

Aus der
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin I
(Schwerpunkt: Gastroenterologie, Gastrointestinale Onkologie,
Hepatologie, Infektiologie und Geriatrie)

**Transmission des Endoplasmatischen Retikulum Stresses –
Charakterisierung des Effektes auf Kupffer Zellen sowie Strategien
zur Identifizierung transmittierter Faktoren**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Julian Götze

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. N. Malek

2. Berichterstatterin: Privatdozentin Dr. Dr. M. André

3. Berichterstatter: Professor Dr. A. Hochhaus

Tag der Disputation: 31.03.2022

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. N. Malek, für die Betreuung dieser Arbeit und die fortwährende Unterstützung während meiner Promotion. Der gemeinsame Austausch, die vielen Ideen und kritischen Fragen empfand ich als sehr produktiv und förderten das Voranschreiten der Arbeit maßgeblich. Zudem bedanke ich mich bei Frau Privatdozentin Dr. Dr. M. André und Herrn Professor Dr. A. Hochhaus für die Erstellung der Zweit- und Drittgutachten.

Bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer, Herrn Dr. P. Bozko, für die große Unterstützung und den festen Glauben an dieses Projekt. Ferner möchte ich allen gegenwärtigen und ehemaligen Kolleg:Innen der Arbeitsgruppe meinen Dank ausdrücken: Frau Dr. B. Baijwa, Frau Dr. H. Belahmer, Frau H. Keppeler, Herrn S. Reuter, Herrn Dr. M. Riebold, Herrn Dr. T. Scholta, Frau A. Rudolph und Frau I. Yilmaz.

Für die kritische Durchsicht der Dissertation und die wertvollen Ideen bin ich meiner Schwester Simone Freund und Herrn Felix Hezel sehr verbunden.

Sehr dankbar bin ich meinen Eltern, Ingrid und Christian Götze, für ihre Unterstützung, die nicht auf einen Lebensabschnitt begrenzt ist, sondern mein ganzes Leben trägt und weiter prägt. Diese Arbeit ist ihnen gewidmet. Ich danke euch.

Den teils langen und steinigen Weg bis zum Abschluss meiner Promotion musste ich nicht allein gehen: Dafür danke ich meiner Ehefrau, Dr. Anja Carola Götze. Das machte vieles einfacher und alles am Ende gut.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	3
Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis.....	7
1. Einleitung	11
1.1. Das Endoplasmatische Retikulum	11
1.2. ER Stress	13
1.2.1. IRE-1	15
1.2.2. PERK	16
1.2.3. ATF-6	17
1.3. ER Stress und Zelltod	18
1.4. Die Rolle von ER Stress in der Pathogenese von Erkrankungen.....	21
1.4.1. ER Stress in der Pathophysiologie von Krebserkrankungen	21
1.4.2. ER Stress-Induktion durch Glukosedepprivation	23
1.4.3. Die Rolle von ER Stress in nicht-alkoholischen Fettlebererkrankungen	23
1.4.4. ER Stress-Induktion durch Palmitat	25
1.5. Pharmaka-basierte ER Stress-Induktion.....	26
1.6. Transmission des ER Stress-Signals.....	28
1.7. Kupffer Zellen.....	30
1.8. Ziele der Promotionsarbeit	31
2. Material und Methoden.....	34
2.1. Material.....	34
2.1.1. Chemikalien.....	34
2.1.2. Antibiotika	35
2.1.3. Antikörper	36
2.1.4. Zelllinien	36
2.1.5. Zusammensetzung der Zellkulturmedien	37
2.1.6. Reagenzien für die Zellkultur	38
2.1.7. Kits.....	39
2.1.8. Verbrauchsmaterialien.....	40
2.1.9. Puffer und Lösungen	41
2.1.10. Ansatz zur Herstellung der SDS-Gele	42
2.1.11. Primer für die qRT-PCR	43

2.2. Methoden	44
2.2.1. Kultivierung von Zelllinien.....	44
2.2.2. Generation konditionierter Medien	45
2.2.3. Behandlung von Kupffer Zellen mit freien Fettsäuren	46
2.2.3.1. Präparation einer an BSA-konjugierten Palmitat-Lösung	46
2.2.3.2. Behandlung der Kupffer Zellen mit Palmitat und Oleat	47
2.2.1. Kultivierung in einem Zwei-Kompartiment-Zellkultursystem.....	48
2.2.1.1. Ko-Kultivierung nach Behandlung mit Thapsigargin	49
2.2.1.2. Ko-Kultivierung nach Glukosedepprivation	49
2.2.1.3. Ko-Kultivierung nach Behandlung mit Palmitat	50
2.2.2. Biochemische Charakterisierung der Medien.....	50
2.2.2.1. Temperaturbehandlung	50
2.2.2.2. Proteinase K-Verdau	51
2.2.2.3. Desoxyribonuklease-Verdau	52
2.2.2.4. Lipidextraktion und Fraktionierungen von Zellkulturüberständen	53
2.2.3. RT-qPCR.....	54
2.2.3.1. RNA-Isolation	55
2.2.3.2. cDNA-Synthese.....	55
2.2.3.3. RT-qPCR.....	56
2.2.4. Western Blot	57
2.2.4.1. Zellyse und Messung der Proteinkonzentration	57
2.2.4.2. SDS-Gelelektrophorese	58
2.2.4.3. Proteintransfer	59
2.2.4.4. Proteindetektion	60
2.2.5. Durchflusszytometrie	61
2.2.5.1. Zellzyklusuntersuchung mittels Propidiumiodid-Färbung	61
2.2.5.2. Aktivitätsmessung mittels dualer Reporterzelllinie (CHO-S21)	62
2.2.6. Erstellung der Grafiken	63
3. Ergebnisse	64
3.1. Expression von ER Stress-Markern in BNL CL2, Hepa-1-6, KC-13-2 und KUP5 nach Behandlung mit Thapsigargin	64
3.2. Proteinuntersuchung in KC-13-2 nach Behandlung mit konditionierten Medien	67
3.3. Proteinuntersuchung in Akzeptor- und Donorzellen nach Behandlung mit konditionierten Medien	68
3.4. Zellzyklusuntersuchung in KC-13-2, KUP5, Hepa-1-6 und AML-12 nach Behandlung mit konditionierten Medien	70
3.5. Proteinuntersuchung in KC-13-2 nach Behandlung mit freien Fettsäuren	76

