

Zelluläre Prozessierung und Abgabe von TNF- α

Andreas Brandl

2009

Aus dem Institut für kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie
Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin (WBex)
der LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Vorstand: Prof. Dr. U. Pohl

Zelluläre Prozessierung und Abgabe von TNF- α

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Andreas Brandl
aus
Neustadt an der Aisch
2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Bernhard F. Becker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Matthias F. Bauer

Prof. Dr. Holger Schulz

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2009

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §2 der Promotionsordnung für die Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München selbständig angefertigt. Der Verfasser hat sich nur der angegebenen Hilfsmittel bedient. Alle Erkenntnisse, die aus der Literatur ganz oder annähernd übernommen sind, sind als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen.

Garmisch-Partenkirchen, am _____

Andreas Brandl

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
I.1	TNF-α	1
I.1.1	TNF-Ligand und TNF-Rezeptor	2
I.1.2	Funktion von TNF-Ligand	2
I.1.3	Funktion von TNF-Rezeptor	3
I.1.4	Klinische Effekte der TNF Blockade	5
I.2	TACE	6
I.2.1	ADAM	6
I.2.2	Die Geschichte von mTNF- α -Converting-Enzyme	6
I.2.3	Der Aufbau von TACE	7
I.2.4	Die Pro-Domäne und der Cystein-Switch	8
I.3	Fragestellung	9
II	Material und Methoden	11
II.1	Material und Bezugsquellen	11
II.1.1	Substanzen (allgemein)	11
II.1.2	Material und Medien für Zellkultur	12
II.1.3	Puffer	15
II.1.4	Nucleinsäureplasmid	18
II.1.5	Antikörper	18
II.1.6	ELISA-Kits	19
II.1.7	Geräte	19
II.2	Methoden	20
II.2.1	Zellkulturen	20
II.2.2	Transfektion von Zellen	20
II.2.2.1	Transiente Transfektion von HMC-1	20
II.2.2.2	Transiente Transfektion von MEF	21
II.2.3	Lyse von Zellen	21
II.2.3.1	Lyse von Suspensionszellen (HMC-1)	21

II.2.3.2	Lyse von adhärenenten Zellen (MEF)	21
II.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	22
II.2.5	Western blotting	22
II.2.6	Anfärbung von Proteinen auf Nitrozellulosemembran	22
II.2.7	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembran	23
II.2.8	Membrängängigkeit von TAPI-2 bei HMC-1	23
II.2.9	High pressure liquid chromatography (HPLC)	23
II.2.10	Nachweis von TNF- α im Überstand und Lysat von Zellen	24
II.2.11	Stimulationsversuche naiver HMC-1	24
II.2.11.1	Susbtanz P	24
II.2.11.2	Calcium-Ionophor A23187	24
II.2.11.3	IL-6	25
II.2.12	Inhibitionsversuche transfizierter HMC-1	25
II.2.12.1	TAPI-2	25
II.2.12.2	Brefeldin A	25
II.2.13	Stimulationsversuche transfizierter HMC-1	26
II.2.13.1	H ₂ O ₂	26
II.2.13.2	HOCl	26
II.2.14	Inhibitionsversuche transfizierter MEF	26
II.2.15	Maxipräp zur Vermehrung des TNF- α Plasmids	27
II.3	Statistische Methoden	27
III	Ergebnisse	28
III.1	HMC-1 als Modell der kardialen Mastzelle	28
III.1.1	Versuch der Stimulation	28
III.1.1.1	Substanz P führt zu keiner Freisetzung von TNF- α	28
III.1.1.2	Wirkungslosigkeit von Calcium-Ionophor A23187	29
III.1.2	Transfektion mittels TNF- α cDNA haltigen Plasmids	30
III.1.2.1	Vergleich des TNF- α Gehaltes von naiven und transfizierten Zellen	30
III.1.2.2	Molekulargewicht des isolierten TNF- α	32
III.1.3	Oxidative Stimulation transfizierter HMC-1	32
III.1.3.1	H ₂ O ₂	32
III.1.3.2	HOCl	33
III.1.4	Hemmung der Freisetzung von TNF- α aus transfizierten HMC-1	34

III.1.4.1	Brefeldin A	34
III.1.5	Versuch der Reifung von HMC-1 mittels Kultivierung in Anwesenheit von IL-6	35
III.2	Die Rolle von TACE bei der Freisetzung von TNF-α	36
III.2.1	Inhibition durch TAPI-2	36
III.2.2	Transiente Transfektion von MEF	37
III.2.2.1	Auswirkungen auf die Freisetzung und Produktion von Mäuse-TNF- α (mTNF- α)	37
III.2.2.2	Vergleich der hu-TNF- α Bildung und Freisetzung bei TACE +/+ und TACE -/- MEF nach Transfektion	39
III.2.3	Hemmung von Proteasen der MEF	40
IV	Diskussion	42
IV.1	HCM-1 als Modell der kardialen Mastzelle	42
IV.1.1	Akute Freisetzung und Stimulation	42
IV.1.1.1	Substanz P	42
IV.1.1.2	Calcium-Ionophor A23187	43
IV.1.2	Transfektion mittels TNF- α cDNA haltigen Plasmids	44
IV.1.3	Oxidative Stimulation transfizierter HMC-1	45
IV.1.4	Hemmung der Freisetzung	46
IV.1.4.1	Brefeldin A	46
IV.1.5	Reifung der immaturren Mastzelllinie HMC-1	47
IV.2	Die Rolle von TNF-α-Converting-Enzyme (TACE)	48
IV.2.1	Inhibition durch TAPI-2	48
IV.2.2	Vergleich der TNF- α Bildung und Freisetzung von TACE -/- und TACE +/+ MEF nach Transfektion	49
IV.2.3	TNF- α Spaltung unabhängig von TACE	50
IV.2.3.1	Inhibition der Serinproteasen	50
IV.2.3.2	Inhibition der Cysteinproteasen	50
IV.2.3.3	Inhibition der Aspartatproteasen	51
IV.2.3.4	Inhibition der Metalloproteinasen	52

V	Zusammenfassung	54
VI	Literaturverzeichnis	57
VII	Publikationen	68
VIII	Anhang	69
VIII.1	Abkürzungen	69
VIII.2	Sequenzen	70
	Lebenslauf	72
	Danksagung	73

I. Einleitung

I. 1 TNF- α

Tumor Nekrose Faktor (TNF) und Lymphotoxin- α wurden vor mehr als 20 Jahren erstmals aufgrund der Eigenschaft Tumorzellen in vitro zu töten und in tumortransplantierten Mäusen hämorrhagische Nekrosen zu verursachen [18] isoliert. Von beiden Proteinen wurden kurze Zeit später die DNA und deren Gene kloniert [2,96]. Zwischenzeitlich wurde ein Faktor namens Cachectin aus Mäusemakrophagen isoliert; die Sequenzierung bewies dabei, dass er identisch mit TNF ist [13,14]. Andere Studien demonstrierten ebenfalls die starke pro-inflammatorische Wirkung von TNF [23,46] und entdeckten, dass er eine Rolle als zentraler endogener Mediator beim endotoxischen Schock spielt [15,125]. TNF hat ein breites Spektrum biologischer Aktivitäten. Aufgrund der Toxizität von TNF für Mensch und Tier wurden die anfänglichen Erwartungen TNF als nützliches Mittel in der Krebstherapie einzusetzen aber nicht erfüllt. Weitere Untersuchungen ergaben, dass eine Überproduktion oder inadäquate Ausschüttung des Zytokins eine wichtige Rolle im Pathomechanismus verschiedener chronisch entzündlicher Erkrankungen spielt.

TNF wird in großen Mengen von Makrophagen produziert, die damit auf inflammatorische Stimuli wie beispielsweise Lipopolysaccharide antworten. Es bindet an Membranrezeptoren, die von nahezu allen Zellen des Körpers exprimiert werden. Wenn TNF in großen Mengen und auf einmal systemisch freigesetzt wird modifiziert es die antikoagulatorischen Eigenschaften von Endothelzellen, aktiviert neutrophile Granulozyten und induziert die Freisetzung anderer inflammatorischer Zytokine. Diese Effekte führen im Extremfall zu einem kardiovaskulären Kollaps. Im Gegensatz dazu führen jedoch kleine Mengen von TNF zu einer adäquaten inflammatorischen Antwort.

Somit ergeben sich wichtige biologische Fragen:

Welche nützlichen Funktionen hat TNF? Kann seine Aktivität blockiert werden und, wenn ja, mit welchen Risiken?

I. 1. 1 TNF-Ligand und TNF-Rezeptor

TNF gehört zur Familie der Liganden, die einen korrespondierenden Rezeptor aktivieren. Der Rezeptor vermittelt Signale, die Zellproliferation oder Zelltod (Apoptose) induzieren. Diese Signale sind insbesondere notwendig für die normale körperliche Entwicklung und für die Funktion des Immunsystems. Eine übermäßige Aktivierung dieser Rezeptoren kann schwere Entzündungsreaktionen, Gewebszerstörung und Schock verursachen. Mutationen in Genen, die für den Liganden oder Rezeptor verantwortlich sind, können charakteristische Störungen der Lymphozyten, der Immunantwort oder Autoimmunerkrankungen hervorrufen.

Alle Vertreter der TNF-Liganden Familie bestehen aus drei Polypeptidketten. Alle bis auf das Lymphotoxin- β , welches aus einer Lymphotoxin- α Untereinheit und zwei Lymphotoxin- β Untereinheiten besteht, sind aus drei identischen Untereinheiten aufgebaut. Alle außer Lymphotoxin- α , welches ausschließlich und TNF, welches vorwiegend sezerniert wird, sind Transmembranproteine, die hauptsächlich durch Zell zu Zell Kontakt agieren.

Alle Vertreter der TNF-Rezeptor Familie sind Transmembranproteine, die aus zwei identischen Untereinheiten bestehen. Die Familie ist durch eine cysteinreiche Aminosäuresequenz definiert, die sich drei bis sechs Mal in der extrazellulären Domäne wiederholt. Die zytoplasmatische Domäne variiert stärker als die extrazelluläre.

I. 1. 2 Funktion von TNF-Ligand

Bis vor fünf Jahren wurden keine natürlich vorkommenden Mutationen, die die Funktion von TNF- α und Lymphotoxin- α oder ihrer beiden Rezeptoren beeinflussen beschrieben. Es gibt inzwischen zwei Fälle weltweit, in denen eine Mutation im TNF-Rezeptor Typ I Gen nachgewiesen werden konnte. Davon leidet ein Patient mit dieser Mutation an systemischen Lupus erythematosus, der andere am Rückfallfiebersyndrom [59,117]. Aufgrund dieser Seltenheit bediente man sich der Gentechnik und züchtete Mäuse, die ein Gen-Knockout für den 55kD sowie den 75kD TNF-Rezeptor besaßen. Es erwies sich eine mäßige Resistenz der 55-kD TNF-Rezeptor defizienten Mäuse gegenüber dem tödlichen Effekt von Lipopolysacchariden, jedoch reagierten sie hochempfindlich auf die Infektion mit *Listeria monocytogenes* [97,107]. Mäuse, die einen Knockout für den 75kD TNF-Rezeptor besaßen,

waren ebenfalls mäßig resistent gegenüber dem tödlichen Effekt von TNF selbst und wiesen nach mehrmaliger intradermaler Injektion von TNF weniger Hautnekrosen auf [37]. Mäuse, bei denen beide Rezeptoren fehlten, hatten eine Addition dieser phänotypischen Effekte, ließen jedoch keine Entwicklungsstörung erkennen. Es sieht so aus als würden, einhergehend mit der unterschiedlichen Struktur der zytoplasmatischen Domäne, die beiden TNF-Rezeptoren in vivo unterschiedliche Aufgaben erfüllen.

Interessanterweise führt die Deletion von TNF und Lymphotoxin- α Genen, welche die einzigen beiden bekannten Liganden des TNF-Rezeptors sind, nicht zum selben Phänotyp, wie die Deletion beider Rezeptoren. Mäuse, denen entweder nur das Lymphotoxin- α Gen oder zusätzlich das TNF Gen fehlt, besitzen keine Lymphknoten, keine Peyer'sche Plaques und keine weiße Pulpa in der Milz. Der Thymus ist dagegen grob erhalten [106].

I. 1. 3 Funktion von TNF-Rezeptor

Es gibt mehrere Theorien über die Funktionsweise und Anordnung der TNF Rezeptoren. Trimere Liganden der TNF Familie führen zu einer Aggregation der Rezeptoruntereinheiten und triggern dadurch eine zelluläre Antwort. Beweisend dafür waren Aktionen, die durch Antikörper gegen jeden der beiden TNF Rezeptoren hervorgerufen wurden [35,123]. Ein unterstützender Aspekt für das Aggregationsmodell (Bild A) ist die Kristallstruktur von Lymphotoxin- α , das einen Komplex mit einem Fragment der extrazellulären Domäne des 55kD TNF Rezeptors eingeht. Genauer gesagt kristallisieren drei Rezeptor Fragmente mit jeweils einem Lymphotoxin- α Trimer [9]. Die Kristallisation der extrazellulären Domäne des 55kD Rezeptors in Abwesenheit von Liganden führt zu einem dimären Protein, in dem jede Untereinheit Kopf zu Kopf zu der anderen steht. Der 55kD Rezeptor scheint auf der Zelloberfläche in Abwesenheit von TNF dimär angeordnet zu sein. Eine dimäre Konformation würde eine hexagonale Anordnung der dimären Rezeptoren und der trimären Ligandenmoleküle erlauben. Diese könnte durch Kontakte zwischen ihren cytoplasmatischen Domänen Signale weitergeben (Bild B).

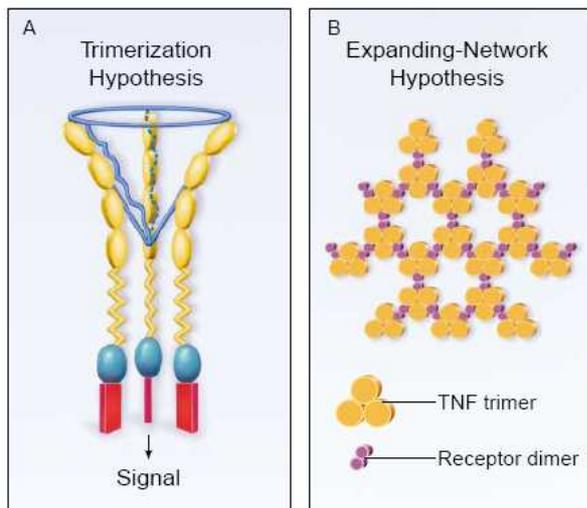


Bild A (übernommen aus [12]): zeigt die „Trimerization Hypothesis“. In diesem Modell besteht die Nebeneinanderstellung von drei Rezeptoren aufgrund der Bindung eines einzelnen TNF Trimeren. Der daraus resultierende Komplex erzeugt ein aktivierendes Zellsignal.

Bild B (übernommen aus [12]): zeigt die „Expanding-Network-Hypothesis“. Eine wachsende hexagonale Anordnung von TNF

Trimeren gebunden an Rezeptor Dimere bezieht die dimäre Rezeptorstruktur in Abwesenheit eines Liganden und die Bindungskapazität eines Ligandenmoleküls mit drei Rezeptoruntereinheiten ein. Das „Abdecken“ von Rezeptoren führt zu einer biologischen Antwort.

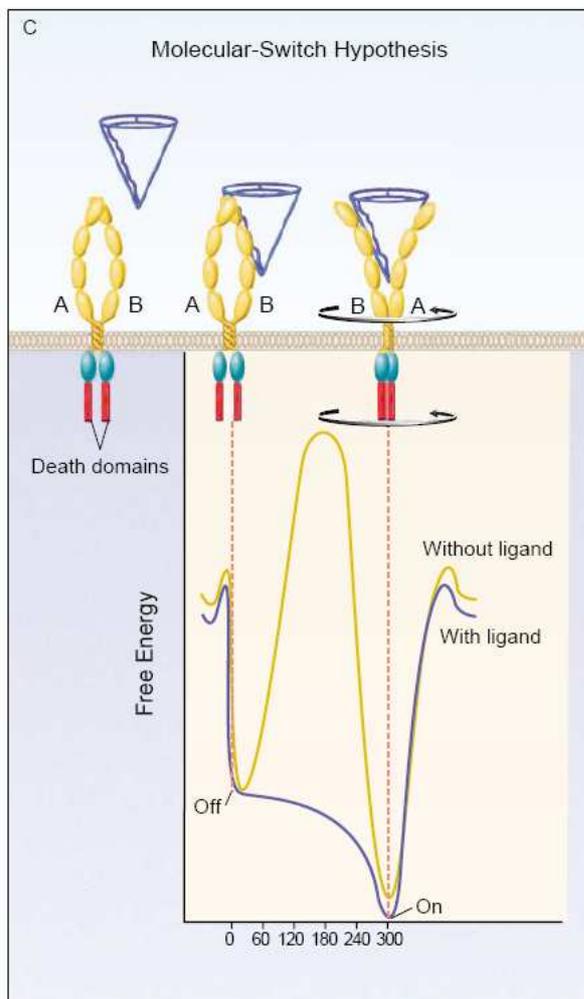


Bild C (übernommen aus [12]): zeigt die „Molecular-Switch-Hypothesis“, das bislang favorisierte Modell. In diesem Modell ist jeder Rezeptor eine aktivierbare Einheit. Aktivierung geschieht in Antwort auf zwei Ereignisse: 1. Der Ligand bindet an Untereinheit B des Rezeptors; 2. Untereinheit A löst sich von Untereinheit B, welche die Bindung des Rezeptors an eine zweite verfügbare Seite auf der Ligandenoberfläche ermöglicht. Diese Ereignisse verursachen Änderungen der Konformation der cytoplasmatischen Domäne des Rezeptors und führen dadurch zu einer Signaltransduktion. Der Graph zeigt ein mögliches Profil der freiwerdenden Energie aufgrund der Konformationsänderung zwischen „off“ und „on“ des Rezeptors. Es ist vorstellbar, dass

eine große Aktivierungsenergie einen Schutz vom „off“ zum „on“ Zustand in Abwesenheit von Liganden beinhaltet und dass TNF effektiv den Wechsel katalysiert.

Alternativ könnte man sich vorstellen, dass jeder dimäre Rezeptor als eine unabhängige Einheit agiert und sich nach jeder Bindung des trimären Liganden neu anordnet (Molecular-Switch-Model) [11]. Das Molecular-Switch-Model wird stark von dem Effekt unterstützt, der durch Austausch einer extrazellulären Domäne des Erythropoietinrezeptors durch eine extrazelluläre Domäne eines TNF Rezeptors gezeigt wurde. Dies führte zu einer kontinuierlichen Signalaktivität in der Zelle [11]. Die Konformation des Rezeptor-Dimeren spielt noch eher als die Reaktion der Dimerenbildung selbst eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion. Eine wichtige Eigenschaft der extrazellulären Domäne des TNF-Rezeptors ist seine Fähigkeit Signaltransduktion in Abwesenheit von Liganden zu verhindern. Fehlt die extrazelluläre Domäne [17] oder ist sie stark modifiziert [11] oder durch einen Antikörper ersetzt oder besetzt [35,123] werden Zellsignale hervorgerufen.

Eine der faszinierendsten Aspekte von TNF ist die Induktion von Apoptose. Apoptose ist stark assoziiert mit den toxischen Effekten von TNF, wie beispielsweise in den Zuständen von Schock und Entzündung. TNF-induzierte Apoptose hat wahrscheinlich eine gewisse physiologische Relevanz, wie es für Apoptose, die durch den Fas Rezeptor induziert wird schon bewiesen wurde. So ist beispielsweise vorstellbar, dass durch TNF hervorgerufene Apoptose infizierter Zellen dem Organismus hilft sich zu schützen. Angenommen wird, dass beide TNF Rezeptoren eine Rolle für den Zelltod spielen, obwohl der 55kD Rezeptor weitaus potenter ist als der 75kD Rezeptor. Da sie sich in der Struktur der cytoplasmatischen Domäne unterscheiden, muss wohl jeder durch einen anderen Mechanismus Apoptose verursachen.

I. 1. 4 Klinische Effekte der TNF Blockade

Es wurden ausgiebige klinische Untersuchungen durchgeführt, um die selektive Neutralisierung durch monoklonale anti-TNF Antikörpern in der Therapie des septischen Schocks zu erforschen. Bisher haben Doppelblindstudien keinen nennenswerten Wirknachweis geliefert [1,128]. Es ist natürlich zu berücksichtigen, dass der septische Schock ein fulminant verlaufendes Krankheitsbild darstellt, in dem der wohlmöglich entscheidende Schaden bereits zum Zeitpunkt des Therapiebeginns entstanden ist.

In der Behandlung von chronisch entzündlichen Erkrankungen, bei denen in der Anwesenheit von TNF ein langsamer und kontinuierlicher Gewebeschaden entsteht zeigte sich größerer Erfolg. Beispielsweise lindert anti-TNF Antikörper Schmerzen, Gelenkschwellungen und Anämie und normalisiert die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit bei Patienten mit rheumatoider Arthritis [33,34,39]. Ebenfalls ermutigende Ergebnisse erzielte man mit anti-TNF Antikörpern in der Behandlung von Morbus Crohn [126].

