

**„Unterschiedliche Expressierung von Interleukin-1 (IL-1 α / IL-1 β) und
IL-1 Rezeptor Antagonist im kardiovaskulären System:
Untersuchungen an Patientengewebe und isolierten Zellen“**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Elena Westphal

geb. am: 23.08.1971 in: Tomsk, Rußland

Gutachter:

1. Prof. Dr. G. Reuter
2. PD Dr. H. Loppnow
3. Prof. Dr. F.U. Schade

Halle (Saale), den 19. Dezember 2003

urn:nbn:de:gbv:3-000006063

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006063>]

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGEN	V
1. EINLEITUNG	1
1.1 Die IL-1 Familie und die Caspase Familie	2
1.1.1 Proteine der IL-1 Familie	2
1.1.1.1 Interleukin-1 α	3
1.1.1.2 Interleukin-1 β	3
1.1.1.3 IL-1 Rezeptor Antagonist	4
1.1.1.4 Interleukin-18	4
1.1.2 Proteine der Caspase Familie	5
1.1.3 Eine IL-1β Prozessierungs-hemmende Aktivität in huma- nen Gefäßmuskelzellen	6
1.2 IL-1 and kardiovaskuläre Funktionen	7
1.3 Aufgabenstellung	9
2. MATERIAL UND METHODEN	10
2.1 Materialien	10
2.1.1 Medien, Lösungen und Zusätze	10
2.1.2 Zytokine, Endotoxin und rekombinante Enzyme	10
2.1.3 Antikörper	11
2.2 Methoden	11
2.2.1 Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung humaner und muriner Zellen	11
2.2.1.1 Humane vaskuläre Gefäßmuskelzellen	11
2.2.1.2 Humane Fibroblasten	12
2.2.1.3 Zelllinie „Jurkat“	12
2.2.1.4 Isolierung und Kultur neonataler Ratten Herzzellen	12
2.2.2 Herstellung von Zellkultur-Überständen und Zell-Lysaten	14
2.2.3 Herstellung von Kernextrakten der „Jurkat“-Zellen	14
2.2.4 Zytokin-Nachweismethoden	15
2.2.4.1 Nachweis biologischer IL-6 Aktivität im 7TD1- Proliferationstest	15

2.2.4.2	Nachweis biologischer IL-1 Aktivität im Fibroblasten-Proliferationstest	16
2.2.5	Biochemische und immunbiochemische Protein-Nachweismethoden	16
2.2.5.1	SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese	16
2.2.5.2	Färbung der SDS-Polyakrylamid-Gele	18
2.2.5.2.1	Färbung mit Coomassie-Blau	18
2.2.5.2.2	Western Blot	19
2.2.5.3	Nachweis von Zytokinen im ELISA	20
2.2.5.4	Immunhistochemische Färbungen	20
2.2.6	Molekularbiologische Methoden	21
2.2.6.1	RNA-Isolierung	21
2.2.6.2	Reverse Transkriptase-Reaktion (RT)	22
2.2.6.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	22
2.2.6.4	Klonierung rekombinanter Proteine	29
2.2.6.5	Präparation rekombinanter Proteine	31
2.2.7	Prozessierungsstudien	32
2.2.8	Auswertung und Darstellung der Daten	33
3.	ERGEBNISSE	34
3.1	Exprimierung von Proteinen der Interleukin-1 (IL-1) und Caspase Familien im kardiovaskulären System	34
3.1.1	Analyse der mRNA Expression von IL-1α, IL-1β, IL-1Ra, IL-18, IL-1RI, Caspase-1 und Caspase-3 im gesunden und insuffizienten linksventrikulären humanen Myokardgewebe	34
3.1.1.1	Die Exprimierung der IL-1 α und IL-1 β Gene im humanen linksventrikulären Myokardgewebe	35
3.1.1.2	Die Exprimierung der IL-1Ra mRNA im linksventrikulären Myokardgewebe herzinsuffizienter Patienten (DCM) ist herabgesetzt	37
3.1.1.3	Die Exprimierung der IL-18 mRNA im humanen linksventrikulären insuffizienten Myokard ist herabgesetzt während die Exprimierung der mRNA der IL-1RI, Caspase-1 und Caspase-3 mRNA im gesunden und insuffizienten Myokard unverändert ist	38
3.1.2	Exprimierung von Proteinen der IL-1 und Caspase Familien in kultivierten Herzzellen neonataler Ratten	39
3.1.2.1	Charakterisierung der Kardiomyozyten-Präparationen	39

3.1.2.2	Exprimierung der mRNA von Proteinen der IL-1 und Caspase Familien in kultivierten Herzmuskelzellen der Ratte	40
3.1.2.3	Analyse der Protein-Exprimierung der IL-1 Isoformen in kultivierten Ratten Kardiomyozyten	42
3.1.3	Exprimierung der IL-1α mRNA in fötalem humanem Herzgewebe und Ratten Herz	50
3.1.4	Untersuchungen zur Exprimierung und Funktion des Interleukin-18 in kultivierten humanen glatten Gefäßmuskelzellen	53
3.1.4.1	Kultivierte humane Gefäßmuskelzellen exprimieren die IL-18 mRNA konstitutiv	53
3.1.4.2	Humane Gefäßmuskelzellen exprimieren kein nachweisbares IL-18 Protein	54
3.1.4.3	IL-18 beeinflusst die Produktion und Freisetzung von aktivem IL-6 in humanen Gefäßmuskelzellen nicht	55
3.2	Funktionelle Charakterisierung einer IL-1β Prozessierungs-hemmenden Aktivität aus humanen glatten Gefäßmuskelzellen	57
3.2.1	Analyse der Substratspezifität der IL-1β Prozessierungs-hemmenden Aktivität anhand der Prozessierung eines zweiten Caspase-1 Substrates, der Interleukin-18 Vorstufe	57
3.2.1.1	Klonierung der IL-18 Vorstufe aus Gefäßmuskelzellen	57
3.2.1.2	Isolierung und Charakterisierung der rekombinanten IL-18 Vorstufe	58
3.2.1.3	Lysate der Gefäßmuskelzellen hemmen die Prozessierung der IL-18 Vorstufe durch Caspase-1	60
3.2.2	Die IL-1β Prozessierungs-hemmende Aktivität aus glatten Muskelzellen blockiert Caspase-1, aber nicht Caspase-3	61
3.2.3	Analyse potentieller Bindungsregionen zwischen der Prozessierungs-hemmenden Aktivität und der IL-1β Vorstufe	63
3.2.3.1	Herstellung und Charakterisierung von Deletionsmutanten der IL-1 β Vorstufe	63
3.2.3.2	Die Prozessierung aller Deletionsmutanten wird blockiert	69

4. DISKUSSION	71
4.1 Caspase-1 und Caspase-3 werden in humanem Herzgewebe und neonatalen Ratten Kardiomyozyten nicht unterschiedlich exprimiert	71
4.2 Die Exprimierung von IL-1RI in humanem Herzgewebe und neonatalen Ratten Kardiomyozyten ist nicht unterschiedlich	72
4.3 Analyse der IL-18 Exprimierung in humanem Myokard, in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen und in Präparationen neonataler Kardiomyozyten	73
4.4 Unterschiedliche Exprimierung des IL-1α in humanem und murinem Herzgewebe: mögliche Beteiligung des IL-1α bei lokalen entzündlichen Vorgängen und Entwicklungsprozessen	74
4.5 Kardiomyozyten exprimieren IL-1β nur in sehr geringem Maße	75
4.6 IL-1Ra ist möglicherweise an der Aufrechterhaltung der Herzzellhomeostase beteiligt	76
4.7 Charakterisierung einer Aktivität, die die Prozessierung der IL-1β Vorstufe blockiert	78
5. ZUSAMMENFASSUNG	81
6. LITERATURVERZEICHNIS	83
ANHANG	

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AcPL	„accessory protein like“
ADP	Adenosindiphosphat
Ag	Antigen
AIDA	Software „Automatic image data analyser“
AK	Antikörper
Amp	Ampizillin
ANF	„Atrial natriuretic factor“
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	Transkriptionsfaktor „activating protein-1“
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Antisense
AV Knoten	Atrioventrikulärer Knoten
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaar („basepair“)
BSA	Bovines Serum Albumin
B Zellen	B Lymphozyten
β-ME	β-Merkaptoethanol
CARD	„Caspase recruitment domain“
CARDIAK	„CARD-containing ICE-associated kinase“
cDNA	Komplementäre DNA („complementary DNA“)
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CMRL	Kulturmedium („Conhault medical research laboratories medium“)
crmA	„Cytokine response modifier A“
C1	Deletionsmutante C1 (M1-E212) der IL-1β Vorstufe
C2	Deletionsmutante C2 (M1-P139) der IL-1β Vorstufe
DAB	Diaminobenzidin
DCM	Dilatative Kardiomyopathie („dilatative cardiomyopathy“)
DEVD	Tetrapeptidinhistor: Aspartat-Glutamat-Valin-Aspartat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DL	Durchlauf
DMEM	Kulturmedium („Dulbecco`s minimum Eagle`s medium“)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
Oligo dT ₁₂₋₁₈	Oligodesoxy-Thymidin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N'N'-tetraessigsäure
ELISA	„Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay“
FKS	Fötales Kälberserum
GITC	Guanidin-Isothiozyanat
GMZ	Glatte Gefäßmuskelzellen
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HT	Hybridisierungstemperatur
HS	„Horse serum“ Pferdeserum
IAP	„Inhibitor of apoptosis“

ICAD	„Inhibitor of caspase-activated DNase“
ICE	IL-1 β Konvertase („IL-1 β converting enzyme“)
icIL-1Ra	Intrazelluläres Interleukin-1 Rezeptor Antagonist („intracellular IL-1 receptor antagonist“)
ICM	Ischämische Kardiomyopathie („ischemic cardiomyopathy“)
IDCM	Idiopathische dilatative Kardiomyopathie („idiopathic dilatative cardiomyopathy“)
I.E.	Internationale Einheit
IFN- γ	Interferon- γ
IGIF	Interferon- γ induzierender Faktor („interferon- γ inducing factor“)
IL	Interleukin
IL-1	Interleukin-1
IL-1B-31T	Zytosin \rightarrow Thymin Transition an der Position -31 bp vor dem Transkriptionsstartkodon im IL-1 β -kodierenden Gen
IL-1Ra	Interleukin-1 Rezeptor Antagonist
IL-1RN*1	Allel A1 des Interleukin-1 Rezeptor Antagonist Genes
IL-1RN*2	Allel A2 des Interleukin-1 Rezeptor Antagonist Genes
IL-1RI	Interleukin-1 Rezeptor Typ I
IL-1RII	Interleukin-1 Rezeptor Typ II
IL-1Rrp	„Interleukin-1 receptor-related protein“
IL-1sRI	Löslicher Interleukin-1 Rezeptor Typ I („soluble IL-1 receptor type I“)
IL-1sRII	Löslicher Interleukin-1 Rezeptor Typ II („soluble IL-1 receptor type II“)
IL-1RAcP	Interleukin-1 Rezeptor-assoziiertes Protein („IL-1 receptor accessory protein“)
IL-6	Interleukin-6
IL-18	Interleukin-18
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
IRAK	IL-1 Rezeptor assoziierte Kinase („IL-1-receptor-associated kinase“)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KM	Kardiomyozyten
kod. Seq.	Kodierende Sequenz
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid; Endotoxin
Mat	Matur; z.B. prozessiertes (reifes) IL-18 oder IL-1 β
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	„messenger“ RNA
MTC	„Multiple tissue cDNA“
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid
MyHC	„Myosin heavy chain“
M15[pREP4]	Plasmid REP4 enthaltender <i>Escherichia coli</i> -Stamm M15
N	Deletionsmutante N (M71-S269) der IL-1 β Vorstufe
NBT	Nitro-blau-tetrazolium
NC1	Deletionsmutante NC1 (M71-E212) der IL-1 β Vorstufe
NF- κ B	Transkriptionsfaktor „nuclear factor- κ B“
Ni-NTA	Nickel-Nitril-Tri-Essigsäure („Nickel-nitrilo-tri-acetic acid“)
NK Zellen	Killerzellen („natural killer cells“)
NO	Stickstoffmonoxid („nitric oxide“)
NYHA	„New York heart association“
OD	Optische Dichte

PARP	Poly(ADP-Ribose) Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung („phosphat buffered saline“)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i> DNA-Polymerase
PI-9	„Proteinase inhibitor-9“
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pQE-30	Plasmid Qiaexpress-30
Pre	Prekursor (Vorstufe); in Verbindung mit IL-1 oder IL-18
Psi-Medium	Modifiziertes LB-Medium
RGS·His	Arginin-Glyzin-Serin-(4 x Histidin)
RICK	„Protein kinase containing a caspase recruitment domain“
RIP-2	„Receptor interacting protein-2“
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RPMI	Kulturmedium („Rockwell park memorial institut medium“)
RS	Rinderserum
RS-Puffer	Rinderserum-Verdünnungs-Puffer
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	RT mit anschließender PCR
S	Sense
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese
serp2	Serpin 2
Serpin	„Serine protease inhibitor“
sIL-1Ra	Löslicher Interleukin-1 Rezeptor Antagonist („soluble IL-1 receptor antagonist“)
SPSS	Software („superior performing software system“)
St	Standard
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS-Puffer	Tris-gepufferte Salzlösung („Tris buffered saline“)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TFB1	„Transforming buffer 1“
TFB2	„Transforming buffer 2“
Th Zellen	T „helper“ Lymphozyten
Tm	Schmelztemperatur
TNF- α	Tumor Nekrosis Faktor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TUNEL	„Terminal dUTP nick end labeling“
T Zellen	T Lymphozyten
U	„Unit“ (Aktivität)
Ü	Überstand
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
YVAD	Tetrapeptidinhitor: Tyr-Val-Ala-Asp

1. EINLEITUNG

Das Herz-Kreislaufsystem ist eines der zentralen Organsysteme im Körper. Es führt im Organismus unter anderem die wichtigen Aufgaben des Transports von Nährstoffen und der Sauerstoffversorgung der peripheren Organe durch. In den westlichen Ländern gehören Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems wie z.B. Atherosklerose, Koronare Herzkrankheit, Herzinsuffizienz oder Myokardinfarkt zu den häufigsten Diagnosen bei Patienten im Alter über 50 Jahren und sind die häufigste Todesursache in der Bevölkerung (Gerok et al., 2000). Seit der Mitte der 90-iger Jahre wird neben genetischer Prädisposition, Umwelteinflüssen, haemodynamischen und neurohormonalen Faktoren (z.B. Noradrenalin; Renin-Angiotensin-System) eine Rolle von Zytokinen bei der Pathogenese der Herz-Kreislaufkrankungen diskutiert (Seta et al, 1996; Werdan, 1998; Paulus, 1999; Mann, 2001). Die „Zytokin-Hypothese“ von Seta und Kollegen (Seta et al, 1996) beinhaltet, dass eine vermehrte Expression von Zytokinen den Krankheitsverlauf nach einer initialen kardialen Schädigung weiter negativ beeinflussen kann. Die ursprünglichen Untersuchungen auf diesem Gebiet konzentrierten sich auf Tumor Nekrosis Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-6 (IL-6). Im Laufe der letzten Jahre wurde es aber immer deutlicher, dass viele Zytokineffekte durch die Induktion sekundärer Zytokine im Rahmen der Zytokin-Kaskade mediiert werden und dass möglicherweise die Gesamtheit dieser Zytokine zu Veränderungen der myokardialen Funktionen führen könnte.

Ein weiteres wichtiges pro-inflammatorisches Zytokin, neben TNF, ist das Interleukin-1 (IL-1). Die Rolle dieses Zytokins bei kardiovaskulären Erkrankungen ist nicht so intensiv untersucht wie die des TNF. Die IL-1 Familie besteht unter anderem aus zwei IL-1 Isoformen (IL-1 α und IL-1 β) und dem IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1Ra). Darüber hinaus gehören auch die IL-1 Rezeptoren (IL-1RI, IL-1RII) und das IL-1 Rezeptor-assoziierte Protein (IL-1RAcP) zu dieser Protein-Familie. Ein weiteres Zytokin, das Interleukin-18 (IL-18), wird aufgrund seiner strukturellen und funktionellen Eigenschaften ebenfalls zur IL-1 Familie gezählt. Zur Aktivierung des IL-1 β und des IL-18 ist die Caspase-1 notwendig, die der IL-1 Familie daher nahe steht. Im folgenden werden zunächst die Proteine der IL-1 Familie und die Caspasen-1 und -3 vorgestellt. Anschließend wird die bisher bekannte Rolle des IL-1 für die Pathologie von Herz-Kreislauf Erkrankungen zusammengefaßt.

1.1 Die IL-1 Familie und die Caspase Familie

1.1.1 Proteine der IL-1 Familie

Interleukin-1 gilt als ein zentraler Mediator im Zytokinnetzwerk und übt unzählige Funktionen im Rahmen physiologischer und pathologischer Vorgänge aus (Dinarello, 1996). Die IL-1 Funktionen werden durch IL-1 α und IL-1 β gleichermaßen vermittelt. Im Gegensatz dazu bindet der IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1Ra) an denselben Rezeptor, induziert aber kein Signal und wirkt als Inhibitor der IL-1 Aktivität. Das IL-18 ähnelt den Proteinen der IL-1 Familie u.a. in der Proteinstruktur und wird auch durch die Caspase-1 prozessiert, besitzt aber einen eigenen Rezeptor-Komplex. IL-18 wird separat im Punkt 1.1.1.4 der Einleitung beschrieben.

Die drei Proteine (IL-1 α , IL-1 β und IL-1Ra) werden durch unterschiedliche Gene kodiert, die beim Mensch auf dem Chromosom 2 lokalisiert sind (Webb et al., 1986; Steinkasserer et al., 1992). Humanes IL-1 α und IL-1 β wird als 31-33 kDa Vorstufenprotein synthetisiert und besitzt kein Signal-Peptid. Die Aminosäuresequenz der Vorstufe der beiden Isoformen ist zu 23% homolog (Auron et al., 1984, March et al. 1985). Die Aminosäure-Homologie des IL-1Ra zum maturen IL-1 β beträgt 26% und zum maturen IL-1 α 18% (Carter et al., 1990; Eisenberg et al., 1990). Auch die dreidimensionale Struktur der drei Proteine ist ähnlich und besteht aus 12 β -Faltblättern, die zu 4 Kleeblatt Strukturen gefaltet sind (Murzin et al., 1992). Außerdem binden alle drei Proteine an die IL-1 Rezeptoren (Dower et al., 1985; Kilian et al., 1986; Hannum et al., 1990). Die Bindung von IL-1 α oder IL-1 β an den membranständigen IL-1 Rezeptor Typ I (IL-1RI) ist der erste Schritt in der Signal-Übertragung. Dann folgt die Anlagerung des IL-1 Rezeptor-assoziierten Proteines (IL-1RAcP) (Greenfeder et al., 1995; Huang et al., 1997) an den Rezeptor-Komplex. Dies führt zur Aktivierung einer Protein-Kaskade in der Zelle und vermittelt unter anderem die Translokation von NF- κ B („nuclear factor- κ B“) zum Kern (Hatada et al., 2000). Auch die Aktivierung anderer Transkriptionsfaktoren, wie beispielweise AP-1 („activating protein-1“), durch IL-1 wurde beschrieben (Long, 2001). Der zweite Rezeptor, der IL-1 Rezeptor Typ II (IL-1RII), bindet zwar IL-1, ist aber nicht an der Signal-Übertragung beteiligt und wird als „decoy“ Rezeptor bezeichnet (Colotta et al., 1993). IL-1RI und IL-1RII existieren auch als lösliche Proteine, die durch proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domänen der Membranrezeptoren entstehen. Es wird vermutet, dass die löslichen IL-1 Rezeptoren das zirkulierende IL-1 binden und inaktivieren. Sie wurden im Plasma und Urin sowohl bei gesunden Personen (Symons et al., 1991; Colotta et al., 1996) als auch erhöht bei Personen mit Sepsis (Giri et al., 1994) gefunden.

1.1.1.1 Interleukin-1 α

Die IL-1 α Vorstufe (IL-1 α_{pre}) verbleibt überwiegend intrazellulär und wird im Zytosol, assoziiert mit Zytoskelett-Strukturen (Mikrotubuli) vorgefunden (Stevenson et al., 1992). Immunhistochemische Markierung LPS-(Lipopolysaccharid; Endotoxin)-stimulierter humaner Makrophagen mit einem IL-1 α Antikörper zeigt eine gleichmäßige, diffuse Anfärbung von Zellen (Andersson et al., 1992). Normalerweise bleibt die IL-1 α Vorstufe auch nach starker Stimulierung zellassoziert (Lonnemann et al., 1989). Im Falle des Zelltodes kann sie freigesetzt und durch extrazelluläre Proteasen gespalten werden (Kobayashi et al., 1991). Ein kleiner Teil des IL-1 α_{pre} wird in humanen und murinen Monozyten und Makrophagen zur Oberfläche der Zellen transportiert, wo dieses Protein (vermutlich durch Mannose-spezifische Interaktion mit Lektinen) verankert wird (Kurt-Jones et al., 1985; Brody & Durum, 1989; Kaplanski et al., 1994). Auch humane glatte Gefäßmuskelzellen exprimieren IL-1 α auf der Zell-Oberfläche (Loppnow & Libby, 1992). Dieses membrangebundene IL-1 α wird als autokriner Aktivator betrachtet, der möglicherweise zur Aktivierung von Nachbarzellen beitragen kann und somit eine Rolle bei lokalen Entzündungsprozessen spielt. Ebenfalls wird vermutet, dass IL-1 α intrazelluläre Funktionen besitzt. So konnte gezeigt werden, dass ein IL-1 α_{pre} /IL-1 Rezeptor Komplex an DNA im Kern bindet (Weitzmann & Savage, 1992). Innerhalb der ersten 115 Aminosäuren der IL-1 α Vorstufe wurde eine Kernlokalisierungssequenz gefunden (Wessendorf et al., 1993). Transfektion von Endothelzellen mit einem Plasmid, das diese Sequenz enthielt, führte zur Lokalisation des entsprechenden IL-1 α im Kern und zur Beeinflussung der Proliferation der Zellen. Auch radioaktiv markiertes, rekombinantes, matures IL-1 α konnte als Komplex mit dem IL-1RI kernassoziert gefunden werden (Mizel et al., 1987; Curtis et al., 1990).

1.1.1.2 Interleukin-1 β

Wie IL-1 α wird auch IL-1 β als Vorstufe produziert, stellt aber die IL-1 Isoform dar, die vorwiegend von den Zellen abgegeben wird. Nach der Synthese bleibt der größte Teil der inaktiven 31 kDa IL-1 β Vorstufe zunächst im Zytosol (Singer et al., 1988). Erst nach der Prozessierung mit der IL-1 β Konvertase (ICE; IL-1 β converting enzyme; Caspase-1) wird das IL-1 β biologisch aktiv und abgegeben (Black et al., 1989; Kostura et al., 1989; Cerretti et al., 1992; Thornberry et al., 1992). Die IL-1 β Konvertase spaltet die IL-1 β Vorstufe proteolytisch zwischen den Aminosäuren Aspartat (Asp116) in Position P1 und Alanin (Ala117) in Position P2 und generiert die etwa 18 kDa große, aktive IL-1 β Form. Die IL-1 β Vorstufe kann von der Caspase-1 auch an einer zweiten Stelle prozessiert werden, wobei das entstehende Produkt 28 kDa groß ist (Kostura et al., 1989; Black et al., 1989). Auch andere, extrazelluläre Proteasen wie Trypsin (Matshushima et al., 1986) oder Elastase (Black et al., 1988) spalten die IL-1 β

Vorstufe und generieren aktives IL-1, das vermutlich zu Entzündungsprozessen beitragen kann.

1.1.1.3 IL-1 Rezeptor Antagonist

Ursprünglich wurde der IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1Ra) in Überständen kultivierter Monozyten detektiert (Arend et al., 1985) und zunächst als IL-1 Inhibitor bezeichnet. Ebenso wurde es im Urin von Patienten mit Fieber oder myelomonozytischer Leukämie gefunden (Balavoine et al., 1986; Seckinger et al., 1987). Isolierung und Charakterisierung des IL-1 Inhibitors zeigte, dass dieses 17 kDa (nach Glykosilierung 22-25 kDa) große Protein mit der gleichen Affinität wie die IL-1 Isoformen an die IL-1 Rezeptoren bindet, aber kein Signal induzieren kann. Dies führte zur Bezeichnung IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1Ra; Hannum et al., 1990). Die sekretierte IL-1Ra Form wird, außer in Monozyten, auch in polymorphonuklearen Neutrophilen (Re et al., 1993; Malyak et al., 1994), Hepatozyten (Gabay et al., 1997) und weiteren Zellen produziert. Es wurden 3 weitere humane IL-1Ra Isoformen beschrieben, die meist in der Zelle verbleiben. Sie werden als icIL-1Ra 1, 2 und 3 bezeichnet, während die ursprünglich beschriebene sekretierte Isoform als sIL-1Ra bezeichnet wird (Arend & Guthridge, 2000). Alle IL-1Ra Isoformen sind Produkte eines Gens. Die zuerst beschriebene intrazelluläre Isoform ic₁IL-1Ra entsteht durch alternatives transkriptionelles Spleißen, wodurch ein 18 kDa großes Protein ohne Signal-Sequenz produziert wird (Haskill et al., 1991). ic₁IL-1Ra wird in epithelialen Zellen, aber auch in Monozyten und Makrophagen gefunden. Es existieren Hinweise, dass diese Isoform an der Plasma-Membran der Keratinozyten exprimiert und zum Teil abgegeben wird (Corradi et al., 1995). Die zweite intrazelluläre Isoform, ic₂IL-1Ra, enthält ein 63 bp großes Insert zwischen dem ersten und zweiten Exon und wurde in Fibroblasten, Keratinozyten und myelomonozytischen Zellen nachgewiesen (Muzio et al., 1995). Die dritte intrazelluläre Isoform, ic₃IL-1Ra, wurde als 16 kDa Protein beschrieben, das durch ein alternatives Translatierungsstartkodon entsteht (Malyak et al., 1998a; Muzio et al., 1999). Diese Isoform wird von Hepatozyten und Neutrophilen produziert, wird aber auch in kleineren Mengen in Monozyten, Makrophagen oder Keratinozyten gefunden (Malyak et al., 1998b). ic₃IL-1Ra bindet an den IL-1RI mit 4- bis 5-fach niedrigerer Affinität als sIL-1Ra oder ic₁IL-1Ra und stellt somit ein verhältnismäßig schwachen Inhibitor der IL-1 Aktivität dar (Malyak et al., 1998a).

1.1.1.4 Interleukin-18

Interleukin-18 (IL-18) wurde ursprünglich als Interferon- γ induzierender Faktor (IGIF) aus der Leber von Mäusen isoliert, nachdem die Tiere mit *Propionibacterium acnes* und

anschließend mit LPS stimuliert wurden (Okamura et al., 1995). Darüber hinaus wird IL-18 unter anderen von aktivierten Makrophagen, Kupffer-Zellen (Okamura et al., 1995) und Monozyten (Akita et al., 1997) produziert. Es wurde gezeigt, dass IL-18 in Kooperation mit IL-12 die Interferon- γ (IFN- γ) Produktion in T, B, NK und Th1 Zellen induziert (Robinson et al., 1997). Das humane IL-18 Gen wurde auf dem Chromosom 11 lokalisiert (Nolan et al., 1998). Die Aminosäure-Sequenzhomologie zwischen murinem maturem IL-18 und humanem maturem IL-1 β beträgt etwa 19% (Ushio et al., 1996). Ebenso wie IL-1 β , besteht IL-18 aus 12 β -Faltblattstrukturen und wird als 24 kDa großes inaktives Vorstufenmolekül produziert, das keine typische Signal-Sequenz besitzt und durch Caspase-1 aktiviert wird (Gu et al., 1997; Ghayur et al., 1997). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass auch die Caspase-3 die IL-18 Vorstufe spaltet, die dabei entstehenden 16 und 15 kDa großen Produkte aber keine Aktivität besitzen (Akita et al., 1997).

IL-18 besitzt einen eigenen Rezeptor, der ein Heterodimer aus zwei Ketten (α und β) darstellt. Die α -Kette wurde ursprünglich als „IL-1 receptor-related protein“ (IL-1Rrp; Parnet et al., 1996; Torigoe et al., 1997) und die β -Kette als „accessory protein like (AcPL)“ (Born et al., 1998) beschrieben. Die α -Kette des IL-18 Rezeptors (IL-1Rrp) allein bindet IL-18 nur schwach. Die β -Kette besitzt keine Bindungsstellen für IL-18, verstärkt aber die IL-18 Bindungsaffinität der α -Kette und ist an der Signal-Übertragung beteiligt. Die humanen IL-1Rrp und AcPL Gene sind auf dem Chromosom 2 in einem Cluster mit den IL-1 Rezeptoren kolokalisiert. Aufgrund ihrer strukturellen Organisation gehören die beiden Proteine zur Familie der IL-1 Rezeptoren (Dale & Nicklin, 1999). Auch bei IL-18 wird die Signal-Übertragung über NF- κ B durchgeführt (Akira, 2000).

1.1.2 Proteine der Caspase Familie

Die IL-1 β Vorstufe wird durch die IL-1 β -Konvertase aktiviert. Mittlerweile wird dieses Enzym als Caspase-1 bezeichnet. Caspase-1 stellt das erste Mitglied einer Familie von Zysteinproteasen dar, die wichtige Funktionen in entzündlichen und apoptotischen Prozessen besitzen. Mittlerweile gehören dieser Familie 14 Caspasen an. Sie alle enthalten im aktiven Zentrum ein Cystein in einem QACXG-motif und spalten hinter dem Aspartat (Alnemri et al., 1996; Howard et al., 1991).

Ursprünglich wurde Caspase-1 aus der monozytären Zelllinie THP 1 als IL-1 β spaltendes Enzym isoliert und charakterisiert (Thornberry et al., 1992; Cerretti et al., 1992). Die Überexpression der Caspase-1 führte in Fibroblasten zur Auslösung der Apoptose (Miura et al., 1993). Dennoch ist Caspase-1 keine typische Apoptose-Caspase, sondern wird eher als an entzündlichen Prozessen beteiligt angesehen (Los et al., 1999; Loppnow et al., 2001).

Mittlerweile ist bekannt, dass die Caspase-1 auch IL-18 prozessiert (Gu et al., 1997; Ghayur et al., 1997). Caspase-1 wird als 45 kDa große Vorstufe exprimiert (p45). Die Abspaltung der N-terminalen Prodomäne (119 Aminosäuren; Met1 bis Asp119), sowie eines 18 Aminosäuren (Ser298 bis Asp316) langen Zwischenstücks führt zur Entstehung der ICEp20- (Asn120 bis Asp297) und ICEp10- (Ala317 bis His404) Untereinheiten des Enzyms. Die Kristallisierung des Enzyms im Komplex mit einem Tetrapeptid-Inhibitor zeigte, dass die aktive ICE ein Heterotetramer aus (p20)₂/(p10)₂ ist, in dem beide Untereinheiten an der Bildung des aktiven Zentrums beteiligt sind (Wilson et al., 1994; Walker et al., 1994). Die IL-1 β Konvertase enthält die Sequenz Asp-Asn bzw. Ala an ihren eigenen Prozessierungsstellen (Aminosäuren 119/120 und 316/317), was eine autoproteolytische Prozessierung oder Aktivierung durch andere Caspasen vermuten lässt. Hierbei könnte das CARD-Motif („caspase recruitment domain“) (Hofmann et al., 1997) beitragen, das sich in der N-terminalen Prodomäne der Caspase-1 befindet und zur Selbstassoziation führen kann. Man vermutet, dass ein weiteres Protein, CARDIAK (RIP-2; RICK) das ebenfalls ein CARD-Motif enthält, eine Rolle bei der Aktivierung der Caspase-1 spielt (Thome et al., 1998; McCarthy et al., 1998; Inohara et al., 1998). Alternativ könnte die Caspase-11 für die Aktivierung der Caspase-1 verantwortlich sein (Wang et al., 1998).

Ein weiteres Mitglied der Caspase Familie, die Caspase-3 (auch als CPP-32, Apopain oder Yama bekannt), besitzt eine Schlüsselrolle in der Apoptose (Fernandes-Alnemri et al., 1994). Zu den Substraten der Caspase-3 gehört das Reparaturenzym poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP), das bei DNA-Reparaturen mitwirkt (Tewari et al., 1995). Auch Zellstrukturproteine wie Fodrin (Martin et al., 1995) oder Gelsolin (Kothakota et al., 1997) werden gespalten. Es stellte sich heraus, dass ein wesentlicher Schritt im Rahmen der Einleitung der Apoptose durch Caspase-3 darin besteht, dass ein DNase Inhibitor (ICAD; „inhibitor of caspase-activated DNase“) ein Substrat der Caspase-3 ist. Die Spaltung des ICAD hebt die Blockierung der DNase auf, was zur Freisetzung der aktiven DNase führt (Enari et al., 1998).

1.1.3 Eine IL-1 β Prozessierungs-hemmende Aktivität in humanen Gefäßmuskelzellen

Die Produktion von aktivem IL-1 β wurde ursprünglich in monozytären Zellen beschrieben. Auch glatte Gefäßmuskelzellen (GMZ) produzieren IL-1 β . Allerdings prozessieren und sezernieren die GMZ das IL-1 β nicht, obwohl sie Caspase-1 enthalten. Diese Daten unserer Arbeitsgruppe führten zur Identifizierung einer Aktivität, die die IL-1 β Prozessierung inhibiert (IL-1 β Prozessierungs-hemmende Aktivität; Schönbeck et al., 1997). Es sind auch weitere Caspase Inhibitoren bekannt. Dazu gehören syntetische Peptide wie YVAD (Tyr-Val-

Ala-Asp) oder DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) (Cerretti et al., 1992; Thornberry et al., 1994; Miller et al., 1995), Inhibitoren viralen Ursprungs, wie die Serpine crmA oder serp2 (Ray et al., 1992; Petit et al., 1996) und andere virale Produkte (Baculovirus p35; Bump et al., 1995). Boudreau und Kollegen (Boudreau et al., 1995) berichteten über die Korrelation zwischen der Aktivität von Caspase-1 und der Expression der extrazellulären Matrix in epithelialen Zellen. Auch der Phosphorylierungsstatus (Cardone et al., 1998) und oxidative Modifikationen oder Nitrosylierung (Mohr et al., 1997) können die Aktivität der Caspasen beeinflussen. Weitere endogene Inhibitoren der Caspase-1, außer der IL-1 β Prozessierungs-hemmenden Aktivität in glatten Gefäßmuskelzellen (Schönbeck et al., 1997), sind nicht bekannt. Dem gegenüber sind Inhibitoren der apoptotischen Caspase-3, -7 und -9 (humane IAP's „inhibitors of apoptosis“; XIAP, c-IAP-1, c-IAP-2; Deveraux et al., 1997; Roy et al., 1997) beschrieben worden.

1.2 IL-1 und kardiovaskuläre Funktionen

IL-1 ist ein zentraler Mediator im Zytokin Netzwerk und induziert zahlreiche Funktionen (Dinarello, 1996) im Organismus. Auch verschiedene Funktionen kardiovaskulärer Zellen können durch IL-1 beeinflusst werden (Loppnow et al., 1998; Loppnow et al., 2001; Dinarello & Pomerantz, 2001). Hierzu zählen die Aktivierung der Expressierung von Adhäsionsmolekülen und der Zytokinproduktion im Rahmen entzündlicher Prozesse. Darüber hinaus ist bekannt, dass die Proliferation die Aktivierung der Apoptose und die Kontraktilität durch IL-1 beeinflusst wird.

IL-1 verstärkt die inflammatorische Antwort durch die Induktion weiterer Zytokine in Herzzellen (Müller-Werdan, 1998) und Gefäßzellen (Warner et al., 1987; Loppnow & Libby, 1990). Durch die Stimulierung der Chemokinproduktion oder der Expression von Adhäsionsmolekülen in Herzzellen (Kacimi et al., 1998) oder Gefäßzellen (Schönbeck et al., 1995) kann IL-1 indirekt zur Leukozyteninfiltration in das Gewebe und zur Aktivierung der Zellen des Gewebes beitragen. Außerdem stimuliert IL-1 die Proliferation von kultivierten Gefäßmuskelzellen (Libby et al., 1988; Beasley & Cooper, 1999), was im arteriosklerotischen Gewebe von Bedeutung sein könnte. Auch die Hypertrophie neonataler Kardiomyozyten in der Zellkultur (Palmer et al., 1995) wird durch IL-1 stimuliert. Darüberhinaus wurde IL-1 β auch als Auslöser der Apoptose in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte beschrieben (Arstall et al., 1999; Ing et al., 1999).

Die Kontraktion ist eine Funktion, die typisch für kardiovaskuläre Zellen ist. IL-1 kann die Kontraktion von Herz- und Gefäßzellen beeinflussen. So übt IL-1 negative Effekte auf die Kontraktion isolierter Herzen (Hosenpud et al., 1989) und vaskulärer glatter Gefäßmuskelzellen der Ratte aus (Beasley et al., 1989). Negativ inotrope Auswirkung hat IL-

1 auch auf isolierte Papillarmuskeln (Evans et al., 1993) und isolierte humane atriale Trabekel (Cain et al., 1999). Auch *in vivo*, zum Beispiel im Model des septischen Schocks beim Menschen, wird eine myokardiale Depression beobachtet. Dabei wird IL-1 β im Serum von septischen Patienten erhöht detektiert und ist einer der Mediatoren, die für die Kardiodepression verantwortlich sind, wie von Kumar und Kollegen gezeigt wurde (Kumar et al., 1996). Die gleichzeitige Elimination von IL-1 β und TNF- α aus dem Serum führte zur Aufhebung des inhibitorischen Effektes des Serums auf die Kontraktilität der neonatalen Ratten Kardiomyozyten *in vitro*. Auch das rekombinante IL-1 β allein wirkte in diesem System kardiodepressiv (Kumar et al., 1996). Diese negativ inotrope Wirkung von IL-1 auf Herz- und Gefäßzellen wird zum Teil durch eine erhöhte Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) oder zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) mediiert (Kumar et al., 1999). Aber auch andere Komponenten, wie zum Beispiel Sphingosin, spielen vermutlich bei der Vermittlung der Kontraktilitätssuppression eine Rolle (Oral et al., 1997). Da die kontraktile Funktion der kardialen Myozyten durch den Kalzium-Haushalt wesentlich beeinflusst wird, ist der Einfluß von IL-1 auf den Kalzium-Gehalt untersucht worden. Stimulierung neonataler Ratten Kardiomyozyten mit IL-1 führte zu erhöhten zellulären Kalzium-Konzentrationen (Bick et al., 1997). Im Einklang mit diesen Daten inhibierte IL-1 die Expression von Phospholamban (McTiernan et al., 1997) in kultivierten neonatalen Herzzellen.