3.5.1.	Nach Behandlung mit Palmitat	76
3.5.2.	Nach kombinierter Behandlung mit Palmitat und Oleat	78
3.6.	Proteinuntersuchung in KC-13-2 und Hepa-1-6 nach Ko-Kultivierung	79
3.6.1.	Nach Behandlung mit Palmitat oder Glukosedeprivation	79
3.6.2.	Nach Behandlung mit Thapsigargin	81
3.7.	Proteinuntersuchung in Kupffer Zellen nach Behandlung mit konditionierten Medien..	83
3.7.1.	Nach Temperaturbehandlung der konditionierten Medien	83
3.7.2.	Nach Proteinase K-Verdau der konditionierten Medien	85
3.7.3.	Nach Desoxyribonuklease-Verdau der konditionierten Medien	87
3.8.	Durchflusszytometrische Untersuchung von CHO-S21-Zellen nach Behandlung mit konditionierten Medien.....	89
3.8.1.	Nach Lipidextraktion des konditionierten Mediums CM TG und des konditionierten Kontrollmediums CM E.....	90
3.8.2.	Nach HILIC-basierter Fraktionierung der konditionierten Medien.....	93
3.8.3.	Nach HILIC-basierter Sub-Fraktionierung der konditionierten Medien	94
4.	Diskussion	96
4.1.	Effekte der konditionierten Medien in Hepatozyten und Kupffer Zellen	98
4.2.	Nicht-pharmakologische ER Stress-Induktion in Kupffer Zellen	101
4.3.	Physikalische und biochemische Charakteristika putativer transmissibler Faktoren....	104
4.4.	Aktivitätstestungen der konditionierten Medien nach Lipidextraktion und HILIC-basierter Fraktionierung	106
4.5.	<i>de novo</i> -UPR auf Basis einer pharmakologischen ER Stress-Induktion <i>in vitro</i> als reales Phänomen oder Artefakt – ein Ausblick	109
5.	Zusammenfassung	112
6.	Abbildungsverzeichnis.....	115
7.	Tabellenverzeichnis.....	117
8.	Literaturverzeichnis	118
9.	Erklärung zum Eigenanteil	127

Abkürzungsverzeichnis

AMPK	AMP-activated protein kinase
APC	Antigen-presenting cell
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASK-1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
ATF-4	Activating transcription factor 4
ATF-6	Activating transcription factor 6
ATP	Adenosintriphosphat
BAK	BH antagonist or killer
BAX	BCL-2-associated X protein
BCL-2	B cell lymphoma 2
BH3	BCL-2- homology 3
BID	BH3 - interacting domain death agonist
BIM	BCL-2-interacting mediator of cell death
BiP	Binding immunoglobulin protein
BSA	Bovines Serum-Albumin
bZIP	Basic leucine zipper
CD	Cluster of differentiation
CFP	Cyan fluorescent protein
CHOP	C/EBP homologous protein
COP II	Coat protein II
CRpP	Constitutive repressor of eIF2 α phosphorylation
DAG	Diacylglycerin
DEN	N-Nitrosodiethylamine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDEM-1	ER-degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein-1
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid
EGTA	Ethylenglycoltetraacetic acid
eIF2 α	Eukaryotic translation initiation factor 2 α
ER	Endoplasmatisches Retikulum

ERAD	ER-associated degradation
ERdj	ER-localized DnaJ
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
GADD34	Growth arrest and DNA damage-inducible gene 34
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Green fluorescent protein
h	Stunde
HCl	Hydrogenchlorid (Salzsäure)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
HILIC	Hydrophilic interaction chromatography
HPLC	High-performance liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
HSP	Hitzeschockprotein
IFN γ	Interferon γ
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare NO Synthase
IP ₃	Inositol 1,4,5-Trisphosphat
IRE-1	Inositol requiring enzyme 1
LDL	Low-density Lipoprotein
LOX-1	lectin-like oxidized LDL Rezeptoren
LPC	Lysophosphatidylcholin
MEF	Mouse embryonic fibroblasts
MeOH	Methanol
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute
MPS	Mononukleär-phagozytäres System
mRNA	Massenger ribonucleic acid
MS	Massenspektrometrie
NaF	Natriumfluorid
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease

