei diesem Protokoll Polybrene anstelle von Protaminsulfat verwendet. Die A549-Zellen wurden mit unverdünntem, 1:3-, 1:10- und 1:100-verdünntem Virusüberstand versetzt und nicht zentrifugiert. Die Infektion erfolgte über einen Zeitraum von 16 Stunden, danach wurde das Medium komplett gewechselt. Nach weiteren 48 Stunden wurde die FACS-Analyse durchgeführt.

Die prozentuale Angabe an eGFP-positiven Zellen nach Transduktion der A549-Zellen mit den verschiedenen Virusüberständen ist in folgender Tabelle aufgeführt:

Retrovirales Expressionsplasmid	Verdünnung des Virusüberstandes	eGFP-positive Zellen [%]
pSF91-IRES-eGFP-PRE	unverdünnt	83,6
	1:3	81,7
	1:10	43,2
	1:100	6,7
pSF91-IRES-eGFP-PRE-Ets-1	unverdünnt	89,8
	1:3	67,0
	1:10	34,4
	1:100	4,3

Tabelle 4.7: Vollständige Ergebnisse der durchflußzytometrischen Untersuchung der in 293GPG-Zellen generierten retroviralen Virusüberstände pSF91-IRES-eGFP-PRE und -Ets-1 an A549-Zellen. Aufgeführt sind die Verdünnungsstufe des Virusüberstandes sowie die Anzahl an eGFP-positiven Zellen [%]. Hervorgehoben ist der Ets-1-Überstand, mit dem die meisten (89,8 %) A549-Zellen transduziert worden sind.

Zur besseren Veranschaulichung werden hier zusätzlich die Histogramme der FACS-Analysen des Ets-1 Virusüberstandes gezeigt:

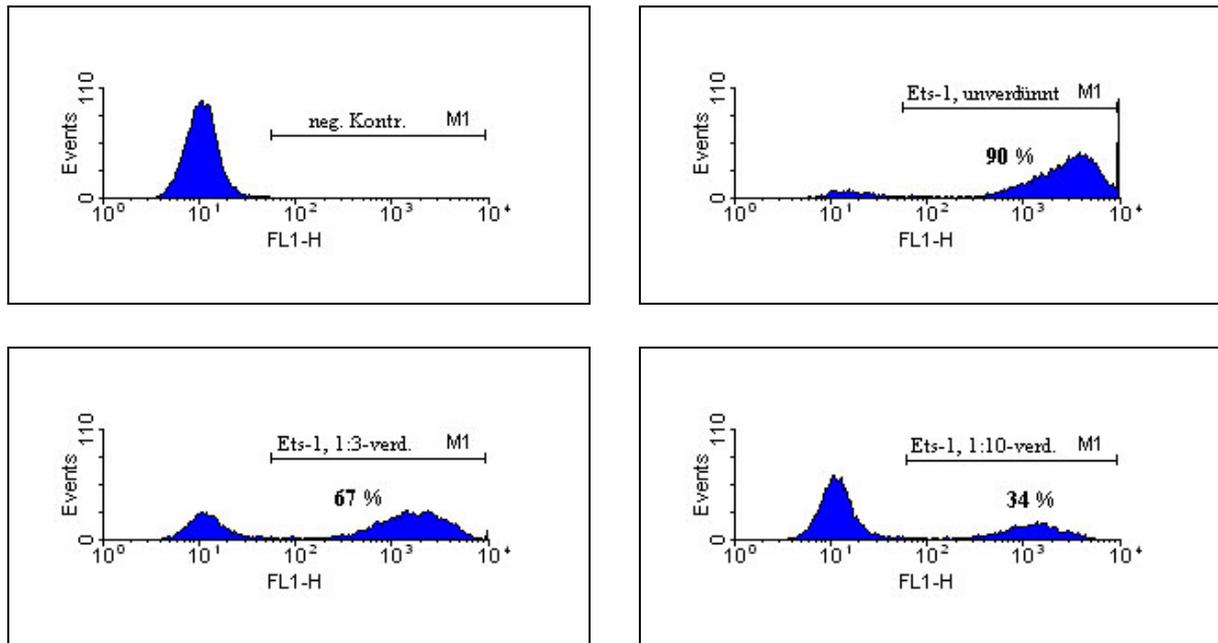


Abbildung 4.27: Durchflußzytometrische Untersuchung des in 293GPG-Zellen generierten pSF91-IRES-eGFP-PRE-Ets-1 Virusüberstandes an A549-Zellen. Aufgezeigt sind die nicht infizierten Zellen (neg. Kontr.) sowie die unterschiedlich verdünnten Überstände. Die hervorgehobenen Prozentzahlen geben die eGFP-positiven Zellen wieder.

Aus Abbildung 4.27 sowie der zugehörigen Tabelle 4.7 geht hervor, dass die Transduktionsrate des Ets-1 Überstandes in derselben Größenordnung liegt, wie die des pSF91-IRES-eGFP-PRE Virusüberstandes.

Es bleibt weiterhin festzuhalten, dass die Infektiösität der in 293GPG-Zellen generierten Virusüberstände wesentlich höher ist (~ 90 %) als die der aus Phoenix-gp-Zellen gewonnenen (~ 45 %). Da zusätzlich die Abnahme der Virusüberstände sowie ihre Weiterverarbeitung bei der unter 3.3.1.2 geschilderten Durchführung im Vergleich zu dem für Phoenix-gp-Zellen optimierten Protokoll (siehe 3.3.1.1) wesentlich unkomplizierter ist, wurde im Folgenden nur noch mit dem „293GPG-Verpackungssystem“ gearbeitet.

4.3.3 Optimierung der retroviralen Infektion für verschiedene Zelllinien

Zur Optimierung der retroviralen Infektion für verschiedene Zelllinien wurde der in 293GPG-Zellen generierte pSF91-IRES-eGFP-PRE-Ets-1 Virusüberstand (siehe 4.3.2) verwendet.

Untersucht wurde die Transduzierbarkeit der humanen Zelllinien U937, HMC-1, HEK293 und SK-N-MC sowie der murinen Zelllinie J774A.1. Als Positivkontrolle wurden stets die A549-Zellen mitgeführt. Zuerst wurden die Bedingungen des unter 3.3.2.2 aufgeführten Protokolls beibehalten, jedoch wurde von jeder Zellsorte ein zweiter Ansatz nach der Viruszugabe für eine Stunde bei 37°C und 2000 rpm zentrifugiert. Die Infektion erfolgte jeweils mit unverdünntem und 1:10-verdünntem Virusüberstand. Zu beachten ist, dass die Infektion von Suspensionszellen wesentlich schwieriger zu handhaben ist, als die von

adhärenten Zellen. Die Suspensionszellen müssen für jeden Mediumwechsel bzw. Zugabe der Virusüberstände aus den Zellkulturplatten in Eppendorfreaktionsgefäße überführt, zentrifugiert, mit frischem Medium resuspendiert und zurück in die Platten pipettiert werden.

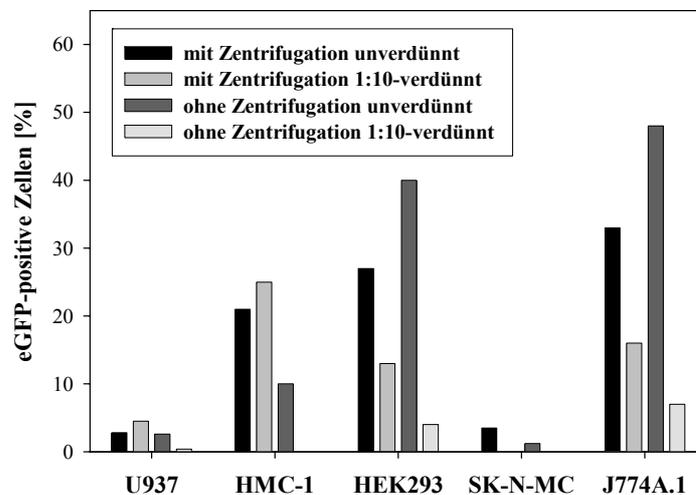


Abbildung 4.28: FACS-Analyse der mit dem in 293GPG-Zellen generierten Ets-1 Virusüberstand transduzierten Zelllinien. Dargestellt sind die eGFP-positiven Zellen in Prozent. Die Infektion erfolgte laut Protokoll (siehe 3.3.2.2). Zusätzlich wurde ein zweiter Ansatz jeder Zellen für 1 Stunde bei 37°C und 2000 rpm zentrifugiert. Aufgezeigt sind jeweils die Daten ohne und mit Zentrifugation der unverdünnten und 1:10-verdünnten Virusüberstände. Die als Positivkontrolle mitgeführten A549-Zellen waren ohne Zentrifugation bei unverdünntem Überstand zu 78 % infiziert.

Aus der Abbildung 4.28 geht hervor, dass die Aufzentrifugation der Viren bei den beiden Suspensionszelllinien U937 und HMC-1 etwa eine Verdopplung der Transduktionsrate bewirkt. Bei den adhären Zellen HEK293 und J774A.1 führt sie hingegen eher zu einer Verschlechterung. Die myeloblastische Zelllinie U937 und die neuronale Zelllinie SK-N-MC lassen sich nach dem beschriebenen Protokoll nur sehr schlecht transduzieren.

4.3.3.1 Gegenüberstellung von Protaminsulfat und Polybrene

Bei der Austestung der verschiedenen Glykoproteine nach dem „HT1080-Protokoll“ (3.3.2.1) ließen sich etwa 25 % der U937-Zellen infizieren (siehe 4.3.1). Im folgenden Experiment wurde daher an dieser Zelllinie, sowie an HMC-1-Zellen untersucht, ob Protaminsulfat im Vergleich zu Polybrene die Aufnahme der Viren noch verbessern kann. Außerdem wurden die Viren für zwei Stunden auf die Zellen aufzentrifugiert. Die Infektion erfolgte über einen Zeitraum von 16 Stunden, danach wurde das Medium komplett gewechselt. Für diesen Optimierungsversuch wurde wiederum der in 293GPG-Zellen generierte Ets-1 Überstand verwendet. Er wurde 1:2, 1:10 und 1:100 verdünnt auf die Zellen aufgetragen.

Dabei stellte sich heraus, dass der Zusatz von Protaminsulfat anstelle von Polybrene in U937-Zellen zu einer Verdoppelung der Transduktionsrate führt. In HMC-1-Zellen ist dieser Effekt nicht zu beobachten. Vergleicht man die Ergebnisse mit denen aus Abbildung 4.28, so ist

ersichtlich, dass eine Verlängerung der Zentrifugationsphase nicht zu einer Verbesserung der Transduktionsrate führt.

4.3.3.2 Verkürzung des Infektionszeitraumes

In einem weiteren Optimierungsversuch wurde untersucht, ob kürzere Infektionszeiten zu einer Erhöhung der Transduktionsrate in U937-Zellen führen. Hierzu wurden die Zellen wie zuvor beschrieben unter Zusatz von Protaminsulfat behandelt. Nach der Beendigung der einstündigen Zentrifugation wurde das Medium nach weiteren vier oder sechs Stunden durch frisches ersetzt.

Es zeigte sich, dass eine sechsstündige Infektion zu etwas besseren Transduktionsraten führt als eine vierstündige (max. um Faktor 2). Im Vergleich zu der in Abbildung 4.28 dargestellten 16-stündigen Infektion ist eine geringe Erhöhung der eGFP-positiven Zellen zu verzeichnen. Hierbei könnte es sich jedoch auch um Messschwankungen handeln. In jedem Fall bleibt festzuhalten, dass eine Verkürzung des Infektionszeitraumes von 16 auf sechs Stunden keine Verschlechterung der Transduktionsrate zur Folge hat.

4.3.3.3 Mehrmalige Infektion

Da die Transduktionsraten in U937-Zellen nach den bisherigen Optimierungen immer noch < 10 % (bei 1:2-verdünntem Virusüberstand) waren und für unsere geplanten Analysen eine hohe Transduktionseffizienz Voraussetzung war, wurde in einem weiteren Experiment untersucht, ob mehrmalige Infektionen zu einer Erhöhung führen. Hierzu wurden die Zellen an drei aufeinander folgenden Tagen jeweils mit unverdünntem und 1:10-verdünntem Ets-1 Virusüberstand versehen. Nach einstündiger Zentrifugation folgte eine sechsstündige Infektion, die durch einen Mediumwechsel abgestoppt wurde.

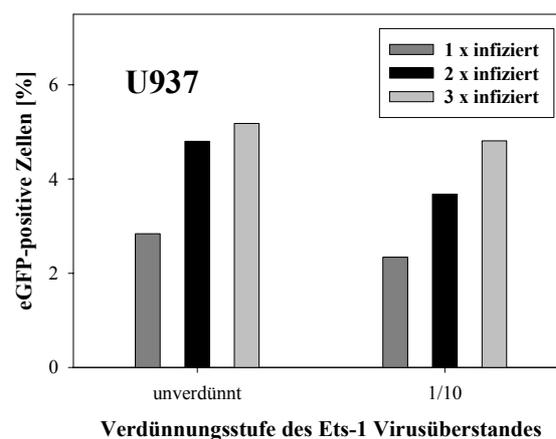


Abbildung 4.29: FACS-Analyse der mit dem in 293GPG-Zellen generierten Ets-1 Virusüberstand transduzierten Zelllinie U937. Dargestellt sind die eGFP-positiven Zellen in Prozent. Die Infektion erfolgte laut Protokoll (siehe 3.3.2.2), wobei die Viren für zwei Stunden bei 37°C und 2000 rpm in Gegenwart von Protaminsulfat aufzentrifugiert wurden. Verglichen wurde hier eine einmaligen mit einer zwei- bzw. dreimaligen Infektion im Abstand von 24 Stunden.

Der Abbildung 4.29 ist zu entnehmen, dass die mehrmalige Infektion lediglich zu einer schwachen Erhöhung der Transduktionsrate in U937-Zellen führt.

Alles in allem bleibt festzuhalten, dass sich mittels des retroviralen Systems die adhärenenten Zelllinien HEK293 und J774A.1 sowie die Suspensionszelllinie HMC-1 gut transduzieren lassen (30 – 45 %). Für die myeloblastische Zelllinie U937 konnte lediglich eine Transduktionsrate < 10 % erreicht werden.

Sicherlich könnte das System an dieser Stelle noch weiter optimiert werden, jedoch zeigten sich schon ganz klar die Grenzen. Um Transduktionsraten > 70 % zu erhalten, wurde somit zu dem unter 4.3 erläuterten selektierbaren System gewechselt.

4.4 Anwendung des retroviralen Gentransfer- und Expressionssystems

4.4.1 Herstellung stabiler Ets-1-DN (und eGFP) Zelllinien unter Verwendung des retroviralen *neo*-Expressionsvektors

Zur Herstellung stabiler Zelllinien wurde der für die Neomycin-Resistenz kodierende RetroX™-Vektor pQCXIN der Firma Clontech/BD eingesetzt (Näheres siehe 4.3).

4.4.1.1 Aufnahme von „G418-Kill-Kurven“

Zur späteren G418-Selektion musste zuerst eine „Kill-Kurve“ für die zu untersuchenden Zelllinien aufgenommen werden. Hierzu wurden HeLaT-, HEK293-, U937- und HMC-1-Zellen 14 Tage lang mit unterschiedlichen Konzentrationen (0 – 800 µg/ml) des Giftes kultiviert. Alle drei Tage wurde das Medium gewechselt und die toten Zellen gezählt (Trypanblau). Es zeigte sich, dass nach fünf Tagen etwa die Hälfte aller Zellen bei 800 µl/ml G418 gestorben war. Nach zehn Tagen waren auch schon bei einer G418-Konzentration von 400 µg/ml mehr als $\frac{3}{4}$ der Zellen tot (die Daten sind hier nicht näher gezeigt). Aufgrund dieser Testergebnisse wurde entschieden, die transduzierten Zellen mit 500 und 800 µg/ml G418 zu selektieren.

4.4.1.2 Klonierung einer Ets-1 dominant negativen Mutante und des enhanced Green Fluorescent Proteins (Kontrolle) in den RetroX™-Vektor pQCXIN

Durch die G418-Selektion werden zwar sämtliche Zellen getötet, die den *neo*-Vektor nicht aufgenommen haben, jedoch gibt dies keine Auskunft darüber, ob weitere einklonierte Gene auch tatsächlich funktionell aktiv sind.

Zur Überprüfung dieses Sachverhalts wurde das *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) in den pQCXIN-Vektor einkloniert (Klonierung siehe 6.1).

Eine dominant negative Mutante des Transkriptionsfaktors Ets-1 (Ets-1-DN) sollte, wie schon unter 4.3 erwähnt, zur näheren Aufschlüsselung der Interaktion des C3aR mit dem Transkriptionsfaktor Ets-1 hergestellt werden. Hierzu wurde die Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors (AMS 306 bis 441, [151]) per PCR amplifiziert und ebenfalls in den pQCXIN-Vektor kloniert (Klonierung siehe 6.1). Die dominant negative Mutante ist zur Bindung an das Ets-1 Bindemotiv befähigt, „eine Signalweiterleitung“ bleibt jedoch aus. Im Folgenden wurde die Ets-1-DN stabil in die Zelllinien HMC-1, U937, HeLaT und HEK293 integriert.

4.4.1.3 Generierung der viralen Überstände

Die beiden neu-generierten retroviralen Konstrukte pQCXIN-eGFP und pQCXIN-Ets-1-DN sowie der zugehörige Leervektor wurden, wie unter 3.3.1.2 beschrieben, in Doppelansätzen in 293GPG-Zellen transfiziert. Fünf Tage lang wurden die Virusüberstände gesammelt und von den Parallelansätzen vereinigt.

Die mit dem pQCXIN-eGFP Konstrukt transfizierten 293GPG-Zellen wurden nach der Abnahme des letzten Virusüberstandes abgelöst und durchflußzytometrisch analysiert.

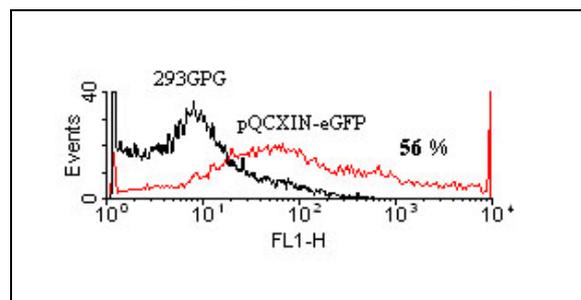


Abbildung 4.30: FACS-Analyse der 293GPG-Zellen nach Transfektion mit dem pQCXIN-eGFP Konstrukt und fünftägiger Virusproduktion. Aufgezeigt ist die eGFP-Fluoreszenz von nicht transfizierten und transfizierten 293GPG-Zellen.

Der Abbildung 4.30 ist zu entnehmen, dass etwa 56 % der 293GPG-Zellen selbst von den produzierten Viren transduziert worden sind. Dieser Test gibt lediglich einen groben Anhaltspunkt über die Infektiösität der Viren, da im Verlaufe der Produktion sehr viele Verpackungszellen sterben.

4.4.1.4 Überprüfung der viralen Überstände in A549-Zellen

Die Qualität der Virusüberstände wurde anschließend anhand der Standardinfektion von A549-Zellen überprüft (siehe 3.3.2.2). Da der für die Ets-1-DN kodierende Expressionsvektor neben der Neomycinresistenz keinen Fluoreszenzmarker aufweist, konnte lediglich der pQCXIN-eGFP Virusüberstand durchflußzytometrisch analysiert werden.

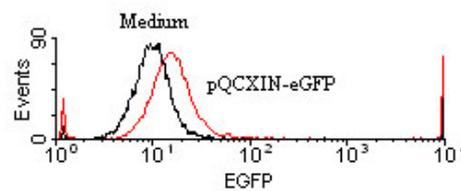


Abbildung 4.31: FACS-Analyse der mit dem pQCXIN-eGFP Virusüberstand transduzierten A549-Zellen. Dargestellt ist die eGFP-Fluoreszenz von A549-Zellen, die nur mit Medium bzw. dem pQCXIN-eGFP Virusüberstand behandelt worden ist.

Auffällig bei den in Abbildung 4.31 dargestellten Resultaten ist die relativ schwache Rechtsverschiebung der pQCXIN-eGFP-Kurve im Vergleich zur Mediumkontrolle. Da es sich um einen sehr schlanken, homogenen Peak handelt, scheint die Infektionsrate recht hoch zu sein, wohingegen die eGFP-Expressionsrate jedoch relativ gering ist. In A549-Zellen wurden standardmäßig die mit dem pSF91-IRES-eGFP-PRE Vektor hergestellten viralen Überstände analysiert. Eventuell ist diese Zelllinie nicht optimal zur Überprüfung von Virusüberständen, die mit dem pQCXIN-Vektor hergestellt wurden, geeignet. Da die transduzierten Zellen im Folgenden mit G418 selektiert wurden, schien das Ergebnis dennoch ausreichend um fortzufahren.

4.4.1.5 Herstellung der stabilen Linien

Adhärente Zellen:

Zur Herstellung der stabilen Zelllinien wurden je $2,3 \times 10^4$ HEK293- oder HeLaT-Zellen pro *well* in 6-*well*-Platten einen Tag vor der Infektion ausgesät. Am nächsten Tag wurden sie mit je 2 ml der verschiedenen Virusüberstände bzw. Medium zur Kontrolle versehen. Von jeder Probe wurden zwei *wells* bestückt, da anschließend mit 500 $\mu\text{g/ml}$ und 800 $\mu\text{g/ml}$ G418 selektiert werden sollte. Sämtliche Überstände wurden mit Polybrene versetzt. Nach 16-stündiger Inkubation mit den viralen Überständen wurde das Medium komplett gewechselt. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Medium erneut gewechselt, diesmal war es jedoch mit der entsprechenden Konzentration an G418 versetzt. Die weitere Kultivierung erfolgte wie unter 3.4.2 geschildert.

Suspensionszellen:

Die U937- und HMC-1-Zellen wurden direkt vor der Transfektion runterzentrifugiert und je 1×10^5 Zellen in 0,5 ml frischem Medium pro *well* einer 12-*well*-Platte pipettiert. Die Zellen wurden anschließend mit je 1 ml pro *well* der Virusüberstände bzw. Medium zu Kontrolle versehen. Es folgte eine Zugabe von Protaminsulfat sowie eine einstündige Zentrifugation bei 37°C und 2000 rpm. Sechs Stunden später wurde 1,5 ml frisches Medium pro *well* zugefügt (ohne Abnahme). Nach weiteren 16 Stunden erfolgte ein kompletter Mediumwechsel sowie

nach weiteren 24 Stunden abermals, jedoch unter Zusatz von 500 µg/ml bzw. 800 µg/ml G418. Die weitere Kultivierung erfolgte ebenfalls wie unter 3.4.2 geschildert.

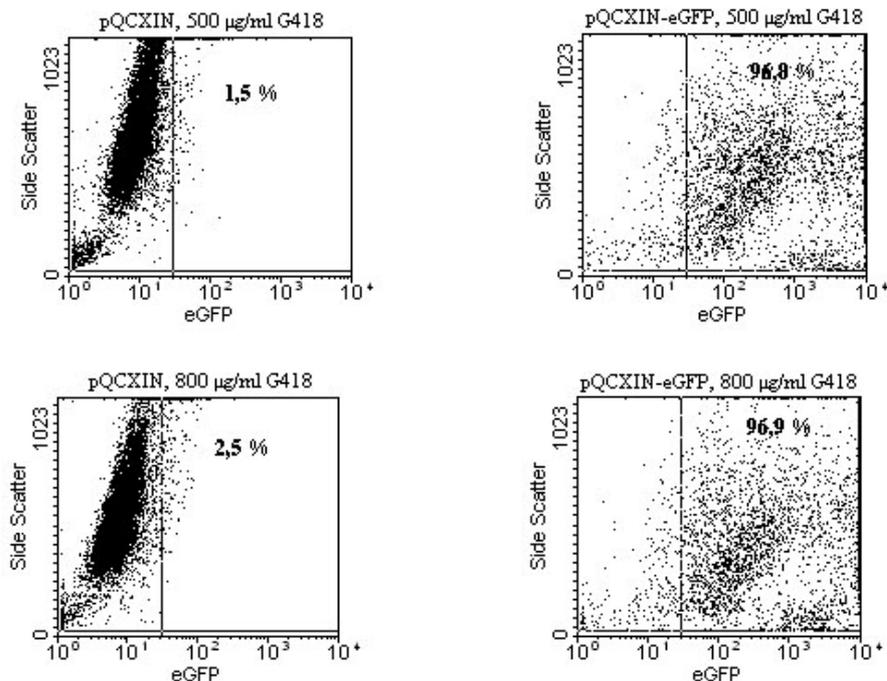
14 Tage nach der Infektion wurde anhand der eGFP-Expression überprüft, wie viel Prozent der jeweiligen Zellen positiv transduziert worden sind. Hierbei wird davon ausgegangen, dass das eGFP gleich gut in die Zielzell-DNA inseriert worden ist, wie die Ets-1 dominant negative Mutante.

Bei den HeLaT-Zellen waren bei einer G418-Konzentration von 500 µg/ml ebenso wie bei 800 µg/ml sämtliche Zellen der mit Medium „infizierten“ Zellen gestorben. Nach der durchflußzytometrischen Untersuchung bestätigte sich, dass bei beiden Konzentrationen gleich viele Zellen (~ 96 %) eGFP stabil ins Genom inseriert hatten.

Bei den drei anderen Zellen waren bei 500 µg/ml G418 nicht alle Zellen der Medium-Kontrolle gestorben, so dass hier nur die mit 800 µg/ml G418 selektierten Zellen weiter betrachtet wurden.

Festzuhalten bleibt also, dass nach Selektion etwa **96 %** der HeLaT-Zellen, **89 %** der U937-Zellen, **75 %** der HMC-1-Zellen, sowie **96 %** der HEK293-Zellen positiv transduziert waren.

HeLaT-Zellen:



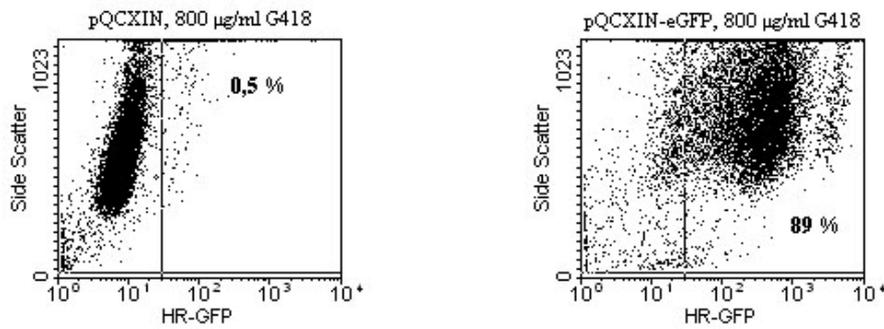
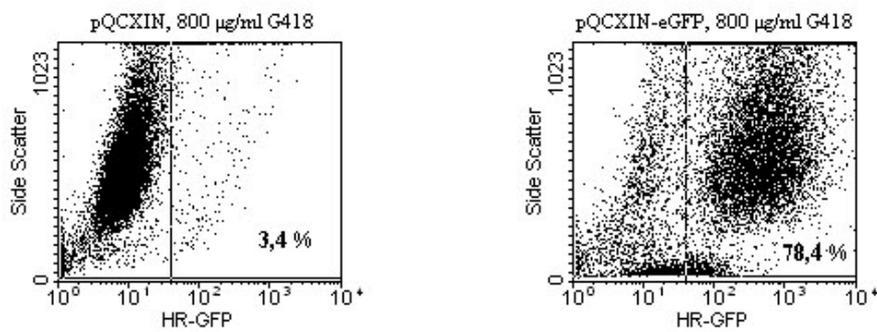
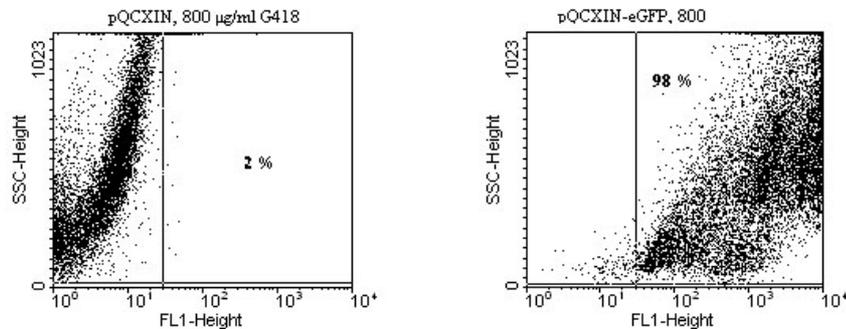
U937-Zellen:**HMC-1-Zellen:****HEK293-Zellen:**

Abbildung 4.32: Durchflußzytometrische Überprüfung der mit pQCXIN-eGFP stabil transduzierten Zelllinien HeLaT, U937, HMC-1 und HEK293 nach 14-tägiger Selektion mit G418 im Vergleich zu Leervektor transduzierten Zellen. Die hervorgehobenen Prozentzahlen geben die Anzahl an eGFP-positiven Zellen wieder.

Nachdem die stabilen Zelllinien für weitere drei Wochen unter G418-Selektion kultiviert waren, wurde der Anteil an eGFP-positiven Zellen erneut bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass der Prozentsatz an stabil transduzierten Zellen gleich geblieben oder sogar um 2 - 3 % angestiegen ist.

4.4.2 Funktionsüberprüfung der Ets-1 dominant negativen Mutante

4.4.2.1 Untersuchung der inhibierenden Wirkung der Ets-1-DN auf die Stimuli-induzierte Hochregulation des C3aR in U937-Zellen

In Analogie zu den unter 4.2 beschriebenen Stimulationsexperimenten an der induzierbaren Zelllinie U937 sollte hier untersucht werden, ob die stabil integrierte Ets-1-DN die durch verschiedene Stimuli erzeugte Hochregulation des C3aR unterbinden kann. So wurden die mit dem Kontrollvektor pQCXIN und der Ets-1-DN stabil transduzierten U937-Zellen mit Bt₂-cAMP und IFN- γ für 72 h sowie mit TNF- α und IL-1 β für je zwei und vier Stunden stimuliert. Die Expression des C3aR wurde auf mRNA-Ebene mittels *real-time* RT-PCR bestimmt.

U937-Zellen	C3aR-mRNA [Induktionsfaktor im Vergleich zur Puffer-Kontrolle; bestimmt mittels <i>real-time</i> RT-PCR]	
	Stimulans (Stimulationszeitraum)	Kontrolle
Bt ₂ -cAMP (72 h)	52 (+/- 1,1)	3 (+/- 3,0)
IFN- γ (72 h)	7,9 (+/- 4,2)	11,8 (+/- 5,8)
IL-1 β (4 h)	1,3 (+/- 0,1)	2,2 (+/- 0,2)
TNF- α (4 h)	4,7 (+/- 0,9)	6,6 (+/- 1,5)
IL-1 β (2 h)	1,3 (+/- 0,2)	3,4 (+/- 1,2)
TNF- α (2 h)	4,3 (+/- 0,19)	8,0 (+/- 1,3)

Tabelle 4.8: *Real-time* RT-PCR Analyse der nach Stimulation von stabil transduzierten U937-Zellen resultierenden Hochregulation der C3aR-mRNA. Die mit dem Kontrollvektor pQCXIN und der Ets-1-DN transduzierten U937-Zellen wurden für 72 h mit Bt₂-cAMP [1 mM] und IFN- γ [1000 U/ml] sowie für je zwei und vier Stunden mit TNF- α [50 ng/ml] und IL-1 β [10 ng/ml] behandelt. Die Induktionsfaktoren wurden im Verhältnis zu der zu jedem Zeitpunkt mitgeführten Pufferkontrolle berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei vollkommen unabhängigen Experimenten mit Doppelwerten in jedem Test.

Wie aus der Tabelle 4.8 hervorgeht, verringert die stabil integrierte Ets-1-DN die durch Bt₂-cAMP induzierte Hochregulation des C3aR in U937-Zellen um Faktor ~ 18 im Vergleich zu Kontroll-transduzierten Zellen.

Dieses Ergebnis belegt eindeutig, dass die Ets-1-DN funktionell aktiv ist und tatsächlich die Stimuli-induzierte Hochregulation des C3aR verringert. Bei Stimulation mit IFN- γ , TNF- α oder IL-1 β konnte dieser Effekt jedoch nicht verzeichnet werden.

Teil 2:

4.5 Expressionsanalyse monozytärer Zellen mittels cDNA-Array

Dieser Teil der Dissertation basiert auf meiner vorausgegangenen Diplomarbeit am Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, in der Grundlagen zur Analyse von Anaphylatoxin-induzierten Genregulationen an monozytären Zellen erarbeitet wurden (Diplomarbeit M. Schaefer: „Arbeiten zur Expressionsanalyse mittels cDNA-Array und RT-PCR an monozytären Zellen und Chlamydien“). Aufbauend auf diese Arbeit sollten nun ein Überblick über C3a- und C5a-Rezeptor-nachgeschaltete intrazelluläre Regulationseinheiten und -Kaskaden in monozytären Zellen gewonnen und dabei neue Funktionen der Anaphylatoxine identifiziert werden. Hierbei sollten zuerst die in der Diplomarbeit begonnenen Vorarbeiten abgeschlossen und weitere Optimierungen vorgenommen werden. Abschließend sollte für etwa tausend Gene die AT-Rezeptor-nachgeschalteten Regulationsvorgänge auf mRNA-Ebene untersucht werden. Zum Screening sollten cDNA-Arrays, zur anschließenden Detailcharakterisierung exemplarisch ausgewählter Gene quantitative *real-time* RT-PCR und antigenetische Tests eingesetzt werden.

4.5.1 Planung der cDNA Array-Experimente

Mikroarrays ermöglichen den breit gefächerten Vergleich der Expressionsanalyse von zwei oder mehr Zellpopulationen auf mRNA-Ebene. Dabei kann z. B. das Transkriptom stimulierter mit dem nicht-stimulierter Zellen verglichen werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Atlas™ cDNA Expression Arrays der Firma Clontech/BD bieten die Möglichkeit gleichzeitig die Expression von ~ 1200 Genen zu betrachten. Daher eignen sie sich sehr gut als Screening-Verfahren zur Analyse der durch Anaphylatoxine induzierten Veränderung des Expressionsmusters monozytärer Zellen. Neben den Vorzügen der Mikroarrays bleibt jedoch zu beachten, dass diese Technologie immer noch sehr teuer ist und deshalb für die Versuchsplanung eine völlig andere Strategie als bei herkömmlichen Testverfahren angewandt werden muss. So ist es derzeit nicht finanzierbar, mit diesem Messverfahren selbst die Versuchsbedingungen zu optimieren. Stattdessen ist man gezwungen, wenn möglich auf der Basis anderer Daten, die Parameter der Versuchsdurchführung festzulegen und diese, maximal standardisiert, im Arrayexperiment anzuwenden.

Kurz vor Beginn dieser Arbeit konnte an C3aR-k/o-Mäusen gezeigt werden, dass C3a eine protektive Rolle beim LPS-induzierten Endotoxinschock zukommt [110]. Deshalb sollte hier neben der isolierten Wirkung der Anaphylatoxine zusätzlich die Interaktionen der C3aR- bzw. C5aR-abhängigen Signalwege mit dem TLR-4-Weg untersucht werden. Vor der Durchführung der eigentlichen Array-Experimente mussten zahlreiche Parameter festgelegt und nach Möglichkeit in Vorversuchen überprüft werden: Sollten Monozyten von Mensch oder Maus analysiert werden? Natürlich interessieren letztendlich die Regulationsvorgänge im

humanen System. Andererseits kann man jedoch an Mauszellen durchgeführte Messreihen wesentlich einfacher *in vivo* im Tiermodell weiterführen. Sollten monozytäre Zelllinien oder primäre aufgereinigte Monozyten verwendet werden? Zelllinien bieten viel konstantere Verhältnisse ohne Spender-abhängige Schwankungen. Dafür vermeidet man bei primären Zellen Tumorzellartefakte. Soll bei Verwendung von primären Zellen besser die RNA eines Spenders verwendet werden oder die von mehreren Spendern für die Analyse gepoolt werden? Sollen „native“ Zellen benutzt werden oder besser mit IFN- γ vorstimulierte? Mit welcher Konzentration und über welchen Zeitraum soll dieses „Priming“ gegebenenfalls erfolgen? In welcher Kombination, Konzentration und über welchen Zeitraum sollen die eigentlichen Stimuli eingesetzt werden? Werden die Anaphylatoxine während der Stimulation inaktiviert? Können Carboxypeptidase-N Inhibitoren eine Verstoffwechslung von C5a in schwach aktives C5a-desArg bzw. von C3a in inaktives C3a-desArg unterbinden? Oder müssen bei längeren Stimulationszeiten die Anaphylatoxine wiederholt dem Medium zugegeben werden?

Zur Klärung dieser Fragen wurden die im Folgenden beschriebenen Optimierungsexperimente durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass sich einige Parameter nicht eindeutig bestimmen ließen, sondern trotz aller Vorversuche „blind“ nach Plausibilität festgelegt werden mussten. Um die Chancen zu erhöhen, Versuchsbedingungen zu treffen, bei denen eine gute Regulation im Array zu beobachten ist, wurden im Mikroarray letztendlich parallel zwei Hauptzugänge (mit einer Variation) gewählt:

1. murine Tumorzelllinie J774A.1, mit C3a als Hauptstimulans
2. primäre humane Monozyten, mit C5a als Hauptstimulans
 - a) lange Stimulationszeiten
 - b) kurze Stimulationszeiten

4.5.2 Optimierung der Monozyten-Aufreinigung und Kultivierung

An dieser Stelle sei erwähnt, dass das Arbeiten mit primären Zellen im Vergleich zu etablierten Tumorzelllinien erhebliche Schwierigkeiten mit sich bringt. So ist allein die Beschaffung ausreichender Mengen von Monozyten problematisch. Für die meisten der hier vorgestellten Experimente wurden drei Vollblutspenden benötigt. Teilweise erwiesen sich die Zellen einzelner Spender schon während der Aufreinigung als untauglich, da nach der Ficoll-Zentrifugation keine klare Bande der polymorphkernigen Zellen zu erkennen war. Meist war dann eine sehr geringe Ausbeute an Monozyten die Folge.

Nachdem die MHH-Blutbank im Zuge einer neuen gesetzlichen Regelung die Serumgewinnung von der Zentrifugationsmethode, bei der die *Buffy Coats* als „Abfallprodukt“ entstehen, auf ein Filtersystem umstellte, wurde eine neue Beschaffungsquelle benötigt. Es stellte sich heraus, dass die Eigenblutbank des Annastiftes weiterhin nach der Zentrifugationsmethode Serum gewinnt. Freundlicherweise stellte man uns dort im Verlaufe der Zeit eine Vielzahl von *Buffy Coats* zur Verfügung. Natürlich ist die Spenderzahl

wesentlich geringer als in der MHH-Blutbank, so dass nicht oft die Möglichkeit bestand die Zellen von drei Spendern am selben Tag zu erhalten.

Bei der Aufreinigung von Monozyten aus *Buffy Coats* sind zwei Personen für etwa neun Stunden vollkommen in die Durchführung eingebunden, so dass eine besonders gute Versuchsplanung, gerade wegen der benötigten Hilfe einer zweiten Person, erforderlich war.

4.5.2.1 Monozyten-Aufreinigung – Verbesserung der Ausbeute und Reinheit

Im Folgenden sind die Optimierungsschritte des Monozyten-Aufreinigungsprotokolls bezüglich Ausbeute, Reinheit und Vitalität dargestellt.

Bei dem am Ende der Diplomarbeit verwendeten Protokoll wurde das Blut aus einem *Buffy Coat* 1:5 mit PBS gemischt und 30 ml davon über 20 ml Ficoll-Paque™ geschichtet. Als erster Optimierungsschritt in der Dissertation wurde das PBS zusätzlich mit 2 mM EDTA versetzt. Durch diesen Zusatz sollte verhindert werden, dass sich die Monozyten während der anschließenden Zentrifugation an die Polypropylenröhrchen anheften. Die Ausbeute konnte so spenderabhängig um Faktor zwei bis vier erhöht werden.

Der zweite Optimierungsschritt bestand in einer Verlängerung der Zentrifugation zur Trennung der Blutzellen von 25 auf 30 Minuten. Dabei wurde die Temperatur von Raumtemperatur auf 18°C, dem Temperaturoptimum des Ficoll-Paque™ herabgesetzt. Außerdem wurde die Zentrifugalkraft von 600 auf 400 x g verringert, um die Zellen noch schonender zu behandeln. Der Anteil an toten Zellen (Trypanblaufärbung) konnte so um etwa 20 % verringert werden.

Das Aussäen in einer geringeren oder höheren Dichte als 1×10^6 Zellen/cm², sowie längere oder kürzere Adhärierungsphasen als ein bis zwei Stunden führten nicht zu einer Verbesserung der Ausbeute bzw. Reinheit, so dass hier die ursprünglichen Vorgehensweisen beibehalten wurden.

In durchflußzytometrischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Spender- und „Tagesform-abhängig“ etwa 70 – 90 % der so gewonnenen Zellen CD14 positiv und damit eindeutig Monozyten/Makrophagen sind.

4.5.2.2 Auswahl des geeigneten Mediums zur Kultivierung von primären humanen Monozyten bei anschließender Stimulation mit den Anaphylatoxinen und/oder LPS

In der vorausgegangenen Diplomarbeit stellte sich RPMI 1640 unter Zusatz von 10 % FCS und 40 ng/ml GM-CSF als das beste der damals getesteten Medien zur Kultivierung von primären humanen Monozyten heraus. In der Dissertation sollte die durch C3a/C5a alleine bzw. in Kombination mit LPS induzierte Genregulation untersucht werden. Um eine Voraktivierung der Zellen durch GM-CSF auszuschließen, sollte hier ein Medium gefunden werden, in dem sich die Monozyten gleich gut kultivieren lassen, dem aber kein spezieller voraktivierender Stimulus zugefügt ist.

In der Literatur ist neben dem Zusatz von FCS auch der von humanem AB-Serum beschrieben. So wurde in einer ersten Versuchsreihe die Kultivierung der aufgereinigten Monozyten in RPMI mit 10 % AB-Serum im Vergleich zu FCS +/- GM-CSF ausgetestet. Beide Seren wurden hitzeinaktiviert. Die Monozyten wurden nach dem zuvor optimierten Protokoll aufgereinigt (siehe 3.4.1) und in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/cm² im entsprechenden Medium ausgesät (Tag 0). Nach eineinhalbstündiger Adhärenz wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit vorgewärmten PBS gewaschen und erneut mit Medium bedeckt.

Bezeichnung	Grundmedium	Serum	Antibiotika	Zusätze	ZK-Material
Medium I	RPMI 1640	FCS	P/S	GM-CSF	Greiner
Medium II	RPMI 1640	FCS	P/S	GM-CSF	Primaria (BD)
Medium III	RPMI 1640	FCS	P/S	-	Primaria (BD)
Medium IV	RPMI 1640	AB-Serum	P/S	-	Greiner
Medium V	RPMI 1640	AB-Serum	P/S	GM-CSF	Greiner

Tabelle 4.9: Auflistung verschiedener Medien, die zur Kultivierung von humanen Monozyten eingesetzt wurden. Zusätzlich wurde die Kultivierung der Monozyten in den normalerweise verwendeten Zellkulturflaschen der Firma Greiner mit der Serie Primaria von BD verglichen.

Nach zwei, vier und sechs Tagen wurde jeweils das Medium abgenommen, die enthaltenen Zellen gezählt und neues Medium auf die Zellen gegeben. In der folgenden Tabelle ist als Maß für die unerwünschte Ablösung von kultivierten Monozyten/Makrophagen die Anzahl der im Überstand befindlichen Zellen angegeben.

Bezeichnung	Tag 2	Tag 4	Tag 6
Medium I	$6,7 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	$9,9 \times 10^5$
Medium II	$6,8 \times 10^6$	$6,6 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$
Medium III	$1,4 \times 10^7$	$8,4 \times 10^6$	-
Medium IV	$1,2 \times 10^7$	$4,3 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$
Medium V	$1,0 \times 10^7$	$2,3 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$

Tabelle 4.10: In der Tabelle sind die nach den angegebenen Kultivierungstagen im Überstand befindlichen Zellen aufgeführt, die sich unter Verwendung verschiedener Medien abgelöst hatten.

In *Medium I und II* lösen über den gesamten Versuchszeitraum nur wenige Zellen ab. Nach vier Tagen sind die Monozyten stark ausdifferenziert, wesentlich größer geworden und haben viele Ausläufer gebildet. Bezüglich der Anheftungsfähigkeit und Vitalität (Trypanblau) kann kein Unterschied zwischen den Zellkulturflaschen von Greiner und der Serie Primaria von BD verzeichnet werden. In nachfolgenden Experimenten wurden die Monozyten daher in den üblicherweise verwendeten Flaschen von Greiner kultiviert.

In *Medium III* hatten im Vergleich zu allen anderen Medien schon nach zwei bzw. vier Tagen die meisten Zellen abgelöst. Nach sechs Tagen waren nur noch vereinzelt Zellen am Boden der Zellkulturflasche haften geblieben. Nahezu alle der abgelösten Zellen waren tot (Trypanblau).

Bei Verwendung der *Medien IV und V* lösen sich ebenso wenige Zellen ab wie in Medium I und II. Nach vier Tagen sind die Zellen extrem gewachsen. Nach sechs Tagen war nahezu der gesamte Boden der Zellkulturflasche bedeckt, so dass die Zellen ihre Ausläufer wieder eingezogen haben und somit sehr groß und rund wirken.

Es bleibt also festzuhalten, dass Monozyten in *Medium IV* dauerhaft ohne den Zusatz zusätzlicher Stimuli bzw. Wachstumsfaktoren kultiviert werden können. Diese Ergebnisse wurden in mehreren Folgeexperimenten bestätigt.

Im Verlauf dieser Arbeit konnte außerdem nachgewiesen werden, dass Monozyten, bei denen kein Mediumwechsel vorgenommen wurde, bis zu 10 Tagen kultiviert werden können. Dagegen lösten sich etwa 30 % der Zellen, bei denen ein Mediumwechsel durchgeführt wurde anschließend ab. Diese Zellen waren abgestorben (Vitalfärbung mit Trypanblau). Möglicherweise bilden die Zellen autokrine Faktoren, die zur Aufrechterhaltung ihrer Vitalität und Adhärenz nützlich sind. In folgenden Experimenten wurde daher von einem vollständigen Mediumwechsel abgesehen und wenigstens, falls dies versuchstechnisch nicht anders möglich war, zumindest die Hälfte des Mediums auf den Zellen gelassen.

Auch wenn im Weiteren von Monozyten gesprochen wird, so handelt sich nach der Kultivierung um *differenzierte* Monozyten bzw. Makrophagen.

4.5.3 Nachweis der C3aR- und C5aR-Expression auf monozytären Zellen bzw. Zelllinien mittels FACS-Analysen und ¹²⁵I-Bindungsstudien

4.5.3.1 Durchflußzytometrische Untersuchung primärer humaner Monozyten

In meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, dass die Expression des C3aR und C5aR auf Monozyten (bei der Verwendung von RPMI 1640 unter Zusatz von 10 % FCS und 40 ng/ml GM-CSF) mit der Dauer der Kultivierung zunimmt.

In den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurde untersucht, ob die Expression der beiden Rezeptoren ebenso stark ist, wenn die Zellen ohne den Zusatz von Wachstumsfaktoren und mit 10 % AB-Serum anstelle von FCS kultiviert werden (Abbildung 4.33).