Die oben genannten Informationen machen deutlich, dass IL-1 wesentliche Funktionen kardiovaskulärer Zellen beeinflussen kann. Hierbei könnte systemisch vorhandenes IL-1 aus dem Plasma (Paulus, 1999), aber auch endogenes IL-1 eine Rolle spielen. Es wurde bisher gezeigt, dass im Herzgewebe gesunder Kaninchen IL-1 vorhanden ist (Matsukawa et al., 1997). In Herzen von Patienten mit idiopatischer dilatativer Kardiomyopathie (IDCM) (Francis et al., 1998) und in koronaren Arterien von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) (Galea et al., 1996) wurde IL-1 β mRNA- und Protein-Exprimierung nachgewiesen. Dabei enthielten Gewebe-Proben der Patienten mit IDCM deutlich mehr IL-1 β mRNA in Vergleich zu den Proben der Patienten mit ICM (Francis et al., 1998). Shioi und Kollegen haben IL-1 β mRNA im Myokardium gesunder Mäusen gezeigt. Nach Injektion der Tiere mit dem Enzephalomyokarditis Virus im Rahmen eines experimentellen Tiermodells wurde die IL-1 β mRNA Expression im Herz stimuliert. Auch das IL-1 β Protein konnte im Herzgewebe der infizierten Tiere nachgewiesen werden (Shioi et al., 1996). IL-1 β wurde auch im Herzen von Patienten mit viraler Myokarditis (Satoh et al., 1996) und Hypertrophie (Shioi et al., 1997) detektiert.

1.3 Aufgabenstellung

Wie oben dargestellt wurde, ist IL-1 ein potenter Regulator kardiovaskulärer Funktionen. Die Aktivität des IL-1 kann nicht nur durch seine Expressierung reguliert werden. Abgesehen davon, dass zwei IL-1 Isoformen vorhanden sind, kann die IL-1 Aktivität auf weiteren Ebenen reguliert werden. So muss zum einen die inaktive IL-1 β Vorstufe durch die Caspase-1 erst aktiviert werden. Zum anderen kann die IL-1 Aktivität durch Expressierung des IL-1Ra bzw. löslicher Rezeptoren wie sIL-1RI, sIL-1RII, oder einer IL-1 β Prozessierungs-hemmenden Aktivität beeinflusst werden. Außerdem, ist auch die Zahl und Aktivität der IL-1 Rezeptoren der Ziel-Zelle entscheidend für die Aktivierung der Funktionen. Obwohl die endogene IL-1 β Expressierung im Herzen unter bestimmten pathologischen Bedingungen gezeigt worden war, war nicht klar, welche anderen Moleküle der IL-1 Familie im Herz exprimiert werden. Ebenso war unklar welche IL-1 Isoformen kardiale Myozyten exprimieren können.

Unser Ziel war es daher, die endogene Expressierung der Mitglieder der IL-1 und Caspase Familien in Herz- und Gefäßzellen zu vergleichen. Dabei konzentrierten wir uns auf folgende Fragen:

- Welche Zytokine der IL-1 Familie (IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, IL-1RI) und zweier Mitglieder der Caspase Familie (Caspase-1, Caspase-3) werden in humanem Herzgewebe und in kultivierten neonatalen Ratten Kardiomyozyten exprimiert?
- Existieren Unterschiede in der Expressierung der IL-1- und Caspase-Familienmitglieder in gesundem und kranken Herzgewebe?

Darüberhinaus sollte die vorher von uns in GMZ beschriebene IL-1 β Prozessierungs-hemmende Aktivität untersucht werden, da sie ein möglicher Regulator der IL-1 Funktionen in vaskulären Zellen ist. Im zweitem Teil der vorliegenden Promotionsarbeit sollte die Charakterisierung dieser Aktivität weitergeführt und folgende Fragen beantwortet werden:

- Wird auch die Prozessierung eines weiteren Substrates der Caspase-1, der IL-18 Vorstufe, durch diese Aktivität inhibiert?
- Wird auch die Aktivität der Caspase-3 beeinflusst?
- Ist es möglich Bindungsstellen des Inhibitors an der IL-1 β Vorstufe zu identifizieren?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Medien, Lösungen und Zusätze

Die Zellkulturmedien DMEM und RPMI 1640, CMRL 1415, die Medienzusätze L-Glutamin (200 mM), Penizillin/Streptomycin (10.000 I.E./10.000 µg/ml), PBS, Trypsin/EDTA-Lösung, sowie Kollagenase (CLS Typ II), Pferdeserum (HS) und fötales Kälberserum (FKS) für die Ratten Herzkultur wurden gebrauchsfertig von der Firma Biochrom (Berlin, Deutschland) bezogen. Fötales Kälberserum (FKS) für die Kultur der Gefäßmuskelzellen, Fibroblasten und 7TD1-Zellen wurde von der Firma Linaris (Bettingen a. M., Deutschland) geliefert und bei 56°C 30 Min im Wasserbad inaktiviert. Humanes Transferrin wurde bei Boeringer Mannheim (Mannheim, Deutschland) gekauft, Rinderinsulin und Rinderalbumin bei Sigma (Taufkirchen, Deutschland) und Aqua ad iniectabilia (steril und pyrogenfrei) bei Braun (Melsungen, Deutschland) bestellt. Guanidin-Isothiozyanat-Lösung (GITC), Reverse Transkriptase, Ribonuklease-Inhibitor und Taq-Polymerase wurden bei Gibco BRL (Karlsruhe, Deutschland); DNase I bei Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland); Oligo dT₁₂₋₁₈ und dNTP-mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) bei Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) und Pfu-Polymerase bei Stratagene Europe (Amsterdam, Niederlande) gekauft. „Nucleic Acid Qick Sticks“ wurden von Clontech (Heidelberg, Deutschland) bezogen, „QIAexpressTM Kit“, „Plasmid Purification Kit“ und das Ni-NTA Affinitäts-Chromatographie Material wurde von Quiagen (Hilden, Deutschland) geliefert. Weitere Lösungen oder Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Serva (Taufkirchen, Deutschland) oder Sigma (Diesenhofen, Deutschland) bezogen, wobei mindestens der Reinheitsgrad p.a. benutzt wurde.

2.1.2 Zytokine, Endotoxin und rekombinante Enzyme

Humanes rekombinantes, matures IL-1 α und IL-1 β , IL-6, TNF- α und IL-18 wurde von Cell Concept (Umkirch, Deutschland) geliefert. IL-1 α , IL-1 β und TNF- α der Ratte wurden bei R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland) gekauft. Rekombinante humane Caspase-1 lieferte Biomol (Hamburg, Deutschland), rekombinante humane Caspase-3 Pharmingen (Heidelberg, Deutschland). Endotoxin (Lipopolysacharid, LPS) von *Salmonella friedenaus* wurde freundlicherweise von Prof. Dr. H. Brade (Forschungszentrum Borstel, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

2.1.3 Antikörper

Tabelle 1. Verwendete Antikörper				
Antigen	Antigenherkunft	Quelle	Typ	Bezeichnung ¹
Anti-IL-1 β	Mensch	Maus	monoklonal	FIB-3
Anti-IL-1 α	Ratte	Ziege	polyklonal	AF500
Anti-IL-1 α	Ratte	Ziege	polyklonal	sc 1254
Anti-IL-1 β	Ratte	Ziege	polyklonal	sc 1252
Anti-IL-18	Mensch	Maus	monoklonal	MAB318
Anti-IL-18	Mensch	Ziege	polyklonal	AF318
Anti-PARP	Mensch	Maus	monoklonal	66401A
RGS·His	-	Maus	monoklonal	34610
ED1	Ratte	Maus	monoclonal	MCA341R
Maus Antikörper	Maus	Ziege	polyklonal Phosphatase-markiert	115-056-071
Maus Antikörper	Maus	Ziege	polyklonal Peroxidase-markiert	115-036-071
Ziegen Antikörper	Ziege	Kaninchen	polyklonal Phosphatase-markiert	305-055-006
Ziegen Antikörper	Ziege	Esel	polyklonal Peroxidase-markiert	sc 2020

- ¹ FIB-3 wurde von Dr. H. Herzbeck (Forschungszentrum Borstel, Deutschland) zur Verfügung gestellt;
 AF500, MAB318, AF318 wurden bei R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland) bezogen;
 sc 1254, sc 1252, sc 2020 wurden bei Santa Cruz (Santa Cruz, USA) bezogen;
 115-056-071, 115-036-071 und 305-055-006 wurden bei Dianova (Hamburg, Deutschland) bezogen;
 66401A wurde bei Pharmingen (Heidelberg, Deutschland) bezogen;
 34610 wurde bei Quiagen (Hilden, Deutschland) bezogen;
 MCA341R wurde bei Biozol (Eching b. München, Deutschland) bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung humaner und muriner Zellen

2.2.1.1 Humane vaskuläre Gefäßmuskelzellen

Humane vaskuläre Gefäßmuskelzellen (GMZ) wurden aus der *Vena saphena* isoliert. Diese ansonsten nicht benutzten Gewebe wurden freundlicherweise von Prof. Dr. R.-E. Silber (Universitätsklinik und Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie, Halle) zur Verfügung

gestellt. Die Gefäße wurden in heparinisiertem Eigenblut (1.000 I.E. Heparin/ml Blut) transportiert und spätestens 24 Std nach der Entnahme präpariert. Die Isolierung der GMZ erfolgte in Anlehnung an die Methode von Ross (Ross & Kariya, 1980). Hierzu wurden Adventitia und Intima der Gefäßwand entfernt. Aus der verbleibenden Media wurden etwa 2 x 2 mm große Gewebestücke präpariert und in Petrischalen überführt. Nach 10 Min wurde 6 ml GMZ-Kulturmedium (DMEM mit 1 g Glukose/l, 10% FKS, 1% Penizillin/Streptomycin und 1% L-Glutamin) zugefügt und die Petrischale bei 37°C und 7,5% CO₂ inkubiert (Loppnow et al., 1990). Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Erste auswachsende GMZ zeigten sich im mikroskopischen Bild nach etwa 10 Tagen. Nach Bildung eines konfluenten Zellrasens wurden die Gewebestücke entfernt und die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung (10 Min, 37°C) von den Kulturgefäßen abgelöst. Anschließend wurden Vitalität und Zellzahl nach Färbung mit Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer (Firma Brandt, Ludwigshafen, Deutschland) bestimmt. Die GMZ (3.000 Zellen/cm²) wurden in 182 cm²-Kulturflaschen der Firma Greiner (Frickenhausen, Deutschland) subkultiviert. GMZ wurden anhand des typischen „hill and valley“ Wachstums und Färbung mit α -SMZ-Aktin charakterisiert. In den Experimenten wurden GMZ der zweiten bis vierten Passage verwendet.

2.2.1.2 Humane Fibroblasten

Humane dermale Fibroblasten wurden, wie früher beschrieben (Loppnow et al., 1989), kultiviert. Die Zellen wurden wöchentlich trypsiniert und in 182 cm²-Kulturflaschen der Firma Greiner (Frickenhausen, Deutschland) in DMEM mit 4,5 g Glukose/l, 10% FKS, 1% Penizillin/Streptomycin, und 1% L-Glutamin bei 37°C und 7,5% CO₂ subkultiviert (2.800 Zellen/cm²).

2.2.1.3 Zelllinie „Jurkat“

Die Zellen wurden in 75 cm²-Kulturflaschen im RPMI 1640 unter Zugabe von 10% FKS, 1% Penizillin/Streptomycin und 1% L-Glutamin bei 37°C und 7,5% CO₂ subkultiviert. Die Zellsuspensionen wurden im Abstand von 2 bis 3 Tagen in frischem Medium subkultiviert (200.000 Zellen/ml).

2.2.1.4 Isolierung und Kultur neonataler Ratten Herzzellen

Neonatale Ratten Herzzellen wurden aus den Herzen ein- bis drei Tage alter Wistar-Ratten

nach der früher beschriebenen Methode isoliert (Werdan & Erdmann, 1989). Hierzu wurden die noch schlagenden Herzen nach Tötung der Tiere durch Genickbruch aseptisch entnommen und in kalter PBS-AG1-Lösung gespült. Danach wurden die Herzen mit Skalpellen in einer Trypsin- und Kollagenase-haltigen Lösung zerschnitten und bei 37°C unter schwachem Rühren 15 Min inkubiert. Nach Absetzen der Gewebestücke wurde der erste Überstand verworfen, neue Dissoziationslösung hinzugefügt und dieser Vorgang noch acht- bis zehnmal wiederholt. Die Überstände der Dissoziationsschritte wurden in Zentrifugenröhrchen pipettiert, die serumhaltiges CMRL-Wachstumsmedium enthielten und bis zum letzten Dissoziationsschritt auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurden die Röhrchen zentrifugiert (1.400 U/Min, 10 Min, Raumtemperatur), in serumhaltiges CMRL-Wachstumsmedium aufgenommen, in 175 cm² Kulturflaschen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) überführt und bei 37°C inkubiert (1,5 Std). In dieser Zeit adhärten die nicht-myozytären Zellen. Anschließend wurde der Überstand aus der Flasche entnommen, in 25 cm² Kulturflaschen oder 6-Loch Platten der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) in einer Konzentration von 120.000 Zellen/cm² ausgesät und bei 37°C kultiviert. Nach 24 Std wurden die Herzzellen mit serumfreiem CMRL-Wachstumsmedium versehen und nach weiteren 24 Std in serumfreiem Medium für die Versuche verwendet. Nach Ausbildung eines Zellrasens konnte man im mikroskopischen Bild die Kontraktion der Zellen erkennen.

PBS-AG1-Lösung (pH 7,4):	137,0	mM	NaCl
	2,7	mM	KCl
	10,6	mM	Na ₂ HPO ₄
	2,1	mM	KH ₂ PO ₄
	5,0	mM	Glukose
Dissoziationslösung:	0,03	%	Kollagenase CLS TypII
	0,12	%	Trypsin
			in PBS-AG1-Lösung
CMRL-Grundmedium (pH 7,4):	2,35	g/l	CMRL 1415
	135,00	mM	NaCl
	5,40	mM	KCl
	0,36	mM	NaH ₂ PO ₄
	1,30	mM	CaCl ₂
	0,97	mM	MgSO ₄
	1,40	mM	Na ₂ HPO ₄
	7,50	mM	D-Glukose
	10,00	mM	HEPES

Serumhaltiges CMRL-

Wachstumsmedium (pH 7,4):	10,0	%	Pferdeserum
	10,0	%	fötales Kälberserum
	40,0	mg/l	Gernebcin
			in CMRL-Grundmedium

Serumfreies CMRL-

Wachstumsmedium (pH 7,4):	25,0	µg/ml	Rinderalbumin
	25,0	µg/ml	Rinderinsulin
	25,0	µg/ml	humanes Transferrin
	40,0	µg/ml	Gernebcin
			in CMRL-Grundmedium

2.2.2 Herstellung von Zellkultur-Überständen und Zell-Lysaten

Zur Herstellung von Überständen und Lysaten wurden konfluente humane GMZ bzw. 2 bis 3 Tage alte Kulturen neonataler Ratten Herzzellen verwendet. Zunächst wurden die Zellen in Kulturflaschen unter den entsprechenden Bedingungen bei 37°C inkubiert. Die Überstände wurden anschließend abgenommen, zentrifugiert (300 x g, 10 Min, Raumtemperatur) und bei -20°C unter Zugabe von 5% FKS eingefroren. Zur Herstellung von Zell-Lysaten wurden Zellen durch Trypsin/EDTA-Lösung (10 Min, 37°C) abgelöst. Nach Zugabe von Medium wurden die Präparationen zentrifugiert (300 x g, 10 Min, Raumtemperatur) und einmal in PBS gewaschen. Humane GMZ (50.000 Zellen/µl) wurden in Aqua ad iniectabilia, Ratten Kardiomyozyten (1 x 10⁶ Zellen/ml) in DMEM mit 4,5 g Glukose/l, 10% FKS, 1% Penizillin/Streptomycin, und 1% L-Glutamin aufgenommen. Lysate wurden durch mehrmalige Einfrier-Auftau-Zyklen hergestellt. Die Lysate wurden bei -20°C gelagert.

2.2.3 Herstellung von Kernextrakten der „Jurkat“-Zellen

Zur Herstellung von Kernextrakten aus „Jurkat“-Zellen wurden 30 x 10⁶ Zellen kultiviert, zentrifugiert (300 x g, 10 Min, 4°C) und in 100 µM Na-Orthovanadat (in PBS) resuspendiert. Das Zell-Pellet wurde nach zweimaliger Zentrifugation (300 x g, 10 Min, 4°C) in 400 µl Puffer A aufgenommen, 20 Sek im Ultraschallbad beschallt und anschließend 30 Min auf Eis inkubiert. Nach kurzem Schütteln wurde die Präparation zentrifugiert (4.500 x g, 10 Min, 4°C) und das Pellet in 50 µl Puffer B resuspendiert. Während der nachfolgenden Inkubation auf Eis (20 Min) wurden die Ansätze alle 5 Min für 5 Sek gevortext. Nach erneuter Zentrifugation (15.000 x g, 2 Min, 4°C) wurde der Überstand gesammelt und bei -80°C eingefroren.

Puffer A (pH 7,9):	10,0	mM	HEPES-KOH
	1,5	mM	MgCl ₂
	10,0	mM	KCl
	0,5	mM	DTT
	0,2	mM	PMSF
	1,0	%	Na-Orthovanadat (0,1 M; pH 10,0)
	2,0	µg/ml	Pepstatin
	5,0	µg/ml	Aprotinin
	5,0	µg/ml	Leupeptin
Puffer B (pH 7,9):	20,0	mM	HEPES-KOH
	420,0	mM	NaCl
	1,5	mM	MgCl ₂
	0,2	mM	EDTA
	25,0	%	Glyzerol, v/v
	0,5	mM	DTT
	0,2	mM	PMSF
	1,0	%	Na-Orthovanadat (0,1 M; pH 10,0)
	2,0	µg/ml	Pepstatin
	5,0	µg/ml	Aprotinin
	5,0	µg/ml	Leupeptin

2.2.4 Zytokin-Nachweismethoden

2.2.4.1 Nachweis biologischer IL-6 Aktivität im 7TD1-Proliferationstest

Biologische Interleukin-6 Aktivität wurde mit Hilfe der IL-6-abhängigen murinen B-Zelllinie 7TD1 analysiert (Van Snick et al, 1986). Die 7TD1 Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10% FKS, 1% Penizillin/Streptomycin, und 1% L-Glutamin, 100 pg IL-6/ml und 0,5 µM β-Merkaptoethanol kultiviert. Die Kultur wurde wöchentlich dreimal umgesetzt (50.000 Zellen/ml). Für den Test wurden die Proben bzw. der IL-6 Standard (10 ng/ml) in Flachboden-Mikrotiterplatten in 50 µl 7TD1-Verdünnungsmedium (RPMI 1640, 2% FKS, 1% Penizillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin) in 1:4 Schritten seriell verdünnt. Anschließend wurden die 7TD1-Zellen zweimal zentrifugiert (150 x g, 10 Min) und in Zellmedium (RPMI 1640 mit 18% FKS, 1% Penizillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin, 1,0 µM β-Mercaptoethanol) aufgenommen. 50 µl dieser Zellsuspension (40.000 Zellen/ml) wurden zu 50 µl der Probe bzw. des Standards gegeben. Nach 72 Std (37°, 7,5% CO₂) wurden 10 µl

MTT-Lösung/Loch (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid; 5 mg/ml in PBS mit $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$) für weitere 4 Std hinzugegeben. Anschließend wurden 100 µl Stop-Lösung/Loch (5% SDS, 50% Dimethylformamid) hinzugegeben und die Extinktion der Proben im ELISA-Meßgerät (Spectra Fluor, Tecan, Berlin, Deutschland) bei 540 nm bestimmt. Die IL-6 Aktivität der Proben wurde anhand eines IL-6 Standards (10 ng/ml) berechnet.

2.2.4.2 Nachweis biologischer IL-1 Aktivität im Fibroblasten-Proliferationstest

Dieser Test wurde zur Messung biologischer IL-1 Aktivität eingesetzt. Die Fibroblasten waren früher aus humaner Vorhaut isoliert und eingefroren worden (Loppnow et al, 1989). Zur Durchführung der IL-1 Messung wurden die Zellen aufgetaut und in DMEM mit 4,5 g Glukose/l, 10% FKS, 1% Penizillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin kultiviert. Für den Test wurden die Zellen trypsiniert und in Flachboden-Mikrotiterplatten in 100 µl Medium (5.000/Loch) kultiviert. Nach 24 Std wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, anschließend wurden die Proben bzw. der entsprechende IL-1 Standard aufgetragen und in 1:4 Schritten seriell verdünnt. Nach 96 Std (37°C, 7,5% CO_2) wurde der Überstand entfernt und die Kulturen nach dreimaligem Waschen mit Leitungswasser 3 Min mit 3% Formaldehyde fixiert. Nach viermaligem Waschen mit Wasser wurden die Zellen mit 0,2% Kristal-Violett (Serva, Taufkirchen, Deutschland) in 10% Methanol (50 µl/Loch) 10 Min inkubiert und anschließend 5 x mit Wasser gewaschen. Zum Schluss wurden die Zellen in 100 µl 0,5% SDS-Lösung 30 Min lysiert. Im ELISA-Meßgerät wurde die Extinktion der Proben bei 570 nm bestimmt. Die IL-1 Aktivität der Proben wurde anhand eines IL-1 Standards (10 ng/ml) berechnet.

2.2.5 Biochemische und immunbiochemische Protein-Nachweismethoden

2.2.5.1 SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese wurde in „Vertikal Elektrophorese Kammern“ der Firmen Hoefer Pharmacia Biotech (San Francisco, USA) oder Phase (Lübeck, Deutschland) mit 5%-igen Sammelgelen und 10%-igen bzw. 15%-igen Trenngelen durchgeführt. Hierzu wurden die im folgenden beschriebenen Lösungen und Puffer verwendet (Tabelle 2, nächste Seite).

	Trenngel		Sammelgel
	10%	15%	5%
Wasser	12,500	7,500	4,900
Gelpuffer I	7,500	7,500	----
Gelpuffer II	----	----	2,000
Acrylamid-Lösung	10,000	15,000	1,400
APS-Lösung	0,150	0,150	0,083
TEMED	0,015	0,015	0,011

Gel-Puffer I (pH 8,8):	1,5	M	Tris
	0,4	%	SDS (w/v)
Gel-Puffer II (pH 6,8):	0,5	M	Tris
	0,4	%	SDS (w/v)
Acrylamid-Lösung: (Rothiphorese Gel 30)	30,0	%	Akrylamid
	0,8	%	Bisakrylamid
APS-(Ammoniumpersulfat)-Lösung:	0,1	%	Ammoniumpersulfat
Proben-Puffer:	1,25	ml	Gel-Puffer II
	1,00	ml	Glyzerol
	1,00	ml	2,3% SDS
	750,00	µl	β-Merkaptoethanol
	200,00	µl	Bromphenolblau (1 mg/ml)
Elektrophoresepuffer (pH 8,3):	25,0	mM	Tris-HCl
	200,0	mM	Glyzin
	1,0	g/l	SDS

Zur elektrophoretischen Trennung von Proteinen wurden 25 µl Probe mit 15 µl Proben-Puffer gemischt, 5 Min auf 95°C erhitzt und zentrifugiert (13.000 x g, 10 Sek). Anschließend wurden 35 µl dieser Lösung aufgetragen. Die Elektrophorese Kammer wurde mit Elektrophoresepuffer gefüllt und zunächst bei 90 V (30 Min) und anschließend bei 120 V getrennt. Zur Molekulargewichtsbestimmung dienten farbig markierte Proteinmischungen der Firma Amersham Pharmacia (Freiburg, Deutschland) mit den in der Tabelle 3 angegebenen Molekulargrößen. Die Gele wurden im Western Blot oder bei der Proteinfärbung weiterbearbeitet.

Tabelle 3. Komponenten der Molekulargewichtsmarker

Proteine	Größe (kDa)	Farbe	Proteinmischung	
			Rainbow N756	Rainbow N755
Myosin	220,0	blau	+	-
Phosphorylase b	97,4	braun	+	-
Rinderserum-Albumin	66,0	rot	+	-
Ovalbumin	46,0	gelb	+	+
Carboanhydrase	30,0	orange	+	+
Trypsininhibitor	21,5	blau	+	+
Lysozym	14,3	rot	+	+
Aprotinin	6,5	hellblau	-	+
Insulin (β -Kette)	3,4	dunkelblau	-	+
Insulin (α -Kette)	2,4	dunkelblau	-	+

+ in der Proteinmischung vorhanden

- in der Proteinmischung nicht vorhanden

2.2.5.2 Färbung der SDS-Polyakrylamid-Gele

2.2.5.2.1 Färbung mit Coomassie-Blau

Zur Färbung der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden die Gele zunächst in der Coomassie-Färbelösung fixiert und gefärbt (1 Std). Danach wurden die Gele 1 Stunde in der Entfärbelösung und anschließend 2 Stunden in Glycerin (10%) geschwenkt. Die gefärbten Gele wurden zwischen 2 Zellophan-Folien im Trockenschrank getrocknet (2 Std, 50°C).

Coomassie-Färbelösung:

10,0	ml	Essigsäure
40,0	ml	Methanol
0,1	g	Coomassie-Blau
ad 100	ml	H ₂ O

Entfärbelösung:

25,0	ml	Essigsäure
5,0	ml	Methanol
ad 100	ml	H ₂ O

2.2.5.2.2 Western Blot

Die Proteine wurden im "semi-dry" Verfahren ("Fastblot"; Biometra, Göttingen, Deutschland) von dem Polyakrylamidgel auf eine Nitrozellulose Membran (Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland) übertragen. Hierzu wurde eine zuvor in Towbin-Puffer äquilibrierte Membran auf 3 Lagen mit Towbin-Puffer angefeuchtete Whatmann-Filterpapiere (Whatmann 3MM) luftblasenfrei aufgelegt. Anschließend wurde das Gel luftblasenfrei auf die Membran aufgebracht. Das Gel wurde dann mit 3 Lagen Filterpapier bedeckt und die Proteine für 1 Std transferiert (1 mA/cm^2 – Gelfläche).

Towbin-Puffer (pH 8,3):	25	mM	Tris-HCl
	150	mM	Glyzerol
	20	%	Methanol

Zur spezifischen Färbung der transferierten Proteine mit Antikörpern wurden die Membranen zunächst mit 15% Rinderserum-Verdünnungs-Puffer (RS-Puffer) 1 Stunde blockiert. Anschließend wurden sie mit dem primären Antikörper (in RS-Puffer) inkubiert (1 Std). Nach dreimaligem Waschen der Membran mit Tris-Wasch-Puffer wurde der entsprechende Peroxidase-markierte Sekundärantikörper in RS-Puffer zugegeben (1 Std). Ungebundener Sekundärantikörper wurde durch erneutes dreimaliges Waschen (Tris-Wasch-Puffer) entfernt und die Anwesenheit spezifischer Proteine durch die Inkubation mit der Substratlösung sichtbar gemacht. Die Farbenentwicklung wurde durch Waschen mit Leitungswasser gestoppt. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Im IL-18 oder RGS-His Western Blot wurde 5% Trockenmilch (IL-18) bzw. 3% Rinderserum (RGS-His) statt 15% Rinderserum verwendet und die Waschschrte erfolgten im TBS-Tween-Triton Puffer.

Rinderserum-Verdünnungs-Puffer (pH 7,2):	15,00	%	Rinderserum
	0,01	%	Thimerosal (w/v)
	0,05	%	Tween 20
	150,00	mM	NaCl
	10,00	mM	NaH ₂ PO ₄

Tris-Wasch-Puffer (pH 8,0):	10,00	mM	Tris-HCl
	0,05	%	Tween 20
	0,01	%	Thimerosal (w/v)

TBS-Buffer (pH 7,5):	10,0	mM	Tris-HCl
	150,0	mM	NaCl

TBS-Tween-Triton Buffer (pH 7,5):	20,00	mM	Tris-HCl
	500,00	mM	NaCl
	0,05	%	Tween 20
	0,20	%	Triton
Entwicklungslösung für Immunoblots:	50,0	ml	Substrat-Puffer
	50,0	mg	Diaminobenzidin
	1,0	mg	Kobalt-Chlorid
	100,0	µl	Wasserstoffperoxid (30%)
Substrat-Puffer (pH 6,3):	17,00	mM	Zitronensäure
	65,00	mM	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
	0,01	%	Thimerosal (w/v)

2.2.5.3 Nachweis von Zytokinen im ELISA

Humanes IL-18 und Ratten IL-1 β in Kultur-Überständen und Zell-Lysaten der entsprechenden Zellen wurden in kommerziellen ELISA-Kits (Humanes IL-18: Kat.-Nr. 850.110.096; Hölzel Diagnostika, Köln, Deutschland; Ratten IL-1 β : Kat.-Nr. KRC0012, Biosource, Solingen, Deutschland) quantifiziert. Die ELISA Messungen wurden entsprechend der Anleitungen der Hersteller durchgeführt.

2.2.5.4 Immunhistochemische Färbungen

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf „chamber slides“ der Firma Nunc kultiviert. Die auf den Objektträgern angewachsenen Zellen wurden fixiert (20 Min; 4% PFA in PBS; Raumtemperatur) und anschließend mit PBS gewaschen (10 Min, 3-fach). Die Blockierung erfolgte mit 1% BSA in PBS (1 Std bei Raumtemperatur). Die Antikörper wurden in 0,1% Saponin in PBS verdünnt. Fixierte Zellen wurden zunächst mit dem ersten Antikörper (2 Std; Raumtemperatur) inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen (5 Min). Danach erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem mit alkalischer Phosphatase-markierten sekundären Antikörper. Nach einem Waschschrift mit NBT/BCIP Puffer (5 Min) wurde frisch zubereitete Lösung (2% NBT/BCIP Substratlösung in NBT/BCIP Puffer) auf die Objekt-Träger gegeben (5 bis 10 Min). Unverdünnte NBT/BCIP Substratlösung wurde gebrauchsfertig bezogen (Roche Diagnostics; Mannheim, Deutschland). Zum Stoppen der Reaktion wurden Objekt-Träger in NBT/BCIP Puffer eingetaucht. Die gefärbte Zellen wurden in 75% Glyzerol in PBS eingeschlossen.

PBS (pH 7,2):	135,0	mM	NaCl
	3,0	mM	KCl
	1,5	mM	KH ₂ PO ₄
	8,0	mM	Na ₂ HPO ₄
NBT/BCIP Puffer:	0,10	M	Tris-Puffer, pH 9,5
	0,05	M	MgCl ₂
	0,10	M	NaCl

2.2.6 Molekularbiologische Methoden

2.2.6.1 RNA-Isolierung

Die Gesamt RNA von Zellen wurde nach der Methode von Chomczynski (Chomczynski & Sachi, 1987) isoliert. Hierzu wurden die Zellen ($0,4 - 0,8 \times 10^6/\text{ml}$) in Guanidin-Isothiozyanat-Lösung aufgenommen, die 2% β -Merkaptoethanol enthielt (GITC-Lösung). Anschließend wurde das gleiche Volumen wassergesättigtes Phenol, $1/10$ Volumen Natrium-Acetat (2 M; pH 4,0) und $1/10$ Volumen Chloroform-Isoamylalkohol hinzugefügt, 15 Min auf Eis inkubiert und die Ansätze zentrifugiert ($10.000 \times g$, 20 Min, 4°C). Die RNA wurde durch Zugabe von Isopropanol (2,5 Volumen) präzipitiert (2 Std, -20°C). Die Präzipitate wurden erneut in GITC-Lösung (0,5 ml) aufgenommen und wiederum mit Isopropanol präzipitiert. Nach dem Waschen ($10.000 \times g$, 10 Min, 4°C) mit Ethanol (70%) wurde das Pellet in TE-Puffer aufgenommen. Anschließend wurde die RNA mit DNase I inkubiert (10 Einheiten in 100 μl 0,1 M Natriumacetat, 5 mM MgSO₄, pH 5,0; 30 Min; 37°C). Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 100 μl Phenol (pH 4,5-5,0) abgebrochen. Nach einer Zentrifugation ($13.000 \times g$, 10 Min, 4°C) wurde die wässrige Phase mit Chloroform inkubiert (200 μl) und erneut zentrifugiert ($13.000 \times g$, 10 Min, 4°C). Die RNA wurde aus der wässrigen Phase unter Zugabe von $1/10$ Volumen Natrium-Acetat (3M; pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol (96%) präzipitiert ($13.000 \times g$, 20 Min, 4°C) und anschließend mit Ethanol (70%) gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen. Die Quantifizierung der präparierten RNA-Menge erfolgte durch Bestimmung der OD bei 260 nm. Die RNA (10 μl) wurde im gleichen Volumen Probenpuffer auf ein denaturierendes Polyakrylamidgel aufgetragen und nach anschließender Färbung des Gels mit Ethidiumbromid (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) im UV-Transilluminator bei 260 nm überprüft.

TE-Puffer (pH 7,4):	10,0	mM	Tris
	1,0	mM	EDTA-Na ₂
TBE-Puffer:	89,0	mM	89 mM Tris-Borat
	2,0	mM	EDTA
Denaturierendes			
Poliakrylamidgel:	1	x	TBE-Puffer
	7,0	M	Harnstoff
	5,0	%	Akrylamid
	0,1	%	APS
	3,5	%	TEMED, v/v
Probenpuffer (2x konzentriert):	2,00	x	TBE-Puffer
	7,00	M	Harnstoff
	20,00	%	Saccharose, w/v
	0,05	%	Bromphenol, w/v

Die verwendeten Puffer bzw. das Wasser, das zur Herstellung von Tris-haltigen Puffern Verwendung fand, wurden vor der Verwendung mit Diethylpyrocarbonat (0,1%) inkubiert (12 Std, 37 °C) und anschließend autoklaviert.

2.2.6.2 Reverse Transkriptase-Reaktion (RT)

Zur Herstellung von cDNA aus RNA wurde 1 µg Gesamt RNA zunächst 10 Min mit 0,5 µg Oligodesoxy-Thymidin in 11,5 µl H₂O inkubiert (70°C). Anschließend wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (5.000 x g, 1 Min, Raumtemperatur). Danach wurden 4 µl „first strand buffer“ (5-fach), 2 µl DTT (0,1 M), 0,5 µl Ribonuklease-Inhibitor (10 U/µl), 1 µl Desoxynukleotid-Lösung (10 mM) zugegeben und inkubiert (2 Min, 42°C). Anschließend wurde Reverse Transkriptase (SuperScriptTM II; 200 U) hinzugegeben und die Ansätze inkubiert (50 Min, 42°C). Die Reaktion wurde durch Erhitzen beendet (10 Min, 70°C). Die so entstandenen RT-Produkte wurden mit H₂O verdünnt (1:5) und bei -70°C gelagert.

2.2.6.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde zum Nachweis von mRNA und zur Herstellung von DNA-Fragmenten zur Klonierung eingesetzt. Dabei wurden die

Taq-Polymerase bzw. die Pfu-Polymerase eingesetzt. Die Anwesenheit genomischer DNA in den RNA-Präparationen wurde durch nicht revers transkribierte RNA-Präparationen ausgeschlossen. Die Anwesenheit von RNA in den Proben wurde durch PCR-Experimente mit β -Aktin oder 18S RNA RT-PCR dargestellt. Zur Optimierung der Primer wurden zunächst die RT-PCR Reaktionen optimiert und die geeigneten Zyklenzahlen für jedes Primer-Paar bestimmt, um nicht die Plateu Phase der Amplifizierung zu erreichen. In Abbildung 1 ist exemplarisch die Ermittlung der optimalen Zyklenzahl am Beispiel des Primer-Paares für die 18S RNA dargestellt. Dieses Gen wurde als Positivkontrolle verwendet. Die Bande bei 345 bp stellt das erwartete spezifische RT-PCR Produkt dar (Abbildung 1A). Die Intensität der Banden wurde densitometrisch mit Hilfe eines Gelauswertesystems (AIDA) quantifiziert und zeigt für dieses Primer-Paar eine lineare Beziehung im Bereich von 17 bis 23 Zyklen (Abbildung 1B). Die weiteren Primer-Paare wurden ebenso bearbeitet. Die RT-PCR's wurden anschließend mit Zyklenzahlen durchgeführt, die im linearen Bereich lagen. Die optimalen Zyklenzahlen für die verwendeten Primer-Paare sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

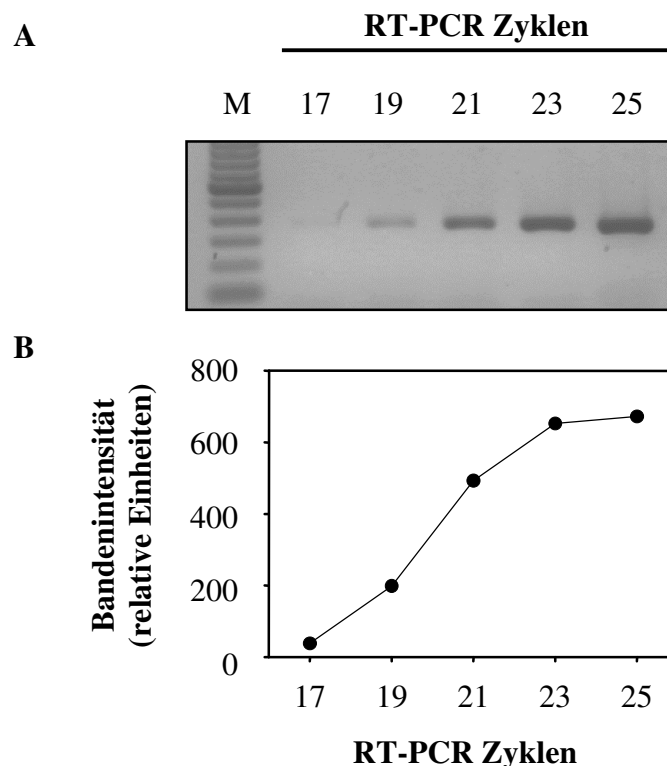


Abbildung 1: Ermittlung der optimalen Zyklenzahl für die RT-PCR am Beispiel des Primer-Paares für 18S RNA. A: cDNA aus unstimulierten Ratten Kardiomyozyten wurde mit dem Primer-Paar für 18S RNA in 60 μ l PCR-Ansätzen amplifiziert. Aliquots (10 μ l) wurden nach 17, 19, 21, 23 und 25 Zyklen entnommen und in einem 1,6%-igen Agarosegel analysiert. **B:** Das Negativ der Polaroid-Aufnahme wurde im Durchlicht-Scanner analysiert. Die Intensität der spezifischen Banden wurde mit Hilfe der „AIDA“ Software bestimmt und graphisch dargestellt (Bandenintensität).