NaCl	Natriumchlorid
NaDOC	Natriumdeoxycholat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
NF-Y	Nuclear transcription factor Y
NP-40	Nonidet P-40
ORF	Open reading frame
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PERK	Double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like ER kinase
POMC	Proopiomelanocortin
PP-1	Protein Phosphatase 1
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIP	Regulierte intramembrane Proteolyse
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RIDD	Regulated IRE-1 - dependent decay of mRNAs
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-qPCR	Reverse transcription-quantitative real-time PCR
SERCA	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SMAC	Second mitochondria-derived activator of caspase
SR	Scavenger-Rezeptor
SRP	Signal recognition particle
S1P	Site-1 Protease
S2P	Site-2 Protease
TAE	Tris-Acetacetat-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	TBS mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TERS	Transmission of ER Stress

TNF	Tumornekrosefaktor
TREM	Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells
UDP-GlcNAc	Uridine diphosphate N-acetylglucosamine
UPR	Unfolded Protein Response

1. Einleitung

1.1. Das Endoplasmatische Retikulum

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein zentrales, phylogenetisch konserviertes Kompartiment kernhaltiger, eukaryotischer Zellen. Sein Lumen wird von einem Membransystem umgeben, welches die charakteristische Morphologie, bestehend aus Zisternen sowie Tubuli, erzeugt und auch Teile des Zellkernes umschließt. Größe und Ausdehnung dieser Organelle sind dynamisch, von der Zellart abhängig und dem sekretorischen Profil einer Zelle entsprechend angepasst. Daher zeichnen sich beispielsweise Hepatozyten, Plasmazellen oder β -Zellen des Pankreas durch ein besonders ausgebildetes ER aus. Es wird das raue, granuläre von einem glatten, agranulären Endoplasmatischen Retikulum unterschieden [1].

Die Granularität ergibt sich durch die Anheftung von Ribosomen auf der zytoplasmatischen Seite des endoplasmatischen Retikulums. Hier findet die Biosynthese einer Vielzahl von Membranproteinen und sekretorischen Proteinen statt. Die naszierende, auf der zytoplasmatischen Seite synthetisierte Polypeptidkette gelangt durch einen Proteintransportkanal (Sec-Translokon) ungefaltet in das Lumen des ER. Signal recognition particles (SRP) erkennen die N-terminal gelegene Signalsequenz und ermöglichen dem Polypeptid den Eintritt in das ER. Im Lumen wird die Signalsequenz durch Signalpeptidasen abgespalten. Bereits kotranslational erfolgen Modifikationen durch N-Glykosylierung oder die Ausbildung von Disulfidbrücken. Es finden weitere posttranslationale Modifikationen statt und durch chaperone-assistierte Vorgänge wird das Protein in die korrekte dreidimensionale Form überführt. Über Vesikel gelangen die neugebildeten Proteine zum Golgi-Apparat, in dessen Zisternen sie weiter prozessiert werden [1, 2].

Proteine, die nicht ihre korrekte Zielkonformation einnehmen, werden wieder in das Zytoplasma überführt und dort abgebaut. Dieser Prozess wird ER-assoziierte Degradation (engl. ER-associated degradation, ERAD) genannt [3]. Hierbei wird das fehlgefaltete Protein ubiquitiniert und über das 26S-Proteasom der Proteolyse zugeführt [2]. Eine wichtige Rolle spielt in diesem Zusammenhang das Protein ER-degradation-enhancing

alpha-mannosidase-like protein-1 (EDEM-1), das u.a. die Aggregation von fehlgefalteten Proteinen verhindert [4].

Die Erfolgsrate der Proteinfaltung ist gering und wird in der Literatur teilweise mit < 20 % angegeben. Durch die Selektion korrekt gefalteter und damit funktionaler Proteine findet im ER auch eine Qualitätskontrolle sekretorischer Proteine, wie Oberflächenrezeptoren oder Peptidhormonen, statt [5]. Das ER trägt somit maßgeblich zur Proteostase bei, einem Gleichgewicht aus der Synthese von Proteinen und ihrem regulierten Abbau. Lediglich korrekt gefaltete Proteine verlassen über diesen Weg das ER.

Eine weitere, zentrale Aufgabe für die Funktionsweise der eukaryontischen Zelle ist die intrazelluläre Sequestrierung von Calciumionen (Ca^{2+} -Ionen) im Lumen des ER. Als second messenger sind Ca^{2+} -Ionen fundamental für zelluläre Signalketten. Membranständige Ca^{2+} -Ionen-Kanäle ermöglichen den in das Zytoplasma gerichtete Ca^{2+} -Ionen-Einstrom aus dem Lumen des ER, welcher durch Rezeptoren, wie beispielsweise Ryanodin- oder Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3)-Rezeptoren reguliert wird. Der Gradient der Ca^{2+} -Konzentrationen zwischen Zytoplasma und dem ER-Lumen wird durch Ca^{2+} -Ionen-Pumpen, sogenannten Ca^{2+} -ATPasen des sarkoplasmatischen/endoplasmatischen Retikulums (engl. Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase, SERCAs), aufrechterhalten, die aktiv Ca^{2+} -Ionen in das ER-Lumen pumpen [6].

Das glatte ER ist der Ort der Phospholipidsynthese und ist an der Synthese von langkettigen Fettsäuren sowie von Steroiden beteiligt. Insbesondere in Hepatozyten finden sich im glatten ER zahlreiche Enzyme, wie beispielsweise Monooxygenasen aus der Familie der Cytochrom- P_{450} -Enzyme, welche die Hydroxylierung von diversen Xenobiotika katalysieren und im Rahmen der Biotransformation zur Entgiftung beitragen [1].

Durch diese Vielzahl an Funktionen ist die Aufrechterhaltung der Integrität des ER für die Zelle von zentraler Bedeutung.