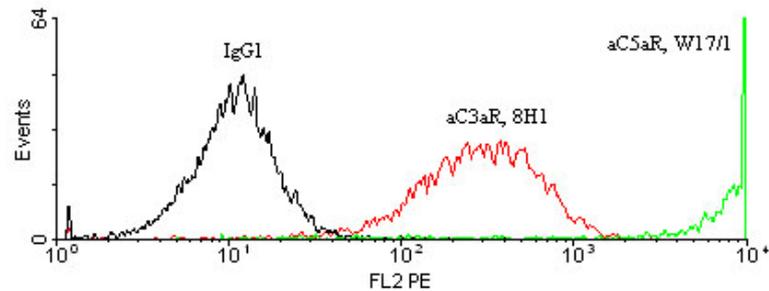


Abbildung 4.33: Durchflußzytometrischer Nachweis des C3aR und C5aR auf humanen Monozyten nach dreitägiger Kultur in RPMI + 10 % AB-Serum unter Verwendung der monoklonalen Antikörper 8H1 und W17/1. Die hohe Expression des C5aR liegt größtenteils außerhalb des Mess- bzw. Darstellungsbereiches. Als Kontrolle für unspezifische Bindung wurde ein kommerziell erhältlicher isotypischer IgG₁-Antikörper verwendet.

Weiterhin sollte geklärt werden, ob eine Vorstimulation der Zellen mit IFN- γ Einfluss auf die Rezeptorexpression hat. Dazu wurden die Monozyten von zwei Spendern am Tag 3 (Abbildung 4.34) nach der Aufreinigung für je 1 h und 24 h, am Tag 7 (Abbildung 4.35) lediglich für 1 h mit IFN- γ (300 U/ml) stimuliert. Parallel wurde die funktionelle Kopplung im Ca²⁺-Freisetzungstest von den Zellen desselben Spenders gemessen (siehe 4.5.4).

Da die durch C3a und C5a vermittelten Effekte direkt von der Rezeptordichte abhängig sind [100], sollte die Stimulation für den Array möglichst an dem Tag erfolgen, an welchem die stärkste Rezeptorexpression und funktionelle Kopplung zu verzeichnen ist.

Da der humane Array mit C5a als Hauptstimulans durchgeführt wurde, ist hier nur die Expression des entsprechenden Rezeptors aufgezeigt.

Tag 3 nach Aufreinigung

ohne Stimulation :

1 h IFN- γ :

24 h IFN- γ :

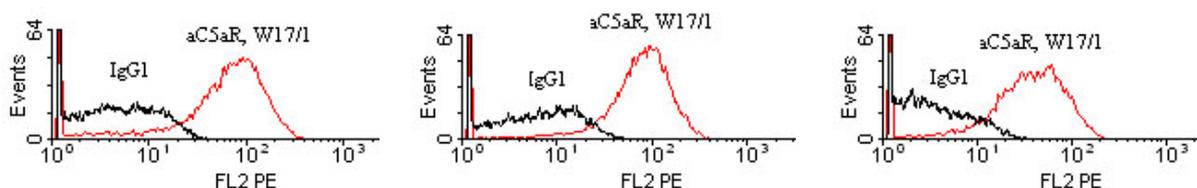


Abbildung 4.34: Durchflußzytometrischer Nachweis des C5aR auf humanen Monozyten nach dreitägiger Kultur in RPMI + 10 % AB-Serum unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers W17/1. Aufgezeigt sind nicht stimulierte, sowie für 1 h und 24 h mit 300 U/ml stimulierte Zellen. Als Kontrolle für unspezifische Bindung wurde ein kommerziell erhältlicher isotypischer IgG₁-Antikörper verwendet.

Tag 7 nach Aufreinigung

ohne Stimulation :

1 h IFN- γ :



Abbildung 4.35: Durchflußzytometrischer Nachweis des C5aR auf humanen Monozyten nach siebentägiger Kultur in RPMI + 10 % AB-Serum unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers W17/1. Aufgezeigt sind nicht stimulierte, sowie für 1 h mit 300 U/ml stimulierte Zellen. Als Kontrolle für unspezifische Bindung wurde ein kommerziell erhältlicher isotypischer IgG₁-Antikörper verwendet.

In den Abbildung 4.34 ist anschaulich demonstriert, dass eine Stimulation mit IFN- γ keinen Einfluß auf die C5aR-Expression hat. Weiterhin ist zu beobachten, dass am Tag 3 nach der Aufreinigung etwa mehr Rezeptoren auf den Monozyten vorhanden sind.

4.5.3.2 Überprüfung primärer humaner Monozyten auf Rezeptorexpression mittels kompetitiver ¹²⁵I-C5a-Bindungsstudie

Die mittels Durchflußzytometrie gezeigte C3aR- und C5aR-Expression auf primären humanen Monozyten sollte in ¹²⁵I-Bindungsstudien bestätigt werden. Das heißt, Sinn und Zweck dieser Experimente war lediglich die semiquantitative Überprüfung der C5aR-Expression, eine Bestimmung der genauen Rezeptorzahl und K_D war hier nicht von Interesse. Die Monozyten wurden standardmäßig aufgereinigt und kultiviert. Da für den cDNA Array an primären humanen Monozyten/Makrophagen das Anaphylatoxin C5a als Hauptstimulans eingesetzt werden sollte, wurde hier ausschließlich eine ¹²⁵I-C5a-Bindungsstudie wie unter 3.2.16 beschrieben durchgeführt.

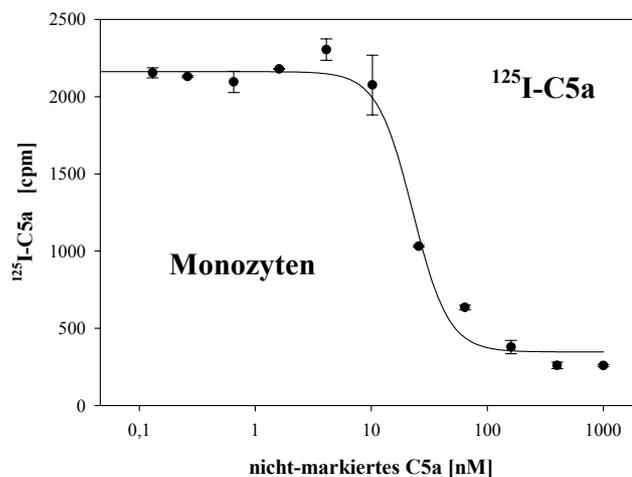


Abbildung 4.36: Kompetitive ¹²⁵I-C5a-Bindungsstudie an primären humanen Monozyten. Die über Ficoll-Paque™ und Adhärenz aufgereinigten Monozyten wurden in RPMI mit 10 % AB-Serum kultiviert. Die ED₅₀ liegt etwa bei 23 nM.

Der Abbildung 4.36 ist zu entnehmen, dass die ED_{50} , die bei Voraussetzung nur einer Bindungsstelle in etwa der K_D entspricht, bei 23 nM liegt (normal: 1 – 5 nM).

4.5.3.3 Überprüfung der Zelllinie J774A.1 auf Rezeptor-Expression mittels kompetitiver ^{125}I -C3a-Bindungsstudie

Für den zweiten Hauptzugang bei der Array-Planung wurde die murine Zelllinie J774A.1 gewählt. Deshalb musste auch an diesen Zellen ausgetestet werden, ob sie den C3aR/C5aR in genügend hoher Kopienzahl auf ihrer Oberfläche tragen. Da für dieses Array-Experiment das Anaphylatoxin C3a als Hauptstimulans eingesetzt werden sollte, wurde zuerst eine komplette ^{125}I -C3a-Bindungsstudie, wie unter 3.2.16 beschrieben, durchgeführt. Auch hier war die Bestimmung der genauen Rezeptorzahl und K_D nicht von Interesse, es sollte lediglich grundsätzlich die C3aR-Expression überprüft werden. Zur Austestung, ob eine Vorstimulation der Zellen mit $\text{IFN-}\gamma$ die konstitutive Expression der Anaphylatoxin-Rezeptoren auf diesen Zellen beeinträchtigt, wurden anschließend ^{125}I -C3a- und C5a-Bindungsstudien nach einem entsprechenden Priming der Zellen durchgeführt.

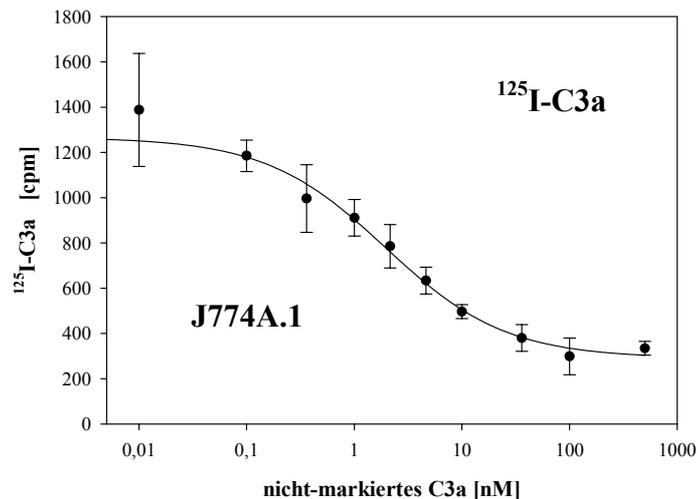


Abbildung 4.37: Kompetitive ^{125}I -C3a-Bindungsstudie an der murinen Zelllinie J774A.1. Aufgetragen sind die gemessenen cpm gegen die ansteigenden Konzentrationen des kalten Verdrängers C3a (Mittelwert und Standardabweichung von je vier Werten). Als Positivkontrolle wurde die humane Mastzelllinie HMC-1 mitgeführt. Hierbei wurde lediglich eine Zweipunktmessung durchgeführt: ohne Zugabe des kalten Verdrängers ergaben sich 1603 cpm (Gesamtbindung), unter Zugabe von 500 nM kaltem C3a konnten 140 cpm (unspezifische Bindung) gemessen werden. $ED_{50} = 2$ nM.

In der Abbildung 4.37 bestätigt sich, dass die Zelllinie J774A.1 den C3aR auf ihrer Oberfläche exprimiert. Die ED_{50} , die bei Voraussetzung nur einer Bindungsstelle in etwa der K_D entspricht, lag bei 2 nM.

Da unter physiologischen Bedingungen nie ein einzelnes Zytokin, Wachstumsfaktor oder Entzündungsmediator vollkommen isoliert wirkt, sollten auch diese Zellen vor der

eigentlichen Stimulation (mit den Anaphylatoxinen und/oder LPS) mit IFN- γ geprimt werden. Zuvor musste jedoch untersucht werden, ob sich diese Vorbehandlung der Zellen auf die Expression der Anaphylatoxin-Rezeptoren auswirkt. Hierzu wurden erneut ^{125}I -C3a- und C5a-Bindungsstudien (semiquantitativ) durchgeführt, wobei die Zellen für eine und 24 Stunden mit je 300 U/ml IFN- γ stimuliert wurden. Bei der ^{125}I -C5a-Bindungsstudie wurde mit 250 nM kaltem C5a verdrängt, bei der ^{125}I -C3a-Bindungsstudie hingegen mit 500 nM kaltem C3a. Zum Vergleich wurden unbehandelte Zellen eingesetzt.

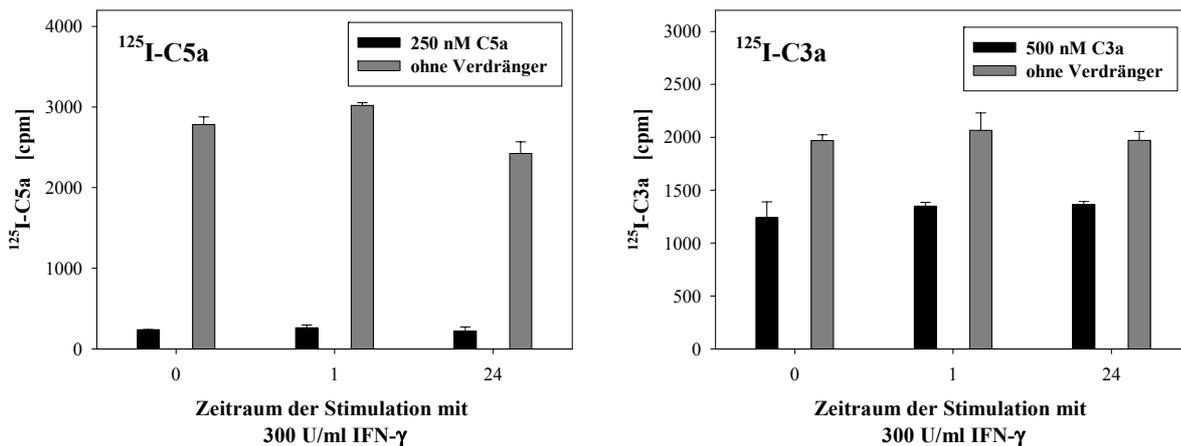


Abbildung 4.38: Semiquantitative kompetitive ^{125}I -C3a- und C5a-Bindungsstudien an der murinen Zelllinie J774A.1, die zuvor für 0, 1 und 24 Stunden mit 300 U/ml IFN- γ stimuliert wurde. Aufgetragen sind die gemessenen cpm gegen den Zeitraum der Stimulation mit IFN- γ . Bei der orientierenden ^{125}I -C3a-Bindungsstudie wurde mit 500 nM kaltem C3a verdrängt, wohingegen bei der ^{125}I -C5a-Bindungsstudie eine Konzentration von 250 nM an kaltem Verdränger C5a ausreichend war.

Wie in den Abbildungen 6 a) und b) ersichtlich, wirkte sich weder eine einstündige, noch eine 24-stündige Stimulation mit 300 U/ml IFN- γ nachteilig auf die Expression der Anaphylatoxin-Rezeptoren auf J774A.1-Zellen aus.

4.5.4 Nachweis der Funktionsfähigkeit des C3aR und C5aR auf monozytären Zellen mittels Ca^{2+} -Test

Um die funktionelle Kopplung der beiden Anaphylatoxin-Rezeptoren C3aR und C5aR auf primären humanen Monozyten zu überprüfen, wurde der Anstieg an freiem zytosolischem Ca^{2+} nach Stimulation mit C3a und C5a gemessen. Im Vergleich zum antigenetischen Nachweis mittels FACS, bei dem allein das Vorhandensein der Rezeptoren auf Zelloberflächen betrachtet wird, untersucht man in diesem Test, ob die Proteine tatsächlich funktionell aktiv sind. Die nach Ligandenbindung erfolgende Signalweiterleitung ist schließlich die Grundvoraussetzung für eine Beeinflussung des Genexpressionsmusters. Durch die Bindung der Anaphylatoxine an ihren entsprechenden Rezeptor kommt es nach der

Aktivierung des assoziierten G-Proteins zur Induktion der Phosphoinosid-Kaskade und damit zur Ausschüttung von Ca^{2+} aus internen Speichern und zum Einstrom durch spezifische Ionenkanäle.

Der Ca^{2+} -Test wurde mit den standardmäßig aufgereinigten und kultivierten Monozyten wie unter 3.1.2 beschrieben durchgeführt. Um spenderabhängige Artefakte auszuschließen, sollte der antigenetische Nachweis und der Ca^{2+} -Test aus den Monozyten ein und desselben Spenders erfolgen. Da die Versuchsreihe über eine Woche fortgesetzt wurde, musste an dieser Stelle auf die Messung von Mehrfachwerten verzichtet werden, da es unmöglich ist, aus einem *Buffy Coat* die für Wiederholungsversuche benötigten Zellmengen zu gewinnen.

Zur Absicherung der Ergebnisse wurden jedoch zwei Spender parallel betrachtet und zusätzlich der gesamte Versuch wiederholt. Hierbei ließen sich die Ergebnisse in der Tendenz bestätigen.

Die erste Überprüfung der funktionellen Kopplung fand am Tag vier nach der Aufreinigung statt. Die Ergebnisse sind in folgender Abbildung dargestellt. Hierbei ist eindeutig zu erkennen, dass die Zellen sehr gut auf C5a antworten, wohingegen die C3a-Antwort etwas schwach ausfällt. Weiterhin kann man festhalten, dass die Signalstärke bei verschiedenen Spendern stark variiert.

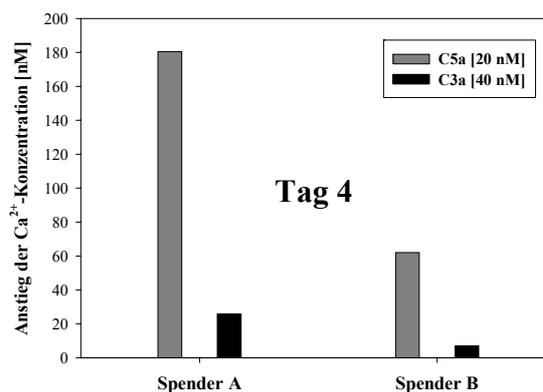


Abbildung 4.39: Auftragung der Konzentration an freiem zytosolischem Ca^{2+} nach Stimulation der primären humanen Monozyten mit C5a und C3a. Die Monozyten waren über Ficoll-Paque™ und Adhärenz aufgereinigt. Der Test wurde vier Tage nach der Isolation der Zellen durchgeführt. Die Stimuli wurden in folgenden Endkonzentrationen zugesetzt: C5a → 20 nM, C3a → 40 nM. Dargestellt sind die Messwerte von zwei unterschiedlichen Spendern.

Die zweite Ca^{2+} -Freisetzungsmessung erfolgte am achten Tag nach der Aufreinigung. Da schon entschieden war, die Monozyten für den humanen Array mit dem Anaphylatoxin C5a zu stimulieren, wurden die Zellen hier nur mit diesem Anaphylatoxin behandelt. Zusätzlich wurde jedoch untersucht, ob eine Vorstimulation mit 300 U/ml IFN- γ Einfluss auf die funktionelle Kopplung hat. Es zeigte sich, dass ein Priming der Zellen weder für eine noch für 24 Stunden die Freisetzung von Ca^{2+} nach Ligandenbindung beeinflusst. Diese Daten sind hier nicht aufgeführt.

4.5.5 ATP-Release-Assay zur Überprüfung der C3a-Stabilität in den Stimulationsmedien

Um sicherzustellen, dass die Konzentration an Anaphylatoxinen im Zellkulturmedium über den gesamten Zeitraum der Stimulation annähernd konstant bleibt, wurde im ATP-Release-Assay (ARA) untersucht, ob es während der Stimulationsphase zu einem Verlust biologisch aktiver Anaphylatoxine kommt und ob gegebenenfalls der Zusatz der Inhibitoren 6-Aminohexansäure und Plummer's Inhibitor, die spezifische Desarginierung der Anaphylatoxine durch die Carboxypeptidase N verhindern kann. Bei diesem Testverfahren kann lediglich der Abbau des C3a eindeutig bestimmt werden. Dies liegt unter anderem daran, dass C5a_{desArg} noch (vermindert) aktiv ist. Man kann jedoch davon ausgehen, dass die Desarginierung von C5a annähernd derselben Kinetik gehorcht, da sie demselben Mechanismus folgt.

Für dieses Testverfahren wurden die nach dem Standardprotokoll aufgereinigten und kultivierten Monozyten für null und 24 Stunden mit dem Anaphylatoxin C3a [75 nM] stimuliert. In diesem ersten Versuch wurde kein Inhibitor zugesetzt.

Für den ARA wurde eine Verdünnungsreihe beginnend mit 100 nM C3a eingesetzt und in je Dreifachwerten, wie unter 3.1.3 beschrieben, vermessen. Die Überstände der null und 24-Stunden stimulierten Zellen wurde ebenfalls in Dreifachwerten zum Test eingesetzt. Nach sigmoidaler Kurvenanpassung der Standardreihe wurde für die im linearen Bereich befindlichen Messwerte die Konzentration ermittelt.

Daraus ergab sich, dass im Medium der für null Stunden stimulierten Zellen 16 nM C3a detektiert werden konnte. Nach der 24-stündigen Behandlung mit dem Anaphylatoxin fiel die Konzentration auf 0,7 nM ab.

Es bleibt also festzuhalten, dass die Konzentration an C3a ohne den Zusatz der Carboxypeptidase N-Inhibitoren bei 24-stündiger Stimulation um mehr als das Zehnfache abnimmt. Das heißt bei einer längerfristigen Stimulation müsste dem Medium mehrmals das Anaphylatoxin zugeführt werden, was den Verbrauch des relativ teuren Stimulans extrem erhöhen würde und möglicherweise mechanisch/physikalisch zu einer Aktivierung der Zellen führen könnte.

Bei der zweiten Versuchsreihe wurden die äquivalent aufgereinigten und kultivierten Monozyten für null und 24 Stunden mit 50 nM C3a stimuliert. Diesmal war das Medium jedoch mit 1,5 mM Plummer's Inhibitor und 50 mM 6-Aminohexansäure versetzt. Die Überstände wurden wie oben beschrieben im ARA eingesetzt und die Konzentrationen anhand der C3a-Standardreihe berechnet.

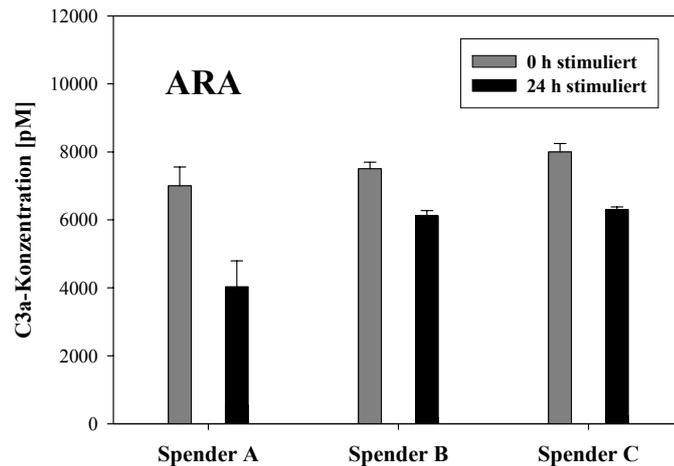


Abbildung 4.40: Nachweis der C3a-Konzentration in Monozyten-Überständen nach null- und 24-stündiger Stimulation mit 50 nM C3a in Gegenwart von 1,5 mM Plummer's Inhibitor und 50 mM 6-Aminohexansäure. Dargestellt sind die anhand der C3a-Standardreihe berechneten Konzentrationen von drei unabhängigen Spendern.

Wie in Abbildung 4.40 ersichtlich ist, nimmt die Konzentration an funktionell aktivem C3a im Stimulationsmedium nach 24 Stunden maximal um die Hälfte ab. Da mit einem Überschuss des Anaphylatoxins stimuliert wird, reicht das verbleibende aktive C3a vollkommen zur Induktion aus.

4.5.6 Lipopolysaccharid-freies Arbeiten

Die Modifikation der Anaphylatoxin-induzierten Genregulationen an monozytären Zellen durch Lipopolysaccharide (LPS) kann nur dann eindeutig analysiert werden, wenn eine Pyrogen-Verunreinigung sämtlicher Materialien ausgeschlossen werden kann. So mussten alle Puffer, Medien, Stimuli, Reaktionsgefäße usw., die, angefangen bei der Monozyten-Aufreinigung bis hin zur eigentlichen Stimulation, benötigt wurden, entweder „LPS-frei“ (Endotoxingehalt < 1 EU/ml) bestellt werden oder im Limulus-Amebocyte-Lysate-Test (Endochrom™, siehe 3.2.15) auf eventuelle LPS-Verunreinigungen hin getestet werden. Da ein Teil der benötigten Chemikalien diesen Grenzwert zunächst überschritt, musste nach Alternativen von anderen Firmen gesucht werden und diese erneut dem Endochrom™-Test unterzogen werden. Zuletzt wurde untersucht, ob auch das komplette Stimulationsmedium inklusive AB-Serum, IFN- γ , Plummer's Inhibitor, 6-Aminohexansäure und C3a bzw. C5a einen Pyrogengehalt < 1 EU/ml aufwies.

LPS ist ein Membranbestandteil gramnegativer Bakterien. Um eine Kontamination mit solchen Erregern auszuschließen, durften sämtliche Versuche ausschließlich unter der Sterilwerkbank durchgeführt werden.

4.5.7 Bestimmung einer LPS Dosis-Wirkungskurve mittels IL-8-ELISA

In diesem Teil der Arbeit sollte die optimale Konzentration an Lipopolysaccharid zur Stimulation von primären humanen Monozyten ermittelt werden, bei der die Zellantwort möglichst groß ausfällt. Aus der Literatur ist bekannt, dass humane Monozyten auf eine LPS-Stimulation mit der Produktion von Interleukin-8 antworten, so dass der IL-8-ELISA hier zur Bestimmung einer Dosis-Wirkungskurve herangezogen wurde.

Standardmäßig aufgereinigte Monozyten wurden mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen stimuliert. Die Überstände wurden wie unter 3.5 beschrieben für den IL-8-ELISA eingesetzt. Um repräsentative Ergebnisse zu erhalten wurden jeweils vier *wells* mit der gleichen LPS-Menge behandelt. Hierbei war auffällig, dass die Mehrfachwerte unüblich stark schwankten.

Nach Gesprächen mit dem LPS-Spezialisten Prof. Dr. A. J. Ulmer vom Forschungszentrum Borstel stellte sich heraus, dass folgende Änderungen bezüglich der Lagerung und Verarbeitung des verwendeten Endotoxins zweckmäßig erschienen: Das neu bestellte *E. coli* 0127:B8 LPS von Sigma (nach [110]) wurde in H₂O (statt PBS) in einer Konzentration von 1 mg/ml (statt 10 mg/ml) gelöst und bei 4°C (statt – 80°C) gelagert. Ganz entscheidend ist die Aufbewahrung im Glasgefäß anstelle von Plastik, da sich Endotoxine extrem stark an Plastik anheften und somit schon die Konzentration der Stocklösung verändert wird. Weiterhin sollte die Stocklösung aus demselben Grund nur mit silikonisierten Pipettenspitzen pipettiert werden. Zu beachten bleibt jedoch, dass bei der Verwendung kommerziell erhältlicher LPS-Chargen, insbesondere bei hohen Konzentrationen, eine Mitaktivierung des TLR-2-Weges durch Kontaminanten nicht auszuschließen ist.

Mit dem neuen LPS wurde die Aufnahme einer Dosis-Wirkungskurve wiederholt. Zum Vergleich wurde die humane monozytäre Zelllinie U937 ebenfalls mit verschiedenen LPS-Konzentrationen stimuliert und die Überstände anschließend im IL-8-ELISA analysiert. Um sicherzustellen, dass die Ergebnisse repräsentativ sind, wurden bei beiden Zellarten pro Bedingung je vier *wells* parallel stimuliert. Die folgenden Abbildungen zeigen den gemessenen Verlauf.

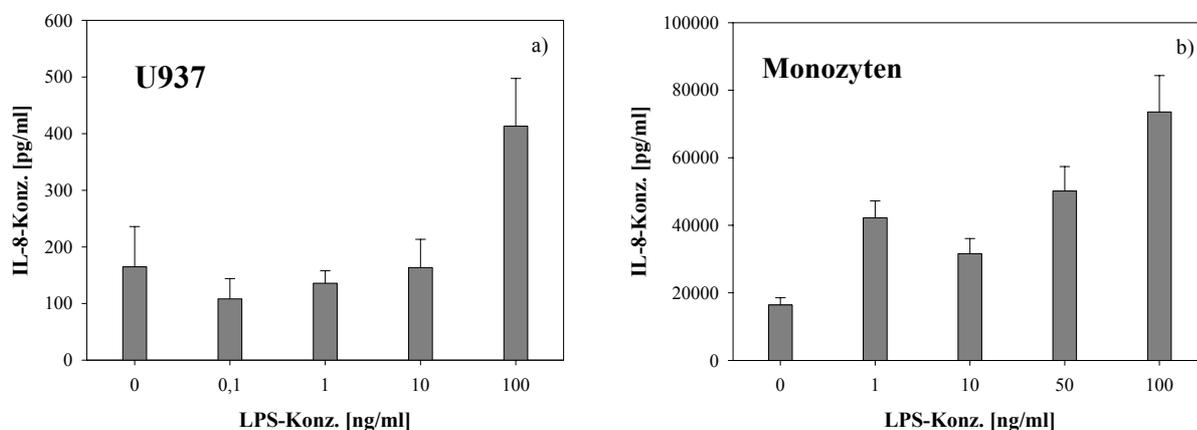


Abbildung 4.41: LPS-Dosis-Wirkungskurven. a) U937-Zellen wurden für 24 h mit den angegebenen LPS-Konzentrationen stimuliert. b) Monozyten in RPMI-Medium mit 10 % AB-Serum für 3 Tage kultiviert, abgelöst,

in 24-well Platten erneut ausgesät und am nächsten Tag für 24 h mit LPS stimuliert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von je vier unabhängig behandelten Proben.

In den Abbildung 4.41 a) und b) ist zu erkennen, dass die monozytäre Zelllinie U937 und primäre humane Monozyten etwa mit der gleichen Dosisabhängigkeit auf eine Stimulation mit LPS reagieren, wobei die IL-8-Antwort der Monozyten etwa um Faktor 100 höher ausfällt. Bei der Zelllinie U937 ist der stärkste Anstieg zwischen 10 und 100 ng/ml LPS zu verzeichnen, daher wurde bei der Aufnahme der Dosis-Wirkungskurve an Monozyten zusätzlich mit 50 ng/ml LPS stimuliert.

Es bleibt also festzuhalten, dass primäre humane Monozyten mit einer starken IL-8-Produktion auf eine Stimulation mit LPS antworten, wohingegen die Antwort von nicht-differenzierten U937-Zellen wesentlich schwächer ausfällt.

Die Hypothese, dass C3a/C5a die LPS-induzierte Antwort in monozytären Zellen modifizieren können, sollte im Mikroarray untersucht werden. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, im Array die größtmögliche Anzahl an regulierten Genen zu erhalten, wäre es wünschenswert gewesen, die zur Bestätigung dieser Hypothese nötigen Versuchs-/Stimulationsbedingungen vorab exemplarisch an einem Genprodukt zu optimieren. Da sich der IL-8-ELISA als geeignetes System zur Bestimmung LPS-induzierter Zellantworten herausgestellt hatte, sollte er auch zur Klärung obiger Fragestellung herangezogen werden.

Die über Ficoll-Paque™ und Adhärenz aufgereinigten Monozyten wurden für drei Tage in RPMI 1640 unter Zusatz von a) 10 % FCS + 40 ng/ml GM-CSF, b) 10 % FCS und c) 10 % AB-Serum kultiviert. Es folgte eine 24-stündige Stimulation mit 50 ng/ml LPS alleine und in Kombination mit 50 nM C3a bzw. 40 nM C5a. Die Überstände wurden wie unter 3.5.1 geschildert für den IL-8-ELISA eingesetzt. Die Ergebnisse sind in der nachfolgend dargestellten Abbildung ersichtlich.

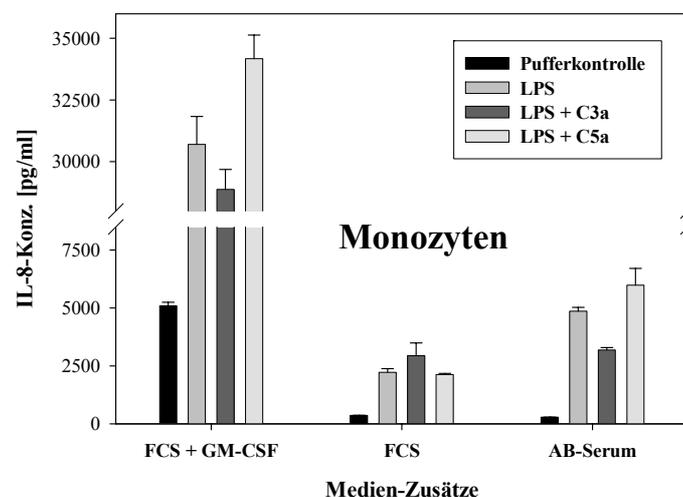


Abbildung 4.42: IL-8-Konzentration im Zellkulturüberstand stimulierter primärer humaner Monozyten. Die Zellen wurden über Ficoll-Paque™ und Adhärenz aufgereinigt und für drei Tage bei 37°C und 5 % CO₂ in RPMI 1640 unter Zusatz der in der Legende angegebenen Seren und/oder Wachstumsfaktoren kultiviert. Die

Stimulation erfolgte für 24 Stunden mit 50 ng/ml LPS und/oder 50 nM C3a bzw. 40 nM C5a. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung von drei Messpunkten im ELISA. Im Wiederholungsversuch wurden die Daten bestätigt.

In Abbildung 4.42 ist anschaulich demonstriert, dass C3a und C5a die LPS-induzierte IL-8-Antwort primärer humaner Monozyten nicht signifikant modifizieren. Somit stellt der IL-8-ELISA leider kein geeignetes Messverfahren dar, um die durch C3a/C5a-bedingte Veränderung einer LPS-induzierten Zellantwort weiter zu optimieren. Weiterhin kann der Abbildung entnommen werden, dass der Zusatz von GM-CSF zum Kultivierungsmedium den IL-8-Basislevel erheblich erhöht und somit auch die IL-8-Produktion nach Stimulation (mit LPS alleine oder in Kombination mit den Anaphylatoxinen) wesentlich stärker ausfällt als bei den Kultivierungsmedien ohne weitere Zusatzstoffe. Somit bestätigt sich die Vermutung, dass die Zellen durch GM-CSF vorstimuliert werden.

4.5.8 RNA-Extraktion

Nachdem die konstitutive Expression der Anaphylatoxin-Rezeptoren auf J774A.1-Zellen gesichert war, musste ermittelt werden, aus wie vielen Zellen die für einen Array benötigte RNA-Menge gewonnen werden kann. Selbiges musste natürlich für die nach Standardprotokoll aufgereinigten und kultivierten humanen Monozyten untersucht werden.

Zu Beginn dieser Experimente wurde die RNA wie unter 3.2.17.1 beschrieben unter Verwendung von Chloroform aufgereinigt. Nach der sich anschließenden cDNA-Synthese wurde eine PCR mit den Primern für das Haushaltsgen RPS9 (murin bzw. human) wie unter 3.2.9 geschildert zur Überprüfung auf Verunreinigungen mit genomischer DNA durchgeführt. Nach der Visualisierung im Agarosegel stellte sich heraus, dass sämtliche Proben geringe Mengen an genomischer DNA enthielten, so dass ein DNase-Verdau und eine zweite RNA-Aufreinigungsrunde angeschlossen werden mussten. Nach erneuter Konzentrationsbestimmung und Auftragung sowohl der einmal als auch der zweimal aufgereinigten RNA auf ein denaturierendes Agarosegel konnte gezeigt werden, dass die Proben nach dem DNase-Verdau leicht degradiert waren und sich die Konzentration extrem verringert hatte. Dieses Experiment wurde mehrmals mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt, wobei zur Kontrolle HeLaT-Zellen mitgeführt wurden, bei denen der extreme Konzentrationsverlust und die Degradation nach dem DNase-Verdau nur in geringem Ausmaß zu verzeichnen waren. Daher muss davon ausgegangen werden, dass die aus Zellen monozytären Ursprungs gewonnene RNA instabiler und damit degradationsanfälliger ist als die RNA aus Zellen nicht-monozytären Ursprungs, wie z. B. HeLaT.

Als nächstes wurde (auf Anraten von Dr. Lauber aus der GBF in Braunschweig) bei der RNA-Aufreinigung Chloroform durch 1-Brom-3-chlorpropan (BCP) ersetzt. Das oben beschriebene Experiment wurde wiederholt, wobei sich herausstellte, dass die nach dem neuen Protokoll aufgereinigte RNA schon nach der ersten Runde keine genomische DNA

mehr enthielt, so dass im Folgenden auf den DNase-Verdau und die zweite Extraktion verzichtet werden konnte.

Unter den genannten Bedingungen konnte aus 2×10^6 J774A.1 Zellen etwa 45 bis 60 μg RNA gewonnen werden. Bei den Monozyten schwankt die RNA-Ausbeute aufgrund der oben ausführlich beschriebenen Problematik mit primären Zellen (siehe 4.5.2) spender- und „tagesform“-abhängig. Festzuhalten bleibt jedoch, dass auf jeden Fall aus einem Spender genügend RNA isoliert werden kann, um bei vier verschiedenen Stimulationsmedien für jede Bedingung mindestens 10 μg RNA zu erhalten

4.5.9 Atlas™ Mouse 1.2 cDNA Expression Array – Stimulation der J774A.1-Zelllinie und Durchführung des Array-Experimentes

Für die Planung des weiteren Vorgehens wurden die Resultate der oben geschilderten Vorversuche so weit wie möglich berücksichtigt.

Wie schon unter 4.5.1 ausführlich dargelegt, ist es aufgrund der hohen Preise von Mikroarrays nicht möglich, eine Vielzahl von Bedingungen auszutesten. Daher bestand weder die Möglichkeit eine Kinetik aufzunehmen noch sämtliche denkbaren Kombinationen der Stimuli einzusetzen.

Da von C3a wesentlich weniger Funktionen beschrieben sind als von C5a sollte es für den murinen Array als Hauptstimulans eingesetzt werden.

Der FMLP-Rezeptor ist der nächste Verwandte der Anaphylatoxin-Rezeptoren. Da FMLP in Ca^{2+} -Freisetzungstests stets höhere und länger andauernde Signale liefert als C3a (und auch als C5a), sollte es an dieser Stelle als zusätzliches Stimulans eingesetzt werden. Es bestand die Annahme, dass FMLP möglicherweise auch im Array die höheren Regulationen hervorruft.

Es wurde also entschieden, die murine Zelllinie J774A.1 mit *a)* Medium, *b)* 50 nM C3a, *c)* 50 ng/ml LPS, *d)* 100 nM FMLP, *e)* der Kombination aus C3a und LPS sowie *f)* der Kombination aus FMLP und LPS für sechs Stunden zu stimulieren. Pro Bedingung waren am Vortag sieben kleine Zellkulturflaschen mit je 2×10^6 Zellen ausgesät worden. Vor der eigentlichen Stimulation wurden die Zellen für eine Stunde mit 300 U/ml murinem IFN- γ geprimt. Zwischen dieser Vor- und der eigentlichen Stimulation fand kein Mediumwechsel statt. Die C3a-, LPS- und FMLP-Stimulationsmedien waren mit 300 U/ml IFN- γ versetzt, um die Konzentration an diesem Zytokin konstant zu halten.

Um eine Desarginierung des C3a zu verhindern waren sämtlichen Medien mit 1,5 mM Plummer's Inhibitor und 50 mM 6-Aminohexansäure versetzt worden.

Nach Ablauf der sechs Stunden wurde das Medium abgenommen, durch Zentrifugation von Zellen befreit und für eventuelle Zytokinmessungen bei -80°C eingefroren. Die Zellen wurden sofort in Trizol aufgenommen und wie unter 3.2.17.1 beschrieben die RNA

aufgereinigt. Ihre Qualität wurde im denaturierenden Gel überprüft. Eine Verunreinigung mit genomischer DNA wurde durch eine PCR mit dem Haushaltsgen RPS9 ausgeschlossen.

Für den Atlas™ cDNA Expression Array wurden von jeder RNA vier Mikrogramm in ³²P-markierte cDNA umgeschrieben und jeweils mit einer Atlas-Array Membran (Atlas™ Mouse 1.2 Array) der Firma Clontech hybridisiert. Die weitere Durchführung erfolgte wie unter 3.2.10 beschrieben. Die Membranen wurden für vier Tage auf einer Phosphoimaging-Platte exponiert, die Platte mit einem Phosphoimager ausgelesen und die so erhaltenen digitalisierten Daten computergestützt normalisiert und verglichen.

Der Array wurde zur Absicherung der Ergebnisse ein zweites Mal wiederholt.

4.5.9.1 Auswertung der Atlas™ Mouse 1.2 cDNA Expression Arrays

Bei positiver Regulation, d. h. stärkerer Expression des Gens bei stimulierten Zellen, wurde das Verhältnis der Genexpression (proportional zur Signalintensität auf den Array-Membranen) von stimulierten zu nicht-stimulierten Zellen als Maß für die Regulation verwendet. Bei negativer Regulation, also bei schwächerer Expression nach Stimulation, wurde dessen negativer Kehrwert verwendet. Dieses Maß wird im Weiteren auch als Regulationsfaktor bezeichnet.

Die zahlreichen Kriterien, wann ein Gen als messbar und reguliert gilt, sind unter 3.2.10 genau beschrieben.

Eine Zusammenfassung der im Folgenden ausführlich dargestellten Ergebnisse der Atlas™ Mouse 1.2 cDNA Expression Arrays befindet sich auf Seite 72.

Bei der Stimulation der J774A.1-Zelllinie mit C3a (Tabelle 4.11) oder FMLP (Tabelle 4.12) ergaben sich gegenüber den nicht-stimulierten Zellen keine reproduzierbaren Regulationsvorgänge. Auffällig war, dass die gefundenen Regulationen zum Großteil sehr schwach ausfielen. In den folgenden beiden Tabellen sind die berechneten Regulationsfaktoren der beiden Array-Experimente wiedergegeben.

C3a gegen Kontrolle:

GENBANK	GENNAME	Array I	Array II
AA041883	<i>Dynein light chain 1, cytoplasmic (protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase) (PIN)</i>	2,0	-
AF003747	<i>solute carrier family 30 (zinc transporter), member 4</i>	-	15,0
AF013281	<i>eomesodermin homolog (Xenopus laevis)</i>	-	28,8
AF013282	<i>T-box 14</i>	2,2	-
AF033353	<i>ubiquitin-like 1</i>	2,5	-
D86726	<i>mini chromosome maintenance deficient 6 (S. cerevisiae)</i>	-	6,5
L22472	<i>Bcl2-associated X protein</i>	2,3	-
M32240	<i>peripheral myelin protein, 22 kDa</i>	2,0	-
M91236	<i>gap junction membrane channel protein beta 5</i>	2,8	-

M94335	<i>thymoma viral proto-oncogene</i>	2,6	-
U02079	<i>nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 2</i>	2,9	-
U04807	<i>FMS-like tyrosine kinase 3 ligand</i>	2,4	-
U05671	<i>adenosine A1 receptor</i>	-	524,7
U10903	<i>programmed cell death 2</i>	2,2	-
U17162	<i>BAG-1; bcl-2 binding protein with anti-cell death activity</i>	2,8	-
U21050	<i>Tnf receptor-associated factor 3</i>	4,2	-
U25995	<i>receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1</i>	3,3	-
U39643	<i>Fas-associated factor 1</i>	4,1	-
U75506	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>	3,0	-
X04648	<i>Fc receptor, IgG, low affinity IIb</i>	2,4	-
X61800	<i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta</i>	-	2,1
Y13231	<i>BCL2-antagonist/killer 1</i>	2,9	-

Tabelle 4.11: Dargestellt sind die Gene, die sich bei der Stimulation der murinen Zelllinie J774A.1 mit C3a in Array I oder II (Atlas™ Mouse 1.2 Array, Clontech/BD) gegenüber nicht-stimulierten Zellen als reguliert erwiesen. Ein Gen gilt als reguliert, wenn der Betrag des errechneten Faktors > 1,94 ist. In der ersten Spalte ist die GenBank-Accession-Nummer und in der zweiten Spalte der Genname aufgeführt. In den Spalten 3 und 4 sind die berechneten Regulationsfaktoren des ersten und des Wiederholungs-Experimentes aufgelistet. Die Gene sind in alphabetischer Reihenfolge der Accession-Nummern wiedergegeben. Regulationsfaktoren > 3 sind fett markiert.

FMLP gegen Kontrolle:

GENBANK	GENNAME	Array I	Array II
AA000715	<i>S100 calcium-binding protein A1; S-100 protein alpha chain</i>	-	-3,0
D26089	<i>mini chromosome maintenance deficient 4 homolog (S. cerevisiae)</i>	-	3,0
D32210	<i>Notch gene homolog 2, (Drosophila)</i>	-	-66,5
K01700	<i>transformation related protein 53</i>	-	2,7
L05630	<i>C5A receptor</i>	-	2,0
L13968	<i>YY1 transcription factor</i>	-	-4,3
L20048	<i>interleukin 2 receptor, gamma chain</i>	-2,2	-
L28177	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha</i>	-	-2,1
L40406	<i>heat shock protein, 105 kDa</i>	-	2,5
M27129	<i>CD44 antigen</i>	-	1,9
M60909	<i>retinoic acid receptor, alpha</i>	-	4,5
M61909	<i>avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene homolog A</i>	-	2,1
M72414	<i>microtubule-associated protein 4</i>	-	2,5
M98547	<i>receptor-like tyrosine kinase</i>	-	2,5
U19596	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)</i>	-	2,0
U36760	<i>forkhead box G1</i>	-	6,0
U37501	<i>laminin, alpha 5</i>	-	26,4
U41751	<i>etoposide induced 2.4 mRNA</i>	-	2,3
U43788	<i>POU domain, class 2, associating factor 1</i>	2,0	-
U69270	<i>LIM domain binding 1</i>	-	2,0
X53068	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>	-	2,6
X57277	<i>RAS-related C3 botulinum substrate 1</i>	2,7	-
X61800	<i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta</i>	-	3,0
X64713	<i>cyclin B1, related sequence 1</i>	-	2,2
X66323	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5</i>	-	-2,4
X84311	<i>cyclin A1</i>	-	5,5
X95351	<i>maternal embryonic leucine zipper kinase</i>	-	3,0
Y00487	<i>hemopoietic cell kinase</i>	-	6,9
Y13231	<i>BCL2-antagonist/killer 1</i>	-	2,0
Z31663	<i>activin A receptor, type 1B</i>	-	-8,9
Z47766	<i>cyclin F</i>	-	2,1

Tabelle 4.12: Dargestellt sind die Gene, die sich bei der Stimulation der murinen Zelllinie J774A.1 mit **FMLP in Array I oder II** (AtlasTM Mouse 1.2 Array, Clontech/BD) gegenüber **nicht-stimulierten Zellen als reguliert erwiesen**. Ein Gen gilt als reguliert, wenn der Betrag des errechneten Faktors > 1,94 ist. In der ersten Spalte ist die GenBank-Accession-Nummer und in der zweiten Spalte der Gennamen aufgeführt. In den Spalten 3 und 4 sind die berechneten Regulationsfaktoren des ersten und des Wiederholungs-Experimentes aufgelistet. Die Gene sind in alphabetischer Reihenfolge der Accession-Nummern wiedergegeben. Regulationsfaktoren > 3 sind fett markiert.

Bei der Einzelstimulation mit LPS (Tabelle 4.13) im Vergleich zur Kontrolle konnte die Regulation einiger Gene in beiden Arrays eindeutig nachgewiesen werden. Diese Gene sind in der entsprechenden Tabelle fett markiert. Bei der Kombinationsstimulationen mit LPS und C3a (Tabelle 4.14) im Vergleich zur Einzelstimulation mit LPS ergaben sich keine reproduzierbaren Regulationsvorgänge. Hingegen zeigte die Kombinationsstimulation mit FMLP und LPS im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit LPS (Tabelle 4.15) einige Gene auf, die in beiden Arrays reguliert waren. Diese sind ebenfalls fett hervorgehoben.

