

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Die Rolle von Erkennungsrezeptoren für virale Nukleotidsequenzen  
bei der Entstehung endothelialer Inflammation durch virale RNA**

Dissertation

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

vorgelegt von Jonathan Nadjiri

aus

Querfurt

2014

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: PD Dr. Markus Wörnle

Mitberichterstatter: PD Dr. Ursula Zimmer-Strobl  
PD Dr. Barbara Adler  
Prof. Dr. Christian P. Sommerhoff

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

Tag der mündlichen Prüfung: 17.7.2014

Meiner Familie in Dankbarkeit

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>- 1 -</b>
1.1	STAND DER FORSCHUNG.....	- 2 -
1.1.1	<i>Aufbau und Funktion des Endothels.....</i>	- 2 -
1.1.2	<i>Vaskulopathie und Interaktion mit Hämostase durch virale Infektionen bzw. RNA.....</i>	- 3 -
1.1.3	<i>Die Rolle des Immunsystems im Zusammenhang mit dieser Studie.....</i>	- 4 -
1.1.4	<i>TLR-3.....</i>	- 6 -
1.1.5	<i>RIG-1 und MDA-5 .....</i>	- 8 -
1.1.6	<i>ICAM-1.....</i>	- 10 -
1.1.7	<i>VCAM-1 .....</i>	- 10 -
1.1.8	<i>IL-6.....</i>	- 11 -
1.1.9	<i>Vorarbeiten der Forschungsgruppe .....</i>	- 11 -
1.2	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG .....	- 13 -
1.2.1	<i>Arbeitshypothese.....</i>	- 13 -
1.2.2	<i>Ziele .....</i>	- 13 -
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>- 14 -</b>
2.1	MATERIAL .....	- 14 -
2.1.1	<i>Medien und Flüssigkeiten.....</i>	- 14 -
2.1.2	<i>Stimulationsagentien, Kits und Enzyme .....</i>	- 15 -
2.1.3	<i>Die Geräte .....</i>	- 18 -
2.1.4	<i>Verbrauchsmaterial.....</i>	- 18 -
2.2	DIE ZELLKULTUR .....	- 20 -
2.2.1	<i>Die Passage der Zellen.....</i>	- 21 -
2.3	DURCHFÜHRUNG .....	- 22 -
2.3.1	<i>Die Vorbereitung der Zellen für die Versuche.....</i>	- 22 -
2.3.2	<i>Versuchsaufbau der Experimente.....</i>	- 23 -
2.3.2.1	<i>Versuchsaufbau: Expression der Toll-like-Rezeptoren, RIG-1 und MDA-5 als Erkennungsrezeptoren für virale Nukleotidsequenzen auf HMEC-Zellen .....</i>	- 23 -
2.3.2.2	<i>Versuchsaufbau: Expression von Toll-like-Rezeptoren, MDA-5, RIG-1, Chemokinen, Zytokinen und Adhäsionsmolekülen bei zeitabhängiger Stimulation durch poly(I:C).....</i>	- 23 -
2.3.2.3	<i>Versuchsaufbau: Effekt einer Stimulation mit synthetischer RNA bei inflammatorischen Bedingungen auf die Expression der viralen Rezeptoren TLR-3, RIG-1, MDA-1 .....</i>	- 24 -
2.3.2.4	<i>Versuchsaufbau: Rezeptorabhängigkeit von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen.....</i>	- 25 -
2.3.3	<i>RNA Interferenz .....</i>	- 26 -
2.3.4	<i>Gewinnung von Material zur RNA Isolation .....</i>	- 27 -
2.3.5	<i>RNA Isolation .....</i>	- 27 -

2.3.6	Messung der RNA .....	- 29 -
2.3.7	cDNA Synthese .....	- 29 -
2.3.8	Die quantitative Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction .....	- 30 -
2.3.9	Durchführung der Real-time quantitative RT-RCR.....	- 31 -
2.3.10	Statistische Auswertung.....	- 32 -
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>- 33 -</b>
3.1	EXPRESSION DER TOLL-LIKE-REZEPTOREN, RIG-1 UND MDA-5 ALS ERKENNUNGSREZEPTOREN FÜR VIRALE NUKLEOTIDSEQUENZEN AUF HMEC-ZELLEN .....	- 33 -
3.2	EXPRESSION DER TOLL-LIKE-REZEPTOREN, MDA-5, RIG-1, CHEMOKINEN, ZYTOKINEN UND ADHÄSIONSMOLEKÜLEN BEI ZEITABHÄNGIGER STIMULATION DURCH POLY(I:C) .....	- 36 -
3.3	EFFEKT EINER STIMULATION MIT SYNTHETISCHER RNA BEI INFLAMMATORISCHEN BEDINGUNGEN AUF DIE EXPRESSION DER VIRALEN REZEPTOREN TLR-3, RIG-1, MDA-1 .....	- 49 -
3.4	REZEPTORABHÄNGIGKEIT VON ZYTOKINEN, CHEMOKINEN UND ADHÄSIONSMOLEKÜLEN .....	- 51 -
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>- 54 -</b>
4.1	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE UND ANALYSE .....	- 54 -
4.2	AUSSICHT .....	- 61 -
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>- 63 -</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>- 65 -</b>
6.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	- 65 -
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>- 67 -</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>- 73 -</b>
<b>9</b>	<b>CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>- 74 -</b>

## **Abbildungsverzeichnis**

<i>Abbildung 1: Dargestellt ist der TLR-3 nach Dimerbildung .....</i>	<i>- 6 -</i>
<i>Abbildung 2: Signalwege von TLR-3, RIG-1 und MDA-5 sowie deren strukturelle Beschaffenheit.....</i>	<i>- 9 -</i>
<i>Abbildung 3: Lichtmikroskopische Darstellung der HMEC-1-Zellen mit einer Dichte von <math>2 \times 10^5</math> Zellen pro Well mit 2 ml Medium nach 24 Stunden.....</i>	<i>- 20 -</i>
<i>Abbildung 4: Lichtmikroskopische Darstellung der HMEC-1-Zellen mit einer Dichte von <math>4 \times 10^5</math> Zellen pro Well mit 2 ml Medium nach 24 Stunden.....</i>	<i>- 20 -</i>
<i>Abbildung 5: Expression der Toll-like-Rezeptoren auf HMEC-Zellen .....</i>	<i>- 34 -</i>
<i>Abbildung 6: Expression von TLR-3, RIG-1 und MDA-5 als Erkennungsrezeptoren für virale Nukleotidsequenzen auf HMEC-Zellen.....</i>	<i>- 35 -</i>
<i>Abbildung 7: Expression von TLR-3 bei zeitabhängiger Stimulation durch poly(I:C) .....</i>	<i>- 37 -</i>
<i>Abbildung 8: Expression von RIG-1 bei zeitabhängiger Stimulation durch poly(I:C) .....</i>	<i>- 38 -</i>
<i>Abbildung 9: Expression von MDA-5 bei zeitabhängiger Stimulation durch poly(I:C).....</i>	<i>- 39 -</i>
<i>Abbildung 10: Expression von INF-<math>\beta</math> bei zeitabhängiger Stimulation durch poly(I:C).....</i>	<i>- 40 -</i>
<i>Abbildung 11: Expression von IL-6 bei zeitabhängiger Stimulation durch poly(I:C) .....</i>	<i>- 41 -</i>
<i>Abbildung 12: Expression von IL-8 bei zeitabhängiger Stimulation durch poly(I:C) .....</i>	<i>- 42 -</i>
<i>Abbildung 13: Expression von TNF-<math>\alpha</math> bei zeitabhängiger Stimulation durch poly(I:C) .....</i>	<i>- 43 -</i>
<i>Abbildung 14: Expression von RANTES bei zeitabhängiger Stimulation durch poly(I:C) .....</i>	<i>- 44 -</i>
<i>Abbildung 15: Expression von MCP-1 bei zeitabhängiger Stimulation durch poly(I:C) .....</i>	<i>- 45 -</i>
<i>Abbildung 16: Expression von MCSF bei zeitabhängiger Stimulation durch poly(I:C).....</i>	<i>- 46 -</i>
<i>Abbildung 17: Expression von VCAM-1 bei zeitabhängiger Stimulation durch poly(I:C).....</i>	<i>- 47 -</i>
<i>Abbildung 18: Expression von ICAM-1 bei zeitabhängiger Stimulation durch poly(I:C).....</i>	<i>- 48 -</i>
<i>Abbildung 19: Effekt einer Stimulation mit synthetischer RNA bei inflammatorischen Bedingungen auf die Expression der viralen Rezeptoren TLR-3, RIG-1, MDA-1 .....</i>	<i>- 49 -</i>
<i>Abbildung 20: Rezeptorabhängigkeit von IL-6 .....</i>	<i>- 51 -</i>
<i>Abbildung 21: Rezeptorabhängigkeit von INF-<math>\beta</math> .....</i>	<i>- 52 -</i>
<i>Abbildung 22: Rezeptorabhängigkeit von VCAM-1 .....</i>	<i>- 53 -</i>

# **1 Einleitung**

Eine große Anzahl viraler Erkrankungen und Infektionen können als folgenschwere Systemerkrankungen verlaufen und sich dabei in vielen Organsystemen wie etwa den Nieren, der Leber, dem zentralen Nervensystem oder am Gefäßsystem manifestieren. Gerade ein Befall des Gefäßsystems kann sich beispielsweise über eine Vaskulitis oder auch Thrombosen mit schwerwiegenden thrombembolischen Konsequenzen auswirken[76]. Diese Komplikationen stellen im Klinikalltag ein Problem dar. Obwohl diese Erscheinungen und ihr Zusammenhang mit viralen Erkrankungen bekannt sind, ist der Pathomechanismus noch weitestgehend ungeklärt. In der folgenden Studie sollen diese Zusammenhänge an humanen Endothelzellen in vitro untersucht werden.

## **1.1 Stand der Forschung**

### **1.1.1 Aufbau und Funktion des Endothels**

Das Endothel ist eine einlagige Zellschicht, welche alle Gefäße von innen auskleidet und einer extrazellulären Matrix, der Basalmembran, aufsitzt. Dabei besitzt jede Zelle einen Kern. Die Endothelzellen sind untereinander mit „Tight Junctions“ verbunden und bilden eine Barriere für viele im Blut gelöste Stoffe und Zellen. Dabei trägt das Endothel an der luminalen Seite eine Glykokalix aus Proteoglykanen und Glykoproteinen, welche einen wesentlichen Beitrag zur Aufrechterhaltung der Gefäßbarriere und damit auch des kolloidosmotischen Druckes leisten. Der kolloidosmotische Druck ist essentiell für Stoffwechselfvorgänge im gesamten vaskulären System bzw. Körper[3, 65]. Das Endothel spielt eine wichtige Rolle beim Sauerstofftransport in das Gewebe, sowie bei der Modulation von Gefäßreaktionen durch Bildung von Endothelin oder ACE, wodurch es direkt an der Blutdruckregulation beteiligt ist. Dazu kommen antikoagulatorische bzw. antithrombotische Funktionen, welche unter anderem über Prostazyklin oder Thrombomodulin vermittelt werden, aber auch prothrombotische Wirkungen, welche zum Beispiel durch den von Willebrand-Faktor ausgeübt werden. Zusätzlich nehmen die Endothelzellen durch die Produktion von zahlreichen Botenstoffen wie IL-1, IL-6, IL-8, CSF und Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 und ICAM-1 eine entscheidende Rolle bei Entzündungsprozessen ein, was den Fokus der folgenden Studie darstellt.

### **1.1.2 Vaskulopathie und Interaktion mit Hämostase durch virale Infektionen bzw. RNA**

Vaskulitiden sind schwerwiegende Komplikationen, die häufig mit viralen Infektionen assoziiert sind[55]. Diese können sowohl durch DNA- als auch durch RNA-Viren ausgelöst werden. Dabei werden die bedeutsamsten durch Infektionen ausgelösten Vaskulitiden durch das Hepatitis B und das Hepatitis C Virus verursacht[55]. Die Polyarteritis nodosa kann dabei durch das Hepatitis B Virus ausgelöst werden[28]. Neben diesen viralen Infektionen kann das Humane Immundefizienz Virus (HIV) ebenso, wenn auch seltener, zu thrombotischen Mikroangiopathien oder auch Vaskulitiden führen, was dann wiederum in weitere Organschäden resultieren kann[20, 27, 59]. Allerdings geht die gefäß- und organschädigende Wirkung nicht allein vom Virus aus, sondern auch durch die antivirale Therapie können Gefäßschädigungen entstehen oder sich ein arterieller Hypertonus ausbilden. Eine klare Unterscheidung zwischen vaskulären Komplikationen der Virusinfektion und Nebenwirkungen der antiviralen Therapie ist deshalb nur erschwert möglich[62]. Des Weiteren kann auch das Zytomegalie-Virus mit kutanen oder auch transplantationsassoziierten Vaskulopathien assoziiert sein[13, 48]. Ebenso steht das H1N1 Virus des Jahres 2009 als Mitverursacher von Vaskulitiden zur Diskussion[80]. Autopsieberichte an H1N1 Verstorbenen legen einen Zusammenhang zwischen dem Virus und pulmonalen Thrombosen nahe[30]. Weil auch Atherosklerose eine entzündliche Erkrankung ist, stand lange Zeit zur Debatte, ob auch hier virale Infektionen zur Entstehung beitragen können [64].

Man kann annehmen, dass die gefäßschädigende Wirkung von viralen Infektionen durch Induktion einer Abwehrreaktion des Körpers über beispielsweise Zytokine, Chemokine oder prothrombotische Faktoren wie PAI-1 verursacht wird[79]. Gerade neuere Erkenntnisse legen nahe, dass virale Infektionen häufiger mit Thrombogenität im Zusammenhang stehen und somit dann zu entsprechenden Komplikationen führen[7, 30]. Neben den klassischen Manifestationen des Epstein Barr Virus wird dieser Erreger auch als Ursache von Thrombogenität in Betracht gezogen[51]. Insgesamt kann man also annehmen, dass virale

Erkrankungen kardiovaskuläre Ereignisse auslösen bzw. herbeiführen können, die mit erhöhter Mortalität verbunden sind[30].

Daneben konnte zusätzlich gezeigt werden, dass neben exogener viraler RNA, auch endogene RNA in der Lage ist, sich als Cofaktor der intrinsischen Blutgerinnung über den Faktor VII, XI und XII auszuwirken[37, 57, 73]. Diese Manifestationen konnten in Tiermodellen, in denen Thrombosen induziert wurden, bestätigt werden [22].

Überdies stehen auch die Einflüsse exogener RNA auf Fibrosierungsvorgänge im Fokus der aktuellen Forschung[84, 85]. Zusätzlich wurde festgestellt, dass RNA sich in Abhängigkeit von VEGF auf die Gefäßpermeabilität auswirkt[22].

### **1.1.3 Die Rolle des Immunsystems im Zusammenhang mit dieser Studie**

Bei der Erkennung von bakteriellen oder viralen Infektionen kommt eine Batterie an Abwehrmaßnahmen des Immunsystems zum Einsatz. Dabei besteht das Immunsystem aus einer angeborenen und einer erworbenen Komponente, die eng miteinander in Verbindung stehen[4]. Das angeborene Immunsystem besteht aus einer humoralen Komponente, welche sich aus dem Komplement oder auch Zytokinen zusammensetzt und einer zellulären Instanz wie zum Beispiel Makrophagen, natürlichen Killerzellen oder auch neutrophilen Granulozyten. Die Effekte vom angeborenen System sind unspezifisch und von Geburt an erhalten. Synergistisch dazu handelt es sich bei der erworbenen Komponente um eine spezifische Antwort. Dabei bestehen Interaktionen zwischen diesen beiden Hauptkomponenten. Die erworbene Komponente besteht ebenfalls aus zellulären Elementen wie zum Beispiel T- und B-Lymphozyten oder Plasmazellen und humoralen Elementen wie den Antikörpern. Dabei besitzt das erworbene System die Eigenschaft, einmal prozessierte Pathogene wiederzuerkennen und eventuell bei erneutem Kontakt schneller bzw. differenzierter zu reagieren.

Das angeborene Immunsystem spielt bei der Initialphase der Infektion eine wesentliche Rolle, da die Initiierung des erworbenen Systems einige Tage dauert[4].

Dabei sind Toll-like Rezeptoren ein wesentlicher Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Bislang sind zehn Rezeptoren der TLR-Familie(TLR-1-10) beim Menschen identifiziert worden[4, 23]. In Ihrer Funktion erkennen sie sogenannte PAMPs (pathogen-assoziierte molekulare Muster)[4]. Bei diesen PAMPs handelt es sich um Struktur motive, die essentiell und auch charakteristisch für eine bestimmte Gruppe von Pathogenen sind[4].

Eine Aktivierung von TLRs kann zur Zytokinausschüttung der entsprechenden Zelle führen, welche wiederum T-Lymphozyten aktiviert[4]. Die Expression von TLRs ist nicht nur auf Immunzellen beschränkt; TLRs können auch von Nicht-Immunzellen exprimiert werden[72]. TLR-3 erkennt doppelsträngige RNA (dsRNA) sowie poly(I:C), ein synthetisches Analogon viraler RNA [4, 50, 89, 95]. Dabei ist der TLR-3 in der Lage viele verschiedene Viren zu erkennen, da viele Viren an einem Punkt ihres Replikationszyklus dsRNA produzieren[82]. Es ist sogar möglich, dass auch virale DNA nach Internalisierung in die Zelle durch die Polymerase III in RNA umgeschrieben wird und auf diese Art dann Erkennungsrezeptoren für virale Nukleotidsequenzen wie RIG-1 stimuliert[1, 11]. RIG-1 und MDA-5 sind neben dem TLR-3 weitere Rezeptoren dieser Kategorie und erkennen ebenfalls dsRNA[89].

Exprimiert wird TLR-3 von verschiedensten Zellen wie zum Beispiel unreifen dendritischen Zellen, Epithelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten und neben manchen Tumorzellen auch von Endothelzellen, auf deren Verhalten im Folgenden genauer eingegangen werden soll[95].

### 1.1.4 TLR-3

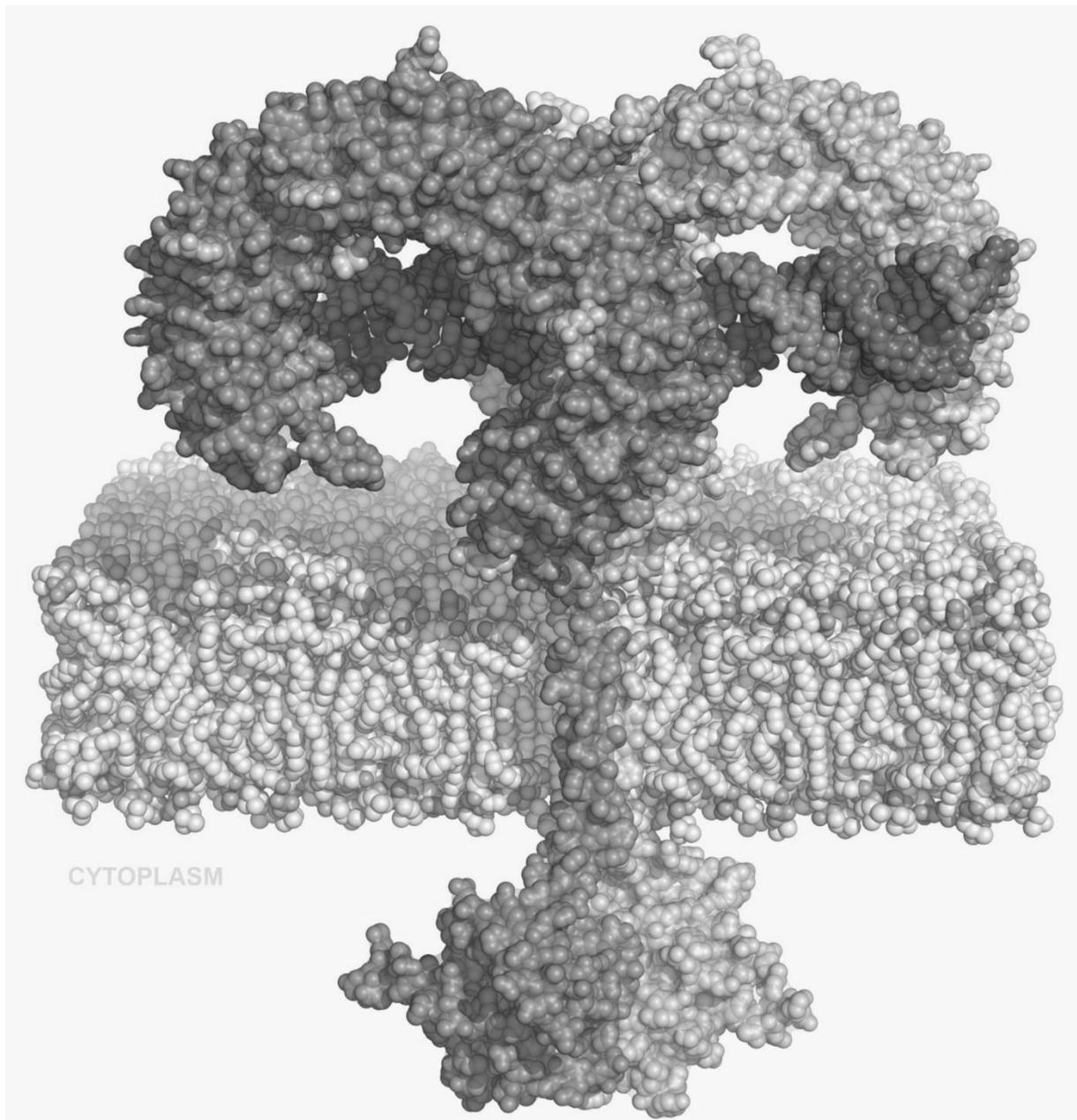


Abbildung 1: Dargestellt ist der TLR-3 nach Dimerbildung [dargestellt als dunklere und hellere transmembranäre Domäne] bei Bindung des Liganden dsRNA [dargestellt als Doppelhelix aus hellerem und dunklerem Strang] (Liu, L., et al., Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. Science, 2008. 320(5874): p. 379-81.)

Der TLR-3 ist ein transmembranärer Rezeptor vom Typ I, in Abbildung 1 dargestellt, und besteht nach aktuellen Erkenntnissen aus einem LRR (Leucin-rich repeat), welches zur Ektodomäne gehört[5]. Das Molekulargewicht beträgt 125 kDa[82, 95]. Die Ektodomäne erkennt die entsprechenden Liganden wie zum Beispiel virale dsRNA oder auch ssRNA sowie poly(I:C)[4, 50, 95]. Darauf folgt die transmembranäre Domäne, an welche sich die

intrazelluläre Komponente TIR (Toll/IL1 Rezeptor) anschließt[95]. Dabei kann die TIR Komponente an das intrazelluläre Adapterprotein TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ) binden[95]. Strukturell bildet der TLR-3 bei Bindung an den Liganden ein Dimer, welches für die Erkennung von Liganden obligat ist, wobei die beiden Ektodomänen die Form eines Hufeisens annehmen, in welchem der Ligand erkannt wird[46, 82]. TLR-3 ist meist intrazellulär lokalisiert, jedoch kann sich der Rezeptor ebenfalls an der Zelloberfläche befinden, wie beispielsweise bei Fibroblasten[53]. Intrazellulär befindet sich die Ektodomäne in Endosomen[82]. Dabei bleibt der Rezeptor für seine Liganden reagibel[53].

Der TLR-3 induziert die Transkriptionsfaktoren Interferon Regulatory Transcription Factor (IRFs) 3 und 7 sowie NF- $\kappa$ B[95]. Im Gegensatz zu den anderen TLRs verläuft die Signalkaskade nicht über MyD88, sondern agiert über das Adapterprotein TRIF(TICAM) und kann so über Phosphorylierung und Dimerbildung der Transkriptionsfaktoren IRF 3 und 7 zur Bildung von antiviralen und proinflammatorischen Zytokinen wie Typ-1 Interferonen, also INF- $\alpha$  und INF- $\beta$  führen[83, 95]. NF- $\kappa$ B wird durch den TLR-3 ebenfalls in einem TRIF abhängigen Signalweg über das Rezeptor-Interaktions-Protein 1 (RIP1) aktiviert[5]. Diese Aktivierung führt dann zu vermehrter Bildung von Interleukinen, kann aber auch über einen von TNF  $\alpha$  unabhängigen Weg zur Apoptose der Zellen führen[69, 95].

### 1.1.5 RIG-1 und MDA-5

Neben dem TLR-3 dienen auch RIG-1(Retinoid Acid-Inducible Gene 1) und MDA-5(Melanoma-Differentiation-Associated Gene 5) als Erkennungsrezeptoren für virale Nukleotidsequenzen[45, 86, 89, 95]. RIG-1 und MDA-5 sind intrazellulär lokalisiert[70]. Dabei können diese zytosolischen Helikasen dsRNA und auch poly(I:C), als synthetisches Analogon viraler RNA, binden[45, 89, 95]. RIG-1 und MDA-5 gehören zur Familie der RIG-1 like Rezeptoren (RLR) bzw. zur DExD/H Box RNA Helikase Familie. Beide besitzen am N-Terminus zwei Kopien der Caspase Recruitment Domains (CARDs), die sich dann über die Transkriptionsfaktoren IRF 3 und 7 sowie NF- $\kappa$ B in der Produktion von Zytokinen auswirken, was in Abbildung 2 veranschaulicht wird[38, 45, 93, 95, 97]. Dabei verläuft die Induktion der genannten Transkriptionsfaktoren über die Aktivierung des mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS)[71]. Am C-terminalen Ende liegt die C-terminal regulatory domain (CTD), welche den Liganden binden kann[45]. Zwischen der CARD-Region und der CTD-Region liegt die DExD/H Box RNA Helikase Domäne[45]. Die Bindung des Liganden hat jeweils die Dimerbildung von RIG-1 bzw. MDA-5 zur Folge und löst die Kaskade zur Produktion von Typ 1 Interferonen, also INF  $\alpha$  und  $\beta$  sowie weiteren Zytokinen aus[83, 95]. RIG-1 und MDA-5 sind während des Prozesses in der Lage dsRNA zu entwinden[93].