1.2. ER Stress

Die Kapazität des ER, Proteine zu falten, kann sich durch Akkumulation ungefalteter Proteine erschöpfen. Auch Punktmutationen in Aminosäuresequenzen können dazu beitragen, dass intermediäre Faltstrukturen stabilisiert werden, Proteine aggregieren und die Last an fehl- bzw. ungefalteten Proteinen erhöhen. Es entsteht ER Stress, der die Integrität des ER beeinträchtigt und somit der zellulären Funktion schadet. Dies geschieht auch, wenn die Abläufe der Proteinfaltung durch Änderungen im umgebenen Mikromilieu gestört werden. Die Homöostase des ER kann beispielsweise durch Nährstoffmangel, Hypoxie, einen veränderten Redox-Status oder veränderte luminalen bzw. zytoplasmatische Ca^{2+} -Ionenkonzentrationen kompromittiert werden [5].

Als zelluläre Antwort wird ein komplexes Programm gestartet, die sogenannte unfolded protein response (UPR). Diese hier beteiligten Signalkaskaden zielen darauf ab, die Homöostase wiederherzustellen, u.a. durch die transiente Inhibition der Proteinsynthese bei gleichzeitiger Induktion der Chaperon-Genexpression. Die Kapazitäten zur Proteinfaltung werden erhöht und durch Induktion des ERAD-Systems die Proteasom-abhängige Degradation von Proteinen stimuliert. Gelingt es nicht, die Last an fehlgefalteten Proteinen zu reduzieren, werden zell-destruktive Signalwege aktiviert [7].

Die miteinander koordinierten Signalkaskaden werden durch die transmembranären Sensorproteine inositol requiring enzyme 1 (IRE-1), double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like ER kinase (PERK) und activating transcription factor 6 (ATF-6) vermittelt. Diese Proteine enthalten jeweils eine in das ER Lumen gerichtete Domäne, eine zytoplasmatische Domäne sowie eine Domäne, die die ER Membran durchzieht [8].

Durch die Bindung an BiP (Abkürzung für engl. binding immunoglobulin protein) im Bereich der luminalen Domäne verbleiben diese transmembranären Proteine in einem inaktiven Zustand. BiP, auch glucose regulated protein 78 (GRP-78) genannt, gehört zur Gruppe der Chaperone. Chaperone binden an die naszierende Polypeptidkette, verhindern eine initiale Fehlfaltung durch Aggregation und erleichtern die nachfolgende Faltung bis zum Erreichen der Zielkonformation [1, 8].