LPS gegen Kontrolle:

GENBANK	GENNAME	Array I	Array II
AA000715	<i>S100 calcium-binding protein A1; S-100 protein alpha chain</i>	-	-2,3
AF013282	<i>T-box 14</i>	2,4	-
AF017085	<i>general transcription factor II 1</i>	-	-2,0
AF033353	<i>ubiquitin-like 1</i>	2,1	-
AF062567	<i>trans-acting transcription factor 3</i>	-2,1	-
AF068780	<i>geminin</i>	-	-2,7
AJ002636	<i>stromal antigen 2</i>	-	-2,1
D13473	<i>Rad51 homolog (S. cerevisiae)</i>	-2,0	-
J02870	<i>laminin receptor 1 (67kD, ribosomal protein SA)</i>	-2,1	-
J03752	<i>GLUTATHIONE S-TRANSFERASE, MICROSOMAL (EC 2.5.1.18)</i>	-2,0	-
L05630	<i>C5A receptor</i>	-	2,3
L13968	<i>YY1 transcription factor</i>	-	-4,3
L20048	<i>interleukin 2 receptor, gamma chain</i>	-	-2,2
L21671	<i>interleukin 6</i>	16,6	28,3
L21973	<i>E2F transcription factor 1</i>	-2,4	-
L22472	<i>Bcl2-associated X protein</i>	2,3	-
L28177	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha</i>	-	-2,4
M14222	<i>cathepsin B</i>	-	-2,1
M15131	<i>interleukin 1 beta</i>	7,8	-
M34510	<i>CD14 antigen</i>	-	2,3
M35590	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b</i>	2,3	2,2
M59378	<i>interleukin 1 receptor antagonist</i>	10,7	7,7
M74294	<i>small inducible cytokine A3</i>	6,8	6,3
M83312	<i>small inducible cytokine A4</i>	3,8	3,8
M91236	<i>gap junction membrane channel protein beta 5</i>	3,4	-
M94335	<i>thymoma viral proto-oncogene</i>	2,0	-
M95106	<i>cAMP responsive element binding protein 1</i>	-	-2,3
U04443	<i>myosin light chain, alkali, nonmuscle</i>	-	-2,0
U17162	<i>BAG-1; bcl-2 binding protein with anti-cell death activity</i>	2,2	-
U19799	<i>nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, beta</i>	-	2,3
U21050	<i>Tnf receptor-associated factor 3</i>	3,3	-
U25995	<i>receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1</i>	3,7	-

U39643	<i>Fas-associated factor 1</i>	3,7	-
U43512	<i>dystroglycan 1</i>	-	-2,2
U44088	<i>T-cell death associated gene</i>	-	29,0
U45977	<i>stromal cell derived factor 4</i>	-4,6	-
U47543	<i>Ngfi-A binding protein 2</i>	-	-2,9
U52951	<i>enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)</i>	-	-2,0
U78103	<i>embryonic ectoderm development</i>	-	-2,0
X02389	<i>plasminogen activator, urokinase</i>	-2,2	-
X06086	<i>cathepsin L</i>	-2,3	-
X06203	<i>MARCKS-like protein</i>	2,0	2,0
X12531	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5</i>	2,8	2,1
X61399	<i>epidermal growth factor receptor pathway substrate 8</i>	-2,5	-2,6
X61800	<i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta</i>	-	2,3
X66032	<i>cyclin B2</i>	-	-2,0
X75888	<i>cyclin E1</i>	-	-2,5
X84311	<i>cyclin A1</i>	-	3,7
X96859	<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2B (RAD6 homology)</i>	-	-2,1
Y13231	<i>BCL2-antagonist/killer 1</i>	2,1	-
Z21524	<i>hematopoietically expressed homeobox</i>	-	-2,3
Z21848	<i>DNA polymerase delta 1, catalytic domain</i>	-2,5	-
Z47766	<i>cyclin F</i>	-2,1	-

Tabelle 4.13: Dargestellt sind die Gene, die sich bei der Stimulation der murinen Zelllinie J774A.1 mit **LPS** in Array I **und/oder** II (AtlasTM Mouse 1.2 Array, Clontech/BD) gegenüber **nicht-stimulierten Zellen** als reguliert erwiesen. Ein Gen gilt als reguliert, wenn der Betrag des errechneten Faktors > 1,94 ist. In der ersten Spalte ist die GenBank-Accession-Nummer und in der zweiten Spalte der Genname aufgeführt. In den Spalten 3 und 4 sind die berechneten Regulationsfaktoren des ersten und des Wiederholungs-Experimentes aufgelistet. Die Gene sind in alphabetischer Reihenfolge der Accession-Nummern wiedergegeben. Gene, deren Regulation im Wiederholungsexperiment reproduziert werden konnte, sind fett dargestellt.

LPS + C3a gegen LPS:

GENBANK	GENE NAME	Array I	Array II
AF030065	<i>hepsin</i>	-	74,5
AF062567	<i>trans-acting transcription factor 3</i>	2,3	-
J03168	<i>interferon regulatory factor 2</i>	-2,8	-
L03529	<i>coagulation factor II (thrombin) receptor</i>	-	500,9
L12140	<i>amino-terminal enhancer of split</i>	-1,9	-
M27129	<i>CD44 antigen</i>	-	2,1
S76657	<i>activating transcription factor 2</i>	-3,3	-
U02079	<i>nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 2</i>	-2,0	-
U06924	<i>signal transducer and activator of transcription 1</i>	-2,0	-
U09507	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)</i>	-2,5	-
U22516	<i>angiogenin</i>	2,2	-
X57796	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a</i>	-2,8	-
X59990	<i>catenin alpha 1</i>	-2,2	-
X77113	<i>growth differentiation factor 9</i>	-	43,9
X81582	<i>insulin-like growth factor binding protein 4</i>	-4,5	-
X84311	<i>cyclin A1</i>	-2,9	-
X99063	<i>zyxin</i>	-2,5	-

Tabelle 4.14: Dargestellt sind die Gene, die sich bei der Kombinationsstimulation der murinen Zelllinie J774A.1 mit **C3a und LPS** in Array I **oder** II (AtlasTM Mouse 1.2 Array, Clontech/BD) im Vergleich zu Zellen, die lediglich mit **LPS** behandelt waren, als reguliert erwiesen haben. Ein Gen gilt als reguliert, wenn der Betrag des errechneten Faktors > 1,94 ist. In der ersten Spalte ist die GenBank-Accession-Nummer und in

der zweiten Spalte der Genname aufgeführt. In den Spalten 3 und 4 sind die berechneten Regulationsfaktoren des ersten und des Wiederholungs-Experimentes aufgelistet. Die Gene sind in alphabetischer Reihenfolge der Accession-Nummern wiedergegeben.

LPS + FMLP gegen LPS:

GENBANK	GENE NAME	Array I	Array II
AA000715	<i>S100 calcium-binding protein A1; S-100 protein alpha chain</i>	2,0	-
AA289122	<i>Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 2 (CKS-2).</i>	-	2,8
AF031426	<i>nuclear DNA-binding protein</i>	-	2,2
AF062567	<i>trans-acting transcription factor 3</i>	2,6	-
AF064071	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>	2,6	-
AF068780	<i>geminin</i>	-	2,4
AF074714	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kD, polypeptide 4</i>	-	2,3
D01034	<i>TATA box binding protein</i>	2,1	-
D16313	<i>keratin complex 1, acidic, gene 15</i>	-	-17,0
D26157	<i>prostaglandin I receptor (IP)</i>	-	2,1
D31942	<i>oncostatin M</i>	-	6,4
K01700	<i>transformation related protein 53</i>	-2,2	-
L07918	<i>rho, GDP dissociation inhibitor (GDI) beta</i>	2,6	-
L07924	<i>ral guanine nucleotide dissociation stimulator</i>	2,1	-
L28177	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha</i>	2,2	-
L40406	<i>heat shock protein, 105 kDa</i>	-	52,4
M12056	<i>lymphocyte protein tyrosine kinase</i>	-	2,5
M14220	<i>glucose phosphate isomerase 1 complex</i>	-	2,5
M26283	<i>homeo box B5</i>	1,9	-
M27129	<i>CD44 antigen</i>	-	2,1
M32240	<i>peripheral myelin protein, 22 kDa</i>	-	27,7
M35590	<i>small inducible cytokine A4</i>	-2,5	-
M59378	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b</i>	-2,2	-
M60651	<i>phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1 (p85 alpha)</i>	-	10,3
M60778	<i>integrin alpha L</i>	-	2,2
M61177	<i>mitogen activated protein kinase 3</i>	-	2,0
M63801	<i>gap junction membrane channel protein alpha 1</i>	3,9	3,7
M94087	<i>activating transcription factor 4</i>	2,2	-
M94335	<i>thymoma viral proto-oncogene</i>	-2,3	-
M95106	<i>cAMP responsive element binding protein 1</i>	-	2,3
S71659	<i>LIM homeobox protein 4</i>	-	4,5
S76657	<i>activating transcription factor 2</i>	-2,8	-
U06922	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>	2,4	-
U06924	<i>signal transducer and activator of transcription 1</i>	-2,1	-
U10115	<i>dishevelled, dsh homolog (Drosophila)</i>	-2,1	-
U19118	<i>activating transcription factor 3</i>	2,7	-
U30823	<i>myocyte enhancer factor 2A</i>	2,0	-
U34259	<i>lysosomal-associated protein transmembrane 4A</i>	-2,7	-
U36277	<i>nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>	2,0	-
U44088	<i>T-cell death associated gene</i>	-	-22,4
U45977	<i>stromal cell derived factor 4</i>	3,2	2,5
U49112	<i>programmed cell death 6</i>	-2,4	-
U52945	<i>tumor susceptibility gene 101</i>	2,4	-
U60530	<i>MAD homolog 2 (Drosophila)</i>	-	6,9

U73037	<i>interferon regulatory factor 7</i>	-	2,2
U78103	<i>embryonic ectoderm development</i>	2,2	-
U94350	<i>radical fringe gene homolog, (Drosophila)</i>	-2,3	-
U94479	<i>integrin linked kinase</i>	-	2,4
X02165	<i>neurofilament, light polypeptide</i>	-4,6	-
X06086	<i>cathepsin L</i>	-	2,1
X06115	<i>cadherin 1</i>	-2,8	-
X14951	<i>integrin beta 2</i>	-3,0	-
X51983	<i>thyroid hormone receptor alpha</i>	2,0	-
X56135	<i>prothymosin alpha</i>	2,2	-
X57277	<i>RAS-related C3 botulinum substrate 1</i>	3,6	2,2
X57796	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a</i>	-2,3	-
X59990	<i>catenin alpha 1</i>	-2,1	-
X61800	<i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta</i>	-2,3	-
X63963	<i>paired box gene 6</i>	2,3	-
X66032	<i>cyclin B2</i>	2,1	-
X80332	<i>RAB20, member RAS oncogene family</i>	1,9	-
X81582	<i>insulin-like growth factor binding protein 4</i>	-4,6	-
X84311	<i>cyclin A1</i>	-3,5	-
Z19521	<i>low density lipoprotein receptor</i>	2,1	-

Tabelle 4.15: Dargestellt sind die Gene, die sich bei der Kombinationsstimulation der murinen Zelllinie J774A.1 mit FMLP und LPS in Array I *und/oder* II (AtlasTM Mouse 1.2 Array, Clontech/BD) gegenüber Zellen, die lediglich mit LPS behandelt waren, als reguliert erwiesen. Ein Gen gilt als reguliert, wenn der Betrag des errechneten Faktors > 1,94 ist. In der ersten Spalte ist die GenBank-Accession-Nummer und in der zweiten Spalte der Gennamen aufgeführt. In den Spalten 3 und 4 sind die berechneten Regulationsfaktoren des ersten und des Wiederholungs-Experimentes aufgelistet. Die Gene sind in alphabetischer Reihenfolge der Accession-Nummern wiedergegeben. Gene, deren Regulation im Wiederholungsexperiment reproduziert werden konnte, sind fett dargestellt.

Die vollständigen Ergebnisse der einzelnen Array-Analysen sind im Anhang 6.2.1 getrennt aufgeführt.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass sich unter den gewählten Versuchsbedingungen nur wenige Gene durch eine Stimulation mit dem Anaphylatoxin C3a oder dem bakteriellen FMLP in der murinen Zelllinie J774A.1 induzieren ließen. Im Wiederholungsexperiment konnte leider keines dieser Regulationsereignisse bestätigt werden. Ebenfalls konnten keine Modifikationen der LPS-Antwort durch C3a reproduzierbar ermittelt werden. Eine FMLP-abhängige Veränderung der LPS-induzierten Expression von drei Genen wurde in zwei unabhängigen Experimenten detektiert. Überraschenderweise bewirkte die Einzelstimulation mit dem bakteriellen Endotoxin nur wenige Veränderungen der Genexpression. Die Induktion von acht dieser Gene wurde im zweiten Array bestätigt.

4.5.10 Atlas™ Human 1.2 cDNA Expression Array – Stimulation der primären humanen Monozyten und Durchführung des Array-Experimentes

Da C5a bei den meisten in der Literatur beschriebenen Funktionen höhere Antworten auslöst als C3a (siehe Einleitung) wurde nach den negativen Ergebnissen an J774A.1-Zellen entschieden, dass die Versuche an primären humanen Monozyten mit diesem Anaphylatoxin als „Hauptstimulans“ durchgeführt werden sollten. Zusätzlich sollte eine Modifikation der durch LPS-induzierten Genregulation betrachtet werden. Bei der „Variante 1“ wurden relativ lange Priming- und Stimulationszeiten gewählt (je 24 Stunden). Da unter diesen Bedingungen nahezu keine Regulationen durch C5a detektiert werden konnten, wurde bei der „Variante 2“ das Priming auf eine Stunde und die eigentliche Stimulation auf vier Stunden verkürzt. Die genauen Veränderungen der Versuchsdurchführung sind im Folgenden aufgezählt.

4.5.10.1 Durchführung des Stimulations-Experimentes „Variante 1“

Die humanen Monozyten wurden aus drei *Buffy Coats* von unbekanntem Spendern wie unter 3.4.1 beschrieben aufgereinigt und für fünf Tage im Standardmedium kultiviert. Es folgte ein 24-stündiges Priming der Zellen mit 300 U/ml IFN- γ . Daraufhin wurden die Zellen mit Medium, 40 nM C5a, 100 ng/ml LPS und einer Kombination aus C5a und LPS für weitere 24 Stunden stimuliert. Das Medium wurde zuvor nicht gewechselt. Sämtliche Stimuli waren in Medium verdünnt, welchem zur Verhinderung des Abbaus von C5a die Inhibitoren der Carboxypeptidase N (Plummer's Inhibitor und 6-Aminohexansäure) zugesetzt waren.

Nach Ablauf der Stimulationsphase wurde das Medium entfernt, durch Zentrifugation von Zellen befreit und für folgende Zytokinmessungen bei - 80°C eingefroren.

Die Zellen selbst wurden in Trizol aufgenommen und die RNA wie unter 3.2.17.1 beschrieben aufgereinigt. Eine Degradierung wurde durch Überprüfung im denaturierenden Agarosegel und eine Verunreinigung mit genomischer DNA durch PCR (RPS9-Primer) ausgeschlossen.

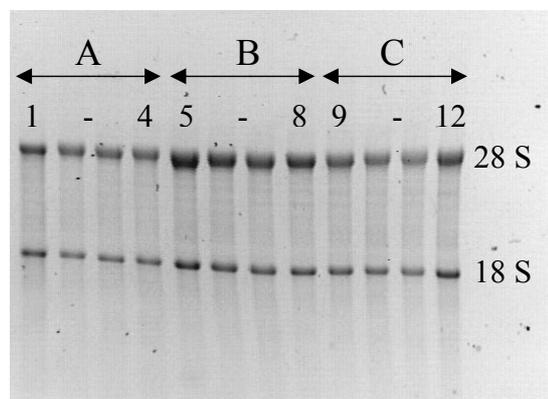


Abbildung 4.43: Elektrophoretische Auftrennung der Gesamt-RNA aus Monozyten im denaturierenden Agarosegel. Es wurden jeweils 0,8 μ g der mit Puffer, C5a, LPS oder C5a+LPS stimulierten Zellen der drei Spender A, B und C aufgetragen.

Für diesen Mikroarray wurde die RNA, die aus den jeweils gleichbehandelten Zellen der verschiedenen Spender gewonnen war, gepoolt und je fünf Mikrogramm in ^{32}P -markierte cDNA umgeschrieben. Die Hybridisierung mit den AtlasTM Human 1.2 Array-Membranen (Clontech/BD) wurde wie unter 3.2.10 beschrieben durchgeführt. Nach zehntägiger Exposition wurde die Phosphoimaging-Platte ausgelesen und die so erhaltenen Signale computergestützt normalisiert und die Regulationsfaktoren im Vergleich zur Kontrolle, wie bereits unter 4.5.9.1 erwähnt, berechnet.

4.5.10.2 Durchführung des Stimulations-Experimentes „Variante 2“

Da unter den in 4.5.10.1 gewählten Bedingungen leider nur wenige Gene durch C5a alleine reguliert worden sind und zumindest ein Großteil der durch LPS und C5a in Kombination induzierten Gene auch durch LPS alleine reguliert waren, schien es wenig sinnvoll den Array unter den selben Bedingungen zu wiederholen. Da bei diesem Testverfahren lediglich eine Momentaufnahme der zum entsprechenden Zeitpunkt exprimierten Gene auf mRNA-Ebene analysiert werden kann, besteht die Möglichkeit, dass in einem Zeitraum von 24 Stunden schon ein Teil der durch die Stimulation transkribierten mRNA wieder abgebaut ist und sich so der Aufspürung im Array entzieht. Daher wurden bei der „Variante 2“ sowohl das Priming mit IFN- γ (auf eine Stunde) als auch die eigentliche Stimulation mit C5a und/oder LPS (auf vier Stunden) verkürzt. Die Konzentrationen aller Stimuli und der Inhibitoren wurde beibehalten.

Eine weitere Abänderung bestand darin, dass die Monozyten vor der Stimulation nur für drei Tage kultiviert worden waren. Außerdem wurde die RNA der drei Spender nicht gepoolt, sondern nur ein Spender für den Array eingesetzt.

4.5.10.3 Auswertung der AtlasTM Human 1.2 cDNA Expression Arrays

Um einen Überblick über die Anzahl der durch die verschiedenen Stimuli (im Vergleich zur Kontrolle) regulierten Gene zu erlangen ist die Tabelle 4.16 aufgeführt. Abzüglich der Haushaltsgene werden auf den AtlasTM-Membranen 1180 Gene repräsentiert.

Stimulans	Anzahl der Gene, die sich im Experiment 1 als reguliert erwiesen	Anzahl der Gene, die sich im Experiment 2 als reguliert erwiesen
<u>C5a</u> gegen Kontrolle	13	26
<u>LPS</u> gegen Kontrolle	89	211
<u>LPS + C5a</u> gegen Kontrolle	100	193
<u>LPS + C5a</u> gegen <u>LPS</u>	11	25

Tabelle 4.16: Übersicht über die Anzahl der Gene, die sich nach Stimulation mit C5a, LPS oder C5a + LPS (im Vergleich zur Kontrolle), in den verschiedenen Array-Experimenten als reguliert erwiesen haben.

In der folgenden Tabelle sind die durch C5a regulierten Gene der beiden Arrays aufgeführt. Es ist zu beachten, dass es sich hier nicht um Wiederholungsexperimente handelt. Da jedoch jeweils nur relativ wenig Gene reguliert worden sind (siehe Tabelle 4.16), ist hier die Gesamtheit dargestellt.

Man könnte die Array-Experimente 1 und 2 gewissermaßen als „Kinetik“ auffassen, da die Konzentrationen der Stimuli konstant gehalten wurden und lediglich die Stimulationszeiträume vom ersten zum zweiten Experiment verkürzt worden sind (weitere Veränderungen siehe oben).

Regulationsfaktoren > 3 bzw. < -3 sind hervorgehoben. Grau unterlegt sind zusätzlich die Gene, deren Regulation anschließend mittels *real-time* RT-PCR oder ELISA überprüft worden ist.

C5a gegen Kontrolle:

GENBANK	GENE NAME	<u>Experiment 1</u> 24 h IFN- γ 24 h C5a	<u>Experiment 2</u> 1 h IFN- γ 4 h C5a
AB001325	<i>aquaporin 3</i>	-	-6,2
AF055377	<i>v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma (avian) oncogene homolog</i>	-2,1	-
D00726	<i>ferrochelataze (protoporphyrin)</i>	-	-2,1
D10924	<i>chemokine (C-X-C motif), receptor 4 (fusin)</i>	-	-3,1
D14497	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8</i>	-2,0	-
L04282	<i>zinc finger protein 148 (pHZ-52)</i>	-	-3,6
L23959	<i>transcription factor Dp-1</i>	4,6	-
L36719	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 3</i>	-	2,1
M15800	<i>mal, T-cell differentiation protein</i>	-	7,4
M15990	<i>v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1</i>	-2,8	-
M23452	<i>small inducible cytokine A3 (homologous to mouse Mip-1a)</i>	-	11,9
M26679	<i>homeo box A5</i>	3,2	-
M32865	<i>thyroid autoantigen 70kD (Ku antigen)</i>	-	-2,1
M34065	<i>cell division cycle 25C</i>	-27,3	-
M34664	<i>heat shock 60kD protein 1 (chaperonin)</i>	-	-3,2
M36430	<i>guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1</i>	-	2,2
M62505	<i>complement component 5 receptor 1 (C5a ligand)</i>	-	2,0
M73077	<i>glucocorticoid receptor DNA binding factor 1</i>	-	-3,8
M86400	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide</i>	-	-3,7
M87339	<i>replication factor C (activator 1) 4 (37kD)</i>	-	-2,4
M91438	<i>serine protease inhibitor, Kazal type, 2 (acrosin-trypsin inhibitor)</i>	-	156,2
M93255	<i>Friend leukemia virus integration 1</i>	-	-2,2
M98343	<i>ems1 sequence (mammary tumor and squamous cell carcinoma-associated (p80/85 src substrate)</i>	-	9,5
S40832	<i>early growth response 3</i>	-	4,2
S75989	<i>solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 11</i>	289,8	-
U10550	<i>GTP-binding protein overexpressed in skeletal muscle</i>	-	8,4
U18840	<i>myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>	-	-2,5
U29607	<i>methionine aminopeptidase; eIF-2-associated p67</i>	2,4	-
U38178	<i>phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited</i>	2,0	-
U86453	<i>phosphoinositide-3-kinase, catalytic, delta polypeptide</i>	-2,3	-
X01394	<i>tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)</i>	-	3,0
X02530	<i>small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 10</i>	-	2,7
X04429	<i>serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1</i>	-	7,6

X07819	<i>matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)</i>	2,3	-
X07979	<i>integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)</i>	-	-2,1
X60957	<i>tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains</i>	2,0	-
X66087	<i>v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 1</i>	-2,1	-
X74795	<i>minichromosome maintenance deficient (S. cerevisiae) 5 (cell division cycle 46)</i>	-	-2,2
X75621	<i>tuberous sclerosis 2</i>	-	-2,0

Tabelle 4.17: Dargestellt sind die Gene, die sich bei der Einzelstimulation der primären humanen Monozyten mit **C5a** im ersten *und/oder* zweiten Array-Experiment (Atlas™ Human 1.2 Array, Clontech/BD) gegenüber nicht-stimulierten Zellen als reguliert erwiesen. Ein Gen gilt als reguliert, wenn der Betrag des errechneten Faktors > 1,94 ist. In der ersten Spalte ist die GenBank-Accession-Nummer und in der zweiten Spalte der Gennamen aufgeführt. In den Spalten 3 und 4 sind die berechneten Regulationsfaktoren des ersten und zweiten Array-Experimentes aufgelistet. Die Gene sind in alphabetischer Reihenfolge der Accession-Nummern wiedergegeben.

Durch die Einzelstimulation mit LPS und die Kombinationsstimulation mit LPS und C5a sind in beiden Array-Experimenten relativ viele Gene reguliert worden (siehe Tabelle 4.16). Deshalb sind in den beiden folgenden Tabellen jeweils nur die Gene aufgeführt, für die sich in beiden Experimenten ein Faktor > 1,94 bzw. < - 1,94 ergab. Gene, die sich in beiden Experimenten als > Faktor 3 bzw. < Faktor - 3 reguliert erwiesen, sind hervorgehoben. Grau hervorgehoben sind zusätzlich die Gene, deren Regulation anschließend mittels *real-time* RT-PCR oder ELISA überprüft worden ist.

LPS gegen Kontrolle:

GENBANK	GEN NAME	Experiment 1 24h IFN-γ 24h LPS	Experiment 2 1h IFN-γ 4h LPS
AB008775	<i>aquaporin 9</i>	3,2	3,0
AF020192	<i>cytochrome P450, subfamily XXVIIIB (25-hydroxyvitamin D-1-alpha-hydroxylase), polypeptide 1</i>	7,7	8,7
AF040105	<i>putative c-Myc-responsive</i>	-2,5	-2,0
AF051334	<i>Nijmegen breakage syndrome 1 (nibrin)</i>	3,6	4,6
AF055377	<i>v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma (avian) oncogene homolog</i>	-25,6	-26,6
AF060222	<i>deoxyribonuclease II, lysosomal</i>	-2,4	-4,1
AF071596	<i>immediate early response 3</i>	5,4	25,7
AF084199	<i>PR domain containing 1, with ZNF domain</i>	2,7	-2,7
AJ000512	<i>serum/glucocorticoid regulated kinase</i>	-3,3	-8,3
J03746	<i>microsomal glutathione S-transferase 1</i>	2,3	-2,7
J04130	<i>small inducible cytokine A4 (homologous to mouse Mip-1b)</i>	23,8	233,4
J04145	<i>integrin, alpha M (complement component receptor 3, alpha; also known as CD11b (p170), macrophage antigen alpha polypeptide)</i>	-2,1	-27,3
L13738	<i>activated p21cdc42Hs kinase</i>	2,0	-7,2
L25124	<i>prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)</i>	6,2	23,8
L41816	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase I</i>	-2,4	-3,3
M13194	<i>excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)</i>	-2,5	-2,4
M15800	<i>mal, T-cell differentiation protein</i>	2,7	28,0
M19922	<i>fructose-1,6-bisphosphatase 1</i>	-6,3	-2,1
M21121	<i>small inducible cytokine A5 (RANTES)</i>	29,6	2,3
M23452	<i>small inducible cytokine A3 (homologous to mouse Mip-1a)</i>	62,3	323,7

M24545	<i>small inducible cytokine A2 (monocyte chemotactic protein 1, homologous to mouse Sig-je)</i>	-2,1	-2,4
M31165	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	48,4	208,4
M35663	<i>protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent</i>	4,1	2,8
M36430	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1	3,4	15,1
M57502	small inducible cytokine A1 (I-309, homologous to mouse Tca-3)	52,3	33,9
M62829	<i>early growth response 1</i>	-2,6	-8,0
M73780	integrin, beta 8	201,9	183,4
M77234	<i>ribosomal protein S3A</i>	-2,1	-2,1
M80397	<i>polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit (125kD)</i>	-2,7	-5,5
M81830	somatostatin receptor 2	4,7	4,0
M93255	<i>Friend leukemia virus integration 1</i>	-2,7	-30,5
M95678	<i>phospholipase C, beta 2</i>	-2,7	-3,5
U14417	<i>ral guanine nucleotide dissociation stimulator</i>	-2,6	-3,9
U66838	<i>cyclin A1</i>	2,2	56,2
U71364	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9	3,2	56,8
U73036	<i>interferon regulatory factor 7</i>	6,0	2,3
U78876	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3</i>	-2,9	-6,4
X01394	<i>tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)</i>	4,0	3-
X02530	small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 10	3,8	10,1
X03663	colony stimulating factor 1 receptor, formerly McDonough feline sarcoma viral (v-fms) oncogene homolog	-5,4	-5,2
X04602	interleukin 6 (interferon, beta 2)	5,7	10436,8
X06318	<i>protein kinase C, beta 1</i>	-10,8	-2,4
X53799	<i>GRO2 oncogene</i>	1,9	8,3
X66364	<i>cyclin-dependent kinase 5</i>	-2,0	-3,5
X75042	<i>v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog</i>	2,0	4,4
X75342	SHB adaptor protein (a Src homology 2 protein)	-3,3	-23,9
X85106	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kD, polypeptide 2</i>	-2,3	-3,6
X87212	<i>cathepsin C</i>	-2,4	-2,6
Y00285	<i>insulin-like growth factor 2 receptor</i>	-2,5	-3,1
Y00787	interleukin 8	5,4	47,4
Z36715	<i>ELK3, ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)</i>	-4,2	-4,0

Tabelle 4.18: Dargestellt sind die Gene, die sich bei der Einzelstimulation der primären humanen Monozyten mit LPS im ersten *und* zweiten Array-Experiment (AtlasTM Human 1.2 Array, Clontech/BD) gegenüber nicht-stimulierten Zellen als reguliert erwiesen. Ein Gen gilt als reguliert, wenn der Betrag des errechneten Faktors > 1,94 ist. In der ersten Spalte ist die GenBank-Accession-Nummer und in der zweiten Spalte der Genname aufgeführt. In den Spalten 3 und 4 sind die berechneten Regulationsfaktoren des ersten und zweiten Array-Experimentes aufgelistet. Die Gene sind in alphabetischer Reihenfolge der Accession-Nummern wiedergegeben. Hervorgehoben sind die Gene, für die sich in beiden Experimenten ein Regulationsfaktor > 3 bzw. < - 3 ergeben hat. Grau hervorgehoben sind die Gene, deren Regulation anschließend mittels *real-time* RT-PCR oder ELISA überprüft worden ist.

C5a + LPS gegen Kontrolle:

GENBANK	GENNAME	Versuch 1 24h IFN- γ 24h LPS+C5a	Versuch 2 1h IFN- γ 4h LPS+C5a
AB008775	<i>aquaporin 9</i>	2,7	6,5
AF020192	cytochrome P450, subfamily XXVIIIB (25-hydroxyvitamin D-1-alpha-hydroxylase), polypeptide 1	7,3	7,6
AF051334	Nijmegen breakage syndrome 1 (nibrin)	3,5	6,0
AF055377	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma (avian) oncogene homolog	-13,8	-1697,8
AF060222	<i>deoxyribonuclease II, lysosomal</i>	-2,0	-3,3
AF071596	immediate early response 3	5,7	17,9
AF078078	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma</i>	2,0	-3,1
AJ000512	serum/glucocorticoid regulated kinase	-3,2	-9,7

D10923	<i>putative chemokine receptor; GTP-binding protein</i>	4,8	14,1
D14520	<i>Kruppel-like factor 5 (intestinal)</i>	2,0	6,4
D29013	<i>polymerase (DNA directed), beta</i>	-2,0	-6,4
J03746	<i>microsomal glutathione S-transferase 1</i>	2,7	-2,6
J04130	<i>small inducible cytokine A4 (homologous to mouse Mip-1b)</i>	16,4	144,2
J04145	<i>integrin, alpha M (complement component receptor 3, alpha; also known as CD11b (p170), macrophage antigen alpha polypeptide)</i>	-2,6	-30,7
L25124	<i>prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)</i>	8,0	16,3
L25259	<i>CD86 antigen (CD28 antigen ligand 2, B7-2 antigen)</i>	2,5	2,1
L36151	<i>phosphatidylinositol 4-kinase, catalytic, alpha polypeptide</i>	-2,0	-3,6
L41816	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase I</i>	-2,7	-5,0
M13194	<i>excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)</i>	-2,6	-2,4
M19922	<i>fructose-1,6-bisphosphatase 1</i>	-5,2	-2,0
M23452	<i>small inducible cytokine A3 (homologous to mouse Mip-1a)</i>	34,8	370,2
M29696	<i>interleukin 7 receptor</i>	21,6	51,5
M31165	<i>tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6</i>	43,0	223,9
M35663	<i>protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent</i>	3,6	2,4
M36430	<i>guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1</i>	2,1	19,7
M57502	<i>small inducible cytokine A1 (I-309, homologous to mouse Tca-3)</i>	105,8	47,2
M62829	<i>early growth response 1</i>	-2,8	-4,3
M63960	<i>protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform</i>	-2,0	-2,5
M73780	<i>integrin, beta 8</i>	232,2	193,5
M80397	<i>polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit (125kD)</i>	-2,0	-18,6
M81830	<i>somatostatin receptor 2</i>	4,9	4,6
M93255	<i>Friend leukemia virus integration 1</i>	-2,2	-23,5
M95678	<i>phospholipase C, beta 2</i>	-2,3	-6,8
M97935	<i>signal transducer and activator of transcription 1, 91kD</i>	-2,2	-3,0
U03688	<i>cytochrome P450, subfamily I (dioxin-inducible), polypeptide 1 (glaucoma 3, primary infantile)</i>	2,1	-9,2
U14417	<i>ral guanine nucleotide dissociation stimulator</i>	-2,3	-3,9
U22431	<i>hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)</i>	2,3	3,4
U24152	<i>p21/Cdc42/Rac1-activated kinase 1 (yeast Ste20-related)</i>	-2,1	-53,6
U71364	<i>serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9</i>	3,5	58,1
U73036	<i>interferon regulatory factor 7</i>	4,5	2,1
U78876	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3</i>	-2,7	-3,8
U86453	<i>phosphoinositide-3-kinase, catalytic, delta polypeptide</i>	-2,0	-2,6
X01394	<i>tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)</i>	2,8	25,0
X02530	<i>small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 10</i>	2,4	7,3
X03663	<i>colony stimulating factor 1 receptor, formerly McDonough feline sarcoma viral (v-fms) oncogene homolog</i>	-3,3	-4,2
X04602	<i>interleukin 6 (interferon, beta 2)</i>	5,6	6459,8
X06256	<i>integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)</i>	2,0	2,0
X53799	<i>GRO2 oncogene</i>	2,1	9,1
X66364	<i>cyclin-dependent kinase 5</i>	-2,0	-3,3
X75042	<i>v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog</i>	2,0	6,5
X75342	<i>SHB adaptor protein (a Src homology 2 protein)</i>	-4,0	-8,2
X85106	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kD, polypeptide 2</i>	-2,3	-2,6
X87212	<i>cathepsin C</i>	-2,5	-2,5
Y00285	<i>insulin-like growth factor 2 receptor</i>	-2,8	-2,2
Y00787	<i>interleukin 8</i>	4,5	63,9

Tabelle 4.19: Dargestellt sind die Gene, die sich bei der Kombinationsstimulation der primären humanen Monozyten mit C5a und LPS im ersten *und* zweiten Array-Experiment (AtlasTM Human 1.2 Array, Clontech/BD) gegenüber nicht-stimulierten Zellen als reguliert erwiesen. Ein Gen gilt als reguliert, wenn der Betrag des errechneten Faktors > 1,94 ist. In der ersten Spalte ist die GenBank-Accession-Nummer und in der zweiten Spalte der Gennamen aufgeführt. In den Spalten 3 und 4 sind die berechneten Regulationsfaktoren des ersten und zweiten Array-Experimentes aufgelistet. Die Gene sind in alphabetischer Reihenfolge der Accession-Nummern wiedergegeben. Hervorgehoben sind die Gene, für die sich in beiden Experimenten ein

Regulationsfaktor > 3 bzw. < - 3 ergeben hat. Grau hervorgehoben sind die Gene, deren Regulation anschließend mittels *real-time* RT-PCR oder ELISA überprüft worden ist.

Da neben neuen Funktionen von C5a auch die Modifikation der LPS-Antwort durch dieses Anaphylatoxin untersucht werden sollte, sind in der folgenden Tabelle die durch die Kombinationsstimulation von C5a und LPS im Vergleich zu der Einzelstimulation mit LPS regulierten Gene aufgelistet.

LPS + C5a gegen LPS:

GENBANK	GENE NAME	Experiment 1	Experiment 2
		24h IFN- γ 24h LPS	1h IFN- γ 4h LPS
AB008775	<i>aquaporin 9</i>	-	2,2
AF084199	<i>PR domain containing 1, with ZNF domain</i>	-	2,1
D13318	<i>GA-binding protein transcription factor, alpha subunit (60kD)</i>	-	2,2
D43642	<i>transcription factor-like 1</i>	-	-4,5
J04102	<i>v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2</i>	-	2,0
L14778	<i>protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, alpha isoform (calcineurin A alpha)</i>	-	2,0
L36645	<i>formyl peptide receptor-like 1</i>	2,0	-
M14648	<i>integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)</i>	-	3,0
M15800	<i>mal, T-cell differentiation protein</i>	-2,1	-
M15990	<i>v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1</i>	-	2,7
M23410	<i>junction plakoglobin</i>	-2,1	-
M27492	<i>interleukin 1 receptor, type 1</i>	-	2,5
M29696	<i>interleukin 7 receptor</i>	3,4	3,3
M57502	<i>small inducible cytokine A1 (I-309, homologous to mouse Tca-3)</i>	2,0	-
M60974	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha</i>	2,1	-
M75914	<i>interleukin 5 receptor, alpha</i>	1,9	-
M80359	<i>MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3</i>	-	2,1
M86492	<i>glia maturation factor, beta</i>	-	2,0
M95712	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>	-	2,2
U01134	<i>fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)</i>	-	2,4
U08015	<i>nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1</i>	-	2,1
U08316	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kD, polypeptide 3</i>	-	2,3
U10550	<i>GTP-binding protein overexpressed in skeletal muscle</i>	-	2,6
U24166	<i>microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1</i>	-	2,2
U60520	<i>caspase 8, apoptosis-related cysteine protease</i>	-	4,2
X04429	<i>serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1</i>	-	2,9
X06233	<i>S100 calcium-binding protein A9 (calgranulin B)</i>	2,3	-
X06234	<i>S100 calcium-binding protein A8 (calgranulin A)</i>	3,0	-
X06256	<i>integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)</i>	2,1	-
X07979	<i>integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)</i>	-	2,1
X13967	<i>leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor)</i>	-	14,9
X16707	<i>FOS-like antigen-1</i>	-	2,1
X59770	<i>interleukin 1 receptor, type II</i>	2,7	-
X78627	<i>translin</i>	-	2,3
X91247	<i>thioredoxin reductase 1</i>	-	2,0

Tabelle 4.20: Dargestellt sind die Gene, die sich bei der Kombinationsstimulation der primären humanen Monozyten mit C5a und LPS im ersten *und/oder* zweiten Array-Experiment (Atlas™ Human 1.2 Array, Clontech/BD) gegenüber Zellen, die lediglich mit LPS behandelt waren, als reguliert erwiesen. Ein Gen gilt

als reguliert, wenn der Betrag des errechneten Faktors $> 1,94$ ist. In der ersten Spalte ist die GenBank-Accession-Nummer und in der zweiten Spalte der Gencode aufgeführt. In den Spalten 3 und 4 sind die berechneten Regulationsfaktoren des ersten und zweiten Array-Experimentes aufgelistet. Die Gene sind in alphabetischer Reihenfolge der Accession-Nummern wiedergegeben. Hervorgehoben sind die Gene, für die sich in beiden Experimenten ein Regulationsfaktor > 3 bzw. < -3 ergeben hat.

Zusammengefasst: Humane Monozyten/Makrophagen reagieren auf eine kurze C5a-Stimulation mit der Induktion einer Reihe von Genen, darunter das *macrophage inflammatory protein-1 α* . Das bakterielle Endotoxin LPS führte in diesen Zellen, wie zu erwarten, zur Hoch- bzw. Runterregulation zahlreicher Gene. Die Richtigkeit dieser Befunde ist dadurch belegt, dass ein Großteil der detektierten Regulationsereignisse bereits bekannt ist. Darüber hinaus modifizierte C5a die LPS-vermittelte Induktion verschiedener Gene, wie z. B. des Zytokins IL-6 und des Orphan-Rezeptors HM74.

4.5.11 Überprüfung der Ergebnisse der Atlas™ Human 1.2 cDNA Expression Array-Daten durch unabhängige Verfahren

Um die durch C5a- und/oder LPS-induzierten Genexpression in primären humanen Monozyten, die mittels der Mikroarray-Technik analysiert wurden, zu bestätigen, wurde ein Teil der Genregulationen durch unabhängige Methoden verifiziert. Zur Überprüfung der Ergebnisse auf mRNA-Ebene wurde die quantitative *real-time* RT-PCR verwendet, für zwei Gene wurde zusätzlich eine Analyse auf Proteinebene mittels ELISA gewählt.

4.5.11.1 Überprüfung der Mikroarray Ergebnisse mittels ELISA für IL-6 und IL-8

Vor dem Aufbau neuer *real-time* RT-PCRs sollte für zwei Gene kontrolliert werden, ob sich die im Array gefundenen Regulationen der humanen Monozyten durch C5a und/oder LPS mit dieser unabhängigen Methode bestätigen lassen. Hierzu wurden die beiden Gene IL-6 und IL-8 gewählt, für die sich im zweiten Array-Experiment (1 h Priming mit IFN- γ , 4 h Stimulation mit C5a, LPS und der Kombination aus C5a und LPS) folgende Regulationsfaktoren im Vergleich zur Puffer-Kontrolle ergeben hatten:

	C5a	LPS	C5a + LPS
Interleukin 6	-	10437	6459
Interleukin 8	-	48	64

Tabelle 4.21: Regulationsfaktoren für die Gene IL-6 und IL-8, die mittels Atlas™ Human 1.2 cDNA Expression Array (Variante 2) erhalten wurden.

Wie unter 4.5.10.2 geschildert, wurde für den Atlas™ Human 1.2 cDNA Expression Array „Variante 2“ lediglich die RNA eines Spenders (Spender C) eingesetzt. Da bei der Versuchsdurchführung jedoch die Monozyten von drei Spendern zeitgleich stimuliert worden waren, konnten die ELISA mit den Überständen von drei unabhängigen Spendern durchgeführt werden (siehe 3.5.1).

Wie der Abbildung 4.44 zu entnehmen ist, konnte zumindest für Spender B und C eindeutig gezeigt werden, dass C5a die durch LPS-induzierte Produktion von IL-6 um Faktor 2,6 bzw. 4 verringert. Bei Spender A ist lediglich eine Abnahme um Faktor 1,4 zu beobachten.

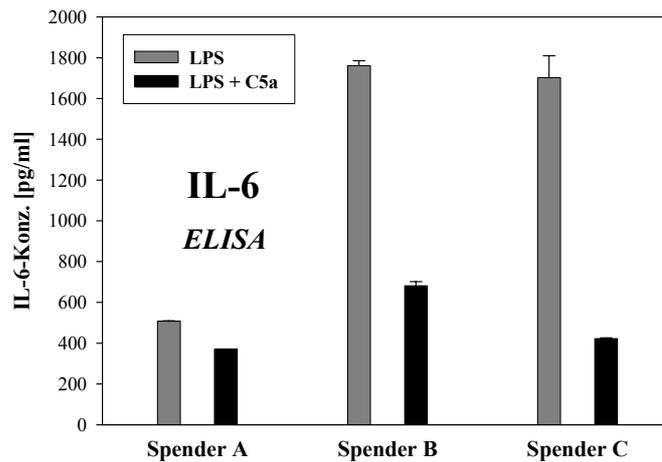


Abbildung 4.44: Graphische Darstellung der Konzentrationsbestimmung von IL-6 im Überstand der nach einem einstündigen Priming (IFN- γ) für vier Stunden mit LPS bzw. LPS und C5a stimulierten primären humanen Monozyten. Aufgeführt sind Mittelwert und Standardabweichung eines Experimentes mit Doppelwerten im Test.

Wie zu erwarten, wurde die LPS-induzierte Produktion von IL-8 hingegen nicht durch C5a beeinflusst. Die ELISA-Ergebnisse sind in Abbildung 4.45 dargestellt.

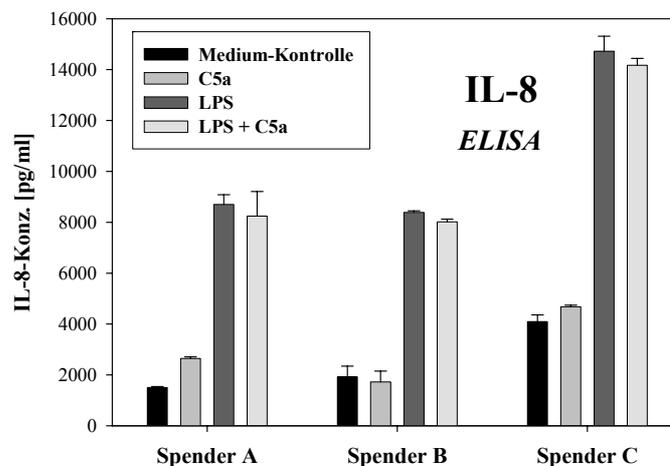


Abbildung 4.45: Graphische Darstellung der Konzentrationsbestimmung von IL-8 im Überstand der nach einem einstündigen Priming (IFN- γ) für vier Stunden mit LPS bzw. LPS und C5a stimulierten primären humanen Monozyten. Aufgeführt sind Mittelwert und Standardabweichung eines Experimentes mit Doppelwerten im Test.

Es bleibt also festzuhalten, dass sich die im Mikroarray erhaltenen Regulationen für die Gene IL-6 und IL-8 mittels ELISA bestätigen ließen. Die interessant erscheinende Beeinflussung der LPS-induzierten IL-6-Antwort durch C5a sollte zusätzlich mit einer dritten Methode abgesichert werden.

4.5.11.2 Überprüfung der Mikroarray Ergebnisse mittels quantitativer *real-time* RT-PCR

Für die Überprüfung mittels *real-time* RT-PCR wurden neben dem IL-6 noch zwei weitere Gene ausgewählt, deren Wirkung im Zusammenhang mit Anaphylatoxin- bzw. LPS-vermittelten Funktionen in humanen Monozyten stehen könnte.

Für die zu analysierenden Gene hatten sich im Atlas™ 1.2 Human cDNA Expression Array „Variante 2“ folgende Regulationsfaktoren im Vergleich zur Puffer-Kontrolle ergeben.

	C5a	LPS	C5a + LPS
CCL3 <i>small inducible cytokine A3</i> (MIP-1 α)	12	> 300	> 300
HM74 <i>putative chemokine receptor;</i> <i>GTP-binding protein</i>	-	-	14

Tabelle 4.22: Regulationsfaktoren für die Gene CCL3 und HM74, die mittels Atlas™ Human 1.2 cDNA Expression Array (Variante 2) erhalten wurden.

Für die zwei in der Tabelle 4.22 aufgelisteten Gene mussten vor der Durchführung der *real-time* RT-PCR zuerst die entsprechenden Primer generiert und ausgetestet werden. Die Kriterien für die Entwicklung der Primer sind unter 3.2.11 angegeben. Ihre Austestung inklusive der Überprüfung der Annealing-Temperatur, Primermatrix usw. wurde wie bereits unter 4.1.12 beschrieben durchgeführt. Sowohl für die Primermatrix, als auch für die eigentlichen Messungen wurde der SYBR® *Green PCR Core Reagent Kit* (Applied Biosystems) verwendet. Zur Bestimmung des Haushaltsgens wurden die humanen RPS9-Primer mit demselben Kit vermessen. Die Ergebnisse der Primermatrizes sind ebenfalls unter 4.1.12 aufgeführt.

Für die Analyse mittels quantitativer *real-time* RT-PCR wurde einerseits die im Array untersuchte RNA des Spenders C eingesetzt. Zusätzlich wurde die RNA der Spender A und B analysiert, die zeitgleich generiert worden waren. Die RNA wurde, wie unter 3.2.9 geschildert, in cDNA umgeschrieben und für die *real-time* RT-PCR eingesetzt.

Die Modifikation der LPS-induzierten IL-6-Antwort der humanen Monozyten durch das Anaphylatoxin C5a ist in der folgenden Abbildung dargestellt. Hierbei wurde die Menge an IL-6-mRNA bei Spender C um Faktor 4,4 sowie bei den Spendern A und B je um den Faktor 1,7 verringert:

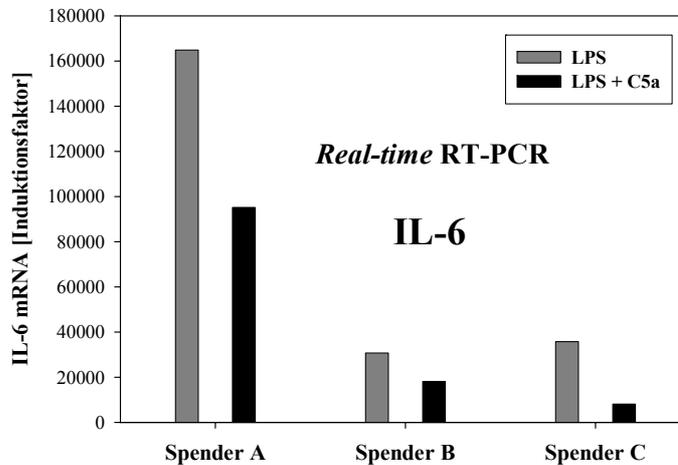


Abbildung 4.46: Graphische Darstellung der mittels *real-time* RT-PCR erhaltenen Induktionsfaktoren der IL-6-mRNA von primären humanen Monozyten nach einem einstündigen Priming mit IFN- γ und vierstündiger Stimulation mit LPS bzw. LPS und C5a. Dargestellt sind die Mittelwerte von Doppelwerten aus einem von zwei repräsentativen *real-time* RT-PCR-Läufen.