RT-PCR mit der Taq-Polymerase: Für die Standard RT-PCR zum RNA-Nachweis wurde die Taq-Polymerase verwendet. Die PCR wurde mit jeweils 5 µl RT-Produkt bzw. Bakterienlysat transformierter Bakterien durchgeführt, zu dem je 1,5 µl spezifische Primer („sense“ und „antisense“; je 100 pM), 5 µl PCR-Puffer (10-fach), 1,5 µl Magnesiumchlorid Lösung (50 mM), 2 µl dNTP Lösung (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; je 10 mM) und 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) in einem Gesamtvolumen von 50 µl auf Eis gegeben wurden. Die Ansätze wurden zunächst im „Thermocycler“ 150 Sek bei 94°C erhitzt und die darauf folgende PCR-Reaktionen nach vier verschiedenen Protokollen durchgeführt.

Protokoll A: Denaturierung: 94°C, 30 Sek
 Hybridisierung: 30 Sek, die Hybridisierungstemperatur (HT) für die verschiedenen Primer-Paare ist der Tabelle 4 zu entnehmen
 Elongation: 72 °C, 90 Sek, mit 2 Sek Verlängerung pro Zyklus (die Zyklen-Zahl für die verschiedenen Primer-Paare ist der Tabelle 4 zu entnehmen)

Protokoll B: Dieses Protokoll gleicht dem Protokoll A, lediglich die Hybridisierungszeit ist auf 90 Sek erhöht

Protokoll C: **1. Schritt** (10 Zyklen)
 Denaturierung: 94°C, 30 Sek
 Hybridisierung und Elongation: bei gleichbleibender Hybridisierungszeit (60 Sek) wurde die Hybridisierungstemperatur, die im 1. Zyklus 66°C betrug, nach jedem Zyklus um 1°C bis auf 57°C im 10. Zyklus reduziert

2. Schritt (die Zyklen-Zahl für die verschiedenen Primer-Paare ist der Tabelle 4 zu entnehmen)

Denaturierung: 94°C, 30 Sek
 Hybridisierung: 56°C, 30 Sek
 Elongation: 72°C, 90 Sek, wobei 2 Sek Verlängerung pro Zyklus eingeführt wurden

Protokoll D: Denaturierung: 94°C, 30 Sek
 Hybridisierung: 60°C, 30 Sek
 Elongation: 72 °C, 30 Sek (Die jeweilige Zyklen-Zahl der Elongation ist der Tabelle 4 zu entnehmen)

RT-PCR mit der Pfu-Polymerase: Zur Herstellung von cDNA-Fragmenten für Klonierungen wurde die Pfu-Polymerase verwendet. Die Reaktion wurde mit 5 µl RT-Produkt durchgeführt, zu dem auf Eis 1,5 µl sequenzspezifische Primer („sense“ und „antisense“, beide 100 pM), 5 µl PCR-Puffer (10-fach; „cloned Pfu buffer“), 2 µl dNTP Lösung (dATP, dCTP, dGTP,

dTTP; je 10 mM) und 1 µl „cloned Pfu polymerase“ (2,5 U) gegeben wurden (Gesamtvolumen 50 µl). Es wurden die gleichen Protokolle wie für die Taq-Polymerase verwendet, lediglich die Elongationszeit wurde von 30 bzw. 90 Sek auf 2 Min erhöht und es wurde 2 Sek Verlängerung pro Zyklus hinzugefügt.

Tabelle 4. PCR Bedingungen						
Primer-Paar ^A	Spezies	Produkt (bp)	Protokoll	HT ^B (°C)	Zyklen-Zahl	µl RT in 50 µl PCR- Ansatzes
Actin	Mensch	855	A	50	28	5
IL-1α	Mensch	817	A	56	30	5
IL-1β	Mensch	1096	A	50	29	5
IL-1β [M1/E212]*	Mensch	658	C	56	20	5
IL-1β [M71/E212]*	Mensch	448	C	56	20	5
IL-1β [M71/STOP271]*	Mensch	622	C	56	20	5
IL-1β [M1/P139]*	Mensch	439	C	56	20	5
IL-1Ra	Mensch	465	C	56	23	5
IL-18	Mensch	604	B	60	30	10
IL-1RI	Mensch	372	C	56	21	5
ICE	Mensch	880	C	56	22	10
CPP-32	Mensch	857	B	64	30	5
18S RNA	Mensch; Ratte	348 349	D	60	21 20	5
IL-1α	Ratte	581	A	61	30	5
IL-1β	Ratte	621	A	63	30	5
IL-1Ra	Ratte	391	C	56	22	5
IL-18	Ratte	487	A	60	31	5
IL-1RI	Ratte	362	A	62	27	5
ICE	Ratte	900	A	60	31	10
CPP-32	Ratte	782	A	61	29	5
pQE-30 ^c	-	-	A	56	30	5

- A - Die Primer-Paare werden nach dem Gen, für das sie spezifisch sind, bezeichnet
- B - HT, Hybridisierungstemperatur
- C - Klonierungsvektor-spezifisches Primer-Paar
- * - Primer für Klonierung (Klammern: erste und letzte Aminosäure)

Zur Analyse der PCR-Produkte wurden 10 µl der RT-PCR-Reaktionen mit 3 µl Auftragungspuffer versetzt und nach Auftrennung im Agarosegel (1,6%) unter dem UV-Transilluminator photographiert. Zur Bestimmung der cDNA-Fragmentlänge wurde ein Molekulargewichtsstandard („100 base-pair ladder“, Kat. Nr. 15628-019; Gibco BRL) benutzt.

Auftragungspuffer (6x):	0,2	%	Bromphenolblau
	0,2	%	Xylene Cyanol FF
	60,0	%	Glyzerol
	60,0	mM	EDTA

Agarosegel:	1,60	%	(w/v) Agarose
	0,25	µg/ml	Ethidiumbromid
	10,00	%	TBE-Puffer (5x)

TBE-Puffer (5x)	0,45	M	Tris-Borat
	0,01	M	EDTA

Primer Sequenzen: Die Auswahl der verwendeten Primer wurde anhand publizierter Sequenzen (GenBank) mit der Software „Amplify“ durchgeführt. Hierbei wurden Primer ausgewählt, die weder zur Homo- noch Heterodimerbildung neigen, vergleichbare Hybridisierungstemperaturen aufweisen und spezifisch für die betreffende Sequenz sind. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in den Tabellen 5a, 5b und 5c) in 5'-3'-Orientierung dargestellt. Die zur PCR benötigten Primer wurden von Firma MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Tabelle 5a. Primer für den RNA Nachweis humaner Sequenzen				
Gen	Primer ^A	Sequenz ^B	Pos. ^C	„Accession no.“
β-Aktin	S	GTC-AGA-AGG-ATT-CCT-ATG-TGG	432	NM_001101
	AS	GGA-GCA-ATG-ATC-TTG-ATC-TTC	1284	
18S RNA	S	GTT-GGT-GGA-GCG-ATT-TGT-CTG-G	1614	X03205
	AS	AGG-GCA-GGG-ACT-TAA-TCA-ACG-C	1959	
IL-1α	S	ATG-GCC-AAA-GTT-CCA-GAC-ATG	37	M28983
	AS	TAC-GCC-TGG-TTT-TCC-AGT-ATC-TG	851	
IL-1β	S	GAG-GAT-GAC-TTG-TTC-TTT-GAA-G	131	K02770
	AS	GTT-GCT-CAT-CAG-AAT-GTG-GGA-G	1234	
IL-1Ra	S	ATG-GCT-TTA-GAG-ACG-ATC-TGC	123	M55646 X52015 M55646 X52015
	AS	AGT-AGA-ATT-TGG-TGA-CCA-TGA-C	85	
			585	
			540	
IL-18	S	ATATGGATCC-ATG-GCT-GCT-GAA-CCA-GTA-G	178	D49950
	AS	ATATCTGCAG-CTA-GTC-TTC-GTT-TTG-AAC-AG	759	
IL-1RI	S	ATG-AGA-CAA-TGG-AAG-TAG-AC	780	M27492
	AS	TAG-ATG-AAA-ACA-GAA-CAC-AC	1149	
ICE	S	ATATGGATCC-GAC-AAC-CCA-GCT-ATG-CCC	362	X65019
	AS	ATATCTGCAG-ATG-TCCTGG-GAA-GAG-GTA	1219	
CPP-32	S	ATA-AAG-GGA-TCC-ATG-GAG-AAC-ACT-GAA-AAC-TCA-G	341	U13737
	AS	AAC-CTG-CAG-TTA-GTG-ATA-AAA-ATA-GAG-TTC-TTT-TGT-GAG-C	1195	

^A - S, sense; AS, antisense

^B - Sequenz in 5' - 3' Orientierung

^C - 5' Position des Primers in der unter der GenBank „Accession no.“ angegebenen Sequenz

Gen	Primer ^A	Sequenz ^B	Pos. ^C	„Accession no.“
18S RNA	S	GTT-GGT-GGA-GCG-ATT-TGT-CTG-G	1476	X01117
	AS	AGG-GCA-GGG-ACT-TAA-TCA-ACG-C	1822	
IL-1 α	S	ATC-AGC-ACC-TCA-CAG-CTT-CCA-G	482	D00403
	AS	TCA-GCA-CAT-GCC-ATG-CGA-G	1060	
IL-1 β	S	AGC-TGC-ACT-GCA-GGC-TTC-GAG	575	M98820
	AS	AGG-CAG-GGA-GGG-AAA-CAC-ACG	1193	
IL-1Ra	S	AGA-CCT-TCT-ATG-TGA-GGA-ACA-ACC	241	M63101
	AS	TTC-CTG-GAA-GTA-GAA-CTT-TGT-GAC	629	
IL-18	S	ATG-GCT-GCA-ATA-CCA-GAA-GAA-G	127	AJ222813
	AS	CAA-GCT-AGA-AAG-TGT-CCT-TCA-TAC-AG	611	
IL-1RI	S	CGA-TCC-AAT-CCT-AGC-CGA-AGA-C	1352	M95578
	AS	AGA-ACA-TAG-GCA-TCA-TAG-GTC-CTT-C	1711	
ICE	S	AGA-AAT-TCT-GGA-GCT-TCA-GTC-AG	414	U14647
	AS	CTG-TAG-TCT-AGA-GTC-TGG-TTG-TTC-G	1311	
CPP-32	S	ATC-AAA-GCT-TAG-TGT-CCT-GAG-GTG	143	U58656
	AS	TCC-TTC-CGG-TTA-ACA-CGA-GTG	922	

^A - S, sense; AS, antisense

^B - Sequenz in 5' - 3' Orientierung

^C - 5' Position des Primers in der unter der GenBank „Accession no.“ angegebenen Sequenz

Gen	Primer ^A	Sequenz ^B	Pos. ^C	„Accession no.“
pQE-30	S	GAA-TTC-ATT-AAA-GAG-GAG-AAA	-93*	-
	AS	ATC-CAG-ATG-GAG-TTC-TGA-GG	217*	-
IL-18	S	ATAT <u>GGATCC</u> -ATG-GCT-GCT-GAA-CCA-GTA-G	178	D49950
	AS	ATAT <u>CTGCAG</u> -CTA-GTC-TTC-GTT-TTG-AAC-AG	759	
IL-1 β (M1)	S	ATAT <u>GGATCC</u> -ATG-GCA-GAA-GTA-CCT-GAG-CTC	87	K02770
IL-1 β (M71)	S	ATAT <u>GGATCC</u> -ATG-GAC-AAG-CTG-AGG-AAG	297	K02770
IL-1 β (P139)	AS	ATAT <u>CTGCAG</u> -TGG-ACC-AGA-CAT-CAC-CAA-GC	494	K02770
IL-1 β (E212)	AS	ATAT <u>CTGCAG</u> -TTC-CAT-CTT-CTT-CTT-TGG-GTA	722	K02770
IL-1 β (STOP-271)	AS	ATAT <u>CTGCAG</u> -TTA-GGA-AGA-CAC-AAA-TTG-CAT	896	K02770

^A - S, sense; AS, antisense

^B - Sequenz in 5' - 3' Orientierung; die Restriktionsstellen für Bam-HI und Pst-1 sind unterstrichen

^C - 5' Position des Primers in der unter der GenBank „Accession no.“ angegebenen Sequenz

* - Die Positionen beziehen sich auf die Lage vor (-93) bzw. hinter (217) der multiplen Klonierungsschnittstelle des Vektors pQE-30 (Qiagen, Deutschland)

2.2.6.4 Klonierung rekombinanter Proteine

Für die durchzuführenden Untersuchungen wurden einige Proteine benötigt, die nicht kommerziell erhältlich waren. Diese Proteine wurden mit Hilfe des Vektors pQE-30 (Qiagen; Hilden, Deutschland) kloniert und exprimiert. Hierzu wurden mit der RT-PCR entsprechende cDNA-Fragmente erzeugt, in den pQE-30 Vektor ligiert und in kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Durch den Vektor wird ein hexameres Oligo-Histidin N-terminal an das rekombinante Protein angebaut aufgrund denen das Protein mit einem speziell hierfür ausgerichteten Affinitäts-Chromatographie-Material („Nickel-nitrilo-triacetic acid“, Ni-NTA; Qiagen) isoliert werden kann. Die erforderlichen Schritte (Restriktion, Dephosphorilierung, Ligation, Transformation und Analyse der rekombinanten Klone) sind im folgenden beschrieben.

Restriktion: Zur Herstellung der cDNA-Fragmente für die Klonierungen wurde die RT-PCR mit Primern durchgeführt, die zusätzliche Basenpaare an ihren Enden besaßen. Diese Sequenzen führten Restriktionsstellen für die Endonukleasen Bam-H1 und Pst-1 ein (Tabelle 5c, unterstrichen). Die amplifizierte cDNA-Fragmente wurden mit Ethanol präzipitiert und in Tris-EDTA-(TE)-Puffer aufgenommen. Die cDNA-Fragmente und der Vektor pQE-30 wurden separat mit dem Restriktionsenzym Bam-H1 im Restriktions-Puffer B inkubiert und mit Ethanol präzipitiert. Daraufhin erfolgte eine Inkubation mit der Restriktionsendonuklease Pst-1 im Buffer H. Die resultierenden cDNA-Fragmente, die nun Bam-H1 und Pst-1 Enden enthielten, wurden anschließend mit Phenol (1 Volumen, pH 7,5) inkubiert und zentrifugiert (13.000 x g, 10 Min, 4°C). Die obere DNA-haltige Fraktion wurde mit Chloroform inkubiert um die Phenol-Reste zu entfernen und auf die gleiche Weise zentrifugiert. Nach der Präzipitation mit Ethanol wurden die cDNA-Fragmente in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) gelöst und ihre Konzentration mit Hilfe des „Nucleic Acid Quick Sticks“ bestimmt. Die cDNA-Fragmente wurden anschließend direkt zur Ligation verwendet, während der linearisierte pQE-30 Vektor zuvor dephosphoriliert werden musste.

Dephosphorilierung: Der Vektor pQE-30 wurde nach dem Restriktionsverdau an den überhängenden einzelsträngigen Enden dephosphoriliert, um die Selbst-Ligation des Vektors zu minimieren. Hierzu wurde das geschnittene Plasmid mit Ethanol präzipitiert, in H₂O gelöst und die DNA-Konzentration durch Messung der OD_{260nm}-Werte bestimmt. Ein Mikrogramm Plasmid-DNA wurde in 20 µl Dephosphorylierungspuffer unter Zugabe einer Einheit alkalischer Phosphatase bei 37°C inkubiert. Nach 30 Min wurde erneut eine Einheit des Enzyms zugegeben und nach weiteren 30 Min die Reaktion durch Zugabe von 200 mM EGTA (1/10 Volumen) sowie Erhitzen des Ansatzes auf 65°C (10 Min) gestoppt. Anschließend wurde die Präparation auf die gleiche Weise wie die cDNA-Fragmente nach dem Restriktionsverdau mit Phenol extrahiert und in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) gelöst.

Ligation: Zur Ligation der cDNA-Fragmente in den Vektor pQE-30 wurden die geschnittenen PCR-Produkte und der linearisierte, dephosphorylierte Vektor (50 ng) im Verhältnis 3 Teile cDNA plus 1 Teil Vektor in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 1 µl T4-Ligase (1 U/µl) und 1µl 10-fach Ligations-Puffer inkubiert (16 Std, 4°C).

Transformation: Die durch Ligation der cDNA mit dem Vektor entstandenen Expressionsplasmide wurden in kompetente Bakterien des *E.coli*-Stammes M15[pREP4] transformiert. Zur Herstellung kompetenter Wirtszellen wurde eine Kolonie aus der Platte mit den frisch gewachsenen Kolonien in 10 ml LB-Medium überführt, über Nacht kultiviert und anschließend 1:100 in 100 ml frischem Medium verdünnt. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wurden die Zellen zentrifugiert (4.000 x g, 5 Min, 4°C), das Pellet in 30 ml eiskaltem TFB1-Puffer resuspendiert und 90 Min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation der Zellen wurden die Bakterien vorsichtig in 4 ml TFB2-Puffer resuspendiert und als 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Bakterien wurden bei -80°C gelagert. Die Transformation der Expressionsplasmide in kompetente Bakterien erfolgte in Eppendorf-Reaktionsgefäßen nach der Temperaturschock-Methode. Hierzu wurden 50 µl kompetente Bakterien langsam aufgetaut und mit 3 bis 5 µl des Ligationsansatzes 30 Min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen im Wasserbad erhitzt (42°C, 90 Sek). Nach weiteren 2 Min Inkubation auf Eis wurden die Transformationsansätze mit 500 µl Psi-Medium 1 Std bei 37 °C inkubiert. Aliquots der Transformationsansätze (50 oder 200 µl) wurden schließlich auf Antibiotika-haltigen (25 µg/ml Kanamycin und 100 µg/ml Ampizillin) LB-Agarplatten ausplattiert. Nach 24 Std Inkubation bei 30°C wurden separate Klone durch ausstreichen einzelner Kolonien auf frische, Antibiotika-haltige Agarplatten isoliert. Die zur Proteinexpression zu verwendenden Klone wurden in 15% Glycerol (im LB-Medium, v/v) bei -80°C eingefroren.

LB-Agar:	10	g	NaCl
	10	g	Bacto-Trypton
	5	g	Hefe-Extrakt
	15	g	LB-Agar
	ad 1.000	ml	H ₂ O

LB-Medium:	10	g	NaCl
	10	g	Bacto-Trypton
	5	g	Hefe-Extrakt
	ad 1.000	ml	H ₂ O

Psi-Medium

(LB-Medium mit Zusätzen):	4	mM	MgSO ₄
	10	mM	KCl

TFB1-Puffer (pH 5,8):	100	mM	RbCl
	50	mM	MnCl ₂
	30	mM	KC ₂ O ₂ H ₃
	10	mM	CaCl ₂
	15	%	Glyzerol

TFB2-Puffer (pH8,0):	10	mM	MOPS
	10	mM	RbCl
	75	mM	CaCl ₂
	15	%	Glyzerol

Analyse der Klone: Die nach der Transformation erhaltenen Klone wurden molekularbiologisch und funktionell auf die Eignung zur Expression der rekombinanten Proteine überprüft. Zum Nachweis der eingeschleusten cDNA-Fragmente in die Bakterien wurden Kolonien separierter Klone in 5 ml Flüssig-Kultur über Nacht kultiviert. Ein Milliliter der Über-Nacht-Kultur wurde zentrifugiert (4.000 x g, 15 Min), das Pellet in 1 ml H₂O aufgenommen und anschließend dreimal abwechselnd für 2 Min in flüssigem Stickstoff und 95°C inkubiert. Aliquots (5 µl) dieser Präparationen wurden als Matrize in der PCR mit dem pQE-30 Vektor-spezifischen Primer-Paar eingesetzt. Diese Primer sind außerhalb der multiplen Klonierungsstelle lokalisiert, so das, anhand der Größe des entstehenden PCR Produktes, der korrekte Einbau der RT-PCR Produkte der zu klonierenden Proteine geprüft werden konnte. Darüber hinaus wurde die Protein-Expression der Klone analysiert. Hierzu wurden Kolonien der separierten Klone entnommen und in eine Flüssigkultur eingesät. Nach 20 Std Inkubation wurden gleiche Volumen mit bzw. ohne IPTG (1mM) inkubiert (5 Std). Die Kulturen wurden dann zentrifugiert (4.000 x g, 15 Min) und in SDS-PAGE Probenpuffer lysiert. Die Protein-Expression wurde in der SDS-PAGE durch Coomassie-Färbung bzw. in Western Blot Experimenten analysiert. Im Rahmen der Charakterisierung der Klone wurde die Plasmid-DNA kommerziell (Toplab, Martinsried, Deutschland) sequenziert. Hierzu wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des „Plasmid Purification Kit“ der Firma Qiagen isoliert.

2.2.6.5 Präparation rekombinanter Proteine

Zur Herstellung größerer Mengen rekombinanter Proteine wurde jeweils eine Kolonie eines

charakterisierten Klons 20 Std bei 30°C als Vorkultur in 50 ml Flüssigmedium kultiviert und anschließend 20 ml daraus auf 1 Liter Kulturmedium umgesetzt. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 wurden die Kulturen 4 Std mit 1 M IPTG (37°C) inkubiert. Diese IPTG-behandelten Bakterien wurden anschließend zentrifugiert (6.000 x g, 20 Min, 4°C), im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Präparation bei -80°C gelagert. Die Affinitätschromatographie aller rekombinanten Proteine erfolgte unter denaturierenden Bedingungen.

Zur Isolierung der Proteine wurde das eingefrorene Bakterienpellet zunächst aufgetaut und 1 Std mit Harnstoff-Puffer (pH 8,0; 5 ml/g Bakterienmasse) inkubiert, anschließend zentrifugiert (10.000 x g, 15 Min, 4°C) und der erhaltene Überstand 1 Std mit 2 Volumen Ni-NTA-Affinitäts-Chromatographie-Material, das zuvor mit Harnstoff-Puffer (pH 8,0) äquilibriert worden war, auf dem Schüttler inkubiert. Das Säulen-Material wurde in eine PolyprepTM Säule gefüllt, die an eine Chromatographieanlage angeschlossen war und das eluierte Material im UV-Spektrophotometer (OD₂₈₀) analysiert. Zunächst wurde mit 30 ml Harnstoff-Puffer pH 8,0 gespült. Nachdem die Grundlinie wieder erreicht war wurde zur Entfernung von unspezifisch gebundenem Material mit Harnstoff-Puffer pH 6,3 und anschließend mit Harnstoff-Puffer pH 5,9 eluiert. Das gewünschte rekombinante Protein wurde dann mit Harnstoff-Puffer pH 4,5 von der Säule eluiert und die erhaltenen Fraktionen in der SDS-PAGE analysiert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden gesammelt, mit Hilfe von PD-10 Säulen in 20 mM Tris-HCl Puffer (pH 9,0) umgepuffert und schließlich bei -20°C gelagert.

Harnstoff-Puffer (pH: 8,0/6,3/5,9/4,5): 8,0 M Harnstoff
 0,1 M NaH₂PO₄
 10,0 mM Tris

2.2.7 Prozessierungsstudien

Die Fähigkeit rekombinanter Proteasen oder Zell-Lysate, rekombinante Zytokin Vorstufen-Proteine zu prozessieren wurde in Prozessierungsstudien analysiert. Hierzu wurden die Komponenten des Prozessierungsansatzes für die angegebenen Zeiten im Prozessierungs-Puffer in Eppendorf-Reaktionsgefäßen im Thermoblock (37°C) inkubiert. Die Zusammensetzung der Prozessierungsansätze ist den entsprechenden Legenden zu entnehmen. Die Prozessierung wurde durch Zugabe von Proben-Puffer (15 µl pro 50 µl Prozessierungsansatz) und Erhitzen auf 95°C (10 Min) gestoppt. Die entstandenen Spaltprodukte wurden anschließend im Western Blot analysiert.

Prozessierungs-Puffer (5x; pH 7,5):	100	mM	HEPES
	10	mM	DTT
	50	%	Glyzerol

2.2.8 Auswertung und Darstellung der Daten

In der Legende der dargestellten Ergebnisse wurde angegeben, wie oft das Experiment durchgeführt wurde. Die graphisch dargestellten Ergebnisse zeigen jeweils ein repräsentatives Experiment. Im 7TD1-Test und im Fibroblasten-Test wurden Proben in Tri- oder Tetraplikaten analysiert. Die angegebenen Werte stellen die Mittelwerte mit deren Standardabweichungen dar.

Ergebnisse der Western Blot Analysen wurden in mindestens drei weiteren Experimenten bestätigt. RT-PCR-Experimente mit Ratten Herzzellen wurden mit RNA aus drei unabhängigen Stimulierungsexperimenten durchgeführt. RT-PCR Experimente mit humanen glatten Gefäßmuskelzellen wurden mit RNA aus zwei unabhängigen Stimulierungen durchgeführt. PCR Experimente mit dem „Cardiovascular Multiple Tissue cDNA (MTC™) Panel“ (Kat. Nr. K1427-1) der Firma Clontech wurden mit zwei unterschiedlichen MTC™ Chargen wiederholt. PCR-Experimente mit Spender-Herzen und Explantat-Herzen wurden zweifach wiederholt. Die statistische Auswertung der Daten wurde im „Student`s t-test“ für unabhängige Stichproben mit Hilfe des Programms SPSS durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

Proteine der IL-1 Familie sind als wichtige Mediatoren der Entzündung, der Apoptose und der Kontraktilität von Herz- und Gefäßzellen beschrieben worden. Die Rolle dieser Proteine und der Proteine der Caspase Familie für die Pathogenese der Herz-Kreislauf Erkrankungen ist noch recht unklar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten daher im wesentlichen die folgenden Fragen untersucht werden (siehe auch 1.3):

- 3.1 Werden IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, IL-1RI, Caspase-1 und Caspase-3 in humanem und murinem Herzgewebe exprimiert?
- 3.2 Charakterisierung einer bisher nur in Gefäßmuskelzellen nachgewiesenen IL-1 β Prozessierungs-hemmenden Aktivität.

3.1 Exprimierung von Proteinen der Interleukin-1 (IL-1) und Caspase Familien im kardiovaskulären System

Die Exprimierung der o.g. Mitglieder der IL-1 und Caspase Familien in Geweben und Zellen des Herz-Kreislauf Systems steht im Vordergrund des ersten Teils der Ergebnisse. In Gewebeproben und kultivierten Herz- und Gefäßmuskelzellen wurde mit Hilfe der RT-PCR die mRNA Exprimierung untersucht. Die IL-1 Exprimierung und Aktivität in kultivierten Kardiomyozyten wurde mit RT-PCR, Protein-Nachweismethoden und funktionellen Methoden eingehender charakterisiert.

3.1.1 Analyse der mRNA Expression von IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, IL-1RI, Caspase-1 und Caspase-3 im gesunden und insuffizienten linksventrikulären humanen Myokardgewebe

Vergleichende Untersuchungen der Expression der mRNA von Proteinen der IL-1 Familie (IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, IL-1RI) und der Caspase Familie (Caspase-1, Caspase-3) liegen nicht vor. Daher wurde die Exprimierung der genannten Gene in humanem gesunden und insuffizienten Herzgewebe durchgeführt. Die Untersuchung wurde an der Gesamt RNA aus linksventrikulärem Myokard explantierter Herzen zweier Patientengruppen und der Kontrollgruppe durchgeführt. Die Kontrollgruppe stellten Spenderherzen dar, die den Spendern zwar entnommen wurden, die aber aus verschiedenen Gründen nicht transplantiert wurden. Alter und Geschlecht der Spender und Patienten sind in Tabelle 6 beschrieben.

Tabelle 6: Alter und Geschlecht der Spender und Patienten				
		Spender	ICM-Patienten	DCM-Patienten
Anzahl		9	8	10
Geschlecht	Männlich	7	6	9
	Weiblich	2	2	1
Durchschnittsalter ^A		42,6 ± 14	53,9 ± 7,0	50,1 ± 9,1

A: Spender vs. ICM: p=0,069; Spender vs. DCM: p=0,220; ICM vs. DCM: p=0,370.

3.1.1.1 Die Exprimierung der IL-1 α und IL-1 β Gene im humanen linksventrikulären Myokardgewebe

Wie in Abbildung 2 gezeigt, war in keiner der Proben IL-1 α nachweisbar. Die mRNA des IL-1 β Genes wurde in der Mehrzahl der Proben der Spender und der Patienten detektiert, war aber nur schwach exprimiert. Für IL-1 β wurde daher keine densitometrische Auswertung durchgeführt.

Abbildung 2 (siehe nächste Seite): IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-1RI, IL-18, Caspase-1 und Caspase-3 mRNA Exprimierung im linksventrikulären Myokard gesunder Probanden und herzinsuffizienter Patienten. Die Gesamt RNA wurde aus dem Myokardgewebe isoliert und die RT-PCR für die in der Abbildung genannten Gene mit spezifischen Primern durchgeführt. Jeweils 10 μ l der 50 μ l RT-PCR Ansätze wurde im Agarose Gel (1,6%) analysiert. Zum Vergleich einzelner Gele und als Positivkontrolle wurde auf die letzte Bahn eines jeden Gels 10 μ l eines PCR-Ansatzes unstimulierter humaner Gefäßmuskelzellen aufgetragen (St = Standard). Die Größen (bp) der zu erwartenden PCR-Produkte waren: 350 (18S RNA), 817 (IL-1 α), 1.096 (IL-1 β), 465 (IL-1Ra), 604 (IL-18), 372 (IL-1RI), 880 (Caspase-1), 857 bp (Caspase-3). Die Proben wurden zweimal mit dem gleichen Ergebnis analysiert. M: 100 bp Standard; die Bande mit der stärksten Intensität entspricht 600 bp.

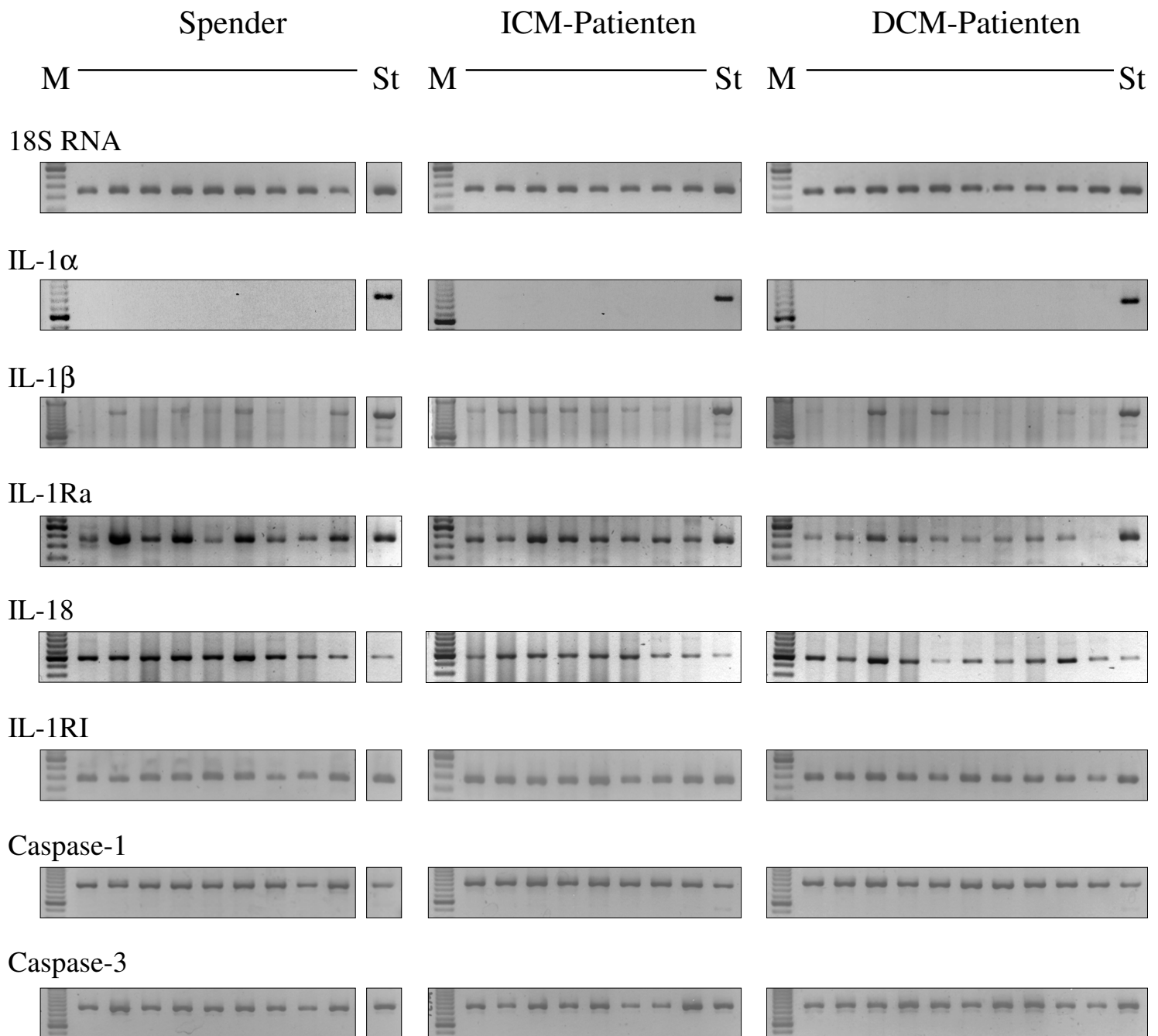


Abbildung 2 (Legende siehe vorherige Seite).

3.1.1.2 Die Expressierung der IL-1Ra mRNA im linksventrikulären Myokardgewebe herzinsuffizienter Patienten (DCM) ist herabgesetzt

Der humane IL-1 Rezeptor Antagonist kommt als sekretiertes Glykoprotein (sIL-1Ra) und als intrazelluläre unglykosilierte Form (icIL-1Ra) vor. Die Expression dieser Formen steht unter der Kontrolle von zwei Promotoren. Die Transkripte unterscheiden sich am 5' Ende. Im humanen System wurden bisher 3 intrazelluläre Isoformen (ic₁IL-1Ra, ic₂IL-1Ra, ic₃IL-1Ra) beschrieben, die durch Wahl eines unterschiedlichen Translatierungsstartkodons (ic₂IL-1Ra) oder durch alternatives Spleißen (ic₃IL-1Ra) entstehen. Mit dem hier verwendeten IL-1Ra Primer-Paar konnten, bis auf ic₃IL-1Ra, alle IL-1Ra Formen gemessen werden. Wie in Abbildung 2 dargestellt, konnte das erwartete, 465 bp große DNA Fragment in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden. Die Abbildung lässt vermuten, dass die Intensität der Banden der DCM-Patienten niedriger ist, als die der Kontrolle bzw. der ICM-Patienten. Die Intensität der IL-1Ra Banden wurde daher mit einem Gelauswertesystem (AIDA) quantifiziert. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 3 graphisch dargestellt. Die Daten zeigen eine signifikante Verringerung der Intensität in den Proben der DCM-Patienten im Vergleich zur Kontrolle ($p \leq 0,05$) und zu ICM-Patienten ($p \leq 0,01$).

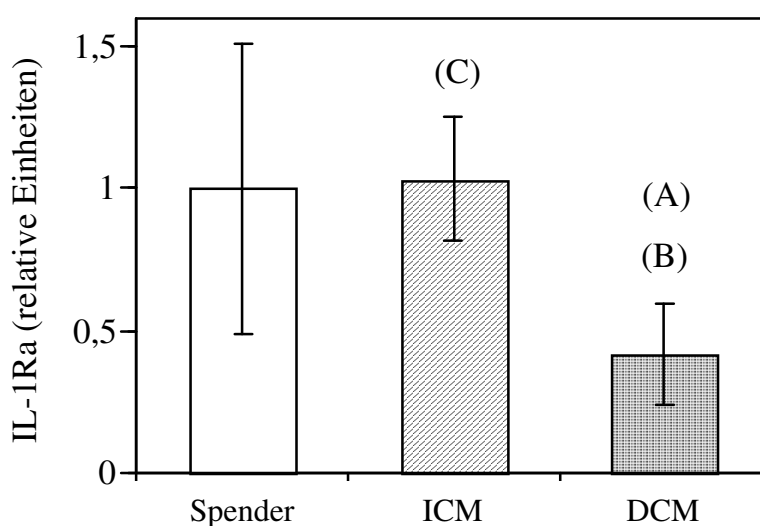


Abbildung 3: Die Bandenintensität der IL-1Ra RT-PCR Produkte bei DCM-Patienten ist signifikant niedriger als die der ICM-Patienten oder Spender. Die Negative der Polaroid-Aufnahmen der 18S und der IL-1Ra RT-PCR Auswertungen wurden im Durchlicht-Scanner analysiert. Die Intensität der RT-PCR Produkte wurde densitometrisch ermittelt. Die Intensität der spezifischen IL-1Ra Bande wurde anhand der 18S RNA Bande normalisiert ($OD_{\text{Probe}}/OD_{18S}$) und die Mittelwerte dieser relativen Einheiten für jede untersuchte Gruppe ermittelt. Die Daten wurden im Student's t-Test für unabhängige Stichproben analysiert. A: $p = 0,012$ (DCM vs. Spender); B: $p = 1,3 \times 10^{-5}$ (DCM vs. ICM); C: $p = 0,470$ (ICM vs. Spender).

3.1.1.3 Die Expressierung der IL-18 mRNA im humanen linksventrikulären insuffizienten Myokard ist herabgesetzt während die Expressierung der mRNA der IL-1RI, Caspase-1 und Caspase-3 mRNA im gesunden und insuffizienten Myokard unverändert ist

Das für das IL-18 Gen spezifische RT-PCR Produkt konnte in allen Proben nachgewiesen werden (Abb. 2). Die statistische Auswertung der Bandenintensität zeigte, dass die Expression dieses Genes in beiden Patienten-Gruppen signifikant ($p < 0,05$) niedriger war als in der Spender-Gruppe (Abb. 4).