Zellmembran

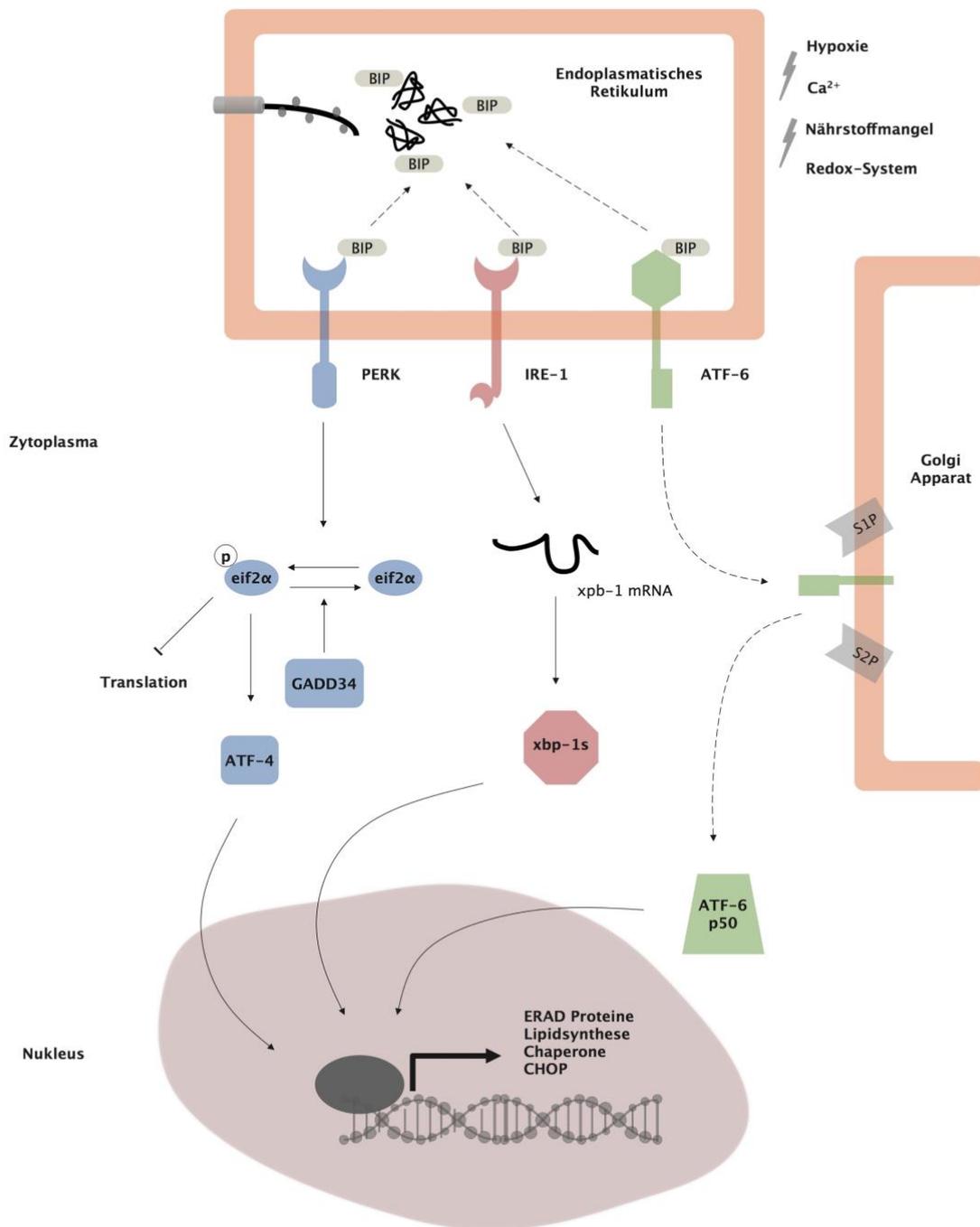


Abbildung 1: Schematische Darstellung der UPR Signalkaskaden. Fehlgefaltete Proteine akkumulieren im Lumen des endoplasmatischen Retikulums. Wichtige Einflussgrößen auf die Proteinfaltungskapazität sind Alterationen des Redox-Systems, Nährstoffmangel, Hypoxie und veränderte Ca^{2+} -Ionen-Konzentrationen. Das Chaperon BiP dissoziiert von der endoluminalen Domäne der drei transmembranären Sensorproteine PERK, IRE-1 sowie ATF-6 und bindet fehlgefaltete Proteine. Hierdurch werden die drei Sensorproteine in einen aktiven Zustand überführt. Nach Autophosphorylierung und Dimerisierung phosphoryliert PERK den Translationsfaktor $\text{eIF2}\alpha$, wodurch die globale Proteinsynthese inhibiert wird. Selektiv führt $\text{p-eIF2}\alpha$ zur Translation von ATF-4, welches neben UPR-assoziierten Transkriptionsfaktoren und Chaperonen, wie BiP, auch die Expression der Phosphatase GADD34 induziert. GADD34 dephosphoryliert $\text{eIF2}\alpha$. Somit wird die globale Proteinsynthese wieder

gestartet. Dissoziiert BiP von der endoluminalen Domäne, wird nach Dimerisierung und Autophosphorylierung die Ribonuklease-Funktion von IRE-1 allosterisch aktiviert. In einem IRE-1-vermittelten Spleißvorgang entsteht der Transkriptionsfaktor XBP-1^s, der die Expression von Chaperonen sowie von Proteinen des ERAD-Systems und der Lipidsynthese induziert. Nach Aktivierung transloziert ATF-6 in den Golgi-Apparat und wird durch die Proteasen S1P und S2P weiter prozessiert. Als Folge dieser regulierten intramembranen Proteolyse resultiert die Freisetzung der N-terminalen zytosolischen Domäne (ATF-6f). Diese fungiert als Transkriptionsfaktor und induziert unter anderem die Expression von BiP, CHOP und XBP-1 [5, 7, 8].

Steigt endoluminal die Konzentration fehlgefalteter Proteine an, dissoziiert BiP von den luminalen Domänen der Sensorproteine und unterstützt die Proteinfaltung. Der Wegfall der Bindung an BiP überführt IRE-1, ATF-6 und PERK in einen aktiven Status [8]. BiP nimmt daher sowohl in der Erkennung des ER Stress-Signals als auch in der Regulierung der UPR eine Schlüsselrolle ein [9].

In den folgenden Abschnitten werden die drei zentralen Arme der Signalkaskaden der UPR näher charakterisiert.

1.2.1. IRE-1

IRE-1 verfügt als bifunktionales Enzym sowohl über eine Serin/Threonin-Kinase-Funktion als auch eine Endoribonuklease-Aktivität. Ist BiP von der luminalen Domäne dissoziiert, oligomerisiert IRE-1, wodurch eine *trans*-Autophosphorylierung der Kinase-Domäne initiiert und anschließend die Ribonuklease-Funktion allosterisch aktiviert wird [8].

IRE-1 spaltet im Rahmen eines unkonventionellen Spleißvorganges als einziges spezifisches Substrat eine messenger ribonucleic acid (mRNA), die für einen UPR-assoziierten Transkriptionsfaktor codiert, das so genannte X-box binding protein 1 (XBP-1). Die Vorläufer-mRNA wird an zwei Positionen geschnitten und ein Intron exzidiert. Nach Ligierung der 5'- und 3'-Fragmente wird der gespleißte Transkriptionsfaktor XBP-1 (XBP-1^s) translatiert [10]. XBP-1^s transloziert in den Nukleus. Die Bindung an ER Stress response element I und II (ERSE) in der Promotorregion der Zielgene induziert die Transkription von Chaperonen, von Komponenten der Lipidsynthese sowie des ERAD-Systems, wie beispielsweise EDEM-1 [11, 12]. Zu den weiteren Zielgenen gehören Proteine der ER-localized DnaJ (ERdj)-Familie, die als

Ko-Chaperone der ER-Maschinerie mit BiP interagieren und zur Proteinfaltung wie auch zur Proteindegradation beitragen können [10, 13].