Die durch die Einzelstimulation mit dem Anaphylatoxin C5a ausgelöste Induktion des *macrophage inflammatory protein-1 α* (MIP-1 α bzw. CCL3) konnte für alle drei Spender mittels *real-time* RT-PCR bestätigt werden.

In der folgenden Tabelle sind sämtliche errechneten Regulationsfaktoren wiedergegeben:

CCL3 <i>small inducible cytokine</i> <i>A3 (MIP-1α)</i>	C3aR-mRNA [Induktionsfaktor im Vergleich zur Puffer-Kontrolle; bestimmt mittels <i>real-time</i> RT-PCR]		
Stimulans	<i>Spender A</i>	<i>Spender B</i>	<i>Spender C</i>
C5a	2,4 (+/- 0,4)	4,4 (+/- 2,1)	6,8 (+/- 3,5)

Tabelle 4.23: *Real-time* RT-PCR Analyse der nach einem einstündigen Priming mit IFN- γ und vierstündiger Stimulation mit C5a resultierenden Hochregulation der CCL3-mRNA in primären humanen Monozyten. Aufgeführt sind Mittelwert und Standardabweichung von zwei unabhängigen Messungen mit Doppelwerten in jedem Test.

Die im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Genexpression des Orphan-Rezeptors HM74 war im Array nur bei kombinierter Stimulation mit LPS zu detektieren. Bei der Verifizierung dieses Ergebnisses mittels *real-time* RT-PCR konnte bei allen drei Spendern eine Induktion schon

durch die alleinige Behandlung der humanen Monozyten mit C5a aufgezeigt werden, die durch die Doppelstimulation mit LPS noch verstärkt wurde.

HM74 <i>putative chemokine receptor</i>	C3aR-mRNA [Induktionsfaktor im Vergleich zur Puffer-Kontrolle; bestimmt mittels <i>real-time</i> RT-PCR]		
	Stimulans	Spender A	Spender B
C5a	3,1 (+/- 0,8)	2,9 (+/- 0,2)	4,9 (+/- 0,4)
LPS	2,2 (+/- 0,4)	2,1 (+/- 0,1)	6,1 (+/- 1,5)
LPS + C5a	3,4 (+/- 1,3)	2,6 (+/- 0,1)	8,1 (+/- 0,4)

Tabelle 4.24: *Real-time* RT-PCR Analyse der nach einem einstündigen Priming mit IFN- γ und vierstündiger Stimulation mit C5a, LPS oder der Kombination von LPS und C5a resultierenden Hochregulation der HM74-mRNA in primären humanen Monozyten. Aufgeführt sind Mittelwert und Standardabweichung von zwei unabhängigen Messungen mit Doppelwerten in jedem Test.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die im Mikroarray erhaltenen Regulationen mittels *real-time* RT-PCR für alle untersuchten Gene bestätigt werden konnten. Auffällig ist, dass die Antwort des im Array eingesetzten Spenders C bei allen drei untersuchten Genen am höchsten war.

5 Diskussion

Teil 1:

5.1 Untersuchung der transkriptionellen Regulation des C3aR

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Regulation des C3aR untersucht werden. Dabei sollten neue Induktoren sowie Transkriptionsfaktoren ermittelt werden, die zu einer Hochregulation der Expression dieses Anaphylatoxin-Rezeptors führen. Zunächst musste der Transkriptions-Startpunkt bestimmt und die Promotorregion eingegrenzt werden.

Für diese Untersuchungen wurde hauptsächlich die humane Mastzelllinie HMC-1 gewählt, die sich durch eine hohe konstitutive Expression des C3aR auszeichnet. Mastzellen spielen eine wesentliche Rolle bei Asthma und Immunerkrankungen. Die Aufschlüsselung der Regulationsprozesse, die zu einer Induktion der Anaphylatoxin-Rezeptoren führen, könnte zum Verständnis der Pathologie dieser Krankheitsbilder beitragen.

5.1.1 Bestimmung des Transkriptions-Startpunktes

Durch RT-PCR mit einem Set von Sense-Primern wurde gezeigt, dass bis zur Position – 185 (bezogen auf das ATG-Startkodon) starke Amplifikate und von dort aus bis zur Position – 275 immer schwächer werdende DNA-Produkte erhalten wurden. In der Dissertation von Frau Sohns („Untersuchungen zur Expression des humanen C3a-Rezeptors“) konnte mittels *Nuclease Protection Assay* (NPA) nur der Initiationspunkt an Position – 185 identifiziert werden. Mittels RT-PCR waren dort die von uns detektierten schwächeren Amplifikate nicht erhalten worden. Das verbesserte RNA-Aufreinigungsprotokolls könnte dazu geführt haben, dass die RNA jetzt vollständiger bis zum 5'-Ende revers transkribiert wurde.

Die Resultate unserer RT-PCR-Analysen in Kombination mit dem Ergebnis des NPA von Frau Sohns weisen darauf hin, dass der C3aR in HMC-1-Zellen einen multiplen Transkriptions-Startpunkt mit einer Hauptinitiationsstelle an Position – 185 und einem Nebenstartpunkt etwa an Position – 265 aufweist. In Übereinstimmung damit befinden sich von Position – 190 bis – 197 sowie von Position – 257 bis – 264 potentielle Cap-Signale. Der stromaufwärts gelegene Nebentranskriptions-Startpunkt wird für eine Detektion im NPA möglicherweise zu schwach frequentiert.

Eine mögliche CAAT-Box ist von Position – 231 bis – 241 lokalisiert und könnte in Verbindung zu dem Haupttranskriptions-Startpunkt stehen.

In Bt₂-cAMP-differenzierten U937-Zellen zeigte auch noch der am weitesten 5' lokalisierte Sense-Primer in der RT-PCR ein relativ starkes Amplifikat. Demnach müssen zur genauen Bestimmung des Transkriptions-Startpunktes in diesen Zellen zusätzliche noch weiter 5' gelegene Sense-Primer generiert und ausgetestet werden. Da das bisher verwendete Positiv-

kontrollplasmid (pSEAP2-E-308-hC3aR-234) nur die ersten 308 bp der 5'-UTR des humanen C3aR umfasst, müsste dann auch ein längeres Fragment der 5'-UTR zur späteren Kontrolle der neuen Primerpaare inkloniert werden.

Die Nutzung einer weiteren Initiationsstelle in Bt₂-cAMP-differenzierten U937-Zellen im Vergleich zu HMC-1-Zellen deutet daraufhin, dass generell verschiedene Transkriptions-Startpunkte für den C3aR in unterschiedlichen Geweben/Zellen genutzt werden. Solch Gewebe-spezifische Regulationen sind auch bei anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren, wie dem D1A Dopamin-Rezeptor, bekannt [152].

5.1.2 Bei dem C3aR-Promotor handelt es sich um einen TATA-losen Promotor

Die Mutation potentieller TATA-Boxen (siehe Abbildung 4.1) hatte keinen Einfluss auf die Aktivität der entsprechenden Promotorkonstrukte im Reporter-Gen-Assay. Diese Ergebnisse weisen auf einen TATA-losen Promotor hin, wie er auch für den murinen C3aR beschrieben ist [96]. Die TATA-unabhängige Initiation der Transkription findet man auch bei anderen G-Protein gekoppelte Rezeptoren [153] wie dem D1A Dopamin-, dem Serotonin 1a-, dem Parathyroid Hormon-, dem δ Opioid- und dem V1a Vasopressin-Rezeptor [154-157].

Für einen TATA-losen Promotor beim C3aR spricht außerdem, dass die potentiellen TATA-Boxen nicht den für eukaryontische Promotoren üblichen Abstand von ~ 25 bp zu den Transkriptions-Startpunkten aufweisen.

5.1.3 Eingrenzung wichtiger regulatorischer Bereiche des C3aR-Promotors und Vorhersage putativer Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen

Unter Zuhilfenahme von Verkürzungsmutanten konnte der C3aR-Promotor auf einen etwa 300 bp langen Bereich eingegrenzt werden. Diese Region von Position -18 bis -286 wurde sukzessive vom 3'- und 5'-Ende weiter deletiert. Das Promotorkonstrukt von Position -162 bis -215 wies im Vergleich zum Reporter-Leervektor keine Aktivität mehr auf. Weitere Analysen mittels Punktmutationen (siehe unten) bestätigten die Annahme, dass es sich hierbei um einen essentiellen Bereich des C3aR-Promotors handelt. Unterschiedlich stark positiv-regulatorische Bereiche liegen 5' und 3' von dieser Kernregion. Ein höchstwahrscheinlich negativ-regulatorischer Bereich befindet sich stromabwärts.

Passend zu der Annahme einer regulatorischen Bedeutung des 300 bp-Bereiches ergab die computergestützte Analyse (MatInspector[®] Professional Software Version 6.2) die Vorhersage von 30 Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen. Dabei soll sich ein Bindungsmotiv für den Transkriptionsfaktor Ets-1 in der Mitte sowie eine AP-1-Bindungsstelle am Rand des Kernpromotors befinden. In der negativ-regulatorisch wirksamen Region wurde eine ATF/CREB-Bindungsstelle vorhergesagt.

5.1.4 Die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-1 sind Regulatoren des C3aR

5.1.4.1 Untersuchungen mittels Reporter-Gen-Studien

Reporter-Gen-Studien an C3aR-Promotorkonstrukten mit mutiertem Ets-1 oder AP-1 Bindemotiv zeigen, dass diese Bindungsstellen für die Expression wichtig sind und weisen stark darauf hin, dass es sich bei den entsprechenden Transkriptionsfaktoren um Regulatoren des C3aR handelt.

Die Überexpression von (exogenem) Ets-1 oder AP-1 alleine konnte die Aktivität eines Wildtyp-Promotorkonstruktes lediglich schwach erhöhen. Das *small GTP-binding protein* Ha-Ras führte zu einem etwas stärkeren Signal. Ras-Proteine binden und aktivieren Raf-Proteinkinasen, welche daraufhin MEK phosphorylieren und aktivieren, was wiederum zur Phosphorylierung und Aktivierung einer MAP-Kinase führt [158]. Diese transloziert in den Kern und phosphoryliert bzw. stimuliert zahlreiche Transkriptionsfaktoren, unter anderem Ets-1 [159;160] und AP-1 [161]. Außerdem steigert Ha-Ras die Expression von c-Fos [162]. Wie zu erwarten, führte die kombinierte Überexpression von Ets-1 und Ha-Ras bzw. AP-1 und Ha-Ras zu einem Anstieg der Promotoraktivität eines Wildtyp-Konstruktes. Diese Aktivitätssteigerung konnte bei den beiden Konstrukten mit mutiertem Ets-1 bzw. AP-1 Bindemotiv nicht beobachtet werden. Die reduzierte basale Aktivität der mutierten Promotorkonstrukte deutet auf das Vorhandensein von endogenem Ets-1 bzw. AP-1 (oder anderer korrespondierender Bindungspartner) in HMC-1-Zellen hin. Für Ets-1 wurde diese Annahme mittels *real-time* RT-PCR, zumindest auf RNA-Ebene, bestätigt.

Wie schon in der Einleitung erwähnt, entscheiden die Mitglieder der **AP-1** Transkriptionsfaktor-Familie über den Vitalitätszustand einer Zelle (zur Übersicht siehe [140;141]). Sie steuern die Wachstumskontrolle, Transformation und Apoptose. Serum, Wachstumsfaktoren, Onkogene, UV-Licht und andere extrazelluläre Signale können die Genexpression von c-Fos/c-Jun induzieren und deren Aktivität durch Phosphorylierung steuern [162]. Neben Jun und Fos gehören auch die *activating transcription factors* (ATF) zu dieser Familie, die ebenfalls durch Phosphorylierungen (de)aktiviert werden. Die differentielle Expression der antagonistisch wirkenden Faktoren c-Jun und JunB ist absolut essentiell für die Zellzyklusregulation. Jun-Komponenten sind zur Ausbildung von Homodimeren befähigt, hingegen können die Fos-Mitglieder nur als Heterodimer mit Jun-Faktoren wirken. Diese Heterodimere zeichnen sich jedoch durch eine wesentlich höhere Stabilität aus, was den starken Anstieg der Aktivität eines C3aR-Wildtyp-Promotorkonstruktes nach kombinierter Überexpression von c-Jun, c-Fos und Ha-Ras im Vergleich zu einem niedrigeren Anstieg durch c-Jun und Ha-Ras erklären könnte.

Der Transkriptionsfaktor **Ets-1** ist an zentralen Zellfunktionen wie Entwicklung und Reparatur beteiligt. Eine hohe Expressionsrate ist gerade während der Angiogenese in proliferierenden Endothelzellen der Gefäße zu beobachten. Darüber hinaus scheint Ets-1 für

das Überleben und die Ausreifung von B- und T-Lymphozyten [134] sowie die Entwicklung von funktionell aktiven NK-Zellen verantwortlich zu sein (zur Übersicht siehe [131]). In differenzierten Mastzellen ist Ets-1 konstitutiv exprimiert, in primären Mastzellen kann er induziert werden und scheint wichtig für die GM-CSF-Synthese zu sein [139].

Der Ets-1 Transkriptionsfaktor

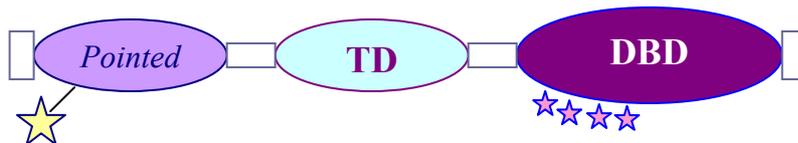


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des Ets-1 Transkriptionsfaktors. Aufgeführt sind die DNA Bindungs-Domäne (DBD), die Transaktivierungs-Domäne (TD) und die Pointed-Domäne. Das gelbe Sternchen spiegelt die Aminosäure Threonin-38 wieder, welche Ras-MAPK-spezifisch phosphoryliert wird. Die vier Sternchen an der DNA-Bindungs-Domäne stellen Ca^{2+} -abhängige Phosphorylierungsstellen dar.

In Reporteragen-Studien konnte gezeigt werden, dass Ets-1 und AP-1, synergistisch auf den C3aR-Promotor wirken. Bei dem Bereich, in dem ihre Bindungs-Domänen lokalisiert sind, könnte es sich daher um ein *Ras-response element* (RRE) handeln. Dieses Motiv wurde erstmals im Enhancer des Polyoma Virus beschrieben [163].

Wie zu erwarten konnte überexprimiertes Ets-1 die Promotoraktivität des Konstruktes mit mutiertem AP-1 Bindemotiv induzieren. Überraschenderweise bewirkte überexprimiertes AP-1 nur einen geringen Anstieg der Promotoraktivität des Konstruktes mit zerstörter Ets-1 Bindungsstelle. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass Ets-1 und AP-1 höchstwahrscheinlich sequentiell mit dem C3aR-Promotor interagieren. Wobei in diesem Falle die Bindung von Ets-1 der von AP-1 vorausgehen muss. Solch kooperative Bindungsmodelle, die auf dem Vorhandensein eines *Ras-response elements* im jeweiligen Promotor basieren, sind für einige Gene, die an der zellulären Transformation und Migration beteiligt sind, beschrieben [164]. Westermarck und Kollegen zeigten, dass die simultane Überexpression von Ets-1 und AP-1 zu einer verstärkten Aktivität des Matrix-Metalloproteinase-1-Promotors im Vergleich zu der alleinigen Ko-Transfektion mit Ets-1 oder AP-1 führt [165]. Bei Logan *et al.* wurde für den TIMP-1 (*tissue inhibitor of metalloproteinases-1*) Promotor, wie von uns für den C3aR-Promotor, eine sequentielle Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren, jedoch in umgekehrter Reihenfolge, gezeigt [166]. Ets-1 und AP-1 führen, ebenfalls Ras-abhängig, zur Aktivierung des Stromelysin-1(MMP-3)-Promotors [160]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Ets-1-Promotor zwei AP-1 und eine Ets-1 Bindungsstelle aufweist, so dass von einer positiven Autoregulation ausgegangen werden kann [167].

5.1.4.2 Interagiert Ets-2 mit dem C3aR-Promotor?

Die DNA Bindungs-Domäne (siehe Abbildung 5.1) ist in allen Mitgliedern der Ets-Familie von Transkriptionsfaktoren hoch konserviert und erkennt die Consensus-Sequenz GGAA/T. Für die spezifische Erkennung durch die unterschiedlichen Ets-Transkriptionsfaktoren sind insgesamt 9 bis 15 Nukleotide verantwortlich, die außerhalb des Core-Motivs stark variieren können. Die Ets-Familie gliedert sich in zwei Subklassen auf, die Ets-Gruppe, zu der Ets-1, Ets-2 und Pointed gehören und in die *ternary complex factors*, der unter anderem Elk-1 und Erg-1 angehören. Von der MatInspector[®] Software wurde spezifisch eine Ets-1 Bindungsstelle vorhergesagt. Dennoch sollte untersucht werden, ob Ets-2 ebenfalls auf den C3aR wirkt, da er in Kombination mit AP-1 die Genexpression des *scavenger receptors*, der während des finalen Stadiums der Monozyten-zu-Makrophagen Differenzierung stark hochreguliert ist, aktiviert [168].

Mittels Reporter-gen-Studien wurde dargelegt, dass weder die Überexpression von Ets-2 alleine noch die Kombination mit AP-1 eine Steigerung der Promotoraktivität eines C3aR-Wildtyp-Konstruktes bewirkte. Unerwartet war die Aktivität des Promotorkonstruktes mit mutiertem Ets-1 Bindemotiv bei Ko-Transfektion mit Ets-2 erhöht. Dieser Effekt ist trotz seiner statistischen Signifikanz am ehesten auf die bei Reporter-gen-Studien üblichen Schwankungen zurückzuführen. Die eingeführte Mutation (caggaag → caagaag) verhindert nach den Angaben von Santa Cruz hochspezifisch die Bindung von Ets-1. Es bestünde theoretisch die Möglichkeit, dass Ets-2 an das mutierte Konstrukt bindet. Dennoch bliebe bei dieser Hypothese fraglich, warum Ets-2 nicht mit dem Wildtyp-Konstrukt interagiert, da dieses die universelle Ets-Consensus-Sequenz aufweist.

5.1.4.3 Hochregulation der C3aR-mRNA in HEK293-Zellen durch Überexpression der Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-1

Da es sich bei den Reporter-gen-Studien um ein relativ artifizielles System handelt, wurde zusätzlich der Effekt von Ets-1 und AP-1 auf die endogene C3aR-mRNA in HEK293-Zellen untersucht.

Nach transienter Überexpression der beiden Transkriptionsfaktoren (zusammen mit Ha-Ras) konnte mittels *real-time* RT-PCR eine Hochregulation der C3aR-mRNA bestätigt werden.

Der tatsächliche Induktionsfaktor liegt wahrscheinlich noch wesentlich höher, da transfizierte und nicht-transfizierte Zellen gleichermaßen in die Analyse eingehen, bei transienten Transfektionen jedoch nur ein geringer Prozentsatz der Zellen erreicht wird und in diesem Fall sogar vier Plasmide gleichzeitig in die Zellen eingebracht werden müssen.

Dieses Ergebnis belegt die Interaktion von exogen zugeführtem Ets-1 und AP-1 mit dem endogenen C3aR-Promotor und stellt somit eine Bestätigung der mittels Reporter-gen-Assay gewonnenen Resultate dar.

Mittels *real-time* RT-PCR konnte auf mRNA-Ebene sowie mittels ^{125}I -C5a-Bindungsstudie auf Protein-Ebene gezeigt werden, dass AP-1 und Ets-1 nicht zu einer Hochregulation des C5aR befähigt sind. Die beiden Regulationsfaktoren scheinen also spezifisch auf den Promotor des C3a-Anaphylatoxin-Rezeptors zu wirken.

5.1.4.4 Durchflußzytometrischer Nachweis der Induktion des C3aR nach Überexpression von Ets-1 und AP-1

Da sich die mittels *real-time* RT-PCR erhaltenen Ergebnisse auf den Nachweis der C3aR-mRNA beschränken, wurde in durchflußzytometrischen Studien untersucht, ob die Überexpression von Ets-1 und AP-1 (zusammen mit Ha-Ras) in HEK293-Zellen auch eine Induktion des C3aR-Proteins bewirkt. Tatsächlich zeigte die FACS-Analyse, dass der C3aR nach transienter Transfektion der beiden Transkriptionsfaktoren hochreguliert wurde.

Die zusätzliche Ko-Transfektion von eGFP zum *Gating* positiv-transfizierter Zellen erbrachte keine weitere Steigerung des Anteils Rezeptor-tragender Zellen (15 %). Wahrscheinlich liegt dies daran, dass sich durch die kombinierte Transfektion von vier Plasmiden (für c-Jun, c-Fos, Ets-1 und Ha-Ras) die Transfektionseffizienz deutlich vermindert, wie eigene Versuche ergaben (Daten nicht gezeigt). Bei der Hinzunahme eines weiteren, für das *Gating* benötigten, Vektors (eGFP) nimmt die Wahrscheinlichkeit weiter ab, dass alle fünf Plasmide gleichzeitig in die selbe Zelle transfiziert und die zugehörigen Proteine dort exprimiert werden.

Um die Bindung der endogenen Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-1 an den C3aR-Promotor direkt zu bestätigen, werden noch Gelshift- (EMSA) und Supershift-Assays benötigt, mit denen bereits begonnen wurde.

5.1.5 Mutation zweier putativer ATF/CREB-Bindungsdomänen

Die von sämtlichen Mitgliedern der ATF (*activating transcription factor*)/CREB (*cAMP-response element binding-protein*)-Familie erkannte Consensus-Sequenz lautet: tgacgtca. Bei dem mutierten Bindungsmotiv sind die Basen ac zu tg ausgetauscht. Die beiden putativen ATF/CREB-Bindungsdomänen im C3aR-Promotor weisen folgende Sequenzen auf: tgacttca (Position –92 bis –99) und tgacttca (Position –195 bis –202). Das heißt, bei beiden möglichen Domänen liegt jeweils ein Basenaustausch gegenüber der Consensus-Sequenz vor. Die weiter 5'-gelegene CREB-Bindungsstelle wurde von der Version 6.2 des MatInspector[®] nicht mehr als solche erkannt. Trotzdem wies ein in diesem Bereich mutiertes kurzes Promotorkonstrukt eine verringerte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt auf. Bei einem längeren Konstrukt hatte dieselbe Mutation keine Veränderung der Promotoraktivität zur Folge. Um tatsächlich charakterisieren zu können, ob die mögliche ATF/CREB-Domäne essentiell an der transkriptionellen Regulation des C3aR beteiligt ist, müssten die entsprechenden Transkriptionsfaktoren zur Überexpression gebracht werden. Alle Mitglieder

der ATF/CREB-Familie sind dazu befähigt, als Homo- oder Heterodimer an die entsprechende Domäne zu binden und können außerdem als Heterodimere mit Mitgliedern der AP-1-Familie wirken. Somit hätten „unzählige“ Kombinationsmöglichkeiten in Überexpressions-Versuchen ausgetestet werden müssen, was im Endeffekt nur eine Aussage über die Wirkung von exogen zugeführten Faktoren erlaubt hätte.

Die Mutation der möglichen CREB-Bindungsstelle an Position – 96 erbrachte keine Abnahme der Promotoraktivität. Hingegen war sowohl in unstimulierten als auch in Bt₂-cAMP-stimulierten HMC-1-Zellen ein leichter Anstieg der Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt zu verzeichnen. Wie in Abbildung 4.9 dargestellt ist, weist die Deletionsmutante pSEAP2-E-187 eine wesentlich höhere Promotoraktivität als das pSEAP2-E-206 Konstrukt auf. Daraus konnte geschlossen werden, dass sich zwischen Position – 80 und – 99 der 5'-UTR des humanen C3aR wahrscheinlich ein negativ-regulatorischer Bereich befindet. Es bestünde also die Möglichkeit, dass durch die Mutation an Position – 96 die Bindung oder Interaktion eines Transkriptions-Repressors unterbunden wird und deshalb die Promotoraktivität ansteigt.

Eventuell sind HMC-1-Zellen mit ihrer hohen konstitutiven Expression nicht die geeigneten Target-Zellen, um die in U937-Zellen beschriebene cAMP-abhängige Hochregulation des C3aR auf Promotorebene zu analysieren. Da sich U937-Zellen praktisch nicht transient transfizieren lassen, konnten hier leider keine Promotorstudien durchgeführt werden. Außerdem besteht die begründete Annahme, dass eine Reihe von Faktoren, die für die Expression des C3aR essentiell sind, zumindest in unstimulierten U937-Zellen, nicht exprimiert sind.

Da in HMC-1-Zellen nach Stimulation mit Bt₂-cAMP auch die Aktivität des nicht für SEAP-kodierenden Kontrollvektors anstieg, besteht die Möglichkeit, dass endogen vorhandene „Sezernierte Alkalische Phosphatase“ induziert wurde. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass bei den stimulierten Werten mehr Zellen als bei den unstimulierten vermessen wurden. Nach der Bt₂-cAMP-Stimulation teilen sich die Zellen nur noch einmal. Um bei der Zellernte 72 h nach der Transfektion überall gleich viele Zellen zu erhalten, wurden in die *wells*, die anschließend stimuliert wurden zu Beginn entsprechend mehr Zellen ausgesät. Naturgemäß resultiert hier eine gewisse Ungenauigkeit.

Bei der in U937-Zellen beschriebenen Bt₂-cAMP-induzierten Hochregulation des C3aR [75] könnte es sich auch um einen **sekundären** Effekt handeln, der unabhängig von der Interaktion eines Mitgliedes der ATF/CREB-Familie mit dem *cAMP-response element* ist. So ist für eine Vielzahl von Stimuli (z. B. den NGF [169]) gezeigt, dass es Ras-abhängig zu einer Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade kommt, was unter anderem zur Phosphorylierung und Aktivierung von CREB führt. Dieses bindet an das CRE im Promotor von c-Fos und schaltet somit dessen Expression an. Bei c-Fos handelt es sich um ein *immediate-early gene* (IEG).

Die Expression von *late response genes* wird oftmals indirekt über die Bindung von zuvor hochregulierten IEGs an den jeweiligen Promotor aktiviert. Das heißt, die Stimulation mit Bt_2 -cAMP könnte zur Expression von c-Fos führen, das daraufhin an den C3aR-Promotor bindet und mit weiteren Faktoren eine Hochregulation bewirkt. In Kombination mit der zuvor gezeigten expressionssteigernden Wirkung von AP-1 auf den C3aR-Promotor besteht eine begründete Annahme für die Richtigkeit dieser Hypothese.

5.2 Identifizierung neuer Induktoren der C3aR-Expression

In der Dissertation von Frau Sohns wurde in Reporter-gen-Studien eine erhöhte Genexpression des C3aR nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen beobachtet. Aufgrund dessen sollte diese Methode als Screening-Verfahren zur Aufdeckung neuer Induktoren der C3aR-Expression eingesetzt werden, jedoch konnte die beschriebene Erhöhung der Promotoraktivität hier nicht bestätigt werden. Der gemessene Anstieg war lediglich auf eine Induktion der zur Normalisierung verwendeten β -Galaktosidase zurückzuführen. Zur Normalisierung könnte stattdessen ein CAT-ELISA eingesetzt werden, da es in den untersuchten Zellen keine endogene Form dieses bakteriellen Enzyms gibt, die induziert werden könnte. Da der CAT-ELISA jedoch sehr teuer ist, wurde von dessen Einsatz zum Screening abgesehen. Einzelne Ergebnisse könnten so jedoch in Reporter-gen-Studien gezielt überprüft werden.

5.2.1 TNF- α als ein neuer Induktor der C3aR-Expression

Das proinflammatorische Zytokin TNF- α , welches hauptsächlich von Makrophagen sezerniert wird, aktiviert in einer Vielzahl von Zellen unterschiedliche Transkriptionsfaktoren. Die wichtigsten dieser Faktoren sind NF- κ B und AP-1. Es ist jedoch auch eine Induktion von Ets-1 z. B. in den glatten Muskelzellen der Gefäße, in Mausmakrophagen oder Synovialfibroblasten bei Arthritis beschrieben [136;137]. Mittels Reporter-gen-Studien an Deletionsmutanten und *site-directed Mutagenesis* konnte gezeigt werden, dass AP-1 und Ets-1/PEA3-Bindungsstellen im Urokinase-Promotor essentiell an der TNF- α -induzierten Hochregulation dieser Kinase beteiligt sind [170].

In dieser Arbeit konnte offenbart werden, dass eine Stimulation mit TNF- α zu einer Zunahme der C3aR-mRNA in U937-Zellen führt. Folglich ist TNF- α ein zweiter physiologischer Induktor dieses Anaphylatoxin-Rezeptors.

Obwohl für andere Zellen bereits eine TNF- α -induzierte Hochregulation des C5aR beschrieben ist [77;171], konnte dies in U937, zumindest für die gewählten Versuchsbedingungen, nicht bestätigt werden.

Die rapide aber transiente Induktion der C3aR-mRNA durch TNF- α lag in der selben Größenordnung wie die durch IFN- γ erzielte. Jedoch handelt es sich bei der durch IFN- γ induzierten Hochregulation des C3aR um einen verzögerten Prozess [75]. Die anhaltende

IFN- γ -abhängige Expression konnte durch eine kurze Ko-Stimulation mit TNF- α erhöht werden. Die unterschiedliche Kinetik und der Synergismus dieser beiden Zytokine bei der transkriptionellen Kontrolle des C3aR weisen darauf hin, dass es sich bei der Induktion durch TNF- α und IFN- γ um divergierende und sich ergänzende Regulationsmechanismen handelt.

Eine Induktion der Transkriptionsfaktoren AP-1 und Ets-1 kann auf verschiedene Weisen erfolgen. Oftmals wird c-Fos, wie oben schon beschrieben, transkriptionell reguliert, während c-Jun und Ets-1 durch Phosphorylierung aktiviert werden. Jedoch weist auch c-Fos Phosphorylierungsstellen auf. Die Aktivierung aller drei Transkriptionsfaktoren wird hauptsächlich durch die MAP-Kinase-Kaskade induziert. TNF- α führt bekanntermaßen zu einem Auslösen dieses Signalweges.

Mittels *real-time* RT-PCR konnte die Ets-1-mRNA in U937-Zellen nachgewiesen werden. Wie zu erwarten konnte keine erhöhte Expression nach Stimulation mit TNF- α verzeichnet werden, da Ets-1 Ras-abhängig durch Phosphorylierung an Threonin-38 in der Pointed-Domäne und nicht transkriptionell aktiviert wird.

Zu beachten ist, dass eine Phosphorylierung der vier Serine in der DNA Bindungs-Domäne (siehe Abbildung 5.1) Ca²⁺-abhängig zu einer Inhibition der Ets-1-Bindung führt [172-174]. Dieser Mechanismus spielt bei einer Vielzahl von Prozessen eine Rolle, so wird z. B. eine erhöhte T-Zell-Apoptose und die terminale B-Zell-Differenzierung durch diesen Inaktivierungsprozess von Ets-1 induziert [134].

Das ebenfalls zu den proinflammatorischen Zytokinen zählende IL-1 wird von aktivierten Makrophagen, Monozyten und peripheren Neutrophilen gebildet. Die beiden Hauptformen IL-1 α und IL-1 β sind funktionell gleichwertig. Da die Hauptmenge des von Makrophagen sezernierten Interleukins IL-1 β ist, wurden die Stimulationsexperimente hier mit diesem Subtyp durchgeführt. IL-1 führt über die Auslösung der MAP-Kinase-Kaskade unter anderem zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und zusammen mit TNF- α zu vielfältigen Veränderungen des Endothels. Es wirkt zudem stark chemotaktisch auf Leukozyten, wirkt als endogenes Pyrogen und erzeugt Fieber. In der Leber induziert es die Expression der Akute-Phase-Proteine und führt in Kombination mit TNF- α zur Aktivierung von B- und T-Lymphozyten sowie zur Stimulation phagozytierender Zellen. Das heißt, TNF- α , IL-1 (und IL-6) sind entscheidend an der Eingrenzung von Entzündungsreaktionen beteiligt. Darüber hinaus konnten Redlich und Kollegen zeigen, dass diese beiden Zytokine in Synovialfibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis, eine Aktivierung und Hochregulation von Ets-1 bewirken [137]. Ets-1 induziert Stromelysin-1 (MMP-3), welches wahrscheinlich eines der Hauptenzyme ist, die zur Knorpeldestruktion bei rheumatoider Arthritis führen [160]. Sowohl TNF- α als auch IL-1 führen in kultivierten Synovialfibroblasten zur Aktivierung und Bindung von Ets-1, wobei es sich bei der Aktivierung durch TNF- α um einen kurzen, transienten Prozess handelt, wohingegen IL-1 eine länger anhaltende Bindung

bewirkt. So ist IL-1 wahrscheinlich für die dauerhafte Hochregulation von Ets-1 in den Synovialfibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis verantwortlich.

In U937-Zellen konnte eine IL-1 β -abhängige Induktion des C3aR lediglich um den Faktor ~ 4 verzeichnet werden. Ein Synergismus zwischen TNF- α und IL-1 β war nicht zu detektieren.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass mit TNF- α ein zweiter physiologischer Induktor der C3aR-Expression aufgezeigt werden konnte. Die Resultate weisen darauf hin, dass dieses proinflammatorische Zytokin über die Auslösung der MAP-Kinase-Kaskade zur Aktivierung von Ets-1 führt, welches in phosphorylierter Form an den C3aR-Promotor bindet und in Kombination mit AP-1 und weiteren Faktoren die Transkription dieses Rezeptors initiiert. Eine überschießende Aktivierung der Anaphylatoxine ist unter anderem auch bei der rheumatoiden Arthritis zu beobachten, so dass hier ein Zusammenhang bestehen könnte.

Die unterschiedliche Kinetik der durch TNF- α und IFN- γ induzierten Hochregulation des C3aR deutet auf zwei unabhängige Mechanismen hin. TNF- α wird sehr früh im Entzündungsgeschehen produziert und könnte deshalb für die schnelle, jedoch transiente Induktion des C3aR verantwortlich sein. IFN- γ wird hauptsächlich von aktivierten T- und B-Lymphozyten sowie natürlichen Killerzellen sezerniert. Es könnte daher eine später einsetzende, jedoch länger anhaltende Hochregulation des Anaphylatoxin-Rezeptors bewirken.

Im Folgenden könnte im EMSA untersucht werden, ob sich eine solche Bindung in U937-Zellen durch eine TNF- α -Stimulation induzieren lässt.

5.3 Etablierung eines retroviralen Gentransfer- und Expressions-Systems zur Herstellung einer dominant negativen Mutante des Ets-1 Transkriptionsfaktors

In dieser Arbeit wurde der Einsatz eines retroviralen Gentransfer- und Expressionssystems etabliert und für verschiedene Zelllinien optimiert. Es zeigte sich, dass in der 293GPG-Verpackungszelllinie Virusüberstände mit hohen Titern produziert werden konnten. Mit einem für eGFP kodierenden Expressionsvektor konnten mit diesen Überständen Transduktionsraten von $\sim 40\%$ für adhärenz Zelllinien und $\sim 10\%$ für Suspensionszelllinien erreicht werden. Da sich das Hauptinteresse jedoch auf die beiden Suspensionszelllinien U937 und HMC-1 richtete und diese erreichten Transduktionsraten für die geplante Untersuchung der Ets-1 dominant negativen Mutante (Ets-1-DN) nicht ausreichten, wurde zusätzlich ein selektierbares System eingeführt. Auch hier zeigte sich, dass der Umgang mit den in Suspension befindlichen Zellen spezieller Protokollabwandlungen bedarf. Zur Herstellung stabiler Linien wurde die Ets-1-DN in einen für das Resistenzgen Neomycin kodierenden Expressionsvektor kloniert. Zur Überprüfung, ob inklonierte Inserts in diesem System tatsächlich exprimiert werden, wurde gleichzeitig eGFP in den *neo*-Vektor eingebracht und

über eine IRES-Sequenz exprimiert. Nach Zelllinien-spezifischer Optimierung konnte in FACS-Analysen gezeigt werden, dass nach vierwöchiger G418-Selektion je nach Zelllinie etwa 75 – 95 % der Zellen stabil eGFP und damit höchstwahrscheinlich auch die Ets-1-DN exprimieren.

5.3.1 Wirkung der Ets-1-DN

In U937-Zellen konnte gezeigt werden, dass die stabil integrierte Ets-1-DN, die durch Bt₂-cAMP induzierte Hochregulation des C3aR im Vergleich zu Kontroll-transduzierten Zellen stark verringert. Das heißt, die dominant negative Mutante des Transkriptionsfaktors Ets-1 wird tatsächlich exprimiert und erfüllt prinzipiell ihre funktionelle Aufgabe der Inhibition der C3aR-Expression.

Eine Verminderung der durch IFN- γ , TNF- α oder IL-1 β induzierten Hochregulation des C3aR durch die Ets-1-DN konnte nicht detektiert werden. Da IFN- γ und TNF- α zwar synergistisch, jedoch mit unterschiedlicher Kinetik, die C3aR-Expression erhöhen, könnte es sein, dass IFN- γ die Aktivierung anderer Transkriptionsfaktoren als Ets-1 bewirkt und deshalb kein Einfluss der Ets-1-DN verzeichnet werden kann. Für IL-1 β konnte nur eine sehr geringe Induktion des C3aR beschrieben werden, so dass die physiologische Relevanz noch unklar bleibt. Der oben aufgestellten Hypothese folgend, dass TNF- α Ets-1 aktiviert und dieser in Kombination mit weiteren Faktoren die Transkription des C3aR initiiert, sollte die Ets-1-DN die TNF- α -induzierte Hochregulation des C3aR verringern. Da in den Kontrollvektor-transduzierten Zellen jedoch nur ein relativ geringer Induktionsfaktor detektiert wurde, besteht durchaus die Möglichkeit, dass sich eine eventuelle Abnahme der Messung entzieht. Eventuell antwortet der hier verwendete Subklon der U937-Zellen schwächer auf eine TNF- α -Stimulation als der für die unter 4.2.3 beschriebenen Stimulationsexperimente an nicht-transduzierten U937-Zellen. Solch unterschiedlich starke Antworten verschiedener Subklone wurden oftmals bei Bt₂-cAMP-differenzierten U937-Zellen beobachtet.

Teil 2:

5.4 Expressionsanalyse monozytärer Zellen mittels cDNA-Array

5.4.1 Optimierung der Versuchs-/Stimulationsbedingungen für die Arrays

Im zweiten Teil der Arbeit sollte ein Überblick über C3a- und C5a-Rezeptor-nachgeschaltete intrazelluläre Regulationseinheiten und Kaskaden in monozytären Zellen gewonnen und dabei neue Funktionen der Anaphylatoxine identifiziert werden.

Als Screening-Verfahren wurden hierzu cDNA-Mikroarrays verwendet. Jedoch mussten vor der endgültigen Durchführung zahlreiche Versuchsparameter optimiert werden, da dies im Array selbst aufgrund der hohen Kosten nicht möglich war.

Es wurden zwei Hauptzugänge gewählt: Zum einen wurden die Funktionen von C3a in der monozytären Mauszelllinie J774A.1 untersucht. In primären humanen Monozyten wurden hingegen die C5aR-nachgeschalteten Effekte betrachtet. Da kurz vor Beginn dieser Arbeit an C3aR-k/o-Mäusen gezeigt werden konnte, dass C3a eine protektive Rolle beim LPS-induzierten Endotoxinschock zukommt [110], wurde in beiden Fällen zusätzlich die alleinige und mit den Anaphylatoxinen kombinierte Wirkung dieses Toxins analysiert.

Nach einer Optimierung des Aufreinigungsprotokolls konnten die primären Monozyten mit einer Reinheit > 70 % isoliert und in Medium unter AB-Zusatz für einen Zeitraum bis zu zehn Tagen kultiviert werden. Die Kultivierung ohne den Zusatz weiterer Stimuli wie z. B. GM-CSF war eine essentielle Voraussetzung für die Untersuchung von C3a/C5a- bzw. LPS-induzierten Genexpressionen, da mittels IL-8-ELISA gezeigt werden konnte, dass Monozyten, die unter dem Zusatz von GM-CSF kultiviert wurden, stark voraktiviert sind. Dies hätte zur Folge haben können, dass die erwarteten C3a/C5a- bzw. LPS-vermittelten Effekte überlagert, verstärkt oder sogar unterdrückt worden wären.

In der vorausgegangenen Diplomarbeit wurde bereits gezeigt, dass die Expression der AT-Rezeptoren durch die Adhärenz an Plastikoberflächen mit der Dauer der Kultivierung zunimmt. Weder eine ein- noch eine 24-stündige Vorstimulation mit IFN- γ beeinflusste dieses Expressionsverhalten. Im Ca^{2+} -Test wurde nachgewiesen, dass die Rezeptoren auch funktionell aktiv sind und eine Behandlung mit IFN- γ die funktionelle Kopplung nicht beeinträchtigt. Mittels kompetitiver ^{125}I -C5a-Bindungsstudie konnte zusätzlich bestätigt werden, dass die unter den genannten Bedingungen aufgereinigten und kultivierten Monozyten den C5aR in hoher Kopienzahl exprimieren. Die ED_{50} , die bei Voraussetzung nur einer Bindungsstelle in etwa der K_D entspricht, lag bei 23 nM. Normalerweise liegt dieser Wert für den C5aR bei etwa 1 – 5 nM. Es besteht einerseits die Möglichkeit, dass die Monozyten nach Plastikadhärenz so viele C5aR tragen, dass während der Bindungsreaktion nicht genügend markierter Ligand zur Verfügung stand, um alle Rezeptoren abzusättigen. Wären die cpm bei den niedrigen Konzentrationen an kaltem Verdränger höher, so wäre die gesamte Kurve nach links verschoben und die ED_{50} läge niedriger. Dies ist beim C5aR in U937-Zellen nach Rezeptorinduktion durch Bt_2 -cAMP der Fall (> 500.000 Rezeptoren/Zelle) [74]. Andererseits ist eine außergewöhnlich hohe „echte“ K_D (~ 48 nM) ebenfalls für den C3aR auf primären humanen Monozyten beschrieben [64], was möglicherweise auf eine etwas andere G-Proteinkopplung in Monozyten zurückzuführen ist. Dieser Punkt wurde jedoch im Kontext dieser Dissertation nicht weiter verfolgt.

Die Expression des C5aR auf J774A.1-Mauszellen ist gesichert [175], ebenso die chemotaktische Wirkung von C3a [176]. Mittels kompetitiver ^{125}I -C3a-Bindungsstudie wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die ED_{50} bei 2 nM liegt. Eine Vorstimulation mit IFN- γ veränderte die C3aR-Expression nicht.

Im *ATP-Release-Assay* offenbarte sich, dass die Konzentration an funktionell aktivem C3a (und C5a) unter Zusatz der Carboxypeptidase N-Inhibitoren nach 24 Stunden maximal um die Hälfte abnimmt. Da stets mit einem Überschuss stimuliert wird, reicht diese Konzentration aus um die gewünschten Effekte zu erzielen.

Zur bestmöglichen Untersuchung der Hypothese, dass C3a/C5a die LPS-induzierte Antwort in monozytären Zellen modifiziert, sollten die dazu nötigen Versuchs-/Stimulationsbedingungen vorab exemplarisch an einem Genprodukt optimiert werden. Jedoch erfüllte das hierzu gewählte IL-8 diese Erwartung leider nicht, da die starke LPS-induzierte Hochregulation durch eine Kombinationsstimulation mit C3a oder C5a nicht verändert werden konnte.

So mussten im Endeffekt einige Parameter für den Array „blind“ entschieden werden.

5.4.2 Auswertung der Array-Experimente

Bei der Stimulation der J774A.1-Zelllinie mit C3a oder FMLP ergaben sich gegenüber den Puffer-stimulierten Zellen keine reproduzierbaren Regulationsereignisse. Auffällig war, dass die gefundenen Veränderungen der Genexpression zumindest beim ersten Experiment zum Großteil sehr schwach ausfielen. So waren 13 der insgesamt 17 beim C3aR-Array gefundenen Regulationsfaktoren < 3 . Im Wiederholungsexperiment erwiesen sich nur fünf Gene, nach den im Methodenteil aufgeführten Kriterien, als reguliert.

Unsere Versuche zielten darauf ab, neue Wirkungen von C3a zu identifizieren. Da von C3a im Allgemeinen jedoch wesentlich weniger Funktionen beschrieben sind als von C5a, besteht allerdings die Möglichkeit, dass dieses Anaphylatoxin in der murinen J774A.1-Zelllinie grundsätzlich keine Regulationen bewirkt und die schwachen, einmalig auftretenden Änderungen der Genexpression nur die geringen natürlichen Schwankungen des Arrays wiedergeben. Abgesehen von der Chemotaxis sind in der Literatur keine weiteren Effekte von C3a in diesen Zellen beschrieben [176].

Da FMLP in Ca^{2+} -Freisetzungstests stets höhere und länger andauernde Signale liefert als C3a (und auch als C5a), wurde es hier parallel ausgetestet. Der humane FMLP-Rezeptor (FPR) ist der nächste Verwandte der AT-Rezeptoren. In murinen Zellen ist sowohl ein *high-affinity* FMLP-Rezeptor, der FPR-1, als auch ein *low-affinity* FMLP-Rezeptor, der FPR-2 beschrieben [177]. Diese beiden Rezeptoren sind die Äquivalente des humanen FPR und FPR-like 1. Da bekannt ist, dass J774A.1-Zellen funktionell auf FMLP antworten können [178], waren möglicherweise die Stimulationsbedingungen nicht optimal gewählt worden.

Das einstündige Priming der Zellen mit IFN- γ wurde durchgeführt, da im physiologischen System stets mehrere Zytokine, Wachstumsfaktoren usw. parallel wirken bzw. sezerniert werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass C5a die LPS-induzierte IL-12-Antwort nur in IFN- γ geprimten Zellen verringert [22]. Es besteht dennoch die Möglichkeit, dass das Priming bei diesem speziellen Stimulationsexperiment die durch FMLP bzw. C3a induzierten Antworten vermindert oder teilweise sogar unterdrückt. Die Stimulation mit C3a ist Teil des

Entzündungsprozesses und gerade hier wird in kurzer Zeit eine Vielzahl von Mediatoren, wie z. B. IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α und IFN- γ freigesetzt. Es kommt zur Akute-Phase-Reaktion, die unter anderem durch Fieber, die Vermehrung peripherer Leukozyten und vor allem durch die erhöhte Synthese von Akute-Phase-Proteinen, wie dem C-reaktiven Protein, charakterisiert ist. Die Akute-Phase-Proteine greifen regulierend in die Immunantwort ein, wirken als Mediatoren und Inhibitoren der Entzündung, sorgen für den Abtransport von Produkten, die während der Entzündung freigesetzt werden und sind an der Wiederherstellung des Gewebes beteiligt.