Die mRNA der IL-1RI, Caspase-1 und Caspase-3 Gene konnte ebenfalls in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden (Abb. 2). Allerdings waren für keines der genannten Gene visuelle Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen ICM- und DCM-Patienten und der Kontrolle zu erkennen. Die Quantifizierung der mRNA-Expression dieser Gene ist in Abbildung 4 graphisch dargestellt und zeigt keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,1$) zwischen den untersuchten Gruppen.

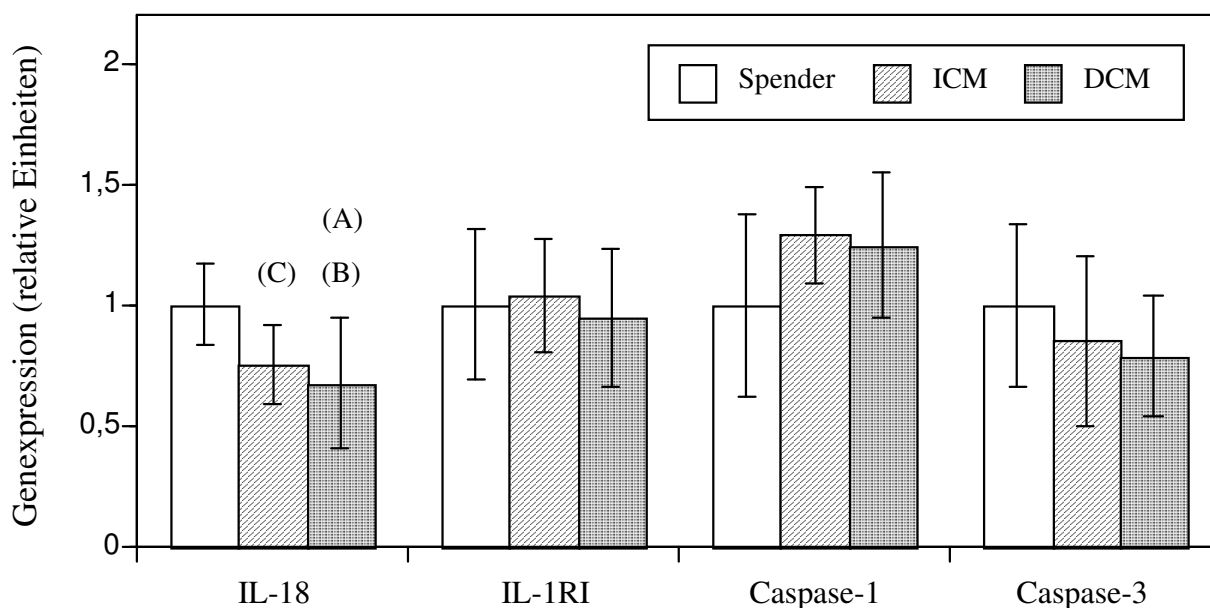


Abbildung 4: Im Gegensatz zur IL-18 mRNA ist die IL-1RI, Caspase-1 und Caspase-3 mRNA in Patienten- und Spenderherzen nicht unterschiedlich exprimiert. Die Negative der Polaroid-Aufnahmen wurden im Durchlicht-Scanner analysiert. Die Intensität der RT-PCR Produkte wurde densitometrisch ermittelt. Die Intensität der spezifischen IL-18, IL-1RI, Caspase-1 und Caspase-3 Banden wurde anhand der 18S RNA Bande normalisiert (OD_{Probe}/OD_{18S}) und die Mittelwerte dieser relativen Einheiten für jede untersuchte Gruppe ermittelt. Die Daten wurden im Student's t-Test für unabhängige Stichproben analysiert. A: $p = 0,008$ (DCM vs. Spender); B: $p = 0,464$ (DCM vs. ICM); C: $p = 0,012$ (ICM vs. Spender).

3.1.2 Exprimierung von Proteinen der IL-1 und Caspase Familien in kultivierten Herzzellen neonataler Ratten

Die oben dargestellten Ergebnisse zeigten, dass Gene der IL-1 und Caspase Familien im Herzgewebe nachzuweisen waren. Die folgenden Experimente sollen darstellen, dass isolierte Kardiomyozyten eine Quelle der Untersuchten Gene sein können. Aus humanen Herzen isolierte Zellen standen leider nicht zur Verfügung. Daher wurde die Expression der IL-1 α , IL-1 β , IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1Ra), Interleukin-18 (IL-18), IL-1 Rezeptor Typ I (IL-1RI), Caspase-1 und Caspase-3 mRNA in isolierten Ratten Kardiomyozyten in RT-PCR Experimenten untersucht. Zunächst wird die Charakterisierung der Zellen beschrieben.

3.1.2.1 Charakterisierung der Kardiomyozyten-Präparationen

Neonatale Ratten Kardiomyozyten werden aus den Herzen frisch geborener Ratten isoliert. Verlässliche Antikörper zur Charakterisierung waren leider nicht vorhanden. Ein wesentliches Kriterium der neonatalen Ratten Kardiomyozyten ist daher der Phänotyp: Nach 48 Stunden in der Kultur konnte man die für diese Zellen typische Kontraktion erkennen. Trotz der mikroskopischen Charakterisierung der Zellen, die zeigte, dass meist alle Zellen kontrahieren, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass kontaminierende Zellen vorhanden sind. Monozyten könnten dabei eine Hauptverunreinigung darstellen. Wir haben daher versucht, monozytäre Zellen in den Kulturen nachzuweisen. Dies wurde mit Hilfe des ED1-Antikörpers durchgeführt. Dieser Antikörper erkennt ein Ratten Antigen, das auf lysosomalen Membranen und auf der Zelloberfläche von Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert wird und viele gemeinsame Eigenschaften mit dem CD68 Antigen des Menschen besitzt. Abbildung 5A zeigt die unspezifische Immunmarkierung der Herzzellpräparation mit dem sekundären Antikörper, wobei die kleinen dunklen Punkte unspezifisch angefärbte tote Zellen darstellen. Die Abbildungen 5B und 5C stellen die spezifische Färbung dar. Der Anteil spezifisch angefärbter Zellen (Pfeile) betrug 0.015% der eingesäten Zellen. Diese geringe monozytäre Kontamination wird nicht signifikant zur Entstehung der später (Punkt 3.1.2.2) beschriebenen RT-PCR Banden beigetragen haben, da unter gleichen Bedingungen mit Leukozyten-Präparation aus der Ratten Milz durchgeführte PCR Experimente in einer Verdünnung, die einem Anteil der Leukozyten in der Kardiomyozyten-Präparation von 0.2 % entsprechen würde, keine Banden für die untersuchte Gene gezeigt haben.

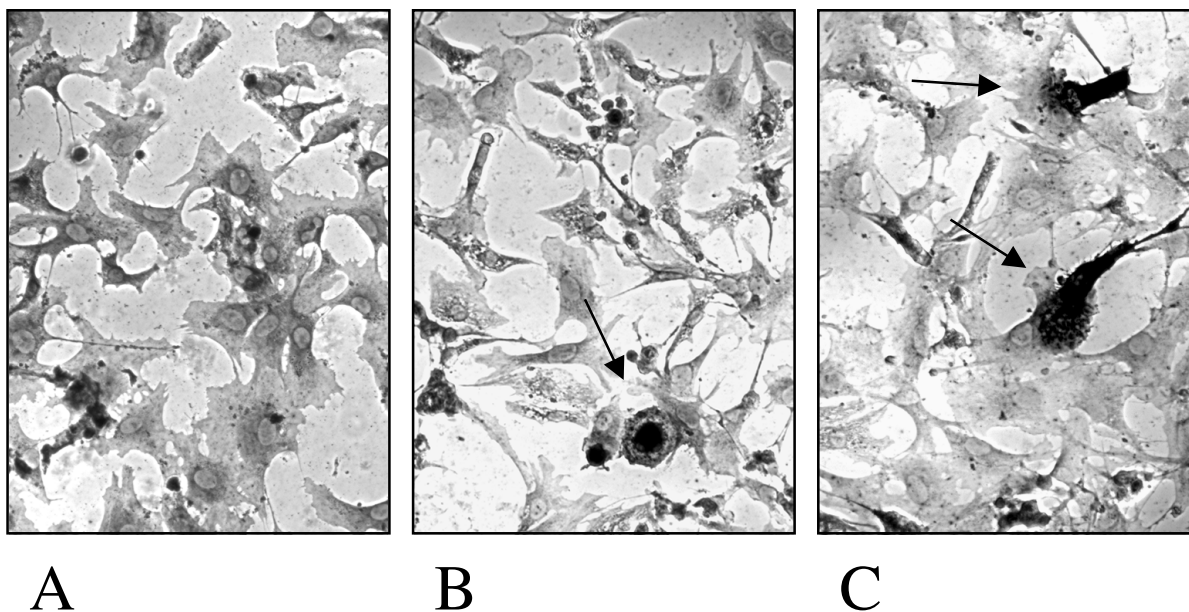


Abbildung 5: Kulturen neonataler Ratten Kardiomyozyten enthalten eine nur geringe Monozyten Kontamination. Neonatale Kardiomyozyten wurden in „chamber slides“ inkubiert. Nach 68 Stunden wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd in PBS Buffer auf dem Objektträger fixiert, mit dem ED1-Antikörper (MCA341R; 20 $\mu\text{g/ml}$) und anschließend mit dem alkalische Phosphatase-markierten Goat-Anti-Maus Antikörper (115-056-071; 3 $\mu\text{g/ml}$) gefärbt. Die spezifisch durch den Antikörper gefärbten Zellen sind durch Pfeile angezeigt. Eine von 4 durchgeführten Immunmarkierungen (4 verschiedene Isolate) mit vergleichbarem Ergebnis ist hier dargestellt. Vergrößerung: 200-fach. **A** - sekundärer Antikörper; **B, C** - ED1-Antikörper und sekundärer Antikörper.

3.1.2.2 Exprimierung der mRNA von Proteinen der IL-1 und Caspase Familien in kultivierten Herzmuskelzellen der Ratte

Im folgenden wurde untersucht, ob kultivierte neonatale Herzmuskelzellen IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, IL-1RI, Caspase-1 und Caspase-3 mRNA exprimieren. Die mRNA Exprimierung wurde in der RT-PCR untersucht. Die mit den optimalen Zyklenzahlen durchgeführten Experimente zeigten, dass bereits unstimulierte Herzzellen die IL-1 α - und IL-1 β -mRNA exprimierten (Abb. 6). Stimulierung der Zellen mit LPS (1 $\mu\text{g/ml}$), IL-1 α_{Ratte} (10 ng/ml) oder TNF- α_{Ratte} (50 ng/ml) führte zur Verstärkung der Intensität der amplifizierten Banden. LPS und IL-1 α waren stärkere Stimulatoren als TNF. In den Überständen der Kardiomyozyten nachweisbares IL-6 wurde als Kontrolle für die Stimulierbarkeit der Herzzellen angesehen. Die Stimulierung mit TNF- α , LPS oder IL-1 führte, wie erwartet, zu bis zu 2-fach, 4-fach bzw. 100-fach erhöhter IL-6 Produktion im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Die mRNA der anderen untersuchten Gene (IL-1Ra, IL-18, IL-1RI, Caspase-1 und

Caspase-3) ist ebenfalls bereits in unstimulierten Herzzellen detektierbar. Die Stimulierung der Zellen beeinflusste die Expressierung dieser mRNA nicht nachweisbar (Abb. 6).

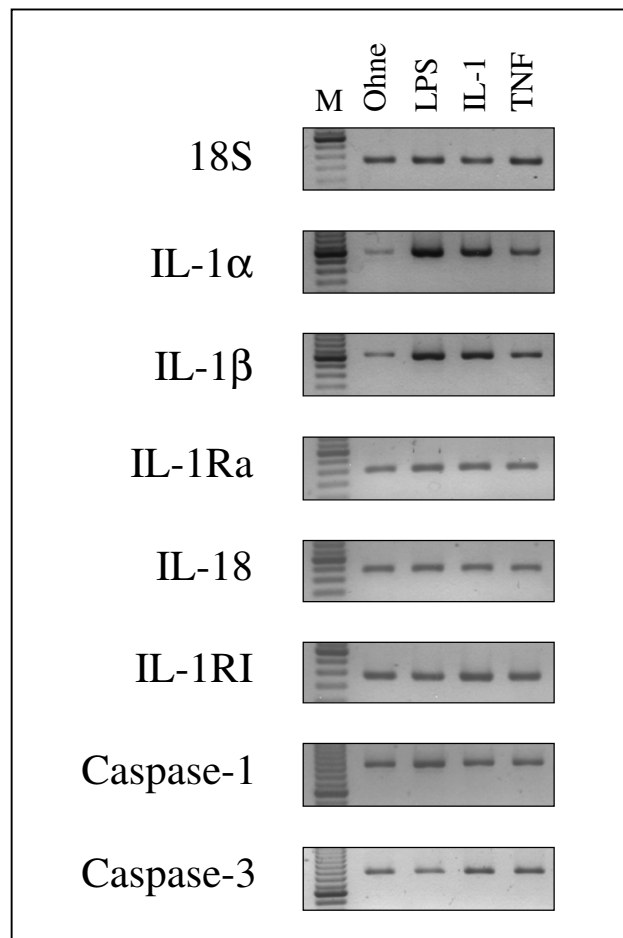


Abbildung 6: Kultivierte Herzzellen aus neonatalen Ratten exprimieren IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, IL-1RI, Caspase-1 und Caspase-3 mRNA. 40 Stunden nach Inkubationsbeginn wurden neonatale Herzzellen mit LPS (1 μ g/ml; LPS), IL-1 α _{Ratte} (10 ng/ml; IL-1) oder TNF α _{Ratte} (50 ng/ml; TNF) oder ohne Stimuli (Ohne) 5 Stunden in serumfreiem CMRL-Wachstumsmedium inkubiert und anschließend die Gesamt RNA isoliert und die reverse Transkription mit 1 μ g Gesamt RNA durchgeführt. Die RT-PCR wurde mit den in Tabelle 5b genannten Primern für Ratten mRNA durchgeführt. 10 μ l Aliquots des 50 μ l Ansatzes wurden im 1,6%-igen Agarose Gel getrennt. Die Größen (bp) der zu erwartenden Fragmente waren: 345 (18S RNA), 581 (IL-1 α), 621 (IL-1 β), 391 (IL-1Ra), 487 (IL-18), 362 (IL-1RI), 900 (Caspase-1), 782 (Caspase-3). M: 100 bp Größenmarker (die Bande mit der stärksten Intensität entspricht 600 bp). Es ist ein repräsentatives Experiment von drei durchgeführten Experimenten dargestellt.

3.1.2.3 Analyse der Protein-Exprimierung der IL-1 Isoformen in kultivierten Ratten Kardiomyozyten

Die PCR Untersuchungen hatten gezeigt, dass kultivierte neonatale Kardiomyozyten der Ratte IL-1 α und IL-1 β mRNA exprimieren. Im folgenden wird die IL-1 α und IL-1 β Protein Produktion in kultivierten Ratten Herzzellen dargestellt.

Zur Charakterisierung der von Ratten Kardiomyozyten exprimierten IL-1 Isoformen wurden zunächst Lysate unstimulierter oder stimulierter Kardiomyozyten hergestellt und in Western-Blot Experimenten analysiert. Lysate unstimulierter bzw. mit LPS, IL-1 α oder TNF- α stimulierter Kardiomyozyten (10×10^6 Zellen pro Bahn) enthielten jedoch kein nachweisbares immunoreaktives IL-1 α . Die Detektionsgrenze des verwendeten IL-1 α _{Ratte} Antikörpers (polyklonales Antiserum) lag bei 5 ng des rekombinanten IL-1 α _{Ratte} pro Bahn. Auch IL-1 β konnte im Western Blot der Kardiomyozyten Lysate oder 50-fach konzentrierter Kardiomyozyten Überstände nicht nachgewiesen werden. Die Detektionsgrenze des verwendeten IL-1 β _{Ratte} Antikörpers war 3 ng rekombinantes IL-1 β .

Lysate (1×10^6 Zellen/ml) und Überstände stimulierter und unstimulierter Kardiomyozyten wurden zusätzlich mit einem Ratten IL-1 β ELISA Kit analysiert. Die Detektionsgrenze des verwendeten Testsystems lag bei 200 pg/ml rekombinantes IL-1 β _{Ratte}. In Lysaten von LPS-, IL-1 α _{Ratte}- oder TNF- α _{Ratte}-stimulierten bzw. unstimulierten Ratten Kardiomyozyten konnten 250 pg IL-1 β /ml gemessen werden, wobei kein Unterschied zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen festgestellt wurde. Die Konzentration von IL-1 β in Überständen lag unter der Detektionsgrenze des benutzen Testsystems. Der ELISA wurde mit Lysaten der Kardiomyozyten oder entsprechenden Überständen aus 3 unabhängigen Stimulierungsexperimenten durchgeführt.

Wir haben zusätzlich versucht IL-1 β in Kardiomyozyten Präparationen immunhistochemisch nachzuweisen. Dafür wurden Kardiomyozyten in „chamber slides“ inkubiert und nach Stimulierung mit LPS oder einer Kombination aus IL-1 α und TNF- α mit einem Ziege-Anti-IL-1 β _{Ratte} Antikörper angefärbt. Abbildung 7 zeigt, dass in unstimulierten Präparationen keine spezifische Färbung nachzuweisen war, während in LPS oder IL-1 α /TNF- α stimulierten Herzzell Präparationen eine spezifische IL-1 β Färbung einzelner Zellen zu erkennen war. Die mit dem anti-IL-1 β _{Ratte} Antikörper gefärbten Zellen sahen den ED1-positiven Zellen (siehe Abb. 5) sehr ähnlich und stellen möglicherweise monozytäre Zellen oder nekrotische Kardiomyozyten dar.

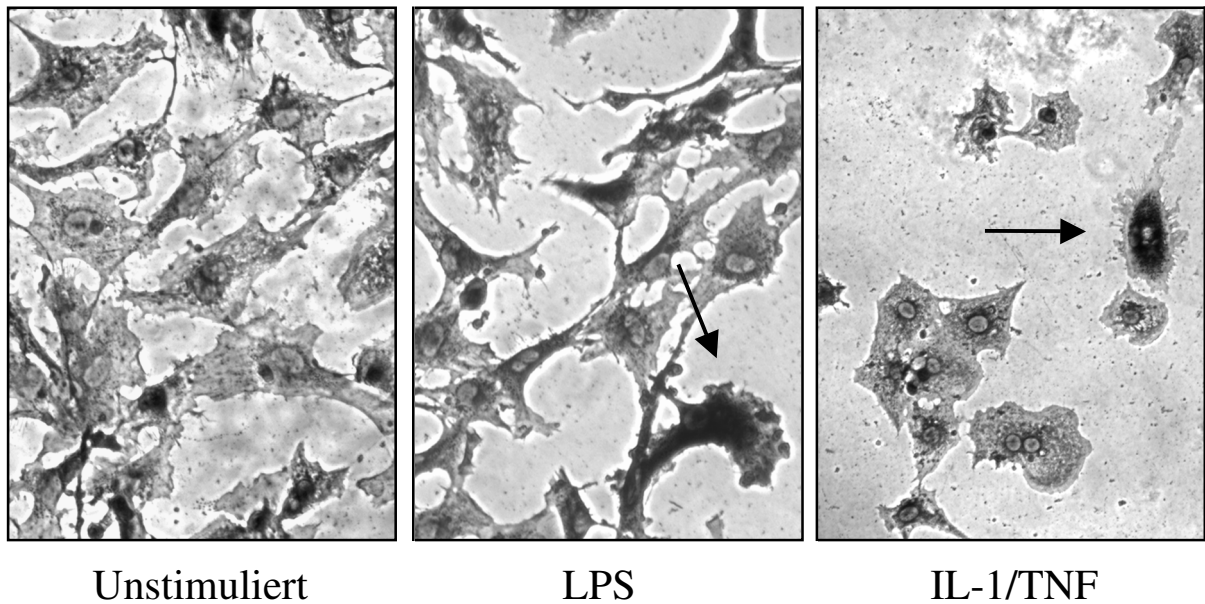


Abbildung 7: IL-1 β wird von Kardiomyozyten nicht exprimiert. Neonatale Kardiomyozyten wurden in „chamber slides“ inkubiert. Nach 48 Std wurden sie mit LPS (1 μ g/ml), mit einer Kombination aus IL-1 α _{Ratte} (10 ng/ml) und TNF- α _{Ratte} (50 ng/ml) oder ohne Stimulus in serumfreiem CMRL-Wachstumsmedium inkubiert (20 Std). Danach wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd in PBS-Buffer fixiert und mit dem Anti-IL-1 β _{Ratte} Antikörper inkubiert (sc 1252; 5 μ g/ml). Anschließend wurde mit alkalischer Phosphatase-markiertem Kaninchen-Anti-Ziege Antikörper (305-055-006; 7 μ g/ml) inkubiert und danach mit NBT/BCIP gefärbt. Eine von zwei durchgeführten Immunmarkierungen mit vergleichbarem Ergebnis ist hier dargestellt. Vergrößerung: 200-fach. Die spezifisch durch den Antikörper markierten Zellen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Der immunhistologische Nachweis von IL-1 α wurde ebenfalls durchgeführt. Alle Zellen in Präparationen unstimulierter Ratten Kardiomyozyten wurden durch den Anti-IL-1 α _{Ratte} Antikörper im Vergleich zur Kontroll-Färbung mit dem sekundären Antikörper spezifisch angefärbt (Abb. 8). Auch LPS- und TNF-stimulierte Kardiomyozyten Präparationen wurden spezifisch mit dem Anti-IL-1 α _{Ratte} Antikörper gefärbt. Dabei traten keine immunhistochemisch messbaren Unterschiede zwischen unstimulierten und LPS- oder TNF-stimulierten Zellen auf.

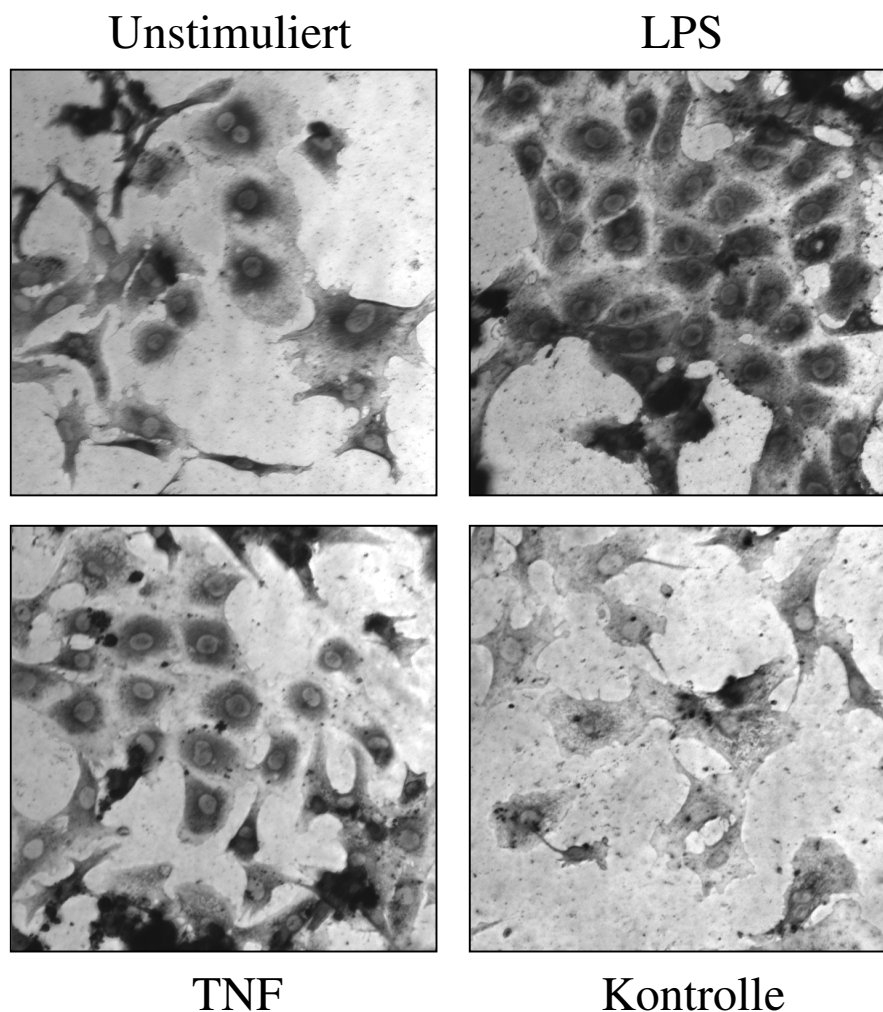


Abbildung 8: Ratten Kardiomyozyten exprimieren IL-1 α . Neonatale Kardiomyozyten wurden in „chamber slides“ inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit LPS (1 μ g/ml), TNF- α (50 ng/ml) oder ohne Stimulus in serumfreiem CMRL-Wachstumsmedium inkubiert (20 Std). Danach wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd in PBS Puffer fixiert und mit einem Anti-IL-1 α _{Ratte} Antikörper inkubiert (sc 1254; 10 μ g/ml). Anschließend wurde mit alkalischer Phosphatase-markiertem Kaninchen-Anti-Ziege Antikörper (305-055-006; 7 μ g/ml) inkubiert und danach mit NBT/BCIP gefärbt. Eine von zwei durchgeführten Immunmarkierungen mit vergleichbarem Ergebnis ist hier dargestellt. Vergrößerung: 200-fach. Kontrolle, Immunmarkierung mit dem sekundären Antikörper.

Zur Verifizierung und Quantifizierung des IL-1 α wurde ein biologisches Test-System mit humanen Fibroblasten eingesetzt (Loppnow et al., 1989). Wir haben zunächst untersucht, ob in diesem Test-System IL-1 der Ratte nachgewiesen werden kann (Abb. 9). Das rekombinante IL-1 α der Ratte stimulierte die Fibroblasten-Proliferation, während IL-1 β der Ratte die Fibroblasten nicht stimulierte.

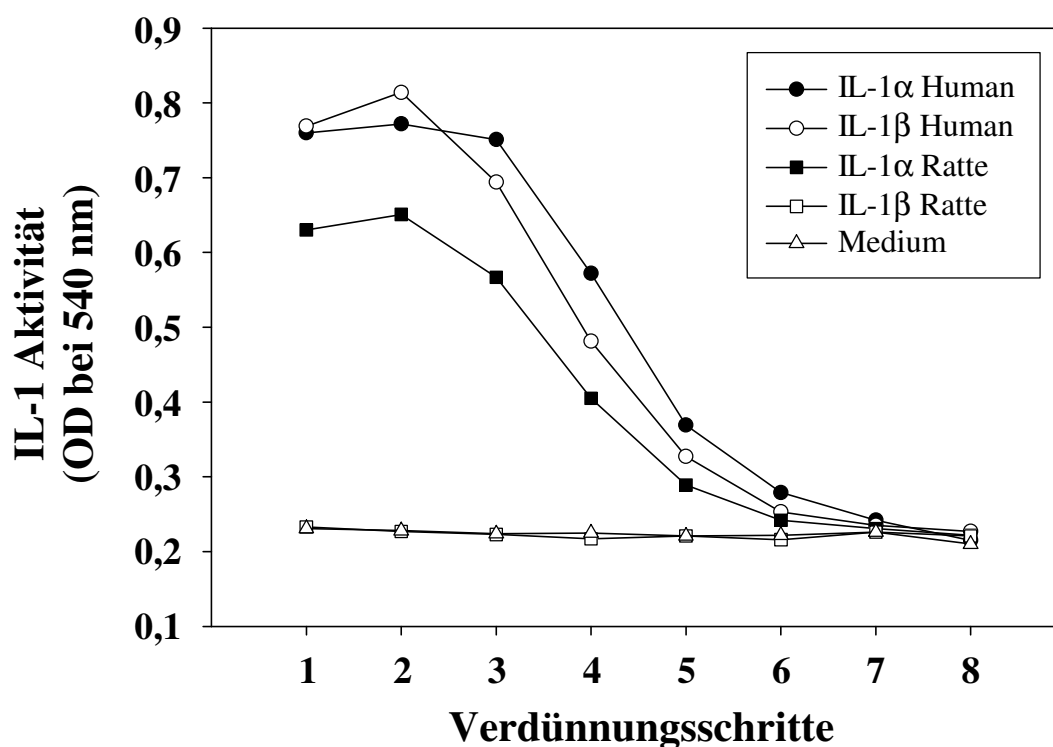


Abbildung 9: Ratten IL-1 α , aber nicht Ratten IL-1 β , stimuliert die Proliferation humaner Fibroblasten. IL-1 (10 ng/ml) wurde zu humanen dermalen Fibroblasten gegeben und seriell in acht 1:4 Schritten verdünnt. Nach 96 Stunden wurde die Fibroblasten-Proliferation durch Färbung mit Kristallviolett und anschließender Absorptionsmessung bei 540 nm bestimmt. Zwei Experimente mit vergleichbarem Ergebnis wurden durchgeführt. Obwohl das Ratten IL-1 β die humanen Fibroblasten nicht stimuliert war es biologisch aktiv, da es in parallel Experimenten Ratten Kardiomyozyten dazu stimuliert IL-6 zu produzieren.

Übereinstimmend mit den histologischen Ergebnissen (Abb. 8) zeigt Tabelle 7, dass bereits unstimulierte Kardiomyozyten IL-1 Aktivität enthielten. Die IL-1 Aktivität war in LPS- bzw. TNF-stimulierten Proben 5- bis 7-fach höher.

Tabelle 7. IL-1 Aktivität^A (pg/10⁶ Zellen) in Zell-Lysaten kultivierter neonataler Ratten Kardiomyozyten				
Stimulus^B	Versuch N1	Versuch N2	Versuch N3	Versuch N4
Ohne	138 ± 5 ^C	43 ± 3	52 ± 11	75 ± 3
LPS	609 ± 123	320 ± 29	358 ± 25	387 ± 44
TNF- α _{Ratte}	510 ± 31	60 ± 5	326 ± 66	220 ± 28

- A: Die in Lysaten von Ratten Kardiomyozyten enthaltene IL-1 Aktivität wurde im Fibroblasten-Test analysiert und anhand eines rekombinanten IL-1 α _{Ratte} Standards berechnet.
- B: Herzzellen wurden mit LPS (1 μ g/ml), TNF- α _{Ratte} (50 ng/ml) oder ohne Stimulus in serumfreiem CMRL-Wachstumsmedium inkubiert (20 Std). Danach wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst, 2 x mit Medium gewaschen und auf 1 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Zell-Lysate wurden durch 3 Einfrier-Auftau-Zyklen hergestellt. In den Überständen der Zellen war keine IL-1 Aktivität nachweisbar.
- C: Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung aus jeweils 4 Parallelmessungen angegeben.

Durch den Einsatz eines blokierenden Anti-IL-1 α _{Ratte} Antikörpers wurde dargestellt, dass die gemessene IL-1 Aktivität im wesentlichen aus IL-1 α bestand. Abbildung 10 zeigt, dass die Aktivität der LPS- bzw. TNF-stimulierten Proben um 89% bzw. 84% durch den Antikörper gehemmt wird. Auch die konstitutive IL-1 Aktivität in unstimulierten Kardiomyozyten wurde reduziert.

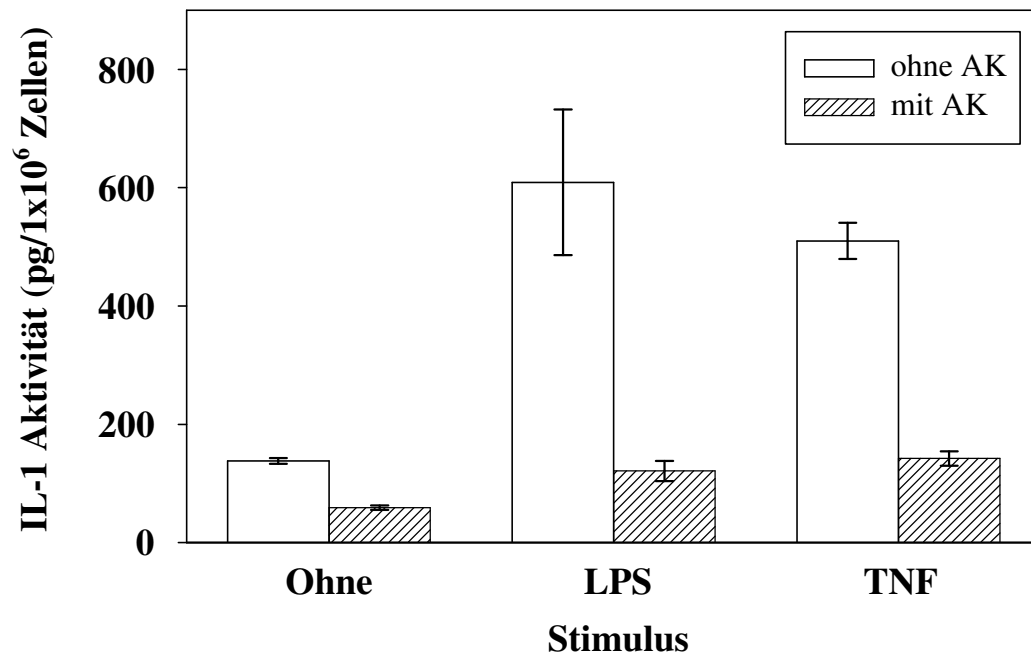


Abbildung 10: IL-1 α spezifische Antikörper hemmen die IL-1 Aktivität der Kardiomyozyten. Herzzellen wurden mit LPS (1 $\mu\text{g/ml}$), TNF- α_{Ratte} (50 ng/ml) oder ohne Stimulus in serumfreiem CMRL-Wachstumsmedium inkubiert (20 Std). Danach wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst, 2x gewaschen und Zell-Lysate hergestellt. Die Lysate wurden im Fibroblasten-Test mit und ohne blokierenden Anti-IL-1 α_{Ratte} Antikörper (AF500; 0,5 $\mu\text{g/ml}$) gemessen. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung abgebildet. Ein repräsentatives Experiment von vier durchgeführten ist dargestellt.

Die oben dargestellten Ergebnisse zeigen, dass neonatale Ratten Kardiomyozyten IL-1 α zellassoziiert produzieren. In verschiedenen Zelltypen wurde früher gezeigt, dass IL-1 α an der Zelloberfläche exprimiert werden kann. In dieser Arbeit wurde die IL-1 α Oberflächen-Expression in einem Koinkubationssystem mit humanen Gefäßmuskelzellen untersucht, die sehr empfindlich (siehe Abb. 11) auf IL-1 α der Ratte reagieren.

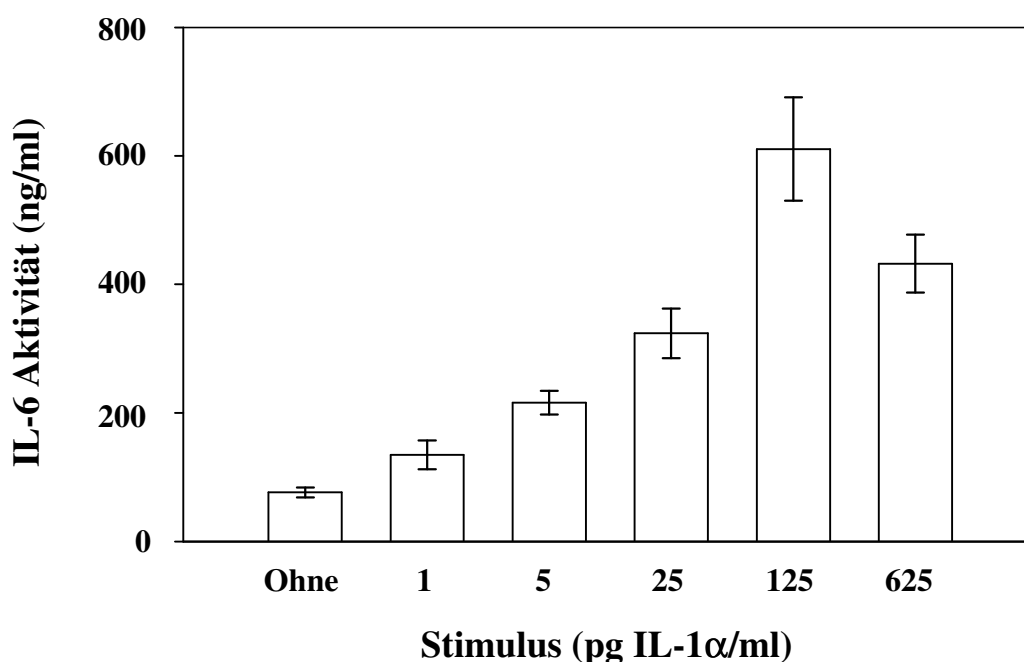


Abbildung 11: Die IL-6 Produktion humaner glatter Gefäßmuskelzellen wird durch rekombinantes IL-1 α der Ratte potent stimuliert. Humane glatte Gefäßmuskelzellen wurden mit rekombinatem IL-1 α _{Ratte} in den angegebenen Konzentrationen inkubiert (20 Std). Anschließend wurden die Überstände abgenommen, zentrifugiert (1.200 U/min; 10 Min) und die IL-6 Aktivität in den Überständen im 7TD1-Test bestimmt. Die IL-6 Aktivität wurde anhand des rekombinanten IL-6 Standards (10 ng/ml) berechnet. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung in ng/ml angegeben. Es wurden drei vergleichbare Experimente durchgeführt.

Zur Durchführung der Koinkubationsexperimente wurden unstimulierte bzw. 20 Stunden mit LPS stimulierte Ratten Kardiomyozyten mit Paraformaldehyd fixiert und intensiv, aber vorsichtig, gewaschen (fixierte Kardiomyozyten). Daraufhin wurden auf diese fixierten Zellen humane glatte Gefäßmuskelzellen gegeben und die, durch das Oberflächen-assoziierte IL-1 α der fixierten Kardiomyozyten induzierte, IL-6 Produktion dieser Zellen bestimmt. LPS-vorstimulierte fixierte Kardiomyozyten induzierten eine dreifach höhere IL-6 Produktion in den hinzugefügten Gefäßmuskelzellen, als unstimulierte fixierte Kardiomyozyten (Abb. 12; Ohne Antikörper). Durch Zugabe von Anti-IL-1 α _{Ratte}-Antikörper vor der Zugabe der GMZ wurde die IL-6 induzierende Aktivität auf den KM vollständig blockiert (Abb. 12; Mit Antikörper). Die gemessene IL-6 Aktivität stammte nur aus den GMZ, da parallel kultivierte fixierte Kardiomyozyten keine messbare IL-6 Aktivität abgaben. Die basale IL-6 Produktion (Abb. 12; 76 \pm 8 ng/ml; Unstimulierte fixierte KM; Ohne Antikörper) entsprach der IL-6 Aktivität, die von unbehandelten GMZ abgegeben wurde (71 \pm 13 ng/ml), die ohne Kardiomyozyten kultiviert worden waren.