I. 2 TACE

TACE (TNF-Alpha-Converting-Enzyme) gehört der Proteasengruppe ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) an.

I. 2. 1 ADAM

ADAMs spielen eine wichtige Rolle in der Zellregulation, die sie über Effekte wie Zelladhäsion, Migration, Proteolyse und Modifikation von Zellsignalen beeinflussen. Die faszinierende Familie besteht aus transmembranen und sekretorischen Proteinen. Obwohl alle ADAMs Domänen für Metalloproteinasen besitzen, codieren bei Menschen nur 13 von 21 der Gene funktionelle Proteasen. Für die anderen acht Mitglieder scheinen Protein-Protein Interaktionen Aspekte ihrer biologischen Funktion zu sein. Die funktionellen ADAM Metalloproteinasen sind am „ectodomain shedding“ verschiedener Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen beteiligt.

I. 2. 2 Die Geschichte von mTNF-Alpha-Convertig-Enzyme

Vor über einem Jahrzent wurde von drei verschiedenen Gruppen die Entdeckung einer TNF- α freisetzenden Aktivität in Makrophagen und Monozyten in Nature publiziert [47,77,80]. Diese Arbeiten führten zu einem Wettrennen in der Identifikation und Isolierung dieser Protease, das TNF- α -Convertig-Enzyme (TACE) und seiner cDNA.

Dies wurde 1997 durch die Firmen Glaxo und Immunex [16,82] erreicht, die beide unter enormer Unterstützung akademischer und industrieller Gruppen ihr Forschungsarbeiten betrieben. Diese Projekte wurden durch den Wunsch nach Entdeckung neuer Inhibitoren getrieben, die sicherer und ökonomischer die bisher teuren und ineffizienten Medikamente für folgende Krankheitsbilder ablösen sollten: septischer und toxischer Schock, Abstoßungsreaktionen nach Transplantation, rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn, Multiple Sklerose, Autoimmun-Diabetes, Kachexie, verschiedene Arten von Leukämie und viele neurodegenerative Zustände.

Heute, ein Jahrzehnt später, scheint dieses Versprechen unerfüllt. Trotz beträchtlicher Bemühungen [21,30,68,83,87,100,129,130] sind nahezu alle TACE Forschungsprojekte der Pharmaindustrie eingestellt, weil selbst die vielversprechendsten Inhibitormoleküle Probleme beim Schritt in klinische Studien aufwarfen oder das klinische Ziel nicht erfüllten. Anhand der in dieser Dissertation dargelegten Resultate glauben wir, dieses Scheitern erklären zu können.

I. 2. 3 Der Aufbau von TACE

Homologie in der Sequenzanalyse von TACE bestätigt die Zugehörigkeit zur ADAM-Familie. Folgende Domänen sind basierend auf der homologen Anordnung untersucht worden.

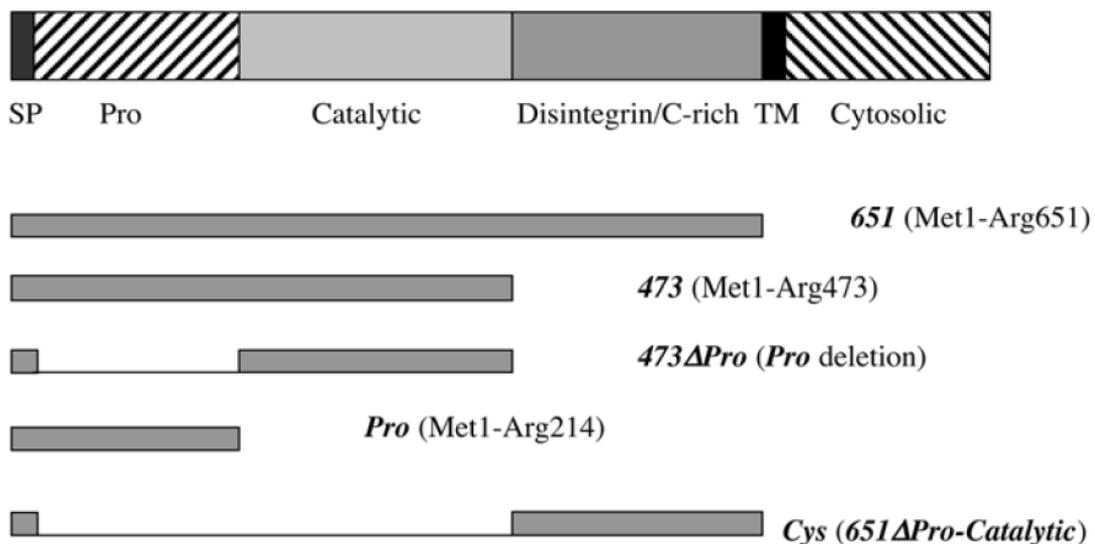


Bild D (übernommen aus [78]) : Domänenabfolge von TACE. SP, Signal Peptid; TM, transmembran; c-rich, Cystein-reich.

Der N-Terminus beinhaltet das Signalpeptid gefolgt von einer 197 Aminosäuren langen Pro-Domäne, die eine „Cysteine-Switch Box“ (PKVC GYLK188) enthält. In Analogie zu den Matrix Metalloproteasen (MMPs) wird TACE zunächst als Pro-Protein synthetisiert, das später durch Abspaltung der Prodomäne in die reife Form gebracht wird. Für die MMPs wurde postuliert, dass der Cysteinrest in diesem hoch konservierten Motiv ein Zinkatom an der aktiven Stelle bindet und dadurch die Vorstufe inaktiviert [44,127]. Pro-Domänen spielen ebenfalls in der Enzymsekretion eine wichtige Rolle. So wird es momentan in der Expression von funktionellem TACE diskutiert [78].

Die Abgrenzung zwischen Pro- und katalytischer Domäne ist wahrscheinlich durch die KEX-2 / furin Erkennungsstelle (RVKRR 215) gefolgt von der katalytischen Domäne (Asn223 bis Val477) definiert. Letztere wurde bereits als dreidimensionale Struktur vom Rest des Proteins isoliert [76]. Die Faltung ist ähnlich der der ADAMs und auch der MMPs, jedoch sind die „interconnecting loops“ größer. Auf die katalytische folgt eine Disintegrin / Cystein reiche Domäne (Cys: Asp484 bis Arg651). Die N-terminale Hälfte dieser Domäne hat ein Cysteinrestschema mit Disintegrinanteilen. C-terminal zu dem Disintegrinmodul sind Motive des „epidermal growth factor“ und ähnlich dem Crambin identifiziert worden. Das Vorhandensein einer einzigen transmembranären Domäne (Ile672 bis Val694) definiert die Topologie von TACE als ein Klasse I Membranprotein, das die Pro-, katalytische und Cysteindomäne im lumenalen/extrazellulären Kompartiment der sekretorischen Bahn hat. Dies ist ähnlich zu der Topographie von pro-TNF α , das ebenfalls die Spaltungsseite und die Cysteindomäne lumenal/extrazellulär trägt.

TACE endet in einem 146 Aminosäure langen cytoplasmatischen Rest (Asp695 bis Cys824), der ein Tyr-Rest in naher Umgebung eines Scr homologen zwei-domänenbindenden Motiv (KKLDKQY ESL705) und einem Scr homologen drei-domänenbindenden Motiv (PAPQTPGR738) besitzt. Zur jetzigen Zeit der Forschung wird spekuliert, ob dieses Motiv eine Rolle in der Kontrolle der intrazellulären Prozessierung von TACE spielt.

I. 2. 4 Die Pro-Domäne und der Cysteine-Switch

Obwohl bisher intensive Forschung in Bezug auf Biogenese und Substratspezifität von TACE und der Familie der ADAMs betrieben wurde, konnte erstaunlicherweise nur wenig über die Enzymaktivierung, im Speziellen welche Rolle die Pro-Domäne spielt in Erfahrung gebracht werden. Nur eine Handvoll der ADAMs wurden charakterisiert in Bezug auf ihre Sekretion

und Pro-Domänen vermittelte Inhibition: ADAM 9 [105], ADAM 10 [3], ADAM 12 [70,71,121], ADAM 15 [73], ADAM 17 (TACE) [50,79,109], ADAM 19 [63] und ADAM 28 [57]. Zur adäquaten Sekretion benötigt jede dieser ADAMs die Anwesenheit der Pro-Domäne. Zwei Studien befassten sich mit der Funktion des Cysteine-Switch in ADAMs näher und kamen zu widersprüchlichen Ergebnissen. Für ADAM 12 ist der Cysteine-Switch unentbehrlich für die inhibitorische Aktivität [71], wohingegen für TACE und ADAM 10 der Cysteine-Switch nicht unbedingt notwendig ist, um das Enzym zu hemmen [50]. Diese Tatsache setzt TACE und ADAM 10 nicht nur von allen anderen ADAMs ab, sondern beispielsweise auch von der Familie der Matrix Metalloproteasen, für die der Cysteine-Switch auch essentiell für die Zymogen Inhibition und somit für die adäquate Sekretion ist [127]. Es wird momentan diskutiert, dass bei TACE nicht das Cysteine-Switch Modell, sondern die Pro-Domäne die katalytische Domäne ähnlich eines Chaperons inhibiert [78]. Somit stellt die Suche nach sogenannten pro-mimetischen Stoffen scheinbar ein sinnvolles Forschungsziel dar, um viele chronische und akut inflammatorische Zustände zu durchbrechen. Diese Hoffnung gilt aber nur, wenn TACE tatsächlich die alleinige sheddase für TNF- α sein sollte.

I. 3 Fragestellung

In den laboreigenen Arbeiten der letzten Jahre, die sich speziell mit dem Thema der TNF- α Freisetzung nach kardialer Ischämie befassten, deutete sich in isoliert perfundierten Maus- und Rattenherzen eine gewisse Unabhängigkeit der TNF- α Freisetzung von TACE an. Versuche mit dem TACE spezifischen Hemmstoff TAPI-2 in isolierten Mäuseherzen zeigten keine signifikante Verminderung der TNF- α Freisetzung nach 15 Minuten Ischämie und 90 Minuten Reperfusion. Vielmehr scheinen auch andere Proteasen, wie beispielsweise MMP-7 eine Rolle in der TNF- α Abspaltung zu spielen [103]. Auch bei Rattenherzen, die eine Ischämie durchliefen und während der Reperfusion zwei Anstiege von TNF- α nach 2-10 Minuten und >45 Minuten zeigten waren diese Freisetzungen nahezu TACE unabhängig [49]. Um der wirklichen Bedeutung von TACE für ein shedding des Zytokins näher zu kommen, wurden mit verschiedenen Zelllinien, u.a. HUVEC, HMC-1 und MEF Versuche durchgeführt, um mögliche Aktivierungsmechanismen von TACE, sowie alternative Freisetzungsmechanismen von TNF- α aufzudecken. Im wesentlichen wurden folgende Ansätze verfolgt:

1. Versuch einer Stimulation der Freisetzung von TNF- α mit HMC-1.
2. Inhibition der TNF- α Freisetzung nach Transfektion mit huTNF- α haltigem cDNA-Plasmid mit HMC-1 und MEF. Letztere waren ohne Expression von TACE (TACE -/-) bzw. wildtyp-Zellen mit TACE (TACE +/+).
3. Inhibition der Freisetzung von TNF- α durch Proteaseinhibitoren verschiedener Klassen mit transfizierten MEF (TACE -/- und TACE +/+).

II. Material und Methoden

II. 1 Material und Bezugsquellen

II. 1. 1 Substanzen (allgemein)

Acrylamid/Bisacrylamid: Roth, Karlsruhe, Deutschland

APS (Ammonium-Persulfat): Sigma, St. Louis, USA

BamHI in 10x Y⁺/TangoTM: Fermentas International Inc., Burlington, Ontario, USA

BCA Protein Assay (Reagenzien A und B): Pierce, Rockford, IL, USA

Brefeldin A: Sigma, St. Louis, USA

Bromphenolblau: Sigma, St. Louis, USA

BSA (bovines Serum-Albumin): Merck, Darmstadt, Deutschland

Butanol: Fluka, Buchs, Schweiz

Calcium Ionophore A23187: Sigma, St. Louis, USA

Complete[®] Proteasinhinhibitor-Cocktail: Roche, Basel, Schweiz

DMSO (Dimethylsulfoxid): Merck, Darmstadt, Deutschland

DTT (Dithiothreitol): Sigma, St. Louis, USA

E-64: Roche, Basel, Schweiz

EcoRI in 10x Y⁺/TangoTM: Fermentas International Inc., Burlington, Ontario, Canada

EDTA (Ethylen-diamin-tetra-acetat): Merck, Darmstadt, Deutschland

L-Glutamin: Merck, Darmstadt, Deutschland

Glycerin: Merck, Darmstadt, Deutschland

Glycin: Merck, Darmstadt, Deutschland

IL-6 (human): Pepro Tech, Rocky Hill, NJ, USA

Ketotifen-Fumarat: Sigma, St. Louis, USA

Leupeptin: AppliChem, Darmstadt, Deutschland

2-Mercaptoethanol: Fluka, Neu-Ulm, Deutschland

Methanol: Merck, Darmstadt, Deutschland
Monothioglycerin: Sigma, St. Louis, USA
NP-40 (Nonidet P-40): Sigma, St. Louis, USA
1,10-Phenanthrolin: Sigma, St. Louis, USA
Pefabloc: Roche, Basel, Schweiz
Pepstatin A: Sigma, St. Louis, USA
Pferdeserum: Biochrom, Berlin, Deutschland
PMA (Phorbol-12-Myristat-Acetat): Sigma, St. Louis, USA
Ponceau S: Sigma, St. Louis, USA
SDS (Natrium-Dodecylsulfat): AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Substanz P (Synthetisch): Sigma, St. Louis, USA
Superfect[®] Transfection Reagent: Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
TAPI-2 (N-(R)-(2-(Hydroxyaminocarbonyl)Methyl)-4-Methylpentanoyl-L-t-Butyl-Gly-L-Ala-2-Aminoethylamid („TNF- α -protease inhibitor“): Peptides International, Louisville, USA
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin): Sigma, St. Louis, USA
TNF- α (rekombinant aus Hefe): Sigma, St. Louis, USA
TNF- α (rekombinant aus E.coli): Sigma, St. Louis, USA
Tris-Base: AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100: Sigma, St. Louis, USA
Trypanblau: Sigma, St. Louis, USA
Tumor-Nekrose-Factor- α (TNF α , human): Endogen, Woburn, MA, USA
Tween 20: AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Trockenmilchpulver: Uelzena, Uelzen, Deutschland

II. 1. 2 Material und Medien für Zellkultur

Antibiotic Antimycotic Solution (100x) (10000 U/ml Penicillin + 10 mg/ml Streptomycin + 25 μ g/ml Amphotericin B): Sigma, St. Louis, USA
DMEM, Dulbeco's Modified Eagles Medium: Sigma, St. Louis, USA
Falcon Multiwell 6 well: Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
Falcon Multiwell 24 well: Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
Falcon 6cm Zellkulturschale: Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA

Falcon 10cm Zellkulturschale: Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
Fetal Calf Serum (FCS): Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Gentamycin: Cambrex BioScience Walkersville, Walkersville, MD, USA
Iscove-Medium (with stable glutamine and 3.024 g/l NaHCO₃): Biochrom AG, Berlin,
Deutschland
Newborn Calf Serum: Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin-Streptomycin Solution (10000 U/ml Penicillin + 10 mg/ml Streptomycin): Sigma,
St. Louis, USA
Promocell: Promocell Bioscience Alive GmbH, Heidelberg, Deutschland
Trypsin-EDTA Solution (1x): Sigma, St. Louis, USA
Vivaspin 0,5 ml Concentrator: VivaScience AG, Hannover, Deutschland
Zellkulturflasche 25 cm²: Sarstedt, Newton, NC, USA
Zellkulturflasche 75 cm²: Sarstedt, Newton, NC, USA

PAEC-Medium

400	ml	DMEM
40	ml	FCS
4	ml	Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B

PBS⁻ (Calcium-free phosphate buffered saline)

137	mM	NaCl
2,7	mM	KCl
8,0	mM	Na ₂ HPO ₄
1,47	mM	KH ₂ PO ₄
pH	7,4	

PBS⁺ (Phosphphate buffered saline)

137	mM	NaCl
2,7	mM	KCl
6,5	mM	Na ₂ HPO ₄
1,47	mM	KH ₂ PO ₄
0,2	mM	MgCl ₂
0,68	mM	CaCl ₂
pH	7,4	

Promocell:

500 ml Endothelzellmedium von Promocell
12,3 ml Supplement-Mix für Endothelzellen

FCS freies HMC-1 Medium:

500 ml Iscove's Medium
100 µl Monothioglycerol
5 ml L-Glutamin MW=146,2
500 µl Gentamycin 50mg/ml

HMC-1 Medium:

500 ml Iscove's Medium
50 ml Eisen supplementiertes fetal calf serum (FCS)
100 µl Monothioglycerol
5 ml L-Glutamin MW=146,2
500 µl Gentamycin

MEF Medium:

500 ml DMEM
5 mM Natrium-Pyruvat
100 U/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
0,25 µg/ml Amphotericin B

II. 1. 3 Puffer

Homogenisierungspuffer für Western Blot

50 mM Tris-HCl pH 7,4
1 mM DTT
0,1 mM ortho-Phenanthrolin
0,2 % Nonidet P-40 (w/v)
1 Tablette Complete[®] auf 10 ml Puffer

Lysepuffer für Zellpellets:

40 ml PBS⁺
1 % Triton X-100
4 Tabletten Complete[®]

Lysepuffer für Western Blot

20 mM KH₂PO₄
1 mM DTT
1 mM EDTA
1 mM Pefablock
1 μM Leupeptin
1 μM Pepstatin A
50 mM NaF
40 mM Na₄P₂O₇
1 mM Na₃VO₄
1 mM ortho-Phenanthrolin
0,2 % Nonidet P-40 (w/v)
1 Tablette Complete[®] in 10 ml PBS⁺

4x Auftrags-Puffer für Western Blot

250	mM	Tris-HCl pH 6,8
400	mM	Mercaptoethanol
8	%	SDS (w/v)
40	%	Glycerin (v/v)
0,02	%	Bromphenolblau (w/v)

Western Laufpuffer

25	mM	Tris-HCl pH 6,8
192	mM	Glycin
0,1	%	SDS (w/v)

Western Transferpuffer

48	mM	Tris-HCl pH 8,0
39	mM	Glycin
0,037	%	SDS (w/v)
10	%	Methanol (v/v)

Western Blockierlösung

200	mM	NaCl
50	mM	Tris-Base pH 7,5
3	%	BSA (w/v)
0,03	%	Tween 20 (v/v)
10	%	Pferdeserum (w/v)

Trockenmilchpulver-Lösung

(zur Minimierung unspezifischer Antikörper-Bindung an den Western Blot)

3 % Trockenmilchpulver (w/v) in PBS⁺

Western Waschpuffer

50 mM Tris-Base pH 7,5

0,15 M NaCl

Mit oder ohne 0,3% Tween 20 (w/v)

Polyacrylamid-Gele für Western blot

(A) Sammelgel 4% (für 5ml)

3,0 ml H₂O bidest

1,25 ml 0,5M Tris pH 6,8

660 µl Acrylamid/Bisacrylamid

50 µl 10% SDS (w/v)

25 µl 10% Ammoniumpersulfat

5 µl TEMED

(B) Trenngel 10% (für 15ml)

6,03 ml H₂O bidest

3,75 ml 1,5M Tris pH 8,8

150 µl 10% SDS (w/v)

5,0 ml Acrylamid/Bisacrylamid

75 µl 10% APS

7,5 µl TEMED

(C) Trenngel 12% (für 15ml)

5,01	ml	H ₂ O bidest
3,75	ml	1,5M Tris pH 8,8
150	µl	10% SDS (w/v)
6,0	ml	Acrylamid/Bisacrylamid
75	µl	10% APS
7,5	µl	TEMED

II. 1. 4 Nucleinsäureplasmid

Das Plasmid pME18S-TNF- α wurde von W.H. Newman (Mercer University, Macon, GA, USA) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um einen Vektor für die Genexpression in Säugetierzellen. Das Plasmid trägt cDNA für humanen TNF- α (Wang, Creasey et al., 1985) als ca. 0,7 kb EcoRI-BamHI-Insert. Das TNF- α -Gen ist unter der Kontrolle des starken, chimären Promoters SR α (Takebe, Seiki et al., 1988).