IFN- γ wird hauptsächlich von aktivierten B- und T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen synthetisiert. Es zeigt antivirale und antiparasitäre Aktivität und wirkt antimitotisch bzw. antiproliferativ auf natürliche und transformierte Zellen. Hauptsächlich wirkt es jedoch als immunmodulatorisches Zytokin: So induziert es synergistisch mit IL-1 und IL-2 die Expression des IL-2-Rezeptors auf T-Lymphozyten und inhibiert das IL-4-induzierte Wachstum von B-Zellen. Ebenso stimuliert es die Sekretion von TNF- α in Monozyten bzw. Makrophagen.

Aus diesen Gründen schien ein Priming der Zellen mit IFN- γ durchaus sinnvoll und die Frage, ob mehr Gene durch C3a (oder FMLP) ohne diese Vorstimulation induziert worden wären, bleibt offen.

Darüber hinaus bleibt zu beachten, dass im Mikroarray lediglich eine steady-state Aufnahme des Transkriptoms einer Zelle zu einem ganz bestimmten Zeitpunkt wiedergegeben wird. Aktivierungsprozesse wie z. B. Phosphorylierungen oder Acetylierungen als auch posttranskriptionelle sowie posttranslationelle Veränderungen werden nicht erfasst.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die unter 3.2.10 aufgeführten Filterkriterien, wie eine bestimmte minimale Signalstärke, zu stringent sind, so dass nur scheinbar keine weiteren Regulationen aufgefunden wurden. Das letzte der sechs Filterkriterien besagt, dass ein Gen nur dann als reguliert zu werten ist, wenn sich ein Faktor $< -1,94$ bzw. $> 1,94$ ergibt. Im C3a-Array sind die Regulationsfaktoren von acht Genen $\leq 2,5$. Gerade im Bereich geringer Intensitäten ist die Schwankungsbreite relativ hoch. Daher besteht die Möglichkeit, dass sich beim Wiederholungsexperiment ein Faktor knapp unterhalb dieser kritischen Grenze ergab und sich die entsprechenden Regulationsvorgänge bei Anwendung der strikten Kriterien der Auffindung entziehen. Das gleiche gilt für den FMLP-Array, dort ergaben sich im zweiten Experiment 14 Gene zu \leq Faktor 2,5 reguliert, die im ersten Array nicht angezeigt wurden. Die Grenzen wurden jedoch bewusst so hoch gesetzt, da in erster Linie starke Veränderungen des Expressionsniveaus von Interesse waren.

Zu unserer Überraschung erwiesen sich bei J774A.1-Zellen auch im LPS-Array relativ wenig Gene als reguliert (29 in Array I, 32 in Array II, davon 8 in beiden). LPS verändert in murinen

Monozyten/Makrophagen die Expression einer Vielzahl von Genen [179;180]. Dieser Befund deutet somit daraufhin, dass die Versuchs-/Stimulationsbedingungen für die Array-Experimente möglicherweise nicht optimal gewählt waren: Eventuell antwortet gerade diese Mauszelllinie nicht besonders stark auf LPS. Bei Cohly *et al.* ist beschrieben, dass die LPS-Antwort in J774A.1-Zellen extrem von den Kultivierungsbedingungen, das heißt dem Medium und der Beschaffenheit der Plastikmaterialien abhängt [181]. Auch der Stimulationszeitraum könnte zu kurz gewählt sein, eventuell hätte man nach 24 Stunden wesentlich stärkere Faktoren erhalten.

Die nach LPS-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle veränderte Expression von acht Genen konnte im Wiederholungsexperiment bestätigt werden. Die LPS-vermittelte Regulation von sieben dieser Gene ist bereits in der Literatur beschrieben: So zeigen das Zytokin IL-6 [182], zwei Mitglieder der Superfamilie von Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptoren [183], der Interleukin-1 Rezeptorantagonist [184], das *small inducible cytokine A3* (MIP-1 α) [185] und A4 (MIP-1 β) [186] sowie der Rezeptor für den *epidermal growth factor* [187] eine Induktion auf.

Um diese Befunde auch statistisch bewerten zu können, wurde Fishers Exakter Test (siehe 3.6.1) herangezogen. Von den ~ 1200 im AtlasTM Mouse 1.2 cDNA Expression Array repräsentierten Genen erwiesen sich nach der Anwendung der ersten fünf Filterkriterien (die Messsignalintensität muss 40 % über dem Hintergrundsignal liegen, die Signalverteilung muss homogen sein, das Signal-Rausch-Verhältnis muss $> 0,2$ sein, die Differenz der Absolutwerte muss mind. 10 sein ... Näheres siehe 3.2.10) nur noch 93 Gene als auswertbar. Für die acht bei beiden Arrays wiederholt induzierten Gene ergab sich daher eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,4803$, dass die gefundenen, reproduzierten Regulationen, die größer einem Faktor von 1,94 waren, möglicherweise nur auf statistische Streuung zurückzuführen sind. Das heißt, es besteht eine 50/50-Chance, ob die gefundenen Veränderungen der Genexpression echt sind oder nicht. Da jedoch eine LPS-abhängige Induktion von sieben dieser acht Gene in der Literatur beschrieben ist, muss davon ausgegangen werden, dass die errechnete statistische Wahrscheinlichkeit hier nicht wirklich aussagekräftig ist.

Die von der GBF vorgeschlagene Vorgehensweise der Anwendung dieser extrem strengen Filterkriterien ist wahrscheinlich von Vorteil wenn nur ein Array durchgeführt wird, aber zu stringent wenn zwei Arrays verglichen werden, da dann nur relativ wenige (hier 10 %) der Gene überhaupt auswertbar sind und sich die restlichen der Betrachtung entziehen.

Auf eine Wiederholung der Array-Auswertung mit „milderen“ Filterkriterien wurde verzichtet, da sich beim C3a-Array sowie dem Vergleich zwischen der Einzelstimulation mit LPS und der Kombinationsstimulation von LPS und C3a überhaupt keine reproduzierbaren Regulationsereignisse ergeben hatten.

Vergleicht man die Ergebnisse des LPS-Arrays mit denen der Kombinationsstimulation mit LPS und FMLP, so ließ sich die veränderte Expression von drei Genen im Wiederholungsexperiment reproduzieren. Da die Faktoren jedoch < 4 waren und das FMLP hier nicht primär interessierte, wurde von einer weiteren Überprüfung dieser Resultate abgesehen.

Da die Array-Experimente an der murinen Zelllinie J774A.1 nicht zu den gewünschten Resultaten führten, wurden für die humanen Arrays mehrere Abwandlungen vorgenommen. Als Hauptstimulans wurde das Anaphylatoxin C5a eingesetzt, von dem im Allgemeinen sowohl mehr Funktionen als auch höhere Antworten beschrieben sind. Bei der Variante 1 wurden primäre humane Monozyten für 24 Stunden mit IFN- γ geprimt und anschließend für weitere 24 Stunden mit C5a, LPS oder der Kombination stimuliert. Hierbei erwiesen sich im C5a-Array nur 13 Gene als reguliert und davon neun $<$ Faktor 3. Bei der Untersuchung der modifizierenden Wirkung von C5a auf die LPS-Antwort war die Expression von 11 Genen verändert, wobei ein einziges $>$ Faktor 3 reguliert war.

Bei dem ersten humanen Array-Experiment wurden die Priming- bzw. Stimulationszeiten relativ lang gewählt, da im murinen System nach einem einstündigen Priming und sechsständiger Stimulation nicht die gewünschten Resultate aufgezeigt werden konnten. Wie oben geschildert, können jedoch auch andere Faktoren dafür verantwortlich sein. Da es sich bei transkriptionellen Veränderungen, die mit der Array-Technologie ausschließlich betrachtet werden können, oftmals um recht schnelle Prozesse handelt, wurden die Priming- und Stimulationszeiten beim zweiten humanen Array-Experiment auf eine bzw. vier Stunden verkürzt. Ein zweiter entscheidender Unterschied war, das beim ersten Experiment die RNA von drei Spendern gepoolt wurde, wohingegen beim zweiten Experiment nur die RNA eines Spenders eingesetzt wurde. Beide Vorgehensweisen sind gut begründbar: Poolt man die RNA mehrerer Spender, so kann man davon ausgehen, dass die erhaltenen Ergebnisse allgemein für die entsprechenden Zellen gültig sind. Es besteht jedoch durchaus die Möglichkeit, dass die verschiedenen Spender unterschiedlich auf die Stimuli antworten, wobei diese Antworten im Pool nivelliert werden. Da das Blut von unbekanntem Spender stammt, kann keine Aussage über Nationalität, Alter und Gesundheitszustand getroffen werden. Es ist durchaus denkbar, dass die Monozyten eines 13-jährigen Jungen vollkommen anders reagieren als die einer 80-jährigen Frau. Die Antworten der Monozyten eines einzigen Spenders sind dann im Pool kaum noch detektierbar. Diese Problematik umgeht man bei dem isolierten Einsatz der RNA nur eines Spenders. Hierbei ist natürlich zu beachten, dass die so gewonnenen Ergebnisse nicht zwangsläufig allgemeine Gültigkeit haben und nachfolgend gezielt an weiteren Spendern überprüft werden müssen.

In jedem Fall zeigten bei der Variante 2 mehr als doppelt soviel Gene ein verändertes Expressionsprofil auf als bei der Variante 1. Man kann somit festhalten, dass die vorgenommenen Veränderungen der Array-Bedingungen einen positiven Effekt erzielt haben.

Die beiden Zytokine IL-6 und IL-8 zeigten ein differierendes Expressionsmuster auf. Die LPS-induzierte Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6 wird durch die zeitgleiche Stimulation mit C5a vermindert. Hingegen war keine Modifikation der LPS-induzierten IL-8-Antwort zu verzeichnen.

IL-6 wird sehr früh im Entzündungsgeschehen von stimulierten Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen sezerniert. Eine Induktion durch die physiologischen Stimuli TNF- α , IL-1 und Endotoxine ist bereits seit längerem bekannt. IL-6 induziert ebenso wie IL-1 die ACTH-Synthese. Die als Antwort darauf gebildeten Glucocorticoide inhibieren wiederum die Produktion von IL-6, IL-1 und TNF- α . Es besteht also eine Art negative Feedback-Schleife zwischen dem Immunsystem und neuroendokrinen Funktionen. Da C5a ebenso wie IL-6 Entzündungen vermittelt, könnte hier ein zusätzlicher negativer Rückkopplungseffekt vorliegen, um eine überschäumende Immunantwort zu verhindern. Eine sehr ähnliche Funktion von C5a konnten Frau Wittmann und Kollegen im Jahre 1999 aufzeigen, so verringert C5a die LPS-induzierte IL-12-Antwort in IFN- γ geprimten Monozyten [22]. In FACS-Analysen konnte eine Abnahme der intrazellulären IL-12-Menge beobachtet werden, diese Reduktion wurde jedoch nicht verzeichnet, wenn das C5a vor dem Priming verabreicht wurde. An diesem Ergebnis ist noch einmal deutlich zu erkennen, dass es trotz aller Anstrengungen extrem schwierig ist, im Vorhinein die „richtigen“ Versuchsparameter festzulegen. In der zitierten Veröffentlichung wurde zwei Stunden mit IFN- γ geprimt, 10 Minuten mit C5a vorstimuliert und anschließend für 24 Stunden mit LPS stimuliert. Hierbei soll nur noch einmal deutlich werden, dass schon eine kleine Abwandlung der Bedingungen zu vollkommen anderen Ergebnissen führen kann.

Für den im Array eingesetzten Spender C sowie die beiden parallel präpariert und stimulierten Spender A und B, konnte die gefundene C5a-Modifikation der LPS-induzierten IL-6-Antwort sowohl im ELISA auf Proteinebene, als auch mittels *real-time* RT-PCR auf mRNA-Ebene bestätigt werden.

Im Gegensatz zu diesen Befunden ist für nicht-parenchymalen Leberzellen (z. B. Kupffer-Zellen) gezeigt, dass C5a die LPS-abhängige Ausschüttung von IL-6 verstärkt [25]. In Gewebshepatozyten, die den C5aR unter normalen Bedingungen nicht exprimieren, kann er durch eine LPS-Gabe induziert werden. Da diese Induktion jedoch nur *de novo* erfolgt und sich in kultivierten Hepatozyten nicht bestätigen lässt, scheint die Hochregulation des C5aR eine Folge der durch die LPS-Stimulation resultierenden IL-6-Produktion in Kupffer-Zellen zu sein [76].

In kultivierten *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) konnte nach C5a-Stimulation eine Runterregulation der IL-6-mRNA beobachtet werden [30]. In unbehandelten PBMCs erwies sich C5a hingegen als potenter Auslöser sowohl der Genexpression, als auch der Protein-Synthese von IL-6 [23]. An diesen Ergebnissen wird deutlich, dass die Wirkung

des anaphylatoxischen Peptides C5a extrem von den zusätzlich vorhandenen Stimuli und der analysierten Zellart abhängt. Bei den von uns gewählten Versuchsbedingungen zeigte C5a alleine keine Wirkung auf die IL-6-Expression in primären humanen Monozyten. Langfristig müssen die Ergebnisse daher im Tiermodell überprüft werden, da bei kultivierten Zellen nie das tatsächliche physiologische Umfeld in seiner vollen Komplexität imitiert werden kann.

Beim zweiten humanen Array-Experiment war weiterhin eine durch C5a-induzierte Hochregulation des *macrophage inflammatory protein-1 α* (MIP-1 α) zu verzeichnen. Auch hier konnte die veränderte Genexpression mittels *real-time* RT-PCR bestätigt werden. Das auch als *small inducible cytokine A3* bezeichnete MIP-1 α gehört zu den CC Chemokinen und spielt eine zentrale Rolle bei der Wirtsantwort auf eindringende bakterielle, virale oder parasitäre Pathogene. Im frühen Stadium solch inflammatorischer Prozesse bewirkt MIP-1 α die Rekrutierung von Neutrophilen, Monozyten, dendritischen Zellen sowie bestimmten Untergruppen der B- und T-Lymphozyten, welche es aktiviert und zur Freisetzung weiterer schützender Mediatoren anregt. Im zweiten Schritt moduliert MIP-1 α das Aktivierungsstadium von Makrophagen und induziert die Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1. Der respiratorische Burst wird aktiviert und die Expression von Integrinen hochreguliert. Somit werden die zum Entzündungsherd gelockten Leukozyten festgehalten und können ins geschädigte Gewebe eindringen. Daneben besitzt MIP-1 α die Fähigkeit Prostaglandin-unabhängig Fieber zu induzieren.

Ein Großteil dieser Funktionen werden auch dem anaphylatoxischen Peptid C5a zugeschrieben. Da C5a in humanen Monozyten/Makrophagen, wie im Array gezeigt, die Expression von MIP-1 α erhöht, könnte es sich hierbei um eine Verstärkung der Immunantwort handeln, um dem Wirt die Möglichkeit zu bieten noch effektiver und schneller auf eindringende Pathogene zu reagieren.

In murinen mikrovaskulären Endothelzellen der Haut konnte gezeigt werden, dass C5a zu einer Erhöhung der LPS-induzierten Hochregulation von MIP-2 führt [69].

Die im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Genexpression des Orphan-Rezeptors HM74 war im Array nur bei kombinierter Stimulation mit LPS zu detektieren. Bei der Verifizierung der Ergebnisse mittels *real-time* RT-PCR konnte eine Induktion des auch als *putative chemokine receptor* bezeichneten HM74 schon durch die alleinige Behandlung der humanen Monozyten mit C5a ermittelt werden. Durch die Doppelstimulation mit LPS wurde diese noch verstärkt. Der HM74 war mittels PCR aus einer cDNA-Bibliothek isoliert worden, bei der die Primer in konservierten Sequenzen der drei verwandten G-Protein gekoppelten Rezeptoren für FMLP, C5a und IL-8 banden [188]. Diese Befunde in Kombination mit der im Array detektierten C5a- und LPS-abhängigen Hochregulation legen den Schluss nahe, dass es sich bei diesem Orphan-Rezeptor wie auch schon der Name „*putative chemokine receptor*“ vermuten lässt um einen Rezeptor handelt, der eine Rolle bei inflammatorischen Prozessen spielt. Eventuell ist

der HM74 ein neuer oder zusätzlicher Rezeptor für eines der unzähligen Zytokine/Chemokine, die das Entzündungsgeschehen beeinflussen.

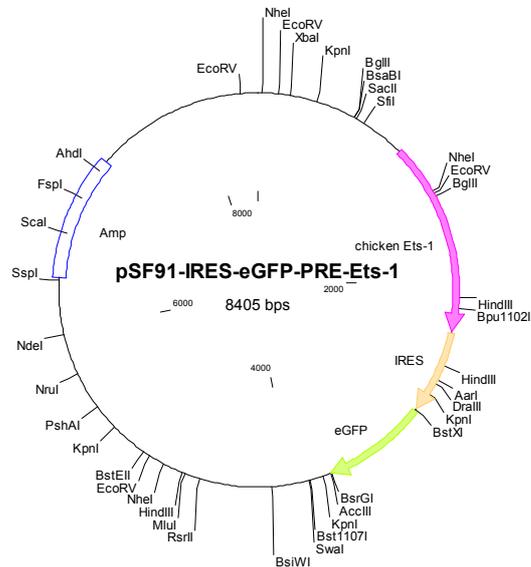
Abschließend lässt sich festhalten, dass mittels der Mikroarray-Technologie drei Gene aufgezeigt werden konnten, deren Expression durch C5a alleine oder in Kombination mit dem bakteriellen Endotoxin LPS verändert wird.

Im Jahre 2002 konnte von Gessner und Kollegen gezeigt werden, dass C5a eine modulierende Funktion bei der Fc γ RI/III-vermittelten Beseitigung von Immunkomplexen zukommt und dass die entsprechenden pathogenen Prozesse nur unterbrochen werden können, wenn die C5aR- und Fc γ RI/III-nachgeschalteten Signalwege parallel wirken [33]. Da auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass C5a bei der Regulation des Zytokins IL-6 und des Orphan-Rezeptors HM74 eine modulierende Funktion zukommt, ist davon auszugehen, dass es sich bei Anaphylatoxin-vermittelten Wirkungen selten um isolierte Antworten handelt, sondern dass sie meist die Funktion anderer Mediatoren beeinflussen.

6 Anhang

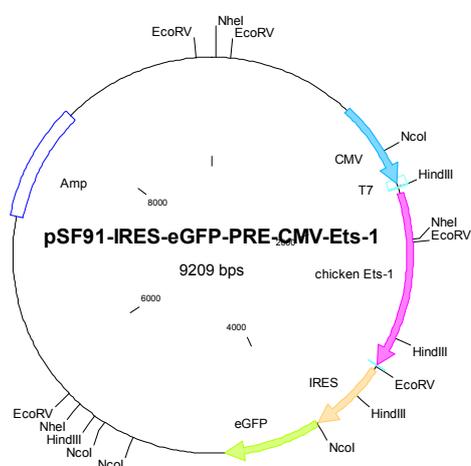
6.1 Generierte Plasmide

pSF91-IRES-eGFP-PRE-Ets-1



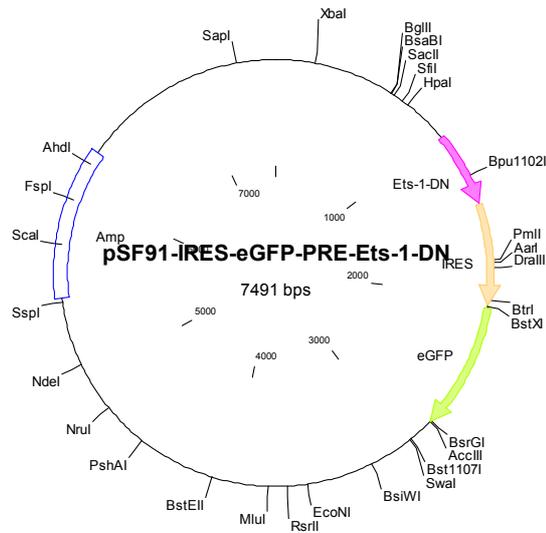
Das Insert chicken Ets-1 wurde mittels Restriktionsverdau (*EcoRI*) aus dem Vektor pcDNA3-Ets-1 herausgeschnitten. Der Vektor pSF91-IRES-eGFP-PRE wurde mit der Restriktionsendonuklease *NotI* verdaut. Anschließend wurden die 5'-Überhänge von Insert und Vektor mittels DNA-Polymerase I, Large Fragment Klenow aufgefüllt. Zur Dephosphorylierung des Vektors wurde die *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIAP) eingesetzt. Das Insert wurde „blunt-end“ in den Vektor ligiert.

pSF91-IRES-eGFP-PRE-CMV-Ets-1



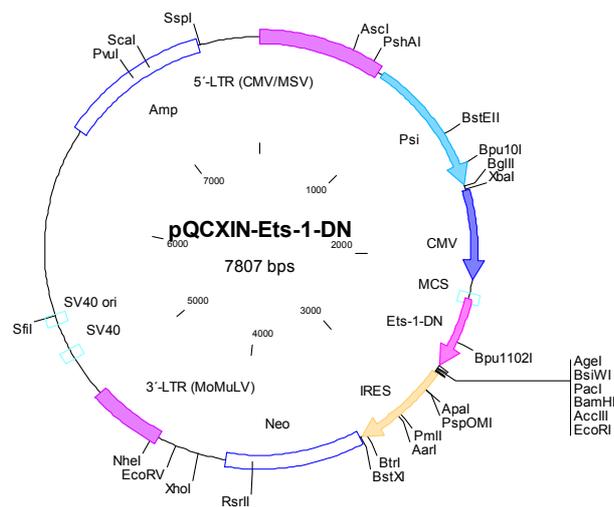
Das Insert CMV-Ets-1 wurde in einem Stück mittels Restriktionsverdau (*MfeI* und *NotI*) aus dem Vektor pcDNA3-Ets-1 herausgeschnitten. Weiteres Vorgehen siehe oben.

pSF91-IRES-eGFP-PRE-Ets-1-DN

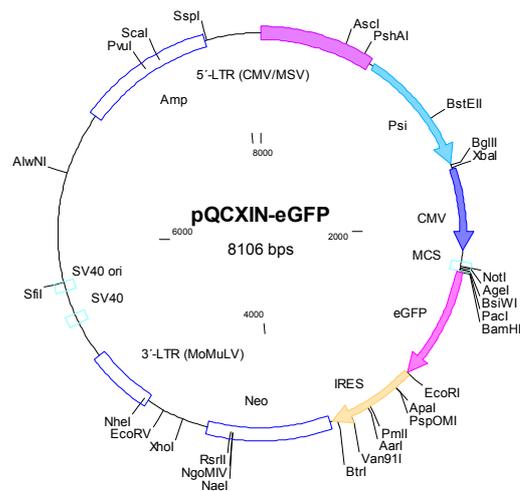


Die Ets-1 Dominant negative Mutante (Ets-1-DN) wurde unter Verwendung der Primer MS29/30 in einer *Pfu*-PCR aus dem Vektor pcDNA3-Ets-1 amplifiziert. Sie kodiert für die Aminosäuren 306 – 441 des Transkriptionsfaktors Ets-1. Das Insert wurde einem Verdau mit dem Restriktionsenzym *NotI* unterzogen. Es folgte eine „sticky-end“-Ligation in den ebenfalls mit *NotI* geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pSF91-IRES-eGFP-PRE.

pQCXIN-Ets-1-DN



Das Insert Ets-1-DN wurde wie zuvor beschrieben generiert. Der mit *NotI* linearisierte RetroX-Vektor pQCXIN wurde mittels CIAP dephosphoryliert. Das Insert wurde „sticky-end“ in den Vektor ligiert.

pQCXIN-eGFP

Das *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) wurde unter Verwendung der Primer JT32/33 in einer *Pfu*-PCR aus dem Vektor pSF91-IRES-eGFP-PRE amplifiziert. Der RetroX-Vektor pQCXIN und das Insert eGFP wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI verdaut. Nach der Dephosphorylierung des Vektors wurde das Insert mittels „sticky-end“-Ligation einkloniert.

6.2 Vollständige Ergebnisse der Array-Experimente

6.2.1 Atlas™ Mouse 1.2 cDNA Expression Array

6.2.1.1 Array I

Genbank	Genname	C3a	LPS	C3a + LPS	FMLP	FMLP + LPS
AA041883	<i>Dynein light chain 1, cytoplasmic (protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase) (PIN)</i>	2,0	-	-	-	-
AF013282	<i>T-box 14</i>	2,2	2,4	2,2	-	2,3
AF020738	<i>fibroblast growth factor 12</i>	-	-	-2,4	-	-2,1
AF033353	<i>ubiquitin-like 1</i>	2,5	2,1	3,1	-	2,2
AF042822	<i>suppression of tumorigenicity 14 (colon carcinoma)</i>	-	-	-2,5	-	-2,3
AF062567	<i>trans-acting transcription factor 3</i>	-	-2,1	-	-	-
AF064071	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>	-	-	-	-	3,2
AF068780	<i>geminin</i>	-	-	-2,0	-	-
D01034	<i>TATA box binding protein</i>	-	-	2,8	-	4,1
D13473	<i>Rad51 homolog (S. cerevisiae)</i>	-	-2,0	-2,3	-	-
D26089	<i>mini chromosome maintenance deficient 4 homolog (S. cerevisiae)</i>	-	-	-	-	-4,4
D83698	<i>BH3 interacting (with BCL2 family) domain, apoptosis agonist</i>	-	-	5,3	-	-
D86725	<i>mini chromosome maintenance deficient 2 (S. cerevisiae)</i>	-	-	-3,0	-	-2,0
J02870	<i>laminin receptor 1 (67kD, ribosomal protein SA)</i>	-	-2,1	-2,9	-	-2,1
J03168	<i>interferon regulatory factor 2</i>	-	-	-4,6	-	-2,-
J03752	<i>GLUTATHIONE S-TRANSFERASE, MICROSOMAL (EC 2.5.1.18)</i>	-	-2,0	-2,2	-	-3,5
J05261	<i>protective protein for beta-galactosidase</i>	-	-	-	-	-2,1

K01700	<i>transformation related protein 53</i>	-	-	-2,6	-	-3,-
L01640	<i>cyclin-dependent kinase 4</i>	-	-	-2,0	-	-
L10656	<i>v-abl Abelson murine leukemia oncogene 1</i>	-	-	-2,1	-	-2,2
L12140	<i>amino-terminal enhancer of split</i>	-	-	-2,4	-	-2,3
L20048	<i>interleukin 2 receptor, gamma chain</i>	-	-	-	-2,2	-
L21671	<i>epidermal growth factor receptor pathway substrate 8</i>	-	-2,5	-2,4	-	-2,1
L21973	<i>E2F transcription factor 1</i>	-	-2,4	-2,5	-	-2,2
L22472	<i>Bcl2-associated X protein</i>	2,3	2,3	-	-	3,1
L28095	<i>caspase 1</i>	-	-	-	-	10,5
L47240	<i>avian erythroblastosis oncogene B 3</i>	-	-	3,3	-	2,6
M15131	<i>interleukin 1 beta</i>	-	7,8	-	-	7,4
M16465	<i>calcium binding protein A11 (calgizzarin)</i>	-	-	-	-	-2,-
M28233	<i>interferon gamma receptor</i>	-	-	2,3	-	-
M32240	<i>peripheral myelin protein, 22 kDa</i>	2,0	-	-	-	2,3
M34476	<i>retinoic acid receptor, gamma</i>	-	-	2,3	-	2,1
M34815	<i>small inducible cytokine B subfamily (Cys-X-Cys), member 9</i>	-	-	-	-	3,6
M35590	<i>small inducible cytokine A4</i>	-	3,8	2,3	-	-
M36829	<i>heat shock protein, 84 kDa 1</i>	-	-	-2,1	-	-2,2
M59378	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b</i>	-	2,3	2,1	-	-
M63801	<i>gap junction membrane channel protein alpha 1</i>	-	-	-	-	11,4
M74294	<i>interleukin 1 receptor antagonist</i>	-	1,-7	11,3	-	13,7
M83312	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5</i>	-	2,8	3,8	-	2,5
M84817	<i>retinoid X receptor alpha</i>	-	-	-3,3	-	-2,9
M88127	<i>adenomatous polyposis coli</i>	-	-	-2,2	-	-
M91236	<i>gap junction membrane channel protein beta 5</i>	2,8	3,4	2,9	-	3,-
M94087	<i>activating transcription factor 4</i>	-	-	-	-	2,2
M94335	<i>thymoma viral proto-oncogene</i>	2,6	2,0	-	-	-
S76657	<i>activating transcription factor 2</i>	-	-	-2,9	-	-2,5
S78355	<i>cyclin D1</i>	-	-	-2,0	-	-
U02079	<i>nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 2</i>	2,9	-	-	-	-
U04807	<i>FMS-like tyrosine kinase 3 ligand</i>	2,4	-	-	-	-
U06924	<i>signal transducer and activator of transcription 1</i>	-	-	-2,4	-	-2,5
U10115	<i>dishevelled, dsh homolog (Drosophila)</i>	-	-	-	-	-2,2
U10903	<i>programmed cell death 2</i>	2,2	-	2,0	-	3,1
U14173	<i>Sloan-Kettering viral oncogene homolog</i>	-	-	-	-	-2,4
U15784	<i>src homology 2 domain-containing transforming protein C1</i>	-	-	-2,8	-	-
U17162	<i>BAG-1; bcl-2 binding protein with anti-cell death activity</i>	2,8	2,2	2,1	-	3,0
U19118	<i>activating transcription factor 3</i>	-	-	-	-	3,2
U19597	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)</i>	-	-	-2,1	-	-
U21050	<i>Tnf receptor-associated factor 3</i>	4,2	3,3	4,5	-	5,0
U25995	<i>receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1</i>	3,3	3,7	3,1	-	3,6
U29539	<i>lysosomal-associated protein transmembrane 5</i>	-	-	-	-	-2,8
U30823	<i>myocyte enhancer factor 2A</i>	-	-	-	-	2,5
U34259	<i>lysosomal-associated protein transmembrane 4A</i>	-	-	-2,1	-	-4,0
U36277	<i>nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>	-	-	2,2	-	2,5
U39643	<i>Fas-associated factor 1</i>	4,1	3,7	3,-	-	3,1
U41751	<i>etoposide induced 2.4 mRNA</i>	-	-	-	-	-2,3
U43788	<i>POU domain, class 2, associating factor 1</i>	-	-	-	2,-	-
U45977	<i>stromal cell derived factor 4</i>	-	-4,6	-3,8	-	-
U52826	<i>syndecan 3</i>	-	-	-	-	-2,4
U57324	<i>presenilin 2</i>	-	-	-	-	2,2
U59463	<i>caspase 11</i>	-	-	-	-	4,8
U73037	<i>interferon regulatory factor 7</i>	-	-	-	-	4,1
U75506	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>	3,0	-	-	-	-
X02165	<i>neurofilament, light polypeptide</i>	-	-	-	-	-5,0
X02389	<i>plasminogen activator, urokinase</i>	-	-2,2	-2,8	-	-3,5
X04648	<i>Fc receptor, IgG, low affinity IIb</i>	2,4	-	-	-	2,5
X05010	<i>colony stimulating factor 1 (macrophage)</i>	-	-	-	-	2,1

X05211	<i>laminin, gamma 1</i>	-	-	-	-	-2,0
X06086	<i>cathepsin L</i>	-	-2,3	-2,1	-	-
X06115	<i>cadherin 1</i>	-	-	-	-	-2,7
X06203	<i>interleukin 6</i>	-	16,6	10,8	-	11,5
X07640	<i>integrin alpha M</i>	-	-	-2,8	-	-
X12531	<i>small inducible cytokine A3</i>	-	6,8	8,2	-	9,1
X14951	<i>integrin beta 2</i>	-	-	-2,3	-	-3,8
X53798	<i>small inducible cytokine subfamily, member 2</i>	-	-	-	-	6,6
X57277	<i>RAS-related C3 botulinum substrate 1</i>	-	-	-	2,7	2,1
X57796	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a</i>	-	-	-4,8	-	-4,0
X59990	<i>catenin alpha 1</i>	-	-	-2,3	-	-2,3
X61399	<i>MARCKS-like protein</i>	-	2,0	-	-	-
X61434	<i>protein kinase, cAMP dependent, catalytic, beta</i>	-	-	-2,7	-	-
X61800	<i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta</i>	-	-	-	-	-2,3
X76850	<i>MAP kinase-activated protein kinase 2</i>	-	-	-	-	2,-
X80332	<i>RAB20, member RAS oncogene family</i>	-	-	-	-	2,-
X81464	<i>translin</i>	-	-	-	-	-2,1
X81582	<i>insulin-like growth factor binding protein 4</i>	-	-	-8,2	-	-8,5
X84311	<i>cyclin A1</i>	-	-	-2,6	-	-3,1
X96618	<i>recombination activating gene 1 gene activation</i>	-	-	-	-	-2,0
X99063	<i>zyxin</i>	-	-	-3,8	-	-2,4
Y13231	<i>BCL2-antagonist/killer 1</i>	2,9	2,1	-	-	-
Y15163	<i>Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2</i>	-	-	-	-	2,0
Z21848	<i>DNA polymerase delta 1, catalytic domain</i>	-	-2,5	-3,7	-	-2,6
Z47766	<i>cyclin F</i>	-	-2,1	-2,3	-	-

6.2.1.2 Array II

Genbank	Gennamen	C3a	LPS	C3a + LPS	FMLP	FMLP + LPS
AA000715	<i>S100 calcium-binding protein A1; S-100 protein alpha chain</i>	-3,0	-2,3	-2,5	-3,0	-
AF013281	<i>eomesodermin homolog (Xenopus laevis)</i>	28,8	-	-	-	-
AF017085	<i>general transcription factor II I</i>	-	-2,0	-	-	-
AF020738	<i>fibroblast growth factor 12</i>	-	-	-	-	2,2
AF042822	<i>suppression of tumorigenicity 14 (colon carcinoma)</i>	-	-	-2,0	-	-
AF068780	<i>geminin</i>	-	-3,0	-4,1	-	-
AJ002636	<i>stromal antigen 2</i>	-	-2,1	-	-	-
D13458	<i>prostaglandin E receptor EP4 subtype</i>	-	-	-	-	2,3
D26089	<i>mini chromosome maintenance deficient 4 homolog (S. cerevisiae)</i>	-	-	-	3,0	-
D31942	<i>oncostatin M</i>	-	-	-	-	37,4
D86726	<i>mini chromosome maintenance deficient 6 (S. cerevisiae)</i>	6,5	-	-	-	-
K01700	<i>transformation related protein 53</i>	-	-	2,8	2,7	-
L02526	<i>mitogen activated protein kinase kinase 1</i>	-	-	-	-	2,-
L05630	<i>C5A receptor</i>	-	2,3	2,7	2,0	2,3
L07918	<i>rho, GDP dissociation inhibitor (GDI) beta</i>	-	-	-2,3	-	-
L13968	<i>YY1 transcription factor</i>	-	-4,3	-2,5	-4,3	-4,4
L20048	<i>interleukin 2 receptor, gamma chain</i>	-	-2,2	-	-	-
L21671	<i>epidermal growth factor receptor pathway substrate 8</i>	-	-2,6	-	-	-
L25606	<i>CD86 antigen</i>	-	-	-	-	2,8
L28177	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha</i>	-	-2,4	-51,6	-2,1	-
L40406	<i>heat shock protein, 105 kDa</i>	-	-	-	2,5	3,5
M12056	<i>lymphocyte protein tyrosine kinase</i>	-	-	-	-	2,8
M13071	<i>raf-related oncogene</i>	-	-	2,-	-	2,3
M13945	<i>proviral integration site 1</i>	-	-	-	-	2,1
M13963	<i>guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting 2</i>	-	-	2,0	-	2,2

M14222	<i>cathepsin B</i>	-	-2,1	-	-	-
M15131	<i>interleukin 1 beta</i>	-	-	5,9	-	-
M27129	<i>CD44 antigen</i>	-	-	2,2	1,9	2,2
M32240	<i>peripheral myelin protein, 22 kDa</i>	-	-	-	-	25,8
M34510	<i>CD14 antigen</i>	-	2,3	2,8	-	2,3
M34815	<i>small inducible cytokine B subfamily (Cys-X-Cys), member 9</i>	-	-	2,3	-	-
M35590	<i>small inducible cytokine A4</i>	-	3,8	4,8	-	5,1
M58288	<i>colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)</i>	-	-	-	-	2,5
M59378	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b</i>	-	2,2	2,8	-	-
M60651	<i>phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1 (p85 alpha)</i>	-	-	-	-	14,-
M60778	<i>integrin alpha L</i>	-	-	-	-	2,2
M60909	<i>retinoic acid receptor, alpha</i>	-	-	9,8	4,5	4,9
M61909	<i>avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene homolog A</i>	-	-	-	2,1	-
M64292	<i>B-cell translocation gene 2, anti-proliferative</i>	-	-	-	-	2,4
M72414	<i>microtubule-associated protein 4</i>	-	-	3,5	2,5	2,4
M74294	<i>interleukin 1 receptor antagonist</i>	-	7,7	6,9	-	7,4
M83312	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5</i>	-	2,1	-	-	2,4
M83649	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6</i>	-	-	2,1	-	-
M83749	<i>cyclin D2</i>	-	-	-	-	-2,7
M87039	<i>nitric oxide synthase 2, inducible, macrophage</i>	-	-	13,3	-	-
M95106	<i>cAMP responsive element binding protein 1</i>	-	-2,3	-	-	-
M98547	<i>receptor-like tyrosine kinase</i>	-	-	-	2,5	-
S71251	<i>small inducible cytokine A7</i>	-	-	-	-	3,1
S71659	<i>LIM homeobox protein 4</i>	-	-	-	-	45,2
S72408	<i>avian sarcoma virus CT10 (v-crkl) oncogene homolog</i>	-	-	-	-	2,1
S76657	<i>activating transcription factor 2</i>	-	-	-	-	2,3
U04443	<i>myosin light chain, alkali, nonmuscle</i>	-	-2,0	-	-	-
U05671	<i>adenosine A1 receptor</i>	524,7	-	-	-	-
U19119	<i>interferon inducible protein 1</i>	-	-	-2,2	-	-
U19596	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)</i>	-	-	-	2,0	-
U19799	<i>nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, beta</i>	-	2,3	3,0	-	2,9
U25685	<i>spleen tyrosine kinase</i>	-	-	2,0	-	-
U27323	<i>cell division cycle 25 homolog A (S. cerevisiae)</i>	-	-	-2,0	-	-
U36760	<i>forkhead box G1</i>	-	-	-	6,0	-
U41751	<i>etoposide induced 2.4 mRNA</i>	-	-	-	2,3	-
U43187	<i>mitogen activated protein kinase kinase kinase 3</i>	-	-	-	-	-2,4
U43512	<i>dystroglycan 1</i>	-	-2,2	-	-	-
U44088	<i>T-cell death associated gene</i>	-	29,0	-	-	-
U45977	<i>stromal cell derived factor 4</i>	-	-	-	-	2,5
U47543	<i>Ngfi-A binding protein 2</i>	-	-2,9	-2,1	-	-
U52951	<i>enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)</i>	-	-2,-	-2,6	-	-2,0
U60530	<i>MAD homolog 2 (Drosophila)</i>	-	-	-	-	6,7
U69270	<i>LIM domain binding 1</i>	-	-	-	2,0	-
U70674	<i>numb gene homolog (Drosophila)</i>	-	-	-	-	2,4
U73037	<i>interferon regulatory factor 7</i>	-	-	-	-	4,1
U78103	<i>embryonic ectoderm development</i>	-	-2,-	-2,3	-	-
X05211	<i>laminin, gamma 1</i>	-	-	2,0	-	2,6
X06203	<i>interleukin 6</i>	-	28,3	28,4	-	44,7
X12531	<i>small inducible cytokine A3</i>	-	6,3	5,8	-	8,8
X52264	<i>intercellular adhesion molecule</i>	-	-	-	-	2,5
X53068	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>	-	-	-	2,6	-
X58876	<i>transformed mouse 3T3 cell double minute 2</i>	-	-	-	-	2,-
X61399	<i>MARCKS-like protein</i>	-	2,-	2,1	-	-
X61800	<i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta</i>	2,1	2,3	2,4	3,0	2,7
X64713	<i>cyclin B1, related sequence 1</i>	-	-	2,0	2,2	-
X66032	<i>cyclin B2</i>	-	-2,0	-	-	-

X66323	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5</i>	-	-	-2,7	-2,4	-
X67056	<i>glycine transporter 1</i>	-	-	-	-	2,6
X70472	<i>myeloblastosis oncogene-like 2</i>	-	-	-	-	-2,1
X75888	<i>cyclin E1</i>	-	-2,5	-4,6	-	-6,7
X77113	<i>growth differentiation factor 9</i>	-	-	19,6	-	-
X84311	<i>cyclin A1</i>	-	3,7	4,6	5,5	3,8
X96859	<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2B (RAD6 homology)</i>	-	-2,1	-	-	-2,5
Y00487	<i>hemopoietic cell kinase</i>	-	-	-	6,9	-
Y13231	<i>BCL2-antagonist/killer 1</i>	-	-	-	2,0	-
Z21524	<i>hematopoietically expressed homeobox</i>	-	-2,3	-1,9	-	-
Z26580	<i>cyclin A2</i>	-	-	-	-	-2,2
Z31663	<i>activin A receptor, type 1B</i>	-	-	-	-8,9	-

6.2.2 Atlas™ Human 1.2 cDNA Expression Array

6.2.2.1 Experiment 1

Genbank	Genname	C5a	LPS	C5a+LPS
AB008775	<i>aquaporin 9</i>	-	3,2	2,7
AF020192	<i>cytochrome P450, subfamily XXVIIIB (25-hydroxyvitamin D-1-alpha-hydroxylase), polypeptide 1</i>	-	7,7	7,3
AF040105	<i>putative c-Myc-responsive</i>	-	-2,5	-2,2
AF051334	<i>Nijmegen breakage syndrome 1 (nibrin)</i>	-	3,6	3,5
AF055377	<i>v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma (avian) oncogene homolog</i>	-2,1	-25,6	-13,8
AF060222	<i>deoxyribonuclease II, lysosomal</i>	-	-2,4	-2,0
AF071596	<i>immediate early response 3</i>	-	5,4	5,7
AF078078	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma</i>	-	-	2,0
AF084199	<i>PR domain containing 1, with ZNF domain</i>	-	2,7	2,6
AJ000512	<i>serum/glucocorticoid regulated kinase</i>	-	-3,3	-3,2
D10923	<i>putative chemokine receptor; GTP-binding protein</i>	-	-37,0	-4,8
D14497	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8</i>	-2,0	-	-
D14520	<i>Kruppel-like factor 5 (intestinal)</i>	-	-	2,0
D15050	<i>transcription factor 8 (represses interleukin 2 expression)</i>	-	-	2,2
D26512	<i>matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)</i>	-	2,6	2,7
D29013	<i>polymerase (DNA directed), beta</i>	-	-	-2,0
D38305	<i>transducer of ERBB2, 1</i>	-	-2,1	-
D38595	<i>inter-alpha (globulin) inhibitor H4 (plasma Kallikrein-sensitive glycoprotein)</i>	-	62,5	42,5
D50405	<i>histone deacetylase 1</i>	-	-2,4	-
J02703	<i>integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)</i>	-	-	2,1
J03746	<i>microsomal glutathione S-transferase 1</i>	-	2,3	2,7
J04130	<i>small inducible cytokine A4 (homologous to mouse Mip-1b)</i>	-	23,8	16,4
J04145	<i>integrin, alpha M (complement component receptor 3, alpha; also known as CD11b (p170), macrophage antigen alpha polypeptide)</i>	-	-2,1	-2,6
L06895	<i>MAX dimerization protein</i>	-	-	2,8
L07597	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kD, polypeptide 1</i>	-	-3,0	-2,0
L08096	<i>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 7</i>	-	40,5	29,1
L08187	<i>Epstein-Barr virus induced gene 3</i>	-	76,9	59,5
L13738	<i>activated p21cdc42Hs kinase</i>	-	2,0	-
L14778	<i>protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, alpha isoform (calcineurin A alpha)</i>	-	-	-2,4
L16464	<i>ets variant gene 3</i>	-	3,0	-
L19185	<i>peroxiredoxin 2</i>	-	-2,1	-2,5
L19871	<i>activating transcription factor 3</i>	-	2,0	2,2
L20422	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide</i>	-	2,1	2,2

L23959	<i>transcription factor Dp-1</i>	4,6	7,4	8,4
L25124	<i>prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)</i>	-	6,2	8,0
L25259	<i>CD86 antigen (CD28 antigen ligand 2, B7-2 antigen)</i>	-	-	2,5
L34587	<i>transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 1 (15kD, elongin C)</i>	-	-	-2,0
L36151	<i>phosphatidylinositol 4-kinase, catalytic, alpha polypeptide</i>	-	-	-2,0
L36645	<i>formyl peptide receptor-like 1</i>	-	-3,2	-
L41816	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase I</i>	-	-2,4	-2,7
L41939	<i>EphB2</i>	-	15,6	-
M11717	<i>heat shock 70kD protein 1A</i>	-	5,5	4,1
M13194	<i>excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)</i>	-	-2,5	-2,6
M15800	<i>mal, T-cell differentiation protein</i>	-	2,7	-
M15990	<i>v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1</i>	-2,8	-	-
M19722	<i>Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog</i>	-	-3,6	-2,6
M19922	<i>fructose-1,6-bisphosphatase 1</i>	-	-6,3	-5,2
M21121	<i>small inducible cytokine A5 (RANTES)</i>	-	29,6	23,9
M22199	<i>protein kinase C alpha polypeptide (PKC-alpha; PKCA)</i>	-	-	-4,5
M23410	<i>junction plakoglobin</i>	-	6,8	3,2
M23452	<i>small inducible cytokine A3 (homologous to mouse Mip-1a)</i>	-	62,3	34,8
M24545	<i>small inducible cytokine A2 (monocyte chemotactic protein 1, homologous to mouse Sig-je)</i>	-	-2,1	-
M26679	<i>homeo box A5</i>	3,2	-	-
M29696	<i>interleukin 7 receptor</i>	-	-	21,6
M31165	<i>tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6</i>	-	48,4	43,0
M32977	<i>vascular endothelial growth factor</i>	-	3,1	4,4
M34065	<i>cell division cycle 25C</i>	-27,3	-31,0	-33,4
M34181	<i>protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, beta</i>	-	-3,6	-2,7
M35663	<i>protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent</i>	-	4,1	3,6
M36430	<i>guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1</i>	-	3,4	2,1
M37722	<i>fibroblast growth factor receptor 1 (fms-related tyrosine kinase 2, Pfeiffer syndrome)</i>	-	-3,1	-2,8
M57502	<i>small inducible cytokine A1 (I-309, homologous to mouse Tca-3)</i>	-	52,3	105,8
M59911	<i>integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)</i>	-	-2,6	-2,2
M60119	<i>human immunodeficiency virus type I enhancer-binding protein 2</i>	-	-	2,2
M60974	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha</i>	-	-	2,9
M62829	<i>early growth response 1</i>	-	-2,6	-2,8
M63960	<i>protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform</i>	-	-	-2,0
M67454	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6</i>	-	34,1	33,2
M73780	<i>integrin, beta 8</i>	35,9	201,9	232,2
M74816	<i>clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testosterone-repressed prostate message 2, apolipoprotein J)</i>	-	4,9	3,9
M77234	<i>ribosomal protein S3A</i>	-	-2,1	-2,2
M80397	<i>polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit (125kD)</i>	-	-2,7	-2,0
M81830	<i>somatostatin receptor 2</i>	-	4,7	4,9
M93255	<i>Friend leukemia virus integration 1</i>	-	-2,7	-2,2
M95678	<i>phospholipase C, beta 2</i>	-	-2,7	-2,3
M97935	<i>signal transducer and activator of transcription 1, 91kD</i>	-	-	-2,2
S75989	<i>solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 11</i>	289,8	-	-
U02687	<i>fms-related tyrosine kinase 3</i>	-	-	-2,4
U03688	<i>cytochrome P450, subfamily I (dioxin-inducible), polypeptide 1 (glaucoma 3, primary infantile)</i>	-	-	2,1
U14417	<i>ral guanine nucleotide dissociation stimulator</i>	-	-2,6	-2,3
U22431	<i>hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)</i>	-	-	2,3