Die Ribonuklease-Funktion von IRE-1 vermittelt auch den Abbau der 28S-ribosomalen Untereinheit. Weiterhin korreliert die Aktivität der Ribonuklease mit dem Ausmaß und der Dauer des ER Stress-Signals. In Abhängigkeit von der Signalstärke der UPR-Antwort nimmt die Oligomerisierung und Autophosphorylierung zu und IRE-1 degradiert vermehrt ER-membranständige mRNA. Hierbei reduziert IRE-1 die zelluläre Proteinlast und die ER Stress-Intensität über eine Drosselung der Proteinbiosynthese. Dieser Vorgang wird regulated IRE-1-dependent decay of mRNAs (RIDD) genannt. Das RIDD-System ist in Zellen konstitutiv aktiv und trägt zur Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung der Homöostase bei. Mit steigendem ER Stress nimmt die RIDD-Aktivität zu, sodass auch mRNA degradiert werden kann, die beispielsweise für zytoprotektive Proteine codiert. Demnach kann das RIDD-System abhängig vom Ausmaß des ER Stress-Signals der Zelle einen Überlebensvorteil bieten oder zelldestruktiv wirken [14].

Neben dem *competition binding*-Modell, in dem IRE-1 und luminale, fehlgefaltete Proteine um eine Bindung mit BiP konkurrieren, wird eine weitere Theorie postuliert, nach der eine direkte Aktivierung des IRE-1 Signalweges durch fehlgefaltete Peptide als Liganden erfolgt. Durch die Darstellung der Kristallstruktur der luminalen Domäne zeigte sich eine Peptid-bindende Einkerbung ähnlich der von Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes, Klasse 1 (engl. major histocompatibility complex I, MHC I). Hieran können sich fehlgefaltete Peptide binden, eine Dimerisierung induzieren und IRE-1 aktivieren [15].

1.2.2. PERK

Eine der primären Effekte der ER Stress-Antwort in Säugetierzellen ist die transiente Hemmung der globalen Proteintranslation. Dieser Effekt wird durch den PERK-Signalweg vermittelt. In Analogie zur Aktivierung von IRE-1 bindet BiP unter homöostatischen Bedingungen an PERK. Aufgrund der Akkumulation fehlgefalteter Proteine dissoziiert BiP von der luminalen Domäne und initiiert die Autophosphorylierung und Dimerisierung von PERK.

Im Gegensatz zu IRE-1, deren Kinaseaktivität auf die Autophosphorylierung beschränkt ist, phosphoryliert PERK nach Aktivierung die α -Untereinheit des eukaryotic initiation factor 2 (eIF2 α) an der Aminosäure Serin 51 [10]. Im phosphorylierten Zustand kann eIF2 α (p-eIF2 α) nicht in seine aktive Form übergehen und die Translation effektiv beginnen, sodass die globale Proteinsynthese inhibiert wird.

Nach Phosphorylierung von eIF2 α wird bevorzugt die Translation von mRNA gestartet, die in ihrem 5'-untranslatiertem Bereich einen offenen Leserahmen (engl. open reading frame, ORF) enthält. Hierzu zählt unter anderem der Transkriptionsfaktor activating transcription factor 4 (ATF-4). ATF-4 wiederum initiiert die Expression von Genen, die für Chaperone, beispielsweise BiP, oder UPR-assoziierte Transkriptionsfaktoren, wie XBP-1, codieren [15]. Zusätzlich induziert ATF-4 die Expression der Phosphatase growth arrest and DNA damage-inducible gene 34 (GADD34). GADD34 bildet einen Komplex mit der Serin/Threonin-Protein Phosphatase 1 (PP1). Das Holoenzym GADD34:PP1 dephosphoryliert eIF2 α , wodurch die globale Proteinsynthese wieder gestartet wird [7, 16].

Die Dephosphorylierung von eIF2 α wird in Säugetierzellen von zwei Phosphatasen kontrolliert. Die Phosphatase constitutive repressor of eIF2 α phosphorylation (CReP) wird konstitutiv exprimiert und bildet ebenso mit PP1 ein Holoenzym. Dieser Komplex trägt zur Dephosphorylierung von eIF2 α bei und gewährleistet unter homöostatischen Bedingungen eine kontinuierliche Proteinsynthese. Als Ausdruck einer ER Stress-vermittelten zellulären Antwort wird GADD34 erst nach Phosphorylierung von eIF2 α induziert und dephosphoryliert eIF2 α im Sinne einer negativen Rückkopplungsschleife [10]. Persistiert das ER Stress-Signal, trotz kompensatorischer Mechanismen, wird als weiteres Zielgen von ATF-4 der Transkriptionsfaktor C/EBP homologous protein (CHOP) induziert, der eine Vielzahl an Apoptose-assoziierten Genen auf Transkriptionsebene reguliert [8].

1.2.3. ATF-6

In Säugetierzellen kommen zwei verschiedene Isoformen von ATF-6 vor: ATF-6 α und ATF-6 β . Der Aktivierung von PERK und IRE-1 entsprechend löst auch die Dissoziation von BiP eine Initiierung des Signalweges aus. Das in der ER Membran verankerte ATF-6 beherbergt in der

zytosolischen Domäne einen Transkriptionsfaktor, der zur Familie der basic leucine zipper (bZIP) gehört. Die Freisetzung bzw. Aktivierung dieses Vorläufermoleküls geschieht im Rahmen der regulierten intramembranen Proteolyse (RIP), die eine Translokation in den Golgi-Apparat zur weiteren proteolytischen Prozessierung umfasst.