II. 1. 5 Antikörper

Anti-TNF- α Antikörper:

Für Western Blot:

Anti-Human TNF α (N-19) Polyclonal (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland): Polyklonaler Antikörper (Spezies: Ziege) gegen humanes TNF- α

Sekundäre Antikörper:

Für Western Blot:

HRP-anti-goat IgG (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland): Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltes IgG (Spezies: Hase)

II. 1. 6 ELISA-Kits

Human TNF- α ELISA kit (BioSource Europe, Nivelles, Belgien): monoklonaler Antikörper, Sandwich ELISA

Rat TNF- α UltraSensitive ELISA kit (BioSource Europe, Nivelles, Belgien): monoklonaler Antikörper, Sandwich ELISA

II. 1. 7 Geräte

Bakterienschüttler HT: Infors AG, Bottmingen, Schweiz

ELISA reader Spectra Fluor: Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland

Kühltruhe NuaireTM -85°C Ultralow Freezer, Zapf Instrumente, Sarstedt, Deutschland

Mikroskop Fluovert FU: Leitz, Oberkochen, Deutschland

Sterilbank LaminAir® HB 2448: Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland

Sterilbank SterilGard: The Baker Company, Sanford, Maine, USA

Sterilbank Steril-VBH Compact: Steril, Foster Wheeler, Mailand, Italien

Waage Mettler H54: Mettler Waagen GmbH, Giessen, Schweiz

Wasserbad SWB25: Haake, Karlsruhe, Deutschland

Zentrifuge Biofuge 13: Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland

Zentrifuge Superspeed RC2-B: Sorvall, Hormuth-Vetter, Wiesloch, Deutschland

Zentrifuge Varifuge 3.0R: Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland

Zellcoulter CASY1: Schärfe System, Deutschland

Zellcoulter Coulter Z2: Coulter Electronics LTD., Luton, England

Zellinkubator Cytoperm: Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland

Zellinkubator Steri-Cult 200: Forma Scientific Inc., Marietta, OH, USA

II. 2 Methoden

II. 2. 1 Zellkulturen:

Es wurden zwei verschiedene Arten von Zellen untersucht:

- Die humane Mastzelllinie HMC-1 wurde von Prof. Dr. med. Christian Sommerhoff zur Verfügung gestellt und bei 37°C unter 5% CO₂ in Iscove´s Medium kultiviert, das mit 10% Eisen-supplementiertem Fetal Calf Serum (FCS), 1,2mM Monothioglycerin, 200mM L-Glutamin und 50µg/ml Gentamycin versetzt war.
- Die Mouse Embryonic Fibroblasts (MEF) wurden von Amgen, Thousand Oaks, CA, USA zur Verfügung gestellt und bei 37°C unter 5% CO₂ in DMEM kultiviert, das mit 10% Eisen-supplementiertem FCS und 1 % Antibiotic-Antimycotic Solution (10000 U/ml Penicillin + 10 mg/ml Streptomycin + 25 µg/ml Amphotericin B) versetzt war.

II. 2. 2 Transfektion von Zellen

II.2.2.1 Transiente Transfektion von HMC-1

Zuerst wurden die Zellen aus den Zellkulturflaschen in einen Zentrifugenbehälter 50ml (Falcon) überführt und mittels Zellcoulter die Konzentration gemessen. Danach wurden sie bei 900 rpm und 25°C für 5 Minuten zentrifugiert und das Pellet in frisches HMC-1 Medium mit einer Konzentration von $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml aufgenommen. Vor der Transfektion wurden die Zellen in 6-well Platten (Falcon) zu je 2 ml verteilt und wieder zurück in den Zellinkubator gestellt. Nach 2 Stunden wurde die Transfektion mittels SuperfectTM gemäß dem „Transfektionsprotokoll für Suspensionszellen“ aus dem Handbuch der Firma Qiagen durchgeführt. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen unter dem Mikroskop begutachtet und bei intaktem Erscheinungsbild aus den wells in einen Zentrifugenbehälter

50ml vereint. Für die Versuche wurden sie dann nochmals bei 900 rpm und 25°C für 5 Minuten zentrifugiert und in frischem HMC-1 Medium mit FCS aufgenommen und auf die entsprechende Ausgangskonzentration gebracht.

II.2.2.2 Transiente Transfektion von MEF

Mouse Embryonal Fibroblasts wurden in 6cm Zellkulturschalen sowie in 6-well Platten transfiziert. Dazu mussten sie eine Konfluenz von 80-90% aufweisen und mikroskopisch einwandfrei aussehen, d.h. ohne Abrundungen oder Apoptose sein. Die Transfektion mit SuperfectTM wurde gemäß dem Protokoll der Firma Qiagen für adhärenente Zellen durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden wurde das Transfektionsgemisch entfernt und die Zellen einmal mit 4ml PBS⁺ gewaschen und in frisches PAEC-Medium aufgenommen. Abschließend wurde noch mal per Mikroskop kontrolliert. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Versuche mit den Zellen durchgeführt.

II. 2. 3 Lyse von Zellen

II.2.3.1 Lyse von Suspensionszellen (HMC-1)

Ca. $5 \cdot 10^5$ Zellen wurden bei 4°C auf Eis mit 200µl Lysepuffer resuspendiert und mit einer Insulinspritze durch mehrmaliges Aufziehen lysiert. Die Lysate wurden zentrifugiert (5min, 12.000g), das Pellet verworfen und vom Überstand eine Proteinbestimmung durchgeführt.

Zur Proteinbestimmung wurde der BCA[®] protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA) verwendet, wobei nach dem Protokoll des Hersteller verfahren wurde. Als Mengenstandard diente bovines Serum-Albumin.

Zur Lagerung wurden die Lysate in flüssigem Stickstoff schock-gefrohren und bei -80°C aufbewahrt.

II.2.3.2 Lyse von adhärennten Zellen (MEF)

Die Zellen wurde bei 4°C mit 200µl (60mm Schalen) bzw. 500µl (100mm Schalen) Lysepuffer für 15 Minuten inkubiert und dann mit Hilfe eines Schabers restlos von der Platte entfernt. Danch wurde die Zellsuspension in ein Eppendorfer Reaktionsgefäß überführt und mit einer Insulinspritze durch mehrmaliges Aufziehen lysiert. Die Lysate wurden zentrifugiert (5min, 12.000g), das Pellet verworfen und vom Überstand eine Proteinbestimmung (BCA[®] protein assay) durchgeführt.

Zur Lagerung wurden die Lysate in flüssigem Stickstoff schock-gefrohren und bei -80°C aufbewahrt.

II. 2. 4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine aus Zell-Lysaten wurden mittels SDS-PAGE (4% Sammelgel, 10% Trenngel) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA. Die Laufzeit (ca. 1h) wurde so gewählt, dass die Auftragungs-Pufferfront am Fuße des Gels anlangte (Glasplatten, Spacer, Käme und Gelkammer: Bio Rad[®], München, Deutschland).

II. 2. 5 Western blotting

Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte mittels Western blotting nach der „semi-dry“ Methode (Kyhse-Andersen, 1984).

II. 2. 6 Anfärbung von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Um den Erfolg des Transfers der Proteine aus dem Gel auf die Membran abzuschätzen, wurden die Proteinbanden mit Ponceau S gefärbt. Die Proteinbanden wurden mittels eines digitalen Analysesystems (Gel Doc 1000, Bio Rad[®], München, Deutschland) aufgenommen und anschließend wurde die Membran solange mit H₂O bidest entfärbt bis keine Banden mehr sichtbar waren.

II. 2. 7 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Der spezifische Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen erfolgte immunologisch mittels Antikörper (Harlow & Lane, 1988). TNF- α wurde mit dem primären Antikörper GOAT ANTI-TNF α nachgewiesen, der zu 1 μ g/ml in Blockierlösung verdünnt eingesetzt wurde. Der sekundäre Antikörper war ein Meerrettich-Peroxidase-(HRP-) gekoppelter antigoat IgG; er wurde 1:400 verdünnt in Blockierlösung eingesetzt. Die Entwicklung der Blots erfolgte mittels Chemiluminescence Detection Kit (AppliChem, Darmstadt, Deutschland). Sie wurden direkt mittels eines digitalen Analysesystems (Gel Doc 1000, Bio Rad[®], München, Deutschland) dokumentiert.

II. 2. 8 Membrangängigkeit von TAPI-2 bei HMC-1

1 \cdot 10⁶ Zellen wurden mit 300 μ M TAPI-2 in 1ml PBS⁺ für 30 Minuten inkubiert, dann zentrifugiert (1 min, 13.000g) und die Überstände schock-gefroren und bei -80°C aufbewahrt. Das Zellpellet wurde dreimal bei 4°C mit PBS⁺ gewaschen und schließlich in 50 μ l PBS⁺ resuspendiert. Die Zellen wurden durch drei „freeze-thaw“ Zyklen (Sherman & Kim, 1967) lysiert, zentrifugiert (1 min, 13.000g) und die Überstände wieder schock gefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die abzentrifugierten Membranen wurden in 50 μ l PBS⁺ resuspendiert und mit 1:10 HClO₄ gefällt, zentrifugiert (1 min, 13.000g) und die Überstände cryokonserviert.

Die verschiedenen Proben (Kontrolle, Zellysat, Zellmembran) wurden dann der HPLC zugeführt.

II. 2. 9 High pressure liquid chromatography (HPLC)

Der Nachweis von TAPI-2 in sauren Zellextrakten bzw. in angesäuerten Zellüberständen erfolgte mittels *high pressure liquid chromatography* (HPLC). Die Auftrennung erfolgte über eine C18-Aqua[®] Säule (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) mit isokratischer Elution durch ein Gemisch aus 32% HClO₄ (pH 2,0), Methanol (30%) und Wasser (38%) und bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Für TAPI-2 ergab sich unter diesen Bedingungen eine Retentionszeit von 14,6 Minuten. Der Nachweis erfolgte photometrisch bei einer Absorptionswellenlänge von 200nm (L-7400 Detektor, Hitachi-Merck, Darmstadt, Deutschland).

II. 2. 10 Nachweis von TNF- α im Überstand und Lysat von Zellen

TNF- α Konzentrationen in Zellüberständen (Medium oder Puffer) und Zellysaten wurden immunologisch mittels ELISA bestimmt. Die verwendeten Kits stammten von Biosource („human TNF- α “ und „rat TNF- α “). Die Vorgehensweise entsprach dem Protokoll des Herstellers.

II. 2. 11 Stimulationsversuche naiver HMC-1

II.2.11.1 Substanz-P

Die kultivierten Zellen wurden mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^7$ Zellen pro ml in PBS⁺ aufgenommen und mit verschiedenen Konzentrationen (10 μ M, 100 μ M) von Substanz-P, mit und ohne Zugabe von 1 μ M Ketotifen jeweils für 20 und für 60 Minuten bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5% CO₂ inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation (1 min, 13.000g) wurden die Überstände abgenommen und aus den Pellets Lysate angefertigt.

II.2.11.2 Calcium-Ionophor A23187

HMC-1 wurden in einer Konzentration von $1 \cdot 10^7$ Zellen pro ml in PBS⁺ aufgenommen und mit 0,005 mg/ml und 0,05 mg/ml Calciumionophore A23187, mit und ohne 1 μ M Ketotifen jeweils für 20 und 60 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden sie zentrifugiert (1 min, 13.000g), die Überstände abgenommen und aus den Pellets Lysate angefertigt.

II.2.11.3 IL-6

Die Zellen wurden bei einer Konzentration von $1 \cdot 10^5$ Zellen pro ml Medium in Zellkulturflaschen (25cm²) angesetzt. HMC-1 wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von IL-6 (50, 100, 300ng/ml, 1, 3 μ g/ml) behandelt oder über einen Zeitraum von 10 Tagen kontinuierlich mit 100ng/ml bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Es wurden Überstände abgenommen und Zelllysate angefertigt.

II. 2. 12 Inhibitionsversuche transfizierter HMC-1

II.2.12.1 TAPI-2

HMC-1 wurden nach transienter Transfektion mit cDNA für TNF- α in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro ml in PBS⁺ aufgenommen und in 500 μ l Ansätzen mit 30, 100 und 300 μ M TAPI-2 bei 37°C und in einer Atmosphäre mit 5% CO₂ inkubiert. Jeweils 150 μ l des Überstandes wurden nach 15, 30 und 60 Minuten abgenommen und die Konzentration von TNF- α bestimmt.

In einem anderen Versuch wurden HMC-1 unter Anwesenheit von 300 μ M TAPI-2 transfiziert, für 24h inkubiert und anschließend Zelllysate gewonnen.

II.2.12.2 Brefeldin A

Die Zellen wurden nach erfolgreicher Transfektion in PBS⁺ aufgenommen (10^6 Zellen pro ml) und in 500µl Ansätzen mit 20µM, 200µM und 2mM Brefeldin A bei 37°C und in einer Atmosphäre mit 5% CO₂ inkubiert. Nach 30 und 60 Minuten wurden jeweils 150 µl des Überstandes abgenommen und die Konzentration von TNF-α bestimmt.

II. 2. 13 Stimmulationsversuche transfizierter HMC-1

II.2.13.1 H₂O₂

Die Zellen wurden nach Transfektion mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro ml in PBS⁺ aufgenommen und in 500µl Ansätzen mit 100 und 500µM H₂O₂ bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 15, 30 und 60 Minuten wurden jeweils 150µl des Überstandes abgenommen und die Konzentration von TNF-α bestimmt.

II.2.13.2 HOCl

Bei einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro ml in PBS⁺ wurden die transfizierten HMC-1 in 500µl Ansätzen mit 30, 50 und 100µM HOCl bei 37°C und in einer Atmosphäre mit 5% CO₂ inkubiert. 150µl der Überstände wurden jeweils nach 15, 30 und 60 Minuten abgenommen und die Konzentration von TNF-α bestimmt.

II. 2. 14 Inhibitionsversuche transfizierter MEF

Das Transfektionsgemisch wurde nach 3 h Inkubation abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS⁺ gewaschen und mit frischem Medium, in dem die verschiedenen Proteaseinhibitoren gelöst waren für 24 h bei 37°C und in einer Atmosphäre mit 5% CO₂ inkubiert. E-64 und Pepstatin A wurden mit einer Konzentration von 10µM, 1,10-Phenanthrolin mit 100µM und Pefabloc

mit 2mM eingesetzt. Nach 24 Stunden wurden Überstände abgenommen und Zellysate gewonnen.

II. 2. 15 Maxipräp zur Vermehrung des TNF- α Plasmids

Die Vermehrung des pME18s-TNFalpha Plasmids wurde mit dem Qiagen[®] Test-Kit und nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

II. 3 Statistische Methoden

Der Stichprobenumfang jeder Versuchsgruppe ist im Ergebnisteil angegeben. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. Bei statistischen Vergleichen von zwei unabhängigen Versuchsgruppen (Kontroll- und Interventionsgruppe) wurde der t-Test nach Student verwendet.

Unterschiede zwischen Gruppen wurden als statistisch signifikant erachtet, wenn die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler erster Ordnung weniger als 5% betrug ($p < 0,05$). Signifikante Unterschiede zwischen Interventions- und Kontrollgruppen wurden mit (*) gekennzeichnet. Alle statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe des Computerprogramms Sigma Plot 10.0 (Systat Software, Inc.) durchgeführt.

III. Ergebnisse

III. 1 HMC-1 als Modell der kardialen Mastzelle

Frühere Versuche haben gezeigt, dass die Freisetzung von TNF- α in isoliert perfundierten ischämischen Herzen von Mastzellen getriggert wird. Da primäre humane Mastzellen nur mit hohem Aufwand und sehr geringer Ausbeute zu isolieren sind, wurde die Mastzelllinie HMC-1 als Modell für humane Mastzellen gewählt.

HMC-1 sind unreife Mastzellen und enthalten wenig TNF- α (MW: $16,9 \pm 0,65$ pg/ 10^6 Zellen; n=3). Davon setzen Sie geringe Mengen (MW: $1,7 \pm 0,18$ pg/ 10^6 Zellen; n=3) kontinuierlich frei. Da die Freisetzung nur knapp über der Nachweisgrenze des ELISA liegt, war nicht jede Kultur positiv messbar.

III. 1. 1 Versuch der Stimulation

Folgenden Versuche wurden durchgeführt, um weitere Hinweise über die Freisetzung von TNF- α aus Mastzellen zu erhalten. Im Speziellen wurde das Augenmerk auf die frühe Freisetzung, also die Freisetzung aus den Speichergranula gelegt.

III.1.1.1 Substanz P führt zu keiner Freisetzung von TNF- α

Substanz P wurde in drei verschiedenen Konzentrationen (1 μ M, 10 μ M und 100 μ M) eingesetzt und führte bei den Kulturen weder extrazellulär zum Anstieg noch intrazellulär zum Abfall der TNF- α Konzentration (Abb.1).

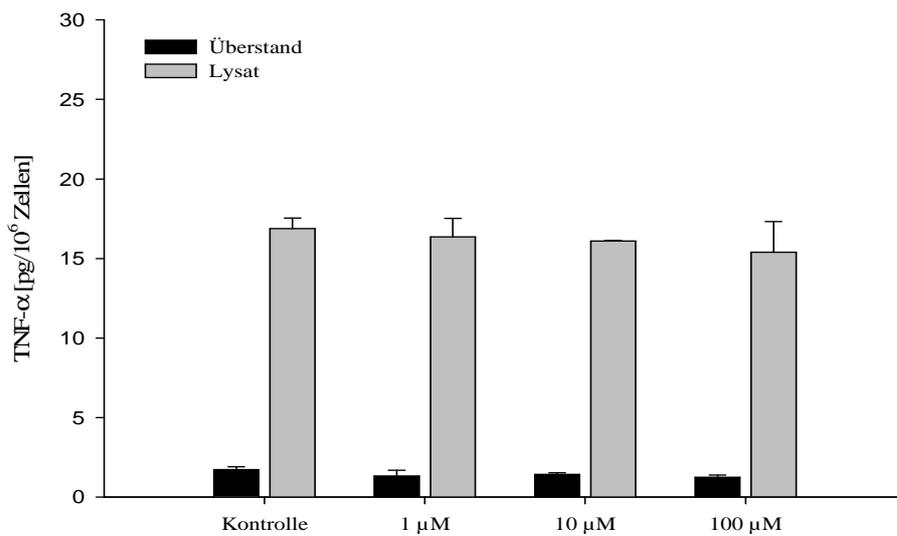


Abbildung 1: TNF- α gemessen in Überständen und Lysaten nach 60 minütiger Inkubation mit der entsprechenden Konzentration von Substanz P (n=3).

III.1.1.2 Wirkungslosigkeit von Calcium-Ionophor A 23187

Calcium-Ionophor A 23187 wurde in drei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Die Messungen der Zelllysate (Abb.2) und der Zellkulturüberstände (hier nicht gezeigt) ergaben keinen Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Interventionsgruppen.

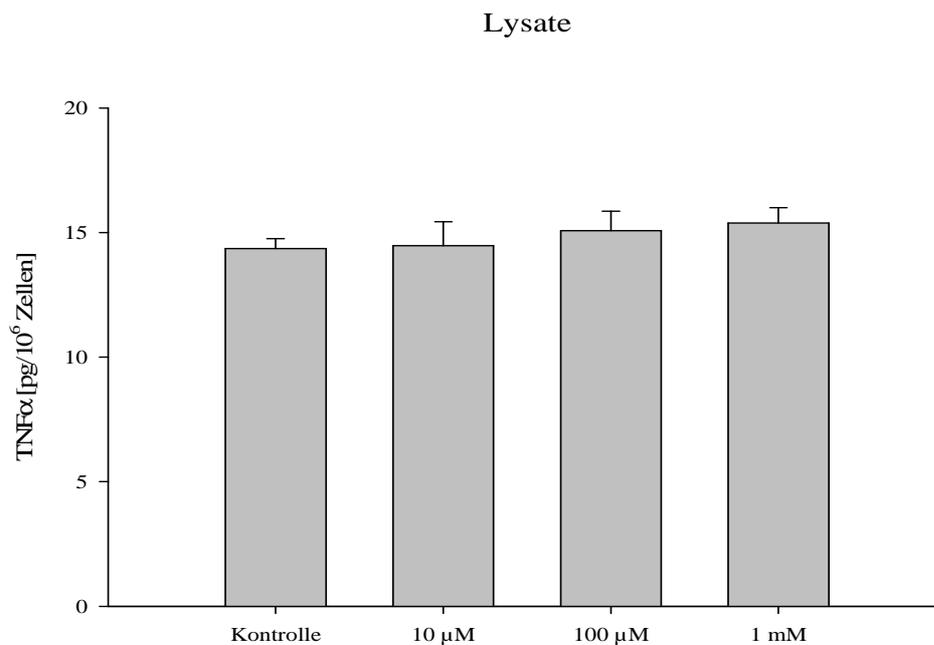


Abbildung 2: TNF- α Konzentration in Zelllysaten nach einstündiger Inkubation mit Calcium-Ionophor A 23187 (n=4)

III. 1. 2 Transfektion mittels TNF- α cDNA haltigen Plasmids

III.1.2.1 Vergleich des TNF- α Gehaltes von naiven und transfizierten Zellen

Die TNF- α Konzentration wurde in Zellüberständen und Zelllysaten gemessen und miteinander verglichen. Um eine unspezifische Aktivierung durch Transfektionsreagenzien auszuschließen wurde zusätzlich eine „mock“ Transfektion mit cDNA für green fluorescent peptide (GFP) in gleicher Weise durchgeführt. Mithilfe der Durchflusszytometrie konnte die Effizienz der Transfektion auf etwa 5% geschätzt werden. Färbungen mit Trypanblau ergaben keine Zelltoxizität.