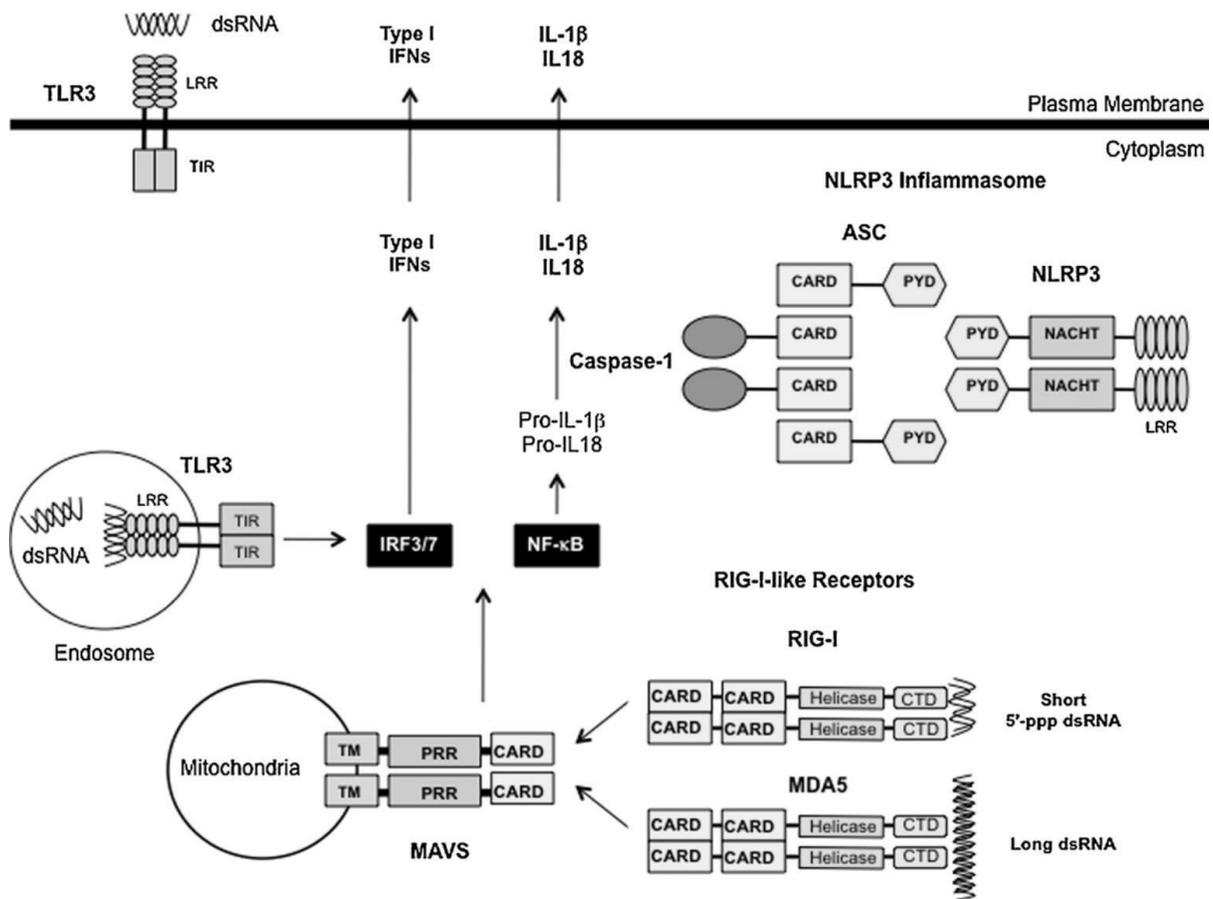


Abbildung 2: Signalwege von TLR-3, RIG-1 und MDA-5 sowie deren strukturelle Beschaffenheit.

Der TLR-3 ist einmal transmembran an der Zelloberfläche und einmal in einem Endosomen im Zytoplast gelegen dargestellt. Dabei bindet die LRR Komponente den Liganden und vermittelt ihre Wirkung auf die Transkriptionsfaktoren IRF-3 und 7 sowie NF-κB über die zytosolisch gelegene TIR-Domäne. RIG-1 und MDA-5 ähneln sich in Struktur und Signalkaskade. Beide bestehen aus der ligandbindenden CTD-Komponente, der spezifischen Helikasedomäne und einer zweifachen CARD-Domäne. Die Ligandbindung führt zur Dimerisierung von RIG-1 und MDA-5 und wirkt über die dargestellten MAVS auf die Transkriptionsfaktoren IRF-3 und 7 sowie NF-κB. Diese führen hier wie bei der Induktion durch TLR-3 zur Produktion von Type I Interferonen, sowie zur Produktion von IL-1-β und IL-18. (Yu, M. and S.J. Levine, Toll-like receptor 3, RIG-I-like receptors and the NLRP-3 inflammasome: Key modulators of innate immune responses to double-stranded RNA viruses. Cytokine Growth Factor Rev, 2011)

### **1.1.6 ICAM-1**

Bei dem Protein ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) oder CD54 handelt es sich um ein Oberflächenprotein der Zelle, welches zur Superfamilie der Immunglobuline gehört und unter normalen Umständen nur in geringem Ausmaß exprimiert wird[9]. Dabei ermöglicht es die Adhäsion zwischen Leukozyten und Endothel, sodass es im Rahmen von Entzündungen eine wichtige Rolle spielt, indem es die Diapedese fördert und damit die inflammatorische Antwort des Organismus lokal begünstigt[18].

Das ICAM-1-Molekül besteht aus 5 Immunglobulin-ähnlichen Domänen (D1-D5), einer kurzen transmembranären Region und einer kurzen carboxyl-terminalen zytoplasmatischen Domäne[9, 16, 74]. Im Molekül ist die  $\beta$ -Faltblattstruktur dominant[9].

Da ICAM-1 mit Vaskulitiden in Verbindung steht und man über dies die Atherosklerose als eine Form der Vaskulitis diskutiert, sollen Effekte auf die Expression dieses Proteins im Rahmen der ursprünglichen These ebenfalls untersucht werden[91].

### **1.1.7 VCAM-1**

Bei dem Molekül VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) oder auch CD106 handelt es sich um ein transmembranäres Glykoprotein, welches wie ICAM-1 ebenfalls der Immunglobulin-Superfamilie angehört[9, 17, 24]. Dabei besteht der extrazelluläre Anteil aus 6 oder 7 Immunglobulinpartikeln[17]. Dieses Protein wird unter anderem von Endothelzellen unter Einfluss von Entzündungsreizen exprimiert[54]. Der Hauptligand von VCAM-1 ist VLA-4[24]. Die Interaktion dieser beiden Moleküle spielt eine große Rolle bei der Adhäsion von im Blut zirkulierenden Immunzellen an das Endothel, sodass VCAM-1 eine weitere wichtige Stufe der Kaskade zur Diapedese darstellt.

Da VCAM-1 als ein mögliches Schlüsselprotein beim Vorgang der vaskulären Entzündung gilt, zum anderen aber auch selbst als Erkennungsrezeptor für virale Nukleotidsequenzen diskutiert wird, soll die Expression dieses Proteins nach Aktivierung von RNA-Rezeptoren des angeborenen Immunsystems untersucht werden[33, 42, 60]

### **1.1.8 IL-6**

IL-6 (Interleukin 6) ist ein Zytokin, das von unterschiedlichen Zellen, unter anderem auch Endothelzellen als Reaktion auf eine große Bandbreite von Stimuli produziert werden kann und eine wichtige Rolle im Rahmen von Entzündungsreaktionen spielt[32]. Als Stimulus zur Expression von IL-6 kommen beispielsweise virale Erkrankungen in Betracht[67]. Dabei handelt es sich um ein kleines Glykoprotein(21kDa), welches bei einigen entzündlichen Erkrankungen erhöht sein kann. Früher wurde es lediglich als Nebenprodukt einer inflammatorischen Antwort bzw. auch als Marker der Inflammation angesehen, während es nun immer mehr selbst als Modulator der Inflammation gilt[67].

Man nimmt an, dass IL-6 bei der Abwehrreaktion von Viren, wie zum Beispiel H1N1, eine entscheidende Rolle zukommt[15]. Zusätzlich ist IL-6 über PGE<sub>2</sub> an der Fieberentstehung beteiligt[8].

Vor dem Hintergrund, dass IL-6 mit dem Auftreten von vaskulärer Inflammation assoziiert wird und seine Expression bei viralen Infektionen erhöht wird, soll dieses Protein im Weiteren in Abhängigkeit einer Aktivierung der bereits genannten viralen Rezeptoren ebenfalls untersucht werden[15, 47, 58, 61, 67].

### **1.1.9 Vorarbeiten der Forschungsgruppe**

Methodische Abläufe sowie die Verwendung bestimmter Konzentrationen ergeben sich aus Vorarbeiten der Forschungsgruppe um PD Dr. M. Wörnle. Dabei basieren die Überlegungen zu viral verursachten, vaskulären Veränderungen auch auf Ergebnissen, welche die Forschungsgruppe an der humanen Niere erarbeitet hat. Dabei lag der Fokus auf den immunvermittelten, speziell durch Viren verursachten Nierenerkrankungen wie zum Beispiel der Hepatitis C assoziierten Glomerulonephritis. Diese Erkrankungen können aber auch als Systemerkrankungen mit einer Beteiligung des Gefäßsystems verlaufen[20, 27, 68].

Der Schwerpunkt dieses Projekts sollte daher auf der Rolle von Immunrezeptoren des angeborenen Immunsystems bei viralen Infektionen mit Gefäßbeteiligung liegen.

Die Untersuchungen der Arbeitsgruppe haben an der humanen adulten Niere durch Immunhistochemie an Gefrierschnitten die Expression von TLR-3 im Glomerulus, auf den Gefäßmuskelzellen der Arteriolen und auf den Epithelien der Sammelrohre nachweisen können[90]. Im Weiteren konnte eine Steigerung bzw. Selbstinduktion der Expression des TLR-3 durch IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  sowie poly(I:C) demonstriert werden[90]. Die Funktionalität des TLR-3 auf Mesangialzellen wurde mittels eines Inflammations-Mikrochips mit 80 Genen untersucht. Von den hochregulierten Genen (IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , CSF-1, ICAM-1) wurden ausgewählte mittels RT-PCR bestätigt[90].

Ferner konnte die Arbeitsgruppe eine basale Expression der viralen Rezeptoren RIG-1 und MDA-5 mittels RT-PCR an humanen Mesangialzellen demonstrieren, welche sich durch Stimulation mit poly(I:C) steigern ließ[89]. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass zwischen TLR-3, RIG-1 und MDA-5 ein enger Zusammenhang besteht[89].

Anhand dieser vorherigen Projekte wurde die Versuchsmethodik etabliert, Stimulantien (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , poly (I:C)) sowie deren Konzentrationen festgelegt. Gleiches gilt auch für die Zielgene, Zeiträume und Zellzahlen der Untersuchungen. Damit wurde die Basis für die Untersuchungen der Arbeitsgruppe an den HMEC-1 Zellen geschaffen, wobei im Einzelnen, Anpassungen nötig waren. Um ein proinflammatorisches Milieu zu schaffen, wie es bei Virusinfektionen zu finden ist, wurde eine Stimulation mit der Kombination aus den proinflammatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  und IL1- $\beta$  verwendet. Diese Zytokine spielen neben IL-6 unter anderem eine Rolle bei der Adhäsion von Leukozyten[19].

## **1.2 Fragestellung und Zielsetzung**

### **1.2.1 Arbeitshypothese**

Wir nehmen an, dass Erkennungsrezeptoren für virale Nukleotidsequenzen in Endothelzellen vorhanden sind und in vivo eine „Gate Keeper“-Funktion einnehmen, also dass sie RNA-Fragmente aus dem vaskulären System erkennen, beseitigen und eine konsekutive antivirale Antwort auslösen. Wir gehen weiter davon aus, dass sich die virale Infektion durch größere Mengen an viraler RNA über bestimmte Mechanismen und unter Beteiligung der Erkennungsrezeptoren für virale Nukleotidsequenzen als Gefäßveränderung manifestiert, wobei auch Immunkomplexe aus viralen Bestandteilen und Antikörpern beteiligt sein könnten.

### **1.2.2 Ziele**

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es, die Regulation der Expression der viralen RNA Rezeptoren TLR-3, RIG-1 und MDA-5, deren Interaktion im Endothel bei Stimulation mit viralen Nukleinsäuren zu analysieren und die durch Erkennungsrezeptoren für virale Nukleotidsequenzen regulierten Gene am Endothel zu untersuchen. Dabei liegt das Augenmerk auf der Synthese von antiviralen Substanzen (INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ ), von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , MCP-1, RANTES, MCSF) sowie von Zelladhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1) nach Aktivierung der Erkennungsrezeptoren für virale Nukleotidsequenzen. Die spezifische Beteiligung der Rezeptoren bei diesen Prozessen soll mittels Knockdown-Experimenten untersucht werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Medien und Flüssigkeiten**

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) gelagert bei 5° C

Mit 1000 mg/L Glukose, L-Glutamin und Natrium Bikarbonat

Mit Pyridoxin (ersetzt Pyridoxal HCl durch Pyridoxine HCl)

An Zellkultur getestet

Auf Endotoxine getestet

Steril und gefiltert

Produktnummer: D6046

Sigma-Aldrich, Corporation, St. Louis, USA

Endothelial cell growth medium gelagert bei 5°C

Und Supplement Mix gelagert bei -20°C

Katalognummer: 201 0111

Provitro, Berlin ,Deutschland

FBS gelagert bei -20°C

FBS Superior

Katalognummer: S0615

Biochrom Ag, Berlin, Deutschland

PBS (Phosphate Buffered Saline) bei Raumtemperatur gelagert

Mit 8g/L Natriumchlorid,

Mit 0,2g/L Kaliumchlorid,

Mit 1,15g/L di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat

Mit 0,2g/L Kaliumdihydrogenphosphat

Hergestellt durch „Apotheke Klinikum der Universität“ Pettenkoferstr. 8a, 80336 München

Opti-MEM® Reduced Serum Medium

gelagert bei 5°

Katalognummer: 31985-070

Invitrogen bzw. Life Technologies, Carlsbad, USA

Trypsin-EDTA gelagert bei -20°C

Solution (1x)

Produktnummer: T3924

Sigma-Aldrich, Corporation, St. Louis, USA

Penicillin / Streptomycin gelagert bei -20°C

(100x)

Katalognummer: P11-010

PAA, Pasching, Österreich

Destilliertes Wasser

Beta-Mercaptoethanol

## 2.1.2 Stimulationsagentien, Kits und Enzyme

RNasin® RNAse Inhibitor:

Gelagert bei -20° C

Katalognummer: N2611

Promega Corporation, Madison, USA

Reverse Transkriptase:

Gelagert bei -20°C

SuperScript® II Reverse Transcriptase,

Katalognummer: 18064-022

Invitrogen bzw. Life Technologies, Carlsbad, USA

DNase:

Gelagert bei 4°C

RNase-Free DNase Set (50)

Katalognummer: 79254

Qiagen GmbH – Germany, Hilden, Deutschland

RNA-Isolation:

PureLink™ RNA Mini Kit

Katalognummer: 12183018A

Invitrogen bzw. Life Technologies, Carlsbad, USA

RNA-Quantifizierung:

Component A und B bei Raumtemperatur C und D bei 4° C gelagert

Qubit™ RNA Assay Kit

Katalognummer: Q32852

Invitrogen bzw. Life Technologies, Carlsbad, USA

Poly (I:C):

Gelagert bei -20°C

Platinum qPCR supermix-UDG with ROX:

Katalognummer: 11743-500

Invitrogen bzw. Life Technologies, Carlsbad, USA

Ambion® In Vivo Negative Control #1 siRNA:

Gelagert bei -20°

Katalognummer: 4457287

Ambion bzw. Life Technologies, Carlsbad, USA

siRNA TLR-3:

Gelagert bei -20°

Katalognummer: 107056

Ambion bzw. Life Technologies, Carlsbad, USA

siRNA MDA-5:

Gelagert bei -20°

Katalognummer: 125361

Ambion bzw. Life Technologies, Carlsbad, USA

siRNA RIG-1:

Gelagert bei -20°

Katalognummer: 14985

Ambion bzw. Life Technologies, Carlsbad, USA

siPORT™ NeoFX™ Transfection Agent:

Gelagert bei 4°

Katalognummer: 4457287

Ambion bzw. Life Technologies, Carlsbad, USA

INF-γ:

Gelagert bei -20°C

Katalognummer: 300-02

PeproTech, Rocky Hill, USA

TNFα:

Gelagert bei -20°C

Katalognummer: 300-01A

PeproTech, Rocky Hill, USA

IL-1 β:

Gelagert bei -20°C

Katalognummer: 200-01B

PeproTech, Rocky Hill, USA

AoD(Primer),

Applied Biosystems bzw. Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA

GENSYMBOL	GENNAME	KONTEXTSEQUENZ ASSAY ON DEMAND	REFSEQ	ASSAYID
<b>human GAPDH</b>	Glyceraldehyde-3- Phosphat Dehydrogenase		NM_002046.3 M33197	Hs00153349_m1
<b>DDX58 (human RIG-1)</b>	DEAD (Asp-Glu-Ala- Asp) box polypeptide 58	CCCTAGACCATGCAG GTTATTCTGGACTTT	NM_014314.3, AF038963.1, DN998145.1, BC107731.1	Hs00204833_m1
<b>IFIH1( human MDA5)</b>	interferon induced with helicase C domain 1	GCAGATGCAACCAGA GAAGATCCAT	NM_022168.2, AY017378.1, AF095844.1, BC078180.1	Hs01070332_m1
<b>TLR-1</b>	Toll-like Rezeptor 1	TGTTTTGTGGCCAG GGTCTTCATG	NM_003263	Hs00413978_m1
<b>TLR-2</b>	Toll-like Rezeptor 2		NM_003264	Hs00152932_m1
<b>TLR-3</b>	Toll-like Rezeptor 3	TAGCAGTCATCCAAC AGAATCATGAGACAG	NM_003265.2, U88879.1, BC059372.1, BC094737.1	Hs00152933_m1
<b>TLR-4</b>	Toll-like Rezeptor 4	CTGCGTGGAGACTTG GCCCTAAACC	NM_003266, NM_138556	Hs00152934_m1
<b>TLR-5</b>	Toll-like Rezeptor 5	ACAGTCACCAAACCA GGGATGCTAT	NM_003268	Hs00152825_m1
<b>TLR-6</b>	Toll-like Rezeptor 6	CCAGCTACTTGATTTA AGTGTTTTTC	NM_006068	Hs00271977_s1
<b>TLR-8</b>	Toll-like Rezeptor 8	GGAAAGGAGACTAA AAAGGAAAACA	NM_016610	Hs00152972_m1

<b>TLR-9</b>	Toll-like Rezeptor 9	(Sonde : h-TLR-9-T1)	NM_017442	(FP: h-TLR-9-FP1) (RP: h-TLR-9-RP1)
<b>TLR-10</b>	Toll-like Rezeptor 10	TTGAAACTCCATCTG TAAGGCTAT	NM_030956	Hs00374069_g1
<b>Human RANTES</b>	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted		NM_002985.2	
<b>IL-6</b>	Interleukin 6	TGGATTCAATGAGGA GACTTGCCTGGTGAA	NM_000600.2, X04403.1, M14584.1, M18403.1	Hs00174131_m1
<b>IL-8</b>	Interleukin 8	GCTCTGTGTGAAGGT GCAGTTTTGCCAAG	NM_000584.2, M17017.1, M26383.1, Z11686.1	Hs00174103_m1
<b>ICAM-1</b>	Interzelluläres Adhäsions-Molekül 1	TCACCGTGTACTGGA CTCCAGAACG	NM_000201	Hs00164932_m1
<b>VCAM-1</b>	Vaskuläres Zelladhäsions-molekül 1	GTCAAGGAAGAGA AAACAACAAAGA	NM_080682.1, NM_001078.2, M30257.1, M60335.1	Hs00365486_m1
<b>TNF <math>\alpha</math></b>	Tumor Nekrose Faktor	ATGTTGTAGCAAACC CTCAAGCTGA	NM_000594, NM_000594	Hs00174128_m1
<b>TNFRSF1A</b>	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor Superfamilie, 1A	GCTGCCACTGGTGCT CCTGGAGCTG	NM_001065.2, M63121.1, BC010140.2, CR596841.1	Hs00533560_m1
<b>TNFRSF1B</b>	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor Superfamilie, 1B	AGAGAAGCCAAGGT GCCTCACTTGC	NM_001066.2, M32315.1, M35857.1, M55994.1	Hs00153550_m1
<b>MCP-1</b>	monocyte chemotactic protein-1		NW_001843666 .1	Mm00441242_m1
<b>MCSF</b>	Macrophage colony-stimulating factor		Chromosome: 1; NC_000001.10 (110453233..11 0473616)	Hs99999084_m1
<b>INF <math>\alpha</math></b>	Interferon $\alpha$	(Sonde: hIFNa-T1)		(FP: hIFNa-FP) (RP: hIFNa-RP )
<b>INFB1</b>	Interferon $\beta$	TACCTCCGAACTGA AGATCTCCTAGCCT	NM_002176.2, M28622.1, V00546.1, V00547.1	Hs00277188_s1

### 2.1.3 Die Geräte

Mikroskop:	Olympus CK2, Hamburg, Deutschland
Zählkammer: Improved Neubauer Chamber (0,0025 mm <sup>2</sup> )	BlauBrand, Wertheim, Deutschland
Fluorometer: Qubit 1.0 Fluorometer Katalognummer: Q32857	Invitrogen bzw. Life Technologies, Carlsbad, USA
Pipetten(0.5-10, 10-100, 10, 2-20, 20-200, 100-1000µl):	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Steril Werkbank:	Heraeus, München, Deutschland
Thermomixer:	Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe:	Pipetus, Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Inkubator: 37° C , 5%CO <sub>2</sub> , 95% Normalluft	Function Line, Heraeus, München, Deutschland
Kühlschränke:	AEG-Gerät bei 5°C und BOSCH-Gerät bei 4°C
Tiefkühlschränke:	BOSCH-Gerät bei -22°C und ein BOSCH-Gerät bei -30°C
RT-PCR Maschine: ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System, Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA	
Zentrifugen:	Centrifuge 5415 C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland Standzentrifuge mit Kühlung Rotixa/KS, Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Kamera:	GT-8500, Samsung, Seoul, Korea

### 2.1.4 Verbrauchsmaterial

Pipetten: Costar Stripetts 1ml (Cat. No.: 4485), 5ml (Cat. No.: 4051 ), 10ml (Cat. No.: 4488) and 25ml (Cat. No.: 4489)	Corning Incorporated, New York, USA
Pipettespitzen: Ep T.I.P.S.® Motion Pipette Tips White, Yellow and blue	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Kulturflaschen:

75ml culture flask

Katalognummer: 83.1813

Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

6 Well Kultur Platten

Diameter 3,48mm

Katalognummer: 3506

Corning Incorporated, New York, USA

Zentrifugiergefäße:

50ml self-standing centrifugation Tubes

Katalognummer: 430921

Corning Incorporated, New York, USA

Mikropipetierplatte:

MicroAmp® Optical 96-Well Plate

Katalognummer: N8010-0560

Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA

## 2.2 Die Zellkultur

Bei den für diese Arbeit verwendeten Zellen handelt es sich um HMEC-1. Diese Zellen haben wir dankend vom „Centers for Disease Control and Prevention“ erhalten (Atlanta, GA 30333, USA).

Bei dieser Zellkultur handelt es sich um eine immortalisierte humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie. Die Immortalisierung wurde durch Transfektion mit einem auf pBR-322 basierenden Plasmid, welches das „large T“ Antigen vom Simian 40 A Virus beinhaltet, erreicht [2, 66]. In Kultur wachsen diese Zellen einschichtig bis zu  $22,5 \times 10^6$  Zellen pro  $75 \text{ cm}^2$ , wobei die Zellen allerdings die Morphologie, den Phänotyp und auch die charakteristischen Funktionen von primären humanen mikrovaskulären Endothelzellen nicht verlieren [2]. Dabei exprimieren diese Zellen acht von zehn beim Menschen bekannte TLRs [23]. Des Weiteren zeigt diese Zellkultur keine Anzeichen von Alterung vor Passage 95 [2]. Für unsere Versuche wurden Zellen zwischen der Passage 14 und 26 verwendet.

Nach der Passage formen diese Zellen Zellinseln, was in Abbildung 3 dargestellt ist. Von dort breiten sich die Zellen dann auf dem Untergrund aus und bilden danach den weiter oben beschriebenen dichten Zellrasen aus, welcher in Abbildung 4 illustriert wird.

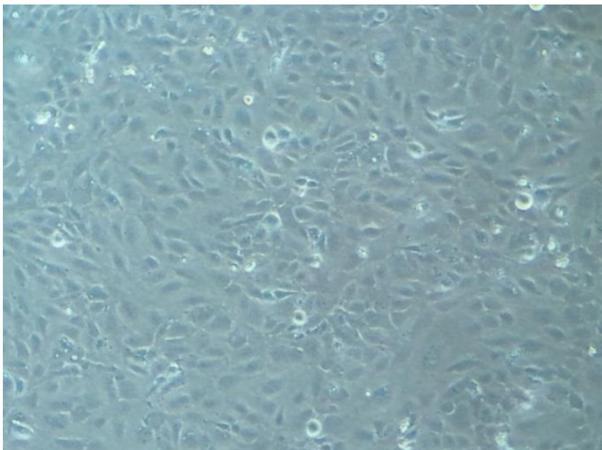


Abbildung 3: Lichtmikroskopische Darstellung der HMEC-1-Zellen mit einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen pro Well mit 2 ml Medium nach 24 Stunden

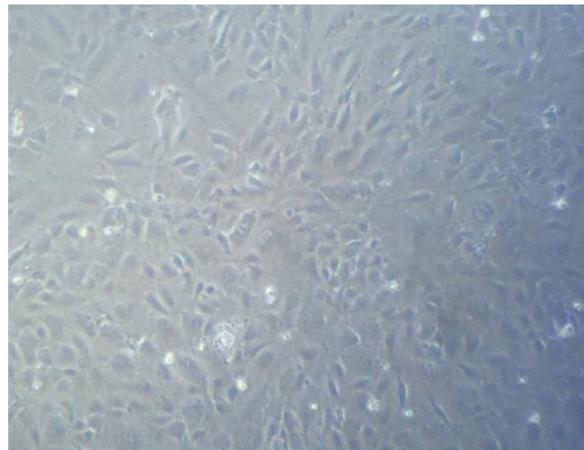


Abbildung 4: Lichtmikroskopische Darstellung der HMEC-1-Zellen mit einer Dichte von  $4 \times 10^5$  Zellen pro Well mit 2 ml Medium nach 24 Stunden

### 2.2.1 Die Passage der Zellen

Das Medium, welches für die Kultivierung der HMEC-1 verwendet wurde, bestand aus dem im Kapitel Material beschriebenen Dulbecco's Modified Eagle Medium plus 10 % (v/v) des „Endothelial Growth Medium“, welches den „Supplement Mix“ beinhaltet plus 10 % (v/v) des FBS plus 100 IU/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin. Das benötigte Volumen an Medium wurde ca. 20 Minuten lang bei Raumtemperatur aufgewärmt bevor es in Kontakt mit den Zellen kam. Die Zellen selbst wurden in den erwähnten Flaschen mit 20ml Medium aufbewahrt. Zur Kultivierung wurden die Zellen im Inkubator bei 37° mit 5 % CO<sub>2</sub> gelagert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen in eine neue Passage überführt. Dafür wurde das alte Medium abgesaugt und der verbliebene Zellrasen mit PBS gewaschen. Danach wurde in jede Flasche, die zur Präparation bereit stand, 1,5 ml Trypsin gegeben um den Zellrasen abzulösen. Im Anschluss daran wurden die Zellen für ca. 2 Minuten abhängig vom Prozess der Loslösung der Zellen, welcher lichtmikroskopisch überwacht wurde, bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die losgelösten Zellen wurden dann mit 8,5 ml pro Flasche des Mediums in Suspension gebracht, sodass das Gesamtvolumen 10 ml pro Flasche ergab. Diese 10 ml Suspension wurden in Zentrifugierröhrchen gefüllt und bei 1000 U/min bzw. 168 G für drei Minuten zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen wieder mit zwei bis 3 ml des Mediums pro Flasche in Suspension gebracht.

Nachdem die Zellen wieder in Suspension gebracht wurden, wurde je 1 ml in jede Flasche gegeben, die präpariert werden sollte. Dabei enthielten die Flaschen vor Zugabe der Zellen 19 ml des Mediums, sodass sich das Gesamtvolumen von 20 ml ergibt.