Diese Daten zeigen, dass IL-1 α auf der Oberfläche der fixierten Kardiomyozyten exprimiert wird.

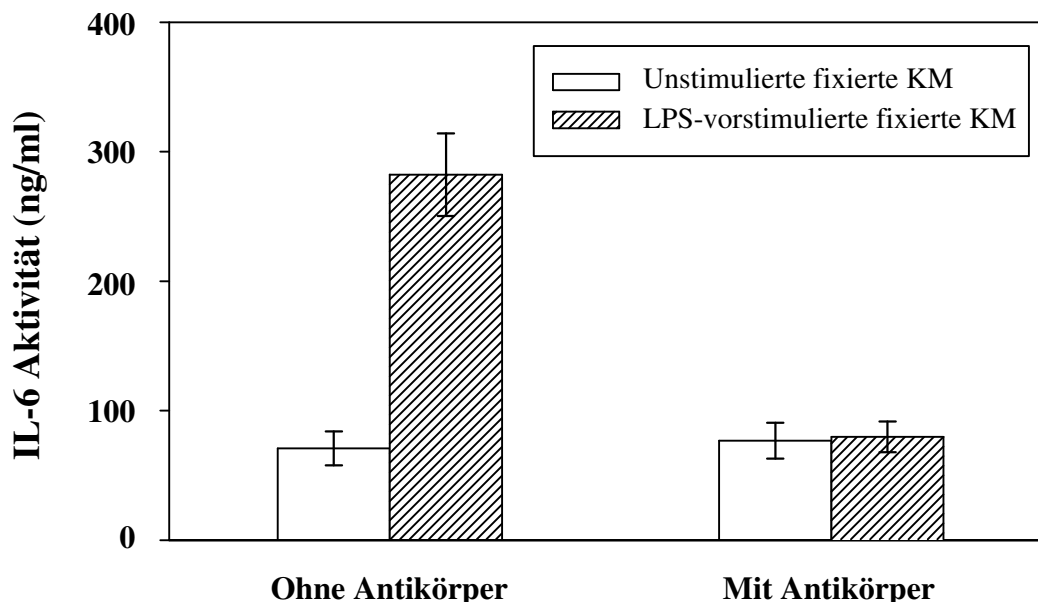


Abbildung 12: IL-1 α auf der Oberfläche LPS-vorstimulierter, fixierter Kardiomyozyten neonataler Ratten induziert die IL-6 Produktion in humanen glatten Gefäßmuskelzellen. Neonatale Kardiomyozyten wurden in 6-Loch Platten inkubiert (48 Std). Danach wurden die Zellen mit LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ oder ohne Stimuli in serumfreiem CMRL Medium inkubiert (20 Std), mit serumfreiem CMRL Medium zweimal gewaschen, mit 1% Paraformaldehyd in PBS^{Ca++Mg++} 30 Min bei 4°C fixiert und anschließend dreimal mit kaltem DMEM Medium mit 1g Glukose/L, 10% FKS, 1% Penizillin/Streptomycin und 1% Glutamin gewaschen (fixierte KM). Anschließend wurden auf die fixierten Kardiomyozyten lebende humane glatte Gefäßmuskelzellen als IL-1 α Responderzellen gegeben (15.000 Zellen/cm²). Blockierende Anti-IL-1 α _{Ratte} Antikörper (AF500; 0,1 $\mu\text{g/ml}$) wurden vor der Zugabe der GMZ hinzugefügt. Nach 24 Stunden wurden die Überstände abgenommen, zentrifugiert (1.200 U/Min) und die IL-6 Aktivität in den Überständen im 7TD1-Test bestimmt. Die IL-6 Aktivität wurde anhand des rekombinanten IL-6 Standards berechnet. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung in ng/ml angegeben. Es wurden zwei vergleichbare Experimente durchgeführt.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass neonatale Ratten Kardiomyozyten IL-1 α und IL-1 β mRNA exprimieren. IL-1 α wurde zellassoziiert auf der Zelloberfläche der Kardiomyozyten nachgewiesen. Ebenso wurde gezeigt, dass Kardiomyozyten IL-18, IL-1Ra, IL-1RI, Caspase-1 und Caspase-3 mRNA konstitutiv exprimieren.

3.1.3 Exprimierung der IL-1 α mRNA in fötalem humanem Herzgewebe und Ratten Herz

Wir haben oben gezeigt, dass kultivierte neonatale Ratten Kardiomyozyten basal und erhöht nach Stimulierung mit LPS und TNF IL-1 α mRNA und IL-1 α Protein exprimieren. In humanem Herzgewebe gesunder Patienten war keine IL-1 α mRNA vorhanden. Auch im Myokard herzinsuffizienter Patienten war keine IL-1 α mRNA nachweisbar, obwohl in kultivierten humanen Gefäßmuskelzellen IL-1 α mRNA nachzuweisen war. Hierfür könnten verschiedene Gründe vorliegen:

- 1) Kardiomyozyten in Kultur verhalten sich anders als Zellen *in vivo*.
- 2) IL-1 α spielt eine Rolle in der Entwicklung des Herzens und wird im adulten Herz nicht mehr exprimiert.
- 3) IL-1 wird in verschiedenen Spezies unterschiedlich exprimiert.

Im folgenden wurde daher

- A) die Exprimierung der IL-1 α mRNA in ganzen Herzen neonataler Ratten und kultivierten neonatalen Kardiomyozyten verglichen.
- B) die Exprimierung der IL-1 α mRNA in humanem adulten und fötalem Herz analysiert.

Die Analyse der IL-1 α mRNA Expression im neonatalen Ratten Herz wurde an Herzen von 2 Tage alten Wistar Ratten durchgeführt. Unstimulierte bzw. LPS-stimulierte kultivierte neonatale Ratten Kardiomyozyten wurden als Positivkontrolle verwendet. Wie in Abbildung 13 dargestellt, konnte sowohl im Herzgewebe der neugeborenen Ratten, als auch in unstimulierten kultivierten neonatalen Kardiomyozyten die spezifische IL-1 α Bande nachgewiesen werden.

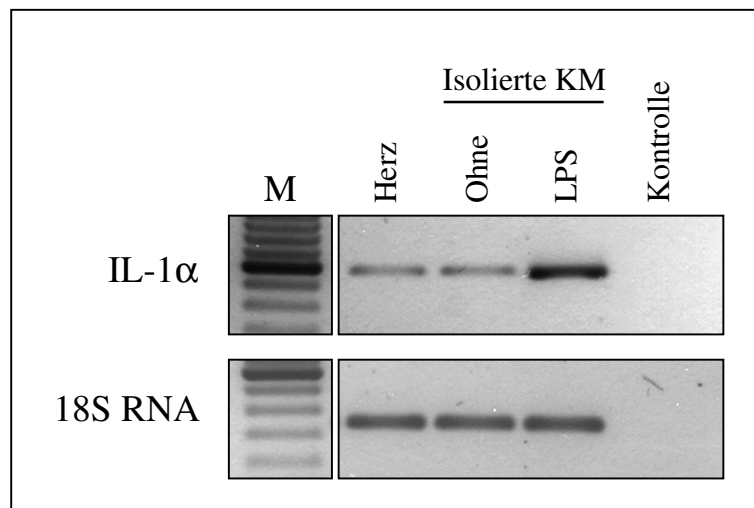


Abbildung 13: IL-1 α wird im neonatalen Herzgewebe der Ratte exprimiert. Gesamt RNA aus dem Herz von vier 2 Tage alten Ratten (Herz) wurde unmittelbar nach der Entnahme präpariert. Ebenso wurde die Gesamt RNA unstimulierter (Isolierte KM; Ohne) oder mit LPS (1 μ g/ml) stimulierter neonataler Ratten Kardiomyozyten (Isolierte KM; LPS) präpariert. Nach der RT-Reaktion wurden PCR-Reaktionen mit spezifischen Primern durchgeführt. 10 μ l des 50 μ l Ansatzes wurden im Agarose Gel (1,6%) analysiert. Die Größen (bp) der zu erwartenden Fragmente waren: 345 (18S RNA); 581 (IL-1 α). M: 100 bp Standard, die Bande mit der stärksten Intensität entspricht 600 bp. Diese Analyse wurde einmal durchgeführt. Auch in einem Experiment mit Herzgewebe einer adulten Ratte wurde IL-1 α mRNA nachgewiesen. Kontrolle, Negativkontrolle mit allen Reaktionskomponenten außer cDNA.

Der Vergleich von fötalem und adultem humanem Gewebe erfolgte in PCR Experimenten mit dem kommerziell erhältlichen „Human Cardiovascular MTCTM Panel“ (Kat.-Nr. K1427-1, Firma Clontech, Palo Alto, USA), das bereits revers transkribierte RNA verschiedener humaner Gewebe enthielt. Diese cDNA's waren nach Angaben des Herstellers frei von genomischer DNA. Die cDNA Mengen waren vom Hersteller standardisiert worden. Als Kontrollen wurden von uns die cDNA's IL-1 α stimulierter und unstimulierter Gefäßmuskelzellen verwendet. Wie in Abbildung 14 dargestellt, konnte die für das IL-1 α Gen spezifische PCR Bande nur im fötalen Herzen, aber nicht im adulten Herzen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wurde in PCR Experimenten mit einer zweiten Charge des „Human Cardiovascular MTCTM Panel“ bestätigt.

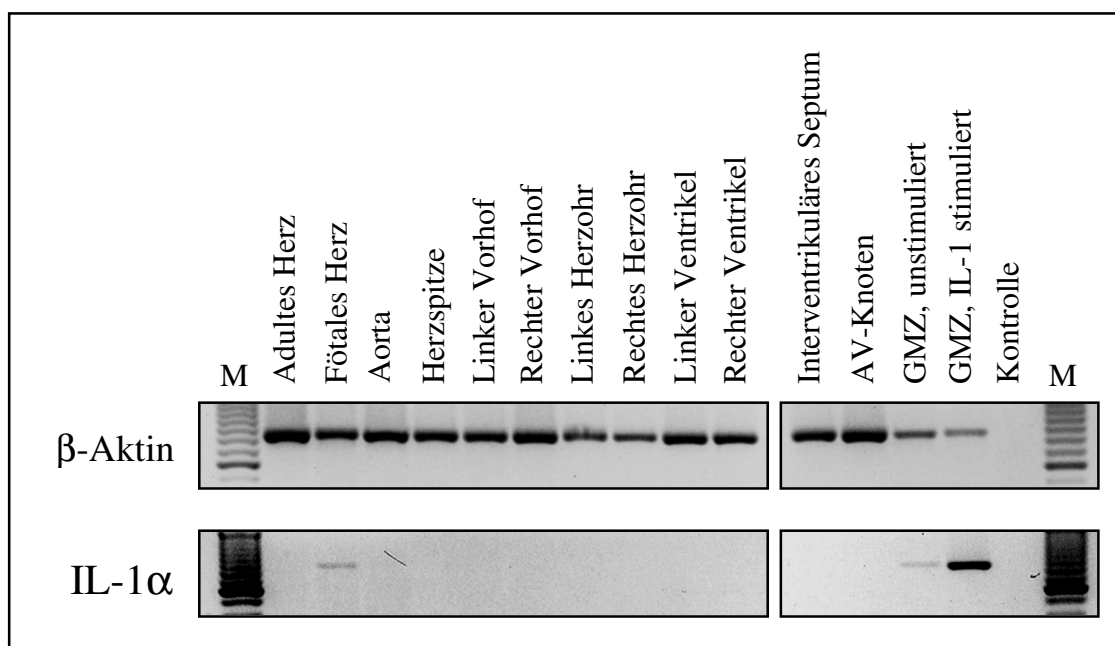


Abbildung 14: Fötale humanes Herzgewebe enthält nachweisbare IL-1 α mRNA. cDNA's aus dem „Human Cardiovascular MTCTM Panel“ und IL-1 α stimulierter bzw. unstimulierter Gefäßmuskelzellen wurden mit spezifischen Primern amplifiziert und im Agarose Gel (1,6%) untersucht. Die Größen (bp) der zu erwartenden PCR Banden waren: 855 (β -Actin), 817 (IL-1 α). M: 100 bp Standard, in dem die Bande mit der stärksten Intensität 600 bp entspricht. Es wurden mehrere vergleichbare PCR Experimente mit zwei unterschiedlichen Chargen des „Human Cardiovascular MTCTM Panel“ durchgeführt. Hier ist das Experiment mit der Charge Nr. 9011018 dargestellt. Kontrolle, Negativkontrolle mit allen Reaktionskomponenten außer cDNA.

Die dargestellten Ergebnisse lassen auf eine unterschiedliche Exprimierung der IL-1 α mRNA im humanen fötalen und adulten Herz schließen.

Auch die Exprimierung anderer Gene der Proteine der IL-1 und Caspase Familien wurde mit dem „Human Cardiovascular MTCTM Panel“ analysiert. Im Gegensatz zur IL-1 α mRNA konnten die mRNAs der IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, IL-1RI, Caspase-1 und Caspase-3 Gene sowohl im fötalen, als auch im adulten Herzen und in der Aorta detektiert werden (hier nicht dargestellt).

3.1.4 Untersuchungen zur Expressierung und Funktion des Interleukin-18 in kultivierten humanen glatten Gefäßmuskelzellen

Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigten unter anderem die Expressierung der IL-18 mRNA in neonatalen Ratten Kardiomyozyten und humanem Herzgewebe. Es existieren bisher noch keine Untersuchungen zur Proteinexpressierung und Funktion von IL-18 in kardiovaskulären Zellen. Aufgrund fehlender Ratten-spezifischer Reagenzien konnten wir diese Analysen nur im humanem System mit Gefäßmuskelzellen durchführen. Daher wurde im folgenden die IL-18 mRNA- und Proteinproduktion in humanen glatten Gefäßmuskelzellen untersucht und der Einfluss von IL-18 auf die Zytokin Produktion dieser Zellen analysiert.

3.1.4.1 Kultivierte humane Gefäßmuskelzellen exprimieren die IL-18 mRNA konstitutiv

Zunächst wurde die IL-18 mRNA Expression in humanen Gefäßmuskelzellen (GMZ) mit der RT-PCR analysiert. Sowohl unstimulierte, als auch LPS, TNF- α , IL-1 α oder IL-18 stimulierte Gefäßmuskelzellen exprimieren IL-18 mRNA. Keine der aufgezählten Stimuli führte zur deutlichen Veränderung der Intensität der amplifizierter Bande (Abb. 15).

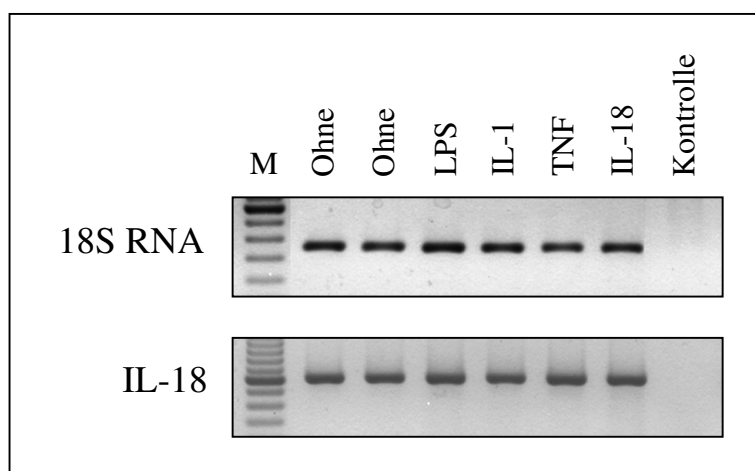


Abbildung 15: Gefäßmuskelzellen exprimieren die IL-18 mRNA konstitutiv. Humane GMZ wurden mit LPS (1 μ g/ml, LPS), TNF α (50 ng/ml, TNF), IL-1 α (10 ng/ml, IL-1), IL-18 (100 ng/ml, IL-18) oder ohne Stimulus (Ohne) inkubiert (5 Std) und anschließend die Gesamt RNA isoliert. RT-PCR wurde mit spezifischen Primern durchgeführt. Die zu erwartenden PCR Produkte (bp) waren: 345 (18S RNA) und 604 (IL-18). Hier ist ein repräsentatives Experiment aus zwei Stimulierungsexperimenten dargestellt. Beide Experimente hatten ein vergleichbares Ergebnis. M: 100 bp Standard, die Bande mit der stärksten Intensität entspricht 600 bp. Kontrolle, Negativkontrolle mit allen Reaktionskomponenten außer cDNA.

3.1.4.2 Humane Gefäßmuskelzellen exprimieren kein nachweisbares IL-18 Protein

Die IL-18 Protein Expressierung in Gefäßmuskelzellen wurde in Western Blot Experimenten mit einem IL-18 spezifischem polyklonalem Antikörper analysiert. Es konnte weder in unstimulierten Gefäßmuskelzellen noch in stimulierten GMZ das IL-18 Protein nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war im Kontrollexperiment IL-1 β nach Kostimulation der Gefäßmuskelzellen mit IL-1 α und TNF- α nachweisbar (Abb. 16). Auch in ELISA Experimenten konnte kein IL-18 in Zell-Lysaten oder Überständen der GMZ nachgewiesen werden.

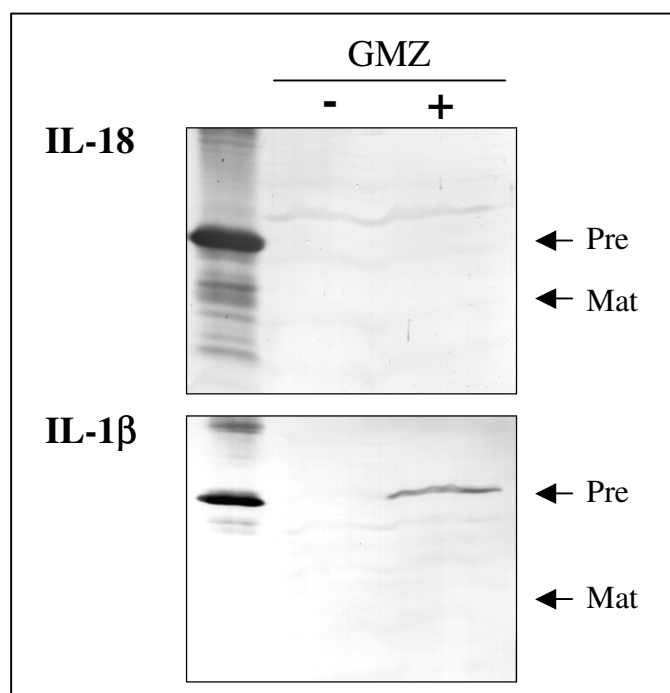


Abbildung 16: IL-18 ist in kultivierten humanen Gefäßmuskelzellen im Western Blot nicht nachweisbar. Humane Gefäßmuskelzellen wurden ohne (-) oder mit (+) IL-1 α / TNF- α (10 bzw. 50 ng/ml) inkubiert (20 Std). Lysate der Zellen wurden in der SDS-PAGE und anschließend im Western Blot analysiert. Die Färbung wurde mit polyklonalem IL-18 Antikörper (AF318; 1 μ g/ml) bzw. mit IL-1 β spezifischem monoklonalem Antikörper (FIB-3; 1 μ g/ml) durchgeführt. Pro Bahn wurden Lysate mit $2,5 \times 10^6$ GMZ aufgetragen. Als Kontrollen wurden pro Bahn 300 ng der entsprechenden Vorstufe (Pre) aufgetragen. Hier ist ein repräsentatives aus 3 durchgeführten Experimenten dargestellt.

3.1.4.3 IL-18 beeinflusst die Produktion und Freisetzung von aktivem IL-6 in humanen Gefäßmuskelzellen nicht

Gefäßmuskelzellen produzieren potent IL-6. Wir haben daher untersucht, ob IL-18 die IL-6 Produktion in Gefäßmuskelzellen beeinflusst. Obwohl IL-1, TNF oder LPS stimulierte GMZ die erwartete IL-6 Produktion zeigten, war nach IL-18 Stimulierung keine Veränderung der basalen IL-6 Produktion festzustellen (Abb. 17).

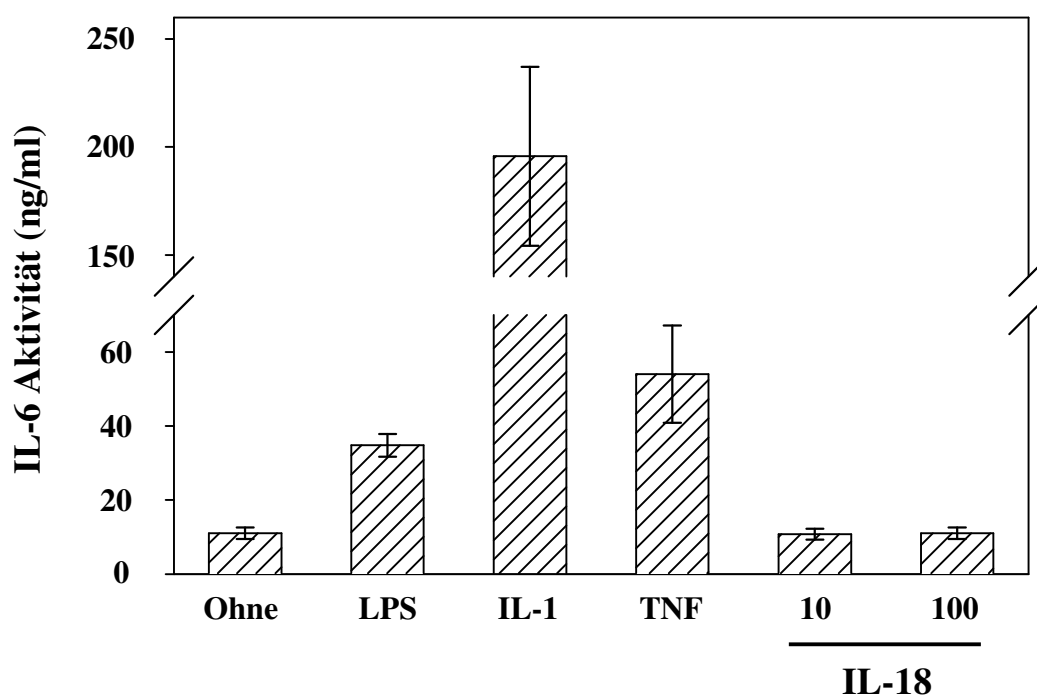


Abbildung 17: IL-18 stimuliert die IL-6 Produktion in humanen Gefäßmuskelzellen nicht. Humane Gefäßmuskelzellen wurden mit LPS (LPS, 1 µg/ml), IL-1α (IL-1, 10 ng/ml), TNF-α (TNF, 50 ng/ml), IL-18 (IL-18, 10 oder 100 ng/ml) oder ohne Stimulus (Ohne) inkubiert (20 Std). Anschließend wurden die Überstände abgenommen, zentrifugiert (1.200 U/Min; 10 Min) und die IL-6 Aktivität in den Überständen im 7TD1-Proliferationstest gemessen. Die IL-6 Aktivität wurde anhand eines mitgeführten Standards berechnet. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung in ng/ml angegeben. Ein repräsentatives aus drei durchgeführten Experimenten ist dargestellt.

Die Experimente zeigten also, dass kultivierte humane Gefäßmuskelzellen zwar IL-18 mRNA konstitutiv exprimieren, jedoch kein nachweisbares IL-18 Protein produzieren und nicht auf das rekombinante humane IL-18 durch IL-6 Produktion reagieren.

Im bisher vorgestellten Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, IL-1RI, Caspase-1 und Caspase-3 mRNA in Zellen des kardiovaskulären Systems exprimiert werden. Neben den Patientenuntersuchungen, die auf ein gestörtes IL-1/IL-1Ra Gleichgewicht in den DCM Patienten schließen lassen, war wesentliches Ergebnis dieser Arbeit, dass IL-1 α in kultivierten neonatalen Ratten Kardiomyozyten nicht nur transkribiert, sondern auch translatiert wird und an der Oberfläche der Ratten Kardiomyozyten nachzuweisen ist. Biologisch aktives IL-1 auf der Oberfläche der Kardiomyozyten könnte zur Aktivierung benachbarter Zellen oder einwandernder Leukozyten im Herzen beitragen. Es ist allerdings zu vermuten, dass fötales und adultes Herzgewebe IL-1 α unterschiedlich exprimieren und IL-1 α diese Funktionen lediglich im sich entwickelnden Herzen ausübt.

3.2 Funktionelle Charakterisierung einer IL-1 β Prozessierungs-hemmenden Aktivität aus humanen glatten Gefäßmuskelzellen

Wie bereits vorne (Punkt 1.3) zum Ausdruck gebracht, kann die Funktion des IL-1 durch die produzierte IL-1 Menge, die Expression der Rezeptoren, die Anwesenheit des Antagonisten und im Falle der IL-1 β Vorstufe auch noch durch die Aktivität der Caspase-1 beeinflusst werden. In unserer Arbeitsgruppe war eine Aktivität in humanen glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen worden, die die IL-1 β Prozessierung hemmte. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass auch Kardiomyozyten-Präparationen die Prozessierung von IL-1 β hemmten. Da IL-1 β nur in prozessierter Form biologisch aktiv ist, stellt diese inhibitorische Substanz einen möglichen Regulator IL-1-vermittelter Funktionen dar. In diesem Teil der vorliegenden Arbeit steht die Fortsetzung der Charakterisierung der inhibitorischen Aktivität aus humanen Gefäßmuskelzellen im Mittelpunkt.

3.2.1 Analyse der Substratspezifität der IL-1 β Prozessierungs-hemmenden Aktivität anhand der Prozessierung eines zweiten Caspase-1 Substrates, der Interleukin-18 Vorstufe

3.2.1.1 Klonierung der IL-18 Vorstufe aus Gefäßmuskelzellen

Die früheren Arbeiten hatten gezeigt, dass die Prozessierung der IL-1 β Vorstufe durch Caspase-1 unter Zugabe von Lysaten aus Gefäßmuskelzellen inhibiert wird. Es war bisher nicht bekannt, ob auch die Prozessierung eines weiteren Caspase-1 Substrates, der IL-18 Vorstufe, durch diese Aktivität beeinflusst wird. Zur Durchführung dieser Experimente war es zunächst erforderlich die IL-18 Vorstufe rekombinant herzustellen. Hierzu wurde das QIAexpressTM System verwendet. Gesamt RNA aus humanen GMZ wurde revers transkribiert und die cDNA (604 bp) der IL-18 Vorstufe mit dem Primer-Paar „IL-18, human“ in der PCR-Reaktion mit Pfu-DNA-Polymerase amplifiziert und kloniert. Nach der Transformation des IL-18 Vorstufe Konstruktes (pQE-30/IL-18_{pre}) in kompetente Amp-sensitive *E. coli* Zellen (M-15 [pREP4]) wurden 5 Amp-resistente Klone erhalten. Wie die RT-PCR zeigte, war das Insert in der richtigen Größe in allen 5 Klonen vorhanden. Die Protein-Expression der transformierten Klone wurde in Western Blot Experimenten untersucht. In allen 5 Klonen konnte nach IPTG-Induktion die IL-18 Vorstufe verstärkt nachgewiesen werden. Die Abbildung 18 zeigt das IPTG-Induktionsexperiment für einen ausgewählten Klon.

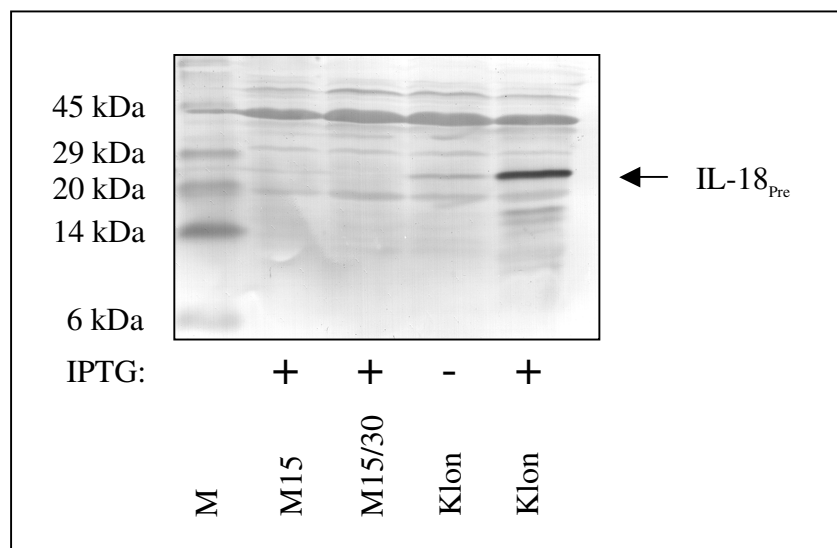


Abbildung 18: IPTG induziert die Proteinexpression der IL-18 Vorstufe in *E. coli*. Ein mit pQE-30/IL-18_{Pre} transformierter *E. coli* M15 Klon (Klon) wurde über Nacht kultiviert (5 ml) und anschließend in Abwesenheit (-) oder Gegenwart (+) von IPTG (1 mM) inkubiert. 2 ml der Bakterienkultur wurden zentrifugiert und in 50 µl Probenpuffer aufgenommen, in der SDS-PAGE und anschließend im Western Blot mit einem monoklonalen Anti-IL-18 Antikörper (MAB318; 2 µg/ml) analysiert. Eine Kultur des *E. coli* Stammes M15 (M15) und ein Ansatz mit pQE-30 transformierten *E. coli* M15 (M15/30) wurden in parallelen Experimenten mit IPTG stimuliert und dienten als Kontrolle. Die durch IPTG induzierte Bande der IL-18 Vorstufe ist rechts durch den Pfeil hervorgehoben (IL-18_{Pre}). M: Molekulargewichtsstandard.

3.2.1.2 Isolierung und Charakterisierung der rekombinanten IL-18 Vorstufe

Für die Herstellung größerer Mengen der IL-18 Vorstufe wurde eine 2 Liter Kultur des oben beschriebenen M15/pQE-30/IL-18_{Pre} Klones verwendet. Die Sequenzanalyse der Plasmid-DNA dieses Klones wies keine Unterschiede zu den publizierten Daten auf. Nach der Zentrifugation wurde das Bakterien-Pellet in Harnstoff-Puffer (pH 8,0) lysiert und zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dieses Lysates auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Spülen der Säule mit Harnstoff-Puffer bei pH 8,0 eluiert. Das Spülen der Säule mit einem absteigenden pH-Stufengradienten führte zur Ablösung der IL-18 Vorstufe von der Ni-NTA Agarose, wie im Western Blot in Abbildung 19 gezeigt. Fraktion 7 enthielt die höchste Konzentration des rekombinanten Proteins und wurde für die Weiterverarbeitung verwendet. Vergleichbare Fraktionen aus mehreren Isolierungen wurden vereinigt und mit Hilfe einer PD10 Säule in 10 mM Tris-HCl Puffer (pH 9,0) überführt. Die Verwendung von Wasser für die Umpufferung dieses Proteins führte zum Ausfallen des Proteines und zu großen Verlusten.

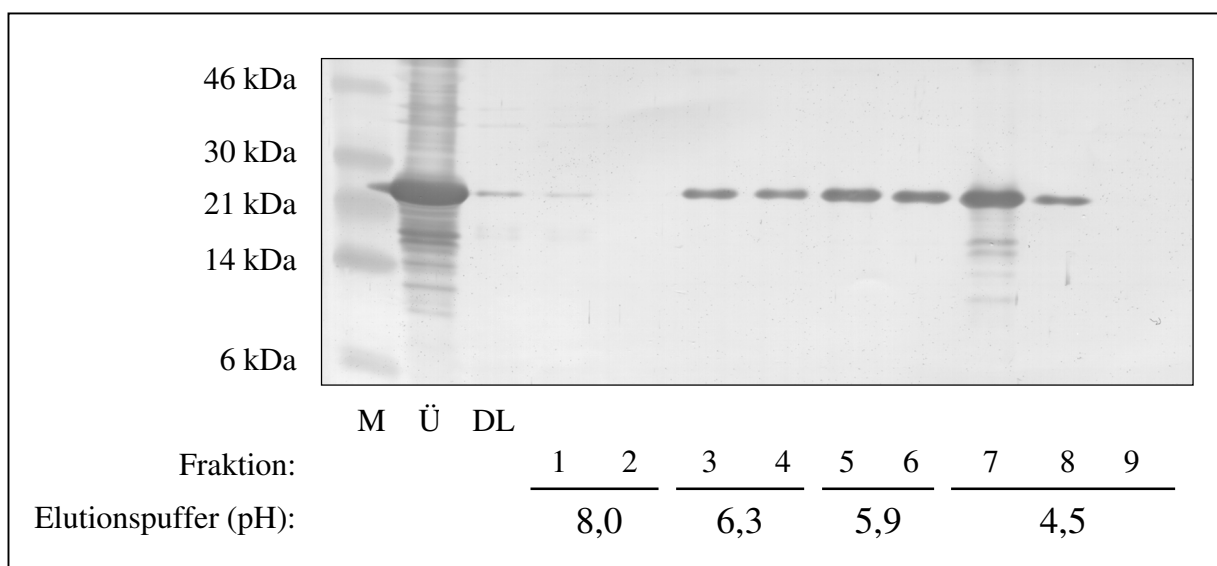


Abbildung 19: Affinitätschromatographische Isolierung der rekombinanten IL-18 Vorstufe aus transformierten *E. coli* - Zellen. Eine Kolonie eines korrekt mit pQE-30/IL-18_{pre} transformierten *E. coli* (M15[pREP4]) Klons wurde in einer 2 Liter Kultur bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 kultiviert und anschließend mit 1 mM IPTG inkubiert (4 Std). Die Bakterien wurden zentrifugiert (4.000 x g, 15 Min, 4°C) und das Pellet (4,1 g) in 24 ml Harnstoff-Puffer (pH 8,0) lysiert. Nach erneuter Zentrifugation (9.000 x g, 20 Min, 4°C) wurde der Überstand (Ü) in mehrere 3,2 ml-Portionen aliquotiert. Eine Aliquot wurde mit 8 ml Ni-NTA-Säulenmaterial inkubiert (1 Std), das zuvor in Harnstoff-Puffer (pH 8,0) äquilibriert worden war, und das ungebundene Material (DL = Durchlauf) gesammelt. Gebundene Proteine wurden dann mit Harnstoff-Puffern der angegebenen pH-Werte (Elutionspuffer (pH)) eluiert und die Fraktionen (Fraktion) anschließend in der SDS-PAGE und im Western Blot mit monoklonalen IL-18 Antikörper (MAB318; 2 µg/ml) analysiert. M: Molekulargewichtsstandard.

Die mit Hilfe des Molekulargewichtsstandards ermittelte Größe des hergestellten Proteins betrug 24 kDa (Abbildungen 18 und 19), was mit der aus der Nukleinsäuresequenz ableitbaren Molekulargröße übereinstimmte und in Zusammenhang mit der cDNA-Sequenzanalyse auf die vollständige Expression der IL-18 Vorstufe hindeutete. Der weiteren Charakterisierung der IL-18 Vorstufe diente auch die Prozessierung durch die rekombinante Caspase-1 bzw. Monozyten-Präparationen. Wie Abbildung 20 zeigt, wird das hergestellte Protein durch Caspase-1 und durch Monozyten-Lysate prozessiert. Die Größe des durch Caspase-1 Prozessierung entstandenen Produktes liegt bei etwa 18 kDa, was der erwarteten Größe entspricht. Die Inkubation mit Monozyten-Lysaten führt zu mehreren Spaltprodukten.

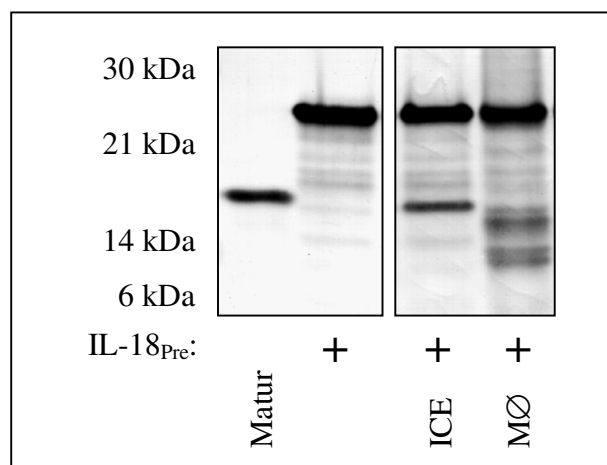


Abbildung 20: Rekombinante Caspase-1 und Monozyten-Präparationen prozessieren die IL-18 Vorstufe. Rekombinant hergestellte IL-18 Vorstufe (IL-18_{Pre}; 300 ng) wurde in Gegenwart von Prozessierungspuffer (1x) mit der rekombinanten Caspase-1 (ICE) (0,2 U/μl) oder mit dem Monozyten-Lysat (MØ; 5.000 Zellen/μl) in 50 μl Prozessierungsansätzen inkubiert (37°C, 30 Min). Die Ansätze wurden in der SDS-PAGE und anschließend im Western Blot mit dem monoklonalen IL-18 Antikörper (MAB318; 2 μg/ml) analysiert. 200 ng des rekombinanten maturen humanen IL-18 (Matur) wurde pro Bahn aufgetragen. Dieses Ergebnis wurde in 2 weiteren Experimenten bestätigt.

Aufgrund der oben beschriebenen Experimente (cDNA Sequenzierung; spezifische Färbung mit dem monoklonalen Antikörper; Prozessierung durch Caspase-1) wurde geschlossen, dass die IL-18 Vorstufe für die weiteren Experimente einsetzbar ist.

3.2.1.3 Lysate der Gefäßmuskelzellen hemmen die Prozessierung der IL-18 Vorstufe durch Caspase-1

Frühere Experimente haben gezeigt, dass die Prozessierung der IL-1β Vorstufe durch die Caspase-1 nach Präinkubation der IL-1β Vorstufe mit einem Lysat von Gefäßmuskelzellen inhibiert wurde. Da neben IL-1 auch IL-18 durch Caspase-1 aktiviert wird sollte hier untersucht werden, ob die GMZ Lysate auch die Prozessierung der IL-18 Vorstufe blockieren. In Abbildung 21 werden zunächst matures IL-18 und die IL-18 Vorstufe gezeigt. Nach Inkubation der IL-18 Vorstufe mit rekombinanter Caspase-1 ist die prozessierte IL-18 Form nachweisbar. Zur Analyse der Inhibition der IL-18 Vorstufe wurde die GMZ-Präparation auf unterschiedliche Weise (A – C) mit der IL-18 Vorstufe bzw. der Caspase-1 präinkubiert. Nach Präinkubation der GMZ-Präparation mit der IL-18 Vorstufe (A) oder der Caspase-1 (B) wurde die Prozessierung vergleichbar gehemmt. Nach der Präinkubation der Caspase-1 mit der Vorstufe und darauffolgender Zugabe der GMZ-Präparation (C) wurde die Prozessierung ebenfalls, aber weniger effektiv, blockiert.