Nach Aktivierung gelangt ATF-6 über coat protein II (COP II)-Transportvesikel in das Kompartiment des Golgi-Apparates [17]. Hier wird das 90-kDa große Protein ATF-6 durch zwei Enzyme, die site-1 Protease (S1P) und die site-2 Protease (S2P), weiter prozessiert und in ein 50-kDa großes Protein konvertiert. Die luminaire Domäne sowie der transmembranäre Anker werden hierbei entfernt und die N-terminale zytosolische Domäne (ATF-6f) freigesetzt [8, 18]. Durch diese Prozessierung wird ATF-6f zu einem löslichen nukleären Transkriptionsfaktor, der in den Nukleus transloziert. Hier bindet ATF-6f an die C-Untereinheit des Transkriptionsfaktors nuclear transcription factor Y (NF-Y). Zusammen binden sie innerhalb der ERSE an unterschiedliche Regionen. Hierdurch werden unter anderem BiP, CHOP und XBP-1 exprimiert [19]. ATF-6f-Zielgene codieren zusätzlich für eine Vielzahl an weiteren ER residenten Chaperonen [7]. Zusammen mit XBP-1^s werden Gene induziert, die die Faltungskapazität des ER erhöhen und auch zur räumlichen Expansion des ER beitragen [5].

1.3. ER Stress und Zelltod

Die Signalkaskaden der UPR können die Last fehlgefalteter Proteine reduzieren und ermöglichen der Zelle die Adaptation an ER Stress auslösende intra- oder extrazelluläre Bedingungen. Zu den Mechanismen zählen – wie oben aufgeführt – die selektive Synthese von Komponenten, die die Proteinfaltungskapazität erhöhen und eine räumliche Expansion des ER vermitteln. Des Weiteren tragen die transiente Translationshemmung, der gesteigerte Abbau fehlgefalteter Proteine durch das ERAD-System sowie der RIDD-vermittelte Abbau ER-membranständiger mRNA zur Reduktion der Proteinlast bei. Somit kann die ER Stress-Antwort der Zelle Strategien bieten, die auf ein Überleben abzielen. Wenn diese Maßnahmen nicht zu einer Minderung der ER Stress-Intensität führen und die Zell-Homöostase nicht wiederhergestellt werden kann, kommt es zur Aktivierung von Signalpfaden, die den Zelltod auslösen [17].

Ein Beispiel ergibt sich aus der Regulation der Proteostase durch die Phosphorylierung von eIF2 α . Über einen kurzen Zeitraum bietet die Beschränkung der Translation einen zellulären Überlebensvorteil. Jedoch ist eine fortwährende (selektive) Inhibition der Proteinbiosynthese unter andauerndem ER Stress nicht mit dem Überleben der Zelle vereinbar [20].

Chronischer ER Stress führt zur Induktion sogenannter terminaler UPR-Pfade. Über die UPR-Signal-Achse PERK-ATF-4 wird der Transkriptionsfaktor CHOP exprimiert. CHOP induziert wiederum die Expression der Phosphatase GADD34, wodurch nach Dephosphorylierung von eIF2 α die Proteinsynthese wiederhergestellt wird. Dies führt unter chronischen ER Stress-Bedingungen zu einer weiteren Akkumulation fehlgefalteter Proteine, vermehrter Proteotoxizität und zum Zelltod [21].

Zusätzlich greift CHOP in die Regulation der Apoptose ein, dem programmierten Zelltod, indem es die Expression des anti-apoptischen Proteines B cell lymphoma 2 (BCL-2) inhibiert und über die Induktion der Expression von BCL-2-interacting mediator of cell death (BIM) die mitochondriale Apoptose stimuliert [5, 22]. Weiterhin induziert CHOP die Expression des Proteins death receptor 5 (DR-5), welches über die Caspase-8 Apoptose induziert. Die intrazelluläre Regulation von DR-5 beinhaltet auch eine Form der ER Stress-Signal-Integration, da die Expression von DR-5 über die Achse PERK-CHOP vermittelt wird und gleichzeitig ihre mRNA einem RIDD-vermittelten Abbau unterliegt. Dies könnte der Zelle temporär die Möglichkeit zur Adaptation erbringen, bis eine durch CHOP vermittelte Akkumulation von DR-5 die Apoptose einleitet [23, 24].

Der Signalweg der mitochondrialen Apoptose wird durch die Freisetzung von mitochondrialen Proteinen, wie beispielsweise Cytochrom C oder second mitochondria-derived activator of caspase (Smac)/Diablo, in das Zytoplasma ausgelöst. Hierdurch werden Effektor-Caspasen, wie Caspase-3, aktiviert [25]. Dieser Signalweg und insbesondere die Integrität der äußeren mitochondrialen Membran werden durch pro- und anti-apoptische Proteine der BCL-2-Familie reguliert [26]. Tritt ein irreparabler Zellschaden auf, werden auf Ebene der Transkription oder über posttranslationale Modifikationen Proteine aus der Gruppe der BCL-2-homology 3 (BH3)-only proteins rekrutiert, die zellprotektive Proteine, wie BCL-2 neutralisieren und pro-apoptische Proteine, wie BCL-2-associated X protein (BAX) und

BH antagonist or killer (BAK) aktivieren. BAX und BAK erhöhen die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran, schädigen die Membranintegrität und verursachen damit die Freisetzung mitochondrialer Proteine [20, 27]. Die terminalen ER Stress-Signalwege sind mit der Aktivierung von mindestens vier Proteinen der Subklasse pro-apoptotischer BH3-only Proteinen assoziiert. Hierzu zählen BIM, p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA), NOXA und BH3-interacting domain death agonist (BID) [28, 29].