Jeder der genannten Arbeitsschritte wurde unter der sterilen Werkbank durchgeführt. Sofern nicht anders erwähnt, beinhalten die Medien die im Kapitel Material genannten Antibiotika.

## **2.3 Durchführung**

### **2.3.1 Die Vorbereitung der Zellen für die Versuche**

Um die benötigte Menge an Zellen zur Verfügung zu haben, wurden die Zellen wie oben beschrieben in 20ml Flaschen kultiviert und befanden sich zwischen Passage 14 und 26. Die Zellen wurden so passagiert wie in 2.2.1. beschrieben.

Danach wurden die Zellen mit Trypsin behandelt, zentrifugiert und anschließend wieder in Suspension gebracht, wie oben beschrieben. Sofern nicht anders erwähnt, wurde Medium mit den genannten Antibiotikakonzentrationen verwendet. Um die Zellen wieder in Suspension zu bringen, wurde bei der Vorbereitung der Experimente ein Volumen zwischen 5 ml und dem maximal für das Experiment benötigte Volumen gewählt, um zu starke Verdünnung zu vermeiden. Im Anschluss wurden die Zellen in einer Neubauerzählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Dabei wurden die Zellen in den vier verschiedenen Arealen gezählt und im Anschluss das arithmetische Mittel gebildet. Die Neubauerzählkammer ermöglicht die Bestimmung der Zellzahl pro Milliliter. Für jedes Experiment wurde ein Volumen mit der gewünschten Zellkonzentration pro Milliliter angefertigt, das ebenfalls für zwei weitere Wells ausreicht. Im Anschluss wurde die Anzahl der für den Versuch benötigten Zellen durch die Konzentration dividiert, welche in der Neubauerzählkammer eruiert wurde. Als Ergebnis wurde das für das Experiment notwendige Volumen aus der oben angefertigten Zellsuspension erhalten. Danach wurde zu diesem Volumen normales Medium hinzugegeben bis das Gesamtvolumen der Wells, deren Benutzung beabsichtigt war, zuzüglich zwei Wells als Sicherheit, erreicht wurde. Im Anschluss wurde die Zellsuspension mit der gewünschten Konzentration zu gleichen Teilen auf die Wells aufgeteilt. Die Anzahl der benötigten Zellen pro Well hängt auch von den erwünschten Messzeitpunkten ab, da bei langer Versuchslaufzeit und zu hoher Zellanzahl eventuell Hyperkonfluenz besteht. Die optimale Anzahl an Zellen wurde in einem Zeit- und Konzentrationsversuch ermittelt. Die Versuche wurden begonnen, wenn der Zellrasen subkonfluent war.

## 2.3.2 Versuchsaufbau der Experimente

### 2.3.2.1 Versuchsaufbau: Expression der Toll-like-Rezeptoren, RIG-1 und MDA-5 als Erkennungsrezeptoren für virale Nukleotidsequenzen auf HMEC-Zellen

In diesem Experiment soll untersucht werden, inwiefern ein proinflammatorisches Milieu sich auf die Expression bzw. Regulation der viralen Rezeptoren und anderer Immunantworten auswirkt.

Im ersten Experiment wurden  $6 \times 10^5$  Zellen in 2 ml Medium mit Antibiotika pro Well verwendet. Hierbei wurden eine basale und eine mit Zytokinen stimulierte Kondition erstellt, welche sich für die Arbeitsgruppe schon früher als zielführend erwiesen hatten.

Die verwendeten Zytokine waren TNF- $\alpha$  in einer Konzentration von 25ng pro ml, IL-1 $\beta$  in 10ng pro ml und INF- $\gamma$  in 20ng pro ml. Jede Kondition wurde in zweifacher Ausführung hergestellt und befand sich während des gesamten Experiments unter denselben Umständen.

1. 600000 Zellen pro Well wurden gesät und dann für 24 Stunden in 2ml Medium bei 37° mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und danach mit PBS gewaschen.
2. Außer dem Medium wurde nichts in die mit Basal beschrifteten Wells gefüllt. In die zu stimulierenden Wells wurde Medium mit 25 ng/ml TNF  $\alpha$ , 10 ng/ml IL1 $\beta$  und 20 ng/ml INF  $\gamma$  gegeben.
3. Inkubation der Wells für 24 Stunden bei 37° mit 5 % CO<sub>2</sub>
4. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet.

Die so gewonnenen Proben wurden dann wie unten beschrieben weiter verarbeitet.

In diesem Versuch wurden folgende Primer verwendet: TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-7, TLR-8, TLR-9, TLR-10, MDA-5, RIG-1 und GAPDH.

### 2.3.2.2 Versuchsaufbau: Expression von Toll-like-Rezeptoren, MDA-5, RIG-1, Chemokinen, Zytokinen und Adhäsionsmolekülen bei zeitabhängiger Stimulation durch poly(I:C)

Um zu eruieren, zu welchem Zeitpunkt die höchste Reagibilität vorliegt und welche Zytokine und Chemokine bei Stimulation mit poly(I:C) durch die HMEC-1 ausgeschüttet werden, wurde dieses Experiment durchgeführt. Dafür wurden  $32 \times 10^4$  Zellen in zwei ml Medium mit

Antibiotika pro Well verwendet. Hierfür wurden die Konditionen „basal“ und „stimuliert“ mit 10 µg/ml poly(I:C) für folgende verschiedene Zeitpunkte hergestellt: Stimulation für drei, sechs, neun, zwölf, vierundzwanzig und achtundvierzig Stunden. Jede Kondition wurde in zweifacher Ausführung hergestellt und befand sich während des gesamten Experiments unter denselben Umständen.

1. Die Zellen wurden gezählt und 320000 Zellen wurden pro Well ausgesät und für 24 Stunden in 2 ml Medium bei 37° mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und im Anschluss mit PBS gewaschen.
2. 2 ml des Mediums mit 10 µg/ml poly(I:C) wurde in jedes mit stimuliert beschriftete Well gegeben. In Wells mit Basalkondition wurden erneut 2 ml Medium gegeben.
3. Nach 3,6,9,12,24 und 48 Stunden der Inkubation bei 37° mit 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen geerntet.

Die so gewonnenen Proben wurden dann wie unten beschrieben weiter verarbeitet.

In diesem Versuch wurden folgende Primer verwendet: IL-6, IL-8, MCP-1, RANTES, INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MCSF, VCAM-1, ICAM-1, TNF R1, TNF R2, TLR-3, RIG-1, MDA-5 und GAPDH.

### **2.3.2.3 Versuchsaufbau: Effekt einer Stimulation mit synthetischer RNA bei inflammatorischen Bedingungen auf die Expression der viralen Rezeptoren TLR-3, RIG-1, MDA-1**

In diesem Versuch soll die Regulation der viralen Rezeptoren untersucht und dabei die Wirkung einer Aktivierung der Rezeptoren demonstriert werden. Dafür werden die Zellen zunächst in ein proinflammatorisches Milieu eingeführt, wie man es bei viralen Infektionen vorfindet und im Anschluss dann mit poly(I:C) stimuliert. Vor der Stimulation mit poly(I:C) ist allerdings ein Waschvorgang mit PBS erforderlich um die direkten Einflüsse und Auswirkungen der Zytokine auf Immungene zu unterbinden, wenn es zu Stimulation mit dsRNA, also poly(I:C) kommt. Für dieses Experiment wurden  $32 \times 10^4$  Zellen in 2 ml des Mediums mit Antibiotika pro Well verwendet. Auch in diesem Versuch wurden alle Konditionen in zweifacher Ausführung angelegt. In diesem Experiment wurden Zellen mit 25 ng/ml Tnf- $\alpha$ , 10 ng/ml IL1- $\beta$  und 20 ng/ml Inf- $\gamma$  für 24 Stunden vorstimuliert und sechs Stunden später dann mit 10 µg/ml poly(I:C) für 12 Stunden stimuliert. Zum Vergleich wurden neben dieser Kondition eine vor- und nachstimulierte, eine rein nachstimulierte und eine basale Kondition angelegt.

1. 320000 Zellen wurden ausgezählt, gesät und für 24 Stunden in 2 ml Medium mit Antibiotika bei 37° mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und dann mit PBS gewaschen.
2. Zytokine wurden in die als vollstimuliert markierten Wells gegeben.
3. Auf alle anderen Konditionen wurde nur Medium gegeben.
4. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37° mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und dann mit PBS gewaschen, im Anschluss wurde in jedes Well erneut Medium gegeben.
5. Nach 6 Stunden Inkubation bei 37° mit 5 % CO<sub>2</sub> wurde der Zellrasen erneut mit PBS gewaschen.
6. 10 µg/ml poly(I:C) wurde in die als stimuliert markierten Wells gegeben während nur Medium in die anderen Konditionen gegeben wurde. Im Anschluss wurden die Zellen bei 37° mit 5 % CO<sub>2</sub> für 12 Stunden inkubiert.

Die so gewonnenen Proben wurden dann wie unten beschrieben weiter verarbeitet.

Für diesen Versuch wurden die Primer für TLR-3, RIG-1, MDA-5 und GAPDH benutzt.

#### **2.3.2.4 Versuchsaufbau: Rezeptorabhängigkeit von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen**

Dieser Versuch dient der Klärung der Interaktion in der Expression der viralen Rezeptoren bei Stimulation mit poly(I:C) sowie deren Mechanismen. In diesem Experiment wurden, wie im Handbuch vorgeschlagen,  $23 \times 10^4$  Zellen in 2,3 ml Medium ohne Antibiotika pro Well verwendet. Im Weiteren wurden die Zellen der Testkonditionen jeweils mit siRNA für TLR-3, RIG-1, MDA-5 und unspezifische mRNA transfiziert. Auf das Prinzip dieses Versuches wird in 2.3.3 näher eingegangen. Das Gesamtvolumen der Transfektionsagentien betrug 200µl, sodass sich in jedem Well mit siRNA insgesamt ein Volumen 2,5ml befand. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 10µg/ml poly(I:C) für zwölf Stunden stimuliert.

Bei diesem Experiment wurden alle Konditionen mit siRNA und mit poly(I:C) inkubiert. Daneben wurden zwei Basalkonditionen angelegt, sowie eine Kondition, die poly(I:C) enthielt und auch das Transfektionsagens siPort, allerdings keine siRNA. Zusätzlich wurde eine sogenannte sineg. Kontrolle angelegt, welche unspezifische siRNA enthält und zusätzlich poly(I:C), sowie siPort um eventuelle Effekte bei anderen Proben durch die spezifische siRNA erklären zu können.

1. Transfektionsagentien wurden präpariert. Mix A: Optimem 9 5µl + siPort 5 µl pro Well.
2. Mix A wurde für 10min bei Raumtemperatur gelagert.
3. Mix B wurde hergestellt: Optimem 87,5 µl + siRNA 12,5 µl pro Well (siTLR-3, siRIG1, siMDA5 und si negativ Kontrolle).
4. Mix A und Mix B wurden kombiniert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.
5. Der Kombination von Mix A und Mix B mit einem Gesamtvolumen von 200 µl wurde in die entsprechenden Wells gegeben.
6. 23000 Zellen wurden mit 2,3 ml des Mediums ohne Antibiotika in jedes Well gegeben
7. Die Zellen wurden bei 37° mit 5 % CO<sub>2</sub> für 24 Stunden inkubiert.
8. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit neuem Medium versehen und mit 10 µg/ml poly(I:C) stimuliert und abermals bei 37° mit 5 % CO<sub>2</sub> für 12 Stunden inkubiert.

Die so gewonnenen Proben wurden dann wie unten beschrieben weiter verarbeitet.

Die für dieses Experiment verwendeten Primer waren: IL-6, IL-8, IFN-β, RANTES, MCP-1, TNF-α, TNFα-Rezeptor2, VCAM-1 und GAPDH.

### 2.3.3 RNA Interferenz

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Knock-Down-Versuche bedient man sich des Prinzips der gezielten Genabschaltung mittels siRNA (Small interfering RNA). Diese siRNA ist etwa 19 bis 23 Basenpaare lang und kann unter physiologischen Bedingungen aus einem größeren Molekül doppelsträngiger RNA gebildet werden, wobei das Enzym, ein Dicer, eine sogenannte RNase vom Typ III, beteiligt ist [83].

Die siRNA bildet dann zusammen mit speziellen Proteinkomponenten den sogenannten RISC RNA-induced silencing complex [75]. Dieser Komplex lysiert nun spezifisch bzw. komplementär zum Leitstrang der siRNA mRNA, sodass diese an der Translation gehindert wird [75]. Auf diese Weise lässt sich die Aktivität eines bestimmten Genes unterdrücken oder stark vermindern.

Für Knock-Down-Versuche wurde den Protokollen der Hersteller gefolgt, für bestimmte Gene spezifische siRNA mit Hilfe eines Transfektionsagens in die Zellen eingebracht und die Expression von konsekutiven Genen bestimmt.

### **2.3.4 Gewinnung von Material zur RNA Isolation**

Zuerst wird der Überstand abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gewaschen, welches dann ebenfalls verworfen wird. Im Anschluss wird in jedes Well 350 µl Lysis Buffer gegeben, welcher schon 1 % β-Mercaptoethanol enthält. Danach werden die Zellen mit einem Zellschaber vom Untergrund gelöst und mit dem Buffer in ein Eppendorf Cup gefüllt.

### **2.3.5 RNA Isolation**

Das Grundprinzip der RNA-Isolation ist es, die RNA auf Grund ihres, unter neutralem pH negativ geladenen, Zustands an die Membran des Spin Cartridges zu binden und mit verschiedenen Puffern Verunreinigungen auszuwaschen. Da DNA sich ebenfalls an die Membran anheftet, besteht die Möglichkeit, diese durch eine DNase in kleinere Fragmente zu spalten, welche dann kaum noch an den Filter gebunden werden können. Im Anschluss wird die RNA mit RNA freiem Wasser wieder in Lösung gebracht.

Für die RNA-Isolation wurde das PureLink™ RNA Mini Kit verwendet. Vor Verwendung musste dem Wash Buffer II zunächst noch 400 % (v/v) 96-100 % (v/v) Ethanol beigefügt werden. Zur Präparation wurden die Proben aufgetaut und mit dem Vortexer gemischt. In der Zwischenzeit wurde, zur Beseitigung von Verunreinigungen mit DNA, die Qiagen DNase I nach Handbuch vorbereitet. So wurden also 70 µl des RDD Puffers und 10 µl der DNase I pro Probe zusammengeführt und in einem Eppendorf Cup im Kühlschrank bei 8 °C bis zur Verwendung aufbewahrt. Die weitere Bearbeitung der Proben erfolgte wie im Handbuch angeraten.

1. Pro Probe wurde 1 Volumenanteil an Ethanol mit einer Konzentration von 70 % verwendet. Danach wurde die Probe mit dem Vortexer gemischt.
2. 700µl wurden aus jedem Eppendorf Cups in jeweils ein Spin Cartridge übertragen.
3. Die Proben wurden bei 12000 x g für 15 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen und die Spin Cartridges wieder in die gleichen Sammelröhrchen eingesetzt.
4. 350 µl Wash Buffer I wurde zu jeder Probe gegeben.
5. Die Proben wurden bei 12000 x g für 15 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen und die Spin Cartridges in wieder in neue Sammelröhrchen eingesetzt.
6. Danach wurde 80 µl des DNase Mixes, dessen Präparation weiter oben beschrieben wurde, zu jeder Probe hinzugefügt.
7. Die Proben wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
8. Zwischenzeitlich wurde 27 µl des RNase freien Wassers in neue Eppendorf Cups gegeben, sodass jede Probe ihr korrespondierendes RT- Mikrogefäß hatte.
9. Nach Ablauf der 15 Minuten wurde 350 µl des Wash Buffer in jedes Spin Cartridge gegeben.
10. Die Proben wurden bei 12000 x g für 15 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen und die Spin Cartridges in wieder neue Sammelröhrchen eingesetzt.
11. Danach wurde 500 µl des Wash Buffer II, dessen Präparation oben beschrieben wurde, zu jeder Probe hinzugefügt.
12. Die Proben wurden bei 12000 x g für 15 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen und die Spin Cartridges wieder in die gleichen Sammelröhrchen eingesetzt.
13. Schritt 11 und 12 wurden wiederholt
14. Die Proben wurden bei 12000 x g für 1 Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen und die Spin Cartridges wieder in ein Eppendorf Cup eingesetzt.
15. 33µl des RNase freien Wassers wurde in jedes Spin Cartridge gegeben und bei Raumtemperatur für 1 Minute inkubiert.
16. Die Proben wurden bei 13000 x g für 1 Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert.
17. Von den auf diese Weise erhaltenen Proben mit einem Volumen von 33 µl wurden 3 µl in die oben erwähnten RT-Mikrogefäß gefüllt.

Im Anschluss wurden die so entstandenen Proben bei -20 °C gelagert oder direkt für die Messung 2.3.6 vorbereitet.

### 2.3.6 Messung der RNA

Zur cDNA-Synthese werden 2 µg RNA pro Probe benötigt. Um dies zu ermöglichen musste die Menge der RNA, welche sich in den bisher isolierten Rohproben befindet bestimmt werden. Für diesen Zweck wurde Qubit®, ein fluorometrisches Gerät zur Messung von RNA benutzt. Wie im Handbuch beschrieben, wurde zunächst für jede Probe und die beiden Eichstandards 199 µl der Komponente A und 1µl der Komponente B zusammengeführt und bereitgestellt. Im Anschluss daran wurden 199 µl des Gemischs mit jeweils 1 µl Probe zusammengeführt und für 2 Minuten inkubiert. Zur Eichung wurden 190 µl des oben genannten Gemisches mit 10 µl des Standards 1 bzw. 2 zusammengeführt und nach 2 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur in das Gerät eingeführt. Nach erfolgreicher Eichung wurden die Proben zur Messung eingeführt. Da die Proben durch Zusammenführung mit dem Buffer 1:200 verdünnt sind, ergibt sich die Konzentration an RNA in der Rohprobe aus der im Qubit® gemessenen Konzentration multipliziert mit 200. Im Anschluss wurden die so entstandenen Proben bei -20 °C gelagert oder direkt für die cDNA Synthese vorbereitet.

### 2.3.7 cDNA Synthese

Durch eine reverse Transkriptase kann entlang einer RNA Matrize eine komplementäre cDNA erstellt werden. Dabei dienen randomisierte Hexamere als Primer und Ansatzpunkte für die reverse Transkriptase. Die cDNA wird aus den in dem Reaktionsgefäß befindlichen Nukleotiden synthetisiert. Währenddessen wird durch RNasin® die eukareontische RNase-Aktivität gehemmt.

Die reverse Transkription wurde mit Hilfe von SuperScript™ II der Firma Invitrogen™ durchgeführt. Das Enzym wird aus einem mit modifizierten pol-Gen des Moloney Murine Leukemia Virus transfizierten E. coli Stamm gewonnen[26, 41]. Dazu werden die Rohproben aufgetaut, mit dem Vortexer gemischt und für fünf Sekunden zentrifugiert. Da die RNA-Konzentration nun aus 2.3.6 bekannt ist, können durch vorher berechnete Verdünnung mit RNA freiem Wasser, die Röhrchen mit 2 µg RNA bereitgestellt werden. Zur Durchführung dieses Arbeitsschrittes wurden folgende Agentien im Mastermix in gelisteter Reihenfolge pro Probe zusammengeführt:

a.	5X-Buffer	9 µl/ Probe
b.	dNTPs	1 µl/ Probe
c.	DTT	2 µl/ Probe
d.	RNA sin	1 µl/ Probe
e.	Hexanukleotide	0,5 µl/ Probe
f.	Acryl	0,5 µl/ Probe
g.	SuperScript II	1 µl/ Probe

Das Enzym SuperScript™ II wurde im Tiefkühlschrank bei -20 °C aufbewahrt bis es direkt mit dem Mastermix zusammengeführt worden ist. Im Anschluss daran wurde der Mix leicht von Hand geschüttelt und bei 1000 U/Min für weniger als 5 Sekunden lang zentrifugiert. Danach wurden 15 µl Mastermix zu jeder Probe gegeben, bevor diese dann kurz mit dem Vortexer gemischt und bei 1000 U/Min für weniger als 5 Sekunden abzentrifugiert wurde. Daraufhin wurden die Proben dem Thermomixer zugeführt, der auf 350 U/Min bei 42 °C programmiert war und verblieben dort für 90 Minuten. Zwischenzeitlich wurden die 1:10 Verdünnungen vorbereitet, welche für die PCR 2.3.9 nötig sind. Es hat sich gezeigt, dass die Agentien im RT-Mix mit der PCR interferieren können, was durch die Verdünnung umgangen werden kann[12]. Dafür wurden 45 µl RNase freies Wasser verwendet. Nach Ablauf der 90 Minuten im Thermomixer und kurzer Zentrifugation wurden 5 µl des Produkts zu den erwähnten 45 µl der 1:10-Proben gegeben, sodass für jede Probe zwei verschiedene cDNA Konzentrationen existieren. Beide Produkte jeder Probe wurden bei -20 °C gelagert oder weiter bearbeitet wie im Folgenden beschrieben.

### **2.3.8 Die quantitative Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction**

Zur Analyse wurden die Proben der RT-PCR zugeführt. Bei dem dabei verwendeten System handelt es sich um das ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System der Firma Applied Biosystems bzw. Life Technologies.

Die RT-PCR stellt ein weiterentwickeltes Verfahren der ursprünglichen PCR dar. Die RT-PCR ist in der Lage die cDNA eines bestimmten Genes zu amplifizieren und es in Echtzeit zu analysieren.

Das grundlegende Prinzip bei diesem Verfahren ist das Aufspalten der DNA-Stränge und die darauffolgende messbare Vervielfältigung bestimmter Gene. Dazu wird durch die exakte Regulation der Temperaturen der Proben der Ablauf gelenkt. Zunächst wird die DNA denaturiert, also in ihre Einzelstränge zerlegt, damit sich sog. Primer, welche der strangsynthetisierenden Polymerase den Startpunkt weisen, anlagern können. Ebenfalls lagern sich im selben Schritt sog. Sonden an. Diese wiederum beinhalten einen Quencher und einen Reporter, welche sich über zur DNA bzw. RNA analogen Nukleotiden im selben Molekül befinden. Dabei stellt der Reporter einen fluoreszierenden Farbstoff dar, welcher durch Laserlicht angeregt werden kann. Entscheidend ist, dass der Quencher die Fluoreszenz des Reporters unterdrückt solange sich beide im selben Molekül befinden. Die Sonde wird so gewählt, dass sie sich innerhalb der zu amplifizierenden Sequenz befindet, sodass sie hybridisieren kann. Ist dies geschehen, trennt die Polymerase bei der Verlängerung der Primer durch die Exonukleaseaktivität den Reporter vom Quencher, worauf dann dessen induzierte Fluoreszenz gemessen werden kann. Dieser Prozess vollzieht sich in immer gleichen Zyklen. Pro Zyklus wird die Anzahl der Matrizenmoleküle verdoppelt.

Wenn nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen ein Signal gemessen wird, so gibt dies dann Rückschluss auf die Ausgangsmenge an Matrizenmolekülen.

### **2.3.9 Durchführung der Real-time quantitative RT-PCR**

Um das Risiko für Kontaminationen zu minimieren, waren die PCR-Arbeitsplätze räumlich getrennt von anderen Arbeitsplätzen. Zusätzlich war eine Abtrennung der verschiedenen Bereiche der PCR notwendig. So gab es einen separaten Bereich für Nukleinsäure-Isolierung und Vorbereitung des PCR-Reaktionsansatzes. Für die RT-PCR Untersuchungen wurde die in der Forschungsgruppe bereits etablierte Methodik wie vorbeschrieben verwendet [12, 21, 63, 84, 85, 87, 86, 88-90]. Durchgeführt wurden die Untersuchungen mit dem TaqMan ABI 7700 Sequence Detection System (PE Biosystems, Weiterstadt, Germany). Dabei wurde hitzeaktivierte Taq DNA Polymerase (Platinum® Taq DNA Polymerase; Invitrogen) aus dem Kit Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG w/ROX benutzt und nach dem entsprechenden Protokoll vorgegangen.

Den wie in 2.3.7 hergestellten Proben wurden folgende Agenzien zugesetzt:

a.	Platinum qPCR supermix-UDG with ROX	10 µl/ Probe
b.	AoD	1 µl/ Probe
c.	H <sub>2</sub> O	7 µl/ Probe

Der Algorithmus im TaqMan ABI 7700 sequence detection system beginnt initial mit einer Verweilzeit von zwei Minuten bei 50° und darauf folgenden zehn Minuten bei 95°. Daraufhin wurde der Zyklus mit 15 Sekunden bei 95° und 60 Sekunden bei 60° 40-mal durchlaufen.

Für quantitative Analysen wurde dann der cDNA-Gehalt jeder Probe mit dem cDNA-Gehalt an GAPDH in der Referenzprobe mit der  $\Delta\Delta Ct$  Methode verglichen[21]. Bei dieser Methode wird folgende Formel benutzt:  $A_0/B_0 = (1 + E)^{(Ct,B-Ct,A)}$ , wobei  $A_0$  die initiale Anzahl an Kopien der Probe A und  $B_0$  die initiale Anzahl der Kopien in Probe B darstellt[12].  $Ct,B$  und  $Ct,A$  stehen jeweils für den Thresholdzyklus von Probe A und B. E steht in diesem Zusammenhang für die Effizienz der Amplifikation. Da die Ergebnisse innerhalb der Experimente in einem Durchlauf erhoben worden sind, gilt  $E=1$ . In dieser Arbeit wird hGAPDH als B verwendet, sodass nach der oben genannten Formel gilt  $A_0/B_0=2^{(\Delta Ct)}$  das Verhältnis der ursprünglichen Anzahl der Kopien zwischen einem zu prüfenden Gen und hGAPDH also gleich  $2^{(\Delta Ct)}$  ist. Im Ergebnisteil 3 werden die entsprechenden quantitativen Angaben nach diesem Verfahren angegeben.

### 2.3.10 Statistische Auswertung

Alle Resultate sind in Bezug auf Signifikanz getestet worden. Dafür wurden die Werte als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Zum Vergleich von Gruppen wurde der homoskedastische, zweiseitige, Student'sche T-Test verwendet. Als signifikant wurden Ergebnisse mit  $p < 0,05$  betrachtet, während Resultate mit  $p < 0,01$  als hochsignifikant erachtet wurden. In Balkendiagrammen wurde  $p < 0,05$  durch \* und  $p < 0,01$  durch \*\* illustriert. Die statistischen Tests wurden mit Hilfe von Microsoft® Excel Professional Academic 2010 durchgeführt.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Expression der Toll-like-Rezeptoren, RIG-1 und MDA-5 als Erkennungsrezeptoren für virale Nukleotidsequenzen auf HMEC-Zellen**

Da Endothelzellen nicht nur vielen inflammatorischen Einflüssen ausgesetzt sondern auch darin involviert sein können, untersuchten wir, ob und welche TLRs nach 24 Stunden durch Stimulation mit Zytokinen exprimiert werden. Dazu wurde noch die Expression der Helikasen RIG-1 und MDA-5 wegen ihrer Rolle als weitere virale RNA Rezeptoren gemessen.