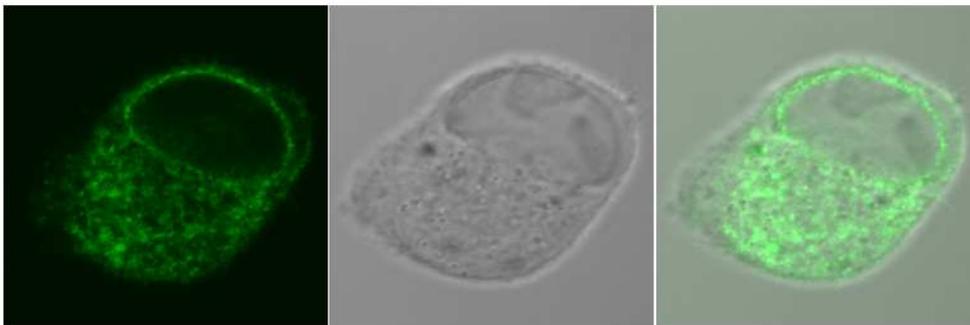


Abbildung 3A: Fluoreszenzmikroskopisches Bild einer transfizierten HMC-1 Zelle mit vesikulärer Speicherung des GFP (links). Das mittlere Bild zeigt die Zelle im Durchlicht; rechts ist die Überlagerung der zwei Aufnahmen zu sehen.

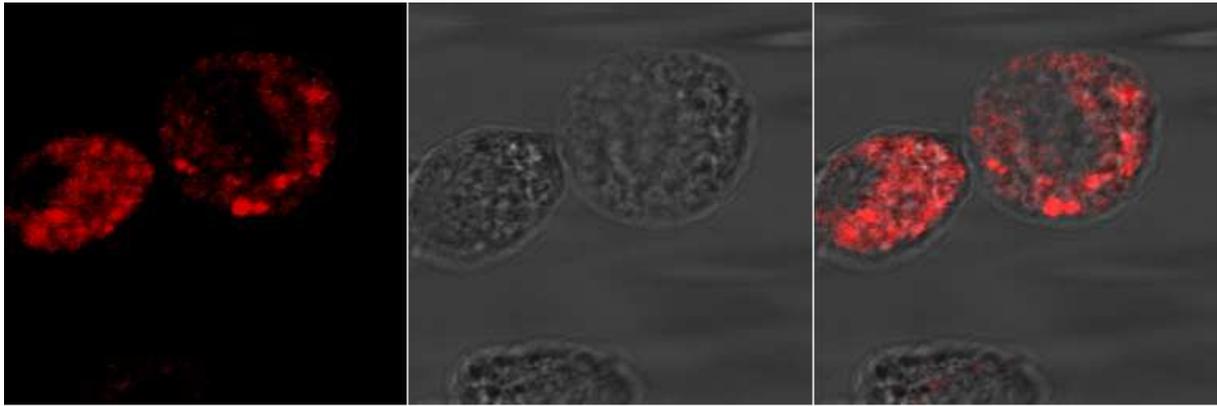


Abbildung 3B: Fluoreszenzmikroskopisches Bild einer mit TNF-alpha cDNA transfizierten HMC-1 Zelle mit vesikulärer Speicherung des Proteinproduktes (links). In der Mitte ist die Zelle im Durchlicht zu sehen; rechts ist die Überlagerung der zwei Aufnahmen dargestellt.

Die Transfektion führte zu dramatischen Erhöhungen des zellulären TNF- α Gehaltes, sowie zur Steigerung der spontanen Freisetzung von TNF- α (Abb.4)

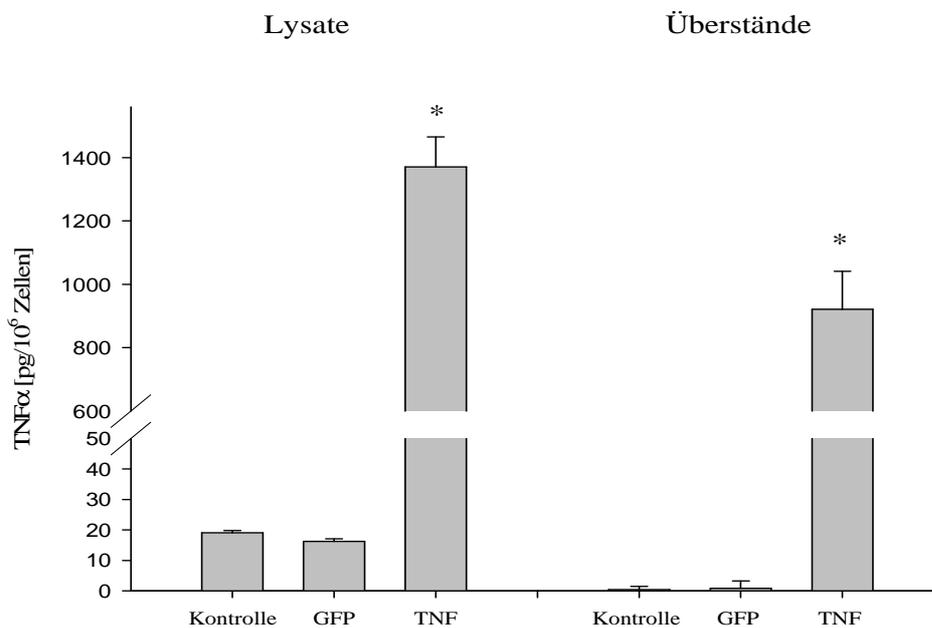


Abbildung 4: Vergleich der TNF- α Bildung in Lysaten (n=5) und Überständen (n=10) von unbehandelten, mit GFP-cDNA und TNF- α -cDNA transfizierten HMC-1.

III.1.2.2 Molekulargewicht des isolierten TNF- α

Mittels Western Blot und Vergleich mit rekombinantem Cytokin (rhTNF) konnte bestätigt werden, dass es sich nach Transfektion um die reife Form von TNF- α (17kD) in den Zelllysaten handelte.

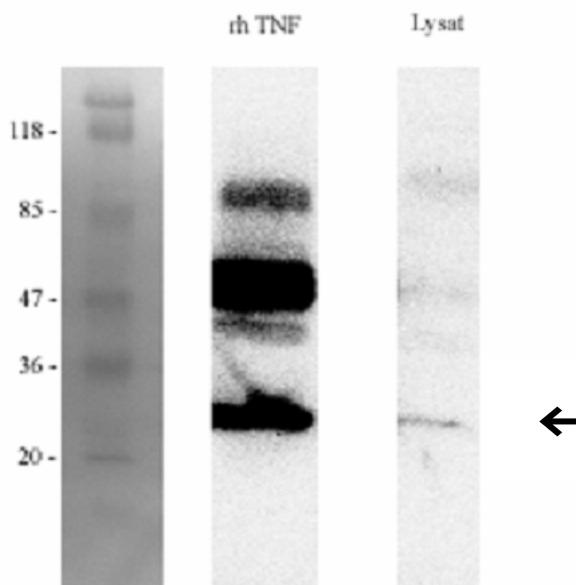


Abbildung 5: TNF- α aus transfizierten HMC-1 (Pfeil) besitzt das gleiche Molekulargewicht wie rhTNF- α .

III. 1. 3 Oxidative Stimulation transfizierter HMC-1

III.1.3.1 H_2O_2

Wasserstoffperoxid wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. 500 μ M H_2O_2 führte nach 15 Minuten zu einem signifikanten Anstieg der TNF- α Freisetzung.

Erstaunlicherweise war nach 60 Minuten Inkubation mit Wasserstoffperoxid die Freisetzung

des Cytokins bei 100 μM sowie bei 500 μM signifikant erniedrigt im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb.6).

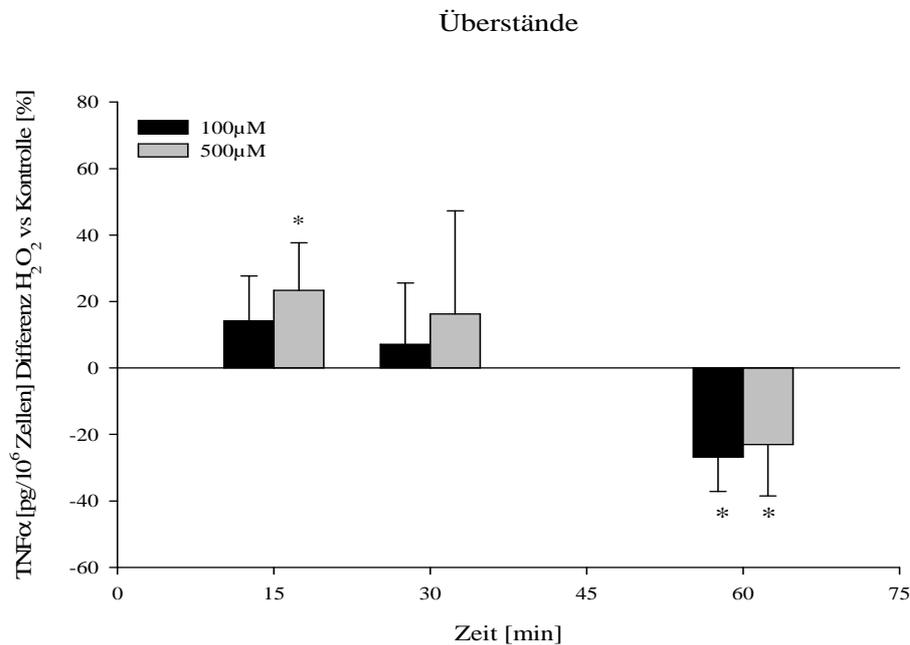


Abbildung 6: TNF- α Freisetzung aus H_2O_2 -stimulierten Zellen nach 15, 30 und 60 Minuten Inkubationszeit. Die Werte sind auf die Kontrollgruppe bezogen ([%], n=4).

III.1.3.2 HOCl

Hypochlorige Säure wurde in drei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Dieses Oxidationsmittel verminderte die TNF- α Freisetzung signifikant um ca. 30-40% bei drei verschiedenen Inkubationszeiten. Allerdings kam es zu keinen zeit- oder konzentrationsabhängigen Effekten von HOCl bei dem hier gewählten Protokoll (Abb.7).

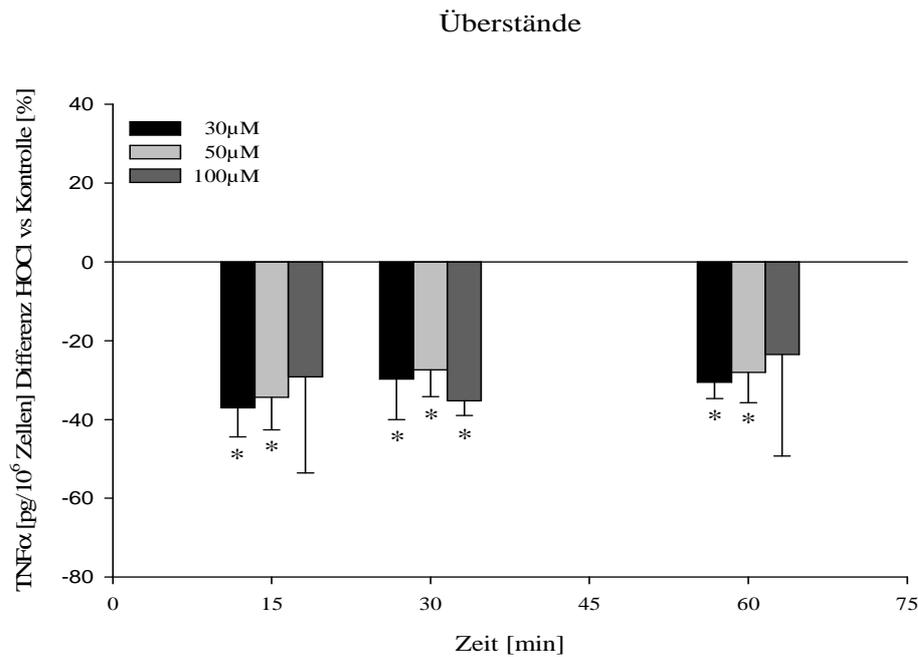


Abbildung 7: TNF- α Konzentration in Zellüberständen bezogen auf die TNF- α Konzentration bei der Kontrollgruppe. Gemessen wurde nach 15, 30 und 60 Minuten ([%], n=6).

III. 1. 4 Hemmung der Freisetzung von TNF- α aus transfizierten HMC-1

III.1.4.1 Brefeldin A

Brefeldin ist ein anerkannter Inhibitor des Golgi-Transports von Proteinen. Es wurde in drei verschiedenen Konzentrationen als Hemmstoff nach Transfektion eingesetzt. In der Konzentration von 2mM führte Brefeldin zu einer signifikanten Hemmung der TNF- α Freisetzung (Abb.8).

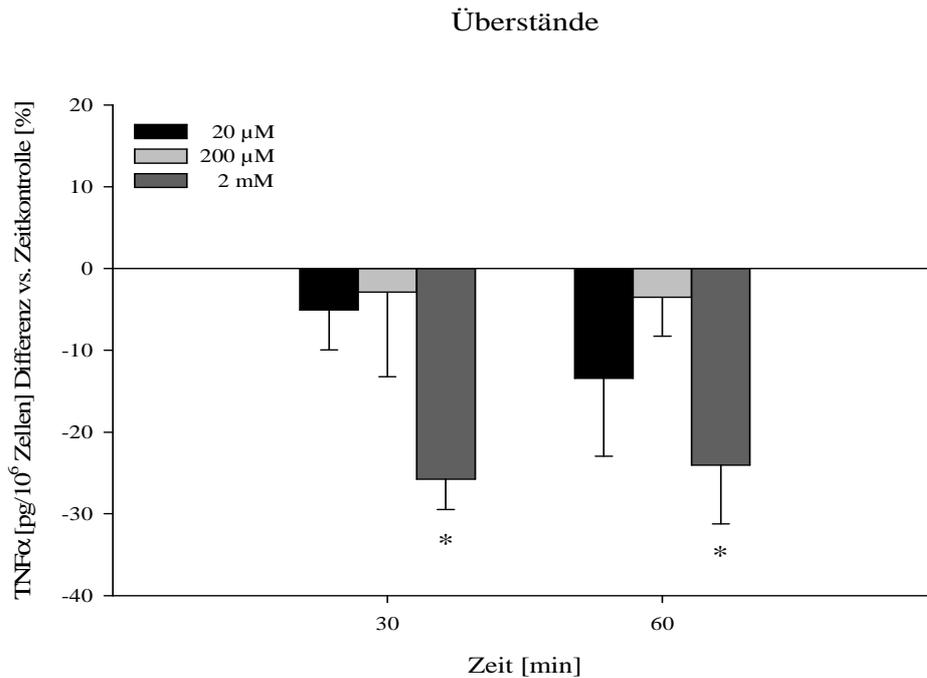


Abbildung 8: TNF- α Konzentration in Zellüberständen bezogen auf die TNF- α Konzentration der Kontrollgruppe. Gemessen wurde nach 30 und 60 Minuten Inkubation mit Brefeldin A ([%], n=4)

III. 1. 5 Versuch der Reifung von HMC-1 mittels Kultivierung in Anwesenheit von IL-6

Bei IL-6 $-/-$ Mäusen war es zu einer deutlich verminderten Freisetzung von TNF- α aus kardialen Mastzellen gekommen. Es schien daher möglich, dass den Kulturen von HMC-1 das Cytokin IL-6 als Reifungsfaktor fehlte. Die tägliche Zugabe von 100 pg/ml IL-6 zu dem üblichen Wachstumsmedium der Kulturen über einen Zeitraum von 10 Tagen hatte keinen Effekt, weder auf die spontane Freisetzung von TNF- α , noch auf die intrazelluläre TNF- α Konzentration. Es wurde auch keine Adhärenzentwicklung der Zellen beobachtet.

III. 2 Die Rolle von TNF- α -Converting-Enzyme (TACE) bei der Freisetzung von TNF- α

III. 2. 1 Inhibition durch TAPI-2

Der Matrix-Metalloproteasen-Inhibitor TAPI-2 gilt als potenter Hemmstoff von TACE. TAPI-2 wurde in drei verschiedenen Konzentrationen (30, 100, 300 μ M) eingesetzt. Nach 30 Minuten Inkubation war für die Konzentration von 30 μ M eine signifikante Verringerung der TNF- α Freisetzung zu beobachten. Nach einer Stunde hemmte TAPI-2 bei allen drei Konzentrationen signifikant die Cytokinfreisetzung um etwa 40-50% (Abb.9).

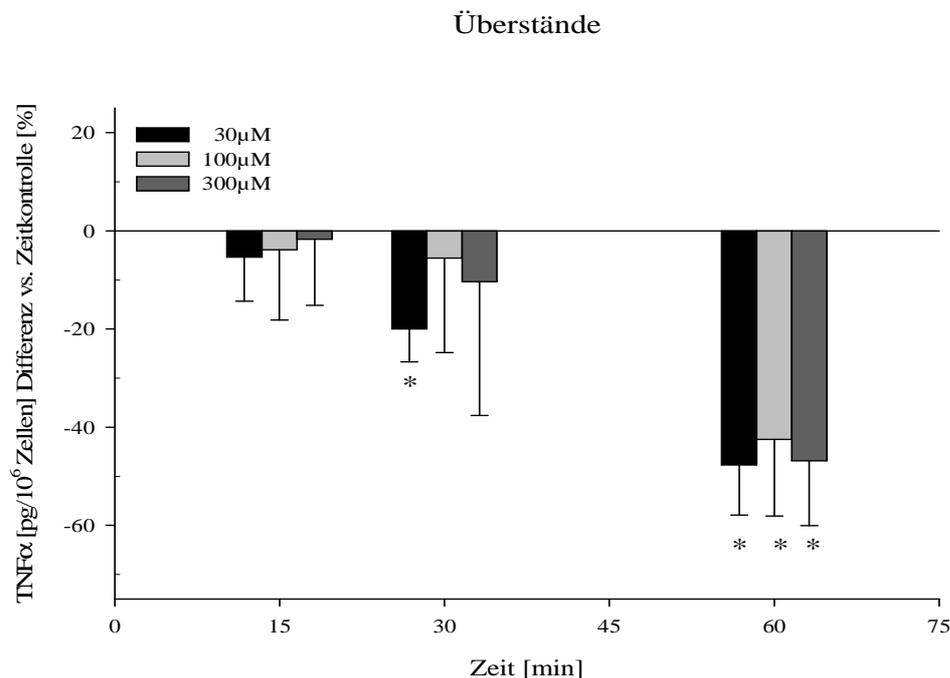


Abbildung 9: TNF- α Konzentration in Zellüberständen bezogen auf die TNF- α Konzentration bei der Kontrollgruppe. Gemessen wurde nach 15, 30 und 60 Minuten Inkubation mit TAPI-2 (in %, n=4).

Zur Überprüfung der Membrangängigkeit von TAPI-2 wurden quantitative Messungen der Verteilung an HMC-1 vorgenommen.

Mithilfe der HPLC konnte die intrazelluläre, sowie die extrazelluläre TAPI-2 Konzentration gemessen werden. Bei einer extrazellulären Konzentration von ca. 200 μM TAPI-2 befanden sich 4% intrazellulär (Abb.10). Die rechnerisch ermittelte intrazelluläre Konzentration von ca. 10 μM sollte ohne weiteres ausreichen, um TACE auch dort vollständig zu hemmen (IC_{50} 1 μM).

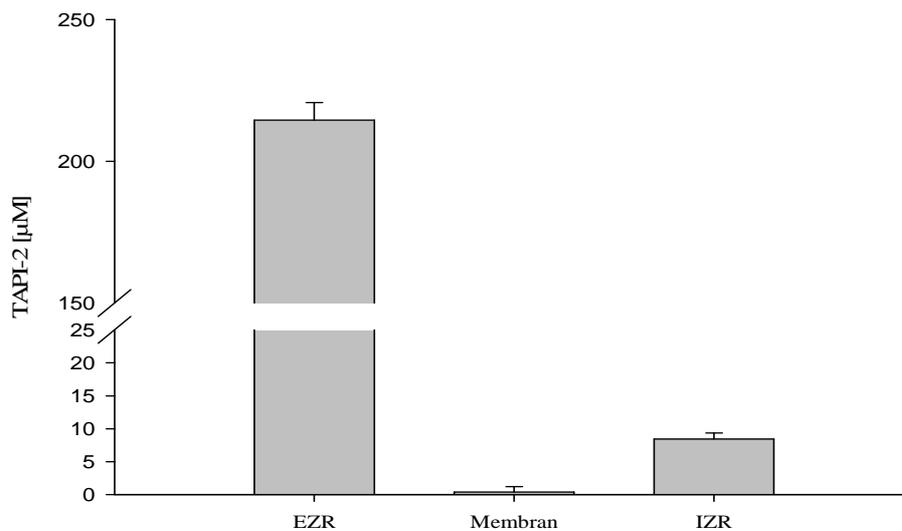


Abbildung 10: TAPI-2 Konzentration [μM] gemessen im Extrazellularraum (EZR), im Membranextrakt sowie im Intrazellularraum (IZR) (n=4).