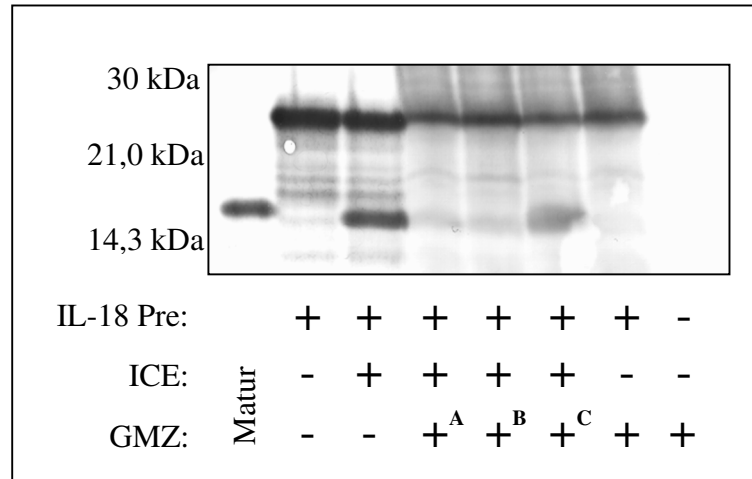


Abbildung 21: Vaskuläre Gefäßmuskelzellen inhibieren die Prozessierung der IL-18 Vorstufe durch Caspase-1. Zell-Lysate aus Gefäßmuskelzellen (10 µl; 50.000 Zellen/µl; GMZ) wurden mit der IL-18 Vorstufe (300 ng) und rekombinanter Caspase-1 (0,2 U/µl; Endkonzentration; ICE) in Gegenwart von Prozessierungspuffer (1x) in einem Gesamt Volumen von 50 µl inkubiert (37°C, 30 Min). Zuvor wurden die Komponenten des Ansatzes unterschiedlich vorinkubiert (37°C, 10 Min):

- A: Präinkubation der IL-18 Vorstufe mit GMZ-Lysat
- B: Präinkubation der Caspase-1 mit GMZ-Lysat
- C: Präinkubation der IL-18 Vorstufe mit Caspase-1 vor der Zugabe des GMZ-Lysates

Die Ansätze wurden in der SDS-PAGE und anschließend im Western Blot mit dem monoklonalen IL-18 Antikörper (MAB318; 2 µg/ml) analysiert. Das rekombinante mature humane IL-18 wurde als Kontrolle (200 ng/Bahn) aufgetragen. Dieses Ergebnis wurde in zwei zusätzlichen Experimenten bestätigt.

3.2.2 Die IL-1β Prozessierungs-hemmende Aktivität aus glatten Muskelzellen blockiert Caspase-1, aber nicht Caspase-3

Hemmt der Prozessierungsinhibitor aus glatten Gefäßmuskelzellen nur die Prozessierung durch Caspase-1 oder beeinflusst er auch die Aktivitäten anderer Caspasen? Um diese Frage zu beantworten wurden Experimente mit der Caspase-3 und deren Substrat poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) durchgeführt. PARP ist ein Enzym, das eine wichtige Rolle bei der Erkennung von DNA-Schädigungen und der Reparatur solcher Schäden spielt. Während der Apoptose wird PARP (116 kDa) durch aktivierte Caspase-3 in zwei Fragmente (25 und 85 kDa groß) gespalten, wodurch das Enzym inaktiviert wird und die apoptotischen Zellen von der Reparatur der DNA abhalten werden. Als PARP Quelle haben wir den Kernextrakt der Zelllinie „Jurkat“ verwendet. In Abbildung 22 wurde auf die erste Bahn der Jurkat-Kernextrakt aufgetragen. Die obere Bande stellt die unprozessierte PARP (116 kDa) dar. Die untere Bande zeigt die ebenfalls im Zellextrakt vorhandene gespaltene 85 kDa große inaktive

PARP. Die Inkubation des Jurkat-Kernextraktes mit der rekombinanten Caspase-3 führt zur Verstärkung der prozessierten Bande. In zwei weiteren Parallelansätzen wurden die Komponenten Jurkat-Kernextrakt, Caspase-3 und GMZ-Lysat in unterschiedlichen Kombinationen vorinkubiert (A und B). Die GMZ-Präparation zeigte in keinem der gewählten Ansätze einen inhibitorischen Einfluss auf die PARP-Prozessierung durch die rekombinante Caspase-3, obwohl in parallel durchgeführten Kontrollexperimenten diese Präparation inhibitorisch auf die IL-1 β Prozessierung wirkte (hier nicht dargestellt).

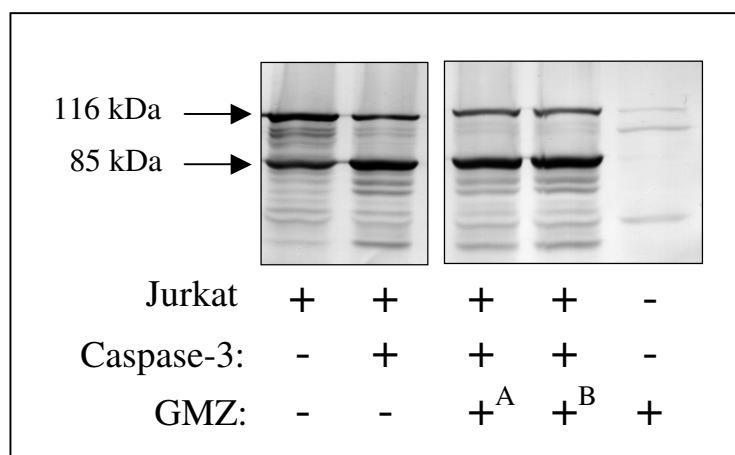


Abbildung 22: Lysate vaskulärer GMZ inhibieren nicht die PARP-Prozessierung durch die rekombinante Caspase-3. Ein Kern-Extrakt der Zelllinie „Jurkat“ wurde präpariert (Protein Konzentration: 3,5 mg/ml). 7,5 μ l dieser Präparation wurden mit rekombinanter Caspase-3 (7,5 μ l; 1 ng/ μ l) im Prozessierungspuffer (1x) in Gegenwart oder Abwesenheit des GMZ-Lysates (7,5 μ l; 25.000 Zellen/ μ l) in einem Gesamt Volumen von 37,5 μ l inkubiert (37°C, 1Std). Die GMZ-Lysate wurden zuvor unter folgenden Bedingungen präinkubiert:

- A:** Präinkubation mit dem Jurkat-Kernextrakt (37°C, 10 Min)
- B:** Präinkubation mit der rekombinanten Caspase-3, (37°C, 10 Min)

Nach dem Abstoppen der Reaktion mit 22 μ l Probenpuffer wurden die Ansätze denaturiert und in der 10% SDS-PAGE und anschließend im Western Blot mit PARP-spezifischem monoklonalem Antikörper (66401A;1 μ g/ml) analysiert. Es wurden insgesamt 3 Prozessierungsexperimente mit vergleichbarem Ergebnis durchgeführt.

3.2.3 Analyse potentieller Bindungsregionen zwischen der Prozessierungshemmenden Aktivität und der IL-1 β Vorstufe

Frühere Experimente haben belegt, dass die Blockierung der Prozessierung der IL-1 β Vorstufe durch rekombinante Caspase-1 am stärksten ist, wenn die GMZ Präparation mit der IL-1 β Vorstufe vorinkubiert wird. Diese Experimente führten zur Hypothese, dass eine Interaktion der inhibitorischen Aktivität aus glatten Gefäßmuskelzellen mit der IL-1 β Vorstufe zur Blockierung der Prozessierung führen könnte. Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigten, dass der von uns in humanen Gefäßmuskelzellen vermutete Inhibitor die Prozessierung eines weiteren Caspase-1 Substrates, der IL-18 Vorstufe, hemmte. Möglicherweise geschieht das ebenfalls durch Bindung des Inhibitors an die IL-18 Vorstufe. IL-1 β und IL-18 sind zu 19% homolog und bestehen beide aus 12 β -Faltblattstrukturen. Der Bereich der stärksten Homologie erstreckt sich durch die Faltblattstrukturen β 8, β 9, und β 10. Diese Regionen stellen potentielle Kandidaten für Bindungsstellen des Inhibitors aus Gefäßmuskelzellen dar. Mit dem Ziel die oben genannte Hypothese zu testen und mögliche Bindungsstellen des Inhibitors an die IL-1 β Vorstufe einzugrenzen, haben wir daher Deletionsmutanten der IL-1 β Vorstufe rekombinant hergestellt.

3.2.3.1 Herstellung und Charakterisierung von Deletionsmutanten der IL-1 β Vorstufe

In Abbildung 23 sind die vier ausgewählten Deletionsmutanten schematisch dargestellt. Es wurden zwei Deletionen des C-Terminus, C1 (M1-E212) und C2 (M1-P139), eine Deletion des N-Terminus N (M71-S269) und eine Deletion NC1 (M71-E212), bei der sowohl N- als auch C-Terminus entfernt wurde, hergestellt. Die komplette IL-1 β Vorstufe entspricht M1 bis S269.

Bei Deletionen am C-Terminus wurde darauf geachtet, dass die Schnittstellen zwischen den β -Faltblattstrukturen liegen (im Konstrukt C1 zwischen β 7 und β 8; im Konstrukt C2 zwischen β 2 und β 3). Basierend auf Literaturdaten wurde die Aminosäure Prolin beibehalten wenn sie im ausgewählten Bereich vorhanden war. Bei der Deletionsmutante N wurden die ersten 70 Aminosäuren entfernt und das Konstrukt fängt mit dem Methionin in Position 71 an. Dieses Subpeptid hatte in Untersuchungen von Jobling und Kollegen (Jobling et al, 1988), ähnlich wie die IL-1 β Vorstufe, eine geringfügige biologische Aktivität.

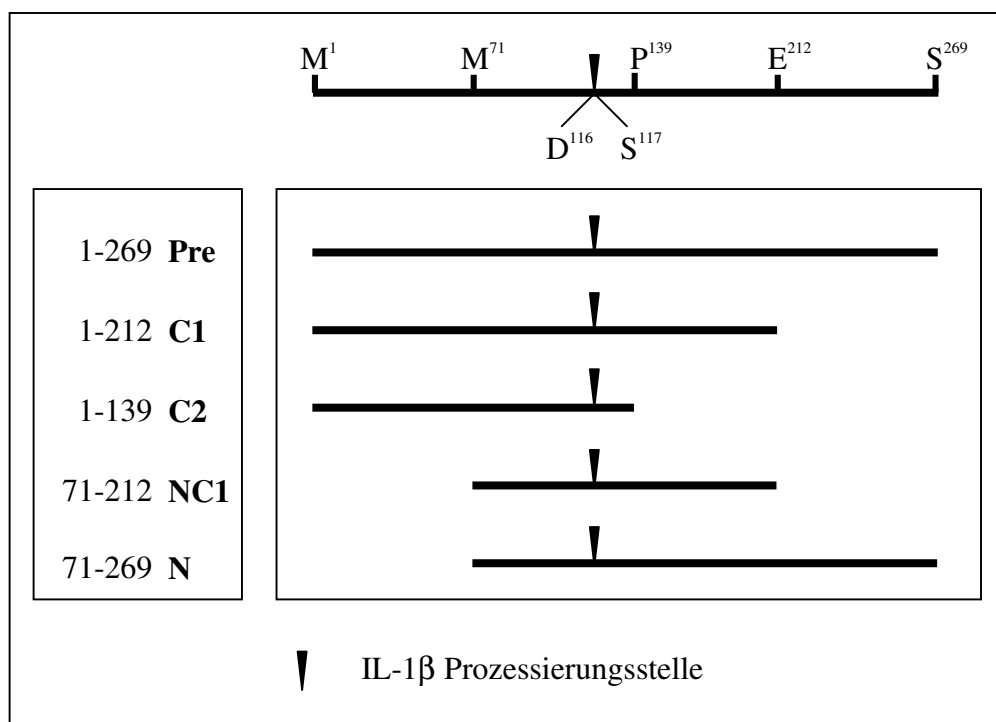


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Deletionen der IL-1 β Vorstufe. Die ausgewählten Deletionen der IL-1 β Vorstufe sind im linken Kasten der Abbildung folgendermaßen bezeichnet: Pre: IL-1 β Vorstufe (AS 1-269); C1: Deletion C1 (AS 1-212); C2: Deletion C2: (AS 1-139); NC1: Deletion NC1 (AS 71-212); N: Deletion N (AS 71-269).

Proteinexpression der Deletionsmutanten. Zur Expression der Deletionsmutanten der IL-1 β Vorstufe in *E.coli* wurde das QIAexpressTM System verwendet. Die Deletionen wurden durch Amplifikation der Teilfragmente der cDNA des humanen IL-1 β Genes hergestellt. Dafür wurde Gesamt RNA aus stimulierten Gefäßmuskellzellen revers transkribiert und in der PCR mit Pfu-DNA-Polymerase mit entsprechenden Primern amplifiziert.

Die Größen der amplifizierten cDNA-Fragmente waren: für C1 - 658 bp, für C2 - 439 bp, für N - 622 bp, für NC1 - 448 bp. Durch die Primer enthielten die amplifizierten cDNA-Fragmente Schnittstellen für die Endonukleasen BamH1 und Pst1 und konnten, wie oben für die IL-18 Vorstufe beschrieben, zur Herstellung der Expressionsplasmide in den pQE-30 Vektor eingebaut werden. Nach der Plasmid-Transformation in den *E. coli* Stamm M15[pREP4] wurden in den erhaltenen Klonen das Vorhandensein und die Größe der Inserts in PCR-Studien untersucht und die Induzierbarkeit der Protein-Expression unter Zugabe von IPTG in Western Blot Experimenten nachgewiesen (hier nicht dargestellt). Die Sequenzierung der geeigneten Klone mit pQE-30 spezifischen Primern (pQE-30^S und pQE-30^A) ergab, dass alle cDNA-Fragmente im richtigen Leseraster eingebaut waren. Bei cDNA-Fragmenten für die Deletionen N und NC1 konnten keine Unterschiede zur Sequenz aus der Genbank

(„Accession no.“ K02770) festgestellt werden. In Klonen für Deletionen C1 und C2 befand sich an der Position 6 Glutamin statt Lysin, verursacht durch den Austausch eines Adenosins durch Guanin. Dies war in beiden unabhängig voneinander amplifizierten Fragmenten der Fall. Eine von einer anderen Arbeitsgruppe publizierte Sequenz für das humane IL-1 β Gen („Accession no.“ X04500) enthielt ebenfalls an der Aminosäure-Position 6 nach dem Start-Methionin ein Glutamin. Die analysierten Klone entsprachen also Literaturdaten und wurden für die Herstellung größerer Protein-Mengen verwendet.

Isolierung der rekombinanten Deletionen der IL-1 β Vorstufe: Die Deletionsmutantenproteine wurden aus 500 ml Kulturen nach der oben für die IL-18 Vorstufe beschriebenen Methode isoliert. Nach der Umpufferung der gesammelten Fraktionen mit Hilfe von PD-10 Säulen in 10 mM Tris-HCl Puffer (pH 9,0) wurden Stammlösungen der jeweiligen Deletionsmutanten in folgenden Konzentrationen hergestellt: Deletion C1 - 0,85 mg/ml; Deletion C2 - 0,12 mg/ml; Deletion NC1 - 0,12 mg/ml; Deletion N - 0,24 mg/ml.

Charakterisierung der Deletionsmutanten: Die erzeugten rekombinanten Proteine wurden in der SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Abb. 24). Die für die hergestellten Deletionsmutanten ermittelte Molekulargewichte waren etwa 27 kDa für die Deletion C1, 18 kDa für die Deletion C2, 25 kDa für die Deletion N und 19 kDa für die Deletion NC1. Dies entsprach den erwarteten Molekulargewichten unter Berücksichtigung des vektorbedingten Anknüpfens von 10 Aminosäuren und deutet auf eine vollständige Expression der in den pQE-30 Vektor klonierten cDNA-Deletionsfragmente der IL-1 β Vorstufe hin.

Neben der für die Deletion N erwarteten Protein-Bande (25 kDa) ist im Coomassie gefärbten Gel ein weiteres Protein mit einem niedrigeren Molekulargewicht (19 kDa) sichtbar. Dieses Protein entstand möglicherweise durch einen frühzeitigen Abbruch der Translatierung.

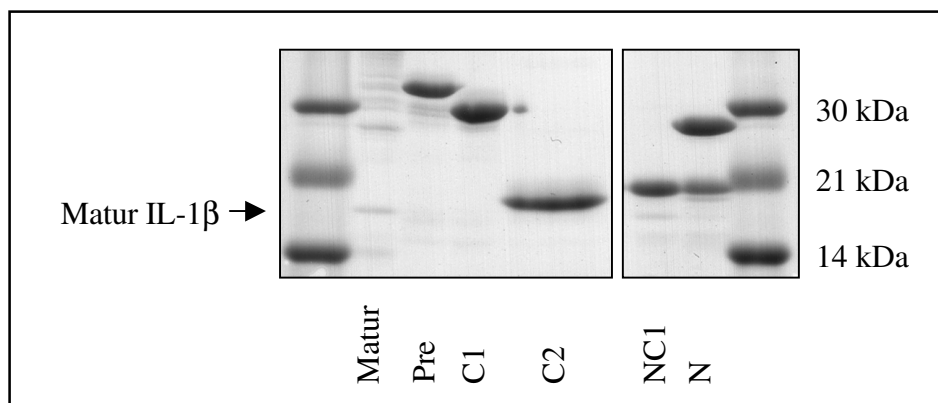


Abbildung 24: Coomassie-Färbung der rekombinant hergestellten Deletionen der IL-1 β Vorstufe. Die IL-1 β Vorstufe (3 μ g) und die rekombinant hergestellten Deletionsmutanten der IL-1 β Vorstufe C1 (5 μ g), C2 (3 μ g), NC1 (2 μ g), N (2 μ g), sowie das mature IL-1 β (1 μ g) wurden in der SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie gefärbt. Das Ergebnis wurde in einem weiteren Experiment bestätigt. Rechts und links befindet sich der Molekulargewichtsstandard.

Der nächste Schritt der Charakterisierung der Deletionsmutanten der IL-1 β Vorstufe war die Überprüfung der Prozessierbarkeit durch die rekombinante Caspase-1. Die Deletionen und deren durch Caspase-1 entstehenden Spaltprodukte sind in Abbildung 25 schematisch dargestellt.

Der zur Verfügung stehende Anti-IL-1 β Antikörper (FIB-3 Antikörper) erkennt ein Epitop im C-Terminus des IL-1 β (graues Viereck in Abbildung 25). Mit diesem Antikörper kann nur die Prozessierung der IL-1 β Vorstufe und der Deletion N detektiert werden. Die durch Caspase-1 entstehenden N-Terminale Spaltprodukte der Deletionen C1, C2, NC1 können mit einem monoklonalen RGS-His Antikörper detektiert werden. Dieser Antikörper erkennt ein Arg-Gly-Ser-(His-His-His-His) Epitop (RGS·His) innerhalb der 10 durch den pQE-30 Vektor angeknüpften Aminosäuren am N-Terminus der rekombinant hergestellten Proteine (weißes Viereck [RGS·His] in Abbildung 25).

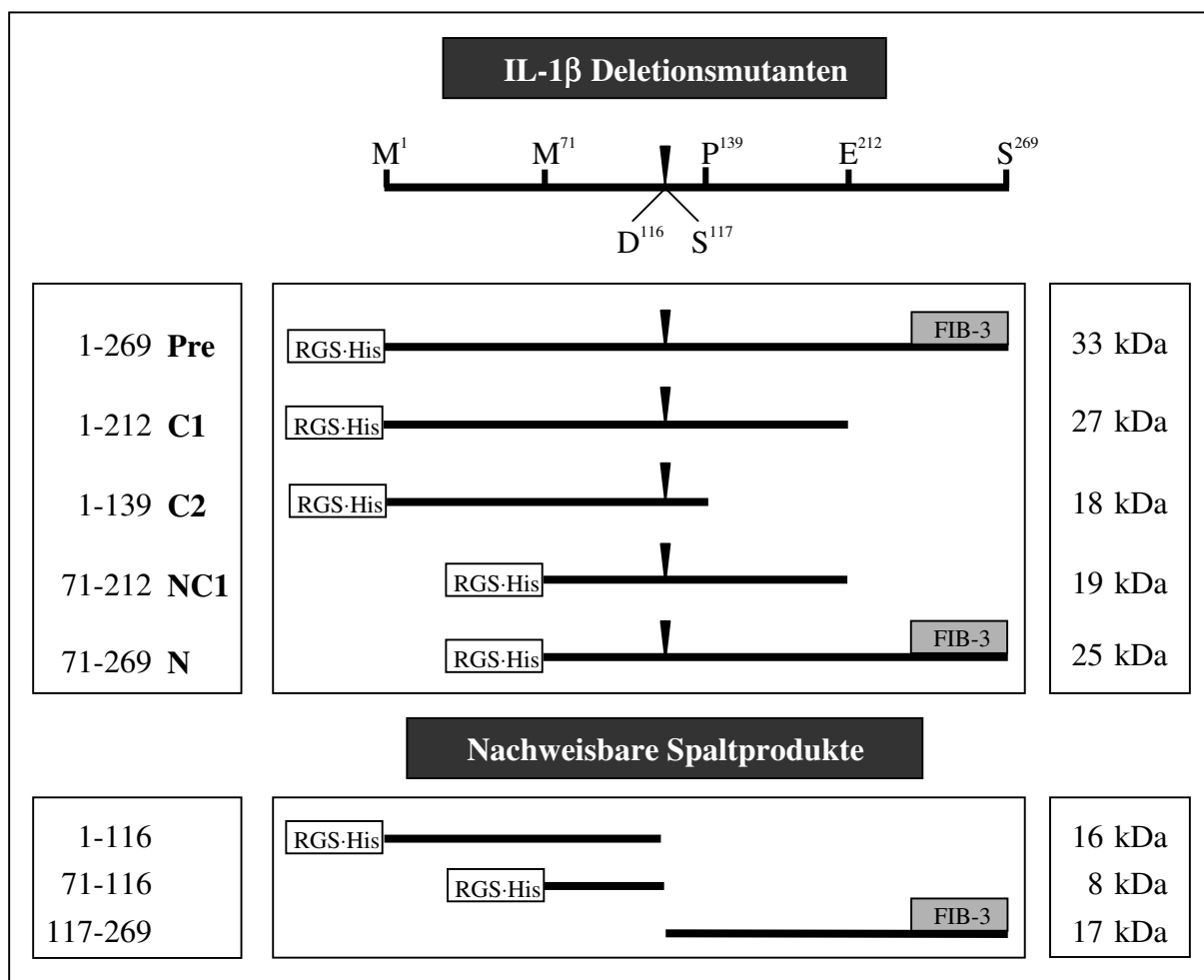


Abbildung 25: Schematische Darstellung der nach Caspase-1-Prozessierung nachzuweisenden Spaltprodukte der IL-1 β Deletionsmutanten. RGS-His, Epitop des RGS-His Antikörpers; FIB-3, Epitop des FIB-3 Antikörpers (schematische Darstellung). Der Pfeil stellt die Prozessierungsstelle dar.

Wie in Abbildung 26 dargestellt, konnten die Deletionsmutanten durch rekombinante Caspase-1 prozessiert werden. Die Größen der durch den IL-1 β Antikörper erkannten Spaltprodukte der IL-1 β Vorstufe und der Deletion N sind vergleichbar (Abbildung 26A). Die durch den RGS-His Antikörper gefärbten prozessierten Banden der Deletionen C1, C2 und der IL-1 β Vorstufe laufen ebenfalls in gleicher Höhe im Western Blot (Abbildung 26B). Bei der Prozessierung der Deletion NC1 wird, wie erwartet, ein Spaltprodukt der Größe 6 bis 8 kDa gefärbt. Auch Monozyten-Lysate prozessierten die Deletionsmutanten der IL-1 β Vorstufe wie erwartet (hier nicht dargestellt).

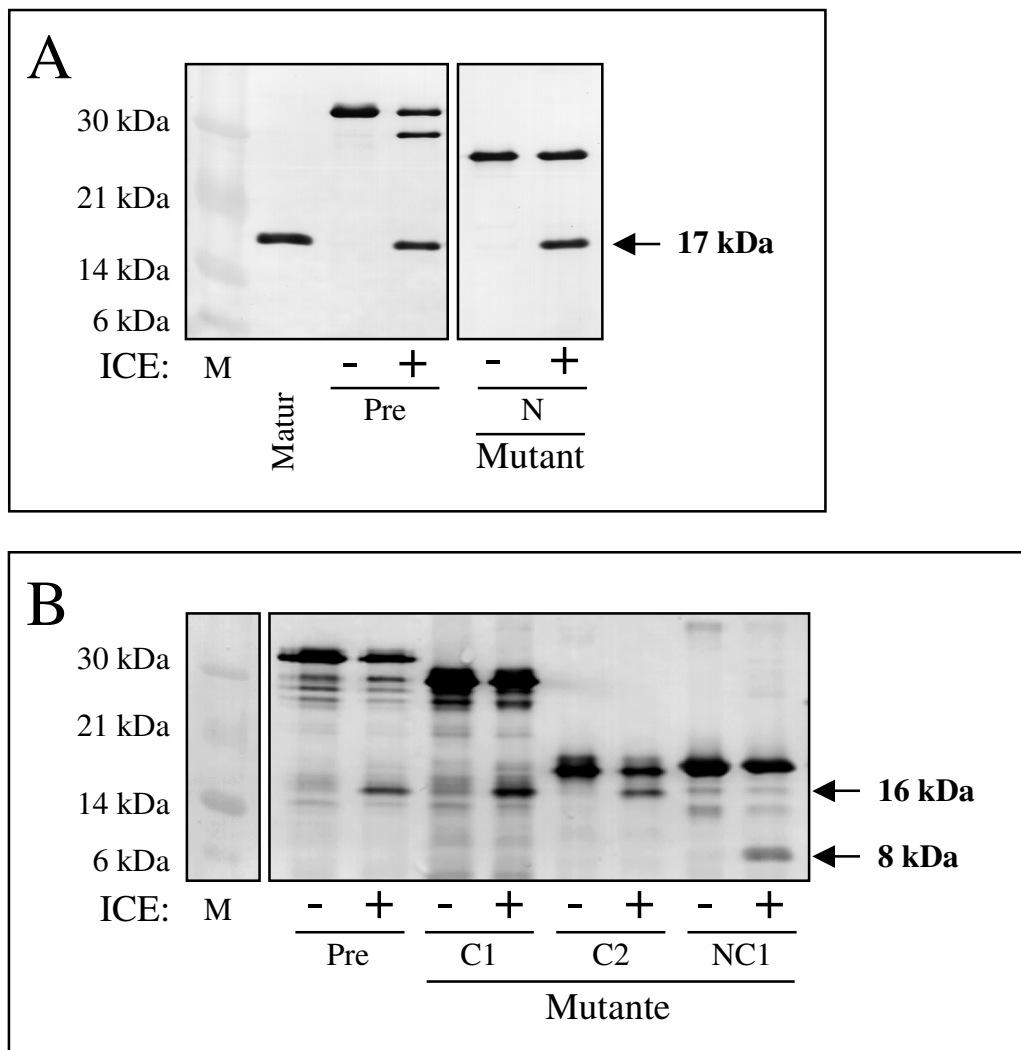


Abbildung 26: Prozessierung der Deletionsmutanten der IL-1 β Vorstufe durch Caspase-1. Die IL-1 β Vorstufe (Pre; 0,6 μ g) und die rekombinant hergestellten Deletionsmutanten der IL-1 β Vorstufe C1 (1,4 μ g), C2 (0,6 μ g), NC1 (1,2 μ g) und N (0,5 μ g) wurden mit der rekombinanten Caspase-1 (ICE; 0,1 U/ μ l) in Gegenwart von Prozessierungspuffer (1x) in 50 μ l inkubiert (37°C, 20 Min). Die Prozessierungsansätze wurden anschließend in der SDS-PAGE getrennt. Die gebildeten Spaltprodukte wurden im Western Blot mit den folgenden Antikörpern angefärbt:

A: monoklonaler IL-1 β Antikörper (FIB-3; 1 μ g/ml)

B: monoklonaler RGS·His Antikörper (Nr. 34610; 0,1 μ g/ml)

Das rekombinante mature IL-1 β (Matur) wurde als Kontrolle (50 ng/Bahn) aufgetragen. Die zu erwartenden Spaltprodukte sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die gezeigten Western Blots (A und B) entstammen einem Prozessierungsexperiment. Hier ist ein repräsentatives Experiment aus drei durchgeführten Prozessierungsexperimenten dargestellt. M: Molekulargewichtsstandard.

Die oben dargestellten Ergebnisse zeigten, dass die Deletionsmutanten der IL-1 β Vorstufe in richtiger Orientierung kloniert und vollständig exprimiert worden sind und dass sie durch Caspase-1 prozessiert werden können. Somit konnten die Deletionsmutanten in Inhibitionsexperimenten mit Präparationen humaner Gefäßmuskelzellen untersucht werden.

3.2.3.2 Die Prozessierung aller Deletionsmutanten wird blockiert

Abbildung 27 zeigt ein repräsentatives Inhibitionsexperiment, in dem die Deletionsmutanten zunächst mit GMZ-Lysat vorinkubiert (10 Min) und anschließend mit rekombinanter Caspase-1 inkubiert wurden. Der Blot in Abbildung 27A wurde mit dem FIB-3 Antikörper, der Blot in Abbildung 27B mit dem RGS·His Antikörper gefärbt. Die durch Caspase-1 entstehenden Spaltprodukte sind durch Pfeile gekennzeichnet. Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, inhibierten Präparationen der humanen Gefäßmuskelzellen die Prozessierung aller hergestellten IL-1 β Vorstufen-Deletionsmutanten durch Caspase-1.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Prozessierungs-inhibitorische Aktivität der GMZ weder im Bereich der größten Homologie zwischen der IL-18 und der IL-1 β Vorstufe (C1 und C2; Regione β 8, β 9, β 10) noch im N-Terminus der IL-1 β Vorstufe bevorzugt bindet.

Zusammenfassend zeigen die in diesem Teil der Arbeit vorgestellten Ergebnisse, dass die IL-1 β Prozessierungs-inhibitorische Aktivität aus glatten Gefäßmuskelzellen die Prozessierung eines weiteren Caspase-1 Substrates, der IL-18 Vorstufe, durch Caspase-1 ebenfalls effektiv blockiert. Andererseits wird die Spaltung von PARP durch Caspase-3 nicht beeinflusst. Die mit dem Ziel die Bindungsstelle des Inhibitors an der IL-1 β Vorstufe lokalisieren zu können hergestellten Deletionsmutanten haben es nicht erlaubt eine spezifische Inhibitor - IL-1 β _{Pre} Interaktionsstelle nachzuweisen.

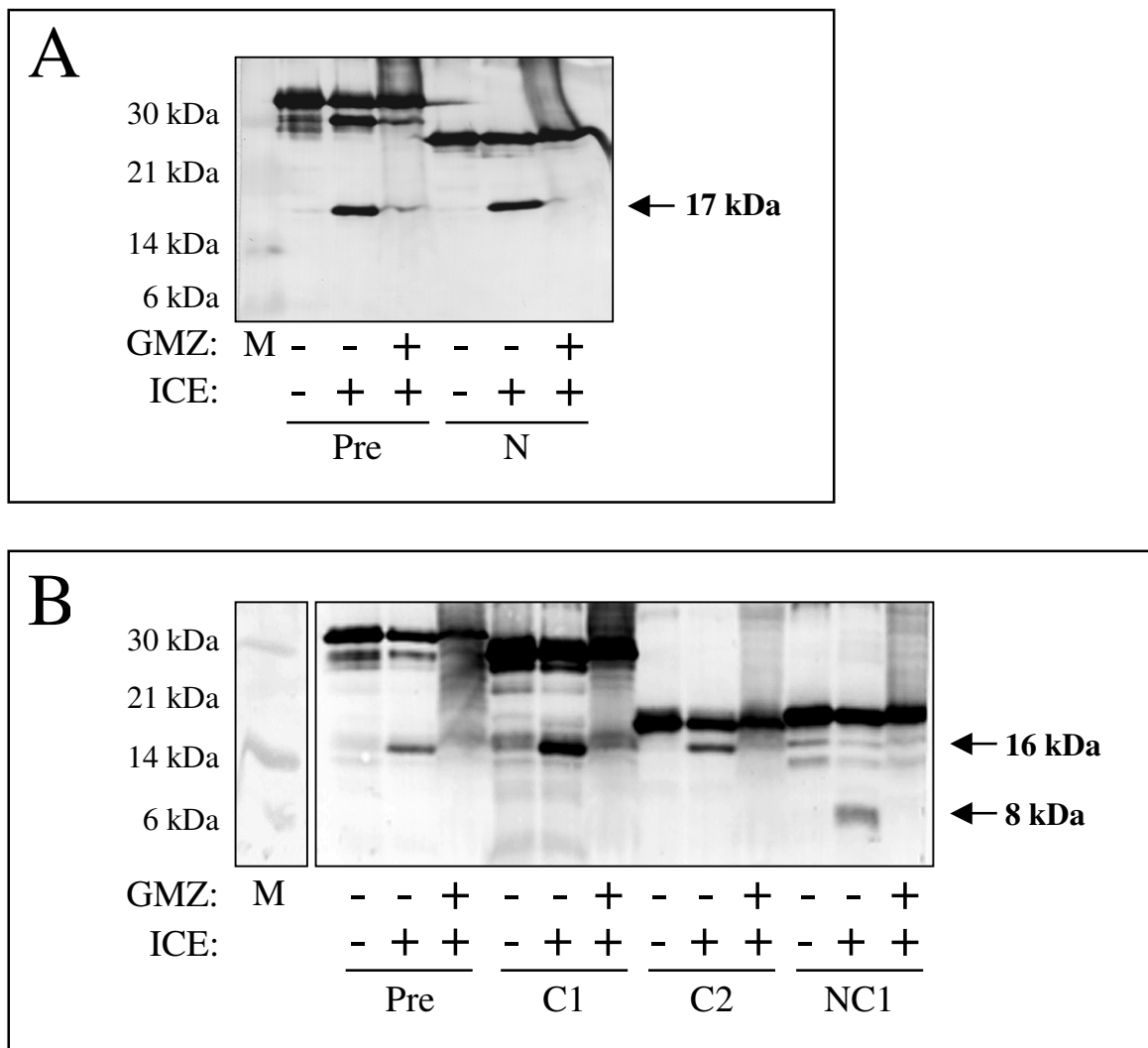


Abbildung 27: Vaskuläre Gefäßmuskelnzellen inhibieren die Prozessierung der Deletionsmutanten der IL-1 β Vorstufe durch Caspase-1. Die IL-1 β Vorstufe (Pre; 0,6 μ g) und die Deletionsmutanten der IL-1 β Vorstufe C1 (1,4 μ g), C2 (0,6 μ g), NC1 (1,2 μ g), N (0,5 μ g) wurden mit den Zell-Lysaten aus Gefäßmuskelnzellen (10 μ l; 50.000 Zellen/ μ l; GMZ) in Gegenwart von Prozessierungspuffer (1x) in 40 μ l vorinkubiert (37°C, 10 Min). Anschließend wurden 10 μ l rekombinanten Caspase-1 (ICE) hinzugegeben und inkubiert (0,1 U/ μ l Endkonzentration ICE; 37°C, 20 Min). Die Prozessierungsansätze wurden anschließend in der SDS-PAGE getrennt und im Western Blot mit den folgenden Antikörper gefärbt:

A: monoklonaler IL-1 β Antikörper (FIB-3; 1 μ g/ml)

B: monoklonaler RGS-His Antikörper (Nr. 34610; 0,1 μ g/ml)

Die durch Caspase-1 entstehenden Spaltprodukte sind durch die Pfeile gekennzeichnet. Die gezeigten Western Blots (A und B) entstammen einem Prozessierungsexperiment. Hier ist ein repräsentatives Experiment aus drei durchgeführten Prozessierungsexperimenten dargestellt. M: Molekulargewichtsstandard.

4. DISKUSSION

Interleukin-1 (IL-1) ist ein zentraler Mediator im Zytokinnetzwerk. Die zwei Isoformen des IL-1, das IL-1 α und das IL-1 β , üben wichtige Funktionen bei der Regulierung immunologischer, entzündlicher und metabolischer Prozesse aus (Dinarello, 1996). Auch in kardiovaskulären Zellen kann IL-1 eine Reihe von Funktionen aktivieren (Loppnow et al., 2001). Hierzu gehören die Stimulierung der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 und IL-6 (Warner et al., 1987; Loppnow & Libby, 1990; Müller-Werdan et al., 1997), die Induktion von Adhäsionsmolekülen (Kacimi et al., 1998), die Stimulierung des hypertrophen Wachstums kardialer Myozyten (Palmer et al., 1995; Thaik et al., 1995), die Induktion der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (Libby et al., 1988; Beasley & Cooper, 1999), die Induktion der Apoptose in kardialen Myozyten (Arstall et al., 1999; Ing et al., 1999) und die Suppression der Kontraktilität kardialer Myozyten (Kumar et al., 1996) oder glatter Gefäßmuskelzellen (Beasley et al., 1989).

Die Aktivität des IL-1 kann durch die Expression und Translation der IL-1 α und IL-1 β Gene, durch die Prozessierung des IL-1 β , durch die Rezeptorexpression und -funktionalität oder durch die Anwesenheit des IL-1 Rezeptor Antagonisten beeinflusst werden. Die Analyse der Exprimierung und Funktion der Proteine der IL-1 Familie und der, für die IL-1 β Aktivierung wichtigen, Caspase Familie in kardiovaskulären Zellen könnte dazu beitragen, die Funktion dieser Mediatoren im Herz- und Gefäßsystem besser zu verstehen und ihre mögliche Beteiligung an der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen zu beleuchten. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Expression dieser Gene in murinem und humanem Gewebe untersucht, die Funktion des IL-1 α in Herzzellen analysiert und eine Aktivität in Herz und Gefäßzellen charakterisiert, die die Prozessierung der IL-1 β Vorstufe blockieren kann. Zunächst wurde die Exprimierung verschiedener Proteine/Gene der IL-1 und Caspase Familien untersucht. Die verschiedenen Gruppen bzw. Gene werden im folgenden separat diskutiert.