HMEC-1 exprimieren mRNA für TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR6, TLR-7, TLR-9, RIG-1 und MDA-5, während für TLR-8 und TLR-10 weder eine Expression unter basalen noch unter stimulierten Konditionen messbar war. Die verwendeten Zytokine, welche in der Vorbereitung des Experiments genauer beschrieben sind, führten zu einem hochsignifikanten Anstieg des Verhältnisses zwischen der mRNA von TLR-2, TLR-3, RIG-1 und MDA-5 bezogen auf GAPDH nach 24 Stunden, was in Abbildung 5 und 6 dargestellt ist. Des Weiteren war bei der HMEC-1 eine Expression von TLR-5 und TLR-7 allein unter stimulierten Konditionen messbar. Es stellte sich zudem heraus, dass der Anstieg von mRNA für TLR-9 nach Stimulation nicht signifikant ist. Daneben zeigte sich die Tendenz der Runterregulation der Expression von TLR-6 nach 24 Stunden der Stimulation, wie in Abbildung 5 dargestellt. Dabei stellte sich dieser Zusammenhang jedoch als statistisch nicht signifikant dar. Ebenfalls nicht signifikant sind die Effekte nach Stimulation auf die Expression von TLR-4 und TLR-9. Dabei zeigte sich ein tendenzieller Anstieg der Expression für TRL9 unter Stimulation sowie die Tendenz zur Runterregulation von TRL-4 unter Stimulation, was in Abbildung 5 illustriert ist. Die Untersuchung am TLR-1 ergab kein signifikantes Ergebnis.

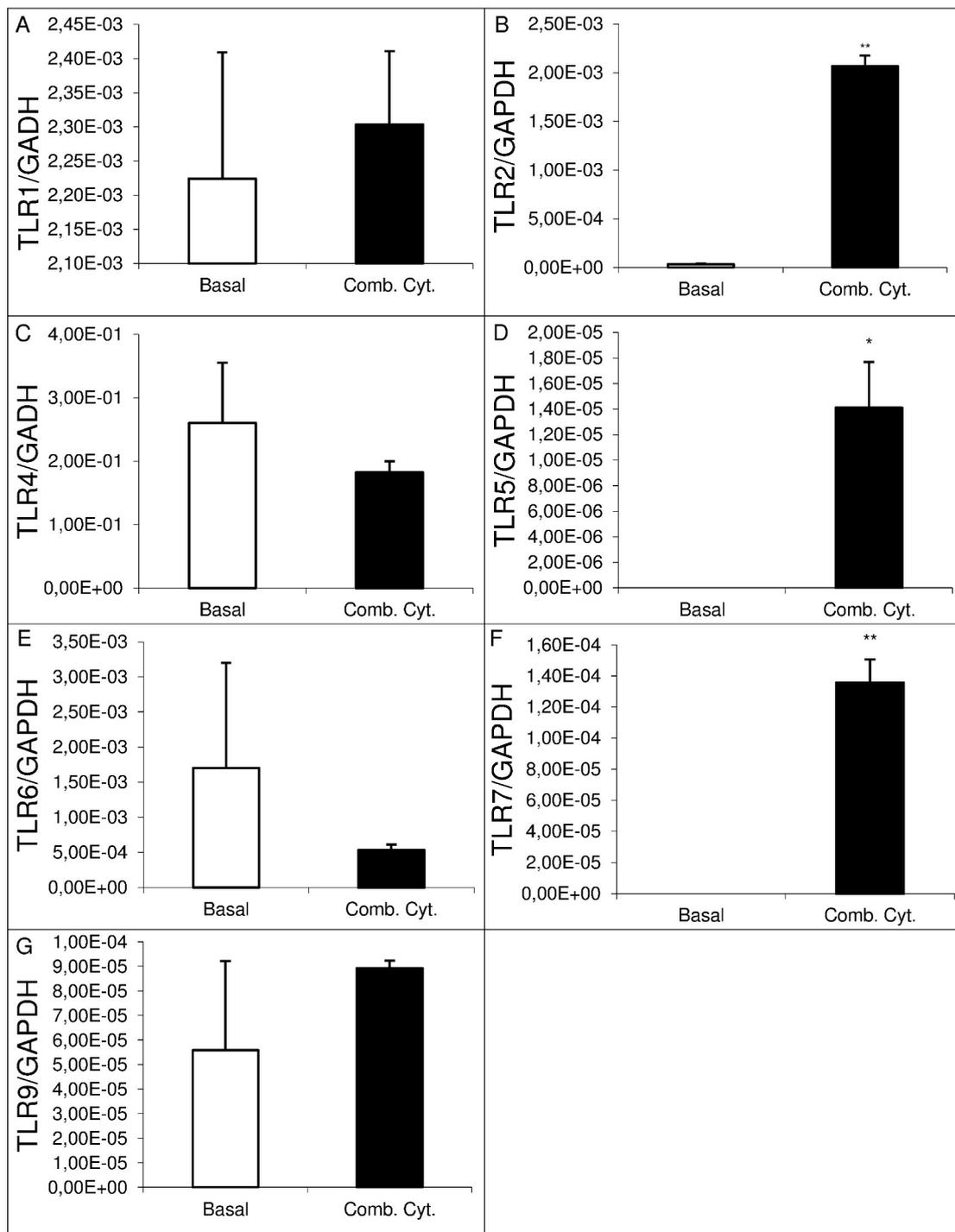


Abbildung 5: Expression der Toll-like-Rezeptoren auf HMEC-Zellen

HMEC-1-Zellen wurden unter Standardbedingungen oder nach 24-stündiger Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen (25 ng/ml TNF  $\alpha$ , 10 ng/ml IL1- $\beta$  sowie 20 ng/ml INF  $\gamma$ ) kultiviert. Anschließend wurde die RNA extrahiert und wie unter 2.3.7-2.3.10 beschrieben mittels RT-PCR und Primern für folgende Rezeptoren analysiert:

**A** TLR-1 Expression auf HMEC-1 mit tendenziellem Anstieg nach 24-stündiger Stimulation **B** TLR-2-Expression bei HMEC-1 mit hochsignifikantem Anstieg unter 24-stündiger Stimulation **C** TLR-4-Expression bei HMEC-1 mit tendenzieller Runterregulation nach 24-stündiger Stimulation **D** TLR-5-Expression bei HMEC-1 mit nicht messbarer Expression in der Basalkondition **E** TLR-6-Expression bei HMEC-1 mit tendenzieller Runterregulation nach 24-stündiger Stimulation **F** TLR-7-Expression bei HMEC-1 mit hochsignifikantem Anstieg unter 24-stündiger Stimulation **G** TLR-9-Expression bei HMEC-1 mit tendenziellem Anstieg nach 24-stündiger Stimulation. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus zwei unterschiedlichen Experimenten angegeben. Die Werte der Ordinaten entsprechen den jeweiligen  $2(\Delta Ct)$ -Werten. (\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,05$  und \*\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,01$ )

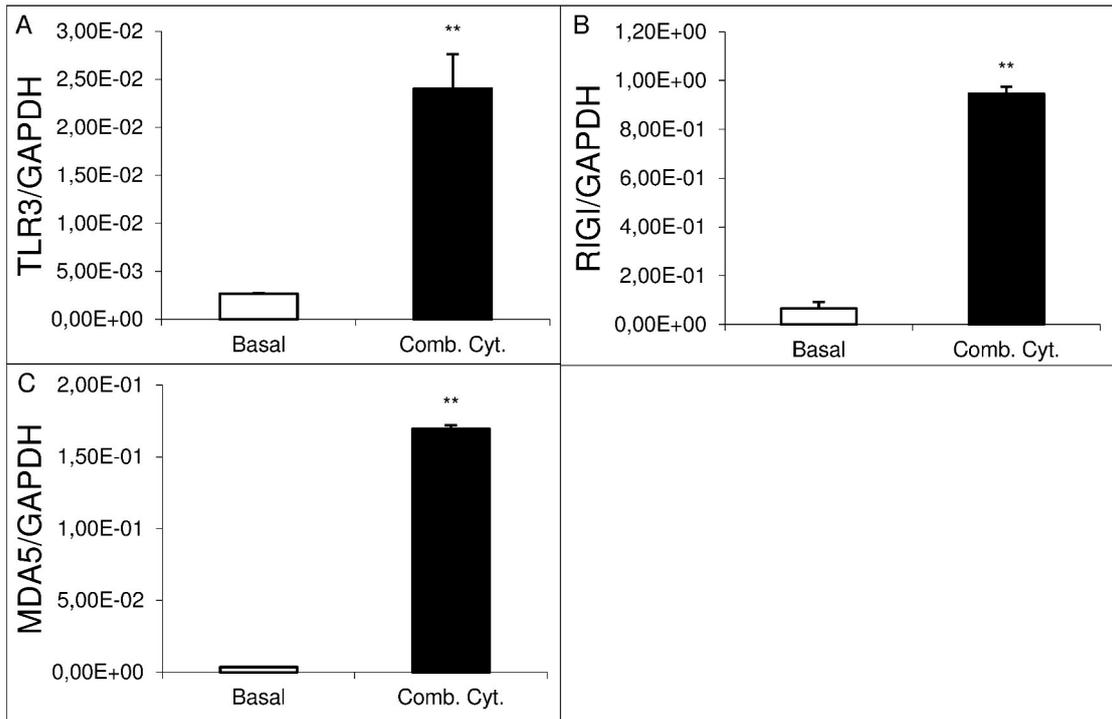


Abbildung 6: Expression von TLR-3, RIG-1 und MDA-5 als Erkennungsrezeptoren für virale Nukleotidsequenzen auf HMEC-Zellen

HMEC-1-Zellen wurden unter Standardbedingungen oder nach 24-stündiger Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen (25 ng/ml TNF  $\alpha$ , 10 ng/ml IL1- $\beta$  sowie 20 ng/ml INF  $\gamma$ ) kultiviert. Anschließend wurde die RNA extrahiert und wie unter 2.3.7-2.3.10 beschrieben mittels RT-PCR und Primern für folgende Rezeptoren analysiert:

**A** TLR-3-Expression bei HMEC-1 mit hochsignifikantem Anstieg unter 24-stündiger Stimulation mit signifikanter Hochregulation **B** RIG-1-Expression bei HMEC-1 mit hochsignifikantem Anstieg unter 24-stündiger Stimulation. **C** MDA-5-Expression bei HMEC-1 mit hochsignifikantem Anstieg unter 24-stündiger Stimulation. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus zwei unterschiedlichen Experimenten angegeben. Die Werte der Ordinaten entsprechen den jeweiligen 2( $\Delta$ Ct)-Werten. (\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,05$  und \*\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,01$ )

### **3.2 Expression der Toll-like-Rezeptoren, MDA-5, RIG-1, Chemokinen, Zytokinen und Adhäsionsmolekülen bei zeitabhängiger Stimulation durch poly(I:C)**

Nachdem demonstriert werden konnte, dass HMEC-1 ohne bzw. nach der oben beschriebenen Induktion TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-6, TLR-7, TLR-8, IL-6, MDA-5 und RIG-1 exprimiert, sollte der Zeitpunkt der höchsten Expression dieser Rezeptoren also der geeignetste Zeitpunkt für weitere Experimente gefunden werden. Zudem wurde die Expression weiterer Gene untersucht. Um die Expression der verschiedenen inflammatorischen Proteine über verschiedene Zeiträume bis maximal 48 Stunden der Stimulation mit poly(I:C) zu eruieren, wurde dieses Experiment durchgeführt und anschließend mittels RT-PCR ausgewertet. Dafür wurden die Primer für TLR-3, IL-6, IL-8, MDA-5, RIG-1, INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , VCAM-1, ICAM-1, TNF  $\alpha$ , MCP-1, RANTES, MCSF, TNF R1, TNF R2 sowie GAPDH verwendet und nach  $\Delta\Delta C_t$  Methode in Relation mit GAPDH gebracht.

Die Evaluation von TLR-3 in Relation mit GAPDH zeigte nach 12 Stunden nicht nur einen hochsignifikanten Anstieg im Vergleich zur basalen Kondition, sondern es stellte sich auch eine signifikante Hochregulation der Expression verglichen mit den sechs und neun Stunden mit poly(I:C) stimulierten Konditionen dar, was in Abbildung 7 dargestellt ist. Innerhalb der Gruppe der stimulierten Zellen wurde eine signifikant niedrigere Expression von mRNA für TLR-3 nach 48 Stunden der Stimulation im Vergleich mit zwölf Stunden der Stimulation festgestellt. Ein weiterer hochsignifikanter Anstieg der Expression in der stimulierten Kondition, verglichen mit der Basalkondition, wurde nach 24 Stunden gefunden. Nach 48 Stunden der Stimulation war kein signifikanter Effekt zwischen der stimulierten und der nicht stimulierten Kondition zu messen ( $p = 0,169$ ). Bei der nicht stimulierten bzw. basalen Expression hat sich die Verminderung der Expression von mRNA für TLR-3 von drei zu sechs Stunden und die folgende Steigerung zu neun Stunden als signifikant herausgestellt. Dabei zeigt sich für TLR-3 unter stimulierten Konditionen tendenziell, jedoch nicht signifikant, die höchste Expression nach zwölf Stunden. Daneben konnte eine Tendenz zu einem Anstieg der TLR-3 Expression über 48 Stunden in der basalen Kondition gefunden werden.

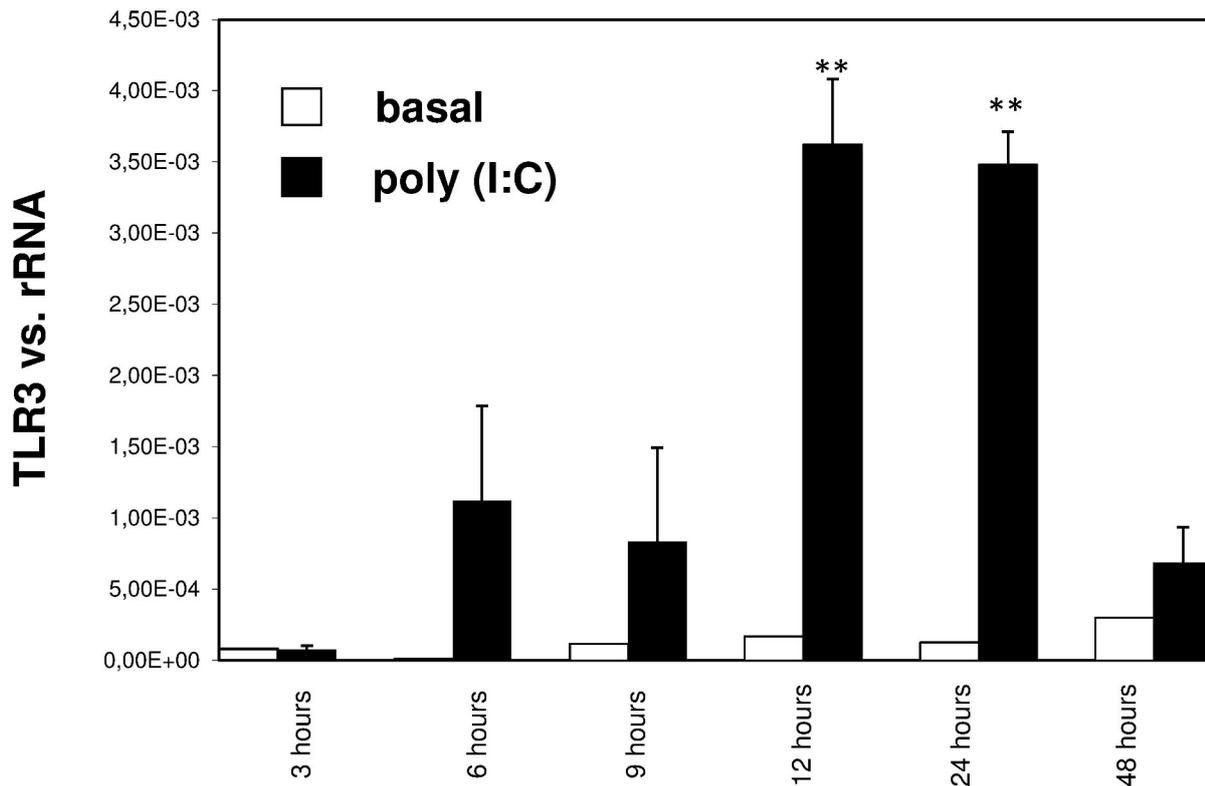


Abbildung 7: Expression von TLR-3 bei zeitabhängiger Stimulation durch poly(I:C) HMEC-1-Zellen wurden unter Standardbedingungen 24 Stunden kultiviert, anschließend mit PBS gewaschen und weiter unter Standardbedingungen kultiviert oder mit 10  $\mu$ g/ml poly(I:C) inkubiert. Nach den Intervallen 3, 6, 9, 12, 24 und 48 Stunden wurde die RNA extrahiert und wie unter 2.3.7-2.3.10 beschrieben mittels RT-PCR und dem Primer für TLR-3 analysiert: Dabei wurde zu den Zeitpunkten 12 und 24 Stunden der Stimulation ein hochsignifikanter Anstieg der Expression im Vergleich zur Basalkondition gefunden. Der Zeitpunkt der höchsten Expression unter Stimulation war nach 12 Stunden zu finden. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus zwei unterschiedlichen Experimenten angegeben. Die Werte der Ordinaten entsprechen den jeweiligen  $2(\Delta$ Ct)-Werten. (\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,05$  und \*\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,01$ )

Was die Expression von mRNA in HMEC-1 von RIG-1 in Relation mit GAPDH betrifft, so wurde hier nach drei, zwölf und 24 Stunden der Stimulation im Vergleich zur Basalkondition ein mindestens signifikanter Anstieg gefunden. Die Kaskade, in der die Expression von RIG-1 innerhalb der stimulierten Konditionen, die von zwölf über 24 bis 48 Stunden nach Stimulationsbeginn in der Expression abnimmt bzw. absteigt, erwies sich ebenfalls als signifikant (Abbildung 8). Es hat sich mit Signifikanz herausgestellt, dass der Effekt nach einer Stimulation von 12 Stunden am größten ist. Nach 48 Stunden war kein signifikanter Effekt durch Stimulation gegenüber der basalen Kondition nachweisbar ( $p = 0,498$ ). Bezüglich der nicht stimulierten bzw. basalen Expression hat sich die Verminderung von drei zu sechs

Stunden als signifikant erwiesen. Im Verlauf hat sich kein signifikanter Effekt innerhalb der Basalkonditionen gezeigt.

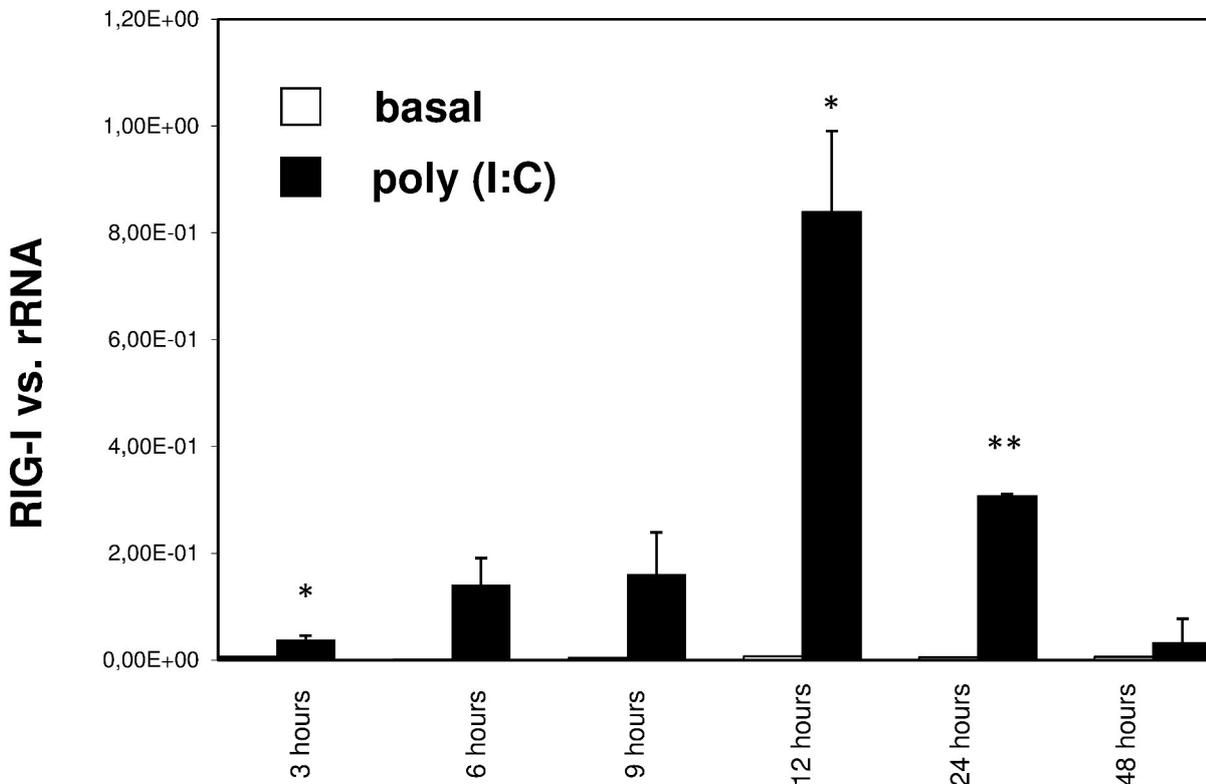


Abbildung 8: Expression von RIG-1 bei zeitabhängiger Stimulation durch poly(I:C) HMEC-1-Zellen wurden unter Standardbedingungen 24 Stunden kultiviert anschließend mit PBS gewaschen und weiter unter Standardbedingungen kultiviert oder mit 10 µg/ml poly(I:C) inkubiert. Nach den Intervallen 3, 6, 9, 12, 24 und 48 Stunden wurde die RNA extrahiert und wie unter 2.3.7-2.3.10 beschrieben mittels RT-PCR und dem Primer für RIG-1 analysiert. Dabei wurde zu den Zeitpunkten 3, 12 und 24 Stunden der Stimulation ein signifikanter Anstieg der Expression im Vergleich zur Basalkondition gefunden. Der Zeitpunkt der höchsten Expression unter Stimulation war nach 12 Stunden zu finden. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung aus zwei unterschiedlichen Experimenten angegeben. Die Werte der Ordinaten entsprechen den jeweiligen 2(ΔCt)-Werten. (\* über Balken markiert Entwicklung mit p<0,05 und \*\* über Balken markiert Entwicklung mit p<0,01)

In Analogie zur Expression von RIG-1 wurde in Bezug auf Expression von MDA-5 an den HMEC-1 unter den Kondition der Stimulation mit 10 µg/ml poly(I:C) getestet. Durch Stimulation wurde nach drei, neun, zwölf, 24 und 48 Stunden eine mindestens signifikante Steigerung der Expression von MDA-5 gefunden. Dabei ist nach zwölf Stunden Stimulation die Expression im Vergleich zu drei, sechs, neun und 48 Stunden Stimulation ebenfalls signifikant gesteigert. Tendenziell findet sich auch bei der Expression von MDA-5 ein Maximum der Expression nach 12 Stunden. Im Gegensatz zu RIG-1 und TLR-3 ist bei MDA-5 nach 48 Stunden noch immer eine signifikante Steigerung zur basalen Kondition sichtbar.

Betreffend der Expression von MDA5 konnte keine Tendenz zum Anstieg in den Basalkonditionen über den Untersuchungszeitraum beobachtet werden (Abbildung 9).

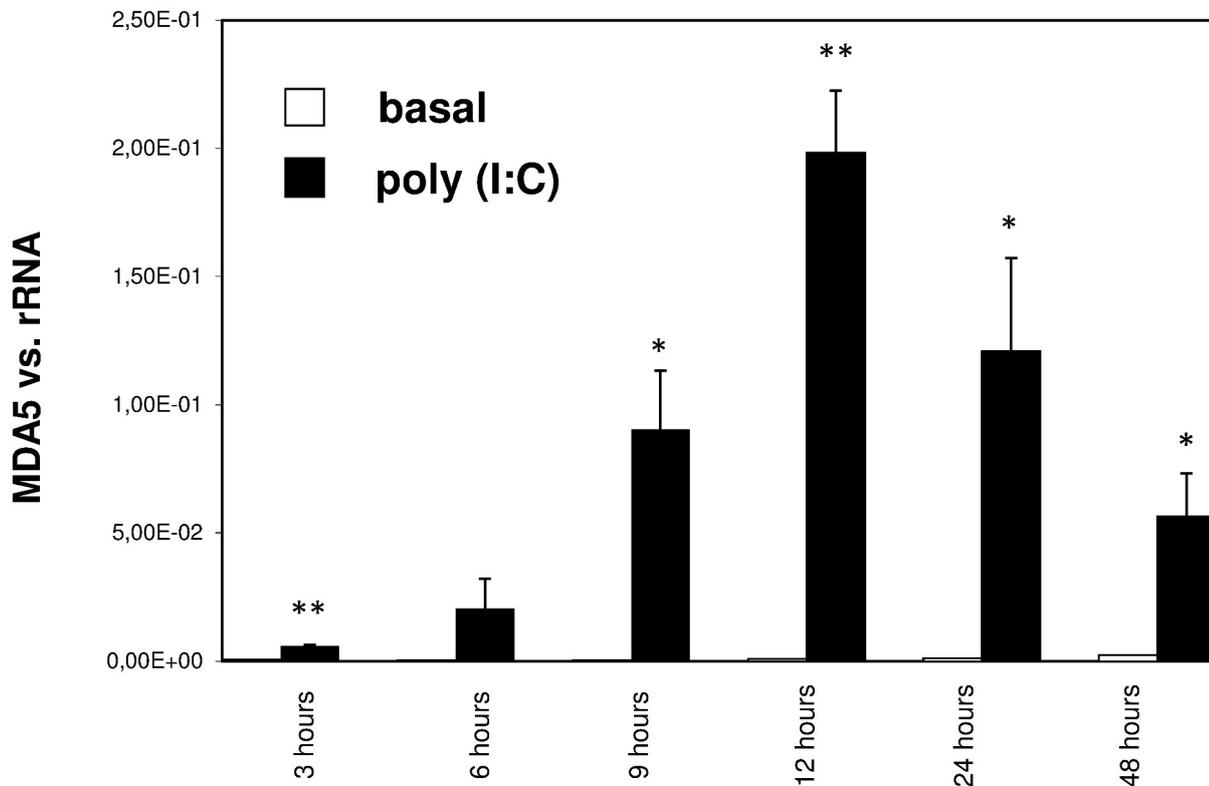


Abbildung 9: Expression von MDA-5 bei zeitabhängiger Stimulation durch poly(I:C) HMEC-1-Zellen wurden unter Standardbedingungen 24 Stunden kultiviert anschließend mit PBS gewaschen und weiter unter Standardbedingungen kultiviert oder mit 10  $\mu$ g/ml poly(I:C) inkubiert. Nach den Intervallen 3, 6, 9, 12, 24 und 48 Stunden wurde die RNA extrahiert und wie unter 2.3.7-2.3.10 beschrieben mittels RT-PCR und dem Primer für MDA-5 analysiert. Dabei wurde zu den Zeitpunkten 3, 9, 12, 24 und 48 Stunden der Stimulation ein signifikanter Anstieg der Expression im Vergleich zur Basalkondition gefunden. Der Zeitpunkt der höchsten Expression unter Stimulation war nach 12 Stunden zu finden. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus zwei unterschiedlichen Experimenten angegeben. Die Werte der Ordinaten entsprechen den jeweiligen 2( $\Delta$ Ct)-Werten. (\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,05$  und \*\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,01$ )

Im genannten Zusammenhang hat sich herausgestellt, dass nach 12 Stunden der stärkste Anstieg der Expression der meisten gemessenen, inflammatorischen Proteine erfassbar war, wobei die Messung von INF- $\beta$  eine Ausnahme darstellt.