III. 2. 2 Transiente Transfektion von MEF

Um die Rolle von TACE bei der Freisetzung von TNF- α weiter zu untersuchen wurden Versuche mit Mouse Embryonic Fibroblasts (MEF), TACE -/- vs TACE +/+ durchgeführt.

III.2.2.1 Auswirkungen auf die Freisetzung und Produktion von Mäuse-TNF- α (mTNF- α)

MEF setzen nur sehr geringe Mengen an TNF- α frei. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen der spontanen TNF- α Freisetzung von TACE positiven (MW: $0,35 \pm 0,4$ pg/ml in 24h) und TACE negativen Zellen (MW: $0,05 \pm 0,1$ pg/ml in 24h). Auch die intrazelluläre Konzentration des Cytokines unterscheidet sich zwischen TACE positiven (MW: $8,96 \pm 1,7$ pg/mg Gesamtprotein) und TACE negativen Zellen (MW: $8,17 \pm 0,4$ pg/mg Gesamtprotein) nicht signifikant.

Transiente Transfektion mittels eines Plasmides, das die cDNA von humanem TNF- α enthält führte zu keiner erhöhten intrazellulären Konzentration und auch zu keiner vermehrten Freisetzung von mTNF- α aus den murinen TACE -/- und TACE +/+ Fibroblasten (Abb.11&12).

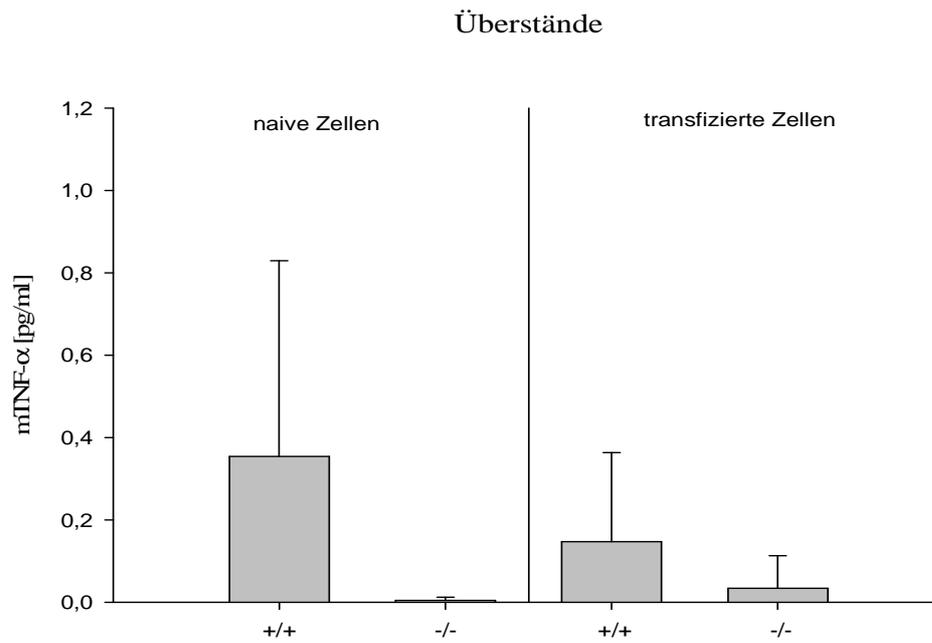


Abbildung 11: Konzentration von mTNF- α gemessen in den Zellüberständen von MEF (n=4).

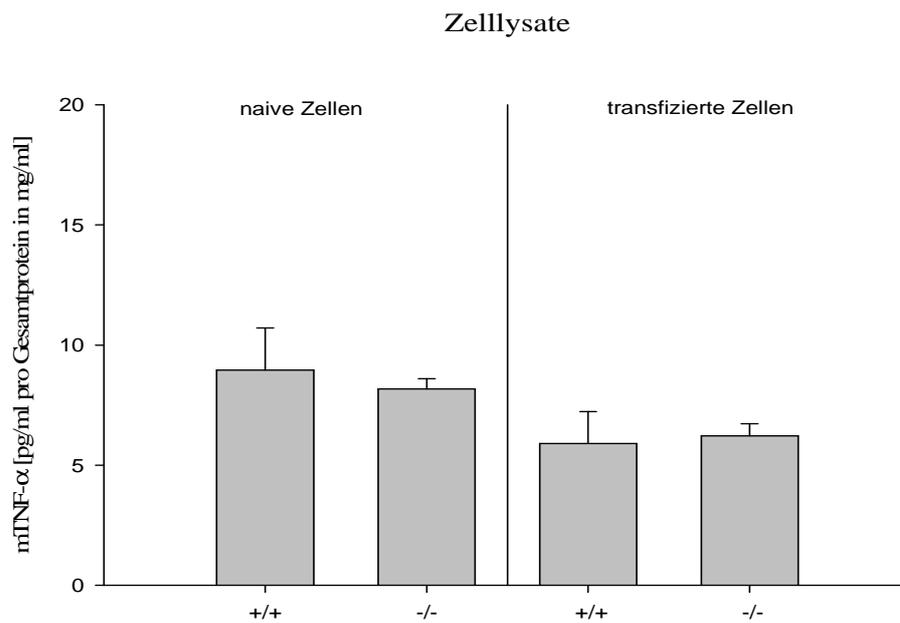


Abbildung 12: Konzentration von mTNF- α [pg/ml] bezogen auf die Gesamtproteinkonzentration [mg/ml] der MEF Zelllysate (n=4).

III.2.2.2 Vergleich der hu-TNF- α Bildung und Freisetzung bei TACE +/+ und TACE -/- MEF nach Transfektion

TACE negative MEF setzten nach Transfektion signifikant mehr humanes TNF- α frei ($462 \pm 11,5$ pg/mg) als die TACE positiven Zellen ($372 \pm 32,3$ pg/mg). Die Lysate zeigten dagegen keinen signifikanten Unterschied (Abb.13).

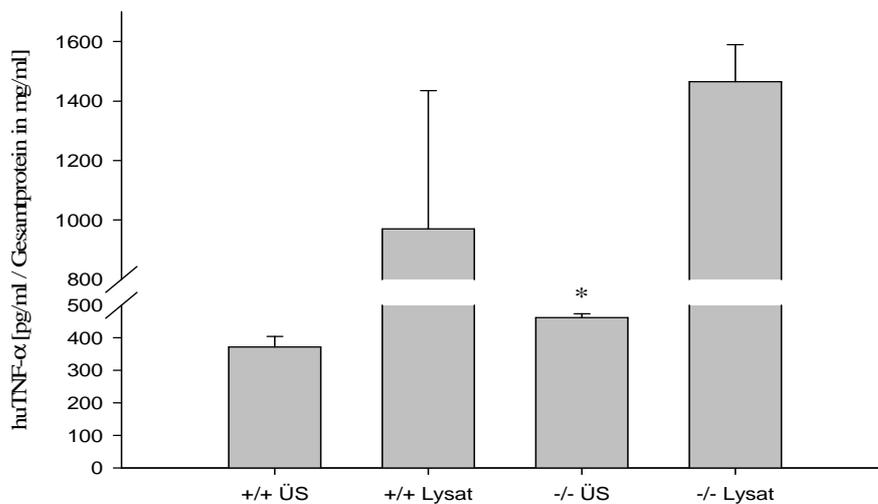


Abbildung 13: huTNF- α Konzentration in Überständen (ÜS) und Lysaten transfizierter TACE +/+ und TACE -/- MEF. Die Werte wurden bezogen auf das Gesamtprotein der Proben (n=4).

III.2.2.3 Hemmung von Proteasen der MEF

Um die TNF- α Freisetzung und Produktion möglicherweise zu verringern wurden verschiedene Inhibitoren eingesetzt: 2mM Pefabloc, 10 μ M E-64, 10 μ M Pepstatin A, 100 μ M 1,10-Phenantrolin.

Pefabloc störte die ELISA Messung von TNF- α , womit es zu keinen verwertbaren Messergebnissen kam. Bei TACE positiven Fibroblasten führte die Inkubation mit Pepstatin A und 1,10-Phenantrolin zu einer Verminderung der intrazellulären TNF- α Konzentration um $24,5\% \pm 8,1\%$ bzw. $28,4\% \pm 5,0\%$. Der Lösungsvermittler DMSO und der Serinproteasen-inhibitor E-64 blieben ohne Effekt (Abb.14).

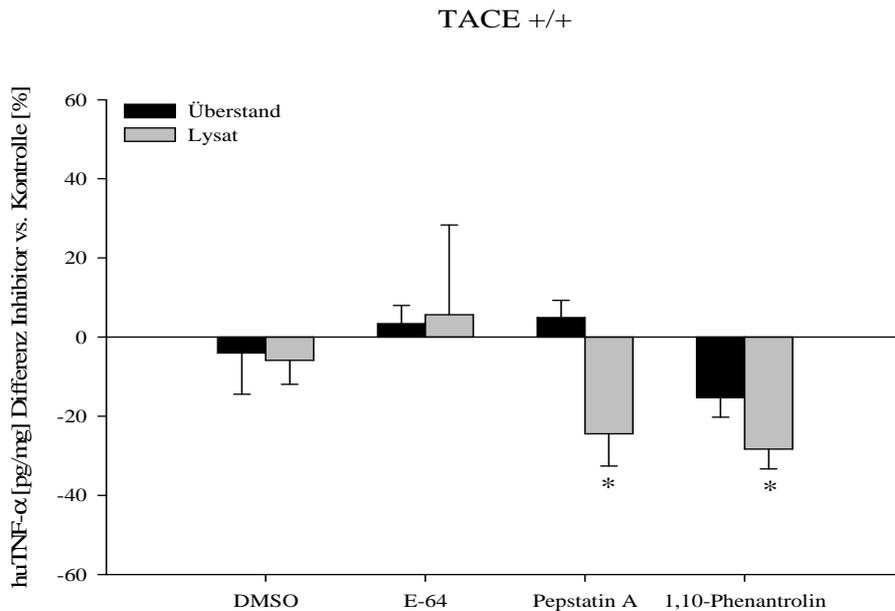


Abbildung 14: Konzentration von human TNF- α in Überständen und Lysaten von TACE +/+ MEF nach einstündiger Inkubation mit dem jeweiligen Inhibitor. Die Werte sind auf die Kontrolle bezogen (n=2-4).

Die TACE negativen Fibroblasten verhielten sich ähnlich den TACE positiven. In den Versuchen zeigte sich eine signifikante Verminderung der intra- sowie extrazellulären TNF- α Konzentration für 1,10-Phenanthrolin um 49,2% \pm 12,6% bzw. 51,4% \pm 15,8%. Pepstatin A hatte allerdings keine signifikante Wirkung auf die TNF- α Konzentration, weder in den Überständen noch in den Lysaten dieser Zellen (Abb.15).

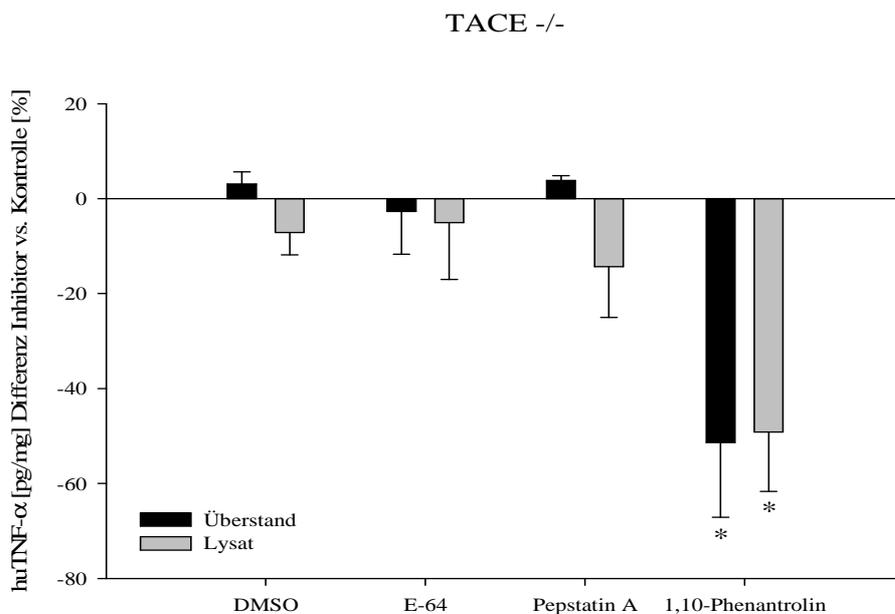


Abbildung 15: Konzentration von human TNF- α in Überständen und Lysaten nach einstündiger Inkubation von TACE -/- Zellen mit dem jeweiligen Inhibitor bezogen auf die Kontrolle ([%], jeweils n=6 Kulturen).

IV. Diskussion

IV. 1 HMC-1 als Modell der kardialen Mastzelle

Die Zelllinie HMC-1 geht aus einem Patienten mit einer Mastzelleukämie hervor. Sie ist die erste Zelllinie, die phänotypisch der humanen Mastzelle sehr ähnlich ist. Die initialen Charakterisierungsversuche wurden vor etwa 15 Jahren durchgeführt. Man fand dabei heraus, dass die Zelllinie eine hohe Expression von c-kit, dem Rezeptor für Stammzellsfaktor besitzt. Interessanterweise produziert die Mehrheit der Zellen einen Antikörper, der gegen die mastzellspezifische Serinprotease Tryptase wirkt. Zudem exprimieren HMC-1 nur die Beta-Tryptase mRNA und nicht die Alpha-Tryptase mRNA. Ein weiteres Indiz für die Unreife der Zellen ist die fehlende Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors. Die Alpha- und Betakette der mRNA fehlen gänzlich, wohingegen die Gammakette intrazellulär nachgewiesen werden kann. Der monozytäre Ursprung zeigt sich in der Ausbildung des Oberflächenantigens CD68 [88]. Dennoch ist unklar, ob HMC-1 imstande sind eine geregelte basale oder gar eine stimulierte Freisetzung von TNF- α zu unterhalten.

IV. 1. 1 Akute Freisetzung und Stimulation

IV.1.1.1 Substanz P

Substanz P ist ein Neuropeptid, das bei allergischen Entzündungen der Lunge wie beispielsweise dem Asthma bronchiale [62] oder auch bei Entzündungsreaktionen der Haut mit Juckreiz und Rötung [53] von klinischer Bedeutung ist. Es wirkt immun modulierend auf Mastzellen und andere immunkompetente Zellen [93]. Aus der Literatur ist bekannt, dass Substanz P bei peritonealen Mastzellen der Ratte zu einer Histaminfreisetzung [38] führt und auch die mRNA Konzentration von TNF- α , sowie die Freisetzung des Cytokins stimuliert

[5,20]. Der gleiche Effekt wurde auch für Mastzellen anderer Organherkunft wie z.B. des Gehirns [19] oder der Haut [90] beobachtet.

Andere Arbeitsgruppen haben eine optimale Konzentration von 10 μM und eine Inkubationszeit von 4 Stunden beschrieben [48], jedoch für Mastzellen der Haut. Für die Freisetzung von $\text{TNF-}\alpha$ durch Substanz P aus Hautmastzellen ist die Aktivierung von mitogen-activated Protein (MAP) Kinasen und extracellular signaling-regulated Protein Kinasen (ERK) notwendig [89]. Des Weiteren wird die Aktivierung über p38 und c-Jun N-terminale Kinasen (JKN) bei peritonealen Mastzellen beschrieben [8]. Am Ende der Signalkaskade führt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors $\text{NF}\kappa\text{B}$ zu einer Expression von $\text{TNF-}\alpha$ [7]. Insgesamt betrachtet unterscheiden sich die einzelnen Subtypen von Mastzellen erheblich, vor allem aufgrund der unterschiedlichen Signalmechanismen [52].

In den Versuchen mit der Mastzelllinie HMC-1 führte die Inkubation mit Substanz P in den Konzentrationen 1, 10 und 100 μM zu keinem Anstieg der extra- oder intrazellulären $\text{TNF-}\alpha$ Konzentration innerhalb von einer Stunde.

Da das Augenmerk des vorliegenden Versuches auf der Freisetzung von $\text{TNF-}\alpha$ aus den Granula lag, ist durch die Inkubationszeit von einer Stunde die Aktivierung über die Signalkaskade wohl nicht ausreichend, um zu einer $\text{TNF-}\alpha$ Freisetzung in Folge einer Steigerung der Synthese zu führen. Da sich keine Unterschiede zwischen Substanz P stimulierten und den Kontrollzellen ergaben, kann man daraus schließen, dass Substanz P keinen Effekt auf die schnelle $\text{TNF-}\alpha$ Freisetzung bei HMC-1 hat.

IV.1.1.2 Calcium-Ionophor A 23187

Durch Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration werden viele physiologische Prozesse kontrolliert, so auch die Sekretion [108]. Ionophore erhöhen selektiv die Permeabilität der Zellmembran für bestimmte Ionen [99]. Der Einstrom von Kalziumionen in Mastzellen führt zur Entleerung der Speichervesikel, was bereits ausgiebig für Histamin erforscht wurde [42,114]. Neben der schnellen Freisetzung von Cytokinen wie $\text{TNF-}\alpha$ [114] innerhalb der ersten fünf Minuten wurde auch eine spätere Freisetzung nach vier Stunden oder auch 24 Stunden beobachtet [81]. Letztere ist auf eine Aktivierung von p42 und p44 der ERK 1/2 und p38 MAPK zurückzuführen, die schließlich über $\text{NF-}\kappa\text{B}$ eine Expressierung von IL-8 [66] und $\text{TNF-}\alpha$ [81] bewirken.

In den vorliegenden Versuchen betrug die Inkubationszeit 20 und 60 Minuten und die Zellen setzten weder mehr $\text{TNF-}\alpha$ frei noch veränderte sich die intrazelluläre Konzentration. Zum

einen ist es möglich, dass das eventuell sezernierte TNF- α innerhalb von 60 Minuten durch Proteasen schon soweit abgebaut wird, dass es für den ELISA nicht mehr messbar ist. Zum Anderen wäre denkbar, dass das Cytokin über die TNF- α Rezeptoren der Mastzelllinie wieder nach intrazellulär aufgenommen wird. Abgesehen davon ist Kalziumionophore ein zytotoxisches Agens. Für RBL-1 Zellen, die einer basophilen Leukämie der Ratte entspringen wurde gezeigt, dass man ab einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ mit Zytotoxizität rechnen muss [114]. In den Versuchen hier wurde A 23187 mit einer Konzentration von 5, 50 und 500 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Da es sich hierbei durchweg um zytotoxische Konzentrationen handelt, ist der Grund für die ausbleibende spätere Stimulation der TNF- α Bildung höchstwahrscheinlich darin zu finden.

IV. 1. 2 Transfektion mittels TNF- α cDNA haltigen Plasmids

Die Versuche mit Substanz P und Ca^{2+} -Ionophor hatten gezeigt, dass HMC-1 keine reifen Mastzellen waren und somit in naivem Zustand ungeeignet waren, um als Modell für Gewebsmastzellen zu dienen.

Transfizierte HMC-1 enthielten im Mittel 1,3 ng TNF- α /10⁶ Zellen. Berücksichtigt man bei der TNF- α Freisetzung die Transfektionsrate von 5%, so kommt man auf eine 4000-fache Cytokinproduktion in transfizierten im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Neben anderen Transfektionsmethoden wie die Magnetofection ergab die Lipofection die besten Ergebnisse für HMC-1 und MEF. Zwar lieferte die Trypanblaufärbung keine Hinweise auf Zellschädigung durch die Transfektion, jedoch muss man immer damit rechnen, dass die Reagenzien in gewissem Maße zytotoxisch sind. Deswegen transfizierten wir GFP auch per Lipofection, um durch die Fluoreszenzmikroskopie eine positive Kontrolle zu bekommen und gleichzeitig die TNF- α Freisetzungen der Negativkontrolle und der TNF- α cDNA Transfektionsgruppe vergleichen zu können. Die Transfektion ergab keine unspezifische Stimulation der Zellen im Sinne einer vermehrten Cytokinfreisetzung und -produktion.

Zu bedenken war, dass die hohe extrazelluläre TNF- α Konzentration nach Transfektion durch autokrine Aktivierung des TNF Rezeptors II zur Apoptose der Zellen führen kann [31]. Somit könnten Vorstufen des TNF- α Peptides in das Kulturmilieu gelangen. Mittels Western Blot Analyse konnte das Molekulargewicht des freigesetzten TNF- α mit ca. 17 kD bestimmt werden. Zwar befindet sich die Bande im Gel oberhalb des Markers für 20 kD, jedoch auf

gleicher Höhe des rekombinanten TNF- α , das laut Hersteller der reifen Form von 17 kD entspricht. Offensichtlich hat sich die Lauffront der Proben langsamer bewegt als die des Markers. Eine weitere Bande oberhalb von 47 kD könnte der des Trimers entsprechen, die bei 51 kD zu erwarten wäre.

Die hier aufgefundenen Molekulargewichte deuten darauf hin, dass das produzierte TNF- α in reifer Form von der Zelloberfläche abgespalten wird und nicht als Folge einer Apoptose nach dem Zelltod freigesetzt wird. Wäre letzteres der Fall würde es sich vermutlich um pro TNF- α handeln, das ein Molekulargewicht von 26kD besäße.