U24152	<i>p21/Cdc42/Rac1-activated kinase 1 (yeast Ste20-related)</i>	-	-	-2,1
U29607	<i>methionine aminopeptidase; eIF-2-associated p67</i>	2,4	2,1	-
U38178	<i>phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited</i>	2,0	8,1	8,2
U45878	<i>baculoviral IAP repeat-containing 3</i>	-	3,7	4,4
U57059	<i>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10</i>	-	3,6	3,0
U66838	<i>cyclin A1</i>	-2,2	2,2	-
U71364	<i>serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9</i>	-	3,2	3,5
U73036	<i>interferon regulatory factor 7</i>	-	6,0	4,5
U78876	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3</i>	-	-2,9	-2,7
U86453	<i>phosphoinositide-3-kinase, catalytic, delta polypeptide</i>	-2,3	-	-2,0
V00568	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>	-	-2,8	-2,6
X01060	<i>transferrin receptor (p90, CD71)</i>	-	-2,2	-
X01394	<i>tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)</i>	-	4,0	2,8
X02530	<i>small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 10</i>	-	3,8	2,4
X03663	<i>colony stimulating factor 1 receptor, formerly McDonough feline sarcoma viral (v-fms) oncogene homolog</i>	-	-5,4	-3,3
X04602	<i>interleukin 6 (interferon, beta 2)</i>	-	5,7	5,6
X06233	<i>S100 calcium-binding protein A9 (calgranulin B)</i>	-	-2,9	-
X06234	<i>S100 calcium-binding protein A8 (calgranulin A)</i>	-	-4,5	-
X06256	<i>integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)</i>	-	-	2,0
X06318	<i>protein kinase C, beta 1</i>	-	-10,8	-2,8
X07819	<i>matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)</i>	2,3	2,5	3,7
X15218	<i>v-ski avian sarcoma viral oncogene homolog</i>	-	-2,5	-
X17620	<i>non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in</i>	-	-2,3	-2,1
X53799	<i>GRO2 oncogene</i>	-	1,9	2,1
X59770	<i>interleukin 1 receptor, type II</i>	-	-3,3	-
X60188	<i>extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1); insulin-stimulated MAP2 kinase; MAP kinase 1 (MAPK 1); p44-MAPK; microtubule-associated protein-2 kinase</i>	-	-2,3	-2,1
X66087	<i>v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 1</i>	-2,1	-	-2,5
X66364	<i>cyclin-dependent kinase 5</i>	-	-2,0	-2,0
X70326	<i>macrophage myristoylated alanine-rich C kinase substrate</i>	-	-	36,6
X74295	<i>integrin, alpha 7</i>	-	-	-2,0
X75042	<i>v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog</i>	-	2,0	2,0
X75342	<i>SHB adaptor protein (a Src homology 2 protein)</i>	-	-3,3	-4,0
X75621	<i>tuberous sclerosis 2</i>	-	-	-1,9
X78710	<i>metal-regulatory transcription factor 1</i>	-	-	2,1
X85106	<i>ribosomal protein S6 kinase, 90kD, polypeptide 2</i>	-	-2,3	-2,3
X87212	<i>cathepsin C</i>	-	-2,4	-2,5
X87838	<i>catenin (cadherin-associated protein), beta 1 (88kD)</i>	-	2,3	2,9
Y00285	<i>insulin-like growth factor 2 receptor</i>	-	-2,5	-2,8
Y00787	<i>interleukin 8</i>	-	5,4	4,5
Z36715	<i>ELK3, ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)</i>	-	-4,2	-

6.2.2.2 Experiment 2

Genbank	Genname	C5a	LPS	C5a+LPS
AB008775	<i>aquaporin 9</i>	-	3,0	6,5
AF020192	<i>cytochrome P45-, subfamily XXVIIIB (25-hydroxyvitamin D-1-alpha-hydroxylase), polypeptide 1</i>	-	8,7	7,6
AF035606	<i>programmed cell death 6</i>	-	-3,3	-3,4
AF040105	<i>putative c-Myc-responsive</i>	-	-2,0	-
AF051334	<i>Nijmegen breakage syndrome 1 (nibrin)</i>	-	4,6	6,0
AF051782	<i>diaphanous (Drosophila, homolog) 1</i>	-	-2,7	-
AF055377	<i>v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma (avian) oncogene homolog</i>	-	-26,6	-1697,8
AF060222	<i>deoxyribonuclease II, lysosomal</i>	-	-4,1	-3,3
AF068920	<i>soc-2 (suppressor of clear, C.elegans) homolog</i>	-	-2,6	-
AF069736	<i>PCAF associated factor 65 beta</i>	-	-2,5	-

AF071596	<i>immediate early response 3</i>	-	25,7	17,9
AF072825	<i>RAF RESPONSIVE ZINC FINGER PROTEIN (FRAGMENT).</i>	-	-8,4	-7,2
AF076974	<i>transformation/transcription domain-associated protein</i>	-	-2,0	-2,0
AF078078	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma</i>	-	-3,1	-3,1
AF084199	<i>PR domain containing 1, with ZNF domain</i>	-	-2,7	-
AJ000512	<i>serum/glucocorticoid regulated kinase</i>	-	-8,3	-9,7
D00726	<i>ferrochelataze (protoporphyrin)</i>	-2,1	-2,0	-4,2
D10202	<i>platelet-activating factor receptor</i>	-	-2,9	-2,0
D10232	<i>renin-binding protein</i>	-	-5,4	-2,6
D10923	<i>putative chemokine receptor; GTP-binding protein</i>	-	-	14,1
D10924	<i>chemokine (C-X-C motif), receptor 4 (fusin)</i>	-3,1	-	-
D10925	<i>chemokine (C-C motif) receptor 1</i>	-	-4,1	-
D11086	<i>interleukin 2 receptor, gamma (severe combined immunodeficiency)</i>	-	-2,9	-2,0
D13318	<i>GA-binding protein transcription factor, alpha subunit (6-kD)</i>	-	-2,9	-
D14497	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8</i>	-	3,5	3,5
D14520	<i>Kruppel-like factor 5 (intestinal)</i>	-	6,3	6,4
D21090	<i>RAD23 (S. cerevisiae) homolog B</i>	-	-2,5	-2,3
D21235	<i>RAD23 (S. cerevisiae) homolog A</i>	-	-2,0	-2,3
D21878	<i>bone marrow stromal cell antigen 1</i>	-	-2,2	-
D26121	<i>ZFMI protein alternatively spliced product</i>	-	-2,1	-
D26309	<i>LIM domain kinase 1</i>	-	-2,4	-2,0
D28468	<i>DNA-binding protein TAXREB3-2; albumin D box-binding protein (DBP)</i>	-	-5,4	-3,8
D29013	<i>polymerase (DNA directed), beta</i>	-	-	-6,4
D43642	<i>transcription factor-like 1</i>	-	-	-6,1
D84476	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5</i>	-	-2,0	-2,3
D90209	<i>activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67)</i>	-	-	2,2
J03075	<i>protein kinase C substrate 8-K-H</i>	-	-2,2	-2,5
J03132	<i>intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor</i>	-	4,1	4,5
J03133	<i>Sp1 transcription factor</i>	-	-4,4	-3,2
J03634	<i>inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide)</i>	-	30,8	51,5
J03746	<i>microsomal glutathione S-transferase 1</i>	-	-2,7	-2,6
J04102	<i>v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2</i>	-	4,1	8,0
J04111	<i>v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog</i>	-	-2,9	-2,2
J04130	<i>small inducible cytokine A4 (homologous to mouse Mip-1b)</i>	-	233,4	144,2
J04145	<i>integrin, alpha M (complement component receptor 3, alpha; also known as CD11b (p17-), macrophage antigen alpha polypeptide)</i>	-	-27,3	-30,7
J04536	<i>sialophorin (gpL115, leukosialin, CD43)</i>	-	-2,1	-
J05593	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase 2</i>	-	-2,9	-2,9
K00558	<i>tubulin, alpha, ubiquitous</i>	-	-2,3	-3,2
K02770	<i>interleukin 1, beta</i>	-	4,3	2,9
K03515	<i>glucose phosphate isomerase</i>	-	-2,0	-1,9
L04282	<i>zinc finger protein 148 (pHZ-52)</i>	-3,6	-4,2	-4,2
L05624	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>	-	-2,1	-
L07414	<i>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 5 (hyper-IgM syndrome)</i>	-	2,9	3,9
L08807	<i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11</i>	-	-4,2	-2,2
L12002	<i>integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)</i>	-	-2,3	-
L13738	<i>activated p21cdc42Hs kinase</i>	-	-7,2	-
L14595	<i>solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4</i>	-	-2,5	-3,3
L16785	<i>non-metastatic cells 2, protein (NM23B) expressed in</i>	-	-2,3	-
L19067	<i>v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3 (p65))</i>	-	2,7	3,1
L20046	<i>excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5 (xeroderma pigmentosum, complementation group G (Cockayne syndrome))</i>	-	-6,2	-3,4
L22075	<i>guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 13</i>	-	-21,1	-3,5
L25124	<i>prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)</i>	-	23,8	16,3
L25259	<i>CD86 antigen (CD28 antigen ligand 2, B7-2 antigen)</i>	-	-	2,1

L33264	<i>cyclin-dependent kinase (CDC2-like) 1-</i>	-	-4,5	-2,8
L33801	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>	-	-3,2	-
L35253	<i>mitogen-activated protein kinase 14</i>	-	-2,8	-2,2
L36151	<i>phosphatidylinositol 4-kinase, catalytic, alpha polypeptide</i>	-	-2,8	-3,6
L36719	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 3</i>	2,1	2,5	4,1
L41816	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase I</i>	-	-3,3	-5,0
M11233	<i>cathepsin D (lysosomal aspartyl protease)</i>	-	-2,1	-2,2
M13194	<i>excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)</i>	-	-2,4	-2,4
M13267	<i>cytosolic superoxide dismutase 1 (SOD1)</i>	-	-2,0	-2,3
M14200	<i>diazepam binding inhibitor (GABA receptor modulator, acyl-Coenzyme A binding protein)</i>	-	-2,0	-
M14631	<i>guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha stimulating activity polypeptide 1</i>	-	-2,1	-2,1
M14745	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>	-	32,3	22,3
M15796	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>	-	-10,9	-12,4
M15800	<i>mal, T-cell differentiation protein</i>	7,4	28,0	39,8
M19154	<i>transforming growth factor, beta 2</i>	-	60,9	41,3
M19922	<i>fructose-1,6-bisphosphatase 1</i>	-	-2,1	-2,0
M21121	<i>small inducible cytokine A5 (RANTES)</i>	-	2,3	-
M22488	<i>bone morphogenetic protein 1</i>	-	3,2	2,7
M23452	<i>small inducible cytokine A3 (homologous to mouse Mip-1a)</i>	11,9	323,7	370,2
M23619	<i>high-mobility group (nonhistone chromosomal) protein isoforms I and Y</i>	-	-3,0	-2,1
M24545	<i>small inducible cytokine A2 (monocyte chemotactic protein 1, homologous to mouse Sig-je)</i>	-	-2,4	-2,1
M25627	<i>glutathione S-transferase A2</i>	-	-2,9	-2,2
M28212	<i>RAB6A, member RAS oncogene family</i>	-	-2,0	-
M28213	<i>RAB2, member RAS oncogene family</i>	-	-2,2	-
M28372	<i>zinc finger protein 9 (a cellular retroviral nucleic acid binding protein)</i>	-	-4,3	-2,7
M29696	<i>interleukin 7 receptor</i>	-	15,7	51,5
M31165	<i>tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6</i>	-	208,4	223,9
M31899	<i>excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3 (xeroderma pigmentosum group B complementing)</i>	-	-2,5	-3,1
M32865	<i>thyroid autoantigen 7-kD (Ku antigen)</i>	-2,1	-2,9	-3,7
M33336	<i>protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha (tissue specific extinguisher 1)</i>	-	-2,2	-
M34664	<i>heat shock 6-kD protein 1 (chaperonin)</i>	-3,2	-7,6	-
M35416	<i>v-ral simian leukemia viral oncogene homolog B (ras related; GTP binding protein)</i>	-	-2,9	-
M35663	<i>protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent</i>	-	2,8	2,4
M36067	<i>ligase I, DNA, ATP-dependent</i>	-	-4,0	-5,7
M36430	<i>guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1</i>	2,2	15,1	19,7
M36717	<i>ribonuclease/angiogenin inhibitor</i>	-	-1,9	-2,1
M37435	<i>colony stimulating factor 1 (macrophage)</i>	-	-2,8	-
M57502	<i>small inducible cytokine A1 (I-3-9, homologous to mouse Tca-3)</i>	-	33,9	47,2
M59040	<i>CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)</i>	-	2,9	3,1
M62505	<i>complement component 5 receptor 1 (C5a ligand)</i>	2,0	-	-
M62829	<i>early growth response 1</i>	-	-8,0	-4,3
M63167	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>	-	-1,9	-2,8
M63960	<i>protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform</i>	-	-2,2	-2,5
M65212	<i>catechol-O-methyltransferase</i>	-	-2,2	-
M65290	<i>interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p4-)</i>	-	7,0	4,1
M73077	<i>glucocorticoid receptor DNA binding factor 1</i>	-3,8	-21,5	-6,3
M73780	<i>integrin, beta 8</i>	-	183,4	193,5
M75914	<i>interleukin 5 receptor, alpha</i>	-	5,4	5,5
M76673	<i>formyl peptide receptor-like 2</i>	-	-3,7	-12,0
M76766	<i>general transcription factor IIB</i>	-	-	2,0
M77234	<i>ribosomal protein S3A</i>	-	-2,1	-

M80359	<i>MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3</i>	-	-	2,0
M80397	<i>polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit (125kD)</i>	-	-5,5	-18,6
M81750	<i>myeloid cell nuclear differentiation antigen</i>	-	-3,9	-2,6
M81768	<i>solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 1 (antiporter, Na⁺/H⁺, amiloride sensitive)</i>	-	-3,9	-3,2
M81830	<i>somatostatin receptor 2</i>	-	4,0	4,6
M81934	<i>cell division cycle 25B</i>	-	-3,2	-3,6
M83234	<i>nuclease sensitive element binding protein 1</i>	-	-2,1	-
M84820	<i>retinoid X receptor, beta</i>	-	-3,1	-3,4
M86400	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide</i>	-4,0	-	-
M86492	<i>glia maturation factor, beta</i>	-	-2,8	-
M87338	<i>replication factor C (activator 1) 2 (4-kD)</i>	-	-4,5	-2,4
M87339	<i>replication factor C (activator 1) 4 (37kD)</i>	-2,4	-5,2	-7,9
M92357	<i>tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2</i>	-	4,8	4,2
M92381	<i>thymosin, beta 1-</i>	-	-2,1	-
M93255	<i>Friend leukemia virus integration 1</i>	-2,2	-30,5	-23,5
M95678	<i>phospholipase C, beta 2</i>	-	-3,5	-6,8
M97796	<i>inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein</i>	-	-2,5	-2,2
M97935	<i>signal transducer and activator of transcription 1, 91kD</i>	-	-4,1	-3,0
NM_005417	<i>v-src avian sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog</i>	-	2,3	3,4
S40706	<i>DNA-damage-inducible transcript 3</i>	-	-2,0	-2,0
S40832	<i>early growth response 3</i>	4,2	-	-
S59184	<i>RYK receptor-like tyrosine kinase</i>	-	-2,5	-
S87759	<i>protein phosphatase 1A (formerly 2C), magnesium-dependent, alpha isoform</i>	-	-4,0	-2,3
S90469	<i>P45- (cytochrome) oxidoreductase</i>	-	-2,8	-3,3
U03494	<i>transcription factor CP2</i>	-	-4,3	-2,5
U03688	<i>cytochrome P45-, subfamily 1 (dioxin-inducible), polypeptide 1 (glaucoma 3, primary infantile)</i>	-	-5,0	-9,2
U04847	<i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily B, member 1</i>	-	-3,1	-2,1
U05875	<i>interferon gamma receptor 2 (interferon gamma transducer 1)</i>	-	-	2,2
U07418	<i>mutL (E. coli) homolog 1 (colon cancer, nonpolyposis type 2)</i>	-	-	-2,8
U09577	<i>hyaluronoglucosaminidase 2</i>	-	-6,2	-6,6
U10117	<i>small inducible cytokine subfamily E, member 1 (endothelial monocyte-activating)</i>	-	-2,5	-2,3
U10550	<i>GTP-binding protein overexpressed in skeletal muscle</i>	8,4	-	9,9
U11732	<i>ets variant gene 6 (TEL oncogene)</i>	-	-2,3	-2,3
U11791	<i>cyclin H</i>	-	-4,5	-3,2
U12140	<i>neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2</i>	-	-2,3	-
U13021	<i>caspase 2, apoptosis-related cysteine protease (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 2)</i>	-	-	-4,3
U13699	<i>caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase)</i>	-	-2,0	-2,1
U13737	<i>caspase 3, apoptosis-related cysteine protease</i>	-	-4,0	-2,8
U14417	<i>ral guanine nucleotide dissociation stimulator</i>	-	-3,9	-3,9
U17032	<i>Rho GTPase activating protein 5</i>	-	5,3	2,1
U18840	<i>myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>	-2,5	-3,9	-3,1
U21092	<i>TNF receptor-associated factor 3</i>	-	-	-2,0
U22431	<i>hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)</i>	-	2,9	3,4
U24152	<i>p21/Cdc42/Rac1-activated kinase 1 (yeast Ste2--related)</i>	-	-42,7	-53,6
U25265	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 5</i>	-	-	-3,5
U26710	<i>Cas-Br-M (murine) ectropic retroviral transforming sequence b</i>	-	-2,3	-
U29680	<i>BCL2-related protein A1</i>	-	3,2	2,6
U32944	<i>dynein, cytoplasmic, light polypeptide</i>	-	-3,0	-3,6
U33286	<i>chromosome segregation 1 (yeast homolog)-like</i>	-	-4,1	-
U34070	<i>CCAAT/ENHANCER BINDING PROTEIN ALPHA (C/EBP ALPHA).</i>	-	-44,5	-28,2
U34683	<i>glutathione synthetase</i>	-	-2,3	-2,5

U35143	<i>retinoblastoma-binding protein 7</i>	-	-3,0	-
U58198	<i>interleukin enhancer binding factor 1</i>	-	-2,9	-
U60519	<i>caspase 1-, apoptosis-related cysteine protease</i>	-	-2,0	-
U60520	<i>caspase 8, apoptosis-related cysteine protease</i>	-	-10,2	-2,4
U63717	<i>osteoclast stimulating factor 1</i>	-	-3,4	-3,1
U65928	<i>COP9 (constitutive photomorphogenic, Arabidopsis, homolog) subunit 5</i>	-	-2,4	-
U66838	<i>cyclin A1</i>	37,4	56,2	52,5
U71364	<i>serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9</i>	-	56,8	58,1
U73036	<i>interferon regulatory factor 7</i>	-	2,3	2,1
U78876	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3</i>	-	-6,4	-3,8
U85245	<i>phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type II, beta</i>	-	-5,2	-4,3
U86453	<i>phosphoinositide-3-kinase, catalytic, delta polypeptide</i>	-	-2,8	-2,6
U89896	<i>casein kinase 1, gamma 2</i>	-	-2,4	-2,7
X00351	<i>actin, beta</i>	-	-	-2,0
X01394	<i>tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)</i>	3,0	30,0	25,0
X01677	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	-	-2,1	-2,2
X02530	<i>small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 1-</i>	2,7	10,1	7,3
X03663	<i>colony stimulating factor 1 receptor, formerly McDonough feline sarcoma viral (v-fms) oncogene homolog</i>	-	-5,2	-4,2
X04106	<i>calpain, small subunit 1</i>	-	-	-2,0
X04429	<i>serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1</i>	7,6	12,3	36,0
X04602	<i>interleukin 6 (interferon, beta 2)</i>	-	10436,8	6459,8
X06233	<i>SI-- calcium-binding protein A9 (calgranulin B)</i>	-	-	-2,1
X06256	<i>integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)</i>	-	-	2,0
X06318	<i>protein kinase C, beta 1</i>	-	-2,4	-
X06985	<i>heme oxygenase (decycling) 1</i>	-	-5,2	-27,4
X07270	<i>heat shock 9--kDa protein A (HSP9-A; HSPCA); HSP86</i>	-	-2,5	-2,2
X07767	<i>protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha</i>	-	-2,8	-3,3
X07979	<i>integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)</i>	-2,1	-3,7	-
X12451	<i>cathepsin L</i>	-	-2,3	-2,1
X14034	<i>phospholipase C, gamma 2 (phosphatidylinositol-specific)</i>	-	-2,0	-2,1
X15219	<i>SKI-like</i>	-	-	2,3
X15480	<i>glutathione S-transferase pi</i>	-	-	-2,2
X15722	<i>glutathione reductase</i>	-	-2,8	-2,5
X15949	<i>interferon regulatory factor 2</i>	-	-2,7	-2,6
X16316	<i>vav 1 oncogene</i>	-	-2,0	-
X16707	<i>FOS-like antigen-1</i>	-	-	2,1
X17576	<i>NCK adaptor protein 1</i>	-	-2,8	-2,6
X53655	<i>neurotrophin 3</i>	-	-2,2	-
X53799	<i>GRO2 oncogene</i>	-	8,3	9,1
X54079	<i>heat shock 27kD protein 1</i>	-	-4,1	-5,0
X54941	<i>CDC28 protein kinase 1</i>	-	-4,9	-
X55504	<i>nucleolar protein 1 (12-kD)</i>	-	-4,8	-3,3
X59738	<i>zinc finger X-chromosomal protein (ZFX)</i>	-	-	2,3
X59932	<i>c-src tyrosine kinase</i>	-	-	-2,3
X60592	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5</i>	-	4,3	3,5
X66364	<i>cyclin-dependent kinase 5</i>	-	-3,5	-3,3
X66365	<i>cyclin-dependent kinase 6</i>	-	-	-1,9
X67951	<i>peroxiredoxin 1</i>	-	-3,3	-2,8
X69550	<i>Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha</i>	-	-	-2,4
X72755	<i>monokine induced by gamma interferon</i>	-	6,8	7,2
X74795	<i>minichromosome maintenance deficient (S. cerevisiae) 5 (cell division cycle 46)</i>	-2,2	-4,4	-9,4
X75042	<i>v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog</i>	-	4,4	6,5
X75342	<i>SHB adaptor protein (a Src homology 2 protein)</i>	-	-23,9	-8,2
X76104	<i>death-associated protein kinase 1</i>	-	-	-2,8
X76648	<i>glutaredoxin (thioltransferase)</i>	-	-2,5	-2,6
X77722	<i>interferon (alpha, beta and omega) receptor 2</i>	-	-4,9	-3,6

X78627	<i>translin</i>	-	-4,9	-2,1
X78686	<i>small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 5 (epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78)</i>	-	-2,9	-3,8
X79389	<i>glutathione S-transferase theta 1</i>	-	-2,9	-2,5
X85106	<i>ribosomal protein S6 kinase, 9-kD, polypeptide 2</i>	-	-3,6	-2,6
X86779	<i>FAST kinase</i>	-	-	-2,3
X87212	<i>cathepsin C</i>	-	-2,6	-2,5
X91247	<i>thioredoxin reductase 1</i>	-	-2,5	-
X92669	<i>menage a trois 1 (CAK assembly factor)</i>	-	-4,3	-2,2
X94991	<i>zyxin</i>	-	-4,4	-3,2
X95384	<i>translational inhibitor protein p14.5</i>	-	-13,5	-
X96586	<i>neutral sphingomyelinase (N-SMase) activation associated factor</i>	-	-2,6	-2,3
Y00285	<i>insulin-like growth factor 2 receptor</i>	-	-3,1	-2,2
Y00371	<i>heat shock 7-kD protein 8</i>	-	-2,1	-3,2
Y00433	<i>glutathione peroxidase 1</i>	-	-4,4	-5,1
Y00787	<i>interleukin 8</i>	-	47,4	63,9
Y10479	<i>E2F transcription factor 3</i>	-	-2,3	-
Z21876	<i>ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 1</i>	-	-2,4	-2,0
Z29678	<i>microphthalmia-associated transcription factor</i>	-	-2,3	-2,0
Z36715	<i>ELK3, ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)</i>	-	-4,0	-3,1
Z74792	<i>nuclear transcription factor Y, gamma</i>	-	-	-2,2

6.3 Vollständige Analyse des Bereiches von – 18 bis – 286 der 5'-UTR des humanen C3aR unter Zuhilfenahme der MatInspector® Professional Software Version 6.2

Family/matrix	Further Information	Opt.	Position		Str.	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
			from - to	anchor				
<u>V\$AREB/AREB6.03</u>	AREB6 (Atp1a1 regulatory element binding factor 6)	0.96	39 - 51	45	(+)	1.000	0.960	tcagCACctggat
<u>V\$MYOD/LMO2COM.01</u>	complex of Lmo2 bound to Tal-1, E2A proteins, and GATA-1, half-site 1	0.98	38 - 52	45	(-)	1.000	0.994	catcCAGGtgctgaa
<u>V\$SMAD/SMAD3.01</u>	Smad3 transcription factor involved in TGF-beta signaling	0.99	67 - 75	71	(+)	1.000	0.993	GTCTggtcc
<u>V\$MZF1/MZF1.01</u>	MZF1	0.98	73 - 79	76	(-)	1.000	1.000	gtGGGGa
<u>V\$CREB/ATF.02</u>	ATF binding site	0.83	85 - 105	95	(-)	1.000	0.834	acttcaTGACttcactgtggc
<u>V\$BRNF/BRN3.01</u>	POU transcription factor Brn-3	0.78	94 - 110	102	(-)	0.750	0.854	gccATACttcatgactt
<u>V\$E2FF/E2F.01</u>	E2F, involved in cell cycle regulation, interacts with Rb p107	0.74	106 - 120	113	(+)	1.000	0.763	atggcaaGAAaattt

	protein							
<u>V\$SORY/HMGIY.01</u>	HMGI(Y) high-mobility-group protein I (Y), architectural transcription factor organizing the framework of a nuclear protein-DNA transcriptional complex	0.92	109 - 125	117	(-)	1.000	0.942	tcagcaAATTtcttgc
<u>V\$SETSF/ELK1.02</u>	Elk-1	0.92	148 - 164	156	(-)	1.000	0.958	attgccGGAAacacgag
<u>V\$STAT/STAT.01</u>	Signal transducers and activators of transcription	0.87	150 - 168	159	(-)	1.000	0.906	acttattgccGGAAacacg
<u>V\$NKXH/NKX31.01</u>	Prostate-specific homeodomain protein NKX3.1	0.84	161 - 173	167	(+)	1.000	0.853	caatAAGTtaagt
<u>V\$NKXH/NKX31.01</u>	Prostate-specific homeodomain protein NKX3.1	0.84	166 - 178	172	(+)	1.000	0.846	agttAAGTtctat
<u>V\$GATA/GATA1.01</u>	GATA-binding factor 1	0.96	186 - 198	192	(-)	1.000	0.981	gtcaGATAgtggt
<u>V\$SETSF/ETS1.01</u>	c-Ets-1 binding site	0.92	199 - 215	207	(+)	1.000	0.933	ctcacAGGAagagtttc
<u>V\$LEFF/LEF1.02</u>	TCF/LEF-1, involved in the Wnt signal transduction pathway	0.94	208 - 224	216	(+)	1.000	0.986	agagtttCAAAGtgagt
<u>V\$PAX2/PAX2.01</u>	Zebrafish PAX2 paired domain protein	0.78	209 - 231	220	(-)	1.000	0.806	agaaatgactcactttgAAACtc
<u>V\$AP1F/AP1.01</u>	AP1 binding site	0.95	211 - 231	221	(-)	0.964	0.980	agaaatgaCTCActttgaaac
<u>V\$AP1F/AP1.01</u>	AP1 binding site	0.95	215 - 235	225	(+)	1.000	0.988	caaagtgaGTCAAttctaaat
<u>V\$TCFF/TCF11.01</u>	TCF11/KCR-F1/Nrf1 homodimers	1.00	223 - 229	226	(+)	1.000	1.000	GTCAAtt
<u>V\$CEBP/CEBPB.01</u>	CCAAT/enhancer binding protein beta	0.94	220 - 238	229	(-)	0.985	0.942	gccatttaGAAAtgactca
<u>V\$MEF2/AMEF2.01</u>	Myocyte enhancer factor	0.80	218 - 240	229	(-)	0.800	0.819	aagccattTAGAaatgactcact
<u>V\$PCAT/CAAT.01</u>	cellular and viral CCAAT box	0.90	231 - 241	236	(-)	0.856	0.905	taagCCATtta
<u>V\$OCT1/OCT.01</u>	Octamer binding site (OCT1/OCT2 consensus)	0.79	242 - 256	249	(+)	0.758	0.791	gaaAGGCaaagcagg
<u>V\$E2FF/E2F.01</u>	E2F, involved in cell cycle regulation,	0.74	249 - 263	256	(+)	1.000	0.770	aaagcagGAAAacag

	interacts with Rb p107 protein							
<u>V\$NFAT/NFAT.01</u>	Nuclear factor of activated T-cells	0.97	252 - 262	257	(+)	1.000	0.972	gcagGAAAcaca
<u>V\$TBPF/TATA.01</u>	cellular and viral TATA box elements	0.90	265 - 281	273	(-)	1.000	0.911	gattaTAAActcctact
<u>V\$HOXF/CRX.01</u>	Cone-rod homeobox-containing transcription factor / otx-like homeobox gene	0.94	269 - 285	277	(-)	1.000	0.941	tcaggATTAtaaactcc

Literatur

- [1] Walport, M.J. (2001) Complement. First of two parts. *N. Engl. J. Med.*, **344**, 1058-1066.
- [2] Ember J.A., Jagels M.A., & Hugli T.E. (1998) Characterisation of Complement Anaphylatoxins and Their Biological Responses. In *The Human Complement System in Health and Disease* (Volanakis J.E. & Frank M.M., eds), pp. 241-284. Marcel Dekker Inc., New York.
- [3] Fernandez, H.N. & Hugli, T.E. (1978) Primary structural analysis of the polypeptide portion of human C5a anaphylatoxin. Polypeptide sequence determination and assignment of the oligosaccharide attachment site in C5a. *J. Biol. Chem.*, **253**, 6955-6964.
- [4] Hugli, T.E., Morgan, W.T., & Muller-Eberhard, H.J. (1975) Circular dichroism of C3a anaphylatoxin. Effects of pH, heat, guanidinium chloride, and mercaptoethanol on conformation and function. *J. Biol. Chem.*, **250**, 1479-1483.
- [5] Hugli, T.E. (1984) Structure and function of the anaphylatoxins. *Springer Semin. Immunopathol.*, **7**, 193-219.
- [6] Hugli, T.E. (1981) The structural basis for anaphylatoxin and chemotactic functions of C3a, C4a, and C5a. *Crit Rev. Immunol.*, **1**, 321-366.
- [7] Cochrane, C.G. & Muller-Eberhard, H.J. (1968) The derivation of two distinct anaphylatoxin activities from the third and fifth components of human complement. *J. Exp. Med.*, **127**, 371-386.
- [8] Wilken, H.C., Gotze, O., Werfel, T., & Zwirner, J. (1999) C3a(desArg) does not bind to and signal through the human C3a receptor. *Immunol. Lett.*, **67**, 141-145.
- [9] Bokisch, V.A. & Muller-Eberhard, H.J. (1970) Anaphylatoxin inactivator of human plasma: its isolation and characterization as a carboxypeptidase. *J. Clin. Invest.*, **49**, 2427-2436.
- [10] Mousli, M., Hugli, T.E., Landry, Y., & Bronner, C. (1992) A mechanism of action for anaphylatoxin C3a stimulation of mast cells. *J. Immunol.*, **148**, 2456-2461.
- [11] Ehrenguber, M.U., Geiser, T., & Deranleau, D.A. (1994) Activation of human neutrophils by C3a and C5A. Comparison of the effects on shape changes, chemotaxis, secretion, and respiratory burst. *FEBS Lett.*, **346**, 181-184.
- [12] Takafuji, S., Tadokoro, K., Ito, K., & Dahinden, C.A. (1994) Degranulation from human eosinophils stimulated with C3a and C5a. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **104 Suppl 1**, 27-29.
- [13] Lundahl, J., Hallden, G., & Hed, J. (1993) Differences in intracellular pool and receptor-dependent mobilization of the adhesion-promoting glycoprotein Mac-1 between eosinophils and neutrophils. *J. Leukoc. Biol.*, **53**, 336-341.
- [14] Nilsson, G., Johnell, M., Hammer, C.H., Tiffany, H.L., Nilsson, K., Metcalfe, D.D., Siegbahn, A., & Murphy, P.M. (1996) C3a and C5a are chemotaxins for human mast cells and act through distinct receptors via a pertussis toxin-sensitive signal transduction pathway. *J. Immunol.*, **157**, 1693-1698.
- [15] Clancy, R.M., Dahinden, C.A., & Hugli, T.E. (1985) Complement-mediated arachidonate metabolism. *Prog. Biochem. Pharmacol.*, **20**, 120-131.
- [16] Morgan, E.L., Thoman, M.L., Weigle, W.O., & Hugli, T.E. (1983) Anaphylatoxin-mediated regulation of the immune response. II. C5a-mediated enhancement of human humoral and T cell-mediated immune responses. *J. Immunol.*, **130**, 1257-1261.
- [17] Geiger, T., Rordorf, C., Galakatos, N., Seligmann, B., Henn, R., Lazdins, J., Erard, F., & Vosbeck, K. (1992) Recombinant human C5a induces transcription but not translation of interleukin 1 beta mRNA in human monocytes. *Lymphokine Cytokine Res.*, **11**, 55-63.
- [18] Pan, Z.K. (1998) Anaphylatoxins C5a and C3a induce nuclear factor kappaB activation in human peripheral blood monocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1443**, 90-98.
- [19] Pieters, W.R., Houben, L.A., Koenderman, L., & Raaijmakers, J.A. (1995) C5a-induced migration of human monocytes is primed by dexamethasone. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **12**, 691-696.

- [20] Monk,P.N., Barker,M.D., & Partridge,L.J. (1994) Multiple signalling pathways in the C5a-induced expression of adhesion receptor Mac-1. *Biochim. Biophys. Acta*, **1221**, 323-329.
- [21] Cavaillon,J.M., Fitting,C., & Haeffner-Cavaillon,N. (1990) Recombinant C5a enhances interleukin 1 and tumor necrosis factor release by lipopolysaccharide-stimulated monocytes and macrophages. *Eur. J. Immunol.*, **20**, 253-257.
- [22] Wittmann,M., Zwirner,J., Larsson,V.A., Kirchhoff,K., Begemann,G., Kapp,A., Gotze,O., & Werfel,T. (1999) C5a suppresses the production of IL-12 by IFN-gamma-primed and lipopolysaccharide-challenged human monocytes. *J. Immunol.*, **162**, 6763-6769.
- [23] Scholz,W., McClurg,M.R., Cardenas,G.J., Smith,M., Noonan,D.J., Hugli,T.E., & Morgan,E.L. (1990) C5a-mediated release of interleukin 6 by human monocytes. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **57**, 297-307.
- [24] Ember,J.A., Sanderson,S.D., Hugli,T.E., & Morgan,E.L. (1994) Induction of interleukin-8 synthesis from monocytes by human C5a anaphylatoxin. *Am. J. Pathol.*, **144**, 393-403.
- [25] Schieferdecker,H.L., Schlaf,G., Jungermann,K., & Gotze,O. (2001) Functions of anaphylatoxin C5a in rat liver: direct and indirect actions on nonparenchymal and parenchymal cells. *Int. Immunopharmacol.*, **1**, 469-481.
- [26] Fukuoka,Y., Strainic,M., & Medof,M.E. (2003) Differential cytokine expression of human retinal pigment epithelial cells in response to stimulation by C5a. *Clin. Exp. Immunol.*, **131**, 248-253.
- [27] Kacani,L., Banki,Z., Zwirner,J., Schennach,H., Bajtay,Z., Erdei,A., Stoiber,H., & Dierich,M.P. (2001) C5a and C5a(desArg) enhance the susceptibility of monocyte-derived macrophages to HIV infection. *J. Immunol.*, **166**, 3410-3415.
- [28] Meddows-Taylor,S., Kuhn,L., Meyers,T.M., Sherman,G., & Tiemessen,C.T. (2001) Defective neutrophil degranulation induced by interleukin-8 and complement 5a and down-regulation of associated receptors in children vertically infected with human immunodeficiency virus type 1. *Clin. Diagn. Lab Immunol.*, **8**, 21-30.
- [29] Langeggen,H., Johnson,E., & Hetland,G. (2001) Effects of C5a and FMLP on interleukin-8 production and proliferation of human umbilical vein endothelial cells. *Inflammation*, **25**, 83-89.
- [30] Monsinjon,T., Gasque,P., Chan,P., Ischenko,A., Brady,J.J., & Fontaine,M.C. (2003) Regulation by complement C3a and C5a anaphylatoxins of cytokine production in human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J.*, **17**, 1003-1014.
- [31] Mukherjee,P. & Pasinetti,G.M. (2001) Complement anaphylatoxin C5a neuroprotects through mitogen-activated protein kinase-dependent inhibition of caspase 3. *J. Neurochem.*, **77**, 43-49.
- [32] Perianayagam,M.C., Balakrishnan,V.S., King,A.J., Pereira,B.J., & Jaber,B.L. (2002) C5a delays apoptosis of human neutrophils by a phosphatidylinositol 3- kinase-signaling pathway. *Kidney Int.*, **61**, 456-463.
- [33] Shushakova,N., Skokowa,J., Schulman,J., Baumann,U., Zwirner,J., Schmidt,R.E., & Gessner,J.E. (2002) C5a anaphylatoxin is a major regulator of activating versus inhibitory FcγR3s in immune complex-induced lung disease. *J. Clin. Invest.*, **110**, 1823-1830.
- [34] Soruri,A., Riggert,J., Schlott,T., Kiafard,Z., Dettmer,C., & Zwirner,J. (2003) Anaphylatoxin C5a induces monocyte recruitment and differentiation into dendritic cells by TNF-alpha and prostaglandin E2-dependent mechanisms. *J. Immunol.*, **171**, 2631-2636.
- [35] Daffern,P.J., Pfeifer,P.H., Ember,J.A., & Hugli,T.E. (1995) C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation. *J. Exp. Med.*, **181**, 2119-2127.
- [36] Elsner,J., Oppermann,M., Czech,W., Dobos,G., Schopf,E., Norgauer,J., & Kapp,A. (1994) C3a activates reactive oxygen radical species production and intracellular calcium transients in human eosinophils. *Eur. J. Immunol.*, **24**, 518-522.

- [37] Zwirner, J., Gotze, O., Sieber, A., Kapp, A., Begemann, G., Zuberbier, T., & Werfel, T. (1998) The human mast cell line HMC-1 binds and responds to C3a but not C3a(desArg). *Scand. J. Immunol.*, **47**, 19-24.
- [38] Hartmann, K., Henz, B.M., Krüger-Krasagakes, S., Kohl, J., Burger, R., Guhl, S., Haase, I., Lippert, U., & Zuberbier, T. (1997) C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells. *Blood*, **89**, 2863-2870.
- [39] Morgan, E.L., Weigle, W.O., & Hugli, T.E. (1982) Anaphylatoxin-mediated regulation of the immune response. I. C3a-mediated suppression of human and murine humoral immune responses. *J. Exp. Med.*, **155**, 1412-1426.
- [40] Takabayashi, T., Vannier, E., Clark, B.D., Margolis, N.H., Dinarello, C.A., Burke, J.F., & Gelfand, J.A. (1996) A new biologic role for C3a and C3a desArg: regulation of TNF-alpha and IL-1 beta synthesis. *J. Immunol.*, **156**, 3455-3460.
- [41] Haeflner-Cavaillon, N., Cavaillon, J.M., Laude, M., & Kazatchkine, M.D. (1987) C3a(C3adesArg) induces production and release of interleukin 1 by cultured human monocytes. *J. Immunol.*, **139**, 794-799.
- [42] Fischer, W.H., Jagels, M.A., & Hugli, T.E. (1999) Regulation of IL-6 synthesis in human peripheral blood mononuclear cells by C3a and C3a(desArg). *J. Immunol.*, **162**, 453-459.
- [43] Fischer, W.H. & Hugli, T.E. (1997) Regulation of B cell functions by C3a and C3a(desArg): suppression of TNF-alpha, IL-6, and the polyclonal immune response. *J. Immunol.*, **159**, 4279-4286.
- [44] Monsinjon, T., Gasque, P., Ischenko, A., & Fontaine, M. (2001) C3A binds to the seven transmembrane anaphylatoxin receptor expressed by epithelial cells and triggers the production of IL-8. *FEBS Lett.*, **487**, 339-346.
- [45] Jauneau, A.C., Ischenko, A., Chan, P., & Fontaine, M. (2003) Complement component anaphylatoxins upregulate chemokine expression by human astrocytes. *FEBS Lett.*, **537**, 17-22.
- [46] Strey, C.W., Markiewski, M., Mastellos, D., Tudoran, R., Spruce, L.A., Greenbaum, L.E., & Lambris, J.D. (2003) The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *J. Exp. Med.*, **198**, 913-923.
- [47] Boulay, F., Mery, L., Tardif, M., Brouchon, L., & Vignais, P. (1991) Expression cloning of a receptor for C5a anaphylatoxin on differentiated HL-60 cells. *Biochemistry*, **30**, 2993-2999.
- [48] Mery, L. & Boulay, F. (1993) Evidence that the extracellular N-terminal domain of C5aR contains amino-acid residues crucial for C5a binding. *Eur. J. Haematol.*, **51**, 282-287.
- [49] DeMartino, J.A., Van Riper, G., Siciliano, S.J., Molineaux, C.J., Konteatis, Z.D., Rosen, H., & Springer, M.S. (1994) The amino terminus of the human C5a receptor is required for high affinity C5a binding and for receptor activation by C5a but not C5a analogs. *J. Biol. Chem.*, **269**, 14446-14450.
- [50] Monk, P.N., Barker, M.D., Partridge, L.J., & Pease, J.E. (1995) Mutation of glutamate 199 of the human C5a receptor defines a binding site for ligand distinct from the receptor N terminus. *J. Biol. Chem.*, **270**, 16625-16629.
- [51] DeMartino, J.A., Konteatis, Z.D., Siciliano, S.J., Van Riper, G., Underwood, D.J., Fischer, P.A., & Springer, M.S. (1995) Arginine 206 of the C5a receptor is critical for ligand recognition and receptor activation by C-terminal hexapeptide analogs. *J. Biol. Chem.*, **270**, 15966-15969.
- [52] Siciliano, S.J., Rollins, T.E., DeMartino, J., Konteatis, Z., Malkowitz, L., Van Riper, G., Bondy, S., Rosen, H., & Springer, M.S. (1994) Two-site binding of C5a by its receptor: an alternative binding paradigm for G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 1214-1218.
- [53] Mullmann, T.J., Siegel, M.I., Egan, R.W., & Billah, M.M. (1990) Complement C5a activation of phospholipase D in human neutrophils. A major route to the production of phosphatidates and diglycerides. *J. Immunol.*, **144**, 1901-1908.
- [54] Torres, M. & Forman, H.J. (1999) Activation of several MAP kinases upon stimulation of rat alveolar macrophages: role of the NADPH oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **366**, 231-239.
- [55] Buhl, A.M., Avdi, N., Worthen, G.S., & Johnson, G.L. (1994) Mapping of the C5a receptor signal transduction network in human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 9190-9194.

- [56] Luttrell,L.M., Roudabush,F.L., Choy,E.W., Miller,W.E., Field,M.E., Pierce,K.L., & Lefkowitz,R.J. (2001) Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 2449-2454.
- [57] Gerard,N.P., Bao,L., Xiao-Ping,H., Eddy,R.L., Jr., Shows,T.B., & Gerard,C. (1993) Human chemotaxis receptor genes cluster at 19q13.3-13.4. Characterization of the human C5a receptor gene. *Biochemistry*, **32**, 1243-1250.
- [58] Libert,F., Parmentier,M., Lefort,A., Dinsart,C., Van Sande,J., Maenhaut,C., Simons,M.J., Dumont,J.E., & Vassart,G. (1989) Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family. *Science*, **244**, 569-572.
- [59] Dohlman,H.G., Caron,M.G., DeBlasi,A., Frielle,T., & Lefkowitz,R.J. (1990) Role of extracellular disulfide-bonded cysteines in the ligand binding function of the beta 2-adrenergic receptor. *Biochemistry*, **29**, 2335-2342.
- [60] Bao,L., Gerard,N.P., Eddy,R.L., Jr., Shows,T.B., & Gerard,C. (1992) Mapping of genes for the human C5a receptor (C5AR), human FMLP receptor (FPR), and two FMLP receptor homologue orphan receptors (FPRH1, FPRH2) to chromosome 19. *Genomics*, **13**, 437-440.
- [61] Chenoweth,D.E. & Hugli,T.E. (1978) Demonstration of specific C5a receptor on intact human polymorphonuclear leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 3943-3947.
- [62] Gerard,N.P., Hodges,M.K., Drazen,J.M., Weller,P.F., & Gerard,C. (1989) Characterization of a receptor for C5a anaphylatoxin on human eosinophils. *J. Biol. Chem.*, **264**, 1760-1766.
- [63] Chenoweth,D.E. & Goodman,M.G. (1983) The C5a receptor of neutrophils and macrophages. *Agents Actions Suppl*, **12**, 252-273.
- [64] Martin,U., Bock,D., Arseniev,L., Tornetta,M.A., Ames,R.S., Bautsch,W., Kohl,J., Ganser,A., & Klos,A. (1997) The human C3a receptor is expressed on neutrophils and monocytes, but not on B or T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **186**, 199-207.
- [65] Haviland,D.L., McCoy,R.L., Whitehead,W.T., Akama,H., Molmenti,E.P., Brown,A., Haviland,J.C., Parks,W.C., Perlmutter,D.H., & Wetsel,R.A. (1995) Cellular expression of the C5a anaphylatoxin receptor (C5aR): demonstration of C5aR on nonmyeloid cells of the liver and lung. *J. Immunol.*, **154**, 1861-1869.
- [66] Osaka,H., McGinty,A., Hoepken,U.E., Lu,B., Gerard,C., & Pasinetti,G.M. (1999) Expression of C5a receptor in mouse brain: role in signal transduction and neurodegeneration. *Neuroscience*, **88**, 1073-1082.
- [67] Schieferdecker,H.L., Rothermel,E., Timmermann,A., Gotze,O., & Jungermann,K. (1997) Anaphylatoxin C5a receptor mRNA is strongly expressed in Kupffer and stellate cells and weakly in sinusoidal endothelial cells but not in hepatocytes of normal rat liver. *FEBS Lett.*, **406**, 305-309.
- [68] Krug,N., Tschernig,T., Erpenbeck,V.J., Hohlfeld,J.M., & Kohl,J. (2001) Complement factors C3a and C5a are increased in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in subjects with asthma. *Am. J. Respir. Crit Care Med.*, **164**, 1841-1843.
- [69] Laudes,I.J., Chu,J.C., Huber-Lang,M., Guo,R.F., Riedemann,N.C., Sarma,J.V., Mahdi,F., Murphy,H.S., Speyer,C., Lu,K.T., Lambris,J.D., Zetoune,F.S., & Ward,P.A. (2002) Expression and function of C5a receptor in mouse microvascular endothelial cells. *J. Immunol.*, **169**, 5962-5970.
- [70] Fayyazi,A., Scheel,O., Werfel,T., Schweyer,S., Oppermann,M., Gotze,O., Radzun,H.J., & Zwirner,J. (2000) The C5a receptor is expressed in normal renal proximal tubular but not in normal pulmonary or hepatic epithelial cells. *Immunology*, **99**, 38-45.
- [71] Farkas,I., Baranyi,L., Takahashi,M., Fukuda,A., Liposits,Z., Yamamoto,T., & Okada,H. (1998) A neuronal C5a receptor and an associated apoptotic signal transduction pathway. *J. Physiol (Lond)*, **507 (Pt 3)**, 679-687.
- [72] Gasque,P., Singhrao,S.K., Neal,J.W., Gotze,O., & Morgan,B.P. (1997) Expression of the receptor for complement C5a (CD88) is up-regulated on reactive astrocytes, microglia, and endothelial cells in the inflamed human central nervous system. *Am. J. Pathol.*, **150**, 31-41.