Im Folgenden werden nun zunächst die inflammatorischen Antworten der Zellen gezeigt.

Die Expression von INF- $\beta$  ist im Vergleich zu den Basalkonditionen zu den Messzeitpunkten 3, 6, 9 und 12 Stunden signifikant gesteigert. Zwischen den stimulierten Konditionen nach 3, 6, 9, 12 Stunden konnte kein signifikanter Effekt gezeigt werden, wobei der Effekt der Stimulation tendenziell nach 3 Stunden am größten ist.

Nach 24 und 48 Stunden fand sich kein Effekt durch poly(I:C). Zwischen den einzelnen Basalkonditionen hat sich ebenfalls kein Effekt ergeben. Die Entwicklung der Expression von INF- $\beta$  ist in Abbildung 10 dargestellt.

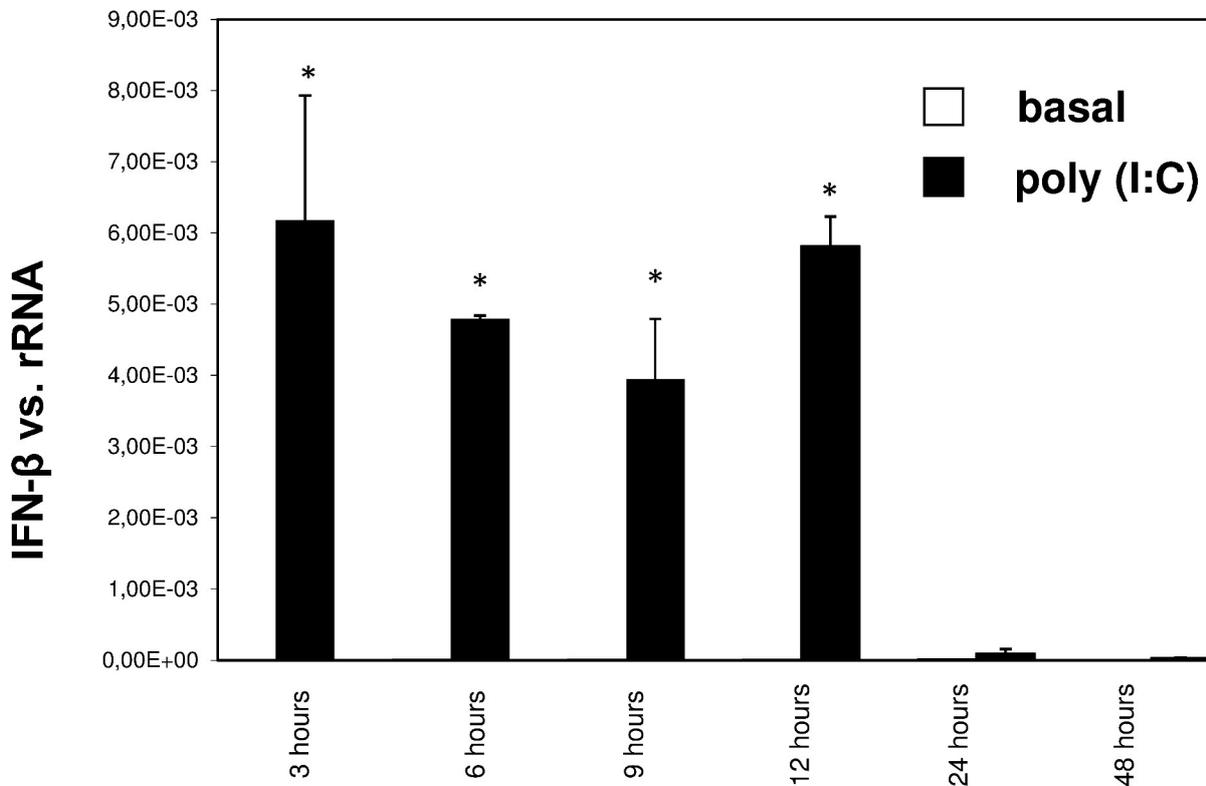


Abbildung 10: Expression von INF- $\beta$  bei zeitabhängiger Stimulation durch poly(I:C)

HMEC-1-Zellen wurden unter Standardbedingungen 24 Stunden kultiviert anschließend mit PBS gewaschen und weiter unter Standardbedingungen kultiviert oder mit 10  $\mu$ g/ml poly(I:C) inkubiert. Nach den Intervallen 3, 6, 9, 12, 24 und 48 Stunden wurde die RNA extrahiert und wie unter 2.3.7-2.3.10 beschrieben mittels RT-PCR und dem Primer für INF- $\beta$  analysiert. Dabei wurden zu den Zeitpunkten 3, 6, 9 und 12 Stunden der Stimulation ein signifikanter Anstieg der Expression im Vergleich zur Basalkondition gefunden. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus zwei unterschiedlichen Experimenten angegeben. Die Werte der Ordinaten entsprechen den jeweiligen 2( $\Delta$ Ct)-Werten. (\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,05$  und \*\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,01$ )

HMEC-1 exprimieren als inflammatorische Antwort IL-6 und IL-8. Im Zuge der Untersuchung der inflammatorischen Antworten von HMEC-1 wurde auch die Expression der mRNA von IL-6 und IL-8 unter den Konditionen dieses Experiments gemessen. Dabei wurde für IL-6 für jeden Zeitpunkt, außer nach 48 Stunden, ein solider signifikanter Anstieg der Expression unter stimulierten Konditionen im Vergleich zur basalen Kondition gefunden. Im Weiteren zeigt sich eine tendenzielle Steigerung der Expression von IL-6 zwischen den stimulierten Zeitpunkten von drei bis zwölf Stunden und ein darauf folgender Abstieg von zwölf Stunden bis 48 Stunden, wobei sich zu diesen Zeitpunkt kein Effekt zur Basalkondition feststellen ließ. Auch für IL-6 zeigt sich das Maximum der Expression bei der Probe nach zwölf Stunden

(Abbildung 11). Eine Tendenz zum Anstieg der Expression von IL-6 im Verlauf innerhalb der Probe mit basalen Konditionen ließ sich nicht darstellen.

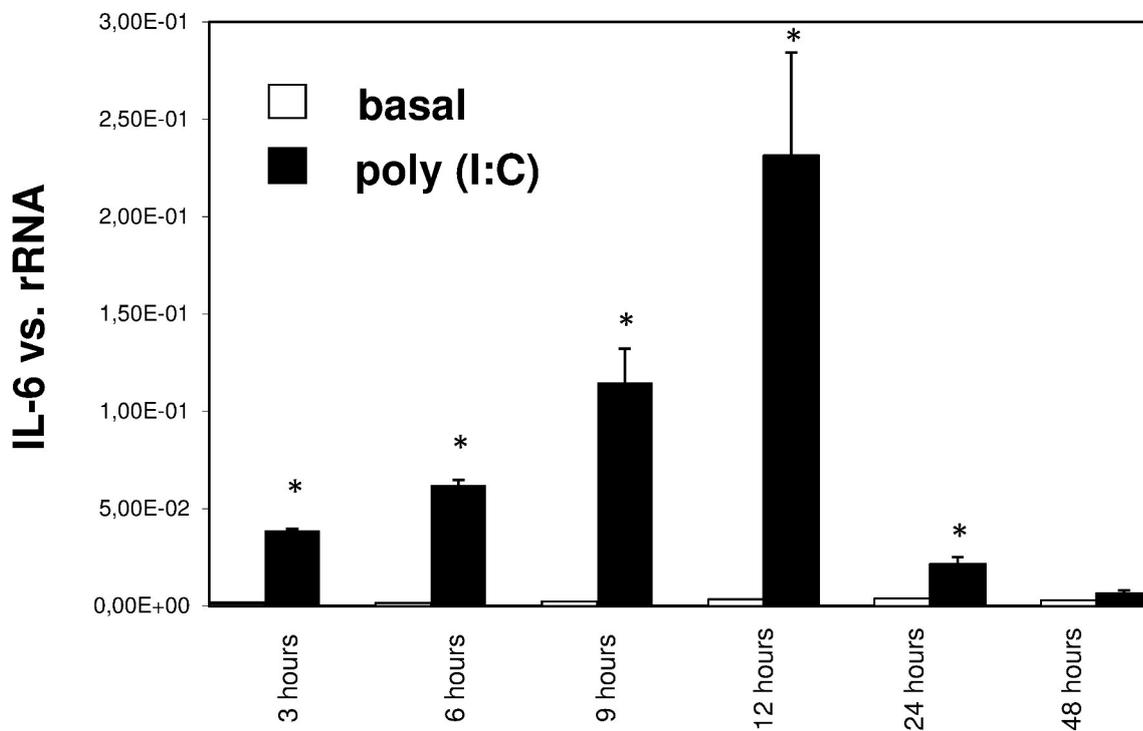


Abbildung 11: Expression von IL-6 bei zeitabhängiger Stimulation durch poly(I:C) HMEC-1-Zellen wurden unter Standardkonditionen 24 Stunden kultiviert anschließend mit PBS gewaschen und weiter unter Standardkonditionen kultiviert oder mit 10 µg/ml poly(I:C) inkubiert. Nach den Intervallen 3, 6, 9, 12, 24 und 48 Stunden wurde die RNA extrahiert und wie unter 2.3.7-2.3.10 beschrieben mittels RT-PCR und dem Primer für IL-6 analysiert. Dabei wurden zu den Zeitpunkten 3, 6, 9 und 12 Stunden der Stimulation ein signifikanter Anstieg der Expression im Vergleich zur Basalkondition gefunden. Der Zeitpunkt der höchsten Expression unter Stimulation war nach 12 Stunden zu finden. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung aus zwei unterschiedlichen Experimenten angegeben. Die Werte der Ordinate entsprechen den jeweiligen 2(ΔCt)-Werten. (\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,05$  und \*\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,01$ )

Das Verhalten der Expression von IL-8 ist mit dem von IL-6 vergleichbar. In diesem Experiment waren die Effekte zwischen den basalen und stimulierten Konditionen für IL-8 zu jedem Zeitpunkt, außer nach 48 Stunden ( $p = 0,07$ ), mindestens signifikant. Jeder Effekt zwischen den einzelnen Zeitpunkten der stimulierten Konditionen bei IL-8 hat sich als mindestens signifikant erwiesen. Die Entwicklung über die Zeitpunkte ist in Abbildung 12 illustriert. Dabei war nach drei Stunden eine Heraufregulierung der Expression von IL-8 zu beobachten, dann eine Abnahme zu sechs Stunden mit folgendem Anstieg über neun Stunden bis zum Zeitpunkt der höchsten Expression nach zwölf Stunden nach Stimulation, welchem schließlich dann eine finale Abnahme der Expression bis zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Stimulation folgte, zu dem kein signifikanter Effekt zur basalen Kondition mehr

aufgezeigt werden kann. Neben den genannten Effekten waren bei den basalen Konditionen keine signifikanten Effekte gegenüber den vorherigen Zeitpunkten festzustellen.

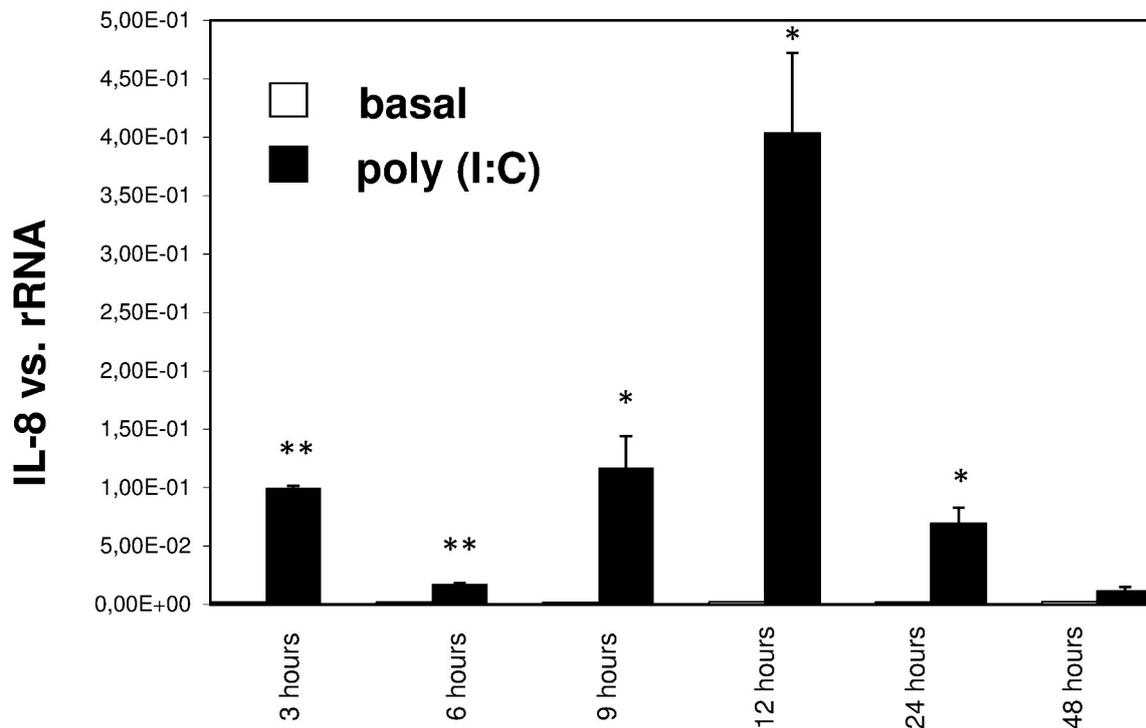


Abbildung 12: Expression von IL-8 bei zeitabhängiger Stimulation durch poly(I:C)

HMEC-1-Zellen wurden unter Standardkonditionen 24 Stunden kultiviert anschließend mit PBS gewaschen und weiter unter Standardkonditionen kultiviert oder mit 10  $\mu$ g/ml poly(I:C) inkubiert. Nach den Intervallen 3, 6, 9, 12, 24 und 48 Stunden wurde die RNA extrahiert und wie unter 2.3.7-2.3.10 beschrieben mittels RT-PCR und dem Primer für IL-8 analysiert. Dabei wurden zu den Zeitpunkten 3, 6, 9, 12 und 24 Stunden der Stimulation ein mindestens signifikanter Anstieg der Expression im Vergleich zur Basalkondition gefunden. Der Zeitpunkt der höchsten Expression unter Stimulation war nach 12 Stunden zu finden. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus zwei unterschiedlichen Experimenten angegeben. Die Werte der Ordinaten entsprechen den jeweiligen 2( $\Delta$ Ct)-Werten. (\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,05$  und \*\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,01$ )

Die Messung von TNF- $\alpha$  als inflammatorische Antwort ergab tendenziell ebenfalls zum Zeitpunkt nach zwölf Stunden der Stimulation die höchste Expression. Der Messwert nach drei Stunden der Stimulation war statistisch signifikant (Abbildung 13). Zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden nach Stimulation wurden deutlich niedrige 2( $\Delta$ Ct)-Werte und keine Effekte im Vergleich zu den Basalkonditionen gefunden. Ebenso wurden innerhalb der Basalkonditionen in diesem Experiment keine Effekte auf die TNF- $\alpha$  Expression beobachtet. Bis zu dem Zeitpunkt nach 12 Stunden waren in einigen der Basalkonditionen keine Expression von TNF- $\alpha$  bestimmbar.

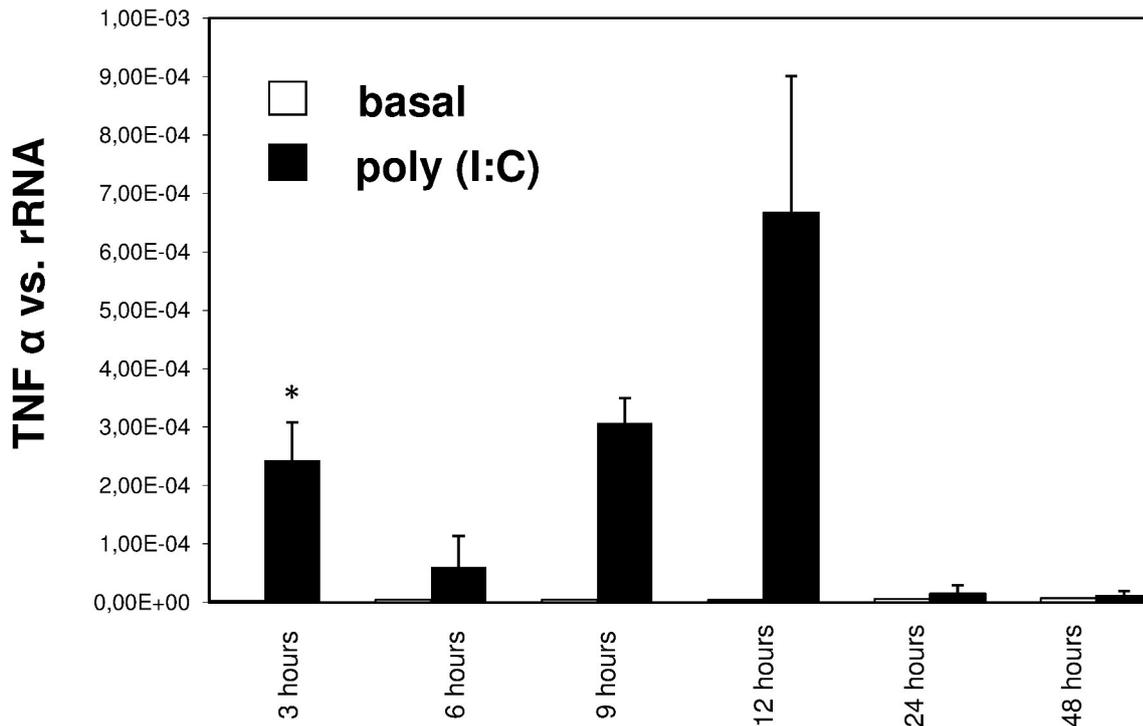


Abbildung 13: Expression von TNF- $\alpha$  bei zeitabhängiger Stimulation durch poly(I:C)

HMEC-1-Zellen wurden unter Standardbedingungen 24 Stunden kultiviert anschließend mit PBS gewaschen und weiter unter Standardbedingungen kultiviert oder mit 10  $\mu\text{g/ml}$  poly(I:C) inkubiert. Nach den Intervallen 3, 6, 9, 12, 24 und 48 Stunden wurde die RNA extrahiert und wie unter 2.3.7-2.3.10 beschrieben mittels RT-PCR und dem Primer für TNF- $\alpha$  analysiert. Dabei wurde 3 Stunden nach Stimulation ein signifikanter Anstieg der Expression im Vergleich zur Basalkondition gefunden. Der Zeitpunkt der höchsten Expression unter Stimulation war nach 12 Stunden zu finden. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus zwei unterschiedlichen Experimenten angegeben. Die Werte der Ordinaten entsprechen den jeweiligen  $2(\Delta\text{Ct})$ -Werten. (\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,05$  und \*\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,01$ )

Als weitere inflammatorische Antwort wurde das Chemokin RANTES (CLL5) gemessen. Für dieses Gen konnte bis auf den Zeitpunkt 48 Stunden nach Stimulation zu jedem anderen Zeitpunkt des Experiments eine statistisch relevante Überexpression von RANTES in HMEC-1 gefunden werden. Ferner zeigte sich von drei über sechs und neun bis zwölf Stunden nach Stimulation ein tendenzieller Anstieg der Expression mit einem darauf folgendem Abstieg. Bei der Expression von RANTES wurde nach zwölf Stunden ebenfalls der höchste Wert gefunden. Auch bei der Expression von RANTES zeigten sich keine relevanten statistischen Effekte zwischen den Basalkonditionen. Die Ergebnisse dieses Experiments werden in Abbildung 14 gezeigt.

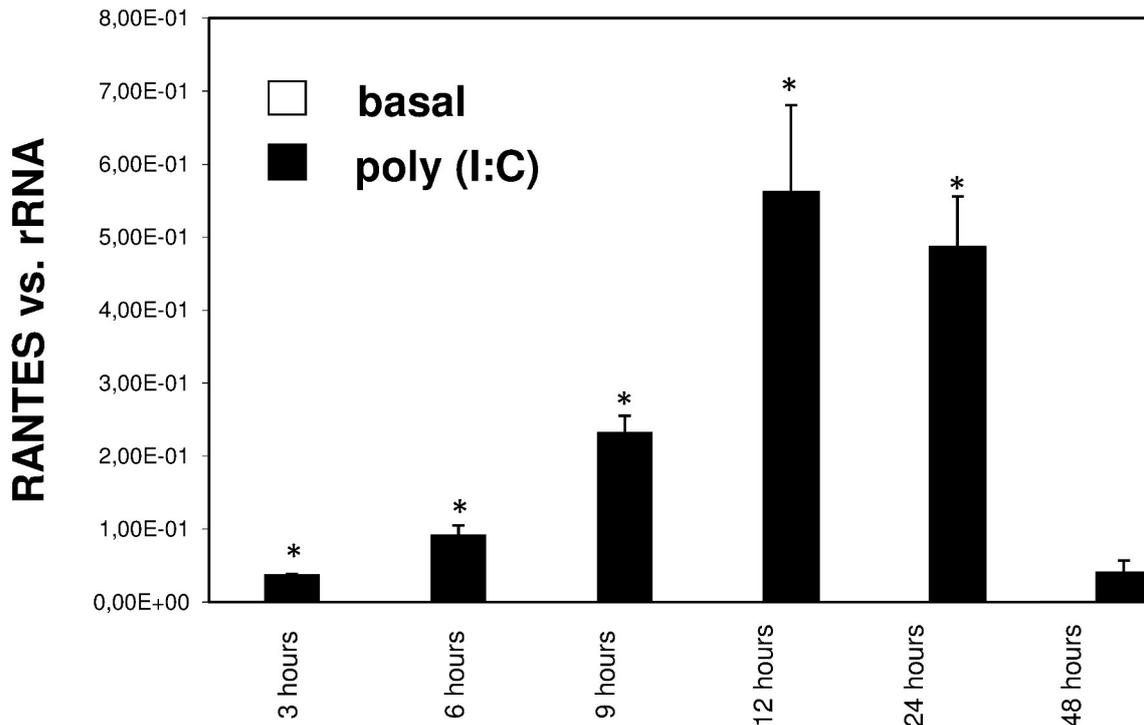


Abbildung 14: Expression von RANTES bei zeitabhängiger Stimulation durch poly(I:C)

HMEC-1-Zellen wurden unter Standardbedingungen 24 Stunden kultiviert anschließend mit PBS gewaschen und weiter unter Standardbedingungen kultiviert oder mit 10 µg/ml poly(I:C) inkubiert. Nach den Intervallen 3, 6, 9, 12, 24 und 48 Stunden wurde die RNA extrahiert und wie unter 2.3.7-2.3.10 beschrieben mittels RT-PCR und dem Primer für RANTES analysiert. Dabei wurde zu allen Zeitpunkten, bis auf 48 Stunden nach Stimulation, ein signifikanter Anstieg der Expression im Vergleich zur Basalkondition gefunden. Der Zeitpunkt der höchsten Expression unter Stimulation war nach 12 Stunden zu finden. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung aus zwei unterschiedlichen Experimenten angegeben. Die Werte der Ordinaten entsprechen den jeweiligen 2(ΔCt)-Werten. (\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,05$  und \*\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,01$ )

Im Rahmen der inflammatorischen Antwort der HMEC-1-Zellen wurde ebenfalls das Chemokin MCP-1 oder CLL-2 gemessen. Dabei fand sich bis auf den Zeitpunkt 24 Stunden nach Stimulation zu jedem anderen Zeitpunkt ein statistisch relevanter Effekt der Expression des Genes im Vergleich zur Basalkondition. Nach 48 Stunden ist die Expression von MCP-1 in der Basalkondition höher als in der stimulierten Probe. Die höchste Expression wurde nach 12 Stunden gemessen. Nach drei Stunden der Stimulation wurde als nicht signifikanter Effekt ein höherer 2(ΔCt)-Wert gefunden als nach sechs Stunden. Darauf folgte ein tendenzieller Anstieg bis zum Stimulationszeitpunkt 12 Stunden. Zu den folgenden Zeitpunkten nahm die Expression von MCP-1 sukzessiv ab(vgl. Abb. 15). Die Expression von MCP-1 innerhalb der Basalkonditionen stiegen vom Zeitpunkt neun Stunden nach Stimulation bis 48 Stunden stetig an, wobei die Effekte zwischen den Proben statistisch nicht signifikant sind.

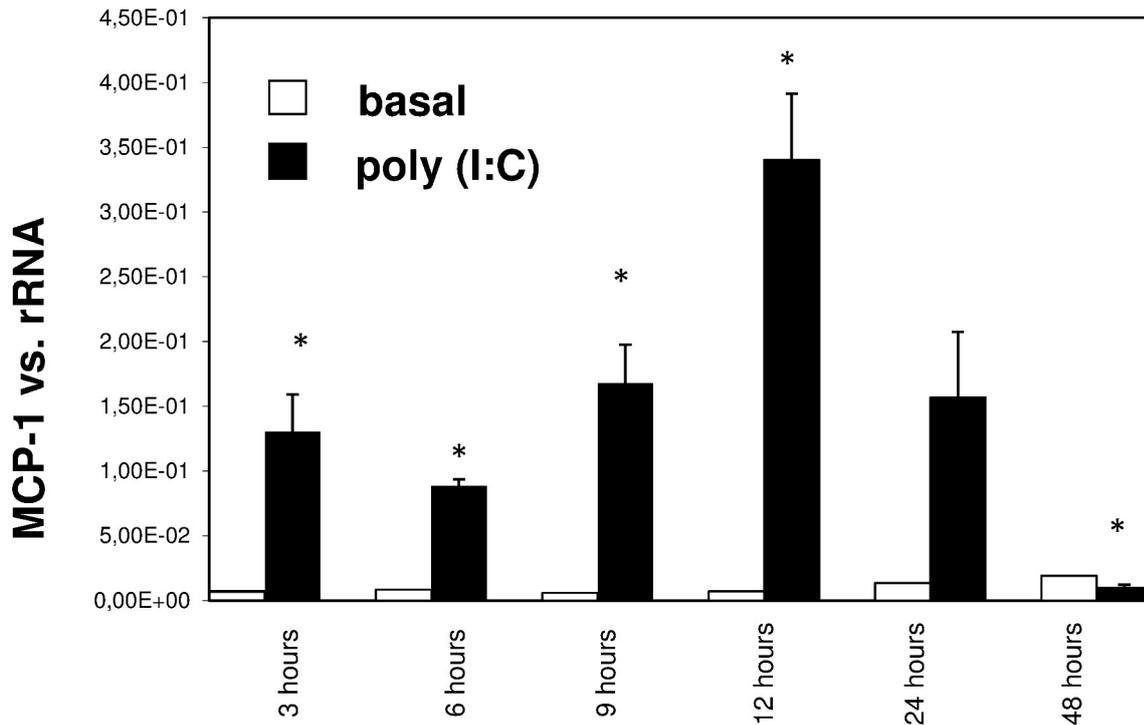


Abbildung 15: Expression von MCP-1 bei zeitabhängiger Stimulation durch poly(I:C)  
HMEC-1-Zellen wurden unter Standardbedingungen 24 Stunden kultiviert anschließend mit PBS gewaschen und weiter unter Standardbedingungen kultiviert oder mit 10 µg/ml poly(I:C) inkubiert. Nach den Intervallen 3, 6, 9, 12, 24 und 48 Stunden wurde die RNA extrahiert und wie unter 2.3.7-2.3.10 beschrieben mittels RT-PCR und dem Primer für MCP-1 analysiert. Dabei wurden zu den Zeitpunkten 3, 6, 9 und 12 Stunden der Stimulation signifikanter Anstieg der Expression im Vergleich zur Basalkondition gefunden. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung aus zwei unterschiedlichen Experimenten angegeben. Die Werte der Ordinaten entsprechen den jeweiligen 2(ΔCt)-Werten. (\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,05$  und \*\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,01$ )

Als weiteres Zytokin im Zuge der inflammatorischen Antwort wurde MCSF (Macrophage colony-stimulating factor) gemessen. Zu jedem Zeitpunkt der Stimulation zeigte sich eine mindestens signifikante Überexpression des Zytokins. Wobei die 2(ΔCt)-Werte von drei über sechs und neun Stunden bis 12 Stunden, dem Zeitpunkt nach Stimulation mit dem höchsten 2(ΔCt)-Wert, sukzessiv anstiegen. In den folgenden stimulierten Proben nahm die Expression von MCSF kontinuierlich ab. Die Entwicklung der Ergebnisse wird in Abbildung 16 illustriert.