4.1 Caspase-1 und Caspase-3 werden in humanem Herzgewebe und neonatalen Ratten Kardiomyozyten nicht unterschiedlich exprimiert

Unsere Untersuchungen konnten keinen Unterschied der mRNA Exprimierung der Caspase-1 im Material von Patienten ischämischer bzw. dilatativer Kardiomyopathie feststellen. Auch in kultivierten neonatalen Ratten Kardiomyozyten haben wir keine Regulierung des Caspase-1 Genes durch LPS, TNF oder IL-1 durch die verwendete Messmethode feststellen können. Diese Daten stehen im Einklang mit der Literatur. Lediglich IFN- γ wurde bisher als Induktor der Caspase-1 Genexpression in humanen Makrophagen (Pirhonen et al., 2001), in humanen

erythroiden Progenitorzellen (Dai & Krantz, 1999) und in humanen pankreatischen Inselzellen (Karlsen et al., 2000) beschrieben.

Die Caspase-3, ein weiteres Mitglied der Caspase Familie, ist eine terminale Protease der Apoptosekaskade, die Zellstrukturproteine wie Fodrin (Martin et al., 1995) oder Gelsolin (Kothakota et al., 1997) bzw. das DNA-Reparaturprotein poly(ADP-Ribose) Polymerase spaltet. Die Bedeutung der Caspase-3 bei kardialen Erkrankungen konnte in einer Reihe von Publikationen gezeigt werden. So führt eine Kardiomyozyten-spezifische Überexpression der Caspase-3 zur Vergrößerung des Infarktes in transgenen Mäusen (Condorelli et al., 2001). Bei Patienten mit rechtsventrikulärer Dysplasie, einer Erkrankung, bei der eine progressive Substitution kardialer Myozyten durch Fett und fibröses Gewebe stattfindet, wurde eine erhöhte kardiale Expression der Caspase-3 dokumentiert (Mallat et al., 1996). Auch bei Patienten mit dilatativer bzw. ischämischer Kardiomyopathie wurden apoptotische Vorgänge anhand TUNEL-positiver Kardiomyozyten nachgewiesen (Alter et al., 2001; Knaapen et al., 2001). Demgegenüber konnte die aktive Form der Caspase-3 im Myokard von DCM- und ICM-Patienten (Scheubel et al., 2002) oder in TUNEL-positiven Kardiomyozyten nicht nachgewiesen werden (Alter et al., 2001; Knaapen et al., 2001), obwohl eine Aktivierung der Caspase-3, als terminale apoptotische Protease, bei diesen Kardiomyopathieformen zu erwarten gewesen wäre. Es wird vermutet, dass die apoptotische Kaskade in diesen Kardiomyozyten zwar aktiviert, aber nicht beendet wird, was den Kardiomyozyten erlaubt, im insuffizienten Myokard eine längere Zeit zu bestehen (Communal et al., 2002). Die von uns beschriebenen Ergebnisse (Abb. 2, 4), die mit unlängst publizierten Daten (Scheubel et al., 2002) im Einklang stehen, könnten ebenfalls für diese Hypothese sprechen.

4.2 Die Exprimierung von IL-1RI in humanem Herzgewebe und neonatalen Ratten Kardiomyozyten ist nicht unterschiedlich

Die Funktionen des IL-1 werden über den IL-1 Rezeptor Typ I vermittelt (Sims et al., 1993). Da IL-1 α/β sowohl die IL-1 α - und IL-1 β -Gen-Expression, als auch die Produktion von IL-6 in kultivierten Kardiomyozyten der Ratte stimuliert, besitzen diese Zellen wahrscheinlich aktive IL-1 Rezeptoren. Diese Annahme wird durch die hier gezeigte konstitutive Exprimierung der IL-1RI mRNA in Kardiomyozyten bestätigt. Ebenso zeigten Bindungsstudien die Exprimierung von IL-1 Rezeptoren in unstimulierten isolierten kardialen Myozyten (Kacimi et al., 1997), wobei allerdings nicht zwischen IL-1RI und IL-1RII unterschieden werden konnte. Nur der IL-1 Rezeptor Typ I ist aktiv in die IL-1 Signal-Übertragung involviert, während IL-1RII als inaktiver IL-1 Rezeptor angesehen wird (Colotta et al., 1993; Dinarello, 1998). Aufgrund unserer Ergebnisse und der Ergebnisse von Kacimi kann somit geschlossen werden, dass bereits unstimulierte Kardiomyozyten den funktionell

aktiven IL-1 Rezeptor Typ I exprimieren können. Die vorliegende Arbeit gibt keinen Hinweis auf eine Regulation der IL-1RI mRNA Expression in kultivierten neonatalen Ratten Kardiomyozyten nach Stimulierung mit LPS, TNF oder IL-1. Auch die Genexpression im Gewebe von Patienten mit DCM oder ICM unterschied sich nicht von der in Kontroll-Spenderherzen. Vergleichbar mit unseren Ergebnissen zeigten Baumgarten und Kollegen ebenfalls keine Unterschiede bei der IL-1RI Genexpression infolge permanent erhöhter mechanischer Belastung („overload“) in Mäuseherzen (Baumgarten et al., 2002). Arbeiten mit anderen Zelltypen zeigten die Regulierbarkeit der IL-1RI Expression in diesen Zellen (Ye et al., 1992; McGee et al., 1996; Young & Dinarello, 1998; Penton-Rol et al., 1999) Die Ursache dieser unterschiedlichen Regulation könnte im variierenden Potential der verschiedenen Gewebe zur IL-1RI Expressierung liegen. Diese Überlegung wird auch von Untersuchungen (Ito et al., 1997) gestützt, in denen die differentielle IL-1RI mRNA Expression nach LPS Applikation in Organen der Maus gezeigt wurde.

4.3 Analyse der IL-18 Expressierung in humanem Myokard, in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen und in Präparationen neonataler Kardiomyozyten

IL-18 wird der IL-1 Familie zugerechnet (Dinarello, 1998). Es wird ebenso wie IL-1 β durch Caspase-1 aktiviert. In der vorliegenden Arbeit wurde IL-18 mRNA in isolierten neonatalen Kardiomyozyten (Abb. 6), in isolierten Gefäßmuskelzellen (Abb. 15) und in humanem Herzgewebe (Abb. 2) nachgewiesen. Dabei war IL-18 mRNA in insuffizientem Myokard (ICM, DCM) im Vergleich zum Spendermyokard signifikant ($p \leq 0,05$) herabreguliert (Abb. 4). Pomerantz und Kollegen (Pomerantz et al., 2001) zeigten eine erhöhte IL-18 Genexpression und Proteinproduktion im Herzen nach Ischämie/Reperfusion. Unter der Berücksichtigung dieser Daten und der ischämischen Episoden, denen Spenderherzen wahrscheinlich infolge der traumatischen Ereignisse und des Verbleibs der Spender auf der Intensiv-Station ausgesetzt waren, könnte die hier gemessene IL-18 mRNA Expression in den Spenderherzen in Bezug auf die ICM- oder DCM-Patienten erhöht sein und nicht, wie man annehmen könnte, die IL-18 mRNA Expression in Patientenherzen gegenüber den Spenderherzen erniedrigt.

Aufgrund fehlender, Spezies-spezifischer Reagenzien konnte in den isolierten Ratten Kardiomyozyten keine IL-18 Proteinmessung durchgeführt werden, während dies in Kulturen von humanen GMZ möglich war. Weder im Western Blot noch in ELISA Experimenten konnten wir in humanen GMZ und deren Überständen das IL-18 Protein nachweisen (Abb. 16 und nicht dargestellte ELISA Ergebnisse). Im Einklang mit unseren Ergebnissen konnten Gerdes und Kollegen (Gerdes et al., 2002) ebenfalls kein IL-18 Protein in humanen glatten Gefäßmuskelzellen nachweisen. Nur in Überständen humaner Monozyten,

die zu den Hauptproduzenten des IL-18 gezählt werden und von uns als Positivkontrolle verwendet wurden, konnte IL-18 in ELISA detektiert werden: 77 ± 17 pg/ml ohne Stimuli; 211 ± 9 pg/ml nach LPS Stimulation. Aufgrund der Ergebnisse von Gerdes und Kollegen und unserer Daten muss geschlossen werden, dass die glatten Gefäßmuskelzellen kein nachweisbares IL-18 Protein exprimieren.

4.4 Unterschiedliche Expressierung des IL-1 α in humanem und murinem Herzgewebe: mögliche Beteiligung des IL-1 α bei lokalen entzündlichen Vorgängen und Entwicklungsprozessen

Die IL-1 Expression, insbesondere die des IL-1 α , wurde bisher in Herzzellen nicht intensiv untersucht. Lediglich eine frühere Arbeit (Nakagawa et al., 1992) zeigt die Expression von IL-1 α im embryonalen Ratten Herz. Die vorliegende Arbeit demonstriert, dass neonatale Ratten Kardiomyozyten IL-1 α mRNA exprimieren und dass die Expressierung nach Stimulierung steigt (Abb. 6). Die bereits basal vorliegende IL-1 α mRNA Expressierung ist nicht auf eine Aktivierung der Zellen durch die Zellkulturbedingungen zurückzuführen, da auch im frisch entnommenen unstimulierten Herzgewebe neonataler Ratten IL-1 α mRNA nachweisbar war (Abb. 13).

In Übereinstimmung mit den PCR Daten, war biologisch nachweisbare IL-1 Aktivität bereits in unstimulierten Zellen vorhanden. Nach Stimulierung mit LPS und TNF- α war die IL-1 Aktivität erhöht (Tabelle 7). Inhibitionsexperimente mit spezifischen Antikörpern zeigten, dass die biologische Aktivität durch IL-1 α Antikörper hemmbar war (Abb. 10). Im wesentlich unempfindlicheren Western Blot konnte, vermutlich wegen der nicht ausreichenden Nachweisgrenze des Antikörpers, kein IL-1 nachgewiesen werden. Demgegenüber bestätigten immunhistologische Untersuchungen mit einem Ratten-spezifischen polyklonalen Anti-IL-1 α Antikörper die Anwesenheit von IL-1 α auf den Zellen. Allerdings waren keine Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen nachweisbar (Abb. 8). Die Anfärbung des Zytosols der Kardiomyozyten ähnelte der zytosolischen Färbung humaner Makrophagen (Andersson et al., 1992) und deutete bereits auf eine zytosolische und membranständige Expressierung des IL-1 α hin. Experimente in einem Ko-Kultur Zellsystem zeigten dann auch, dass neonatale Ratten Kardiomyozyten, ähnlich wie murine Makrophagen (Kurt-Jons et al., 1985), humane glatte Gefäßmuskelzellen (Loppnow & Libby, 1992) oder transfizierte Fibroblasten (Fuhlbrigge et al., 1988), aktives IL-1 α auf ihrer Zell-Oberfläche exprimieren. Dieses Membran-assoziierte IL-1 α könnte während lokaler Entzündungsprozesse eine Rolle spielen, zum Beispiel durch Aktivierung benachbarter Zellen.

Im Gegensatz zu den Experimenten mit Ratten Zellen/Gewebe war im humanen Herzgewebe keine IL-1 α Gen-Expression nachweisbar (Abb. 2). Auch Han und Kollegen (Han et al., 1991) fanden keine IL-1 α mRNA im Herzgewebe gesunder Spender oder Patienten mit viraler Myokarditis bzw. dilatativer Kardiomyopathie. Die im Vergleich zu den neonatalen Ratten Kardiomyozyten unterschiedliche Expressierung ließ sich erklären, als humanes fötales Gewebe untersucht wurde. Die Analyse dieses kommerziell erhältlichen humanen gesunden Gewebes (MTCTM – Panel; Clontech) zeigte, dass IL-1 α auch im humanen System im fötalen, aber nicht im adulten Herzgewebe (Abb. 14) exprimiert wird. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass IL-1 α während der Entwicklung des Herzens exprimiert wird. Es könnte bei Entwicklungsprozessen im Herz aktiv mitwirken. In IL-1 α überexprimierenden transgenen Mäusen verbleiben die Kardiomyozyten auch 12 Tage nach der Geburt der Tiere noch im juvenilen Stadium (Isoda et al, 2001). Die Zellkerne dieser Kardiomyozyten waren größer als die der Kardiomyozyten aus Wildtyp-Mäusen. Die Zahl der Kardiomyozyten in den transgenen Mäusen war, verglichen mit der Kontrolle, höher. Auch die Expression fötaler Gene wie ANF („atrial natriuretic factor“) und β -MyHC („ β -myosin heavy chain“) war in diesen Tieren erhöht.

4.5 Kardiomyozyten exprimieren IL-1 β nur in sehr geringem Maße

IL-1 β ist die IL-1 Isoform, die in der Regel von den Zellen abgegeben wird, zunächst inaktiv ist und durch Caspase-1 aktiviert werden muss (Dinarello, 1996). Die IL-1 β Expression im Herzen wurde bereits untersucht, z.B. bei Myokarditis (Shioi et al., 1996), Hypertrophie (Shioi et al., 1997) oder nach Infarkt (Yue et al., 1998; Ono et al., 1998). Unter diesen Bedingungen wurden vorwiegend nicht myozytäre Zellen als Quelle des IL-1 β beschrieben. Francis und Kollegen (Francis et al., 1998) zeigten aber auch, dass einzelne Kardiomyozyten IL-1 β exprimieren. Diese Daten werden in der vorliegenden Arbeit bestätigt, da IL-1 β mRNA in kultivierten Ratten Kardiomyozyten, aber auch in humanem Herzgewebe vorgefunden wurde. Obwohl die IL-1 β mRNA Expression in den Kardiomyozyten mit LPS, TNF und IL-1 stimulierbar war (Abb. 6), war immunhistochemisch kein IL-1 β in diesen Zellen nachweisbar. Auch Überstände der kultivierten Kardiomyozyten enthielten kein messbares IL-1 β . Dies wäre dadurch erklärbar, dass das IL-1 β Gen transkribiert werden kann ohne translatiert werden zu müssen (Schindler et al., 1990; Kaspar & Gehrke, 1994). Es besteht also die Möglichkeit, dass ein Teil der detektierten IL-1 β mRNA tatsächlich von Kardiomyozyten stammt, aber nicht translatiert wird. Dennoch sind die Daten zur IL-1 β Expressierung schwer zu interpretieren. Zum einen wurde nicht in allen humanen Biopsien IL-1 β mRNA gefunden bzw. war nur niedrig exprimiert, was mit einer weiteren Publikation übereinstimmt (Van Hoffen et al., 1996). Zum anderen könnte die IL-1 β mRNA in den Kulturen der Ratten Kardiomyozyten aus kontaminierenden Zellen stammen, die in sehr niedriger Zahl

nachzuweisen waren. Diese Zellen waren mit einem Antikörper gegen ein Ratten Monozyten-spezifische Antigen anfärbbar, der einem humanen CD68 Antigen entspricht, so dass es sich um Monozyten gehandelt haben könnte. Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass Kardiomyozyten, wenn überhaupt, IL-1 β nur in sehr geringem Maße produzieren.

4.6 IL-1Ra ist möglicherweise an der Aufrechterhaltung der Herzzellhomeostase beteiligt

Der Interleukin-1 Rezeptor Antagonist (IL-1Ra) ist ein natürlich existierender Modulator der IL-1 Funktionen (Dinarello, 1996). Die endogene Produktion des IL-1Ra wird als ein wichtiger anti-entzündlicher Mechanismus betrachtet. Gleichzeitige Expressierung von IL-1Ra und IL-1 wurde in unterschiedlichen Geweben gesunder Tiere dokumentiert (Matsukawa et al., 1997). Die Bestätigung dafür, dass IL-1Ra für die Aufrechterhaltung der normalen Funktionen von Bedeutung ist, konnte mit IL-1Ra defizienten Mäusen geliefert werden. Diese Tiere entwickelten spontan entzündliche Autoimmunerkrankungen (Horai et al., 2000; Nicklin et al., 2000). Die pathologischen Veränderungen in den Gelenken der Tiere waren dem Bild der rheumatoiden Arthritis beim Mensch ähnlich (Horai et al., 2000). Nicklin und Kollegen beobachteten den Tod der Tiere infolge erhöhter arterieller Inflammation.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen am Gewebe herzinsuffizienter Patienten zeigten eine signifikant verminderte IL-1Ra Gen-Expression bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, verglichen mit Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie oder Spenderherzen (Abb. 3). Die IL-1Ra Expressierung in Spenderherzen und ICM Patienten war nicht signifikant unterschiedlich. Eine solche herabgesetzte Expressierung könnte das IL-1/IL-1Ra Gleichgewicht zugunsten entzündlicher Mechanismen stören. Eine ganze Reihe von Publikationen (Wetzler et al., 1994; Casini-Raggi et al., 1995; Chomarat et al., 1995) lässt vermuten, dass die Störung der Balance zwischen IL-1Ra und IL-1 für die Aufrechterhaltung normaler Funktionen von Bedeutung ist und entzündliche Prozesse regulieren kann. So konnte in Leukozyten-Lysaten von Patienten mit chronisch myelogenischer Leukemia 10-fach mehr IL-1 β als in Leukozyten gesunder Personen detektiert werden, während die IL-1Ra Konzentrationen in beiden Gruppen vergleichbar waren (Wetzler et al., 1994). Auch innerhalb der Patienten-Gruppe konnten, assoziiert mit dem Fortschreiten der Erkrankung, Unterschiede gefunden werden. Der IL-1 β Gehalt bei Patienten im akuten Stadium war erhöht, bei gleichzeitiger Verminderung des IL-1Ra Gehalts, verglichen mit Patienten im chronischen Stadium. Diese Patienten zeigten außerdem eine kürzere Lebenserwartung (Wetzler et al., 1994). Eine deutliche Verschiebung des IL-1/IL-1Ra Verhältnisses zugunsten von IL-1 konnte auch in epithelialen Zellen des Darms bei Patienten mit chronischen

Darmerkrankungen in Vergleich zu Kontrollpersonen detektiert werden (Casini-Raggi et al., 1995). Eine ebenfalls aus der Balance geratene IL-1/IL-1Ra Relation wurde in Überständen kultivierter synovialer Gewebe von Patienten mit rheumatischer Arthritis festgestellt (Chomarat et al., 1995). Die Beeinflussung des IL-1Ra/IL-1 Verhältnisses zugunsten von IL-1Ra mit Hilfe rekombinanter Proteine ist eine Strategie bei der Behandlung inflammatorischer Erkrankungen, die erste Erfolge zeigt. So reduzierte die Injektion von rekombinantem IL-1Ra dosisabhängig die Entzündung und die Neuentstehung von Gelenkläsionen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (Bresnihan et al., 1998). IL-1Ra Überexpression in Ratten Herzen zeigte einen kardioprotektiven Effekt nach Ischämie/Reperfusion (Suzuki et al., 2001). Die von uns gefundene verminderte Expressierung der IL-1Ra mRNA im Myokard von DCM Patienten könnte daher auf eine mögliche Störung des IL-1/IL-1Ra Gleichgewichtes in Herzen dieser Patienten hinweisen.

Die Ursache für die herabregulierte IL-1Ra mRNA in DCM Patienten liegt möglicherweise im allelen Polymorphismus des IL-1Ra Genes, das sich durch eine unterschiedliche Anzahl (2 bis 6) von Kopien einer 86 bp Sequenz im Intron 2 auszeichnet (Tarlow et al., 1993). Das am häufigsten (73,6%) vorkommende Allel A1 enthält 4 Kopien und wird als IL-1RN*1 bezeichnet. Allel A2 (IL-1RN*2) mit 2 Kopien wird bei 21,4% der Bevölkerung gefunden und ist bereits mit einer Reihe von Erkrankungen wie Psoriasis, multipler Sklerose, diabetischer Nephropathie, ulzerativer Kolitis, Magen-Krebs, Sensitivität zu Sepsis, dem Schweregrad des Lupus erythematodes (Arend & Guthridge, 2000) und der koronaren arteriellen Erkrankung (Francis et al., 1999) assoziiert worden. Diese Assoziationen könnten durch verminderte IL-1Ra Produktion in Trägern des Alleles A2 im Vergleich zu den Trägern des Alleles A1 erklärt werden (Tountas et al., 1999; Dewberry et al., 2000; Arend & Guthridge, 2000). Außerdem wird in diesem Zusammenhang die Rolle eines Phänomens mit der Bezeichnung „linkage disequilibrium“ diskutiert (Cox et al., 1998; El-Omar et al., 2000; Arend & Guthridge, 2000). „Linkage disequilibrium“ bedeutet im allgemeinen eine bevorzugte gemeinsame Vererbung von bestimmten Allelen unterschiedlicher Gene oder der polymorphen Marker eines Genes. Die Gene, die IL-1 α , IL-1 β und IL-1Ra kodieren, liegen beim Mensch in einem Genlocus auf dem Chromosom 2 und für einige Kombinationen dieser Gene wurde bereits ein beträchtliches „linkage disequilibrium“ gezeigt (Cox et al., 1998). In der Studie von El-Omar und Kollegen wurde der Haplotyp IL-1B-31T/IL-1RN*2 bei 22 % der Patienten mit Magen-Krebs im Vergleich zu 8% bei der Gruppe der gesunden Personen detektiert (El-Omar et al., 2000). IL-1B-31T steht für eine Zytosin→Thymin Transition an der Position -31 bp vor dem Transkriptionsstartkodon im IL-1 β -kodierenden Gen. Die Autoren diskutieren diese allele Kombination als einen inflammatorischen Haplotyp, der im Zusammenhang mit einer *Helicobacter pilory* Infektion, der genetischen Konstitution der Probanden oder Umwelteinflüssen die Entstehung von Magen-Krebs begünstigt. Möglicherweise besteht ebenfalls eine Verbindung zwischen der von uns detektierten

verminderten IL-1Ra Gen-Expression im Herzen der Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie und des Alleles IL-1RN*2 oder dem Haplotyp IL-1B-31T/IL-1RN*2. Diese Hypothese ist bisher noch nicht untersucht und kann erst durch weitere Arbeiten überprüft werden.

4.7 Charakterisierung einer Aktivität, die die Prozessierung der IL-1 β Vorstufe blockiert

Die Prozessierung und somit die Aktivierung der zwei pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 durch die Caspase-1 ist ein wichtiger Mechanismus bei der Regulation entzündlicher Prozesse. Die Aktivität der Caspasen kann auf unterschiedlichen Ebenen reguliert werden: a) Induktion der Genexpression, b) Prozessierung des inaktiven Zymogens und c) Beeinflussung der enzymatischen Aktivität. Es sind, neben synthetischen Peptidinhibitoren wie YVAD oder DEVD (Thornberry et al., 1994; Miller et al., 1995) und Proteinen viralen Ursprungs, z.B. crmA und p35 (Ray et al., 1992; Bump et al., 1995), auch endogene Inhibitoren von Caspasen beschrieben worden. Hierzu zählen die IAP's („inhibitors of apoptosis“; XIAP, c-IAP-1, c-IAP-2), die in der Regel apoptotische Caspasen blockieren (Deveraux et al., 1997; Roy et al., 1997). Endogene Inhibitoren der Caspase-1 sind nicht bekannt, obwohl gezeigt wurde, dass extrazelluläre Matrix (Boudreau et al., 1995) oder unspezifische Proteaseinhibitoren diese Caspase beeinflussen können. Wir haben gezeigt, dass in humanen glatten Gefäßmuskelzellen die IL-1 β Aktivierung durch eine Aktivität beeinflusst wird, die die Prozessierung der IL-1 β Vorstufe blockiert (Schönbeck et al., 1997). Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit sollte die funktionelle Charakterisierung dieser Aktivität fortgeführt werden.

In unseren Experimenten beeinflussten Lysate der Gefäßmuskelzellen die Aktivität eines anderen Mitgliedes der Caspase Familie, der Caspase-3, nicht (Abb. 22). Dieses Ergebnis deutete auf eine gewisse Caspase-1 Spezifität der inhibitorischen Aktivität hin. Weitere Caspasen konnten nicht untersucht werden, da sie zum Zeitpunkt der Untersuchungen nicht verfügbar waren.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Prozessierung eines weiteren Substrates der Caspase-1, der IL-18 Vorstufe, bei Zugabe von Lysaten der humanen Gefäßmuskelzellen ebenfalls inhibiert wurde (Abb. 21). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der inhibitorische Effekt nicht auf IL-1 β beschränkt ist. Die biologische Relevanz dieser Inhibition bleibt unklar. Denn weder das mature IL-18, noch die IL-18 Vorstufe konnte in Lysaten der humanen glatten Gefäßmuskellzellen nachgewiesen werden. Andererseits ist es durchaus

vorstellbar, dass in humanen GMZ bereits vorhandene IL-18 mRNA unter bestimmten Bedingungen translatiert werden kann.

In früheren Prozessierungsexperimenten hatten wir gezeigt, dass die Inhibition der Prozessierung stärker nach der Preinkubation der IL-1 β Vorstufe mit den GMZ-Lysaten, als nach Preinkubation der Lysaten mit Caspase-1 ist. Dieser Befund deutete auf eine Affinität der IL-1 β Prozessierungs-hemmenden Aktivität zur IL-1 β Vorstufe hin. Mit dem Ziel, diese Hypothese zu untersuchen und den möglichen Bereich der Bindung des Inhibitors an die IL-1 β Vorstufe einzugrenzen haben wir Deletionsmutanten der IL-1 β Vorstufe rekombinant hergestellt, bei welchen entweder der C-Terminus oder der N-Terminus oder beide Termini entfernt wurden. Aufgrund der starken Homologie von IL-1 β und IL-18 in der C-terminalen Region und des Ergebnisses, dass die Prozessierung der IL-18 Vorstufe ebenfalls durch die IL-1 β Prozessierungs-inhibitorische Aktivität blockiert wurde, könnte der C-Terminus der IL-1 β Vorstufe eine potentielle Region für die Bindung des Inhibitors darstellen. Entgegen den Erwartungen wurde die Prozessierung aller Deletionsmutanten, auch der C-terminalen, durch Lysate der Gefäßmuskelzellen in vergleichbarem Maße blockiert, was uns nicht erlaubt eine Region einzugrenzen.

Es sind bereits Protease Inhibitoren, wie crmA („cytokine response modifier“) und baculovirus p35 (Ray et al., 1992; Bump et al., 1995) beschrieben worden, die auch Caspase-1 inhibieren. Diese Proteine werden jedoch nicht von eukariotischen Zellen exprimiert, sondern von Viren zur Blockierung der Entzündungsreaktion des Wirtes benutzt. Der virale Caspase-1 Inhibitor crmA gehört zur Familie der Serpine (Potempa et al., 1994). Ein weiteres Mitglied dieser Familie, das humane Serpin PI-9 besitzt eine 54 %-ige Homologie zu crmA (Sprecher et al., 1995; Sun et al., 1996) und wurde ebenfalls als Inhibitor der Caspase-1 in *in vitro* Experimenten identifiziert (Annand et al., 1999). Es wurde gezeigt, dass humane glatte Gefäßmuskelzellen PI-9 exprimieren und vorgeschlagen, dass die IL-1 β Prozessierungs-blockierende Eigenschaften der GMZ-Lysate möglicherweise auf PI-9 zurückzuführen ist (Young et al., 2000). PI-9 ist jedoch ein zytosolisches Protein (Sprecher et al., 1995), während die von uns früher beschriebene inhibitorische Aktivität aus Gefäßmuskelzellen membranassoziiert ist. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Prozessierung der IL-1 β Vorstufe in humanen glatten Gefäßmuskelzellen durch mehrere Inhibitoren blockiert werden könnte. Auch der Misserfolg bei der Suche nach der Bindungsregion innerhalb der IL-1 β Vorstufe (Inhibition aller rekombinant hergestellten Deletionsmutanten) könnte dadurch erklärt werden. Denn, auch wenn die Bindungsstellen für die IL-1 β Prozessierungs-inhibitorische Aktivität innerhalb der rekombinant hergestellten Deletionsmutanten fehlten, könnte die Bindung des in GMZ-Lysaten vorhandenes PI-9 an die Caspase-1 ausreichend für die Blockierung der Prozessierung dieser Mutanten sein. Diese Hypothese muss durch weitere Arbeiten überprüft werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expressierung einiger Gene der IL-1 und der Caspase Familie in humanem gesunden und insuffizienten myokardialen Gewebe sowie die Präsenz und die Regulation dieser Gene in isolierten neonatalen Ratten Kardiomyozyten bzw. in kultivierten humanen glatten Gefäßmuskelzellen analysiert. Zu den wichtigsten Ergebnissen dieser Untersuchungen zählen:

- Die verminderte IL-1Ra Gen Expression in DCM Patienten verglichen zu ICM Patienten und Kontrolle weist aufgrund eines möglichen Eingriffs in das IL-1/IL-1Ra Verhältnis auf die Beteiligung des IL-1Ra in der Entwicklung von DCM hin.
- Die unterschiedliche IL-1 α Gen Expression in adulten und fötalen Herzen lässt eine Rolle des IL-1 α bei den Entwicklungsprozessen des Herzen vermuten, während IL-1 β eher eine Rolle bei entzündlichen Prozessen in adulten Herzen spielen könnte.
- Die Experimente zur Expressierung der IL-1 α Aktivität auf der Oberfläche neonataler Ratten Kardiomyozyten demonstrieren, dass dieses Zytokin benachbarte Zellen aktivieren kann.

Diese Ergebnisse zeigen, dass IL-1 α und IL-1Ra wichtige Regulatoren kardiovaskulärer Zellfunktionen darstellen. In zukünftigen Arbeiten sollte die Frage geklärt werden, ob und in welchem Umfang die von uns im Herzgewebe der DCM Patienten nachgewiesene Herabregulierung der IL-1Ra mRNA auch in herabreguliertem IL-1Ra Proteingehalt resultiert. Außerdem erscheint es wichtig, die mögliche Assoziation dieser Herabregulierung mit dem Vorkommen des Alleles A2 (IL-1RN*2) bzw. des Haplotyps IL-1B-31T/IL-1RN*2 in der Gruppe der DCM Patienten zu korrelieren. Die Analyse unserer Ergebnisse zur IL-1 β Prozessierungs-hemmenden Aktivität weist auf die Beteiligung mehrerer Inhibitoren hin. In weiteren Untersuchungen sollten deshalb isolierte Proteine der Membranfraktion von GMZ-Lysaten verwendet werden, um die ursprünglich beschriebene inhibitorische Aktivität zu identifizieren. Hierbei könnte die IL-1 β Vorstufe als Ligand bei einer affinitätschromatographischen Isolierung verwendet werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Interleukin-1 (IL-1) ist ein multifunktionelles pro-inflammatorisches Zytokin. Es ist unter anderem an der Regulierung von Funktionen kardiovaskulärer Zellen beteiligt und kann in diesen Zellen im Rahmen von Entzündungsprozessen die Produktion weiterer Mediatoren wie Zytokine oder Prostaglandine stimulieren oder Apoptose Mechanismen beeinflussen. Darüber hinaus kann IL-1 die Kontraktilität kardiovaskulärer Zellen beeinflussen. So wirkt es auf Herzmuskellzellen kardiodepressiv und inhibiert die Kontraktilität glatter Gefäßmuskellzellen. Neben den IL-1 Agonisten IL-1 α und IL-1 β beeinflussen weitere Proteine der IL-1 und Caspase Familien die IL-1 Aktivität. Hierzu gehören der IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1Ra), die IL-1 Rezeptoren und Caspase-1, letztere indem sie IL-1 β aktiviert. Die Expressierung dieser Proteine in kardiovaskulären Zellen könnte eine Rolle bei der Regulierung physiologischer und pathologischer Prozesse im Herz und in den Gefäßen spielen.

In dieser Arbeit wurden daher zum einen PCR-Untersuchungen zur Gen-Expression von IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-1RI, IL-18, Caspase-1 und Caspase-3, in gesundem und krankem humanem Herzgewebe durchgeführt. Zum zweiten wurde die Expressierung dieser Gene in neonatalen Ratten Kardiomyozyten unter verschiedenen Stimulationsbedingungen untersucht und die Proteinexpression und Funktionalität des IL-1 α in Herzzellen analysiert. Schließlich wurde die Hemmung der Caspase-1 Prozessierung von IL-1 β und IL-18 durch Gefäßzellpräparate untersucht.

Diese Untersuchungen zeigten, dass IL-1 β , IL-1RI, Caspase-1 und Caspase-3 in humanem fötalen und adulten Herzgewebe und im Herzgewebe herzinsuffizienter Patienten mit Ischämischer Kardiomyopathie (ICM) und Dilatativer Kardiomyopathie (DCM) in vergleichbarem Maße exprimiert wurden. Demgegenüber wurde IL-18 und IL-1Ra in den untersuchten Patienten (ICM, DCM) und der Kontrolle unterschiedlich exprimiert. IL-1Ra mRNA war in DCM-Patienten signifikant verringert, was auf eine mögliche Störung des IL-1Ra/IL-1 Gleichgewichtes im Herzen dieser Patienten hinweist. IL-1 α mRNA wurde im fötalen Herzen, aber nicht im Herzgewebe Erwachsener nachgewiesen.

Kultivierte neonatale Ratten Herzzellen exprimieren ebenfalls IL-1 β , IL-18, IL-1RI, Caspase-1, Caspase-3 und IL-1 α mRNA. Bereits in unstimulierten neonatalen Ratten Kardiomyozyten wurde IL-1 α mRNA, IL-1 α Protein und biologische IL-1 α Aktivität gemessen. Auch im Herzgewebe neonataler Ratten wurde IL-1 α mRNA detektiert. Aktives IL-1 α wird an der Oberfläche neonataler kardialer Myozyten exprimiert, wodurch es im sich entwickelnden Herz benachbarte Kardiomyozyten, kardiale Fibroblasten oder einwandernde

Leukozyten aktivieren könnte. Auf diese Weise könnte IL-1 α bei Entwicklungsprozessen und/oder bei entzündlichen Vorgängen im Herz aktiv mitwirken.

Die Prozessierung der inaktiven IL-1 β Vorstufe durch die Caspase-1 führt zur Aktivierung des IL-1 β . Somit besitzt die Caspase-1 eine Schlüsselposition bei der Regulierung der IL-1 β Aktivität. Eine vorher in unserer Gruppe beschriebene IL-1 β Prozessierungs-hemmende Aktivität humaner glatter Gefäßmuskelzellen stellt somit eine weitere Regulationsebene der IL-1 Aktivität dar. Die Untersuchung von Herzmuskelzellen zeigte ebenfalls eine messbare Inhibition der Prozessierung. Die Fortsetzung der Charakterisierung dieser Aktivität in GMZ zeigte, dass die Prozessierung eines zweiten Substrates der Caspase-1, der Interleukin-18 Vorstufe, ebenfalls gehemmt wird. Die Aktivität der Caspase-3 hingegen wurde nicht beeinträchtigt, was auf die Spezifität der Inhibition hinweist. Die Suche nach Bindungsregionen des Inhibitors im IL-1, die mit Hilfe von C- und N-terminalen Deletionsmutanten durchgeführt wurde, identifizierte keine spezifische Bindungsstelle der inhibitorischen Aktivität im IL-1 β .