- [73] Morgan,B.P., Gasque,P., Singhrao,S., & Piddlesden,S.J. (1997) The role of complement in disorders of the nervous system. *Immunopharmacology*, **38**, 43-50.
- [74] Burg,M., Martin,U., Rheinheimer,C., Kohl,J., Bautsch,W., Bottger,E.C., & Klos,A. (1995) IFN-gamma up-regulates the human C5a receptor (CD88) in myeloblastic U937 cells and related cell lines. *J. Immunol.*, **155**, 4419-4426.
- [75] Burg,M., Martin,U., Bock,D., Rheinheimer,C., Kohl,J., Bautsch,W., & Klos,A. (1996) Differential regulation of the C3a and C5a receptors (CD88) by IFN- gamma and PMA in U937 cells and related myeloblastic cell lines. *J. Immunol.*, **157**, 5574-5581.
- [76] Koleva,M., Schlaf,G., Landmann,R., Gotze,O., Jungermann,K., & Schieferdecker,H.L. (2002) Induction of anaphylatoxin C5a receptors in rat hepatocytes by lipopolysaccharide in vivo: mediation by interleukin-6 from Kupffer cells. *Gastroenterology*, **122**, 697-708.
- [77] Stahel,P.F., Frei,K., Eugster,H.P., Fontana,A., Hummel,K.M., Wetsel,R.A., Ames,R.S., & Barnum,S.R. (1997) TNF-alpha-mediated expression of the receptor for anaphylatoxin C5a on neurons in experimental *Listeria meningoenzephalitis*. *J. Immunol.*, **159**, 861-869.
- [78] Hopken,U.E., Lu,B., Gerard,N.P., & Gerard,C. (1996) The C5a chemoattractant receptor mediates mucosal defence to infection [see comments]. *Nature*, **383**, 86-89.
- [79] Hopken,U.E., Lu,B., Gerard,N.P., & Gerard,C. (1997) Impaired inflammatory responses in the reverse arthus reaction through genetic deletion of the C5a receptor. *J. Exp. Med.*, **186**, 749-756.
- [80] Heller,T., Hennecke,M., Baumann,U., Gessner,J.E., zu Vilsendorf,A.M., Baensch,M., Boulay,F., Kola,A., Klos,A., Bautsch,W., & Kohl,J. (1999) Selection of a C5a receptor antagonist from phage libraries attenuating the inflammatory response in immune complex disease and ischemia/reperfusion injury. *J. Immunol.*, **163**, 985-994.
- [81] Baumann,U., Kohl,J., Tschernig,T., Schwerter-Strumpf,K., Verbeek,J.S., Schmidt,R.E., & Gessner,J.E. (2000) A codominant role of Fc gamma RI/III and C5aR in the reverse Arthus reaction. *J. Immunol.*, **164**, 1065-1070.
- [82] Ottonello,L., Dapino,P., Pastorino,G., Dallegri,F., & Sacchetti,C. (1995) Neutrophil dysfunction and increased susceptibility to infection [see comments]. *Eur. J. Clin. Invest.*, **25**, 687-692.
- [83] Czermak,B.J., Sarma,V., Pierson,C.L., Warner,R.L., Huber-Lang,M., Bless,N.M., Schmal,H., Friedl,H.P., & Ward,P.A. (1999) Protective effects of C5a blockade in sepsis. *Nat. Med.*, **5**, 788-792.
- [84] Goya,T., Morisaki,T., & Torisu,M. (1994) Immunologic assessment of host defense impairment in patients with septic multiple organ failure: relationship between complement activation and changes in neutrophil function. *Surgery*, **115**, 145-155.
- [85] Strachan,A.J., Woodruff,T.M., Haaima,G., Fairlie,D.P., & Taylor,S.M. (2000) A New Small Molecule C5a Receptor Antagonist Inhibits the Reverse- Passive Arthus Reaction and Endotoxic Shock in Rats. *J. Immunol.*, **164**, 6560-6565.
- [86] Huber-Lang,M.S., Sarma,J.V., McGuire,S.R., Lu,K.T., Guo,R.F., Padgaonkar,V.A., Younkin,E.M., Laudes,I.J., Riedemann,N.C., Younger,J.G., & Ward,P.A. (2001) Protective effects of anti-C5a peptide antibodies in experimental sepsis. *FASEB J.*, **15**, 568-570.
- [87] Huber-Lang,M., Sarma,V.J., Lu,K.T., McGuire,S.R., Padgaonkar,V.A., Guo,R.F., Younkin,E.M., Kunkel,R.G., Ding,J., Erickson,R., Curnutte,J.T., & Ward,P.A. (2001) Role of C5a in multiorgan failure during sepsis. *J. Immunol.*, **166**, 1193-1199.
- [88] Drouin,S.M., Kildsgaard,J., Haviland,J., Zabner,J., Jia,H.P., McCray,P.B., Jr., Tack,B.F., & Wetsel,R.A. (2001) Expression of the complement anaphylatoxin C3a and C5a receptors on bronchial epithelial and smooth muscle cells in models of sepsis and asthma. *J. Immunol.*, **166**, 2025-2032.
- [89] Riedemann,N.C., Guo,R.F., Neff,T.A., Laudes,I.J., Keller,K.A., Sarma,V.J., Markiewski,M.M., Mastellos,D., Strey,C.W., Pierson,C.L., Lambris,J.D., Zetoune,F.S., & Ward,P.A. (2002) Increased C5a receptor expression in sepsis. *J. Clin. Invest.*, **110**, 101-108.

- [90] Karp,C.L., Grupe,A., Schadt,E., Ewart,S.L., Keane-Moore,M., Cuomo,P.J., Kohl,J., Wahl,L., Kuperman,D., Germer,S., Aud,D., Peltz,G., & Wills-Karp,M. (2000) Identification of complement factor 5 as a susceptibility locus for experimental allergic asthma. *Nat. Immunol.*, **1**, 221-226.
- [91] Ames,R.S., Li,Y., Sarau,H.M., Nuthulaganti,P., Foley,J.J., Ellis,C., Zeng,Z., Su,K., Jurewicz,A.J., Hertzberg,R.P., Bergsma,D.J., & Kumar,C. (1996) Molecular cloning and characterization of the human anaphylatoxin C3a receptor. *J. Biol. Chem.*, **271**, 20231-20234.
- [92] Crass,T., Raffetseder,U., Martin,U., Grove,M., Klos,A., Kohl,J., & Bautsch,W. (1996) Expression cloning of the human C3a anaphylatoxin receptor (C3aR) from differentiated U-937 cells. *Eur. J. Immunol.*, **26**, 1944-1950.
- [93] Gao,J., Choe,H., Bota,D., Wright,P.L., Gerard,C., & Gerard,N.P. (2003) Sulfation of tyrosine 174 in the human C3a receptor is essential for binding of C3a anaphylatoxin. *J. Biol. Chem.*, **278**, 37902-37908.
- [94] Settmacher,B., Rheinheimer,C., Hamacher,H., Ames,R.S., Wise,A., Jenkinson,L., Bock,D., Schaefer,M., Kohl,J., & Klos,A. (2003) Structure-function studies of the C3a-receptor: C-terminal serine and threonine residues which influence receptor internalization and signaling. *Eur. J. Immunol.*, **33**, 920-927.
- [95] Paral,D., Sohns,B., Crass,T., Grove,M., Kohl,J., Klos,A., & Bautsch,W. (1998) Genomic organization of the human C3a receptor. *Eur. J. Immunol.*, **28**, 2417-2423.
- [96] Hollmann,T.J., Haviland,D.L., Kildsgaard,J., Watts,K., & Wetzel,R.A. (1998) Cloning, expression, sequence determination, and chromosome localization of the mouse complement C3a anaphylatoxin receptor gene. *Mol. Immunol.*, **35**, 137-148.
- [97] Fukuoka,Y. & Hugli,T.E. (1988) Demonstration of a specific C3a receptor on guinea pig platelets. *J. Immunol.*, **140**, 3496-3501.
- [98] Fukuoka,Y. & Hugli,T.E. (1990) Anaphylatoxin binding and degradation by rat peritoneal mast cells. Mechanisms of degranulation and control. *J. Immunol.*, **145**, 1851-1858.
- [99] Glovsky,M.M., Hugli,T.E., Ishizaka,T., Lichtenstein,L.M., & Erickson,B.W. (1979) Anaphylatoxin-induced histamine release with human leukocytes: studies of C3a leukocyte binding and histamine release. *J. Clin. Invest.*, **64**, 804-811.
- [100] Zwirner,J., Gotze,O., Begemann,G., Kapp,A., Kirchhoff,K., & Werfel,T. (1999) Evaluation of C3a receptor expression on human leucocytes by the use of novel monoclonal antibodies. *Immunology*, **97**, 166-172.
- [101] Werfel,T., Kirchhoff,K., Wittmann,M., Begemann,G., Kapp,A., Heidenreich,F., Gotze,O., & Zwirner,J. (2000) Activated human T lymphocytes express a functional C3a receptor. *J. Immunol.*, **165**, 6599-6605.
- [102] Gasque,P., Singhrao,S.K., Neal,J.W., Wang,P., Sayah,S., Fontaine,M., & Morgan,B.P. (1998) The receptor for complement anaphylatoxin C3a is expressed by myeloid cells and nonmyeloid cells in inflamed human central nervous system: analysis in multiple sclerosis and bacterial meningitis. *J. Immunol.*, **160**, 3543-3554.
- [103] Nataf,S., Stahel,P.F., Davoust,N., & Barnum,S.R. (1999) Complement anaphylatoxin receptors on neurons: new tricks for old receptors? *Trends Neurosci.*, **22**, 397-402.
- [104] Ischenko,A., Sayah,S., Patte,C., Andreev,S., Gasque,P., Schouft,M.T., Vaudry,H., & Fontaine,M. (1998) Expression of a functional anaphylatoxin C3a receptor by astrocytes. *J. Neurochem.*, **71**, 2487-2496.
- [105] Sayah,S., Ischenko,A.M., Zhakhov,A., Bonnard,A.S., & Fontaine,M. (1999) Expression of cytokines by human astrocytomas following stimulation by C3a and C5a anaphylatoxins: specific increase in interleukin-6 mRNA expression. *J. Neurochem.*, **72**, 2426-2436.
- [106] Bautsch,W., Hoymann,H.G., Zhang,Q., Meier-Wiedenbach,I., Raschke,U., Ames,R.S., Sohns,B., Flemme,N., Meyer,z., V, Grove,M., Klos,A., & Kohl,J. (2000) Cutting edge: guinea pigs with a natural C3a-receptor defect exhibit decreased bronchoconstriction in allergic airway disease: evidence for an involvement of the C3a anaphylatoxin in the pathogenesis of asthma. *J. Immunol.*, **165**, 5401-5405.

- [107] Humbles,A.A., Lu,B., Nilsson,C.A., Lilly,C., Israel,E., Fujiwara,Y., Gerard,N.P., & Gerard,C. (2000) A role for the C3a anaphylatoxin receptor in the effector phase of asthma. *Nature*, **406**, 998-1001.
- [108] Nakano,Y., Morita,S., Kawamoto,A., Suda,T., Chida,K., & Nakamura,H. (2003) Elevated complement C3a in plasma from patients with severe acute asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **112**, 525-530.
- [109] Drouin,S.M., Corry,D.B., Hollman,T.J., Kildsgaard,J., & Wetsel,R.A. (2002) Absence of the complement anaphylatoxin C3a receptor suppresses Th2 effector functions in a murine model of pulmonary allergy. *J. Immunol.*, **169**, 5926-5933.
- [110] Kildsgaard,J., Hollmann,T.J., Matthews,K.W., Bian,K., Murad,F., & Wetsel,R.A. (2000) Cutting edge: targeted disruption of the C3a receptor gene demonstrates a novel protective anti-inflammatory role for C3a in endotoxin-shock. *J. Immunol.*, **165**, 5406-5409.
- [111] Selberg,O., Hecker,H., Martin,M., Klos,A., Bautsch,W., & Kohl,J. (2000) Discrimination of sepsis and systemic inflammatory response syndrome by determination of circulating plasma concentrations of procalcitonin, protein complement 3a, and interleukin-6. *Crit Care Med.*, **28**, 2793-2798.
- [112] Ames,R.S., Lee,D., Foley,J.J., Jurewicz,A.J., Tornetta,M.A., Bautsch,W., Settmacher,B., Klos,A., Erhard,K.F., Cousins,R.D., Sulpizio,A.C., Hieble,J.P., McCafferty,G., Ward,K.W., Adams,J.L., Bondinell,W.E., Underwood,D.C., Osborn,R.R., Badger,A.M., & Sarau,H.M. (2001) Identification of a selective nonpeptide antagonist of the anaphylatoxin C3a receptor that demonstrates antiinflammatory activity in animal models. *J. Immunol.*, **166**, 6341-6348.
- [113] Ohno,M., Hirata,T., Enomoto,M., Araki,T., Ishimaru,H., & Takahashi,T.A. (2000) A putative chemoattractant receptor, C5L2, is expressed in granulocyte and immature dendritic cells, but not in mature dendritic cells. *Mol. Immunol.*, **37**, 407-412.
- [114] Lee,D.K., George,S.R., Cheng,R., Nguyen,T., Liu,Y., Brown,M., Lynch,K.R., & O'Dowd,B.F. (2001) Identification of four novel human G protein-coupled receptors expressed in the brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **86**, 13-22.
- [115] Cain,S.A. & Monk,P.N. (2002) The orphan receptor C5L2 has high affinity binding sites for complement fragments C5a and C5a des-Arg(74). *J. Biol. Chem.*, **277**, 7165-7169.
- [116] Okinaga,S., Slattery,D., Humbles,A., Zsengeller,Z., Morteau,O., Kinrade,M.B., Brodbeck,R.M., Krause,J.E., Choe,H.R., Gerard,N.P., & Gerard,C. (2003) C5L2, a nonsignaling C5A binding protein. *Biochemistry*, **42**, 9406-9415.
- [117] Kalant,D., Cain,S.A., Maslowska,M., Sniderman,A.D., Cianflone,K., & Monk,P.N. (2003) The chemoattractant receptor-like protein, C5L2, binds C3a desArg77/acylation stimulating protein. *J. Biol. Chem.*
- [118] Sweet,M.J. & Hume,D.A. (1996) Endotoxin signal transduction in macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, **60**, 8-26.
- [119] Poltorak,A., He,X., Smirnova,I., Liu,M.Y., Van Huffel,C., Du,X., Birdwell,D., Alejos,E., Silva,M., Galanos,C., Freudenberg,M., Ricciardi-Castagnoli,P., Layton,B., & Beutler,B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, **282**, 2085-2088.
- [120] Qureshi,S.T., Lariviere,L., Leveque,G., Clermont,S., Moore,K.J., Gros,P., & Malo,D. (1999) Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J. Exp. Med.*, **189**, 615-625.
- [121] Hoshino,K., Takeuchi,O., Kawai,T., Sanjo,H., Ogawa,T., Takeda,Y., Takeda,K., & Akira,S. (1999) Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.*, **162**, 3749-3752.
- [122] Medzhitov,R., Preston-Hurlburt,P., & Janeway,C.A., Jr. (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, **388**, 394-397.
- [123] Wright,S.D., Tobias,P.S., Ulevitch,R.J., & Ramos,R.A. (1989) Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *J. Exp. Med.*, **170**, 1231-1241.

- [124] Wright,S.D., Ramos,R.A., Tobias,P.S., Ulevitch,R.J., & Mathison,J.C. (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, **249**, 1431-1433.
- [125] Haziot,A., Ferrero,E., Kontgen,F., Hijiya,N., Yamamoto,S., Silver,J., Stewart,C.L., & Goyert,S.M. (1996) Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity*, **4**, 407-414.
- [126] Shimazu,R., Akashi,S., Ogata,H., Nagai,Y., Fukudome,K., Miyake,K., & Kimoto,M. (1999) MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.*, **189**, 1777-1782.
- [127] Schromm,A.B., Lien,E., Henneke,P., Chow,J.C., Yoshimura,A., Heine,H., Latz,E., Monks,B.G., Schwartz,D.A., Miyake,K., & Golenbock,D.T. (2001) Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J. Exp. Med.*, **194**, 79-88.
- [128] Nunn,M.F., Seeburg,P.H., Moscovici,C., & Duesberg,P.H. (1983) Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature*, **306**, 391-395.
- [129] Leprince,D., Geronne,A., Coll,J., de Taisne,C., Schneeberger,A., Lagrou,C., & Stehelin,D. (1983) A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature*, **306**, 395-397.
- [130] Wasyluk,B., Hahn,S.L., & Giovane,A. (1993) The Ets family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.*, **211**, 7-18.
- [131] Maroulakou,I.G. & Bowe,D.B. (2000) Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: a regulatory network. *Oncogene*, **19**, 6432-6442.
- [132] Sato,Y. (2001) Role of ETS family transcription factors in vascular development and angiogenesis. *Cell Struct. Funct.*, **26**, 19-24.
- [133] Kola,I., Brookes,S., Green,A.R., Garber,R., Tymms,M., Papas,T.S., & Seth,A. (1993) The Ets1 transcription factor is widely expressed during murine embryo development and is associated with mesodermal cells involved in morphogenetic processes such as organ formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 7588-7592.
- [134] Bories,J.C., Willerford,D.M., Grevin,D., Davidson,L., Camus,A., Martin,P., Stehelin,D., & Alt,F.W. (1995) Increased T-cell apoptosis and terminal B-cell differentiation induced by inactivation of the Ets-1 proto-oncogene. *Nature*, **377**, 635-638.
- [135] Wernert,N., Justen,H.P., Rothe,M., Behrens,P., Dreschers,S., Neuhaus,T., Florin,A., Sachinidis,A., Vetter,H., & Ko,Y. (2002) The Ets 1 transcription factor is upregulated during inflammatory angiogenesis in rheumatoid arthritis. *J. Mol. Med.*, **80**, 258-266.
- [136] Goetze,S., Kintscher,U., Kaneshiro,K., Meehan,W.P., Collins,A., Fleck,E., Hsueh,W.A., & Law,R.E. (2001) TNFalpha induces expression of transcription factors c-fos, Egr-1, and Ets-1 in vascular lesions through extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Atherosclerosis*, **159**, 93-101.
- [137] Redlich,K., Kiener,H.P., Schett,G., Tohidast-Akrad,M., Selzer,E., Radda,I., Stummvoll,G.H., Steiner,C.W., Groger,M., Bitzan,P., Zenz,P., Smolen,J.S., & Steiner,G. (2001) Overexpression of transcription factor Ets-1 in rheumatoid arthritis synovial membrane: regulation of expression and activation by interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum.*, **44**, 266-274.
- [138] Ozaki,I., Mizuta,T., Zhao,G., Yotsumoto,H., Hara,T., Kajihara,S., Hisatomi,A., Sakai,T., & Yamamoto,K. (2000) Involvement of the Ets-1 gene in overexpression of matrilysin in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.*, **60**, 6519-6525.
- [139] McKinlay,L.H., Tymms,M.J., Thomas,R.S., Seth,A., Hasthorpe,S., Hertzog,P.J., & Kola,I. (1998) The role of Ets-1 in mast cell granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression and activation. *J. Immunol.*, **161**, 4098-4105.
- [140] Shaulian,E. & Karin,M. (2001) AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, **20**, 2390-2400.
- [141] Shaulian,E. & Karin,M. (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.*, **4**, E131-E136.

- [142] Shaywitz,A.J. & Greenberg,M.E. (1999) CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem.*, **68**, 821-861.
- [143] Ibelgaufts,H. (1992) *Lexikon Zytokine*. Medikon Verlag München.
- [144] Grynkiewicz,G., Poenie,M., & Tsien,R.Y. (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440-3450.
- [145] Saiki,R.K., Gelfand,D.H., Stoffel,S., Scharf,S.J., Higuchi,R., Horn,G.T., Mullis,K.B., & Erlich,H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- [146] Birnboim,H.C. & Doly,J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513-1523.
- [147] Calvin,N.M. & Hanawalt,P.C. (1988) High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.*, **170**, 2796-2801.
- [148] Livak,K.J., Flood,S.J., Marmaro,J., Giusti,W., & Deetz,K. (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.*, **4**, 357-362.
- [149] Higuchi,R., Fockler,C., Dollinger,G., & Watson,R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N. Y.)*, **11**, 1026-1030.
- [150] Sachs,L. (1997) *Angewandte Statistik*. Springer Verlag, Berlin.
- [151] Nakada,M., Yamashita,J., Okada,Y., & Sato,H. (1999) Ets-1 positively regulates expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and invasiveness of astrocytic tumors. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **58**, 329-334.
- [152] Lee,S.H., Wang,W., Yajima,S., Jose,P.A., & Mouradian,M.M. (1997) Tissue-specific promoter usage in the D1A dopamine receptor gene in brain and kidney. *DNA Cell Biol.*, **16**, 1267-1275.
- [153] Smale,S.T. (1997) Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1351**, 73-88.
- [154] Lee,S.H., Minowa,M.T., & Mouradian,M.M. (1996) Two distinct promoters drive transcription of the human D1A dopamine receptor gene. *J. Biol. Chem.*, **271**, 25292-25299.
- [155] Parks,C.L. & Shenk,T. (1996) The serotonin 1a receptor gene contains a TATA-less promoter that responds to MAZ and Sp1. *J. Biol. Chem.*, **271**, 4417-4430.
- [156] Augustin,L.B., Felsheim,R.F., Min,B.H., Fuchs,S.M., Fuchs,J.A., & Loh,H.H. (1995) Genomic structure of the mouse delta opioid receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **207**, 111-119.
- [157] McCuaig,K.A., Clarke,J.C., & White,J.H. (1994) Molecular cloning of the gene encoding the mouse parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 5051-5055.
- [158] Takai,Y., Sasaki,T., & Matozaki,T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.*, **81**, 153-208.
- [159] Coffey,P., de Jonge,M., Mettouchi,A., Binetruy,B., Ghysdael,J., & Kruijer,W. (1994) junB promoter regulation: Ras mediated transactivation by c-Ets-1 and c-Ets-2. *Oncogene*, **9**, 911-921.
- [160] Wasylyk,C., Gutman,A., Nicholson,R., & Wasylyk,B. (1991) The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *EMBO J.*, **10**, 1127-1134.
- [161] Lengyel,E., Stepp,E., Gum,R., & Boyd,D. (1995) Involvement of a mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the regulation of urokinase promoter activity by c-Ha-ras. *J. Biol. Chem.*, **270**, 23007-23012.
- [162] Karin,M. (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.*, **270**, 16483-16486.

- [163] Wasylyk,B., Wasylyk,C., Flores,P., Begue,A., Leprince,D., & Stehelin,D. (1990) The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature*, **346**, 191-193.
- [164] Chambers,A.F. & Tuck,A.B. (1993) Ras-responsive genes and tumor metastasis. *Crit Rev. Oncog.*, **4**, 95-114.
- [165] Westermarck,J., Seth,A., & Kahari,V.M. (1997) Differential regulation of interstitial collagenase (MMP-1) gene expression by ETS transcription factors. *Oncogene*, **14**, 2651-2660.
- [166] Logan,S.K., Garabedian,M.J., Campbell,C.E., & Werb,Z. (1996) Synergistic transcriptional activation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promoter via functional interaction of AP-1 and Ets-1 transcription factors. *J. Biol. Chem.*, **271**, 774-782.
- [167] Majerus,M.A., Bibollet-Ruche,F., Telliez,J.B., Wasylyk,B., & Bailleul,B. (1992) Serum, AP-1 and Ets-1 stimulate the human ets-1 promoter. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 2699-2703.
- [168] Wu,H., Moulton,K., Horvai,A., Parik,S., & Glass,C.K. (1994) Combinatorial interactions between AP-1 and ets domain proteins contribute to the developmental regulation of the macrophage scavenger receptor gene. *Mol. Cell Biol.*, **14**, 2129-2139.
- [169] Ginty,D.D., Bonni,A., & Greenberg,M.E. (1994) Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell*, **77**, 713-725.
- [170] Lengyel,E., Klostergaard,J., & Boyd,D. (1995) Stimulation of urokinase expression by TNF-alpha requires the activation of binding sites for the AP-1 and PEA3 transcription factors. *Biochim. Biophys. Acta*, **1268**, 65-72.
- [171] Stahel,P.F., Kariya,K., Shohami,E., Barnum,S.R., Eugster,H., Trentz,O., Kossmann,T., & Morganti-Kossmann,M.C. (2000) Intracerebral complement C5a receptor (CD88) expression is regulated by TNF and lymphotoxin-alpha following closed head injury in mice. *J. Neuroimmunol.*, **109**, 164-172.
- [172] Hodge,D.R., Robinson,L., Watson,D., Lautenberger,J., Zhang,X.K., Venanzoni,M., & Seth,A. (1996) Interaction of ETS-1 and ERGB/FLI-1 proteins with DNA is modulated by spacing between multiple binding sites as well as phosphorylation. *Oncogene*, **12**, 11-18.
- [173] Cowley,D.O. & Graves,B.J. (2000) Phosphorylation represses Ets-1 DNA binding by reinforcing autoinhibition. *Genes Dev.*, **14**, 366-376.
- [174] Fleischman,L.F., Pilaro,A.M., Murakami,K., Kondoh,A., Fisher,R.J., & Papas,T.S. (1993) c-Ets-1 protein is hyperphosphorylated during mitosis. *Oncogene*, **8**, 771-780.
- [175] McCloskey,M.A., Fan,Y., & Luther,S. (1999) Chemotaxis of rat mast cells toward adenine nucleotides. *J. Immunol.*, **163**, 970-977.
- [176] Zwirner,J., Werfel,T., Wilken,H.C., Theile,E., & Gotze,O. (1998) Anaphylatoxin C3a but not C3a(desArg) is a chemotaxin for the mouse macrophage cell line J774. *Eur. J. Immunol.*, **28**, 1570-1577.
- [177] Cui,Y.H., Le,Y., Gong,W., Proost,P., Van Damme,J., Murphy,W.J., & Wang,J.M. (2002) Bacterial lipopolysaccharide selectively up-regulates the function of the chemotactic peptide receptor formyl peptide receptor 2 in murine microglial cells. *J. Immunol.*, **168**, 434-442.
- [178] Safir,N., Wendel,A., Saile,R., & Chabraoui,L. (2003) The effect of selenium on immune functions of J774.1 cells. *Clin. Chem. Lab Med.*, **41**, 1005-1011.
- [179] Agnese,D.M., Calvano,J.E., Hahm,S.J., Calvano,S.E., & Lowry,S.F. (2002) Insulin-like growth factor binding protein-3 is upregulated in LPS-treated THP-1 cells. *Surg. Infect. (Larchmt.)*, **3**, 119-125.
- [180] Lee,C.G., Demarquoy,J., Jackson,M.J., & O'Brien,W.E. (1994) Molecular cloning and characterization of a murine LPS-inducible cDNA. *J. Immunol.*, **152**, 5758-5767.
- [181] Cohly,H., Stephens,J., Markhov,A., Angel,M., Campbell,W., Ndebele,K., & Jenkins,J. (2001) Cell culture conditions affect LPS inducibility of the inflammatory mediators in J774A.1 murine macrophages. *Immunol. Invest.*, **30**, 1-15.

- [182] Martin,C.A. & Dorf,M.E. (1990) Interleukin-6 production by murine macrophage cell lines P388D1 and J774A.1: stimulation requirements and kinetics. *Cell Immunol.*, **128**, 555-568.
- [183] Ermert,M., Pantazis,C., Duncker,H.R., Grimminger,F., Seeger,W., & Ermert,L. (2003) In situ localization of TNFalpha/beta, TACE and TNF receptors TNF-R1 and TNF-R2 in control and LPS-treated lung tissue. *Cytokine*, **22**, 89-100.
- [184] Mo,J.S., Matsukawa,A., Ohkawara,S., & Yoshinaga,M. (1998) Involvement of TNF alpha, IL-1 beta and IL-1 receptor antagonist in LPS-induced rabbit uveitis. *Exp. Eye Res.*, **66**, 547-557.
- [185] Pozo,D., Guerrero,J.M., & Calvo,J.R. (2002) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit LPS-stimulated MIP-1alpha production and mRNA expression. *Cytokine*, **18**, 35-42.
- [186] Penido,C., Castro-Faria-Neto,H.C., Vieira-de-Abreu,A., Figueiredo,R.T., Pelled,A., Martins,M.A., Jose,P.J., Williams,T.J., & Bozza,P.T. (2001) LPS induces eosinophil migration via CCR3 signaling through a mechanism independent of RANTES and Eotaxin. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **25**, 707-716.
- [187] Kim,J.H., Lee,S.Y., Bak,S.M., Suh,I.B., Lee,S.Y., Shin,C., Shim,J.J., In,K.H., Kang,K.H., & Yoo,S.H. (2004) Effects of Matrix Metalloproteinase Inhibitor on LPS-induced Goblet Cell Metaplasia. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.*
- [188] Nomura,H., Nielsen,B.W., & Matsushima,K. (1993) Molecular cloning of cDNAs encoding a LD78 receptor and putative leukocyte chemotactic peptide receptors. *Int. Immunol.*, **5**, 1239-1249.

Abbildungsverzeichnis

- ABBILDUNG 2.1: DIE DREI AKTIVIERUNGSWEGE DES KOMPLEMENTSYSTEMS. AUS M. J. WALPORT, NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICIN, VOL. 344, NR. 14 (APRIL 2001)[1].----- 4
- ABBILDUNG 2.2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES C5AR NACH DEM „ZWEI-SEITEN-BINDUNGSMODELL“ VON SICILIANO 1994 [52]. DIE ERSTE BINDUNGSSTELLE (*SITE 1*) DES C5A-MOLEKÜLS INTERAGIERT MIT DEM N-TERMINALEN BEREICH DES REZEPTORS. DER C-TERMINALE BEREICH DES LIGANDEN DURCHDRINGT DIE PORE DER SIEBEN TRANSMEMBRANEN HELICES DES C5AR (*SITE 2*). ----- 9
- ABBILDUNG 2.3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES C3AR. DAS C3A-MOLEKÜL WEIST EBENFALLS ZWEI HAUPTBINDUNGSSTELLEN AUF. DIE C-TERMINAL GELEGENE HELIKALE REGION DES LIGANDEN STELLT DIE „NICHT-WIRKSAME“ BINDUNGSSTELLE (*SITE 1*) DAR, SIE INTERAGIERT ENTWEDER MIT DEM GROßEN EXTRAZELLULÄREN LOOP ODER MIT DEM N-TERMINALEN BEREICH DES REZEPTORS. DIE C-TERMINAL GELEGENE „WIRKSAME“ BINDUNGSSTELLE DES C3A (*SITE 2*) BINDET INNERHALB DER DURCH DIE SIEBEN TRANSMEMBRANEN HELICES AUFGESPANNTEN PORE DES C3AR. (DESIGN NACH DEM C5A/C5AR-MODELL VON SICILIANO 1994).----- 12
- ABBILDUNG 2.4: DIE TLR-4 NACH-GESCHALTETEN SIGNALKASKADEN. DIE MITGLIEDER DER TOLL-LIKE/IL-1 REZEPTOR-FAMILIE TEILEN VERSCHIEDENE SIGNALKOMPONENTEN, WIE DAS ADAPTERPROTEIN MYD88, DAS *TOLL-INTERACTING PROTEIN* (TOLLIP), DIE PROTEIN-KINASE IRAK (*IL-1R-ASSOCIATED KINASE*) UND TRAF6 (*TNF RECEPTOR-ASSOCIATED FACTOR 6*). TRAF6 KANN NF- κ B ÜBER TAK1 (*TGF- β -ACTIVATED KINASE*) UND JNK (C-JUN N-TERMINAL KINASE) SOWIE DIE P38 MAP-KINASE ÜBER MKK6 (*MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE 6*) AKTIVIEREN. TLR-4-SPEZIFISCHE SIGNALKOMPONENTEN SIND DAS TIRAP (*TOLL/IL-1 RECEPTOR DOMAIN-CONTAINING ADAPTOR PROTEIN*) UND DIE PROTEIN-KINASE PKR. ----- 16
- ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ERGEBNISSES EINER FLUORESCENZ-MESSUNG WÄHREND EINER REAL-TIME PCR. AUFGETRAGEN IST DIE ZYKLENZAHL DER PCR (CYCLE NUMBER) GEGEN DIE NORMALISIERTE FLUORESCENZ-INTENSITÄT (NORMALIZED FLUORESCENCE INTENSITY) FÜR EINE PROBE (SAMPLE) UND EINE NEGATIV-KONTROLLE OHNE CDNA (NO TEMPLATE CONTROL, NTC). DER C_T -WERT, DIE ZYKLENZAHL BEI DER DAS FLUORESCENZSIGNAL DER PROBE AUS DEM HINTERGRUND (THRESHOLD) HERAUSTRITT, WURDE HIER DURCH EINEN PFEIL GEKENNZEICHNET. ----- 51
- ABBILDUNG 4.1: ANORDNUNG DER ZUR EINGRENZUNG DES TRANSKRIPTIONSSTARTS VERWENDETEN PRIMER IN DER 5'-UTR DES hC3AR. POTENTIELLE CAP-SIGNALE SIND FETT UND KURSIV, DIE ÜBERGÄNGE ZUM INTRON GRAU UND DAS ATG-STARTCODON FETT UND DIE BEIDEN POTENTIELLEN TATA-BOX-ELEMENTE FETT UND GRAU UNTERLEGT DARGESTELLT. ----- 72
- ABBILDUNG 4.2: AGAROSEGELELEKTROPHORESE NACH RT-PCR VON GESAMT-RNA AUS HMC-1-ZELLEN MIT VERSCHIEDENEN SENSE-PRIMERN, DIE IN DER 5'-UTR DES C3AR BINDEN UND DEM RAS-PRIMER TC8, DER IM ORF BINDET. MIT ALLEN PRIMERPAAREN KONNTE EIN AMPLIFIKAT DETEKTIERT WERDEN, WOBEI DIE PRIMERKOMBINATIONEN BSS4/TC8 UND MS17/TC8 SEHR SCHWACHE BANDEN AUFZEIGTEN. ----- 73
- ABBILDUNG 4.3: AGAROSEGELELEKTROPHORESE NACH RT-PCR VON GESAMT-RNA AUS BT₂-CAMP-DIFFERENZIIERTEN U937-ZELLEN MIT VERSCHIEDENEN SENSE-PRIMERN, DIE IN DER 5'-UTR DES C3AR BINDEN UND DEM RAS-PRIMER TC8, DER IM ORF BINDET. MIT ALLEN PRIMERPAAREN KONNTE EIN AMPLIFIKAT DETEKTIERT WERDEN. - 74
- ABBILDUNG 4.4: ERGEBNIS DER REPORTERGEN-STUDIE MIT DEM pSEAP2-E-1511 WILDTYP-PROMOTORKONSTRUKT UND DEN BEIDEN TATA-EINZELMUTANTEN, 1511_MUTTATA-1 BZW. 1511_MUTTATA-2, DES HUMANEN C3AR IN HMC-1-ZELLEN. AUFGEFÜHRT SIND DIE GEMITTELTEN C3AR-PROMOTORAKTIVITÄTEN (UND STANDARDABWEICHUNG) AUS ZWEI EXPERIMENTEN, WOBEI VON JEDEM KONSTRUKT ZWEI KLONE IN DOPPELWERTEN VERMESSEN WORDEN SIND. ----- 76
- ABBILDUNG 4.5: „LANGE“ PROMOTORKONSTRUKTE DES HUMANEN C3AR (LINKS) UND DIE ERGEBNISSE DES ZUGEHÖRIGEN REPORTERGEN-ASSAYS IN HMC-1-ZELLEN (RECHTS). DIE X-ACHSE AUF DER LINKEN SEITE GIBT DIE NUKLEOTIDPOSITION IN EXON 1 DES C3AR-GENS IN BEZUG ZUM ATG-STARTCODON (MIT +1) WIEDER. DIE SCHWARZEN BALKEN STELLEN DIE BEREICHE DER 5'-UTR DAR, DIE IN DEN pSEAP2-E-REPORTERVEKTOR KLONIERT WURDEN. DIE KONSTRUKT-BEZEICHNUNG SPIEGELT DIE LÄNGE DES PROMOTORFRAGMENTES WIEDER. AUFGEZEIGT SIND MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG VON DREI UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN (MIT DOPPELWERTEN IN JEDEM TEST). ----- 77

- ABBILDUNG 4.6: „KURZE“ PROMOTORKONSTRUKTE DES HUMANEN C3AR (LINKS) UND DIE ERGEBNISSE DES ZUGEHÖRIGEN REPORTERGEN-ASSAYS IN HMC-1-ZELLEN (RECHTS). DIE X-ACHSE AUF DER LINKEN SEITE GIBT DIE NUKLEOTIDPOSITION IN EXON 1 DES C3AR-GENS IN BEZUG ZUM ATG-STARTCODON (MIT +1) WIEDER. DIE SCHWARZEN BALKEN STELLEN DIE BEREICHE DER 5'-UTR DAR, DIE IN DEN PSEAP2-E-REPORTERVEKTOR KLONIERT WURDEN. DIE KONSTRUKT-BEZEICHNUNG SPIEGELT DIE LÄNGE DES PROMOTORFRAGMENTES WIEDER. AUFGEZEIGT SIND MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG VON DREI UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN (MIT DOPPELWERTEN IN JEDEM TEST). ----- 78
- ABBILDUNG 4.7: ÜBERSICHT ALLER NEU-GENERIERTEN C3AR-PROMOTORKONSTRUKTE IM VERGLEICH ZUM PSEAP2-E-267 UND -142. AUFGEFÜHRT SIND DIE LÄNGE (KONSTRUKT-BEZEICHNUNG) UND DIE POSITION IN DER 5'-UTR. FOLGENDE PRIMER WURDEN ZUR AMPLIFIKATION DER INSERTS VERWENDET: BSS21/BSR11 FÜR PSEAP2-E-212, BSS22/BSR11 FÜR PSEAP2-E-197, BSS25/BSR11 FÜR PSEAP2-E-162, BSS13/BSR26 FÜR PSEAP2-E-206 UND BSS13/BSR25 FÜR PSEAP2-E-187. ----- 79
- ABBILDUNG 4.8: 5'-DELETIONSMUTANTEN DES HUMANEN C3AR (LINKS) UND DIE ERGEBNISSE DES ZUGEHÖRIGEN REPORTERGEN-ASSAYS IN HMC-1-ZELLEN (RECHTS). NEBEN DEN NEU-GENERIERTEN PLASMIDEN PSEAP2-E-212, -197 UND -162 IST DAS PSEAP2-E-267 ALS VERGLEICHSKONSTRUKT MIT VERMESSEN WORDEN. DIE X-ACHSE AUF DER LINKEN SEITE GIBT DIE NUKLEOTIDPOSITION IN EXON 1 DES C3AR-GENS IN BEZUG ZUM ATG-STARTCODON (MIT +1) WIEDER. DIE SCHWARZEN BALKEN STELLEN DIE BEREICHE DER 5'-UTR DAR, DIE IN DEN PSEAP2-E-REPORTERVEKTOR KLONIERT WURDEN. DIE KONSTRUKT-BEZEICHNUNG SPIEGELT DIE LÄNGE DES PROMOTORFRAGMENTES WIEDER. AUFGEZEIGT SIND MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG VON DREI UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN (MIT DOPPELWERTEN IN JEDEM TEST).----- 80
- ABBILDUNG 4.9: 3'-DELETIONSMUTANTEN DES HUMANEN C3AR (LINKS) UND DIE ERGEBNISSE DES ZUGEHÖRIGEN REPORTERGEN-ASSAYS IN HMC-1-ZELLEN (RECHTS). NEBEN DEN NEU-GENERIERTEN PLASMIDEN PSEAP2-E-206 UND -187 SIND DIE KONSTRUKTE PSEAP2-E-267 UND -142 ZUM VERGLEICH DER AKTIVITÄTEN MIT VERMESSEN WORDEN. DIE X-ACHSE AUF DER LINKEN SEITE GIBT DIE NUKLEOTIDPOSITION IN EXON 1 DES C3AR-GENS IN BEZUG ZUM ATG-STARTCODON (MIT +1) WIEDER. DIE SCHWARZEN BALKEN STELLEN DIE BEREICHE DER 5'-UTR DAR, DIE IN DEN PSEAP2-E-REPORTERVEKTOR KLONIERT WURDEN. DIE KONSTRUKT-BEZEICHNUNG SPIEGELT DIE LÄNGE DES PROMOTORFRAGMENTES WIEDER. AUFGEZEIGT SIND MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG VON DREI UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN (MIT DOPPELWERTEN IN JEDEM TEST).----- 80
- ABBILDUNG 4.10: GRAUSTUFEN-DARSTELLUNG DER UNTERSCHIEDLICH STARK REGULATORISCH WIRKSAMEN BEREICHE DES C3AR-PROMOTORS VON POSITION – 18 BIS – 286. ----- 81
- ABBILDUNG 4.11: EFFEKT VON TRANSIENT ÜBEREXPRIMIERTEM ETS-1 ALLEIN UND IN GEGENWART VON HA-RAS AUF DIE AKTIVITÄT DES PSEAP2-E-267 WILDTYP-PROMOTORKONSTRUKTES UND DIE ETS-1 BINDUNGSSTELLENMUTANTE 267_MUTETS-1 (MUTIERT AN POSITION – 207) IN HMC-1-ZELLEN. DIE PROZENTANGABEN DER C3AR-PROMOTORAKTIVITÄT BEZIEHEN SICH AUF DIE AKTIVITÄT DES PSEAP2-E-267 MIT 100 %. DARGESTELLT SIND MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG VON DREI UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN (MIT DOPPELWERTEN IN JEDEM TEST). ----- 83
- ABBILDUNG 4.12: EFFEKT VON TRANSIENT ÜBEREXPRIMIERTEM C-JUN UND/ODER C-FOS UND/ODER HA-RAS AUF DIE AKTIVITÄT DES PSEAP2-E-267 WILDTYP-PROMOTORKONSTRUKTES UND DIE AP-1 BINDUNGSSTELLENMUTANTE 267_MUTAP-1 (MUTIERT AN POSITION – 225/226) IN HMC-1-ZELLEN. DIE PROZENTANGABEN DER C3AR-PROMOTORAKTIVITÄT BEZIEHEN SICH AUF DIE AKTIVITÄT DES PSEAP2-E-267 MIT 100 %. DARGESTELLT SIND MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG VON DREI UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN (MIT DOPPELWERTEN IM TEST). ----- 84
- ABBILDUNG 4.13: EFFEKT DER TRANSIENTEN ÜBEREXPRESSION VON ETS-1 UND/ODER AP-1 IN GEGENWART VON HA-RAS AUF DIE AKTIVITÄT DES PSEAP2-E-267 WILDTYP-PROMOTORKONSTRUKTES UND DIE KONSTRUKTE MIT MUTIERTEM TF-BINDEMOTIV, 267_MUTETS-1 (MUTIERT AN POSITION – 207) BZW. 267_MUTAP-1 (MUTIERT AN POSITION – 225/226), IN HMC-1-ZELLEN. DIE PROZENTANGABEN DER C3AR-PROMOTORAKTIVITÄT BEZIEHEN SICH AUF DIE AKTIVITÄT DES PSEAP2-E-267 MIT 100 %. DARGESTELLT SIND MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG VON DREI UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN (MIT DOPPELWERTEN IM TEST). ----- 85
- ABBILDUNG 4.14: EFFEKT DER TRANSIENTEN ÜBEREXPRESSION VON ETS-1 ODER ETS-2 IN GEGENWART VON AP-1 AUF DIE AKTIVITÄT DES PSEAP2-E-267 WILDTYP-PROMOTORKONSTRUKTES UND DAS KONSTRUKT MIT MUTIERTEM