Zusätzlich zu den genannten inflammatorischen Proteinen wurde, wegen ihrer Rolle bei Entzündungsreaktionen, die Expression von ICAM-1 und V-CAM-1 gemessen, sowie deren Verhalten über 48 Stunden unter basalen und stimulierten Konditionen, wobei die Ergebnisse in Abbildung 17 dargestellt sind. Für beide Proteine gibt es eine basale Expression der mRNA in HMEC-1, welche nach Stimulation durch poly(I:C) hochreguliert werden kann. Die Expression von VCAM-1 zeigte zu jedem Zeitpunkt des Experiments, außer nach 48

Stunden, einen signifikanten Anstieg in den stimulierten Bedingungen gegenüber der basalen Kondition und ist in Abbildung 17 dargestellt. Einzig nach 48 Stunden war kein signifikanter Effekt durch Stimulation auslösbar ( $p=0,596$ ). Die maximale Expressionssteigerung zeigte sich nach 12 Stunden. Unter stimulierten Umständen fand sich nach sechs Stunden Stimulation im Vergleich zu drei Stunden tendenziell eine verminderte Expression. Ein Anstieg der basalen Konditionen konnte nicht beobachtet werden.

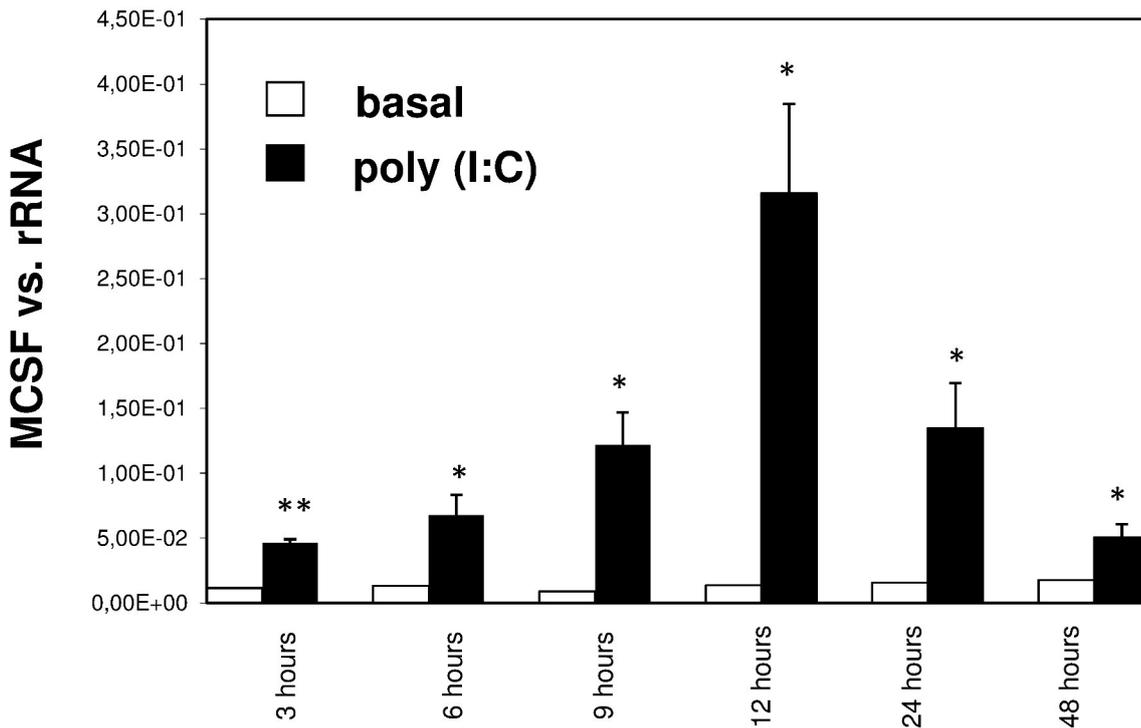


Abbildung 16: Expression von MCSF bei zeitabhängiger Stimulation durch poly(I:C)

HMEC-1-Zellen wurden unter Standardkonditionen 24 Stunden kultiviert anschließend mit PBS gewaschen und weiter unter Standardkonditionen kultiviert oder mit 10  $\mu\text{g/ml}$  poly(I:C) inkubiert. Nach den Intervallen 3, 6, 9, 12, 24 und 48 Stunden wurde die RNA extrahiert und wie unter 2.3.7-2.3.10 mittels RT-PCR und dem Primer für MCSF analysiert. Dabei wurden zu den Zeitpunkten 3, 6, 9, 12, 24 und 48 Stunden der Stimulation ein signifikanter Anstieg der Expression im Vergleich zur Basalkondition gefunden. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus zwei unterschiedlichen Experimenten angegeben. Die Werte der Ordinaten entsprechen den jeweiligen  $2(\Delta\text{Ct})$ -Werten. (\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,05$  und \*\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,01$ )

Was die Expression von mRNA für ICAM-1 (siehe Abb. 18) betrifft, so konnte hier nach drei und zwölf Stunden eine signifikante Steigerung durch Stimulation mit 10  $\mu\text{g/ml}$  poly(I:C) gegenüber der basalen Kondition gezeigt werden. Hinzu kommt, dass sich die Steigerung der Expression unter Stimulation zwischen drei und zwölf Stunden ebenso als signifikant erwiesen hat wie die darauf folgende Verminderung der Expression nach 24 Stunden.

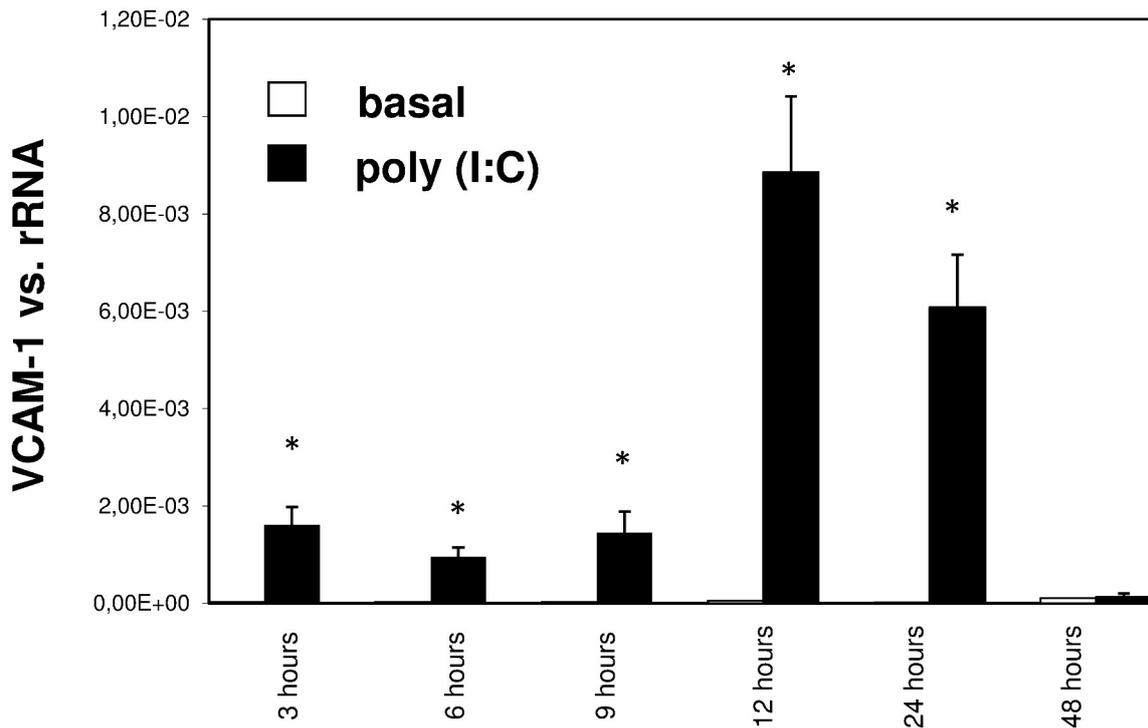


Abbildung 17: Expression von VCAM-1 bei zeitabhängiger Stimulation durch poly(I:C)

HMEC-1-Zellen wurden unter Standardbedingungen 24 Stunden kultiviert anschließend mit PBS gewaschen und weiter unter Standardbedingungen kultiviert oder mit 10 µg/ml poly(I:C) inkubiert. Nach den Intervallen 3, 6, 9, 12, 24 und 48 Stunden wurde die RNA extrahiert und wie unter 2.3.7-2.3.10 mittels RT-PCR und dem Primer für VCAM-1 analysiert. Dabei wurde zu allen gemessenen Zeitpunkten nach Stimulation außer nach 48 Stunden ein signifikanter Anstieg der Expression im Vergleich zur Basalkondition gefunden. Der Zeitpunkt der höchsten Expression unter Stimulation war nach 12 Stunden zu finden. Der Wert der Ordinate entspricht dem jeweiligen 2<sup>(ΔCt)</sup>-Wert. (\* über Balken markiert Entwicklung mit p < 0,05 und \*\* über Balken markiert Entwicklung mit p < 0,01)

Auch die Expression von mRNA für ICAM-1 betreffend, zeigt sich nach zwölf Stunden ein Maximum. Weiterhin wurde nach 48 Stunden im Vergleich mit dem Zeitpunkt drei, sechs und neun Stunden ein signifikanter Anstieg der Expression von ICAM-1 in der basalen Kondition beobachtet.

Die Messung von INF-α ergab keine relevanten oder messbaren Effekte zwischen den Proben mit Stimulation oder ohne, wurden aber wie alle getesteten Gene exprimiert.

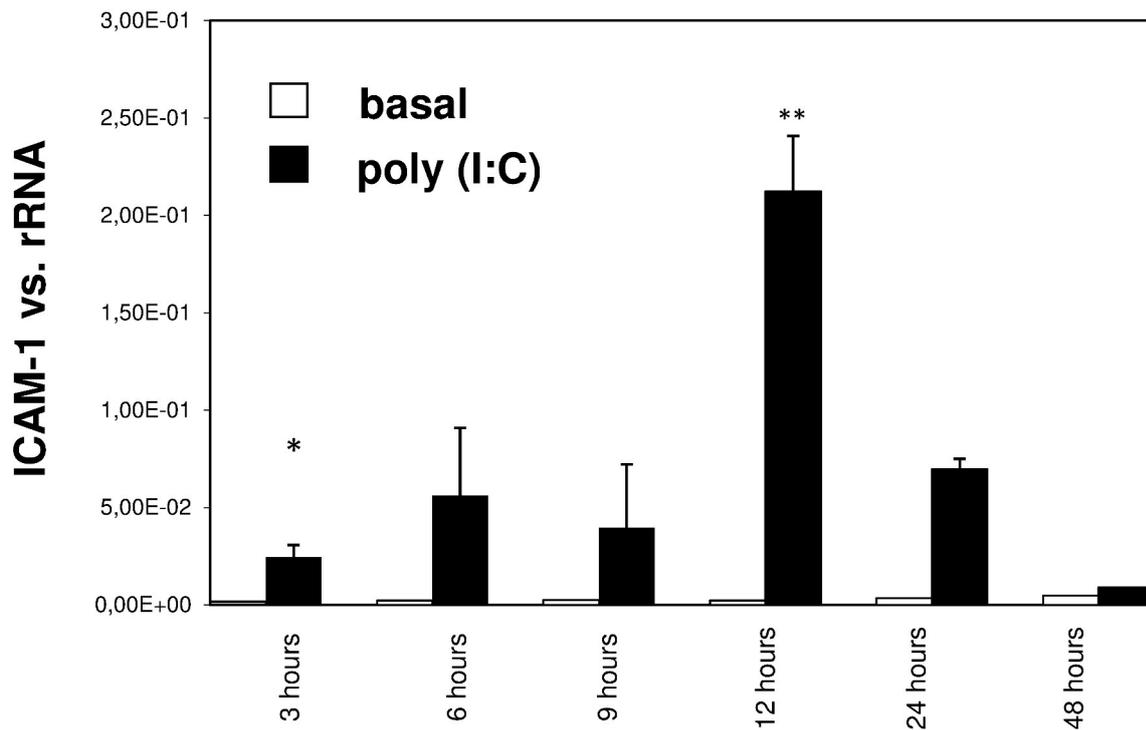


Abbildung 18: Expression von ICAM-1 bei zeitabhängiger Stimulation durch poly(I:C)

HMEC-1-Zellen wurden unter Standardbedingungen 24 Stunden kultiviert anschließend mit PBS gewaschen und weiter unter Standardbedingungen kultiviert oder mit 10 µg/ml poly(I:C) inkubiert. Nach den Intervallen 3, 6, 9, 12, 24 und 48 Stunden wurde die RNA extrahiert und wie unter 2.3.7-2.3.10 beschrieben mittels RT-PCR und dem Primer für ICAM-1 analysiert. Dabei wurden zu den Zeitpunkten 3 und 12 Stunden der Stimulation ein signifikanter Anstieg der Expression im Vergleich zur Basalkondition gefunden. Tendenziell zeigt sich hier 12 Stunden nach Stimulation als Zeitpunkt der höchsten Expression ein Maximum. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung aus zwei unterschiedlichen Experimenten angegeben. Die Werte der Ordinaten entsprechen den jeweiligen 2(ΔCt)-Werten. (\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,05$  und \*\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,01$ )

### 3.3 Effekt einer Stimulation mit synthetischer RNA bei inflammatorischen Bedingungen auf die Expression der viralen Rezeptoren TLR-3, RIG-1, MDA-1

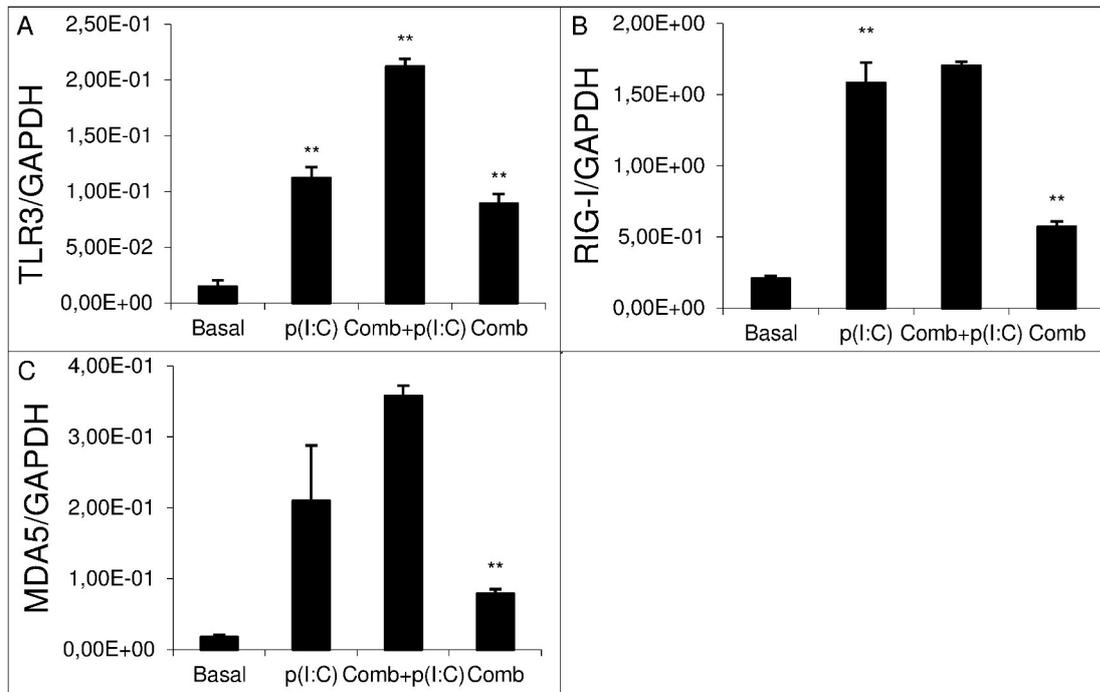


Abbildung 19: Effekt einer Stimulation mit synthetischer RNA bei inflammatorischen Bedingungen auf die Expression der viralen Rezeptoren TLR-3, RIG-1, MDA-1

HMEC-1-Zellen wurden mit einer Kombination aus proinflammatorischen Zytokinen (TNF  $\alpha$ , 25 ng/ml, IL-1 $\beta$  10 ng/ml, INF  $\gamma$  20 ng/ml) oder unter Standardbedingungen für 24 Stunden präinkubiert. Anschließend wurden die Wells mit PBS gewaschen und für weitere 6 Stunden mit Medium befüllt. Dann wurden die Wells wieder mit PBS gewaschen und für weitere 12 Stunden mit oder ohne 10  $\mu$ g/ml poly(I:C) inkubiert. Anschließend wurde die RNA extrahiert und wie unter 2.3.7-2.3.10 beschrieben mittels RT-PCR und folgenden Primern analysiert: **A** TLR-3 **B** RIG-1 **C** MDA-5. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus zwei unterschiedlichen Experimenten angegeben. Die Werte der Ordinaten entsprechen den jeweiligen  $2(\Delta\text{Ct})$ -Werten. (\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,05$  und \*\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,01$ )

In diesem Experiment sollte der Effekt der Vorstimulation mit TNF- $\alpha$ , 25 ng/ml, IL-1 $\beta$  10 ng/ml, INF- $\gamma$  20 ng/ml für 24 Stunden und anschließender zwölfstündiger Stimulation mit 10  $\mu$ g/ml poly(I:C) untersucht werden. Die für dieses Experiment eingesetzten Primer waren: TLR-3, RIG-1 und MDA-5.

Für die Expression von TLR-3 (Abbildung 19) wurde nicht nur eine hochsignifikante Steigerung jeder stimulierten Kondition im Vergleich zur basalen Kondition gefunden, sondern auch

eine hochsignifikante Steigerung der Expression bei der kombinierten Stimulation aus Zytokinen und poly(I:C) im Vergleich zu alleiniger Vorstimulation und alleiniger Stimulation. Zwischen der allein mit Zytokinen stimulierten Kondition und der allein mit poly(I:C) stimulierten Kondition konnte kein signifikanter Effekt beobachtet werden.

Was das Verhalten der Expression von RIG-1 (Abbildung 19) betrifft, so konnte hier gezeigt werden, dass die Kombination aus Vorstimulation und Stimulation im Vergleich zur allein mit Zytokinen vorstimulierten Kondition eine hochsignifikante Überexpression von RIG-1 zur Folge hat. Des Weiteren hat die Stimulation mit poly(I:C) im Vergleich zur beschriebenen Vorstimulation eine höhere Expression von RIG-1 hervorgerufen, wobei dieser Effekt sich ebenfalls als signifikant erwiesen hat. Im Gegensatz zur Expression von TLR-3 konnte bei RIG-1 kein signifikanter Effekt zwischen der nur mit poly(I:C) stimulierten Kondition und der mit der Kombination aus Zytokinen und poly(I:C) stimulierten Kondition festgestellt werden.

Die Expression der mRNA für MDA-5, welche in Abbildung 19 illustriert wird, konnte in diesem Experiment nicht nach zwölf Stunden der alleinigen Stimulation mit poly(I:C) signifikant gesteigert werden. Jedoch bewirkte die Kombination aus Zytokinen und poly(I:C) eine hochsignifikante Expressionssteigerung von MDA-5 im Vergleich zur basalen Kondition und auch im Vergleich zur allein mit Zytokinen vorstimulierten Kondition.

Der Effekt zwischen alleiniger Vorstimulation und Stimulation wie beschrieben, erwies sich, was die Expression von MDA-5 betrifft, nicht als signifikant.

### 3.4 Rezeptorabhängigkeit von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen

Nachdem vorherige Experimente gezeigt haben, dass TLR-3, MDA-5 und RIG-1 von HMEC-1 exprimiert und ferner noch unter inflammatorischen Einflüssen wie poly(I:C) reguliert werden, wurde in diesem Experiment nun IL-6 gemessen, während mRNA für TLR-3, MDA-5 und RIG-1 durch siRNA an der Translation gehindert wurden. Hierbei inhibiert die siRNA die Expression des für sie spezifischen Genes. Dafür wurden Zellen mit poly(I:C) zu genau dem Zeitpunkt, der sich in Experiment 3.2 am reagibelsten erwiesen hat, stimuliert. Dieser Zeitpunkt war zwölf Stunden nach Stimulationsbeginn. Im Anschluss wurde die RT-PCR mit Primern für IL-6, IFN- $\beta$ , RANTES, MCP-1, TNF- $\alpha$  und VCAM-1 utlisiert wie in 2.3.9 beschrieben.

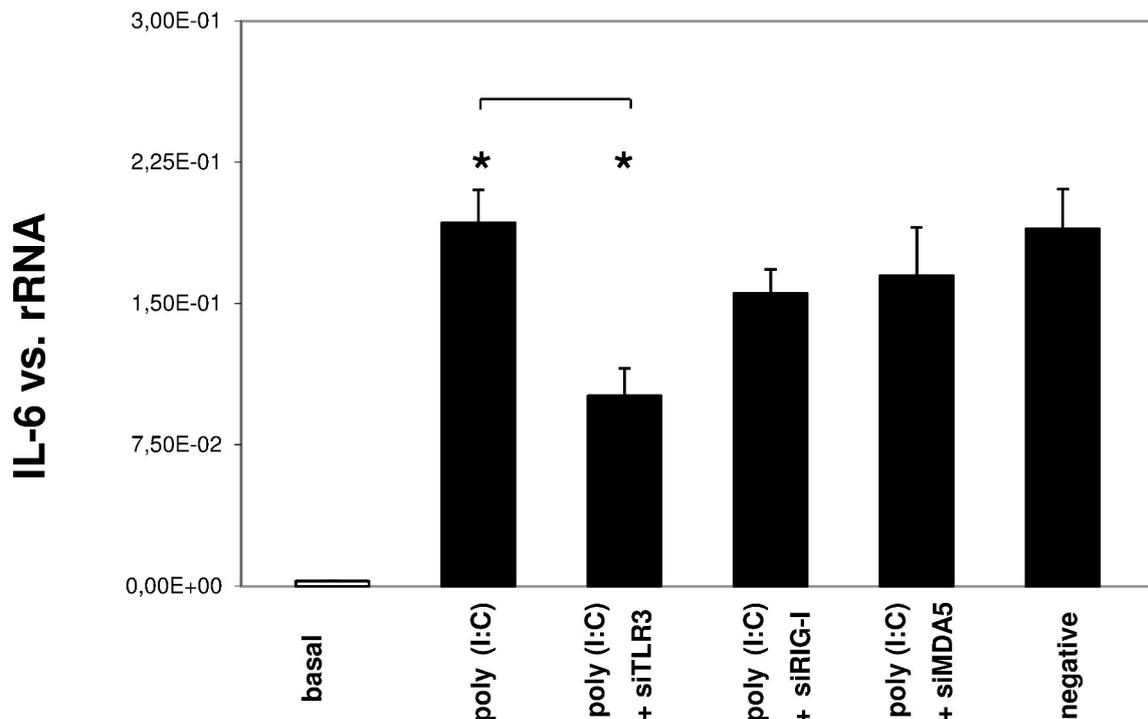


Abbildung 20: Rezeptorabhängigkeit von IL-6

HMEC-1-Zellen wurden mit siRNA für TLR-3, RIG-1, MDA-5, unspezifischer siRNA oder nicht transfiziert und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10  $\mu$ g/ml poly(I:C) oder unter Standardkonditionen für weitere 12 Stunden transfiziert. Daraufhin wurde die RNA extrahiert und wie unter 2.3.7-2.3.10 beschrieben mittels RT-PCR und dem IL-6-Primer analysiert.

Die Expression der mRNA von IL-6 wurde im Vergleich zur Kondition p(I:C) durch Blockieren von TLR-3(siTLR-3) signifikant gesenkt, während die Kondition mit unspezifischer siRNA(negative) keine signifikante Reduktion der Expression im Vergleich von IL-6 herbeiführen konnte. Es wurde keine signifikante Suppression der IL-6-Expression gefunden bei Blockieren von MDA-5(siMDA5) und RIG-1(siRIG1). Alle Konditionen wiesen eine signifikante Überexpression von IL-6 auf im Vergleich zur Basalkondition. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus zwei unterschiedlichen Experimenten angegeben. Die Werte der Ordinaten entsprechen den jeweiligen 2( $\Delta$ Ct)-Werten. (\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,05$  und \*\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,01$ )

Dabei zeigte sich analog zu vorherigen Experimenten eine signifikante Steigerung der Expression von mRNA für IL-6, INF- $\beta$  und VCAM-1 nach zwölf Stunden der Stimulation mit poly(I:C) verglichen mit der basalen Kondition. Des Weiteren wurden Kontrollen hergestellt und zum Vergleich hinzugezogen. Als Kontrollen beziehungsweise Referenzen wurde eine Kondition, die aus einer Kombination von siPort + poly(I:C) (in den Abbildungen poly(I:C) genannt) bestand und eine Kondition die siPort, poly(I:C) und siRNA für unspezifische RNA beinhaltet (in Abbildungen als negative), verwendet (Abbildung 20, 21, 22, 23).