IV. 1. 3 Oxidative Stimulation transfizierter HMC-1

Wasserstoffperoxid und hypochlorige Säure gehören zur Familie der „reactive oxygen species“ (ROS). ROS beeinflussen viele biologische Prozesse, die entweder positiv oder negativ für den Organismus sein können, wie beispielsweise antimikrobielle Verteidigungsmechanismen, Zellwachstum und –überleben sowie einzelne immunologische Vorgänge [29,32,54,69,72,86]. Außerdem kann H₂O₂ als second messenger in der Signaltransduktion durch Aktivierung oder Inhibierung von Gentranskription agieren [116,120,122]. Da es für die Wirkung für Wasserstoffperoxid auf Mastzellen bedeutend mehr Untersuchungen gibt als für hypochlorige Säure, wird die oxidative Stimulation am Beispiel von H₂O₂ diskutiert. Die Erkenntnisse gelten aber genauso für HOCl.

Für RBL-2H3 Zellen wurden verschiedene Konzentrationen von Wasserstoffperoxid auf ihre zellschädigende Wirkung untersucht. Dies ergab, dass eine Konzentration von 0,075 – 0,2 mM die Proliferation stört. Beim Einsatz von 0,2 – 2 mM war nach 240 Minuten eine Zerstörung der DNA zu beobachten [94]. Mit den gewählten Konzentrationen von 100 und 500 μ M für unsere Versuche liegen wir an der Grenze zwischen Proliferationsstörung und DNA Schädigung. Da der Beobachtungszeitraum jedoch 60 Minuten nicht überschreitet, sind diese beiden Folgen wohl eher zu vernachlässigen. Falls es zu einer granulären Freisetzung von TNF- α kommen sollte, wäre dies innerhalb der ersten 5 Minuten zu beobachten.

Tatsächlich ergaben 500 μ M Wasserstoffperoxid einen signifikanten frühen Anstieg der Cytokinfreisetzung, der nach 30 Minuten etwas und schließlich nach 60 Minuten, diesmal für beide Konzentrationen signifikant, erniedrigt war. Bei HOCl war für die am höchsten eingesetzte Konzentration von 100 μ M nach 15 und 60 Minuten eine Zunahme, sonst eine signifikante Verminderung der TNF- α Freisetzung zu beobachten.

Diese Ergebnisse decken sich mit der Vermutung anderer Arbeitsgruppen, dass hohe Konzentrationen von H₂O₂ Exocytose induzieren, jedoch niedrigere Dosen zu keiner Exocytose führen aber zusätzlich die Stimulation durch IgE oder Calcium-Ionophor inhibieren können [51,94]. In unserem Fall liegt zwar keine dieser Aktivierungen vor, doch durch die Transfektion in gewisser Weise eine unspezifische Dauerstimulation. Längerfristige Effekte wie die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren werden in der Literatur erwähnt. So führen ROS in Mastzellen durch Aktivierung von NF-κB [111,120] und APE/Ref-1 [43] zu Genexpression und schließlich zur Produktion von Cytokinen, wie IL-4 und IL-6. Diese Mechanismen können aber bei einem kurzen Beobachtungszeitraum wie hier nicht maßgeblich an der Freisetzung von TNF-α beteiligt sein.

IV. 1. 4 Hemmung der Freisetzung

IV.1.4.1 Brefeldin A

Brefeldin A ist ein Naturstoff, der aus Pilzen stammt. Normalerweise binden die in der Zelle neu synthetisierten Proteine an die Membran des Golgi-Apparates, genauer an den GTP bindenden ADP-ribosylation factor (ARF). Brefeldin A verhindert diesen Schritt [27,56,67,95] und führt somit zu zwei Blockaden in der sekretorischen Bahn: 1. in der Bindung von Protein im endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat und 2. im Trans-Golgi Netzwerk (TGN). Der Transport vom Golgi zu den Lysosomen und von der Plasmamembran zu den Lysosomen wird nicht behindert [118].

Die HMC-1 wurden im Versuch mit drei verschiedenen Konzentrationen von Brefeldin A für 30 und 60 Minuten inkubiert. Die Konzentration von 2 mM führte zu einer signifikanten Verminderung der TNF-α Freisetzung aus transfizierten Zellen. Daraus kann man folgern, dass das Cytokin in transfizierten Zellen über den Golgi-Apparat prozessiert wird.

Mit der Sekretion von TNF-α haben sich bisher einige Forschergruppen beschäftigt. In LPS stimulierten Makrophagen (RAW 264) wurde der Golgi-Apparat als Hauptspeicherort für TNF-α entdeckt, um von dort aus die biologische Aktivierung zu starten [113]. TNF-α wird nur produziert und freigesetzt, wenn die jeweiligen Zellen stimuliert werden. Die Regulation jedoch unterscheidet sich in den verschiedenen Zelllinien: Mastzellen, T-Zellen, Zelllinien von Makrophagen [10]. Das macht es schwierig bisherige Ergebnisse anderer

Zelllinien (RBL) auf unser Modell HMC-1 und/oder kardiale Mastzelle zu übertragen. Das Ergebnis aus dem Versuch passt zum momentanen Stand der Sekretions- und Expressionsmechanismen von Cytokin produzierenden Immunzellen [131]. Eine der möglichen Routen für den Transport von Proteinen vom Trans-Golgi-Netzwerk zu den zytoplasmatischen Granula ist das Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (MPR) abhängige System [91]. Die Beteiligung von MPR im Prozess stimmt damit überein, dass die zytoplasmatischen Granula in Mastzellen phylogenetisch und funktionell mit den Lysosomen verwandt sind [24,119], da der MPR abhängige Weg Proteine zu den Lysosomen schickt [98]. Das ist ebenso vereinbar mit früheren Ergebnissen, dass die Beteiligung von Cathepsin D an der Sekretion von Granula der Mastzelle teilweise vom MPR System abhängig ist [28].

Fazit ist, dass die Produktion und Prozessierung von TNF- α in HMC-1 und Mastzellen über den Golgi-Apparat läuft. Wie es danach nach Aktivierung weiter geht, wird momentan konträr diskutiert. Auf der einen Seite steht die Meinung, dass auch nach Aktivierung die Cytokine in Granula gespeichert und dann freigesetzt werden. Auf der anderen Seite gibt es immer mehr Hinweise dafür, dass es auch den Weg einer kontinuierlichen Sekretion vom Golgi zum Extrazellulärraum gibt. In unseren transfizierten Zellen scheint dies der Fall zu sein.

IV. 1. 5 Reifung der immaturren Mastzelllinie HMC-1

Da die humane Mastzelllinie 1 (HMC-1) eine unreife Mastzelllinie ist, wäre es von großem Vorteil sie auf einfache Weise reifen zulassen, um somit bessere Aussagen über die kardialen Mastzellen treffen zu können.

Anfang der achtziger Jahre wurde erstmals eine Methode beschrieben mit der man primitive Vorläuferzellen zur Reifung bringen konnte: Man kultivierte normale hämatopoetische Zellen der Maus mit einem aus mitogen aktivierten T-Zellen, geklonten Ly-1+2- T-Helferzellen oder WEH-3B Zellen angereicherten Medium [84,85,101,110,124]. Seitdem wurde diese Methode prinzipiell benutzt um "mucosal-type mast cells" (MMC) in vitro zu produzieren [25,45]. Das Cytokin, das für die Reifung verantwortlich gemacht wurde heißt Interleukin-3 (IL-3) [60,102]. Jüngere Untersuchungen ergaben, dass auch TNF- α und IL-6 die Mastzellreifung von Zellen aus der Milz der Maus triggern können [58]. Zusammengefasst gibt es vier

Kategorien von Faktoren, die einen Stammzellularfaktor (SCF) abhängigen Effekt auf humane Mastzellen haben [112]:

1. Faktoren, die Proliferation und Reifung stimulieren: SCF
2. Faktoren, die Proliferation stimulieren: IL-9
3. Faktoren, die Proliferation inhibieren, aber Reifung stimulieren: IL-4, IL-6
4. Faktoren, die Proliferation und Reifung inhibieren: Retinoide

In früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe war aufgefallen, dass IL-6 k.o. Mäuse überraschenderweise ein Defizit der kardialen Mastzellen aufweisen [103]. Die tägliche Gabe von 100 pg/ml IL-6 zu den in Kultur befindlichen HMC-1 hatte in der jetzigen Studie keine Auswirkung auf die intra- oder extrazelluläre TNF- α Konzentration. Inwiefern eine Kombination von IL-6 mit SCF besser gewesen wäre, um Reifung zu induzieren, wurde hier nicht weiter verfolgt.

IV. 2 Die Rolle von TNF- α -Converting-Enzyme (TACE)

IV. 2. 1 Inhibition durch TAPI-2

TNF- α Protease Inhibitor-2 (TAPI-2) ist ein auf Hydroxamat basierender Hemmstoff von Matrix Metalloproteasen und TACE. Die chemische Bezeichnung für TAPI-2 lautet N-(R)-[2-(Hydroxyaminocarbonyl)methyl]-4-methylpentanoyl-L-t-butyl-alanyl-L-alanin, 2-aminoethylamid. Neben der Freisetzung von TNF- α [41] inhibiert TAPI-2 die aktivitätsabhängige Abspaltung von L-Selectin von Neutrophilen, Eosinophilen und Lymphozyten, und zwar genauso stark, wie die Phenylarsinoxid (PAO) induzierte Abspaltung [6]. Es verhindert ebenso die Abspaltung mehrerer Zelloberflächenproteine, wie beispielsweise pro-TGF- α , die α -Untereinheit des IL-6 Rezeptors und β -amyloid precursor Protein [6]. Außerdem ist beschrieben worden, dass TAPI-2 als ein schwacher Inhibitor des Angiotensin Converting Enzymes (ACE) wirkt ($IC_{50}=18\mu M$) [92].

TAPI-2 hat in unseren Versuchen nach 30 Minuten in der extrazellulären Konzentration von $30\mu M$ und nach 60 Minuten in allen drei Konzentrationen (30, 100, $300\mu M$) zu einer signifikanten Abnahme der TNF- α Freisetzung aus transfizierten HMC-1 geführt. Das Ausmaß der Hemmung lag aber weit unter 100%. Dies kann nicht darauf zurückgeführt

werden, dass die TNF- α -Prozessierung eventuell auch intrazellulär erfolgt, denn die Ergebnisse der HPLC Untersuchung zeigten ein Übertreten von TAPI-2 von 4 % über die Zellmembran. Dies bedeutet, dass für die eingesetzten Konzentrationen eine intrazelluläre Konzentration von 1,2 bzw. 4 bzw. 12 μ M vorliegt. Bei einer anzunehmenden IC₅₀ von 0,05 μ M [61], sollte also TAPI-2 in ausreichender Konzentration auch am intrazellulären Wirkort vorgelagert haben.

Bezüglich des Zeitpunktesverlaufs der Hemmung ist anzunehmen, dass es einige Minuten dauert bis TAPI-2 an den Spaltungsort von TACE gelangt. Desweiteren ist vorstellbar, dass nach Transfektion intrazellulär prozessiertes TNF- α direkt auf den sekretorischen Weg gebracht wurde, was durch den Hemmstoff nicht mehr beeinflusst wird. So wäre es zu erklären, dass TAPI-2 erst nach 30 Minuten Inkubationszeit zu einer signifikanten Hemmung der TNF- α Freisetzung führt.

Warum nach 30 Minuten nur die niedrigste Konzentration von TAPI-2 zu einer signifikanten Hemmung der Zytokinfreisetzung führt, lässt sich derzeit nicht erklären. Vermutlich hat die doch erhebliche Streuung der Einzelergebnisse der beiden anderen Konzentrationen keine statistische Aussage zugelassen.

Schließlich gilt festzuhalten, dass der TACE und MMP spezifische Inhibitor TAPI-2 zu einer signifikanten Hemmung der TNF- α Freisetzung führt. Daraus lässt sich schließen, dass die Freisetzung von TNF- α bei den transient transfizierten Zellen zumindest teilweise durch TACE bzw. Matrix Metalloproteasen vermittelt wird und es sich nicht um eine unspezifische Freisetzung aufgrund von Apoptose bzw. „Transfektionsschäden“ handelt.

IV. 2. 2 Vergleich der TNF- α Bildung und Freisetzung von TACE-/- und TACE +/- MEF nach Transfektion

Die hierzu durchgeführten Versuche zeigen, dass es keinen Unterschied in der TNF- α Freisetzung oder der intrazellulären Konzentration des Cytokins zwischen TACE -/- und TACE +/- MEF gibt. Das bedeutet, es kommt durch das Fehlen von TACE weder zu einer verminderten Freisetzung des Cytokins, noch zum intrazellulären Anstieg von unprozessiertem TNF- α . Dies deutet an, dass auch andere MMPs in der Lage sein müssen TNF- α zu spalten und somit freizusetzen. Einige Veröffentlichungen haben diese Fähigkeit bereits für ADAM 10 [74], MMP 7 [55] und MMP 17 [36] bewiesen. In diesem Rahmen

scheinen die angeführten und möglicherweise weitere Proteasen die Funktion von TACE vollwertig ersetzen zu können.

Der Vergleich sowohl des intra- als auch des extrazellulären mTNF- α mit und ohne Transfektion zeigt jeweils identische Konzentrationen in beiden Kompartimenten. Dies lässt schließen, dass durch die Transfektion keine unspezifische Produktions- bzw. Freisetzungsreaktion ausgelöst wird.

IV. 2. 3 TNF- α Spaltung unabhängig von TACE

Nachdem es bewiesen ist, dass auch andere Proteasen die Spaltung von TNF- α durchführen können stellt sich die Frage welcher Klasse diese Proteasen zugehören. Es gibt vier verschiedenen Klassen, die nach ihrem aktiven Zentrum bzw. Katalysemechanismus unterteilt werden: Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteasen. Folglich wurden vier verschiedene Inhibitoren eingesetzt, die nur die entsprechende Klasse inhibieren.

IV.2.3.1 Inhibition der Serinproteasen

Das Präparat Pefabloc SC enthält Sulfonylfluorid, das Serinproteasen irreversibel hemmt. Pefabloc reagiert rasch mit dem Serinrest des katalytischen Zentrums und formt ein stabiles acetyliertes Enzym, das dadurch an proteolytischer Aktivität einbüßt. Pefabloc ist unter den Serinproteaseinhibitoren für sein breites Spektrum bekannt und darf an lebenden Zellen angewendet werden [4,26]. Die empfohlene Arbeitskonzentration liegt im Bereich von 0,4 - 4 mM (Datasheet Roche[®]). In unseren Versuchen kam es beim Einsatz von Pefabloc einerseits zur Störung der Adhärenz der Zellen und zum anderen lieferte der ELISA keine verwertbaren Ergebnisse. Pefabloc wurde in keinem Puffer, sondern in Aqua bidest. gelöst; daher ist eine Reaktion des Inhibitors selbst mit dem ELISA anzunehmen. Der genaue Grund für das analytische Versagen bleibt jedoch ungeklärt.

IV.2.3.2 Inhibition der Cysteinproteasen

E-64 ist ein irreversibler Cysteinproteaseninhibitor, der hochspezifisch ist, eine gute Zell- und Gewebeporosität und eine geringe Toxizität aufweist. Der Hemmstoff inhibiert außer

α - und β -Trypsin keine Serinproteasen. Die Trans-Epoxysuccinyl-Gruppe (aktive Gruppe) von E-64 bindet irreversibel an die aktive Thiol-Gruppe von vielen Cysteinproteasen wie beispielsweise Papain, Actinidase und Cathepsin B, H und L [64,115], um eine Thioether-Bindung einzugehen. Die optimale Konzentration liegt bei 1-10 μ M (Datasheet Sigma[®]). In den hierzu durchgeführten Versuchen führte E-64 weder zu einer signifikanten Hemmung der TNF- α Freisetzung noch zu einem Anstieg der intrazellulären Konzentration des Cytokins. Unsere Versuchsergebnisse decken sich mit der Tatsache, dass bisher keine Arbeit veröffentlicht ist, die einen Zusammenhang zwischen Cysteinproteasen und TNF- α Spaltung aufweist. Damit ist klar, dass die Spaltung und Freisetzung des Cytokins nicht durch Cysteinproteasen zu einem relevanten Anteil unterstützt wird.

IV.2.3.3 *Inhibition der Aspartatproteasen*

Pepstatin A ist ein Inhibitor für Aspartat-Peptidasen. Es formt einen 1:1 Komplex mit Proteasen wie Pepsin, Renin, Cathepsin D, bovine Chymosin und Protease B (*Aspergillus niger*). Der Hemmstoff ist hoch selektiv und inhibiert weder Thiolproteasen noch Serinproteasen. Es wird angenommen, dass Pepstatin A über einen „collected-substrate“ Inhibitionsmechanismus wirkt [104]. Der Hemmstoff ist schwer wasserlöslich und muss in 9:1 Methanol:Essigsäure gelöst werden. Die Essigsäure ist auch für die Lösung des Peptids in DMSO notwendig. Als effektive Arbeitskonzentration wird 1 μ M angegeben (Datasheet Sigma[®]). Weder der Lösungsvermittler Methanol noch DMSO erlangen dabei zelltoxische Spiegel in den Inkubationspuffern.

Die durchgeführten Versuche zeigten in Bezug auf die TNF- α Konzentration der Überstände keinen signifikanten Unterschied der Pepstatin A behandelten und der unbehandelten Zellen. Interessant war, dass die Zelllysate der mit Pepstatin A behandelten MEF erniedrigte TNF- α Konzentrationen aufwiesen, wobei die Erniedrigung bei den TACE +/+ MEF sogar statistische Signifikanz erreichte. Da von uns keine intrazelluläre Bestimmung der Pepstatinkonzentration durchgeführt wurde, ist das Resultat nicht sicher zu bewerten.

Die zwei wichtigsten intrazellulären Aspartatproteasen sind Cathepsin E und Cathepsin D [65]. Sie spielen in dem intrazellulären Weg der Endolysosomen eine große Rolle.

Ein interessanter Punkt ist, dass Cathepsin D durch seine proteolytische Eigenschaft die biologische Funktion des membrangebundenen TNF-Rezeptors II verringert [22]. Das würde bedeuten, dass bei Einsatz von Pepstatin A und der Verringerung der Aktivität von Cathepsin

es zu einer vermehrten Aktivierung des TNF-Rezeptors II kommen müsste. Folglich sollte es über die Signalkaskade NF- κ B zu einer vermehrten Produktion von TNF- α kommen. Bei einer bereits maximal laufenden Cytokinproduktion wie in den transfizierten Zellen könnte dies aber zur Apoptose der Zelle führen und somit zu einer insgesamt niedrigeren Cytokinkonzentration der Zellysate. Die geringere Auswirkung der Aspartasenhemmung bei TACE -/- MEF bleibt aber unerklärt.

IV.2.3.4 Inhibition der Metalloproteinasen

Als Inhibitor wurde in den Versuchen 1,10-Phenanthrolin verwendet. Phenanthrolin ist formal ein Phenanthren-Derivat, das als zweizähniger Ligand in der Komplexchemie Verwendung findet. Aufgrund der Eigenschaft mit fast allen Metallionen starke Komplexe zu bilden gilt es als ein potenter aber unspezifischer Metalloproteinaseninhibitor [40].

Matrixmetalloproteinasen sind Mitglieder der Enzymfamilie, die ein Zinkion in ihrem aktiven Zentrum benötigen, um ihre katalytische Aktivität auszuführen. Zur MMP Familie gehören die klassischen MMPs, die membrangebundenen MMPs (TM-MMP), die ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase) und die ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif). Fast alle MMPs werden als inaktives pro-Enzym synthetisiert. Die Überführung in die aktive Form wird gewöhnlicherweise durch Aktivierungssysteme, die Plasminogenaktivatoren oder Prohormon Convertasen wie beispielsweise Furin beinhalten bewerkstelligt. Die MMP-Aktivität wird von einer Gruppe endogener Proteine, die TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinasen) heißen reguliert. Diese binden an aktive Zentren oder alternative Seiten der aktivierten MMPs [75].

In den Zellüberständen ließ sich bei TACE -/- und TACE +/+ Zellen in Gegenwart von o-Phenanthrolin eine Erniedrigung der Zytokinkonzentration und somit der Freisetzung zeigen. Hieraus kann man schließen, dass Metalloproteinasen die wesentliche Rolle in der Aktivierung von TNF- α spielen. Die anderen Proteasenklassen können offensichtlich die Zytokinspaltung nicht in relevantem Ausmaß übernehmen.