- ETS-1 BINDEMOTIV, 267_MUTETS-1 (MUTIERT AN POSITION – 207), IN HMC-1-ZELLEN. HA-RAS WURDE BEI ALLEN ANSÄTZEN EBENFALLS KO-TRANSFIZIERT. DIE PROZENTANGABEN DER C3AR-PROMOTORAKTIVITÄT BEZIEHEN SICH AUF DIE AKTIVITÄT DES pSEAP2-E-267 MIT 100 %. DARGESTELLT SIND MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG VON DREI UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN (MIT DREIFACHWERTEN IN JEDEM TEST). SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE ($P < 0,01$) SIND MIT # BZW. * GEKENNZEICHNET. BEI DENEN DURCH EINE GESTRICHELTEN LINIE VERBUNDENEN SÄULEN KONNTE KEINE SIGNIFIKANTE ABWEICHUNG DETEKTIERT WERDEN ($P > 0,6$).-----86
- ABBILDUNG 4.15: DARSTELLUNG DER PUTATIVEN CREB-BINDUNGSSTELLEN IN DEN DREI PROMOTORKONSTRUKTEN pSEAP2-E-267, -206 UND -187. -----87
- ABBILDUNG 4.16: ERGEBNISSE DES SEAP-ASSAYS NACH TRANSIENTER TRANSFEKTION VON HMC-1-ZELLEN MIT DEM REPORTERVEKTOR pSEAP2-E, DEN WILD-TYP-PROMOTORKONSTRUKTEN pSEAP2-E-206 UND -187 SOWIE DEN CREB-BINDUNGSSTELLENMUTANTEN 206_MUTCREB UND 187_MUTCREB. DIE CREB-BINDUNGSSTELLE WURDE AN POSITION – 197/198 MUTIERT. DARGESTELLT SIND MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG VON JE ZWEI UNABHÄNGIGEN TRANSFEKTIONEN (MIT DOPPELWERTEN IM SEAP-TEST), WOBEI DIE INTENSITÄTEN VON JE ZWEI UNABHÄNGIGEN KLONEN MIT MUTIERTEM CREB-BINDEMOTIV ZUSÄTZLICH GEMITTELT WORDEN SIND. SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE ($P < 0,05$) SIND MIT # BZW. * GEKENNZEICHNET. -----87
- ABBILDUNG 4.17: ERGEBNISSE DES SEAP-ASSAYS NACH TRANSIENTER TRANSFEKTION VON HMC-1-ZELLEN MIT DEM REPORTERVEKTOR pSEAP2-E, DEM WILD-TYP-PROMOTORKONSTRUKT pSEAP2-E-267 UND DER CREB-BINDUNGSSTELLENMUTANTE 267_MUTCREB. DIE CREB-BINDUNGSSTELLE WURDE AN POSITION – 96/97 MUTIERT. DARGESTELLT SIND MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG VON JE VIER UNABHÄNGIGEN TRANSFEKTIONEN (MIT DOPPELWERTEN IM SEAP-TEST), WOBEI DIE INTENSITÄTEN VON ZWEI UNABHÄNGIGEN KLONEN MIT MUTIERTEM CREB-BINDEMOTIV ZUSÄTZLICH GEMITTELT WORDEN SIND. BEI DEN DURCH GESTRICHELTE LINIEN VERBUNDENEN SÄULEN KONNTE KEINE SIGNIFIKANTE ABWEICHUNG VERZEICHNET WERDEN ($P > 0,05$). -----88
- ABBILDUNG 4.18: FACS-ANALYSE DER TRANSFIZIERTEN HEK293-ZELLEN. DER ERSTE DOTPLOT SPIEGELT DIE NEGATIVKONTROLLE (LEERVEKTOR/PCDNA3.1HISB-TRANSFIZIERTE ZELLEN) UND DER ZWEITE DOTPLOT DIE POSITIVKONTROLLE (PCDNA3-C3AR^{WT}-TRANSFIZIERTE ZELLEN) WIEDER. IM DRITTEN DOTPLOT SIND DIE NACH TRANSFEKTION MIT DEN VIER PLASMIDEN pCDNA3-ETS-1, C-JUN, C-FOS UND HA-RAS MARKIERTEN ZELLEN AUFGEFÜHRT. DIE PROZENTZAHLEN GEBEN DIE ANZAHL DER ZELLEN WIEDER, DIE DEN C3AR EXPRIEMIEREN, GEFÄRBT MIT DEM POLYKLONALEN ANTI-C3AR-ANTISERUM. -----94
- ABBILDUNG 4.19: ERGEBNISSE DER ZUM SCREENING EINGESETZTEN SEMIQUANTITATIVEN KOMPETITIVEN ¹²⁵I-C5A-BINDUNGSSTUDIE. U937-ZELLEN WURDEN FÜR 72, 24, 12 UND 4 H (SIEHE LEGENDE, RECHTS OBEN) MIT BT₂-cAMP [1 mM], IFN- γ [300 U/M], IL-1 [10 NG/ML], IL-3 [50 NG/ML], IL-6 [100 NG/ML], GM-CSF [50 NG/ML] UND TNF- α [100 NG/ML] STIMULIERT. DARGESTELLT SIND MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG VON DREIFACHWERTEN AUS EINEM EXPERIMENT. DIE SPEZIFISCHE BINDUNG ALS MAß FÜR DIE ANZAHL DER INDUZIERTEN C5AR ERGIBT SICH AUS DER DIFFERENZ VON GESAMTBINDUNG (OHNE VERDRÄNGER) UND UNSPEZIFISCHER BINDUNG (MIT 200 nM NICHT-MARKIERTEM C5A). AUF DIE ABWEICHENDE SKALIERUNG BEI DER GRAPHIK FÜR DIE BT₂-cAMP STIMULIERTEN ZELLEN IST ZU ACHTEN (600 CPM SIND MIT GESTRICHELTER LINIE HERVORGEHOBBEN). -----96
- ABBILDUNG 4.20: RESULTAT DER TAQMAN[®] REAL-TIME RT-PCR DER DURCH 50 NG/ML TNF- α INDUZIERTEN HOCHREGULATION DER C3AR-MRNA IN U937-ZELLEN (KINETIK). DARGESTELLT IST DER MITTELWERT AUS DOPPELWERTEN EINES REPRÄSENTATIVEN TESTS AUS EINER REIHE VON DREI UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN. DIE ERRECHNETEN INDUKTIONSFAKTOREN BEZIEHEN SICH IMMER AUF DIE FÜR DEN JEWEILIGEN ZEITPUNKT MITGEFÜHRTE PUFFERKONTROLLE. -----97
- ABBILDUNG 4.21: TAQMAN[®] REAL-TIME RT-PCR: KOOPERATIVE INDUKTION DER C3AR-MRNA DURCH TNF- α UND IFN- γ . DIE U937-ZELLEN WURDEN FÜR 72 H MIT 1000 U/ML IFN- α (ODER PUFFER) UND/ODER FÜR 4 H MIT 50 NG/ML TNF- α (ODER PUFFER) BEHANDELT. DARGESTELLT SIND DIE ERGEBNISSE VON DREI UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN (MITTELWERT AUS DOPPELWERTEN). ----- 100

ABBILDUNG 4.22: DURCHFLUßZYTOMETRISCHER NACHWEIS DER eGFP-POSITIVEN ZELLEN NACH RETROVIRALER INFEKTION MIT DEM EXPRESSIONSVEKTOR pSF91-IRES-eGFP-PRE UND DEN DREI VERSCHIEDENEN <i>ENV</i> -PLASMIDEN RD114, VSV-G UND GALV AN HT1080-ZELLEN. -----	103
ABBILDUNG 4.23: DURCHFLUßZYTOMETRISCHER NACHWEIS DER eGFP-POSITIVEN ZELLEN NACH RETROVIRALER INFEKTION MIT DEM EXPRESSIONSVEKTOR pSF91-IRES-eGFP-PRE UND DEN DREI VERSCHIEDENEN <i>ENV</i> -PLASMIDEN RD114, VSV-G UND GALV AN U937-ZELLEN. -----	103
ABBILDUNG 4.24: DURCHFLUßZYTOMETRISCHER NACHWEIS DER eGFP-POSITIVEN ZELLEN NACH RETROVIRALER INFEKTION MIT DEM EXPRESSIONSVEKTOR pSF91-IRES-eGFP-PRE UND DEN DREI VERSCHIEDENEN <i>ENV</i> -PLASMIDEN RD114, VSV-G UND GALV AN HL-60-ZELLEN. -----	104
ABBILDUNG 4.25: DURCHFLUßZYTOMETRISCHER NACHWEIS DER eGFP-POSITIVEN ZELLEN NACH RETROVIRALER INFEKTION MIT DEM EXPRESSIONSVEKTOR pSF91-IRES-eGFP-PRE UND DEN DREI VERSCHIEDENEN <i>ENV</i> -PLASMIDEN RD114, VSV-G UND GALV AN HMC-1-ZELLEN. -----	104
ABBILDUNG 4.26: DURCHFLUßZYTOMETRISCHE UNTERSUCHUNG DER IN PHOENIX-GP-ZELLEN GENERIERTEN pSF91-IRES-eGFP-PRE-ETS-1 VIRUSÜBERSTÄNDE 2, 3 UND 4 (200 µL INFETIONSOLUMEN) AN HT1080-ZELLEN. DIE HERVORGEHOBENEN PROZENTZAHLEN GEBEN DIE eGFP-POSITIVEN ZELLEN WIEDER. -----	106
ABBILDUNG 4.27: DURCHFLUßZYTOMETRISCHE UNTERSUCHUNG DES IN 293GPG-ZELLEN GENERIERTEN pSF91-IRES-eGFP-PRE-ETS-1 VIRUSÜBERSTANDES AN A549-ZELLEN. AUFGEZEIGT SIND DIE NICHT INFIZIERTEN ZELLEN (NEG. KONTR.) SOWIE DIE UNTERSCHIEDLICH VERDÜNNTEN ÜBERSTÄNDE. DIE HERVORGEHOBENEN PROZENTZAHLEN GEBEN DIE eGFP-POSITIVEN ZELLEN WIEDER. -----	109
ABBILDUNG 4.28: FACS-ANALYSE DER MIT DEM IN 293GPG-ZELLEN GENERIERTEN ETS-1 VIRUSÜBERSTAND TRANSDUZIERTEN ZELLINIEN. DARGESTELLT SIND DIE eGFP-POSITIVEN ZELLEN IN PROZENT. DIE INFEKTION ERFOLGTE LAUT PROTOKOLL (SIEHE 3.3.2.2). ZUSÄTZLICH WURDE EIN ZWEITER ANSATZ JEDER ZELLEN FÜR 1 STUNDE BEI 37°C UND 2000 RPM ZENTRIFUGIERT. AUFGEZEIGT SIND JEWEILS DIE DATEN OHNE UND MIT ZENTRIFUGATION DER UNVERDÜNNTEN UND 1:10-VERDÜNNTEN VIRUSÜBERSTÄNDE. DIE ALS POSITIVKONTROLLE MITGEFÜHRTE A549-ZELLEN WAREN OHNE ZENTRIFUGATION BEI UNVERDÜNNTEM ÜBERSTAND ZU 78 % INFIZIERT. -----	110
ABBILDUNG 4.29: FACS-ANALYSE DER MIT DEM IN 293GPG-ZELLEN GENERIERTEN ETS-1 VIRUSÜBERSTAND TRANSDUZIERTEN ZELLINIE U937. DARGESTELLT SIND DIE eGFP-POSITIVEN ZELLEN IN PROZENT. DIE INFEKTION ERFOLGTE LAUT PROTOKOLL (SIEHE 3.3.2.2), WOBEI DIE VIREN FÜR ZWEI STUNDEN BEI 37°C UND 2000 RPM IN GEGENWART VON PROTAMINSULFAT AUFZENTRIFUGIERT WURDEN. VERGLICHEN WURDE HIER EINE EINMALIGEN MIT EINER ZWEI- BZW. DREIMALIGEN INFEKTION IM ABSTAND VON 24 STUNDEN. -----	111
ABBILDUNG 4.30: FACS-ANALYSE DER 293GPG-ZELLEN NACH TRANSFEKTION MIT DEM pQCXIN-eGFP KONSTRUKT UND FÜNFTÄGIGER VIRUSPRODUKTION. AUFGEZEIGT IST DIE eGFP-FLUORESZENZ VON NICHT TRANSFIZIERTEN UND TRANSFIZIERTEN 293GPG-ZELLEN. -----	113
ABBILDUNG 4.31: FACS-ANALYSE DER MIT DEM pQCXIN-eGFP VIRUSÜBERSTAND TRANSDUZIERTEN A549-ZELLEN. DARGESTELLT IST DIE eGFP-FLUORESZENZ VON A549-ZELLEN, DIE NUR MIT MEDIUM BZW. DEM pQCXIN-eGFP VIRUSÜBERSTAND BEHANDELT WORDEN IST. -----	114
ABBILDUNG 4.32: DURCHFLUßZYTOMETRISCHE ÜBERPRÜFUNG DER MIT pQCXIN-eGFP STABIL TRANSDUZIERTEN ZELLINIEN HeLaT, U937, HMC-1 UND HEK293 NACH 14-TÄGIGER SELEKTION MIT G418 IM VERGLEICH ZU LEERVEKTOR TRANSDUZIERTEN ZELLEN. DIE HERVORGEHOBENEN PROZENTZAHLEN GEBEN DIE ANZAHL AN eGFP-POSITIVEN ZELLEN WIEDER. -----	116
ABBILDUNG 4.33: DURCHFLUßZYTOMETRISCHER NACHWEIS DES C3AR UND C5AR AUF HUMANEN MONOZYTEN NACH DREITÄGIGER KULTUR IN RPMI + 10 % AB-SERUM UNTER VERWENDUNG DER MONOKLONALEN ANTIKÖRPER 8H1 UND W17/1. DIE HOHE EXPRESSION DES C5AR LIEGT GRÖBTEILS AUßERHALB DES MESS- BZW. DARSTELLUNGSBEREICHES. ALS KONTROLLE FÜR UNSPEZIFISCHE BINDUNG WURDE EIN KOMMERZIELL ERHÄLTLICHER ISOTYPISCHER IGG ₁ -ANTI-KÖRPER VERWENDET. -----	123
ABBILDUNG 4.34: DURCHFLUßZYTOMETRISCHER NACHWEIS DES C5AR AUF HUMANEN MONOZYTEN NACH DREITÄGIGER KULTUR IN RPMI + 10 % AB-SERUM UNTER VERWENDUNG DES MONOKLONALEN ANTIKÖRPER W17/1. AUFGEZEIGT SIND NICHT STIMULIERTE, SOWIE FÜR 1 H UND 24 H MIT 300 U/ML STIMULIERTE ZELLEN. ALS	

- KONTROLLE FÜR UNSPEZIFISCHE BINDUNG WURDE EIN KOMMERZIELL ERHÄLTLICHER ISOTYPISCHER IGG₁-ANTIKÖRPER VERWENDET. ----- 123
- ABBILDUNG 4.35: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHER NACHWEIS DES C5AR AUF HUMANEN MONOZYTEN NACH SIEBENTÄGIGER KULTUR IN RPMI + 10 % AB-SERUM UNTER VERWENDUNG DES MONOKLONALEN ANTIKÖRPERS W17/1. AUFGEZEIGT SIND NICHT STIMULIERTE, SOWIE FÜR 1 H MIT 300 U/ML STIMULIERTE ZELLEN. ALS KONTROLLE FÜR UNSPEZIFISCHE BINDUNG WURDE EIN KOMMERZIELL ERHÄLTLICHER ISOTYPISCHER IGG₁-ANTIKÖRPER VERWENDET. ----- 124
- ABBILDUNG 4.36: KOMPETITIVE ¹²⁵I-C5A-BINDUNGSSTUDIE AN PRIMÄREN HUMANEN MONOZYTEN. DIE ÜBER FICOLL-PAQUE™ UND ADHÄRENZ AUFGEREINIGTEN MONOZYTEN WURDEN IN RPMI MIT 10 % AB-SERUM KULTIVIERT. DIE ED₅₀ LIEGT ETWA BEI 23 nM. ----- 124
- ABBILDUNG 4.37: KOMPETITIVE ¹²⁵I-C3A-BINDUNGSSTUDIE AN DER MURINEN ZELLINIE J774A.1. AUFGETRAGEN SIND DIE GEMESSENEN CPM GEGEN DIE ANSTIEGENDEN KONZENTRATIONEN DES KALTEN VERDRÄNGERS C3A (MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG VON JE VIER WERTEN). ALS POSITIVKONTROLLE WURDE DIE HUMANE MASTZELLINIE HMC-1 MITGEFÜHRT. HIERBEI WURDE LEDIGLICH EINE ZWEIPUNKTMESSUNG DURCHGEFÜHRT: OHNE ZUGABE DES KALTEN VERDRÄNGERS ERGABEN SICH 1603 CPM (GESAMTBINDUNG), UNTER ZUGABE VON 500 nM KALTEM C3A KONNTEN 140 CPM (UNSPECIFISCHE BINDUNG) GEMESSEN WERDEN. ED₅₀ = 2 nM. ----- 125
- ABBILDUNG 4.38: SEMIQUANTITATIVE KOMPETITIVE ¹²⁵I-C3A- UND C5A-BINDUNGSSTUDIEN AN DER MURINEN ZELLINIE J774A.1, DIE ZUVOR FÜR 0, 1 UND 24 STUNDEN MIT 300 U/ML IFN- γ STIMULIERT WURDE. AUFGETRAGEN SIND DIE GEMESSENEN CPM GEGEN DEN ZEITRAUM DER STIMULATION MIT IFN- γ . BEI DER ORIENTIERENDEN ¹²⁵I-C3A-BINDUNGSSTUDIE WURDE MIT 500 nM KALTEM C3A VERDRÄNGT, WOHINGEGEN BEI DER ¹²⁵I-C5A-BINDUNGSSTUDIE EINE KONZENTRATION VON 250 nM AN KALTEM VERDRÄNGER C5A AUSREICHEND WAR. ---- 126
- ABBILDUNG 4.39: AUFTRAGUNG DER KONZENTRATION AN FREIEM ZYTOSOLISCHEN Ca²⁺ NACH STIMULATION DER PRIMÄREN HUMANEN MONOZYTEN MIT C5A UND C3A. DIE MONOZYTEN WAREN ÜBER FICOLL-PAQUE™ UND ADHÄRENZ AUFGEREINIGT. DER TEST WURDE VIER TAGE NACH DER ISOLATION DER ZELLEN DURCHGEFÜHRT. DIE STIMULI WURDEN IN FOLGENDEN ENDKONZENTRATIONEN ZUGESETZT: C5A \rightarrow 20 nM, C3A \rightarrow 40 nM. DARGESTELLT SIND DIE MESSWERTE VON ZWEI UNTERSCHIEDLICHEN SPENDERN. ----- 127
- ABBILDUNG 4.40: NACHWEIS DER C3A-KONZENTRATION IN MONOZYTEN-ÜBERSTÄNDEN NACH NULL- UND 24-STÜNDIGER STIMULATION MIT 50 nM C3A IN GEGENWART VON 1,5 mM PLUMMER'S INHIBITOR UND 50 mM 6-AMINOHEXANSÄURE. DARGESTELLT SIND DIE ANHAND DER C3A-STANDARDREIHE BERECHNETEN KONZENTRATIONEN VON DREI UNABHÄNGIGEN SPENDERN. ----- 129
- ABBILDUNG 4.41: LPS-DOSIS-WIRKUNGSKURVEN. A) U973-ZELLEN WURDEN FÜR 24 H MIT DEN ANGEGBENEN LPS-KONZENTRATIONEN STIMULIERT. B) MONOZYTEN IN RPMI-MEDIUM MIT 10 % AB-SERUM FÜR 3 TAGE KULTIVIERT, ABGELÖST, IN 24-WELL PLATTEN ERNEUT AUSGESÄT UND AM NÄCHSTEN TAG FÜR 24 H MIT LPS STIMULIERT. DARGESTELLT SIND MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG VON JE VIER UNABHÄNGIG BEHANDELTEN PROBEN. ----- 130
- ABBILDUNG 4.42: IL-8-KONZENTRATION IM ZELLKULTURÜBERSTAND STIMULIERTER PRIMÄREER HUMANER MONOZYTEN. DIE ZELLEN WURDEN ÜBER FICOLL-PAQUE™ UND ADHÄRENZ AUFGEREINIGT UND FÜR DREI TAGE BEI 37°C UND 5 % CO₂ IN RPMI 1640 UNTER ZUSATZ DER IN DER LEGENDE ANGEGBENEN SEREN UND/ODER WACHSTUMSFAKTOREN KULTIVIERT. DIE STIMULATION ERFOLGTE FÜR 24 STUNDEN MIT 50 ng/ml LPS UND/ODER 50 nM C3A BZW. 40 nM C5A. DARGESTELLT SIND JEWEILS MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG VON DREI MESSPUNKTEN IM ELISA. IM WIEDERHOLUNGSVERSUCH WURDEN DIE DATEN BESTÄTIGT. ----- 131
- ABBILDUNG 4.43: ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG DER GESAMT-RNA AUS MONOZYTEN IM DENATURIERENDEN AGAROSEGEL. ES WURDEN JEWEILS 0,8 μ g DER MIT PUFFER, C5A, LPS ODER C5A+LPS STIMULIERTEN ZELLEN DER DREI SPENDER A, B UND C AUFGETRAGEN. ----- 140
- ABBILDUNG 4.44: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON IL-6 IM ÜBERSTAND DER NACH EINEM EINSTÜNDIGEN PRIMING (IFN- γ) FÜR VIER STUNDEN MIT LPS BZW. LPS UND C5A STIMULIERTEN PRIMÄREN HUMANEN MONOZYTEN. AUFGEFÜHRT SIND MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG EINES EXPERIMENTES MIT DOPPELWERTEN IM TEST. ----- 148
- ABBILDUNG 4.45: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON IL-8 IM ÜBERSTAND DER NACH EINEM EINSTÜNDIGEN PRIMING (IFN- γ) FÜR VIER STUNDEN MIT LPS BZW. LPS UND C5A STIMULIERTEN PRIMÄREN

- HUMANEN MONOZYTEN. AUFGEFÜHRT SIND MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG EINES EXPERIMENTES MIT
DOPPELWERTEN IM TEST. ----- 148
- ABBILDUNG 4.46: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER MITTELS *REAL-TIME* RT-PCR ERHALTENEN INDUKTIONSFAKTOREN
DER IL-6-MRNA VON PRIMÄREN HUMANEN MONOZYTEN NACH EINEM EINSTÜNDIGEN PRIMING MIT IFN- γ UND
VIERSTÜNDIGER STIMULATION MIT LPS BZW. LPS UND C5A. DARGESTELLT SIND DIE MITTELWERTE VON
DOPPELWERTEN AUS EINEM VON ZWEI REPRÄSENTATIVEN *REAL-TIME* RT-PCR-LÄUFEN. ----- 150
- ABBILDUNG 5.1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ETS-1 TRANSKRIPTIONSFAKTORS. AUFGEFÜHRT SIND DIE DNA
BINDUNGS-DOMÄNE (DBD), DIE TRANSAKTIVIERUNGS-DOMÄNE (TD) UND DIE POINTED-DOMÄNE. DAS GELBE
STERNCHEN SPIEGELT DIE AMINOSÄURE THREONIN-38 WIEDER, WELCHE RAS-MAPK-SPEZIFISCH
PHOSPHORYLIERT WIRD. DIE VIER STERNCHEN AN DER DNA-BINDUNGS-DOMÄNE STELLEN Ca^{2+} -ABHÄNGIGE
PHOSPHORYLIERUNGSTELLEN DAR. ----- 156

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: PIPETTIERSCHEMA FÜR DIE AUFSTELLUNG DER PRIMER-MATRIX. IN DER ERSTEN SPALTE SIND DIE UNTERSCHIEDLICHEN PRIMER-VERHÄLTNISSE IN FMOL/ANSATZ AUFGEFÜHRT. DAS K BEDEUTET, DASS DER PROBE KEIN TEMPLATE ZUGEFÜGT WURDE. DIE KONZENTRATIONSANGABEN DER PRIMER BEZIEHEN SICH AUF DIE VERWENDETE VORVERDÜNNUNG. -----	53
TABELLE 4.1: AUFLISTUNG AUSGEWÄHLTER TRANSKRIPTIONSFAKTORBINDUNGSSTELLEN DER 5'-UTR DES C3AR ZWISCHEN POSITION – 18 UND – 286. AUFGEFÜHRT IST DER NAME DES BINDEMOTIVS, DIE POSITION IN DER 5'-UTR UND DIE ZUGEHÖRIGE SEQUENZ, WOBEI DIE FÜR DIE BINDUNG ESSENTIELLEN BASEN HERVORGEHOHEN SIND. ----	82
TABELLE 4.2: ERGEBNISSE DER PRIMERMATRIX FÜR DEN HUMANEN C5AR. IN DER ERSTEN SPALTE STEHEN DAS PRIMERVERHÄLTNIS (IN PMOL/ML IM ENDANSATZ) UND DIE ANGABE, OB DER ANSATZ CDNA ENTHÄLT ODER NICHT (K). ES FOLGEN DIE C _T -WERTE DER EINZELNEN PRIMERKOMBINATIONEN, DEREN MITTELWERTE UND STANDARDABWEICHUNGEN. IN DER LETZTEN SPALTE SIND DIE DIFFERENZEN DER C _T -WERTE DER GLEICHEN PRIMERKOMBINATION MIT UND OHNE CDNA AUFGEFÜHRT, DER WERT MIT DER GRÖßTEN DIFFERENZ IST HERVORGEHOHEN. ER WIRD FÜR DIE SPÄTEREN EIGENTLICHEN MESSUNGEN VERWENDET. FÜR PROBEN, BEI DENEN KEIN AMPLIFIKAT ENTSTAND, WURDE DIE MAXIMALE ZYKLUSZAHL (40) EINGESETZT. -----	90
TABELLE 4.3: ERGEBNISSE DER PRIMERMATRIZES FÜR DIE VERWENDETEN PRIMERPAARE. DAS IL-6 PRIMERPAAR WURDE VON J. BUER (GBF, BRAUNSCHWEIG) ÜBERNOMMEN. DIE ETS-1 PRIMERMATRIX WURDE FREUNDLICHERWEISE VON FRAU K. ENDLICH DURCHGEFÜHRT. -----	91
TABELLE 4.4: <i>REAL-TIME</i> RT-PCR ANALYSE DER NACH TRANSIENTER ÜBEREXPRESSION VON ETS-1, AP-1 UND HA-RAS IN HEK293-ZELLEN RESULTIERENDEN HOCHREGULATION DER C3AR-mRNA. DARGESTELLT SIND DIE ERGEBNISSE VON DREI UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN (JE MITTELWERT AUS DOPPELWERTEN). -----	92
TABELLE 4.5: ERGEBNIS DER <i>REAL-TIME</i> RT-PCR DER DURCH 10 NG/ML IL-1 β INDUZIERTEN HOCHREGULATION DER C3AR-mRNA IN U937-ZELLEN (KINETIK). FÜR DIE ZEITPUNKTE 8 H, 4 H UND 2 H SIND DIE MITTELWERTE UND STANDARDABWEICHUNGEN VON DREI UNABHÄNGIGEN MESSUNGEN MIT DOPPELWERTEN IM TEST DARGESTELLT. DIE ZEITPUNKTE 24 H, 30 MIN UND 15 MIN WURDEN LEDIGLICH EINMAL IN DOPPELWERTEN VERMESSEN. -----	99
TABELLE 4.6: VOLLSTÄNDIGE ERGEBNISSE DER DURCHFLUßZYTOMETRISCHEN UNTERSUCHUNG DER DREI IN PHOENIX-GP-ZELLEN GENERIERTEN RETROVIRALEN VIRUSÜBERSTÄNDE pSF91-IRES-eGFP-PRE, -ETS-1 UND -CMV-ETS-1 AN HT1080-ZELLEN. AUFGEFÜHRT SIND DIE INFEKTIONSVOLUMINA, DIE BEZEICHNUNG DES VIRUSÜBERSTANDES, SOWIE DIE ANZAHL AN eGFP-POSITIVEN ZELLEN [%]. HERVORGEHOHEN IST DER ETS-1-ÜBERSTAND, MIT DEM DIE MEISTEN (44,4 %) HT1080-ZELLEN TRANSDUZIERT WORDEN SIND. -----	107
TABELLE 4.7: VOLLSTÄNDIGE ERGEBNISSE DER DURCHFLUßZYTOMETRISCHEN UNTERSUCHUNG DER IN 293GPG-ZELLEN GENERIERTEN RETROVIRALEN VIRUSÜBERSTÄNDE pSF91-IRES-eGFP-PRE UND -ETS-1 AN A549-ZELLEN. AUFGEFÜHRT SIND DIE VERDÜNNUNGSSTUFE DES VIRUSÜBERSTANDES SOWIE DIE ANZAHL AN eGFP-POSITIVEN ZELLEN [%]. HERVORGEHOHEN IST DER ETS-1-ÜBERSTAND, MIT DEM DIE MEISTEN (89,8 %) A549-ZELLEN TRANSDUZIERT WORDEN SIND. -----	108
TABELLE 4.8: <i>REAL-TIME</i> RT-PCR ANALYSE DER NACH STIMULATION VON STABIL TRANSDUZIERTEN U937-ZELLEN RESULTIERENDEN HOCHREGULATION DER C3AR-mRNA. DIE MIT DEM KONTROLLVEKTOR pQCXIN UND DER ETS-1-DN TRANSDUZIERTEN U937-ZELLEN WURDEN FÜR 72 H MIT B _T ₂ -CAMP [1 mM] UND IFN- γ [1000 U/ML] SOWIE FÜR JE ZWEI UND VIER STUNDEN MIT TNF- α [50 NG/ML] UND IL-1 β [10 NG/ML] BEHANDELT. DIE INDUKTIONSFAKTOREN WURDEN IM VERHÄLTNIS ZU DER ZU JEDEM ZEITPUNKT MITGEFÜHRTEN PUFFERKONTROLLE BERECHNET. DARGESTELLT SIND DIE MITTELWERTE UND STANDARDABWEICHUNGEN VON ZWEI VOLLKOMMEN UNABHÄNGIGEN EXPERIMENTEN MIT DOPPELWERTEN IN JEDEM TEST. -----	117
TABELLE 4.9: AUFLISTUNG VERSCHIEDENER MEDIEN, DIE ZUR KULTIVIERUNG VON HUMANEN MONOZYTEN EINGESETZT WURDEN. ZUSÄTZLICH WURDE DIE KULTIVIERUNG DER MONOZYTEN IN DEN NORMALERWEISE VERWENDETEN ZELLKULTURFLASCHEN DER FIRMA GREINER MIT DER SERIE PRIMARIA VON BD VERGlichen. -----	121
TABELLE 4.10: IN DER TABELLE SIND DIE NACH DEN ANGEgebenEN KULTIVIERUNGSTAGEN IM ÜBERSTAND BEFINDLICHEN ZELLEN AUFGEFÜHRT, DIE SICH UNTER VERWENDUNG VERSCHIEDENER MEDIEN ABGELÖST HATTEN. -----	121

- TABELLE 4.11: DARGESTELLT SIND DIE GENE, DIE SICH BEI DER STIMULATION DER MURINEN ZELLLINIE J774A.1 MIT C3A IN ARRAY I ODER II (ATLAS™ MOUSE 1.2 ARRAY, CLONTECH/BD) GEGENÜBER NICHT-STIMULIERTEN ZELLEN ALS REGULIERT ERWIESEN. EIN GEN GILT ALS REGULIERT, WENN DER BETRAG DES ERRECHNETEN FAKTORS > 1,94 IST. IN DER ERSTEN SPALTE IST DIE GENBANK-ACCESSION-NUMMER UND IN DER ZWEITEN SPALTE DER GENNAME AUFGEFÜHRT. IN DEN SPALTEN 3 UND 4 SIND DIE BERECHNETEN REGULATIONSFAKTOREN DES ERSTEN UND DES WIEDERHOLUNGS-EXPERIMENTES AUFGEListET. DIE GENE SIND IN ALPHABETISCHER REIHENFOLGE DER ACCESSION-NUMMERN WIEDERGEgeben. REGULATIONSFAKTOREN > 3 SIND FETT MARKIERT. ----- 135
- TABELLE 4.12: DARGESTELLT SIND DIE GENE, DIE SICH BEI DER STIMULATION DER MURINEN ZELLLINIE J774A.1 MIT FMLP IN ARRAY I ODER II (ATLAS™ MOUSE 1.2 ARRAY, CLONTECH/BD) GEGENÜBER NICHT-STIMULIERTEN ZELLEN ALS REGULIERT ERWIESEN. EIN GEN GILT ALS REGULIERT, WENN DER BETRAG DES ERRECHNETEN FAKTORS > 1,94 IST. IN DER ERSTEN SPALTE IST DIE GENBANK-ACCESSION-NUMMER UND IN DER ZWEITEN SPALTE DER GENNAME AUFGEFÜHRT. IN DEN SPALTEN 3 UND 4 SIND DIE BERECHNETEN REGULATIONSFAKTOREN DES ERSTEN UND DES WIEDERHOLUNGS-EXPERIMENTES AUFGEListET. DIE GENE SIND IN ALPHABETISCHER REIHENFOLGE DER ACCESSION-NUMMERN WIEDERGEgeben. REGULATIONSFAKTOREN > 3 SIND FETT MARKIERT. ----- 136
- TABELLE 4.13: DARGESTELLT SIND DIE GENE, DIE SICH BEI DER STIMULATION DER MURINEN ZELLLINIE J774A.1 MIT LPS IN ARRAY I UND/ODER II (ATLAS™ MOUSE 1.2 ARRAY, CLONTECH/BD) GEGENÜBER NICHT-STIMULIERTEN ZELLEN ALS REGULIERT ERWIESEN. EIN GEN GILT ALS REGULIERT, WENN DER BETRAG DES ERRECHNETEN FAKTORS > 1,94 IST. IN DER ERSTEN SPALTE IST DIE GENBANK-ACCESSION-NUMMER UND IN DER ZWEITEN SPALTE DER GENNAME AUFGEFÜHRT. IN DEN SPALTEN 3 UND 4 SIND DIE BERECHNETEN REGULATIONSFAKTOREN DES ERSTEN UND DES WIEDERHOLUNGS-EXPERIMENTES AUFGEListET. DIE GENE SIND IN ALPHABETISCHER REIHENFOLGE DER ACCESSION-NUMMERN WIEDERGEgeben. GENE, DEREN REGULATION IM WIEDERHOLUNGSEXPERIMENT REPRODUZIERT WERDEN KONNTE, SIND FETT DARGESTELLT. ----- 137
- TABELLE 4.14: DARGESTELLT SIND DIE GENE, DIE SICH BEI DER KOMBINATIONSSTIMULATION DER MURINEN ZELLLINIE J774A.1 MIT C3A UND LPS IN ARRAY I ODER II (ATLAS™ MOUSE 1.2 ARRAY, CLONTECH/BD) IM VERGLEICH ZU ZELLEN, DIE LEDIGLICH MIT LPS BEHANDELT WAREN, ALS REGULIERT ERWIESEN HABEN. EIN GEN GILT ALS REGULIERT, WENN DER BETRAG DES ERRECHNETEN FAKTORS > 1,94 IST. IN DER ERSTEN SPALTE IST DIE GENBANK-ACCESSION-NUMMER UND IN DER ZWEITEN SPALTE DER GENNAME AUFGEFÜHRT. IN DEN SPALTEN 3 UND 4 SIND DIE BERECHNETEN REGULATIONSFAKTOREN DES ERSTEN UND DES WIEDERHOLUNGS-EXPERIMENTES AUFGEListET. DIE GENE SIND IN ALPHABETISCHER REIHENFOLGE DER ACCESSION-NUMMERN WIEDERGEgeben. ----- 137
- TABELLE 4.15: DARGESTELLT SIND DIE GENE, DIE SICH BEI DER KOMBINATIONSSTIMULATION DER MURINEN ZELLLINIE J774A.1 MIT FMLP UND LPS IN ARRAY I UND/ODER II (ATLAS™ MOUSE 1.2 ARRAY, CLONTECH/BD) GEGENÜBER ZELLEN, DIE LEDIGLICH MIT LPS BEHANDELT WAREN, ALS REGULIERT ERWIESEN. EIN GEN GILT ALS REGULIERT, WENN DER BETRAG DES ERRECHNETEN FAKTORS > 1,94 IST. IN DER ERSTEN SPALTE IST DIE GENBANK-ACCESSION-NUMMER UND IN DER ZWEITEN SPALTE DER GENNAME AUFGEFÜHRT. IN DEN SPALTEN 3 UND 4 SIND DIE BERECHNETEN REGULATIONSFAKTOREN DES ERSTEN UND DES WIEDERHOLUNGS-EXPERIMENTES AUFGEListET. DIE GENE SIND IN ALPHABETISCHER REIHENFOLGE DER ACCESSION-NUMMERN WIEDERGEgeben. GENE, DEREN REGULATION IM WIEDERHOLUNGSEXPERIMENT REPRODUZIERT WERDEN KONNTE, SIND FETT DARGESTELLT. --- 139
- TABELLE 4.16: ÜBERSICHT ÜBER DIE ANZAHL DER GENE, DIE SICH NACH STIMULATION MIT C5A, LPS ODER C5A + LPS (IM VERGLEICH ZUR KONTROLLE), IN DEN VERSCHIEDENEN ARRAY-EXPERIMENTEN ALS REGULIERT ERWIESEN HABEN. ----- 141
- TABELLE 4.17: DARGESTELLT SIND DIE GENE, DIE SICH BEI DER EINZELSTIMULATION DER PRIMÄREN HUMANEN MONOZYTEN MIT C5A IM ERSTEN UND/ODER ZWEITEN ARRAY-EXPERIMENT (ATLAS™ HUMAN 1.2 ARRAY, CLONTECH/BD) GEGENÜBER NICHT-STIMULIERTEN ZELLEN ALS REGULIERT ERWIESEN. EIN GEN GILT ALS REGULIERT, WENN DER BETRAG DES ERRECHNETEN FAKTORS > 1,94 IST. IN DER ERSTEN SPALTE IST DIE GENBANK-ACCESSION-NUMMER UND IN DER ZWEITEN SPALTE DER GENNAME AUFGEFÜHRT. IN DEN SPALTEN 3 UND 4 SIND DIE BERECHNETEN REGULATIONSFAKTOREN DES ERSTEN UND ZWEITEN ARRAY-EXPERIMENTES AUFGEListET. DIE GENE SIND IN ALPHABETISCHER REIHENFOLGE DER ACCESSION-NUMMERN WIEDERGEgeben. ----- 143
- TABELLE 4.18: DARGESTELLT SIND DIE GENE, DIE SICH BEI DER EINZELSTIMULATION DER PRIMÄREN HUMANEN MONOZYTEN MIT LPS IM ERSTEN UND ZWEITEN ARRAY-EXPERIMENT (ATLAS™ HUMAN 1.2 ARRAY,

- CLONTECH/BD) GEGENÜBER NICHT-STIMULIERTEN ZELLEN ALS REGULIERT ERWIESEN. EIN GEN GILT ALS REGULIERT, WENN DER BETRAG DES ERRECHNETEN FAKTORS $> 1,94$ IST. IN DER ERSTEN SPALTE IST DIE GENBANK-ACCESSION-NUMMER UND IN DER ZWEITEN SPALTE DER GENNAME AUFGEFÜHRT. IN DEN SPALTEN 3 UND 4 SIND DIE BERECHNETEN REGULATIONSFAKTOREN DES ERSTEN UND ZWEITEN ARRAY-EXPERIMENTES AUFGELISTET. DIE GENE SIND IN ALPHABETISCHER REIHENFOLGE DER ACCESSION-NUMMERN WIEDERGEGBEN. HERVORGEHOBE SIND DIE GENE, FÜR DIE SICH IN BEIDEN EXPERIMENTEN EIN REGULATIONSFAKTOR > 3 BZW. $< - 3$ ERGEBEN HAT. GRAU HERVORGEHOBE SIND DIE GENE, DEREN REGULATION ANSCHLIEßEND MITTELS *REAL-TIME* RT-PCR ODER ELISA ÜBERPRÜFT WORDEN IST. ----- 144
- TABELLE 4.19: DARGESTELLT SIND DIE GENE, DIE SICH BEI DER KOMBINATIONSSSTIMULATION DER PRIMÄREN HUMANEN MONOZYTEN MIT C5A UND LPS IM ERSTEN *UND* ZWEITEN ARRAY-EXPERIMENT (ATLAS™ HUMAN 1.2 ARRAY, CLONTECH/BD) GEGENÜBER NICHT-STIMULIERTEN ZELLEN ALS REGULIERT ERWIESEN. EIN GEN GILT ALS REGULIERT, WENN DER BETRAG DES ERRECHNETEN FAKTORS $> 1,94$ IST. IN DER ERSTEN SPALTE IST DIE GENBANK-ACCESSION-NUMMER UND IN DER ZWEITEN SPALTE DER GENNAME AUFGEFÜHRT. IN DEN SPALTEN 3 UND 4 SIND DIE BERECHNETEN REGULATIONSFAKTOREN DES ERSTEN UND ZWEITEN ARRAY-EXPERIMENTES AUFGELISTET. DIE GENE SIND IN ALPHABETISCHER REIHENFOLGE DER ACCESSION-NUMMERN WIEDERGEGBEN. HERVORGEHOBE SIND DIE GENE, FÜR DIE SICH IN BEIDEN EXPERIMENTEN EIN REGULATIONSFAKTOR > 3 BZW. $< - 3$ ERGEBEN HAT. GRAU HERVORGEHOBE SIND DIE GENE, DEREN REGULATION ANSCHLIEßEND MITTELS *REAL-TIME* RT-PCR ODER ELISA ÜBERPRÜFT WORDEN IST. ----- 145
- TABELLE 4.20: DARGESTELLT SIND DIE GENE, DIE SICH BEI DER KOMBINATIONSSSTIMULATION DER PRIMÄREN HUMANEN MONOZYTEN MIT C5A UND LPS IM ERSTEN *UND/ODER* ZWEITEN ARRAY-EXPERIMENT (ATLAS™ HUMAN 1.2 ARRAY, CLONTECH/BD) GEGENÜBER ZELLEN, DIE LEDIGLICH MIT LPS BEHANDELT WAREN, ALS REGULIERT ERWIESEN. EIN GEN GILT ALS REGULIERT, WENN DER BETRAG DES ERRECHNETEN FAKTORS $> 1,94$ IST. IN DER ERSTEN SPALTE IST DIE GENBANK-ACCESSION-NUMMER UND IN DER ZWEITEN SPALTE DER GENNAME AUFGEFÜHRT. IN DEN SPALTEN 3 UND 4 SIND DIE BERECHNETEN REGULATIONSFAKTOREN DES ERSTEN UND ZWEITEN ARRAY-EXPERIMENTES AUFGELISTET. DIE GENE SIND IN ALPHABETISCHER REIHENFOLGE DER ACCESSION-NUMMERN WIEDERGEGBEN. HERVORGEHOBE SIND DIE GENE, FÜR DIE SICH IN BEIDEN EXPERIMENTEN EIN REGULATIONSFAKTOR > 3 BZW. $< - 3$ ERGEBEN HAT. ----- 146
- TABELLE 4.21: REGULATIONSFAKTOREN FÜR DIE GENE IL-6 UND IL-8, DIE MITTELS ATLAS™ HUMAN 1.2 CDNA EXPRESSION ARRAY (VARIANTE 2) ERHALTEN WURDEN. ----- 147
- TABELLE 4.22: REGULATIONSFAKTOREN FÜR DIE GENE CCL3 UND HM74, DIE MITTELS ATLAS™ HUMAN 1.2 CDNA EXPRESSION ARRAY (VARIANTE 2) ERHALTEN WURDEN. ----- 149
- TABELLE 4.23: *REAL-TIME* RT-PCR ANALYSE DER NACH EINEM EINSTÜNDIGEN PRIMING MIT IFN- γ UND VIERSTÜNDIGER STIMULATION MIT C5A RESULTIERENDEN HOCHREGULATION DER CCL3-mRNA IN PRIMÄREN HUMANEN MONOZYTEN. AUFGEFÜHRT SIND MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG VON ZWEI UNABHÄNGIGEN MESSUNGEN MIT DOPPELWERTEN IN JEDEM TEST. ----- 150
- TABELLE 4.24: *REAL-TIME* RT-PCR ANALYSE DER NACH EINEM EINSTÜNDIGEN PRIMING MIT IFN- γ UND VIERSTÜNDIGER STIMULATION MIT C5A, LPS ODER DER KOMBINATION VON LPS UND C5A RESULTIERENDEN HOCHREGULATION DER HM74-mRNA IN PRIMÄREN HUMANEN MONOZYTEN. AUFGEFÜHRT SIND MITTELWERT UND STANDARDABWEICHUNG VON ZWEI UNABHÄNGIGEN MESSUNGEN MIT DOPPELWERTEN IN JEDEM TEST. ----- 151

Lebenslauf

von Dipl. Biochem. Myriam Schaefer

Geburtsdatum:

09.10.1975 in Hannover

Familienstand:

ledig

Staatsangehörigkeit:

deutsch

Schulbildung:

Grundschule In der Steinbreite, 1982 – 1986

Orientierungsstufe Ahlem, 1986 – 1988

Georg-Büchner-Gymnasium Letter, 1988 – 1995

Hochschulbildung:

Universität Hannover, Studium der Biochemie 1995 – 2000

Mündliche Diplomhauptprüfung Mai 2000 mit der Gesamtnote „sehr gut“ bestanden.

Diplomarbeit von Mai 2000 bis November 2000 am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Hochschule Hannover mit dem Titel: „Arbeiten zur Expressionsanalyse mittels cDNA-Array und RT-PCR an monozytären Zellen und Chlamydien“. Mit der Note „sehr gut“ bewertet.

Anfertigung der Dissertation:

Seit dem 01.02.2001 am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Anleitung von Herrn Prof. Andreas Klos.

Thema der Dissertation: „Analyse der transkriptionellen Regulation des C3a-Rezeptors und der Genexpression monozytärer Zellen nach Anaphylatoxin-Stimulation“

Veröffentlichungen

Bisherigen Publikationen:

Settmacher, B., C. Rheinheimer, H. Hamacher, R. S. Ames, A. Wise, L. Jenkinson, D. Bock, M. Schaefer, J. Köhl, and A. Klos. 2003. Structure-Function Studies of the C3a-Receptor: C-terminal Serine and Threonine Residues Which Influence Receptor Internalization and Signaling; *Eur. J. Immunol.* **33**: 920-927

Abstracts:

Schaefer, M., S. Konrad, B. Sohns, C. Rheinheimer, W. Bautsch, A. Klos: Transcriptional regulation of the human C3a-receptor: Ets-1 as one important factor; XIX International Complement Workshop, Palermo (2002); veröffentlicht in *International Immunopharmacology*; **2** (9):1305 (2002) (Abstract und Poster)

Schaefer, M., Konrad, S., Sohns, B., Rheinheimer, C., Bautsch, W., Klos, A.: Transcriptional regulation of the human C3a receptor: Ets-1 as one important factor; 54. Jahrestagung der DGHM, Heidelberg (2002); veröffentlicht in *International Journal of Medical Microbiology*; **292** (2002)(Abstract und Vortrag)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Bitter-Suermann sowie Herrn Prof. Dr. Suerbaum danke ich für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. Alves möchte ich ganz herzlich für die Übernahme der Doktorvaterschaft und für die freundliche Betreuung während der letzten Jahre des Studiums danken.

Meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Andreas Klos danke ich für die herzliche Unterstützung, seinen Ideenreichtum, die wertvollen Diskussionen und seine konstruktive Kritik bei der Korrektur dieser Arbeit.

Ein aufrichtiger Dank gilt meinen ehemaligen und jetzigen Kollegen aus der Arbeitsgruppe Klos (Bettina Sohns, Britta Settmacher, Camilla Dietrich, Claudia Rheinheimer, Felicitas Tidow, Genda Bartling, Henning Hamacher, Jan Peters, Jessica Thalmann, Katja Endlich, Simone Heß und Stephanie Konrad) für die freundschaftliche Atmosphäre, die gemeinsam verbrachte Zeit im, aber auch außerhalb des Labors, den Teamgeist und ihre Unterstützung.

Im Besonderen danke ich

Claudia für ihre unermüdliche Hilfe, ihr fachliches Wissen und ihre Freude bei der Arbeit.

Genda für die tatkräftige Unterstützung immer wenn Not am Mann war.

Simone, Jan, Katja und Jessica für ihre Hilfsbereitschaft, das Zuhören und wertvolle Vorschläge.

Steffi für ihre ruhige Art und die gelungene Zusammenarbeit im Komplementbereich.

Anja und Michaela danke ich für die lustigen Zeiten im „Bautsch-Labor“ sowie Anja für das gemeinsame Durchhalten bei den stumpfsinnigen Array-Auswertungen.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und stete Hilfsbereitschaft.

P.D. Dr. Jan Buer danke ich für die Möglichkeit der Array-Analyse an der GBF sowie der Bereitstellung der murinen Clontech Membranen. Dr. Jörg Lauber für die kompetente Hilfestellung bei der Array-Auswertung.

Von ganzem Herzen danke ich

Meinen Eltern für ihre bedingungslose Liebe, für das Gefühl niemals tief fallen zu können, ihr Vertrauen und alles was sie für mich getan haben sowie meiner Mutter für das zeitaufwendige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meiner Oma für das Gefühl einer der wichtigsten Menschen in ihrem Leben zu sein.

Laule, Mone und Karina für ihre uneingeschränkte Freundschaft und die Gewissheit, dass diese ein Leben lang halten wird.

David für seine Freundschaft und die Verbundenheit in den Jahren des Studiums.

Mareike und Tiana für ihre Offenheit und das Gefühl verstanden zu werden.

Anja für die tiefen Gespräche und die amüsanten *Sex and the City*-Abende, nach denen ein harter Arbeitstag schnell vergessen ist.

Diane und Silke für die gemeinsam durchgestandenen Praktika und Prüfungen sowie die Zeit außerhalb der Hallen der Universität.

Philipp, der mich zwar mehr von der Fertigstellung dieser Arbeit abgehalten hat, als dazu beizutragen, für seine Liebe und die Gewissheit, dass die Zeit nach der Doktorarbeit umso schöner wird.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel "Analyse der transkriptionellen Regulation des C3a-Rezeptors und der Genexpression monozytärer Zellen nach Anaphylatoxin-Stimulation" selbständig verfasst sowie alle benutzten Hilfsmittel und Institutionen vollständig angegeben habe. Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation nicht bereits als Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hannover, Oktober 2004

(Myriam Schaefer)