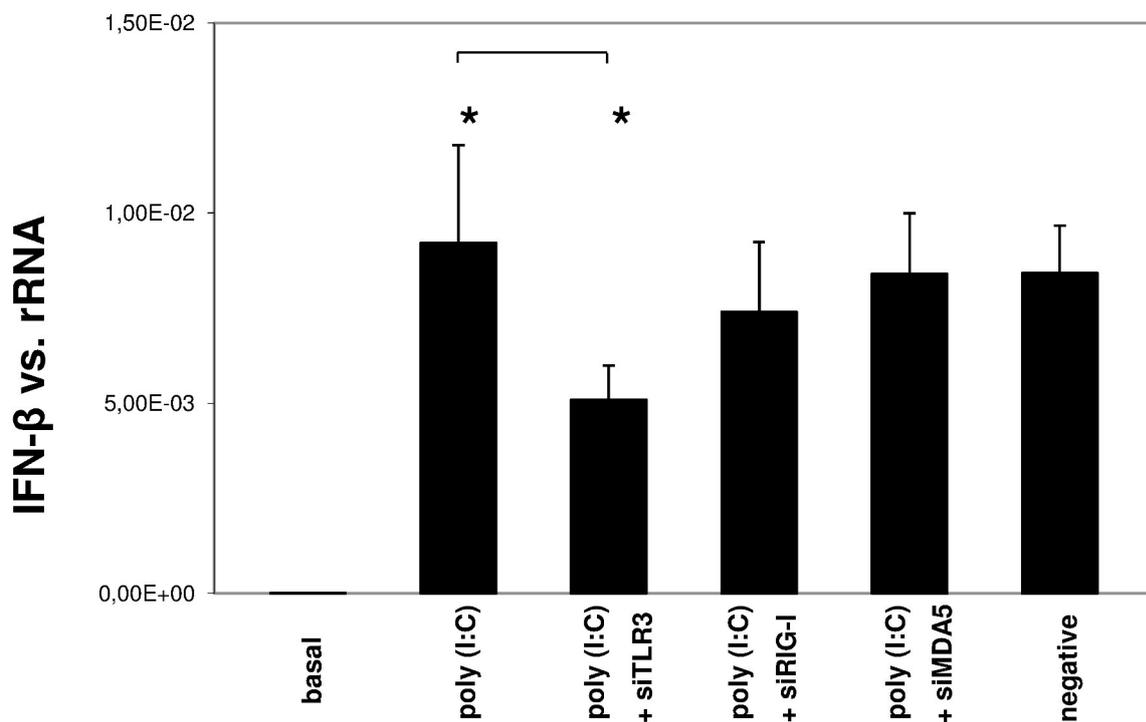


Abbildung 21: Rezeptorabhängigkeit von INF- $\beta$

HMEC-1-Zellen wurden mit siRNA für TLR-3, RIG-1, MDA-5, unspezifischer siRNA oder nicht transfiziert und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Zellen mit 10 $\mu$ g/ml poly(I:C) oder unter Standardkonditionen für weitere 12 Stunden transfiziert. Daraufhin wurde die RNA extrahiert und wie unter 2.3.7-2.3.10 beschrieben mittels RT-PCR und dem INF- $\beta$ -Primer analysiert.

Die Expression der mRNA von INF- $\beta$  wurde im Vergleich zur Kondition p(I:C) durch Blockieren von TLR-3 (siTLR-3) signifikant gesenkt, während die Kondition mit unspezifischer siRNA (negative) keine signifikante Reduktion der Expression im Vergleich von INF- $\beta$  herbeiführen konnte. Es wurde keine signifikante Suppression der INF- $\beta$ -Expression gefunden bei Blockieren von MDA-5 (siMDA5) und RIG-1 (siRIG1). Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus zwei unterschiedlichen Experimenten angegeben. Die Werte der Ordinaten entsprechen den jeweiligen 2( $\Delta$ Ct)-Werten. (\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,05$  und \*\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,01$ )

Im Gegensatz zu der Kondition bestehend aus siPort und poly(I:C) führte die Suppression der mRNA für TLR-3 zu einer signifikanten Verminderung der Expression der inflammatorischen Antworten in Form von IL-6 (Abb. 21), INF- $\beta$  (Abb. 22) und VCAM-1 (23). Die Suppression von

IL-6, INF- $\beta$  und VCAM-1 durch das Blockieren von RIG-1 und MDA-5 hat sich als nicht signifikant herausgestellt.

Daneben wurden weitere Analysen durchgeführt, bei denen die Expression von weiteren inflammatorischen Proteinen sowie Adhäsionsproteinen untersucht werden sollte.

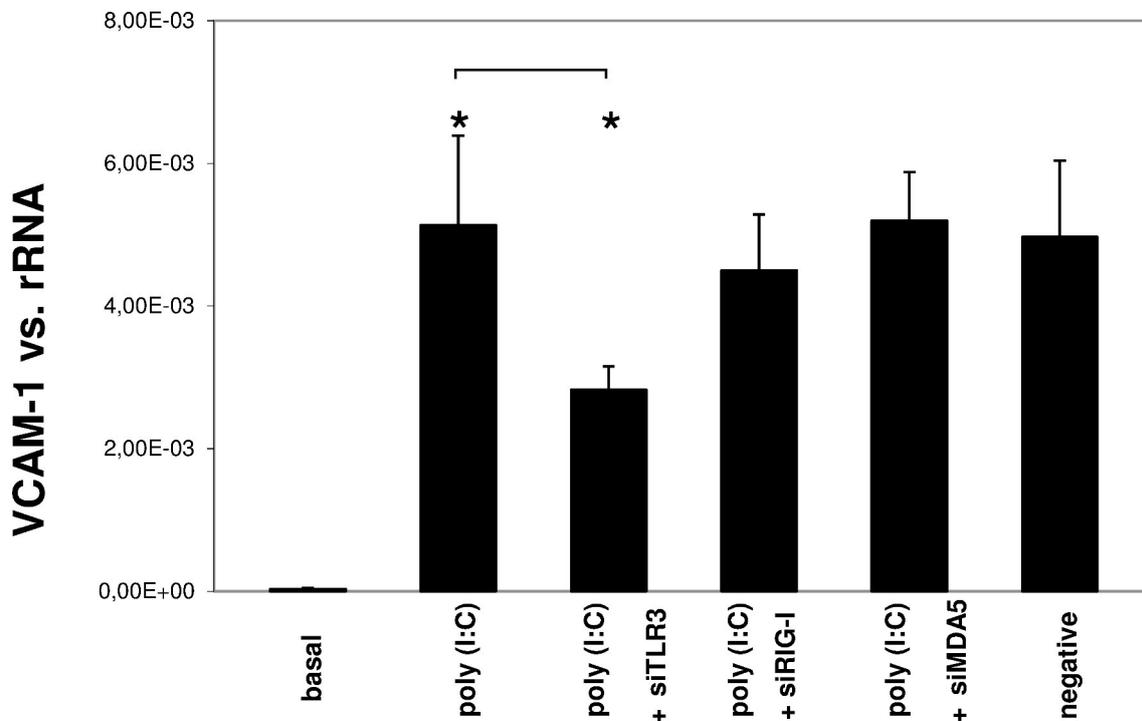


Abbildung 22: Rezeptorabhängigkeit von VCAM-1

HMEC-1-Zellen wurden mit siRNA für TLR-3, RIG-1, MDA-5, unspezifischer siRNA oder nicht transfiziert und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Zellen mit 10 $\mu$ g/ml poly(I:C) oder unter Standardkonditionen für weitere 12 Stunden transfiziert. Daraufhin wurde die RNA extrahiert und wie unter 2.3.7-2.3.10 beschrieben mittels RT-PCR und dem VCAM-1-Primer analysiert.

Die Expression der mRNA von VCAM-1 wurde im Vergleich zur Kondition p(I:C) durch Blockieren von TLR-3 (siTLR-3) signifikant gesenkt, während die Kondition mit unspezifischer siRNA keine signifikante Reduktion der Expression im Vergleich von VCAM-1 herbeiführen konnte. Es wurde keine signifikante Suppression der VCAM-1-Expression gefunden bei Blockieren von MDA-5 (siMDA5) und RIG-1 (siRIG1). Alle Konditionen wiesen eine signifikante Überexpression von VCAM-1 auf im Vergleich zur Basalkondition. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus zwei unterschiedlichen Experimenten angegeben. Die Werte der Ordinaten entsprechen den jeweiligen 2( $\Delta$ Ct)-Werten. (\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,05$  und \*\* über Balken markiert Entwicklung mit  $p < 0,01$ )

# **4 Diskussion**

## **4.1 Interpretation der Ergebnisse und Analyse**

Als Hypothese nahmen wir an, dass Erkennungsrezeptoren für virale Nukleotidsequenzen der Endothelzellen in vivo eine „Gate Keeper“-Funktion einnehmen, dass sie also RNA-Fragmente erkennen und beseitigen können. Weiter gingen wir davon aus, dass sich die virale Infektion durch größere Mengen an RNA über bestimmte Mechanismen als Gefäßveränderung manifestiert, wobei auch Immunkomplexe aus viralen Bestandteilen und Antikörpern beteiligt sein könnten. Möglicherweise führt die virale Infektion so neben einer antiviralen Antwort sowie der Anpassung der Proliferation und der Apoptose zu einer Erhöhung der Thrombogenität der Endotheloberfläche. Dies wiederum würde eine Veränderung der mikrovaskulären Hämostase bewirken, könnte dadurch in Gerinnungsaktivierung, Fibrosen und Sklerosen resultieren und damit Komplikationen bei Vaskulitiden erklären bzw. proatherosklerotisch wirken.

Das Endothel hat direkten Kontakt mit im Blut zirkulierenden Molekülen, wie z.B. Immunglobulinen, Immunkomplexen sowie DNA- und RNA-Fragmenten. Bei viralen Infektionen können daher virale Komponenten wie RNA oder Immunkomplexe, welche RNA beinhalten in Kontakt mit dem Endothel kommen, wobei die Immunkomplexe eine wichtige Rolle bei der Hepatitis C assoziierten Vaskulitis spielen[55].

TLR-3, RIG-1 und MDA-5 gelten als Rezeptoren für dsRNA. Virale dsRNA gilt als Hauptligand für den TLR-3 in dendritischen Zellen aber auch in nicht-immunspezifischen Zellen wie intestinalen Epithelzellen, Fibroblasten oder auch Mesangialzellen[50, 90]. Der TLR-3 wird als Teil eines antiviralen Systems angesehen, da er die Freisetzung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Interferonen bewirken kann. Auch RIG-1 und MDA-5 werden mit viralen Infektionen in verschiedenen Zelltypen in Verbindung gebracht[52, 94].

In diesem Kontext wollten wir zunächst in einem Screening feststellen, welche Immunrezeptoren vom Endothel unter Standardbedingungen exprimiert werden und welche sich durch ein proinflammatorisches Milieu induzieren lassen. Die Untersuchungen dieser Arbeit konnten zeigen, dass Endothelzellen die Toll-Like-Rezeptoren 1-7 und 9 exprimieren,

sodass unsere Arbeitshypothese, nämlich dass das Endothel zumindest in vitro eine Art „Gate Keeper“ bzw. „Clearance“-Funktion hat, untermauert werden konnte und im Einklang mit aktuellen Annahmen steht[23]. Dies bedeutet auch, dass das Endothel zumindest bei viralen Erkrankungen an der Funktion des Immunsystems beteiligt ist, und dass nicht nur „klassische“ Immunzellen dabei eine Rolle spielen, mit Konsequenzen für den gesamten Organismus.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass ein in vitro erzeugtes inflammatorisches Milieu, wie es bei Virusinfektionen zu finden ist, in Endothelzellen eine Überexpression an mRNA für den TLR-3, MDA-5 und RIG-1 bewirkt. Zusätzlich zeigt sich in Experiment 3.1, dass die untersuchten Toll-Like-Rezeptoren, deren Liganden Bakterien zugeschrieben werden, unter den Testbedingungen, wie sie bei viralen Infektionen auftreten, eine Tendenz zur Runterregulation zeigen. In Abbildung 5 wird dies an den Effekten von TLR-2, 4 und 6 veranschaulicht. Zusätzlich zeigte sich in Experiment 3.1 eine Expression von TLR-7, welche ohne Stimulation durch Zytokine nicht messbar war. Da in der später diskutierten Expression von IL-6 noch andere Mechanismen beteiligt sein müssen, scheinen weitere Untersuchungen am TLR-7, in Bezug auf antivirale Antworten, interessant. In Studien konnte gezeigt werden, dass antivirale Substanzen wie Imiquimod über den TLR-7 zu einer antiviralen Antwort führen. Es ist daher denkbar, dass der TLR-7 auch an der Auslösung einer inflammatorischen Antwort bei Kontakt mit viraler RNA beteiligt ist [31].

Das Endothel spielt eine wichtige Rolle bei Vaskulitiden, atherosklerotischen Veränderungen und auch bei thrombembolischen Ereignissen, insbesondere bei immunvermittelten Formen, sodass der Fokus im Weiteren auf den viralen Rezeptoren TLR-3, RIG-1 und MDA-5 in Endothelzellen lag[77].

Nachdem wir zeigen konnten, dass Endothelzellen Immunrezeptoren haben und diese in einem proinflammatorischen Milieu hochregulieren, wollten wir untersuchen, welche Immunantworten bei Kontakt mit einem Liganden für die viralen Rezeptoren TLR-3, RIG-1 und MDA-5, von den Zellen gegeben werden können und welche Zeitabhängigkeit besteht.

Aus Experiment 3.2 lässt sich entnehmen, dass zumindest in vitro der größte Effekt der antiviralen Antwort nach Kontakt mit p(I:C) nach 12 Stunden zu erwarten ist. Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass die HMEC-1-Zellen nach Kontakt mit poly(I:C) eine breite Batterie von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen als inflammatorische Antwort

exprimieren(IL-6, IL-8, INF  $\alpha$ , INF  $\beta$ , TNF  $\alpha$ , MCP-1, RANTES, MCSF, VCAM-1 und ICAM-1) und somit vaskulitische Veränderungen durch Anlocken von Immunzellen, Anregung zur Neubildung von Immunzellen sowie auch das Anregen zur Transmigration unterstützen könnten. Da in atherosklerotischen Läsionen in Gefäßwänden Makrophagen eine wichtige Rolle spielen und dort als sogenannte Schaumzellen vorgefunden werden, könnte MCSF, als ein Protein, welches die Reifung von Makrophagen anregt, in der Kaskade bis zur entzündlichen Gefäßschädigung ebenfalls eine wichtige Rolle bei viral verursachten Infektionen spielen[78]. Ferner konnte bei Stimulation mit p(I:C) eine vermehrte Expression von VCAM-1 und ICAM-1 nachgewiesen werden. Auch dies gibt einen möglichen Hinweis auf den Zusammenhang bzw. den Pathomechanismus von viralen Infektionen und vaskulären Komplikationen, da zwischen Vaskulitis oder Atherosklerose und der Expression von ICAM-1 und VCAM-1 eine Korrelation besteht[25]. Beide Proteine begünstigen die lokale Inflammation und tragen ebenfalls zu den Prozessen der Gefäßentzündungen bei[18, 33, 54, 60, 91].

Nachdem wir zeigen konnten, dass HMECs nach Inkubation mit poly(I:C) die Expression einer Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen zeitabhängig steigern und auch die viralen Rezeptoren hochreguliert werden, sollte die Funktionalität von TLR-3, RIG-1 und MDA-5 untersucht werden. In dem Experiment 3.3 konnte gezeigt werden, dass TLR-3 durch die Vorstimulation mit Zytokinen und anschließende Stimulation der Endothelzellen mit einem Liganden für TLR-3, also poly(I:C), eine hochsignifikante Steigerung von TLR-3 im Vergleich zu der separierten Stimulation erreicht hat. Das bedeutet, dass die oben beschriebene hypothetische Folge der Stimulation zumindest in vitro an Endothelzellen zwei intensivierende Komponenten hat, welche sich additiv zueinander verhalten. Danach bestehen zwei verschiedene Möglichkeiten die über den TLR-3 vermittelten Effekte zu modulieren, worauf später eingegangen werden soll. Aus den Ergebnissen geht weiter hervor, dass der TLR-3 durch seinen eigenen Liganden und durch ein inflammatorisches Milieu zur Überexpression moduliert wird, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Wörnle et al. an Mesangialzellen steht[90]. Ebenso gilt für MDA-5 und RIG-1, dass sie durch ihre eigenen Liganden reguliert werden, was einer gezielteren Immunantwort des Gesamtorganismus dienlich sein könnte. Dabei konnte durch die Untersuchungen an RIG-1 bei kleiner Standardabweichung kein Effekt der eigenen Hochregulation zwischen der

Stimulation mit Zytokinen und der Stimulation mit p(I:C) und Zytokinen beobachtet werden. Zusätzlich ist die Expression von RIG-1 bei alleiniger Stimulation im inflammatorischen Milieu signifikant geringer als in der Kombination und zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen der mit Zytokinen und poly(I:C) stimulierten Kondition, so darf man annehmen, dass die Expression von RIG-1 an HMEC-1-Zellen tatsächlich am ehesten und hauptsächlich durch den Liganden bestimmt wird. Im Weiteren stellte sich in diesem Experiment heraus, dass auch die Expression von MDA-5 an Endothelzellen durch den eigenen Liganden reguliert wird. Dabei zeigt sich allerdings kein signifikanter Unterschied der Überexpression zwischen inflammatorischen Milieu mit Stimulation durch poly(I:C) und alleiniger Stimulation(vgl. Abbildung 19).

Um die Rezeptorabhängigkeit der vorher untersuchten Zytokine und damit die Rezeptorsignalwege zu untersuchen, wurden die Gene der Rezeptoren bei Inkubation mit poly(I:C) mittels Silencing unterdrückt und die Expression der Zytokine gemessen.

Aus Experiment 3.4 kann geschlossen werden, dass die Expression von IL-6, VCAM-1 und INF- $\beta$  über TLR-3 moduliert werden muss. In diesem Zusammenhang spielt der TLR-3 durch die von ihm abhängige Expression von INF- $\beta$  eine wichtige Rolle in der viralen Abwehr. Allerdings gibt das ermittelte Ergebnis Anlass zur Annahme, dass die Expression der genannten Gene nicht allein über den TLR-3 vermittelt wird, und dass es möglicherweise noch einen anderen Mechanismus geben muss, der an der Erkennung viraler RNA beteiligt ist und dann zu einer gesteigerten Expression der Gene führt, oder aber dass die Suppression nicht vollständig war. Möglicherweise wären ähnliche Untersuchungen am TLR-7 an dieser Stelle aufschlussreich. Möglich ist allerdings auch, dass es noch weitere Mechanismen gibt, welche durch Kontakt der HMEC-1-Zelle mit poly(I:C) zur Überexpression von IL-6, VCAM-1 und INF- $\beta$  führen. Aus selbigem Experiment ergibt sich ebenfalls der Anhalt, dass RIG-I und MDA-5 in diesem Zusammenhang keine Rolle in der Kaskade von Kontakt mit poly(I:C), also wahrscheinlich auch viraler RNA und der Expression von IL-6, VCAM-1 und INF- $\beta$  spielen.

Neben den explizit untersuchten Effekten wird poly(I:C) auch ein proapoptisches Potenzial zugeschrieben[96]. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die TLR-3 vermittelte Signalkaskade sich von den anderen TLRs durch die Unabhängigkeit von dem Adapterprotein MyD88 unterscheidet[83, 95]. Derzeit sind drei Signalwege bekannt[5, 69, 95]:

1) Aktivierung von IRF 3 und 7 führt zur Bildung von antiviralen und proinflammatorischen Zytokinen wie Typ-1 Interferonen.

2) Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt zur Bildung zahlreicher proinflammatorischer Gene.

3) Ein TNF  $\alpha$  unabhängiger Signalweg führt zur Apoptose der Zellen.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass abhängig vom TLR-3 sowohl Endprodukte des ersten als auch den zweiten Signalweges von Endothelzellen exprimiert werden.

Auch RIG-1 und MDA-5 führen zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B, IRF-3 sowie 7 und damit zur Expression von Typ-1 Interferonen bzw. zahlreicher anderer proinflammatorischer Gene[93-95, 97]. Da in 3.4 beim Knock-Down von RIG-1 und MDA-5 keine verminderte Expression von NF- $\kappa$ B bzw. IRF-3 oder 7- abhängigen Produkten gefunden werden konnte, ist davon auszugehen, dass die Expression hauptsächlich von TLR-3 abhängt.

Aufgrund unserer Ergebnisse gehen wir davon aus, dass TLR-3, RIG-1 und MDA-5 zum einen physiologisch eine „Gate-Keeper“-Funktion sowie zum anderen auch eine Clearance-Funktion für virale dsRNA im zirkulierenden Blut einnehmen. Bei physiologischer Konzentration an dsRNA und proinflammatorischen Proteinen wäre die Expression der viralen Rezeptoren TLR-3, RIG-1 und MDA-5 gering. Eine virale Infektion mit Immunstimulation sowie erhöhten Konzentrationen von TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$  und INF  $\gamma$  würde zu einer Überexpression der viralen Rezeptoren auf Endothelzellen führen. Bei deren Stimulation durch dsRNA hätte dies wiederum die vermehrte Expression von IL-6, IL-8, INF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1, RANTES, MCSF, VCAM-1 und ICAM-1 aber auch der drei viralen Rezeptoren selbst zur Folge. Die Zytokine IL-6 und 8 würden initial neutrophile Granulozyten anlocken[10]. MCP-1, RANTES und MCSF würden Makrophagen aktivieren und zur Proliferation anregen[29, 44]. VCAM-1 und ICAM-1 würden die Leukozytenadhäsion gezielt anregen[18, 24]. TNF- $\alpha$ , IL-6 und INF- $\beta$  könnten die allgemeine Immunantwort aufrechterhalten, wobei die weitere Rolle von IL-6 nicht zur Gänze klar ist und das Zytokin in Verbindung mit der Chronizität des Vorgangs in Verbindung gebracht wird[6, 14, 34, 90].

Von der Forschungsgruppe um PD Dr. Markus Wörnle konnte in vitro gezeigt werden, dass die durch poly(I:C) erzeugte Überexpression von MMP9 an Mesangialzellen und Mesothelzellen hauptsächlich vom TLR-3 abhängt.

Diese Ergebnisse geben in Zusammenschau mit der in 3 gezeigten Expression von TLR-3 an Endothelzellen einen weiteren Hinweis auf einen möglichen Pathomechanismus bei der Entstehung von vaskulären Fibrosen oder präatherosklerotischen Gefäßveränderungen. Diesem möglichen Mechanismus liegt die bereits bekannte lytische Aktivität von MMP9 gegenüber Kollagen IV zugrunde, welches essentiell für die Basalmembran und außerdem ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix ist[43]. Dies würde neben den reinen Gefäßveränderungen auch einen möglichen Zusammenhang zwischen viralen Infektionen und Thrombosen eröffnen, da die erwähnten Veränderungen am Endothel, der Virchow'schen Theorie nach, Thrombosen begünstigen würden[81]. Es wäre also aufschlussreich, auch an HMEC-1 bzw. Endothelzellen die Expression von Metalloproteinasen abhängig und unabhängig vom TLR-3 zu untersuchen. Allerdings werden die genauen Auswirkungen atherosklerotischer Gefäßveränderungen von MMP-9 noch diskutiert. Zum einen ließ sich zeigen, dass Gefäßerkrankungen mit erhöhten MMP-9 Spiegeln einhergehen und auch durch diese verursacht oder aggraviert werden können[36, 92]. Zum anderen konnte aber auch gezeigt werden, dass MMP-9 antivirale Antworten auslösen kann und damit vielleicht vasoprotektiv wirken könnte. Ursächlich für diese Annahme ist der Umstand, dass in MMP-9-Knockout-Mäusen nach viraler Infektion im Myokard eine höhere Viruslast und mehr Fibrosierung gezeigt werden konnte[49]. Aus den oben erwähnten Forschungen an den Mesothelzellen konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Expression von TLR-3 sich durch Stimulation mit den auch in dieser Arbeit verwendeten Zytokinen steigern lässt, was konsistent zu den in Abschnitt 3 genannten Ergebnissen ist. Die inflammatorische Antwort in Form eines signifikanten Anstieges von IL-6, MCP-1, RANTES, IL-1 $\beta$  und ICAM-1 in der genannten Arbeit an Mesothelzellen konnte auf TNF- $\alpha$  zurückgeführt werden, während in dieser Arbeit eine dezidierte Zuordnung der Überexpression zu einem bestimmten der zur Stimulation verwendeten Zytokine nicht möglich ist und durch ein weiteres Experiment untersucht und bestimmt werden könnte[89].

Für weitere Untersuchungen in dieser Richtung wäre es ergänzend interessant, ob diese Beobachtungen auch in vitro mit ähnlichen Ergebnissen gemacht werden könnten, sollte als Stimulanz nicht poly(I:C) sondern die Stimulation mit viraler dsRNA verwendet werden. Da der TLR-3 Rezeptor als Ligand ebenfalls ssRNA akzeptiert und viele Viren an einem Punkt ihres Replikationszyklus dsRNA produzieren, wären Untersuchungen am TLR-3 mit realem

viralen Material bis hin zu Infektionen mit verschiedenen Viren möglicherweise aufschlussreich, was die Rolle der allgemeinen viralen Infektion in Bezug auf vaskuläre Veränderungen anbelangt[4, 50, 82, 87, 89, 95].

In Studien konnte weiterhin gezeigt werden, dass exogene zytosolische DNA über einen noch nicht ganz geklärten Mechanismus über die RNA-Polymerase III in RNA umgeschrieben werden kann[1, 11]. So ist es beispielsweise möglich, dass es über die Infektion mit EBV, einem dsDNA-Virus, zu einer Aktivierung des RIG-1-Systems kommt[1]. Aus diesem Grund wäre die Untersuchung mit synthetischer oder viraler DNA an HMEC-1-Zellen in Bezug auf die Stimulation von TLR-3 und MDA5 sowie die folgenden Effekte interessant.

## **4.2 Aussicht**

In den beschriebenen Experimenten und Untersuchungen wurden TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und INF  $\gamma$  verwendet, um in vitro ein inflammatorisches Milieu zu produzieren. Dabei zeigten sich, wie schon in 4.1 diskutiert, Konditionen, die vaskuläre Komplikationen erklären könnten. TLR-3 könnte dabei eine Rolle spielen und wird, wie in 3.1 untersucht, abhängig von der Anwesenheit eines inflammatorischen Milieus hochreguliert. Soll nun aus diesen Erkenntnissen und Überlegungen eine therapeutische Konsequenz gezogen werden, so bestünde die Möglichkeit im Organismus einzelne Komponenten der hier in vitro stimulierten inflammatorischen Proteine zu supprimieren. Die Forschungsgruppe um PD Dr. M. Wörnle hat in Untersuchungen festgestellt, dass TNF- $\alpha$  an Mesangialzellen auch direkt zur Expression von MMP-9 führt und auch an Mesothelzellen zur Überexpression von inflammatorischen Zytokinen führt[85, 89]. Möglicherweise besteht dieser Mechanismus ebenso an Endothelzellen. Da rheumatoide Erkrankungen mit einer Erhöhung von TNF- $\alpha$  im Blut einhergehen und stark mit Atherosklerose korrelieren, erscheint eine Suppression von TNF- $\alpha$  attraktiv, um die in dieser Arbeit beobachteten über TLR-3 modulierten Effekte weniger stark auftreten zu lassen[6, 35, 39]. Diesbezüglich konnte in einer Studie gezeigt werden, dass in einem Patientenkollektiv mit rheumatoider Arthritis und Therapie mit TNF- $\alpha$ -Blockern im Vergleich zu einem Kollektiv mit rheumatoider Arthritis ohne TNF- $\alpha$  Therapie nach einem Jahr eine signifikante Verbesserung der Erkrankung in Bezug auf die aortale Pulswellengeschwindigkeit und die Wanddicke der Intima der Karotis Media festzustellen war, was als Marker für atherosklerotische Veränderung gewertet werden kann[6]. Zusammen mit den vorherigen Überlegungen gibt dieses Ergebnis Anlass, auch bei anderen Erkrankungen oder Infektionen, welche mit einem erhöhten TNF- $\alpha$  Spiegel im Blut einhergehen, aus angioprotektiven Gründen über eine TNF- $\alpha$  Blockade nachzudenken.