Betrachten wir die TNF- α Konzentration in den Zellysaten fällt auf, dass für TACE +/- sowie für TACE -/- Fibroblasten die intrazelluläre Cytokinkonzentration in Gegenwart von o-Phenanthrolin signifikant erniedrigt war. In dem gewählten Transfektionsmodell spielt die autokrine bzw. parakrine Stimulierung durch freigesetztes TNF- α , das an den TNF-Rezeptoren der Zellen bindet und somit zu einer Erhöhung der Zytokinproduktion führt, eine entscheidende Rolle. Für die Spaltung von inaktivem TNF- α zu der aktiven Form des

Zytokins werden in der Literatur hauptsächlich die Metalloproteinasen verantwortlich gemacht. Neben TACE ist diese Fähigkeit auch für ADAM 10 [74], MMP 7 [55] und MMP 17 [36] beschrieben worden. Durch Hemmung der Metalloproteinasen kommt es zu einer verminderten Freisetzung des Zytokins und möglicherweise zu einer verminderten Produktion. Nach 24 Stunden Inkubationszeit konnte dies für die TACE +/+ und TACE -/- MEF in den Lysaten gezeigt werden.

V. Zusammenfassung

Die Reoxygenierung des ischämischen Myokards geht mit der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Oxidanzien im Gewebe sowie mit der Synthese und Freisetzung zahlreicher pro-inflammatorischer Cytokine, insbesondere von TNF- α einher. TNF- α spielt eine wichtige Rolle als Entzündungsmediator und ist möglicherweise ursächlich beteiligt an der Entstehung des myokardialen Ischämie-/Reperfusionsschadens. Als Hauptquelle von TNF- α im Herzen werden Gewebe-Mastzellen diskutiert, jedoch kommen auch diverse andere Zellspezies als TNF- α Produzenten in Frage. TACE (TNF- α -converting enzyme), ein Enzym aus der ADAM-Familie der Metalloproteinasen, katalysiert die Umwandlung von membran-assoziiertem pro-TNF- α in die lösliche Form. TACE wird als inaktives Zymogen synthetisiert und normalerweise durch proteolytische Entfernung der inhibitorischen Prodomäne aktiviert. Darüberhinaus verfügt TACE, wie die nahe verwandten MMPs, innerhalb der Prodomäne über einen redox-sensitiven „cystein switch“. Vor allem in Situationen, in denen es zur vermehrten Bildung von ROS/oxidierenden Substanzen kommt, wie z.B. bei der Reperfusion des ischämischen Myokards, ist daher eine akute Aktivierung von pro-TACE durch Oxidation des „cysteine switch“ vorstellbar.

Versuche an isolierten Mäuseherzen zeigten, dass es bei Reperfusion trotz Gabe eines TACE-Inhibitors zu einer TNF- α Freisetzung gekommen ist. Möglich erscheint daher die Fähigkeit anderer Proteasen die Wirkung von TACE zu ersetzen. Zur Klärung des Freisetzungsmechanismus wurden die humane Mastzelllinie HMC-1 und TACE-defiziente embryonale Mäusefibroblasten (MEF) verwendet, die nach transienter Transfektion eines Plasmids, das die cDNA von humanem TNF- α beinhaltet ausreichende Mengen des Cytokins produzieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die folgenden Fragen untersucht werden: Ist die Freisetzung von TNF- α in HMC-1 stimulierbar? Wie verteilt sich TNF- α in transient transfizierten HMC-1? Ist die Freisetzung von TNF- α in transient transfizierten Zellen spezifisch und wie effektiv ist die Transfektion? Wie groß ist das Molekulargewicht des nach Transfektion freigesetzten TNF- α ? Ist nach Transfektion noch eine weitere Steigerung oder Hemmung der Freisetzung möglich? Ist eine Reifung der immaturren Mastzelllinie HMC-1

möglich? Welche Rolle spielt TACE in der Freisetzung von TNF- α nach Transfektion? Gibt es noch andere Proteasen, die TNF- α spalten können?

Die Ergebnisse der Arbeit lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Die Stimulation von naiven HMC-1 wurde mit dem Neuropeptid Substanz P und mit dem Calcium-Ionophor A23187 für den Zeitraum bis zu 60 Minuten untersucht. Hierbei kam es zu keiner vermehrten Freisetzung von TNF- α .

Um die spontane Freisetzungsrates und die intrazelluläre TNF- α Konzentration zu erhöhen bedienen wir uns der Methode der Transfektion eines Plasmids mit cDNA, die für TNF- α kodiert. Das TNF- α in transfizierten HMC-1 wird in Vesikeln gespeichert und freigesetzt. Die Transfektionsrate liegt bei etwa 5% und führt nicht zum Absterben der behandelten Zellen. Eine unspezifische TNF- α Freisetzung aufgrund der Transfektionsagentien konnte ausgeschlossen werden. Die spontane Freisetzungsrates nach Transfektion ist um den Faktor 1000 erhöht. Letzlich zeigt sich in den Zelllysaten ein 17kD großes reifes TNF- α , was beweisend für intrazelluläre Prozessierung und danach folgender Abspaltung von der Membran ist.

Der Versuch der akuten oxidativen Steigerung der Cytokinfreisetzung durch H₂O₂ und HOCl nach Transfektion schlug fehl. Dies spricht für eine bereits am Maximum laufende Produktion von TNF- α der transfizierten Zellen. Die Freisetzung ist in Gegenwart von Brefeldin A oder dem TACE spezifischen Hemmstoff TAPI-2 nach 60 Minuten signifikant vermindert. Daraus lässt sich schließen, dass es sich um eine Prozessierung von TNF- α über den Golgi-Apparat und - zumindest partiell - um eine Freisetzung durch TACE handelt.

Aufbauend auf die Erkenntnis, dass IL-6^{-/-} Mäuse keine TNF- α Freisetzung aus kardialen Mastzellen aufweisen wurden Referenzversuche bei HMC-1 mit IL-6 in verschiedenen Konzentrationen vorgenommen. Diese Stimulation blieb ohne Erfolg. Der Literatur zufolge scheint es, als ob man mindestens zusätzlich noch stem cell factor (SCF) benötigen würde. Im Modell der TACE-defizienten MEF ergibt sich bei unbehandelten Zellen kein Unterschied in der intrazellulären und der freigesetzten TNF- α Konzentration zu den jeweiligen Werten bei Wildtyp-Zellen. Dies spricht für eine funktionelle Kompensation der fehlenden TACE-Aktivität durch andere Proteasen. Eine Kompensation wird auch für die transfizierten Fibroblasten beobachtet. Durch den Einsatz verschiedener Proteaseninhibitoren konnte gezeigt werden, dass für die Spaltung von TNF- α größtenteils die Klasse der Metalloproteasen verantwortlich sein dürfte. Interessanterweise fand sich auch ein Hinweis auf eine gewisse Beteiligung von Proteasen aus der Familie der Aspartatproteasen.

Bei kritischer Betrachtung der Resultate aus den hier durchgeführten Versuchen bleiben noch einige Fragen offen. So ist prinzipiell die Untersuchung der transfizierten Zellen schwierig, da massive Mengen von TNF- α produziert und freigesetzt werden. Bei einem Beobachtungszeitraum von 15, 30 und 60 Minuten ist eine gewisse Dynamik noch erkenntlich. Trotzdem ist die „Hintergrund“-Freisetzung relativ hoch, so dass manche Effekte verschleiert werden könnten. Des weiteren könnten Studien unter Verwendung alternativer Inhibitoren den Verdacht auf eine Rolle der Aspartatproteasen in der TNF- α Spaltung erhärten. Aufschlussreich könnte auch eine Kombination der Inhibitoren Pepstatin A und Phenanthrolin sein, um eine eventuelle Summation der Wirkungen aufzudecken. Ein weiterer unklarer Punkt betrifft die genaue Prozessierung des transfizierten TNF- α und die Natur der freigesetzten Form. Zwar zeigen die Versuche im Western blot ein 17kD großes Cytokin, jedoch könnte das N-terminale Ende um eine oder mehrere Aminosäuren differieren vom natürlichen TACE-Spaltprodukt. Eine Sequenzierung des Peptides könnte eine genauere Antwort darauf geben. Selbst wenn in der Prozessierung geringe Abweichungen vorliegen sollten, ist die Feststellung unstrittig, dass TNF- α auch in Abwesenheit der sheddase TACE von Zellen unterschiedlichsten Typs freigesetzt werden kann. Diese wichtige Erkenntnis relativiert den Nutzen, den man von einer selektiven TACE-Hemmung in der Therapie verschiedenster inflammatorischer Erkrankungen erhoffen darf.

VI. Literaturverzeichnis

1. Abraham E, Wunderink R, Silverman H et al. "Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group." (1995) *JAMA* **273** (12), 934-941.
2. Aggarwal BB, Moffat B, and Harkins RN. "Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization." (1984) *J. Biol. Chem.* **259** (1), 686-691.
3. Anders A, Gilbert S, Garten W et al. "Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases." (2001) *FASEB J.* **15** (10), 1837-1839.
4. Angeloz-Nicoud P, Harel L, and Binoux M. "Recombinant human insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 stimulates prostate carcinoma cell proliferation via an IGF-dependent mechanism. Role of serine proteases." (1996) *Growth Regul.* **6** (3), 130-136.
5. Ansel JC, Brown JR, Payan DG et al. "Substance P selectively activates TNF-alpha gene expression in murine mast cells." (1993) *J. Immunol.* **150** (10), 4478-4485.
6. Arribas J, Coodly L, Vollmer P et al. "Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease inhibitors." (1996) *J. Biol. Chem.* **271** (19), 11376-11382.
7. Azzolina A, Bongiovanni A, and Lampiasi N. "Substance P induces TNF-alpha and IL-6 production through NF kappa B in peritoneal mast cells." (2003) *Biochim. Biophys. Acta* **1643** (1-3), 75-83.
8. Azzolina A, Guarneri P, and Lampiasi N. "Involvement of p38 and JNK MAPKs pathways in Substance P-induced production of TNF-alpha by peritoneal mast cells." (2002) *Cytokine* **18** (2), 72-80.
9. Banner DW, D'Arcy A, Janes W et al. "Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation." (1993) *Cell* **73** (3), 431-445.
10. Baumgartner RA, Deramo VA, and Beaven MA. "Constitutive and inducible mechanisms for synthesis and release of cytokines in immune cell lines." (1996) *J. Immunol.* **157** (9), 4087-4093.

11. Bazzoni F, Alejos E, and Beutler B. "Chimeric tumor necrosis factor receptors with constitutive signaling activity." (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92** (12), 5376-5380.
12. Bazzoni F and Beutler B. "The tumor necrosis factor ligand and receptor families." (1996) *N. Engl. J. Med.* **334** (26), 1717-1725.
13. Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD et al. "Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin." (1985) *Nature* **316** (6028), 552-554.
14. Beutler B, Mahoney J, Le Trang N et al. "Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells." (1985) *J. Exp. Med.* **161** (5), 984-995.
15. Beutler B, Milsark IW, and Cerami AC. "Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin." (1985) *Science* **229** (4716), 869-871.
16. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ et al. "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells." (1997) *Nature* **385** (6618), 729-733.
17. Boldin MP, Mett IL, Varfolomeev EE et al. "Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects." (1995) *J. Biol. Chem.* **270** (1), 387-391.
18. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL et al. "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **72** (9), 3666-3670.
19. Cocchiara R, Albegiani G, Lampiasi N et al. "Histamine and tumor necrosis factor-alpha production from purified rat brain mast cells mediated by substance P." (1999) *Neuroreport* **10** (3), 575-578.
20. Cocchiara R, Bongiovanni A, Albegiani G et al. "Substance P selectively activates TNF-alpha mRNA in rat uterine immune cells: a neuroimmune link." (1997) *Neuroreport* **8** (13), 2961-2964.
21. Conway JG, Andrews RC, Beaudet B et al. "Inhibition of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production and arthritis in the rat by GW3333, a dual inhibitor of TNF-alpha-converting enzyme and matrix metalloproteinases." (2001) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **298** (3), 900-908.
22. Coyne CP, Howell T, Baravik J et al. "Biochemical entities that influence membrane-associated TNF RII (80-kDa) and IL-1 RI (80-kDa) complex expression and receptor fragment production in adherent vascular endothelium." (2003) *Pathophysiology.* **9** (2), 115-125.
23. Dayer JM, Beutler B, and Cerami A. "Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts." (1985) *J. Exp. Med.* **162** (6), 2163-2168.

24. Dell'Angelica EC, Mullins C, Caplan S et al. "Lysosome-related organelles." (2000) *FASEB J.* **14** (10), 1265-1278.
25. Denburg JA. "Basophil and mast cell lineages in vitro and in vivo." (1992) *Blood* **79** (4), 846-860.
26. Diatchuk V, Lotan O, Koshkin V et al. "Inhibition of NADPH oxidase activation by 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride and related compounds." (1997) *J. Biol. Chem.* **272** (20), 13292-13301.
27. Donaldson JG, Finazzi D, and Klausner RD. "Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein." (1992) *Nature* **360** (6402), 350-352.
28. Dragonetti A, Baldassarre M, Castino R et al. "The lysosomal protease cathepsin D is efficiently sorted to and secreted from regulated secretory compartments in the rat basophilic/mast cell line RBL." (2000) *J. Cell Sci.* **113** (Pt 18), 3289-3298.
29. Droge W, Mihm S, Bockstette M et al. "Effect of reactive oxygen intermediates and antioxidants on proliferation and function of T lymphocytes." (1994) *Methods Enzymol.* **234**, 135-151.
30. Duan JJ, Chen L, Wasserman ZR et al. "Discovery of gamma-lactam hydroxamic acids as selective inhibitors of tumor necrosis factor alpha converting enzyme: design, synthesis, and structure-activity relationships." (2002) *J. Med. Chem.* **45** (23), 4954-4957.
31. Ebert O, Ropke G, Marten A et al. "TNF-alpha secretion and apoptosis of lymphocytes mediated by gene transfer." (1999) *Cytokines Cell Mol. Ther.* **5** (3), 165-173.
32. el Hag A and Clark RA. "Immunosuppression by activated human neutrophils. Dependence on the myeloperoxidase system." (1987) *J. Immunol.* **139** (7), 2406-2413.
33. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M et al. "Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis." (1994) *Lancet* **344** (8930), 1105-1110.
34. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M et al. "Repeated therapy with monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) in patients with rheumatoid arthritis." (1994) *Lancet* **344** (8930), 1125-1127.
35. Engelmann H, Holtmann H, Brakebusch C et al. "Antibodies to a soluble form of a tumor necrosis factor (TNF) receptor have TNF-like activity." (1990) *J. Biol. Chem.* **265** (24), 14497-14504.
36. English WR, Puente XS, Freije JM et al. "Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2." (2000) *J. Biol. Chem.* **275** (19), 14046-14055.

37. Erickson SL, de Sauvage FJ, Kikly K et al. "Decreased sensitivity to tumour-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice." (1994) *Nature* **372** (6506), 560-563.
38. Erjavec F, Lembeck F, Florjanc-Irman T et al. "Release of histamine by substance P." (1981) *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **317** (1), 67-70.
39. Feldmann M, Brennan FM, Elliott M et al. "TNF alpha as a therapeutic target in rheumatoid arthritis." (1994) *Circ. Shock* **43** (4), 179-184.
40. Fert-Bober J, Leon H, Sawicka J et al. "Inhibiting matrix metalloproteinase-2 reduces protein release into coronary effluent from isolated rat hearts during ischemia-reperfusion." (2008) *Basic Res. Cardiol.* **103** (5), 431-443.
41. Fiorucci S, Antonelli E, Migliorati G et al. "TNFalpha processing enzyme inhibitors prevent aspirin-induced TNFalpha release and protect against gastric mucosal injury in rats." (1998) *Aliment. Pharmacol. Ther.* **12** (11), 1139-1153.
42. Foreman JC, Mongar JL, and Gomperts BD. "Calcium ionophores and movement of calcium ions following the physiological stimulus to a secretory process." (1973) *Nature* **245** (5423), 249-251.
43. Frossi B, De Carli M, Daniel KC et al. "Oxidative stress stimulates IL-4 and IL-6 production in mast cells by an APE/Ref-1-dependent pathway." (2003) *Eur. J. Immunol.* **33** (8), 2168-2177.
44. Galazka G, Windsor LJ, Birkedal-Hansen H et al. "APMA (4-aminophenylmercuric acetate) activation of stromelysin-1 involves protein interactions in addition to those with cysteine-75 in the propeptide." (1996) *Biochemistry* **35** (34), 11221-11227.
45. Galli SJ. "New insights into "the riddle of the mast cells": microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity." (1990) *Lab Invest* **62** (1), 5-33.
46. Gamble JR, Harlan JM, Klebanoff SJ et al. "Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor." (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82** (24), 8667-8671.
47. Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M et al. "Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases." (1994) *Nature* **370** (6490), 555-557.
48. Gibbs BF, Wierecky J, Welker P et al. "Human skin mast cells rapidly release preformed and newly generated TNF-alpha and IL-8 following stimulation with anti-IgE and other secretagogues." (2001) *Exp. Dermatol.* **10** (5), 312-320.
49. Gilles S, Zahler S, Welsch U et al. "Release of TNF-alpha during myocardial reperfusion depends on oxidative stress and is prevented by mast cell stabilizers." (2003) *Cardiovasc. Res.* **60** (3), 608-616.

50. Gonzales PE, Solomon A, Miller AB et al. "Inhibition of the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme by its pro domain." (2004) *J. Biol. Chem.* **279** (30), 31638-31645.
51. Guerin-Marchand C, Senechal H, Pelletier C et al. "H₂O₂ impairs inflammatory mediator release from immunologically stimulated RBL-2H3 cells through a redox-sensitive, calcium-dependent mechanism." (2001) *Inflamm. Res.* **50** (7), 341-349.
52. Guhl S, Lee HH, Babina M et al. "Evidence for a restricted rather than generalized stimulatory response of skin-derived human mast cells to substance P." (2005) *J. Neuroimmunol.* **163** (1-2), 92-101.
53. Hagermark O, Hokfelt T, and Pernow B. "Flare and itch induced by substance P in human skin." (1978) *J. Invest Dermatol.* **71** (4), 233-235.
54. Halliwell B and Gutteridge JM. "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview." (1990) *Methods Enzymol.* **186**, 1-85.
55. Haro H, Crawford HC, Fingleton B et al. "Matrix metalloproteinase-7-dependent release of tumor necrosis factor-alpha in a model of herniated disc resorption." (2000) *J. Clin. Invest* **105** (2), 143-150.
56. Helms JB and Rothman JE. "Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF." (1992) *Nature* **360** (6402), 352-354.
57. Howard L, Maciewicz RA, and Blobel CP. "Cloning and characterization of ADAM28: evidence for autocatalytic pro-domain removal and for cell surface localization of mature ADAM28." (2000) *Biochem. J.* **348 Pt 1**, 21-27.
58. Hu ZQ, Kobayashi K, Zenda N et al. "Tumor necrosis factor-alpha- and interleukin-6-triggered mast cell development from mouse spleen cells." (1997) *Blood* **89** (2), 526-533.
59. Ida H, Kawasaki E, Miyashita T et al. "A novel mutation (T61I) in the gene encoding tumour necrosis factor receptor superfamily 1A (TNFRSF1A) in a Japanese patient with tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome (TRAPS) associated with systemic lupus erythematosus." (2004) *Rheumatology. (Oxford)* **43** (10), 1292-1299.
60. Ihle JN, Keller J, Oroszlan S et al. "Biologic properties of homogeneous interleukin 3. I. Demonstration of WEHI-3 growth factor activity, mast cell growth factor activity, p cell-stimulating factor activity, colony-stimulating factor activity, and histamine-producing cell-stimulating factor activity." (1983) *J. Immunol.* **131** (1), 282-287.
61. Ingram RN, Orth P, Strickland CL et al. "Stabilization of the autoproteolysis of TNF-alpha converting enzyme (TACE) results in a novel crystal form suitable for structure-based drug design studies." (2006) *Protein Eng Des Sel* **19** (4), 155-161.

62. Joachim RA, Sagach V, Quarcoo D et al. "Upregulation of tumor necrosis factor-alpha by stress and substance p in a murine model of allergic airway inflammation." (2006) *Neuroimmunomodulation*. **13** (1), 43-50.
63. Kang T, Zhao YG, Pei D et al. "Intracellular activation of human adamalysin 19/disintegrin and metalloproteinase 19 by furin occurs via one of the two consecutive recognition sites." (2002) *J. Biol. Chem.* **277** (28), 25583-25591.
64. Katunuma N and Kominami E. "Structure, properties, mechanisms, and assays of cysteine protease inhibitors: cystatins and E-64 derivatives." (1995) *Methods Enzymol.* **251**, 382-397.
65. Katunuma N, Matsunaga Y, Himeno K et al. "Insights into the roles of cathepsins in antigen processing and presentation revealed by specific inhibitors." (2003) *Biol. Chem.* **384** (6), 883-890.
66. Kim MS, Lim WK, Park RK et al. "Involvement of mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB activation in Ca²⁺-induced IL-8 production in human mast cells." (2005) *Cytokine* **32** (5), 226-233.
67. Klausner RD, Donaldson JG, and Lippincott-Schwartz J. "Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure." (1992) *J. Cell Biol.* **116** (5), 1071-1080.
68. Levin JI, Chen JM, Du MT et al. "Anthranilate sulfonamide hydroxamate TACE inhibitors. Part 2: SAR of the acetylenic P1' group." (2002) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12** (8), 1199-1202.
69. Lo SK, Janakidevi K, Lai L et al. "Hydrogen peroxide-induced increase in endothelial adhesiveness is dependent on ICAM-1 activation." (1993) *Am. J. Physiol* **264** (4 Pt 1), L406-L412.
70. Loechel F, Gilpin BJ, Engvall E et al. "Human ADAM 12 (meltrin alpha) is an active metalloprotease." (1998) *J. Biol. Chem.* **273** (27), 16993-16997.
71. Loechel F, Overgaard MT, Oxvig C et al. "Regulation of human ADAM 12 protease by the prodomain. Evidence for a functional cysteine switch." (1999) *J. Biol. Chem.* **274** (19), 13427-13433.
72. Los M, Droge W, Stricker K et al. "Hydrogen peroxide as a potent activator of T lymphocyte functions." (1995) *Eur. J. Immunol.* **25** (1), 159-165.
73. Lum L, Reid MS, and Blobel CP. "Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15." (1998) *J. Biol. Chem.* **273** (40), 26236-26247.
74. Lunn CA, Fan X, Dalie B et al. "Purification of ADAM 10 from bovine spleen as a TNFalpha convertase." (1997) *FEBS Lett.* **400** (3), 333-335.
75. Malemud CJ. "Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview." (2006) *Front Biosci.* **11**, 1696-1701.