Diese Arbeiten zeigen, dass neben IL-1 β auch Interleukin-1 α und der Interleukin-1 Rezeptor Antagonist - bzw. das Gleichgewicht zwischen diesen Mediatoren - eine Rolle im Rahmen der Herz Entwicklung und/oder bei der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen haben könnte.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Akira S (2000) The role of IL-18 in innate immunity. Curr Opin Immunol; 12:59-63
- Akita K, Ohtsuki T, Nukada Y, Tanimoto T, Namba M, Okura T, Takakura-Yamamoto R, Torigoe K, Gu Y, Su MS, Fujii M, Satoh-Itoh M, Yamamoto K, Kohno K, Ikeda M and Kurimoto M (1997) Involvement of caspase-1 and caspase-3 in the production and processing of mature human interleukin 18 in monocytic THP.1 cells. J Biol Chem; 272:26595-26603
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW and Yuan J (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. Cell; 87:171
- Alter P, Jobmann M, Pankuweit S and Maisch B (2001) Apoptosis in myocarditis and dilated cardiomyopathy: does enterovirus genome persistence protect from apoptosis? An endomyocardial biopsy study. Cardiovasc Pathol; 10:229-234
- Andersson J, Björk L, Dinarello CA, Towbin H and Andersson U (1992) Lipopolysaccharide induces human interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 production in the same cell. Eur J Immunol; 22:2617- 2623
- Annand RR, Dahlen JR, Sprecher CA, de Dreu P, Foster DC, Mankovich JA, Talanian RV, Kisiel W and Giegel DA (1999) Caspase-1 (interleukin-1 β -converting enzyme) is inhibited by the human serpin analogue proteinase inhibitor 9. Biochem J; 342:655-665
- Arend WP, Joslin FG and Massoni RJ (1985) Effects of immune complexes on production by human monocytes of interleukin-1 or an interleukin-1 inhibitor. J Immunol; 134:3868-3875
- Arend WP and Guthridge CJ (2000) Biological role of interleukin-1 receptor antagonist isoforms. Ann Rheum Dis; 59:i60-i64
- Arstall MA, Sawyer DB, Fukazawa R and Kelly RA (1999) Cytokine-mediated apoptosis in cardiac myocytes. The role of inducible nitric oxide synthase induction and peroxynitrite generation. Circ Res; 85:829-840
- Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, Mucci SF, Rich A, Wolff SM and Dinarello CA (1984) Nucleotide sequence of human monocyte interleukin-1 precursor cDNA. Proc Natl Acad Sci USA; 81:7907-7911
- Balavoine JF, DeRochemonteix B, Williamson K, Seckinger P, Cruchaud A and Dayer JM (1986) Prostaglandin E2 and collagenase production by fibroblasts and synovial cells is regulated by urine-derived human interleukin-1 and inhibitor(s). J Clin Invest; 78:1120-1124
- Baumgarten G, Knuefermann P, Kalra D, Gao F, Tafflet GE, Michael L, Blackshear PJ, Carballo E, Sivasubramanian N and Mann DL (2002) Load-dependent and -independent regulation of proinflammatory cytokine and cytokine receptor gene expression in the adult mammalian heart. Circulation; 105:2192-2197

- Beasley D, Cohen RA and Levinsky NG (1989) Interleukin-1 inhibits contraction of vascular smooth muscle. J Clin Invest; 83:331-335
- Beasley D and Cooper AL (1999) Constitutive expression of interleukin-1 α precursor promotes human vascular smooth muscle cell proliferation. Am J Physiol; 276:H901-H912
- Bick RJ, Liao J-P, King TW, LeMaistre A, McMillin JB and Buja LM (1997) Temporal effects of cytokines on neonatal cardiac myocyte Ca²⁺ transients and adenylate cyclase activity. Am J Physiol; 272:H1937-H1944
- Black RA, Kronheim SR, Cantrell M, Deeley MC, March CJ, Prickett KS, Wignall J, Conlon PJ, Cosman D, Hopp TP and Mochizuki DY (1988) Generation of biologically active interleukin-1 β by proteolytic cleavage of the inactive precursor. J Biol Chem; 263:9437-9442
- Black RA, Kronheim SR and Sleath PR (1989) Activation of interleukin-1 β by a co-induced protease. FEBS Lett; 247:386-391
- Born TL, Thomassen E, Bird TA and Sims JE (1998) Cloning of a novel receptor subunit, AcPL, required for interleukin-18 signaling. J Biol Chem; 273:29445-29450
- Boudreau N, Sympson CJ, Werb Z and Bissel MJ (1995) Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. Science; 267:891-893
- Bresnihan B, Alvaro-Gracia JM, Cobby M, Doherty M, Domljan Z, Emery P, Nuki G, Pavelka K, Rau R, Rozman B, Watt I, Williams B, Aitchison R, McCabe D and Musikic P (1998) Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. Arthritis Rheum; 41:2196-2204
- Brody DT and Durum SK (1989) Membrane IL-1: IL-1 α precursor binds to the plasma membrane via a lectin-like interaction. J Immunol; 143:1183-1187
- Bump NJ, Hackett M, Hugunin M, Seshagiri S, Brady K, Chen P, Ferez C, Franklin S, Ghayur T, Li P, Licari P, Mankovich J, Shi L, Greenberg A, Miller LK and Wong WW (1995) Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. Science; 269:1885-1888
- Cain BS, Meldrum DR, Dinarello CA, Meng X, Joo KS, Banerjee A and Harken AH (1999) Tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β synergistically depress human myocardial function. Crit Care Med; 27:1309-1318
- Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S and Reed JC (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. Science; 282:1318-1321
- Carter DB, Deibel MR, Jr., Dunn CJ, Tomich CS, Laborde AL, Slightom JL, Berger AE, Bienkowski MJ, Sun FF, McEwan RN, Harris PKW, Yem AW, Waszak GA, Chosay JG, Sieu LC, Hardee MM, Zurcher-Neely HA, Reardon IM, Henrikson RL, Truesdell SE, Shelly JA, Eessalu TE, Taylor BM and Tracey DE (1990) Purification,

- cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein. Nature; 344:633-637
- Casini-Raggi V, Kam L, Chong YJT, Fiocchi C, Pizarro TT and Cominelli F (1995) Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. J Immunol; 154: 2434-2440
- Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA, Huebner K and Black RA (1992) Molecular cloning of the IL-1 β processing enzyme. Science; 256:97-100
- Chomczynski P and Sacchi A (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem; 162:156-159
- Chomarat P, Vannier E, Dechanet J, Rissoan MC, Banchereau J, Dinarello CA and Miossec P (1995) Balance of IL-1 receptor antagonist / IL-1 β in rheumatoid synovium and its regulation by IL-4 and IL-10. J Immunol; 154:1432-1439
- Colotta F, Re F, Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M, Giri J, Dower SK, Sims JE and Mantovani A (1993) Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. Science; 261:472-475
- Colotta F, Saccani S, Giri JG, Dower SK, Sims JE, Introna M and Mantovani A (1996) Regulated expression and release of the decoy receptor in human mononuclear phagocytes. J Immunol; 156:2534-2541
- Communal C, Sumandea M, de Tombe P, Narula J, Solaro RJ and Hajjar RJ (2002) Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. Proc Natl Acad Sci USA; 99:6252-6256
- Condorelli G, Roncarati R, Ross J, Jr., Pisani A, Stassi G, Todaro M, Trocha S, Drusco A, Gu Y, Russo MA, Frati G, Jones SP, Lefer DJ, Napoli C and Croce CM (2001) Heart-targeted overexpression of caspase-3 in mice increases infarct size and depresses cardiac function. Proc Natl Acad Sci USA; 98:9977-9982
- Corradi A, Franzi AT and Rubartelli A (1995) Synthesis and secretion of interleukin-1 α and interleukin-1 receptor antagonist during differentiation of cultured keratinocytes. Exp Cell Res; 217(2):355-362
- Cox A, Camp NJ, Nicklin MJH, di Giovine FS and Duff GW (1998) An analysis of linkage disequilibrium in the interleukin-1 gene cluster, using a novel grouping method for multiallelic markers. Am J Hum Genet; 62:1180-1188
- Curtis BM, Widmer MB, deRoos P and Qwarnstrom EE (1990) IL-1 and its receptor are translocated to the nucleus. J Immunol; 144:1295-1303
- Dai C and Krantz S (1999) Interferon- γ induces upregulation and activation of caspases 1, 3, and 8 to produce apoptosis in human erythroid progenitor cells. Blood; 93:3309-3316
- Dale M and Nicklin MJH (1999) Interleukin-1 receptor cluster: gene organisation of IL-1R2, IL-1R1, IL-1RL2(IL-1Rrp2), IL-1RL1(T1/ST2), and IL-18R1(IL-1Rrp) on human chromosome 2q. Genomics; 57:177-179

- Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS and Reed JC (1997) X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. Nature; 388:300-304
- Dewberry R, Holden H, Crossman D and Francis S (2000) Interleukin-1 receptor antagonist expression in human endothelial cells and atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol; 20:2394-2400
- Dinarello CA (1996) Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood; 6:2095-2146
- Dinarello CA (1998) Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. Intern Rev Immunol; 16:457-499
- Dinarello CA and Pomerantz BJ (2001) Proinflammatory cytokines in heart disease. Blood Purif; 19:314-321
- Dower SK, Kronheim SR, March CJ, Conlon PJ, Hopp TP, Gillis S and Urdal DL (1985) Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin-1. J Exp Med; 162:501-515
- Eisenberg SP, Evans RJ, Arend WP, Verderber E, Brewer MT, Hannum CH and Thompson RC (1990) Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. Nature; 343:341-346
- El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KEL, Bream JH, Young HA, Herera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumehl JF Jr and Rabkin CS (2000) Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. Nature; 404:398-402
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A and Nagata S (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. Nature; 391:43-50
- Evans HG, Lewis MJ and Shah AM (1993) Interleukin-1 β modulates myocardial contraction via dexamethasone sensitive production of nitric oxide. Cardiovasc Res; 27:1486-1490
- Fernandes-Alnemri T, Litwack G and Alnemri ES (1994) CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorabditis elegans cell death protein Ced-3 and mammalian Interleukin-1 β -converting enzyme. J Biol Chem; 269:30761-30764
- Francis SE, Holden H, Holt CM and Duff GW (1998) Interleukin-1 in myocardium and coronary arteries of patients with dilated cardiomyopathy. J Mol Cell Cardiol; 30:215-223
- Francis SE, Camp NJ, Dewberry RM, Gunn J, Syrris P, Carter ND, Jeffery S, Kaski JC, Cumberland DC, Duff GW and Crossman DC (1999) Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and coronary artery disease. Circulation; 99:861-866
- Fuhlbrigge RC, Fine S, Unanue E and Chaplin D (1988) Expression of membrane interleukin-1 by fibroblasts transfected with murine pro-interleukin-1 α cDNA. Proc Natl Acad Sci USA; 85:5649-5653

- Gabay C, Smith MF Jr, Eidlen D and Arend WP (1997) Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute-phase protein. J Clin Invest; 99:2930-2940
- Galea J, Armstrong J, Gadson P, Holden H, Francis SE and Holt CM (1996) Interleukin-1 beta in coronary arteries of patients with ischemic heart disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol; 16:1000-1006
- Gerdes N, Sukhova GK, Libby P, Reynolds RS, Young JL and Schönbeck U (2002) Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implication for atherogenesis. J Exp Med; 195:245-257
- Gerok W, Huber C, Meinertz T and Zeidler H (2000) Lehrbuch „Die Innere Medizin“ (zehnte Auflage). Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Deutschland
- Ghayur T, Banerjee S, Hugunin M, Butler D, Herzog L, Carter A, Quintal L, Sekut L, Talanian R, Paskind M, Wong W, Kamen R, Tracey D and Allen H (1997) Caspase-1 processes IFN- γ -inducing factor and regulates LPS-induced IFN- γ production. Nature; 386:619-623
- Giri JG, Wells J, Dower SK, McCall CE, Guzman RN, Slack J, Bird TA, Shanebeck K, Grabstein KH, Sims JE and Alderson MR (1994) Elevated levels of shed type II IL-1 receptor in sepsis. J Immunol; 153:5802-5813
- Greenfeder S, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA and Yu G (1995) Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin-1 receptor complex. J Biol Chem; 270:13757-13765
- Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, Fleming MA, Hayashi N, Higashino K, Okamura H, Nakanishi K, Kurimoto M, Tanimoto T, Flavell RA, Sato V, Harding MW, Livingston DJ and Su MS (1997) Activation of interferon- γ inducing factor mediated by interleukin-1 β converting enzyme. Science; 275:206-209
- Han RO, Ray PE, Baughman KL and Feldman AM (1991) Detection of interleukin and interleukin-receptor mRNA in human heart by polymerase chain reaction. Biochem Biophys Res Comm; 181:520-523
- Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, Joslin FG, Dripps DJ, Heimdal PL, Armes LG, Sommer A, Eisenberg SP and Thompson RC (1990) Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. Nature; 343:336-340
- Haskill S, Martin G, Van Le L, Morris J, Peace A, Bigler CF, Jaffe GJ, Hammerberg C, Sporn SA, Fong S, Arend WP and Ralph P (1991) cDNA cloning of an intracellular form of the human interleukin-1 receptor antagonist associated with epithelium. Proc Natl Acad Sci USA; 88:3681-3685
- Hatada EN, Krappmann D and Scheidereit C (2000) NF- κ B and the innate immune response. Curr Opin Immunol; 12:52-58
- Hofmann K, Bucher P and Tschopp J (1997) The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. Trends Biochem Sci; 22:155-156

- Horai R, Saijo S, Tanioka H, Nakae S, Sudo K, Okahara A, Ikuse T, Asano M and Iwakura Y (2000) Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. J Exp Med; 191:313-320
- Hosenpud JD, Campbell SM and Mendelson DJ (1989) Interleukin-1-induced myocardial depression in an isolated beating heart preparation. J Heart Transplant; 8:460-464
- Howard AD, Kostura MJ, Thornberry N, Ding GJF, Limjuco G, Weidner J, Salley JP, Hogquist KA, Chaplin DD, Mumford RA, Schmidt JA and Tocci MJ (1991) IL-1-converting enzyme requires aspartic acid residues for processing of the IL-1 β precursor at two distinct sites and does not cleave 31 kDa IL-1 α . J Immunol; 147:2964-2969
- Huang J, Gao X, Li S and Cao Z (1997) Recruitment of IRAK to the interleukin-1 receptor complex requires interleukin-1 receptor accessory protein. Proc Natl Acad Sci USA; 94:12829-12832
- Ing DJ, Zang J, Dzau VJ, Webster KA and Bishopric NH (1999) Modulation of cytokine-induced cardiac myocyte apoptosis by nitric oxide, Bak, and Bcl-x. Circ Res; 84:21-33
- Inohara N, del Peso L, Koseki T, Chen S and N ez G (1998) RICK, a novel protein kinase containing a caspase recruitment domain interacts with CLARP and regulates CD95-mediated apoptosis. J Biol Chem; 273:12296-12300
- Isoda K, Kamezawa Y, Tada N, Sato M and Ohsuzu F (2001) Myocardial hypertrophy in transgenic mice overexpressing human interleukin- J Card Fail; 7:355-364
- Ito A, Takii T and Onozaki K (1997) Endotoxin-induced upregulation of type I interleukin-1 receptor mRNA expression in hepatocytes of mice: role of cytokines. J Interferon Cytokine Res; 17:55-61
- Jobling SA, Auron PE, Gurkat G, Webb A, McDonald B, Rosenwasser LJ and Gehrke L (1988) Biological activity and receptor binding of human prointerleukin-1 β and subpeptides. J Biol Chem; 263:16372-16378
- Kacimi R, Long CS and Karliner JS (1997) Chronic hypoxia modulates the interleukin-1 β -stimulated inducible nitric oxide synthase pathway in cardiac myocytes. Circulation; 96:1937-1943
- Kacimi R, Karliner JS, Koudssi F and Long CS (1998) Expression and regulation of adhesion molecules in cardiac cells by cytokines. Circ Res; 82:576-586
- Kaplanski G, Farnarier C, Kaplanski S, Porat R, Shapiro L, Bongrand P and Dinarello CA (1994) Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism. Blood; 84:4242-4248
- Karlsen AE, Pavlovic D, Nielsen K, Jensen J, Andersen HU, Pociot F, Mandrup-Poulsen T, Eizirik DL and Nerup J (2000) Interferon- γ induces interleukin-1 converting enzyme expression in pancreatic islets by an interferon regulatory factor-1-dependent mechanism. J Clin Endocrinol Metab; 85:830-836

- Kaspar RL and Gehrke L (1994) Peripheral blood mononuclear cells stimulated with C5a or lipopolysaccharide to synthesize equivalent levels of IL-1 β mRNA show unequal IL-1 β protein accumulation but similar polyribosome profiles. J Immunol; 153:277-286
- Kilian PL, Kaffka KL, Stern AS, Wöhle D, Benjamin WR, DeChiara TM, Gubler U, Farrar JJ, Mizel SB and Lomedico PT (1986) Interleukin-1 α and interleukin-1 β bind to the same receptor on T-cells. J Immunol; 136:4509-4514
- Knaapen MW, Davies MJ, De Bie M, Haven AJ, Martinet W and Kockx MM (2001) Apoptotic versus autophagic cell death in heart failure. Cardiovasc Res; 51:304-312
- Kobayashi Y, Oppenheim JJ and Matsushima K (1991) Human pre-interleukin-1 α and β : structural features revealed by limited proteolysis. Chem Pharmaceut Bull; 39:1513-1517
- Kostura MJ, Tocci MJ, Limjuco G, Chin J, Cameron P, Hillman AG, Chartrain NA and Schmidt JA (1989) Identification of monocyte specific pre-interleukin 1 β convertase activity. Proc Natl Acad Sci USA; 86:5227-5231
- Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kohts K, Kwiatkowski DJ and Williams LT (1997) Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. Science; 278:294-298
- Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E and Parrillo JE (1996) Tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β are responsible for *in vitro* myocardial cell depression induced by human septic shock serum. J Exp Med; 183:949-958
- Kumar A, Brar R, Wang P, Dee L, Skorupa G, Khadour F, Schulz R and Parrillo JE (1999) Role of nitric oxide and cGMP in human septic serum-induced depression of cardiac myocyte contractility. Am J Physiol; 276:R265-R276
- Kurt-Jones EA, Beller DI, Mizel SB and Unanue ER (1985) Identification of a membrane-associated interleukin-1 in macrophages. Proc Natl Acad Sci USA; 82:1204-1208
- Libby PS, Warner SJ and Friedman GB (1988) Interleukin-1: a mitogen for human vascular smooth muscle cells that induces the release of growth-inhibitory prostanoids. J Clin Invest; 81:487-498
- Long CS (2001) The role of interleukin-1 in the failing heart. Heart Fail Rev; 6: 81-94
- Lonnemann G, Endres S, Van der Meer JW, Cannon JG, Koch KM and Dinarello CA (1989) Differences in the synthesis and kinetics of release of interleukin-1 α , interleukin-1 β and tumor necrosis factor from human mononuclear cells. Eur J Immunol; 19: 1531-1536
- Loppnow H, Flad HD, Dürrbaum I, Musehold J, Fetting R, Ulmer A J, Herzbeck H and Brandt E (1989) Detection of interleukin-1 with human dermal fibroblasts. Immunobiol; 179:283-291
- Loppnow H and Libby P (1990) Proliferating or interleukin-1-activated human vascular smooth muscle cells secrete copious interleukin-6. J Clin Invest; 85:731-738

- Loppnow H and Libby P (1992) Functional significance of human vascular smooth muscle cell-derived interleukin-1 in paracrine and autocrine regulation pathways. Exp Cell Res; 198:283-290
- Loppnow H, Werdan K, Reuter G and Flad HD (1998) The interleukin-1 and interleukin-1 converting enzyme families in the cardiovascular system. Eur Cytokine Netw; 9:675-680
- Loppnow H, Westphal E, Buchhorn R, Wessel A and Werdan K (2001) Interleukin-1 and related proteins in cardiovascular disease in adults and children. Shock; 16:3-9
- Los M, Wesselborg S and Schulze-Osthoff K (1999) The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. Immunity; 10:629-639
- Mallat Z, Tedgui A, Fontaliran F, Frank R, Durigon M and Fontaine G (1996) Evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia. N Engl J Med; 335:1190-1196
- Malyak M, Smith MF Jr, Abel AA and Arend WP (1994) Peripheral blood neutrophil production of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 β . J Clin Immunol; 14:20-30
- Malyak M, Guthridge JM, Hance KR, Dower SK, Freed JH and Arend WP (1998a) Characterisation of a low molecular weight isoform of IL-1 receptor antagonist. J Immunol; 161:1997-2003
- Malyak M, Smith MF Jr, Abel AA, Hance KR and Arend WP (1998b) The differential production of three forms of IL-1 receptor antagonist by human neutrophils and monocytes. J Immunol; 161: 2004-2010
- Mann DL (2001) Recent insights into the role of tumor necrosis factor in the failing heart. Heart Fail Rev; 6:71-80
- March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price V, Gillis S, Henney CS, Kronheim SR, Grabstein K, Conlon PJ, Hopp TP and Cosman D (1985) Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. Nature; 315:641-647
- Martin SJ, O'Brien GA, Nishioka WK, McGahon AJ, Mahboubi A, Saido TC and Green DR (1995) Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. J Biol Chem; 270:6425-6428
- Matsukawa A, Fukumoto T, Maeda T, Ohkawara S and Yoshinaga M (1997) Detection and characterization of IL-1 receptor antagonist in tissues from healthy rabbits: IL-1 receptor antagonist is probably involved in health. Cytokine; 9:307-315
- Matsushima K, Taguchi M, Kovacs EJ, Young HA and Oppenheim JJ (1986) Intracellular localization of human monocyte associated interleukin 1 (IL-1) activity and release of biologically active IL-1 from monocytes by trypsin and plasmin. J Immunol; 136:2883-2891

- McGee DW, Vitkus SJ and Lee P (1996) The effect of cytokine stimulation on IL-1 receptor mRNA expression by intestinal epithelial cells. Cell Immunol; 168: 276-280
- McCarthy JV, Ni J and Dixit VM (1998) RIP2 is a novel NF- κ B-activating and cell death-inducing kinase. J Biol Chem; 273:16968-16975
- McTiernan CF, Lemster BH, Frye C, Brooks S, Combes A and Feldman AM (1997) Interleukin-1 β inhibits phospholamban gene expression in cultured cardiomyocytes. Circ Res; 81:493-503
- Miller BE, Crasney PA, Gauvin DM, Holbrook KB, Koonz DJ, Abruzzese RV, Miller RE, Pagani KA, Dolle RE, Ator MA and Gilman SC (1995) Inhibition of mature IL-production in murine macrophages and a murine model of inflammation by WIN67694, an inhibitor of ICE. J Immunol; 154:1331-1338
- Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartweg E and Yuan J (1993) Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 β -converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene ced-3. Cell; 75:653-660
- Mizel SB, Kilian PL, Lewis JC, Paganelli KA and Chizzonite RA (1987) The interleukin-1 receptor. Dynamics of interleukin-1 binding and internalization in T cells and fibroblasts. J Immunol; 138:2906-2912
- Mohr S, Zech B, Lapetina EG and Brüne B (1997) Inhibition of caspase-3 by S-nitrosation and oxidation caused by nitric oxide. Biochem Biophys Res Commun; 238:387-391
- Müller-Werdan U, Schumann H, Fuchs R, Reithmann C, Loppnow H, Koch S, Zimny-Arndt U, He C, Darmer D, Jungblut P, Stadler J, Holtz J and Werdan K (1997) Tumor necrosis factor- α is cardiodepressant in pathophysiologically relevant concentrations without inducible nitric oxide-(NO)-synthase (iNOS) or triggering serious cytotoxicity. J Mol Cell Cardiol; 29:2915-2923
- Müller-Werdan U, Schumann H, Loppnow H, Fuchs R, Darmer D, Stadler J, Holtz J and Werdan K (1998) Endotoxin and tumor necrosis factor- α exert a similar proinflammatory effect in neonatal rat cardiomyocytes, but have different cardiodepressant profiles. J Mol Cell Cardiol; 30:1027-1036
- Murzin AG, Lesk AM and Chothia C (1992) β -trefoil fold. Patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitors interleukins-1 β and 1 α and fibroblast growth factors. J Mol Biol; 223:531-543
- Muzio M, Polentarutti N, Sironi M, Poli G, de Gioia L, Introna M, Mantovani A and Calotta F (1995) Cloning and characterization of a new isoform of the interleukin-1 receptor antagonist. J Exp Med; 182:623-628
- Muzio M, Polentarutti N, Facchetti F, Guiseppe P, Doni A, Sironi M, Transidico P, Salmona M, Introna M and Mantovani A (1999) Characterization of type II intracellular IL-1 receptor antagonist [IL-1ra3]: a depot IL-1ra. Eur J Immunol; 29:781-188
- Nakagawa M, Terracio L, Carver W, Birkedal-Hansen H and Borg TK (1992) Expression of collagenase and IL-
Dev Dyn; 195:87-99

-
- Nicklin MJH, Hughes DE, Barton JL, Ure JM and Duff GW (2000) Arterial inflammation in mice lacking the interleukin-1 receptor antagonist gene. J Exp Med; 191:303-311
- Nolan KF, Greaves DR and Waldmann H (1998) The human interleukin-18 gene IL-18 maps to 11q22.2-q22.3, closely linked to the DRD2 gene locus and distinct from mapped IDDM Loci. Genomics; 51:161-163
- Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K, Akita K, Namba M, Tanabe F, Konishi K, Fukuda S and Kurimoto M (1995) Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. Nature; 378:88-91
- Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y and Sasayama S (1998) Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodelling. Circulation; 98:149-156
- Oral H, Dorn GW and Mann DL (1997) Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumor necrosis factor- α in the adult mammalian cardiac myocyte. J Biol Chem; 272:4836-4842
- Palmer JN, Hartogensis WE, Patten M, Fortuin FD and Long CS (1995) Interleukin-1 β induces cardiac myocyte growth but inhibits cardiac fibroblast proliferation in culture. J Clin Invest; 95:2555-2564
- Parnet P, Garka KE, Bonnert TP, Dower SK and Sims JE (1996) IL-1Rrp is a novel receptor-like molecule similar to the type I interleukin-1 receptor and its homologues T1/ST2 and IL-1R AcP. J Biol Chem; 271:3967 - 3970
- Paulus WJ (1999) How are cytokines activated in heart failure? Eur J Heart Fail; 1:309-312
- Penton-Rol G, Orlando S, Polentarutti N, Bernasconi S, Muzio M, Introna M and Mantovani A (1999) Bacterial Lipopolysaccharide causes rapid shedding, followed by inhibition of mRNA expression, of the IL-1 type II receptor, with concomitant up-regulation of the type I receptor and induction of incompletely spliced transcripts. J Immunol; 162:2931-2938
- Petit F, Bertagnoli S, Gelfi J, Fassy F, Boucraut-Baralon C and Milon A (1996) Characterization of a myxoma virus-encoded serpin-like protein with activity against interleukin-1 β -converting enzyme. J Virol; 70: 5860 – 5866
- Pirhonen J, Sareneva T, Julkunen I and Matikainen S (2001) Virus infection induces proteolytic processing of IL-18 in human macrophages via caspase-1 and caspase-3 activation. Eur J Immunol; 31:726-733
- Pomerantz BJ, Reznikov LL, Harken AH and Dinarello CA (2001) Inhibition of caspase-1 reduces human myocardial ischemic dysfunction via inhibition of IL-18 and IL-1 β . Proc Natl Acad Sci USA; 98:2871-2876
- Potempa J, Korzus E and Travis J (1994) The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. J Biol Chem; 269:15957-15960

- Ray CA, Black RA, Kronheim SR, Greenstreet TA, Sleath PR, Salvesen GS and Pickup DJ (1992) Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 β converting enzyme. Cell; 69:597-604
- Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS and Reed JC (1997) The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. EMBO J; 16:6914-6925
- Re F, Mengozzi M, Muzio M, Dinarello CA, Mantovani A and Colotta F (1993) Expression of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) by human circulating polymorphonuclear cells. Eur J Immunol; 23:570-573
- Robinson D, Shibuya K, Mui A, Zonin F, Murphy E, Sana T, Hartley SB, Menon S, Kastelein R, Bazan F and O'Gara A (1997) IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon- γ production and activates IRAK and NF- κ B. Immunity; 7:571-581
- Ross R and Kariya B (1980) Morphogenesis of vascular smooth muscle in atherosclerosis and cell structure. Handbook of Physiology. The cardiovascular system, Section 2; (Bohr DF, Somlyo AP and Sparks HY eds.); American Physiological Society, Bethesda, pages 66-91
- Satoh M, Tamura G, Segawa I, Tashiro A, Hiramori K and Satodate R (1996) Expression of cytokine genes and presence of enteroviral genomic RNA in endomyocardial biopsy tissue of myocarditis and dilated cardiomyopathy. Virchows Arch; 427:503-509
- Scheubel RJ, Bartling B, Simm A, Silber RE, Drogaris K, Darmer D and Holtz J (2002) Apoptotic pathway activation from mitochondria and death receptors without caspase-3 cleavage in failing human myocardium: fragile balance of myocyte survival? J Am Coll Cardiol; 39:481-488
- Schindler R, Clark BD and Dinarello CA (1990) Dissociation between interleukin-1 β mRNA and protein synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. J Biol Chem; 265:10232-10237
- Schönbeck U, Brandt E, Petersen F, Flad H-D and Loppnow H (1995) IL-8 specifically binds to endothelial but not to smooth muscle cells. J Immunol; 154:2375-2383
- Schönbeck U, Herzberg M, Petersen A, Wohlenberg C, Gerdes J, Flad H-D and Loppnow H (1997) Human vascular smooth muscle cells express interleukin-1 β -converting enzyme (ICE), but inhibit processing of the interleukin-1 β precursor by ICE. J Exp Med; 185:1287-1294
- Seckinger P, Williamson K, Balavoine JF, Mach B, Mazzei C, Shaw A and Dayer JM (1987) A urine inhibitor of interleukin-1 activity affects both interleukin-1 α and -1 β but not tumor necrosis factor- α . J Immunol; 139: 1541-1545
- Seta Y, Kesavan S, Bozkurt B, Oral H and Mann D (1996) Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis. J Card Fail; 2:243-249
- Shioi T, Matsumori A and Sasayama S (1996) Persistent expression of cytokine in the chronic stage of viral myocarditis in mice. Circulation; 94:2930-2937

- Shioi T, Matsumori A, Kihara Y, Inoko M, Ono K, Iwanaga Y, Yamada T, Iwasaki A, Matsushima K and Sasayama S (1997) Increased expression of interleukin-1 β and monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in the hypertrophied and failing heart with pressure overload. Circ Res; 81:664-671
- Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Anderson MR, Bird TA, Giri JG, Colotta F, Re F, Mantovani A, Shanebeck K, Grabstein KH and Dower SK (1993) Interleukin-1 signalling occurs exclusively via the type I receptor. Proc Natl Acad Sci USA; 90:6155-6159
- Singer II, Scott S, Hall GL, Limjuco G, Chin J and Schmidt JA (1988) Interleukin-1 β is localized in the cytoplasmic ground substance but is largely absent from the Golgi apparatus and plasma membranes of stimulated human monocytes. J Exp Med; 167: 389-407
- Sprecher CA, Morgenstern KA, Mathewes S, Dahlen JR, Schrader SK, Foster DC and Kisiel W (1995) Molecular cloning, expression, and partial characterization of two novel members of the ovalbumin family of serine proteinase inhibitors. J Biol Chem; 270: 29854-29861
- Steinkasserer A, Spur NK, Cox S, Jeggo P and Sim RB (1992) The human IL-1 receptor antagonist gene (IL-1RN) maps to chromosome 2q14-q21, in the region of the IL-1 α and IL-1 β loci. Genomics; 13: 654-657
- Stevenson FT, Torrano F, Locksley RM and Lovett DH (1992) Interleukin-1: the patterns of translation and intracellular distribution support alternative secretory mechanisms. J Cell Physiol; 152:223-231
- Sun J, Bird CH, Sutton V, McDonald L, Coughlin PB, De Jong TA, Trapani JA and Bird PI (1996) A cytosolic granzyme B inhibitor related to the viral apoptotic regulator cytokine response modifier A is present in cytotoxic lymphocytes. J Biol Chem; 271:27802-27809
- Suzuki K, Murtuza B, Smolenski RT, Sammut IA, Suzuki N and Kaneda MH (2001) Overexpression of interleukin-1 receptor antagonist provides cardioprotection against ischemia-reperfusion injury associated with reduction in apoptosis. Circulation; 104: I308-I313
- Symons JA, Eastgate JA and Duff GW (1991) Purification and characterisation of a novel soluble receptor for interleukin-1. J Exp Med; 174:1251-1254
- Tarlow JK, Blakemore AIF, Lennard A, Solari R, Hughes HN, Steinkasserer A and Duff GW (1993) Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. Hum Genet; 91:403-404
- Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS and Dixit VM (1995) Yama/CPP32 β , a mammalian homolog of CED-3, is a crmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. Cell; 81:801-809

- Thaik CM, Calderone A, Takahashi N and Colucci WS (1995) Interleukin-1 β modulates the growth and phenotype of neonatal rat cardiac myocytes. J Clin Invest; 96:1093-1099
- Thome M, Hofmann K, Burns K, Martinon F, Bodmer J-L, Mattmann C and Tschopp J (1998) Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1. Curr Biol; 8:885-888
- Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, Eliston KO, Ayala JM, Casano FJ, Chin J, Ding G J-F, Egger LA, Gaffney EP, Limjuco G, Palyha OC, Raju SM, Ronaldo AM, Salley JP, Yamin T-T, Lee TD, Shively JE, MacCross M, Mumford RA, Schmidt JA and Tocci M (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. Nature; 356:768-774
- Thornberry NA, Peterson EP, Zhao JJ, Howard AD, Griffin PR and Chapman KT (1994) Inactivation of interleukin-ketones. Biochemistry; 33:3934-3940
- Torigoe K, Ushio S, Okura T, Kobayashi S, Taniai M, Kunikate T, Murakami T, Sanou O, Kojima H, Fujii M, Ohta T, Ikeda M, Ikegami H and Kurimoto M (1997) Purification and characterization of the human interleukin-18 receptor. J Biol Chem; 272:25737-25742
- Tountas NA, Casini-Raggi V, Yang H, di Giovine FS, Vecchi M, Kam L, Melani L, Pizarro TT, Rotter JI and Cominelli F (1999) Functional and ethnic association of allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene in ulcerative colitis. Gastroenterology; 117:806-813
- Ushio S, Namba M, Okura T, Hattori K, Nukada Y, Akita K, Tanabe F, Konishi K, Micallef M, Fujii M, Torigoe K, Tanimoto T, Fukuda S, Ikeda M, Okamura H and Kurimoto M (1996) Cloning of the cDNA for human IFN- γ -inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. J Immunol; 156:4274-4279
- Van Hoffen E, Van Wichen D, Stuij I, De Jonge N, Klöpping C, Lahpor J, Van Den Tweel J, Gmelig-Meyling F and De Weger R (1996) *In situ* expression of cytokines in human heart allografts. Am J Pathol; 149:1991-2003
- Van Snick J, Cayphas S, Vink A, Uyttenhove C, Coulie PG, Rubira MR and Simpson RJ (1986) Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of a T-cell derived lymphokine with growth factor activity for B-cell hybridomas. Proc Natl Acad Sci USA; 83:9679-9683
- Walker NPC, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferez CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD, Herzog L, Hugunin M, Houy W, Mankovich JA, McGuinness L, Orlewicz E, Paskind M, Pratt CA, Reis P, Summani A, Terranova M, Welch JP, Xiong L, Möller A, Tracey DE, Kamen R and Wong WW (1994) Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 β -converting enzyme: a (p20/p10)₂

- homodimer. Cell; 78:343-352
- Wang S, Miura M, Jung Y, Zhu H, Li E and Juan J (1998) Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. Cell; 92:501-509
- Warner SJ, Auger KR and Libby P (1987) Interleukin-1 induces interleukin-1. II. Recombinant human interleukin-1 induces interleukin-1 production by adult human vascular endothelial cells. J Immunol; 139:1911-1917
- Webb AC, Collins P, Auron PE, Eddy RL, Nakai H, Byers MG, Haley LL, Henry WM and Shows TB (1986) Interleukin-1 gene (IL-1) assigned to long arm of human chromosome 2. Lymphokine Res; 5:77-85
- Weitzmann MN and Savage N (1992) Nuclear internalization and DNA binding activities of interleukin-1, interleukin-1 receptor and interleukin-1 receptor complexes. Biochem Biophys Res Commun; 187:1166-1171
- Werdan K and Erdmann E (1989) Preparation and culture of embryonic and neonatal heart muscle cells: modification of transport activity. Methods Enzymol; 173:634-662
- Werdan K (1998) The activated immune system in congestive heart failure – from dropsy to the cytokine paradigm. J Intern Med; 243:87-92
- Wessendorf JHM, Garfinkel S, Zhan X, Brown S and Maciag T (1993) Identification of a nuclear localization sequence within the structure of the human interleukin-1 α precursor. J Biol Chem; 268:22100-22104
- Wetzler M, Kurzrock R, Estrov Z, Komtarjian H, Gisslinger H, Underbrink MP and Talpaz M (1994) Altered levels of interleukin-1 β and interleukin-1 receptor antagonist in chronic myelogenous leukemia: clinical and prognostic correlates. Blood; 84:3142-3147
- Wilson KP, Black JF, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA and Livingstone DJ (1994) Structure and mechanism of interleukin-1 β converting enzyme. Nature; 370:270-274
- Ye K, Koch KC, Clark BD and Dinarello CA (1992) Interleukin-1 down-regulates gene and surface expression of interleukin-1 receptor type I by destabilizing its mRNA whereas interleukin-2 increases its expression. Immunology; 75:427-434
- Yue P, Massie BM, Simpson PC and Long CS (1998) Cytokine expression increases in nonmyocytes from rats with postinfarction heart failure. Am J Physiol; 275: H250 - H258
- Young D and Dinarello CA (1998) Antibodies to domains II and III of the IL-1 receptor accessory protein inhibit IL-1 β activity but not binding: regulation of IL-1 responses is via type I receptor, not the accessory protein. J Immunol; 160: 3170-3179
- Young JL, Sukhova GK, Foster D, Kisiel W, Libby P and Schönbeck U (2000) The serpin proteinase inhibitor 9 is an endogenous inhibitor of interleukin 1 β -converting enzyme (Caspase-1) activity in human vascular smooth muscle cells. J Exp Med; 191:1535-1544

ANHANG

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Elena Westphal, geboren am 23.08.1971 in Tomsk, Rußland, an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Hamburg, Juli 2003

Lebenslauf

Name	Elena Westphal, geb. Lobanova
Geburtsdatum	23.08.1971
Geburtsort	Tomsk, Rußland
Familienstand	verheiratet, 1 Kind
Sept. 1978 – Juni 1988	Mittelschule Nr. 56 der Stadt Toljatti, Rußland
Sept. 1988 – Juni 1990	Laborantin im Institut für Ökologie in Toljatti, Rußland
Sept. 1990 – Juni 1995	Lehrstuhl für Genetik und Selektion, Biologische Fakultät der Moskauer Staatlichen Universität „Lomonossov“ in Moskau, Rußland, Studiengang Genetik, Abschluss: Diplom-Biologin
Mai 1994 – Juni 1995	Fachbereich für Genetik der Biochemie der Tiere, Molekulargenetisches Institut der Akademie der Wissenschaften Rußlands in Moskau, Anfertigung der Diplomarbeit zum Thema: „Entdeckung und Strukturanalyse des Gens Vinkulin bei <i>Drosophila melanogaster</i> “
Okt. 1995 – Dez. 1995	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pflanzenbiochemie, Halle/Saale
Jan. 1996 – Juni 1997	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Genetik an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Juli 1997 – Aug. 1998	Erziehungsurlaub
Sept. 1998 – Dez. 2001	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Forschungslabor der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III der Medizinischen Fakultät an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Anfertigung der Promotionsarbeit
Seit Jan. 2002	Forschungsinstitut LPT „Laboratory of Pharmacology and Toxicology KG“, Hamburg, Abteilung: Berichtswesen

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Dank sagen, die mich bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

Bei Herrn Professor Dr. Karl Werdan bedanke ich mich für die Ermöglichung dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Privatdozent Dr. Harald Loppnow für die Überlassung des interessanten Themas, die hervorragende Einführung in die Welt der Zytokine, die wissenschaftliche Betreuung während der experimentellen Arbeiten, sowie die Anregungen während der Schreibphase.

Herrn Professor Dr. Gunter Reuter gilt mein Dank für die Unterstützung und Kooperation bei der Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit.

Für die allseitige Hilfe bei der Durchführung der Experimente und für die tagtägliche moralische Unterstützung danke ich Frau Claudia Pilowski.

Bei Frau Privatdozentin Dr. Ursula Müller-Werdan und Frau Susanne Koch bedanke ich mich für die Bereitstellung neonataler Ratten Kardiomyozyten, für den Erfahrungsaustausch und die gute Zusammenarbeit.

Frau Dr. Dorothea Darmer und Frau Dr. Susanne Rohrbach danke ich für die Bereitstellung der RNA Proben des humanen Myokards und die Unterstützung bei der Auswertung der PCR Ergebnisse.

Für die Hilfe und Ratschläge bei der Planung der immunhistochemischen Experimente möchte ich mich bei Herrn Dr. Gerd Hause und Herrn Ingo Schulz bedanken.

Weiterhin danke ich Frau Dr. Doris Jäger, Herrn Ingo Neumann und Frau Anke Rasch für das gesunde Arbeitsklima.

Ganz herzlich danke ich meiner Familie für alle Geduld, Verständnis und Unterstützung beim Schreiben dieser Arbeit.