Es wurde gezeigt, dass eine Vorstimulation mit Zytokinen eine Hochregulation der viralen Rezeptoren bewirkt, welche dann ihrerseits bei Liganden Bindung vasoinflammatorische Effekte nach sich ziehen können.

In dieser Arbeit konnte nicht eruiert werden, welches der Zytokine den größten Einfluss auf die über TLR-3 modulierte Kaskade hat, oder ob nicht gegebenenfalls sogar alle Zytokine daran zwingend beteiligt sein müssen. Da jedoch Therapieversuche mit Interferon  $\gamma$  bei

Osteopetrose und chronischer Granulomatose unternommen werden, könnten sich anhand der genannten Überlegungen mögliche Langzeitfolgen solcher Therapien ableiten[40, 56].

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die gefäßschädigenden Effekte von viralen Infektionen wahrscheinlich auch durch das Vorhandensein von viraler RNA verursacht werden. Daher könnte die Gabe von RNase ein weiterer Ansatzpunkt zur Gefäßprotektion sein.

Diese Annahme basiert auch auf einer Studie aus dem Jahr 2007, in welcher festgestellt werden konnte, dass extrazelluläre RNA, ssRNA sowie auch poly(I:C) in vitro und in vivo zu einer signifikant erhöhten Gefäßpermeabilität an verschiedenen mikrovaskulären Endothelzellschichten, unter anderem auch im Gehirn, führen[22]. Zusätzlich fanden sich Desintegrationen der Tight-Junctions[22]. Untersucht wurden diese Zusammenhänge mit dem Augenmerk auf Interaktionen mit VEGF[22]. Dabei wurde beobachtet, dass bei vorheriger Gabe von RNase diese Effekte ausblieben. Daher ist anzunehmen, dass RNase ebenfalls über die in unserer Arbeit beleuchteten Mechanismen unter bestimmten Umständen bzw. bei viralen Infektionen gefäßprotektive Wirkung haben könnte. Da vom Endothel in vivo RNase sezerniert wird, scheinen Untersuchungen, an diesem Punkt zu intervenieren, interessant.

## **5 Zusammenfassung**

Die Komplikationen viraler Erkrankungen stellen im Klinikalltag ein großes Problem dar, denn viele virale Erkrankungen und Infektionen resultieren in einer folgenschweren Systemerkrankung und können sich dabei in vielen Organsystemen, wie etwa den Nieren, der Leber, dem zentralen Nervensystem oder dem Gefäßsystem, manifestieren. Dabei sind die Wirkungsmechanismen vielfältig und noch nicht zur Gänze aufgeklärt. Bei vielen viralen Infektionen wird das Endothel mit viraler RNA konfrontiert. Diese RNA kann von dem TLR-3, RIG-1 und MDA-5 als pathogen erkannt werden und entsprechende Kaskaden der Reaktion nach sich ziehen. Da wir davon ausgehen, dass das Endothel auch in vivo bei viraler Infektion eine Art „Gatekeeper“ - oder „Clearance“-Funktion für RNA einnimmt, also RNA-Fragmente aus dem vaskulären System erkennt und beseitigt, wurde vor diesem Hintergrund das Verhalten von HMEC-1-Zellen (Human Dermal Microvascular Endothelial Cells) gegenüber einem synthetischen RNA Analogon, poly(I:C) und einem inflammatorischen Milieu anhand der Rezeptoren RIG-1, MDA-5 und TLR-3 untersucht.

Zu diesem Zweck wurden HMECs kultiviert und entsprechende Konditionen mit INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  sowie poly(I:C) für die Experimente hergestellt. Anschließend wurde die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und dann mittels real-time PCR quantifiziert.

Unsere Arbeitshypothese unterstützend, konnten wir zunächst zeigen, dass HMEC-1-Zellen TLR-3, RIG-1, MDA-5 und weitere Immunrezeptoren, wie zum Beispiel auch TLR-7, exprimieren. Daraufhin wollten wir untersuchen welche Immunantworten von den HMECs bei Kontakt mit dem synthetischen RNA-Analogon poly(I:C) gegeben werden können und welche Zeitabhängigkeit besteht. Es konnte gezeigt werden, dass bei Inkubation mit poly(I:C) eine Batterie an proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen exprimiert wird. Bei Stimulation mit poly(I:C) zeigte sich zum Zeitpunkt von zwölf Stunden nach Stimulation eine Hochregulation der Rezeptoren TLR-3, RIG-1 und MDA-5. Diese Rezeptoren werden also durch ihre eigenen Liganden hochreguliert. Daraufhin konnte gezeigt werden, dass ein proinflammatorisches Milieu, wie es bei viralen Infektionen zu finden ist, bestehend aus INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  dazu führt, dass eine Überexpression der genannten Rezeptoren stattfindet. Um die Effekte Rezeptoren zuzuordnen, wurden im Anschluss Knock-Down – Versuche der Rezeptorgene durchgeführt. Dabei hat sich gezeigt, dass Silencing mit siRNA

für TLR-3 zu einer Senkung der Expression von IL-6, INF- $\beta$  und VCAM-1 führte. Folglich ist anzunehmen, dass TLR-3 ein Bestandteil der Kaskade in der Erkennung eines Pathogenes, also viraler RNA, mit der nachfolgenden Entzündungsreaktion ist. Ebenfalls geht aus den Experimenten hervor, dass sich die Effekte der Hochregulation, verursacht durch das inflammatorische Milieu bzw. die Stimulation mit poly(I:C) an TLR-3, RIG-1 und MDA-5, additiv verhalten.

Aus den Ergebnissen schließen wir, dass bei physiologischer Konzentration an dsRNA und proinflammatorischen Proteinen die Expression der viralen Rezeptoren TLR-3, RIG-1 und MDA-5 gering wäre. Im Falle einer viralen Infektion würde das inflammatorische Milieu zu einer Überexpression der viralen Rezeptoren auf Endothelzellen führen. Bei deren Stimulation durch dsRNA hätte dies wiederum die vermehrte Expression von IL-6, IL-8, INF  $\beta$ , TNF  $\alpha$ , MCP-1, RANTES, MCSF, VCAM-1, ICAM-1, aber auch der 3 viralen Rezeptoren selbst zur Folge. Die entstehenden Chemokine und Adhäsionsmoleküle würden Leukozyten anlocken und diese zur Proliferation und Diapedese anregen. VCAM-1 und ICAM-1 würden die Leukozytenadhäsion gezielt anregen. Die dabei gebildeten Zytokine könnten die Entzündung unterhalten und eventuell zu ihrer Chronifizierung beitragen. Anhand dieses Modells ließen sich einige der mit Viruserkrankungen assoziierten vaskulären Komplikationen erklären.

Eine therapeutische Konsequenz aus diesem Modell wäre die Intervention an Schlüsselpositionen. Zum einen scheint eine Therapie mit einem TNF- $\alpha$ -Blocker attraktiv um das proinflammatorische Milieu und damit die Expression der viralen Rezeptoren und den konsekutivprozessen einzuschränken. Zum anderen böte sich aber auch durch eine RNase-Therapie in Zukunft eine theoretische Möglichkeit, viral vermittelte vaskuläre Komplikationen einzuschränken, da TLR-3, RIG-1 und MDA-5 durch ihren eigenen Liganden in der Expression gesteigert werden, was durch die RNase eingeschränkt würde.

# 6 Anhang

## 6.1 Abkürzungsverzeichnis

ACE	= Angiotensin Converting Enzyme
AoD	= Assays-on-Demand™
CARD	= Caspase Recruitment Domains
CD	= Cluster of Differentiation
cDNA	= komplementäre DNA
CMV	= Zytomegalie Virus
CSF	= Colony-stimulating Factor
CTD	= C-terminal Regulatory Domain
DMEM	= Dulbecco's Modified Eagle Medium
dsRNA	= double-stranded RNA
E. coli	= Escherichia coli
EDTA	= Ethylendiamintetraacetat
FBS	= Fetal Bovine Serum
FP	= Forward Primer
GAPDH	= Glyceraldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase
HIV	= Human Immunodeficiency Virus
HMEC	= Human Dermal Microvascular Endothelial Cell
ICAM 1	= Inter-Cellular Adhesion Molecule 1 or CD54
IL	= Interleukin
IRF	= Interferon Regulatory Transcription Factor
kDa	= Kilo Dalton
LRR	= Leucin-rich Repeat
MCSF	= Macrophage colony-stimulating factor
MCP-1(CLL2)	= Monocyte chemotactic protein-1
MDA-5	= Melanoma-Differentiation-Associated Gene 5
MMP-9	= Metalloproteinase 9
min	= Minute

mRNA	= messenger Ribonucleic Acid
mTLR	= mRNA for TLR
NF-kB	= Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PAI-1	= Plasminogen Activator Inhibitor-1
PAMPs	= Pathogen-associated Molecular Patterns
PBS	= Phosphate Buffered Saline
PCR	= Polymerase Chain Reaction
Poly (I:C)	= Polyinosinic polycytidylic acid
RANTES(CLL5)	= Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
RefSeq	= Referenz Sequenz
RIG-1	= Retinoid Acid-Inducible Gene 1
RISC	= RNA-induced silencing complex
RLR	= RIG-1 like receptor
RNA	= Ribonucleic Acid
RPM	= Rounds / Revolutions Per Minute
RP	= Reverse Primer
RT-PCR	= Real-Time Polymerase Chain Reaction
siRNA	= signal interference Ribonucleic Acid
ssRNA	= single-stranded RNA
TIR	= Toll/IL-1 Rezeptor
TLR	= Toll-Like-Rezeptor
TNF	= Tumor Necrosis Factor
TRIF	= TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$
VCAM-1	= Vascular-Cell Adhesion Molecule 1 or CD106
VEGF	= Vascular Endothelial Growth Factor

## **7 Literaturverzeichnis**

1. Ablasser, A., et al., *RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate*. Nat Immunol, 2009. 10(10): p. 1065-72.
2. Ades, E.W., et al., *HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line*. J Invest Dermatol, 1992. 99(6): p. 683-90.
3. Aird, W.C., *Endothelial cell heterogeneity*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. 2(1): p. a006429.
4. Akira, S. and H. Hemmi, *Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family*. Immunol Lett, 2003. 85(2): p. 85-95.
5. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. 4(7): p. 499-511.
6. Angel, K., et al., *Effect of 1-Year Anti-TNF-alpha Therapy on Aortic Stiffness, Carotid Atherosclerosis, and Calprotectin in Inflammatory Arthropathies: A Controlled Study*. Am J Hypertens, 2012.
7. Antoniak, S., et al., *Viral myocarditis and coagulopathy: increased tissue factor expression and plasma thrombogenicity*. J Mol Cell Cardiol, 2008. 45(1): p. 118-26.
8. Banks, W.A., A.J. Kastin, and E.G. Gutierrez, *Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier*. Neurosci Lett, 1994. 179(1-2): p. 53-6.
9. Bella, J., et al., *The structure of the two amino-terminal domains of human ICAM-1 suggests how it functions as a rhinovirus receptor and as an LFA-1 integrin ligand*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(8): p. 4140-5.
10. Brown, Z., et al., *Cytokine-activated human mesangial cells generate the neutrophil chemoattractant, interleukin 8*. Kidney Int, 1991. 40(1): p. 86-90.
11. Chiu, Y.H., J.B. Macmillan, and Z.J. Chen, *RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway*. Cell, 2009. 138(3): p. 576-91.
12. Cohen, C.D., et al., *Quantitative gene expression analysis in renal biopsies: a novel protocol for a high-throughput multicenter application*. Kidney Int, 2002. 61(1): p. 133-40.
13. Colvin-Adams, M. and A. Agnihotri, *Cardiac allograft vasculopathy: current knowledge and future direction*. Clin Transplant, 2011. 25(2): p. 175-84.
14. Diehl, S., et al., *Induction of NFATc2 expression by interleukin 6 promotes T helper type 2 differentiation*. J Exp Med, 2002. 196(1): p. 39-49.
15. Dienz, O., et al., *Essential role of IL-6 in protection against H1N1 influenza virus by promoting neutrophil survival in the lung*. Mucosal Immunol, 2012. 5(3): p. 258-66.
16. Dustin, M.L., et al., *Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1)*. J Immunol, 1986. 137(1): p. 245-54.
17. Elangbam, C.S., C.W. Qualls, Jr., and R.R. Dahlgren, *Cell adhesion molecules--update*. Vet Pathol, 1997. 34(1): p. 61-73.
18. Etienne-Manneville, S., et al., *ICAM-1-coupled signaling pathways in astrocytes converge to cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation and TNF-alpha secretion*. J Immunol, 1999. 163(2): p. 668-74.

19. Evans, S.S., et al., *Targeted regulation of a lymphocyte-endothelial-interleukin-6 axis by thermal stress*. Int J Hyperthermia, 2008. 24(1): p. 67-78.
20. Fine, D.M., A.B. Fogo, and C.E. Alpers, *Thrombotic microangiopathy and other glomerular disorders in the HIV-infected patient*. Semin Nephrol, 2008. 28(6): p. 545-55.
21. Fink, L., et al., *Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking*. Nat Med, 1998. 4(11): p. 1329-33.
22. Fischer, S., et al., *Extracellular RNA mediates endothelial-cell permeability via vascular endothelial growth factor*. Blood, 2007. 110(7): p. 2457-65.
23. Fitzner, N., et al., *Human skin endothelial cells can express all 10 TLR genes and respond to respective ligands*. Clin Vaccine Immunol, 2008. 15(1): p. 138-46.
24. Fotis, L., et al., *Intercellular cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in children. Do they play a role in the progression of atherosclerosis?* Hormones (Athens), 2012. 11(2): p. 140-6.
25. Galkina, E. and K. Ley, *Vascular adhesion molecules in atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. 27(11): p. 2292-301.
26. Gerard, G.F., et al., *Influence on stability in Escherichia coli of the carboxy-terminal structure of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*. DNA, 1986. 5(4): p. 271-9.
27. Guillevin, L., *Vasculitides in the context of HIV infection*. AIDS, 2008. 22 Suppl 3: p. S27-33.
28. Guillevin, L., et al., *Polyarteritis nodosa related to hepatitis B virus. A prospective study with long-term observation of 41 patients*. Medicine (Baltimore), 1995. 74(5): p. 238-53.
29. Haberstroh, U., et al., *Expression of the chemokines MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5 is differentially regulated by infiltrating inflammatory cells*. Kidney Int, 2002. 62(4): p. 1264-76.
30. Harms, P.W., et al., *Autopsy findings in eight patients with fatal H1N1 influenza*. Am J Clin Pathol, 2010. 134(1): p. 27-35.
31. Hemmi, H., et al., *Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway*. Nat Immunol, 2002. 3(2): p. 196-200.
32. Hirano, T., *Interleukin 6 and its receptor: ten years later*. Int Rev Immunol, 1998. 16(3-4): p. 249-84.
33. Huber, S.A., *VCAM-1 is a receptor for encephalomyocarditis virus on murine vascular endothelial cells*. J Virol, 1994. 68(6): p. 3453-8.
34. Hurst, S.M., et al., *Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation*. Immunity, 2001. 14(6): p. 705-14.
35. Jamnitski, A., et al., *Cardiovascular comorbidities in patients with psoriatic arthritis: a systematic review*. Ann Rheum Dis, 2012.
36. Kai, H., et al., *Peripheral blood levels of matrix metalloproteases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes*. J Am Coll Cardiol, 1998. 32(2): p. 368-72.
37. Kannemeier, C., et al., *Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(15): p. 6388-93.
38. Kato, H., et al., *Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses*. Nature, 2006. 441(7089): p. 101-5.

39. Kerekes, G., et al., *Validated methods for assessment of subclinical atherosclerosis in rheumatology*. Nat Rev Rheumatol, 2012. 8(4): p. 224-34.
40. Key, L.L., Jr., et al., *Long-term treatment of osteopetrosis with recombinant human interferon gamma*. N Engl J Med, 1995. 332(24): p. 1594-9.
41. Kotewicz, M.L., et al., *Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in Escherichia coli*. Gene, 1985. 35(3): p. 249-58.
42. Kudo, K., et al., *1alpha,25-Dihydroxyvitamin D(3) inhibits vascular cellular adhesion molecule-1 expression and interleukin-8 production in human coronary arterial endothelial cells*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2012. 132(3-5): p. 290-4.
43. Kuroda, T., et al., *Expression of MMP-9 in mesangial cells and its changes in anti-GBM glomerulonephritis in WKY rats*. Clin Exp Nephrol, 2004. 8(3): p. 206-15.
44. Lenda, D.M., E.R. Stanley, and V.R. Kelley, *Negative role of colony-stimulating factor-1 in macrophage, T cell, and B cell mediated autoimmune disease in MRL-Fas(lpr) mice*. J Immunol, 2004. 173(7): p. 4744-54.
45. Li, X., et al., *Structural basis of double-stranded RNA recognition by the RIG-I like receptor MDA5*. Arch Biochem Biophys, 2009. 488(1): p. 23-33.
46. Liu, L., et al., *Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA*. Science, 2008. 320(5874): p. 379-81.
47. Lu, X.T., et al., *Psychological stress, vascular inflammation and atherogenesis: potential roles of circulating cytokines*. J Cardiovasc Pharmacol, 2013.
48. Magro, C.M., A.N. Crowson, and C. Ferri, *Cytomegalovirus-associated cutaneous vasculopathy and scleroderma sans inclusion body change*. Hum Pathol, 2007. 38(1): p. 42-9.
49. Marchant, D. and B.M. McManus, *Matrix metalloproteinases in the pathogenesis of viral heart disease*. Trends Cardiovasc Med, 2009. 19(1): p. 21-6.
50. Marshall-Clarke, S., et al., *Polyinosinic acid is a ligand for toll-like receptor 3*. J Biol Chem, 2007. 282(34): p. 24759-66.
51. Mashav, N., et al., *Epstein-Barr virus-associated venous thromboembolism: a case report and review of the literature*. Thromb Res, 2008. 122(4): p. 570-1.
52. Matsukura, S., et al., *Role of RIG-I, MDA-5, and PKR on the expression of inflammatory chemokines induced by synthetic dsRNA in airway epithelial cells*. Int Arch Allergy Immunol, 2007. 143 Suppl 1: p. 80-3.
53. Matsumoto, M., et al., *Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells*. J Immunol, 2003. 171(6): p. 3154-62.
54. Mazo, I.B., et al., *Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1*. J Exp Med, 1998. 188(3): p. 465-74.
55. Meyers, C.M., et al., *Hepatitis C and renal disease: an update*. Am J Kidney Dis, 2003. 42(4): p. 631-57.
56. Naderi Beni, F., et al., *Increased production of nitric oxide by neutrophils from patients with chronic granulomatous disease on interferon-gamma treatment*. Int Immunopharmacol, 2012. 12(4): p. 689-93.
57. Nakazawa, F., et al., *Extracellular RNA is a natural cofactor for the (auto-)activation of Factor VII-activating protease (FSAP)*. Biochem J, 2005. 385(Pt 3): p. 831-8.
58. Oikonomou, E., et al., *The role of inflammation in heart failure: new therapeutic approaches*. Hellenic J Cardiol, 2011. 52(1): p. 30-40.

59. Paraskevas, K.I., et al., *Peripheral arterial disease and HIV-positive patients*. *Angiology*, 2011. 62(1): p. 7-9.
60. Park, J.G., et al., *Evaluation of VCAM-1 antibodies as therapeutic agent for atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. *Atherosclerosis*, 2013. 226(2): p. 356-63.
61. Park, S. and E.G. Lakatta, *Role of inflammation in the pathogenesis of arterial stiffness*. *Yonsei Med J*, 2012. 53(2): p. 258-61.
62. Pinto, A.N., *AIDS and cerebrovascular disease*. *Stroke*, 1996. 27(3): p. 538-43.
63. Porubsky, S., et al., *Influence of native and hypochlorite-modified low-density lipoprotein on gene expression in human proximal tubular epithelium*. *Am J Pathol*, 2004. 164(6): p. 2175-87.
64. Ray, A., et al., *The role of inflammation on atherosclerosis, intermediate and clinical cardiovascular endpoints in type 2 diabetes mellitus*. *Eur J Intern Med*, 2009. 20(3): p. 253-60.
65. Reitsma, S., et al., *The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization*. *Pflugers Arch*, 2007. 454(3): p. 345-59.
66. Ribeiro, M.J., et al., *Hemostatic properties of the SV-40 transfected human microvascular endothelial cell line (HMEC-1). A representative in vitro model for microvascular endothelium*. *Thromb Res*, 1995. 79(2): p. 153-61.
67. Rincon, M., *Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases*. *Trends Immunol*, 2012. 33(11): p. 571-7.
68. Saadoun, D., et al., *Hepatitis C virus-associated polyarteritis nodosa*. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2010.
69. Salaun, B., et al., *TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells*. *J Immunol*, 2006. 176(8): p. 4894-901.
70. Sarkar, D., R. Desalle, and P.B. Fisher, *Evolution of MDA-5/RIG-I-dependent innate immunity: independent evolution by domain grafting*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(44): p. 17040-5.
71. Seth, R.B., et al., *Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3*. *Cell*, 2005. 122(5): p. 669-82.
72. Shi, Z., et al., *A novel Toll-like receptor that recognizes vesicular stomatitis virus*. *J Biol Chem*, 2011. 286(6): p. 4517-24.
73. Shibamiya, A., et al., *Nucleic acids potentiate Factor VII-activating protease (FSAP)-mediated cleavage of platelet-derived growth factor-BB and inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation*. *Biochem J*, 2007. 404(1): p. 45-50.
74. Simmons, D., M.W. Makgoba, and B. Seed, *ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM*. *Nature*, 1988. 331(6157): p. 624-7.
75. Siomi, H. and M.C. Siomi, *On the road to reading the RNA-interference code*. *Nature*, 2009. 457(7228): p. 396-404.
76. Somer, T., *Thrombo-embolic and vascular complications in vasculitis syndromes*. *Eur Heart J*, 1993. 14 Suppl K: p. 24-9.
77. Sun, W., et al., *Immune complexes activate human endothelium involving the cell-signaling HMGB1-RAGE axis in the pathogenesis of lupus vasculitis*. *Lab Invest*, 2013. 93(6): p. 626-38.

78. Swirski, F.K. and M. Nahrendorf, *Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure*. Science, 2013. 339(6116): p. 161-6.
79. Trotti, R., et al., *Increased erythrocyte glutathione peroxidase activity and serum tumor necrosis factor-alpha in HIV-infected patients: relationship to on-going prothrombotic state*. J Hematother Stem Cell Res, 2002. 11(2): p. 369-75.
80. Urso, R., et al., *Pandemic 2009 H1N1 virus infection associated with purpuric skin lesions: a case report*. J Med Case Reports, 2011. 5(1): p. 132.
81. Virchow, R., *"Thrombose und Embolie. Gefässentzündung und septische Infektion"*. Frankfurt am Main: Von Meidinger & Sohn. pp. 219–732. Matzdorff AC, Bell WR (1998). *Thrombosis and embolie (1846-1856)*. Canton, Massachusetts: Science History Publications. , 1856.
82. Wang, Y., et al., *Dimerization of Toll-like receptor 3 (TLR3) is required for ligand binding*. J Biol Chem, 2010. 285(47): p. 36836-41.
83. Whitehead, K.A., et al., *Silencing or stimulation? siRNA delivery and the immune system*. Annu Rev Chem Biomol Eng, 2011. 2: p. 77-96.
84. Wornle, M., et al., *Effect of dsRNA on mesangial cell synthesis of plasminogen activator inhibitor type 1 and tissue plasminogen activator*. Nephron Exp Nephrol, 2009. 113(2): p. e57-65.
85. Wornle, M., et al., *Role of matrix metalloproteinases in viral-associated glomerulonephritis*. Nephrol Dial Transplant, 2009. 24(4): p. 1113-21.
86. Wornle, M., et al., *Role of toll-like receptor 3, RIG-I, and MDA5 in the expression of mesothelial IL-8 induced by viral RNA*. Appl Biochem Biotechnol, 2010. 160(4): p. 1179-87.
87. Wornle, M., et al., *Role of viral receptors TLR3, RIG-I and MDA5 in mesothelial tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 synthesis*. Thromb Haemost, 2009. 101(6): p. 1128-37.
88. Wornle, M., et al., *Role of viral induced vascular endothelial growth factor (VEGF) production in pleural effusion and malignant mesothelioma*. Cell Biol Int, 2009. 33(2): p. 180-6.
89. Wornle, M., et al., *Novel role of toll-like receptor 3, RIG-I and MDA5 in poly(I:C) RNA-induced mesothelial inflammation*. Mol Cell Biochem, 2009. 322(1-2): p. 193-206.
90. Wornle, M., et al., *Novel role of toll-like receptor 3 in hepatitis C-associated glomerulonephritis*. Am J Pathol, 2006. 168(2): p. 370-85.
91. Xu, Y. and S. Li, *Blockade of ICAM-1: a novel way of vasculitis treatment*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. 381(4): p. 459-61.
92. Yeh, J.L., et al., *Lercanidipine and labedipinedilol-A attenuate lipopolysaccharide/interferon-gamma-induced inflammation in rat vascular smooth muscle cells through inhibition of HMGB1 release and MMP-2, 9 activities*. Atherosclerosis, 2013. 226(2): p. 364-72.
93. Yoneyama, M., et al., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. Nat Immunol, 2004. 5(7): p. 730-7.
94. Yount, J.S., T.M. Moran, and C.B. Lopez, *Cytokine-independent upregulation of MDA5 in viral infection*. J Virol, 2007. 81(13): p. 7316-9.

95. Yu, M. and S.J. Levine, *Toll-like receptor 3, RIG-I-like receptors and the NLRP3 inflammasome: Key modulators of innate immune responses to double-stranded RNA viruses*. Cytokine Growth Factor Rev, 2011.
96. Zhang, J., et al., *PIASy represses TRIF-induced ISRE and NF-kappaB activation but not apoptosis*. FEBS Lett, 2004. 570(1-3): p. 97-101.
97. Zou, J., et al., *Origin and evolution of the RIG-I like RNA helicase gene family*. BMC Evol Biol, 2009. 9: p. 85.

## **8 Danksagung**

Mein besonderer Dank für die Bereitstellung der Thematik und Hilfestellung bei der Anfertigung der Arbeit sowie für die Möglichkeit, die vorliegende Dissertation in seinem Labor durchführen zu können, gilt Herrn PD Dr. Markus Wörnle, Medizinische Klinik und Poliklinik IV der Ludwig-Maximilians-Universität München. Ihm danke ich vor allem für die erfahrene Förderung, seine ständige Gesprächsbereitschaft, Geduld und Freundlichkeit aber auch für die gute Betreuung, sowie wissenschaftlichen Ratschläge und Diskussionen.

Ferner möchte ich mich herzlich bei Frau Andrea Ribeiro bedanken, für ihre technische Unterstützung sowie ihre freundliche Anleitung, Geduld und Hilfestellung.

Danken möchte ich ebenfalls Frau Dr. Susanne Himmelein für die wohlwollende Einarbeitung meinerseits in die Vorgänge im Labor sowie für Unterstützung und Hilfestellung.

## Eidesstattliche Versicherung

**Nadjiri, Jonathan**

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Die Rolle von Erkennungsrezeptoren für virale Nukleotidsequenzen bei der Entstehung endothelialer Inflammation durch virale RNA**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

**München, 18.8.2014**

---

Ort, Datum

 Unterschrift Doktorand(in)/Doktorand