76. Maskos K, Fernandez-Catalan C, Huber R et al. "Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme." (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95** (7), 3408-3412.
77. McGeehan GM, Becherer JD, Bast RC, Jr. et al. "Regulation of tumour necrosis factor-alpha processing by a metalloproteinase inhibitor." (1994) *Nature* **370** (6490), 558-561.
78. Milla ME, Gonzales PE, and Leonard JD. "The TACE zymogen: re-examining the role of the cysteine switch." (2006) *Cell Biochem. Biophys.* **44** (3), 342-348.
79. Milla ME, Leesnitzer MA, Moss ML et al. "Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)." (1999) *J. Biol. Chem.* **274** (43), 30563-30570.
80. Mohler KM, Sleath PR, Fitzner JN et al. "Protection against a lethal dose of endotoxin by an inhibitor of tumour necrosis factor processing." (1994) *Nature* **370** (6486), 218-220.
81. Moller A, Henz BM, Grutzkau A et al. "Comparative cytokine gene expression: regulation and release by human mast cells." (1998) *Immunology* **93** (2), 289-295.
82. Moss ML, Jin SL, Milla ME et al. "Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha." (1997) *Nature* **385** (6618), 733-736.
83. Musso DL, Andersen MW, Andrews RC et al. "N-hydroxyformamide peptidomimetics as TACE/matrix metalloprotease inhibitors: oral activity via P1' isobutyl substitution." (2001) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11** (16), 2147-2151.
84. Nabel G, Galli SJ, Dvorak AM et al. "Inducer T lymphocytes synthesize a factor that stimulates proliferation of cloned mast cells." (1981) *Nature* **291** (5813), 332-334.
85. Nagao K, Yokoro K, and Aaronson SA. "Continuous lines of basophil/mast cells derived from normal mouse bone marrow." (1981) *Science* **212** (4492), 333-335.
86. Nakamura H, Nakamura K, and Yodoi J. "Redox regulation of cellular activation." (1997) *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 351-369.
87. Nelson FC, Delos SE, Levin JI et al. "Benzodiazepine inhibitors of the MMPs and TACE." (2002) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12** (20), 2867-2870.
88. Nilsson G, Blom T, Kusche-Gullberg M et al. "Phenotypic characterization of the human mast-cell line HMC-1." (1994) *Scand. J. Immunol.* **39** (5), 489-498.
89. Okabe T, Hide M, Koro O et al. "Substance P induces tumor necrosis factor-alpha release from human skin via mitogen-activated protein kinase." (2000) *Eur. J. Pharmacol.* **398** (2), 309-315.

90. Okayama Y, Ono Y, Nakazawa T et al. "Human skin mast cells produce TNF-alpha by substance P." (1998) *Int. Arch. Allergy Immunol.* **117 Suppl 1**, 48-51.
91. Olszewski MB, Trzaska D, Knol EF et al. "Efficient sorting of TNF-alpha to rodent mast cell granules is dependent on N-linked glycosylation." (2006) *Eur. J. Immunol.* **36** (4), 997-1008.
92. Parvathy S, Oppong SY, Karran EH et al. "Angiotensin-converting enzyme secretase is inhibited by zinc metalloprotease inhibitors and requires its substrate to be inserted in a lipid bilayer." (1997) *Biochem. J.* **327 (Pt 1)**, 37-43.
93. Payan DG, Levine JD, and Goetzl EJ. "Modulation of immunity and hypersensitivity by sensory neuropeptides." (1984) *J. Immunol.* **132** (4), 1601-1604.
94. Peden DB, Dailey L, DeGraff W et al. "Hydrogen peroxide effects on rat mast cell function." (1994) *Am. J. Physiol* **267** (1 Pt 1), L85-L93.
95. Pelham HR. "Multiple targets for brefeldin A." (1991) *Cell* **67** (3), 449-451.
96. Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS et al. "Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin." (1984) *Nature* **312** (5996), 724-729.
97. Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM et al. "Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection." (1993) *Cell* **73** (3), 457-467.
98. Pohlmann R, Boeker MW, and von Figura K. "The two mannose 6-phosphate receptors transport distinct complements of lysosomal proteins." (1995) *J. Biol. Chem.* **270** (45), 27311-27318.
99. Pressman BC, Harris EJ, Jagger WS et al. "Antibiotic-mediated transport of alkali ions across lipid barriers." (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **58** (5), 1949-1956.
100. Rabinowitz MH, Andrews RC, Becherer JD et al. "Design of selective and soluble inhibitors of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE)." (2001) *J. Med. Chem.* **44** (24), 4252-4267.
101. Razin E, Cordon-Cardo C, and Good RA. "Growth of a pure population of mouse mast cells in vitro with conditioned medium derived from concanavalin A-stimulated splenocytes." (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **78** (4), 2559-2561.
102. Razin E, Ihle JN, Seldin D et al. "Interleukin 3: A differentiation and growth factor for the mouse mast cell that contains chondroitin sulfate E proteoglycan." (1984) *J. Immunol.* **132** (3), 1479-1486.
103. Reil JC, Gilles S, Zahler S et al. "Insights from knock-out models concerning postischemic release of TNFalpha from isolated mouse hearts." (2007) *J. Mol. Cell Cardiol.* **42** (1), 133-141.

104. Rich DH, Bernatowicz MS, Agarwal NS et al. "Inhibition of aspartic proteases by pepstatin and 3-methylstatine derivatives of pepstatin. Evidence for collected-substrate enzyme inhibition." (1985) *Biochemistry* **24** (13), 3165-3173.
105. Roghani M, Becherer JD, Moss ML et al. "Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity." (1999) *J. Biol. Chem.* **274** (6), 3531-3540.
106. Rothe J, Lesslauer W, Lotscher H et al. "Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*." (1993) *Nature* **364** (6440), 798-802.
107. Rothe M, Wong SC, Henzel WJ et al. "A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor." (1994) *Cell* **78** (4), 681-692.
108. Rubin RP. "The role of calcium in the release of neurotransmitter substances and hormones." (1970) *Pharmacol. Rev.* **22** (3), 389-428.
109. Schlondorff J, Becherer JD, and Blobel CP. "Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE)." (2000) *Biochem. J.* **347 Pt 1**, 131-138.
110. Schrader JW. "In vitro production and cloning of the P cell, a bone marrow-derived null cell that expresses H-2 and Ia-antigens, has mast cell-like granules, and is regulated by a factor released by activated T cells." (1981) *J. Immunol.* **126** (2), 452-458.
111. Sen CK, Roy S, and Packer L. "Involvement of intracellular Ca²⁺ in oxidant-induced NF-kappa B activation." (1996) *FEBS Lett.* **385** (1-2), 58-62.
112. Shiohara M and Koike K. "Regulation of mast cell development." (2005) *Chem. Immunol. Allergy* **87**, 1-21.
113. Shurety W, Merino-Trigo A, Brown D et al. "Localization and post-Golgi trafficking of tumor necrosis factor-alpha in macrophages." (2000) *J. Interferon Cytokine Res.* **20** (4), 427-438.
114. Siraganian RP, Kulczycki A, Jr., Mendoza G et al. "Ionophore A-23187 induced histamine release from rat mast cells and rat basophil leukemia (RBL-1) cells." (1975) *J. Immunol.* **115** (6), 1599-1602.
115. Sreedharan SK, Verma C, Caves LS et al. "Demonstration that 1-trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane (E-64) is one of the most effective low Mr inhibitors of trypsin-catalysed hydrolysis. Characterization by kinetic analysis and by energy minimization and molecular dynamics simulation of the E-64-beta-trypsin complex." (1996) *Biochem. J.* **316 (Pt 3)**, 777-786.
116. Staal FJ, Anderson MT, Staal GE et al. "Redox regulation of signal transduction: tyrosine phosphorylation and calcium influx." (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91** (9), 3619-3622.

117. Stjernberg-Salmela S, Pettersson T, Karenko L et al. "A novel tumour necrosis factor receptor mutation in a Finnish family with periodic fever syndrome." (2004) *Scand. J. Rheumatol.* **33** (3), 140-144.
118. Strous GJ, van Kerkhof P, van Meer G et al. "Differential effects of brefeldin A on transport of secretory and lysosomal proteins." (1993) *J. Biol. Chem.* **268** (4), 2341-2347.
119. Suarez-Quian CA. "The distribution of four lysosomal integral membrane proteins (LIMPs) in rat basophilic leukemia cells." (1987) *Tissue Cell* **19** (4), 495-504.
120. Sun Y and Oberley LW. "Redox regulation of transcriptional activators." (1996) *Free Radic. Biol. Med.* **21** (3), 335-348.
121. Sundberg C, Thodeti CK, Kveiborg M et al. "Regulation of ADAM12 cell-surface expression by protein kinase C epsilon." (2004) *J. Biol. Chem.* **279** (49), 51601-51611.
122. Suzuki YJ, Forman HJ, and Sevanian A. "Oxidants as stimulators of signal transduction." (1997) *Free Radic. Biol. Med.* **22** (1-2), 269-285.
123. Tartaglia LA, Goeddel DV, Reynolds C et al. "Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor." (1993) *J. Immunol.* **151** (9), 4637-4641.
124. Tertian G, Yung YP, Guy-Grand D et al. "Long-term in vitro culture of murine mast cells. I. Description of a growth factor-dependent culture technique." (1981) *J. Immunol.* **127** (2), 788-794.
125. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF et al. "Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin." (1986) *Science* **234** (4775), 470-474.
126. van Dullemen HM, van Deventer SJ, Hommes DW et al. "Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2)." (1995) *Gastroenterology* **109** (1), 129-135.
127. Van Wart HE and Birkedal-Hansen H. "The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family." (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87** (14), 5578-5582.
128. Wherry JC, Pennington JE, and Wenzel RP. "Tumor necrosis factor and the therapeutic potential of anti-tumor necrosis factor antibodies." (1993) *Crit Care Med.* **21** (10 Suppl), S436-S440.
129. Xue CB, He X, Corbett RL et al. "Discovery of macrocyclic hydroxamic acids containing biphenylmethyl derivatives at P1', a series of selective TNF-alpha converting enzyme inhibitors with potent cellular activity in the inhibition of TNF-alpha release." (2001) *J. Med. Chem.* **44** (21), 3351-3354.
130. Xue CB, Voss ME, Nelson DJ et al. "Design, synthesis, and structure-activity relationships of macrocyclic hydroxamic acids that inhibit tumor necrosis

factor alpha release in vitro and in vivo." (2001) *J. Med. Chem.* **44** (16), 2636-2660.

131. Zhu FG, Gomi K, and Marshall JS. "Short-term and long-term cytokine release by mouse bone marrow mast cells and the differentiated KU-812 cell line are inhibited by brefeldin A." (1998) *J. Immunol.* **161** (5), 2541-2551.

VII. Publikationen

Abstracts:

Gilles S, Zahler S, Brandl A, Sommerhoff CP, Becker BF (2004)
Release of TNF-alpha from a transfected mast cell line suggests intracellular processing of pro-TNF. Europ. J. Physiol. 447 (Suppl 1): S45

Gilles S, Brandl A, Zahler S, Sommerhoff CP, Becker BF (2004)
Mechanism of TNFalpha shedding by a human mast cell line transfected with a plasmid containing TNFalpha cDNA. Z. Kardiol. 93 (Suppl 3): III/53

Brandl A, Gilles S, Sommerhoff CP, Becker BF (2006)
TNFalpha converting enzyme (TACE) is not essential for release of the cytokine. Acta Physiologica 186 (Suppl 1): 206

Originalarbeiten:

Reil JC, Gilles S, Zahler S, Brandl A, Drexler H, Hültner L, Matrisian LM, Welsch U, Becker BF (2007)
Insights from knock-out models concerning postischemic release of TNFalpha from isolated mouse hearts. J. Mol. Cell. Cardiol. 2007 Jan;42(1):133-41

VIII. Anhang

VIII. 1 Abkürzungen

A 23187	Calcium-Ionophor
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase
ADP	Adenosindiphosphat
BCA	Bovine carbonic anhydrase
BSA	Bovine Serum Albumin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular Signal-regulated Protein Kinase
FCS	Fetal Calf Serum
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HMC-1	Humane Mastzelllinie
HPLC	High pressure liquid chromatography
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
JKN	c-Jun N-terminale Kinasen
kD	kilo Dalton
LPS	Lipopolysaccharid
TACE	TNF- α -converting enzyme
MAPK	mitogen-activated Protein Kinase
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MEF	Mouse Embryonic Fibroblasts
MPR	Mannose-6-phosphate Rezeptor
MW	Molekulargewicht

NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
RBL-1	Rat Basophil Leukaemia Cells
ROS	Reactive Oxygen Species
SCF	Stammzellfaktor
TAPI-2	TNF- α Protease Inhibitor-2
TIMP	Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinase
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor- α

VIII. 2 Sequenzen

Nucleotidsequenz TNF- α mRNA (human):

Gene bank accession No. M10988

Literatur: Wang, Creasey et al., 1985

```

1 cacaccctga caagctgcca ggcaggttct cttcctctca catactgacc cacggctcca
61 ccctctctcc cctggaaagg acaccatgag cactgaaagc atgatccggg acgtggagct
121 ggccgaggag gcgctcccca agaagacagg ggggccccag ggctccaggc ggtgcttggt
181 cctcagcctc ttctccttcc tgatcgtggc aggcgccacc acgctcttct gcctgctgca
241 ctttgagagt atcgcccccc agaggggaaga gtcccccagg gacctctctc taatcagccc
301 tctggccccg gcagtcagat catcttctcg aaccccgagt gacaagcctg tagcccatgt
361 tgtagcaaac cctcaagctg aggggcagct ccagtggctg aaccgccggg ccaatgccct
421 cctggccaat ggcgtggagc tgagagataa ccagtggctg gtgccatcag agggcctgta
481 cctcatctac tcccaggtcc tcttcaaggg ccaaggctgc cctccacc atgtgctcct
541 caccacacc atcagccgca tcgcccctc ctaccagacc aaggccaacc tcctctctgc
601 catcaagagc ccctgccaga gggagacccc agagggggct gaggccaagc cctggtatga
661 gcccatctat ctgggagggg tcttccagct ggagaagggg gaccgactca gcgctgagat
721 caatcgcccc gactatctcg actttgcccga gtctgggcag gtctactttg ggatcattgc
781 cctgtgagga ggacgaacat ccaaccttcc caaacgcctc ccctgccccca atccctttat
841 taccacctcc ttcagacacc ctcaacctct tctggctcaa aaagagaatt gggggccttag
901 ggtcggaacc caagcttaga actttaagca acaagaccac cacttcgaaa cctgggattc
961 aggaatgtgt ggcctgcaca gtgaagtgtt ggcaaccact aagaattcaa actggggcct
1021 ccagaactca ctggggccta cagctttgat ccctgacatc tggaatctgg agaccagggg
1081 gcctttgggt ctggccagaa tgctgcagga cttgagaaga cctcacctag aaattgacac
1141 aagtggacct taggccttcc tctctccaga tgtttccaga cttccttgag acacggagcc
1201 cagccctccc catggagcca gtcacctta tttatgtttg cacttgatgat tatttattat
1261 ttatattatta tttatattat tacagatgaa tgtatattat tgggagaccg gggatcctg
1321 ggggacccaa tgtaggagct gccttggctc agacatgttt tccgtgaaaa cggaggctga
1381 acaataggct gttcccattg agccccctgg cctctgtgcc ttcttttgat tatgtttttt
1441 aaaatattat ctgattaagt tgtctaaaca atgctgattt ggtgaccaac tgtcactcat
1501 tgctgaggcc tctgctcccc agggagttgt gtctgtaatc ggcctactat tcagtggcga
1561 gaaataaagg ttgcttagga aagaa

```

Aminosäuresequenz humaner Pro-TNF- α :

Gene bank accession No. AAA61198

(TACE spaltet zwischen Alanin und Valin innerhalb der fett gedruckten Konsensus-Sequenz)

```
1 mstesmirdv elaeaalpkk tggpqqsrcc lfslsfsfli vagattlfc1 lhfgvigpqr
61 eesprdlsl splaqavrss srtpsdkpva hvvanpqaeg qlqwlrran allangvelr
121 dnqlvvpseg lyliysqvlf kgggcpsthv llthtisria vsyqtkvnll saikspcgre
181 tpegaeakpw yepiylggvf qlekgdrlsa einrpdylf aesgqvyfgi ial
```

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Andreas Brandl
Geburtsdatum 13.06.1980 in Neustadt an der Aisch
Familienstand ledig
Eltern Norbert Brandl, Zahntechniker
Victoria Brandl, Grundschullehrerin

Schulbildung

1986 – 1990 Grundschule Aschheim
1990 – 1999 Gymnasium Kirchheim b. München
1999 Abschluss Abitur

Zivildienst

1999 – 2000 I. Medizinische Klinik des Klinikums Rechts der Isar
zu München

Studium

2001 – 2007 Studium der Humanmedizin
4/01 – 3/03 „Vorklinik“ an der LMU München
4/03 – 10/07 „Klinik“ an der TU München
seit 9/03 Promotion am Institut für vegetative Physiologie
später umbenannt zu Institut für kardiovaskuläre Physiologie und Patho-
physiologie; Walter-Brendel-Institut für experimentelle
Medizin (WBex) der Ludwig-Maximilians-Universität
bei Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. B. F. Becker
11/2007 Abschluss Staatsexamen

Berufliche Tätigkeit

seit 1/2008 Assistenzarzt
Abteilung für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und
Gefäßchirurgie des Klinikums Garmisch-Partenkirchen
(PD Dr. H. Vogelsang; Dr. S. Nöldeke)

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Pohl für die Gelegenheit bedanken, an seinem Lehrstuhl promovieren zu können.

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Bernhard F. Becker für ein interessantes und vielseitiges Projekt mit der Möglichkeit zum selbständigen Arbeiten, bei der er mir stets jederzeit als Ansprechpartner zur Verfügung stand. Ganz besonders möchte ich mich bei ihm für die ausgesprochen engagierte Betreuung bedanken, sowie für die Möglichkeit der freien Zeiteinteilung.

Ein großer Dank geht auch an Frau Dr. Stefanie Gilles, die mich in die Labortätigkeit eingeführt hat und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Auch nach dem Wechsel des Arbeitsplatzes hielt unser Kontakt und ich konnte sie jederzeit um Ihre Meinung fragen.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Dorothee Gössel, Britta Bscheider, Katarzyna Stefanowski und Dora Kiesel, die mich oft in meiner Arbeit unterstützt haben und das ein oder andere Mal einen verloren geglaubten Versuch retteten.

PD Dr. Stefan Zahler möchte ich für die sehr gut funktionierende Anfertigung aller mikroskopischen Bilder danken.

Allen anderen Kolleginnen und Kollegen aus dem Herzlabor, die hier nicht gesondert erwähnt sind, danke ich ebenfalls für das angenehme Arbeitsklima.

Außerhalb des physiologischen Labors gilt ein großer Dank Herrn Prof. Dr. Christian Sommerhoff, der mir nicht nur die HMC-1 Zellen und ein Arbeiten auch in seinem Labor ermöglicht hat, sondern auch vor allem für die netten Gespräche, in denen er mir oft neue Anregungen zu den bisher durchgeführten Versuchen brachte. Gerne möchte ich auch Clara Hönecke, Ursula und Stefan für die Hilfe und die praktischen Tipps in der Zellkultur danken.

Das Plasmid pME18S-TNF- α wurde von W. H. Newman (Mercer University, Macon, GA, USA) zur Verfügung gestellt, TACE -/- MEF von Dr. Roy Black (Immunex, Seattle, USA). Auch ihnen sei an dieser Stelle gedankt.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des SFB469 von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziert. Daher gilt mein Dank auch dieser Einrichtung, insbesondere der Sprecherin des SFB469, Frau Prof. Dr. Marianne Jochum.

Zuletzt möchte ich noch meinen Eltern Victoria und Norbert Brandl danken, die mich stets unterstützten und mir das Medizinstudium und diese Arbeit ermöglicht haben.