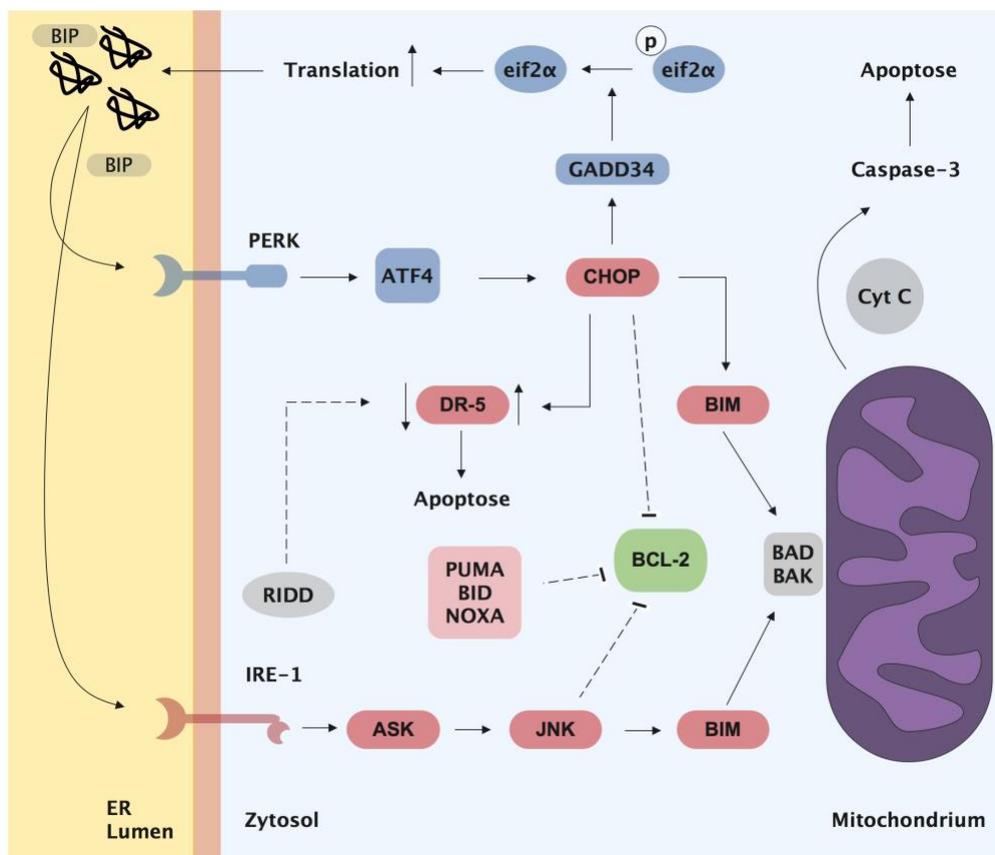


Abbildung 2: ER Stress und Zelltod. Über die Signal-Achse PERK-ATF-4 wird die Expression des Transkriptionsfaktors CHOP induziert. CHOP führt zur Expression der Phosphatase GADD34, welche über die Dephosphorylierung von eIF2 α die globale Proteinsynthese wiederherstellt. Die weitere Akkumulation fehlgefalteter Proteine prolongiert ER Stress-Signale, führt zu vermehrter Proteotoxizität und zum Zelltod. Als zentraler Interaktionspartner inhibiert CHOP das anti-apoptotische Protein BCL-2 und stimuliert über die Induktion der Expression des pro-apoptotischen Proteins BIM die mitochondriale Apoptose. Weiterhin induziert CHOP das pro-apoptotische Protein DR-5, welches über die Caspase-8 Apoptose stimuliert. Die für DR-5 codierende mRNA unterliegt wiederum einem RIDD-vermittelten Abbau, wodurch eine zelluläre Adaptation ermöglicht wird. Akkumuliert jedoch CHOP unter prolongierten ER Stress-Bedingungen, erhöht sich die Konzentration an DR-5 und wirkt pro-apoptotisch. Unter chronischem ER Stress induziert IRE-1 über das Protein ASK die Expression der Kinase JNK. JNK bewirkt über Phosphorylierung eine Inhibition von BCL-2 und eine Aktivierung von BIM. Weiterhin aktivieren die terminalen ER Stress-Signalwege die pro-apoptotischen Proteine PUMA, BID und NOXA, die BCL-2 hemmen und über eine BAD/BAK-vermittelte Permeabilisierung der

mitochondrialen Membran, die Membranintegrität schädigen. Die Freisetzung mitochondrialer Proteine wie Cytochrom C aktiviert Effektor-Caspasen, wie bspw. Caspase 3 und führt zur Apoptose [23, 24, 28, 30].

Gelingt die Wiederherstellung der Homöostase unter einem prolongierten ER Stress-Signal nicht, induziert IRE-1 über das Protein apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK-1) die nachgelagerte Expression der Kinase c-JUN NH₂-terminal kinase (JNK) [20, 31]. Zum einen ist JNK befähigt, pro-apoptische Gene zu transaktivieren, zum anderen wirkt JNK direkt über die Modulation pro-apoptischer Proteine auf die mitochondriale Apoptosepfade ein [32]. Die Phosphorylierung durch die Kinase JNK aktiviert beispielsweise BIM und inhibiert BCL-2 [28].

ER Stress-assoziiertes Zelltod wird somit sowohl über die UPR-immanenten Mechanismen als auch über die Verbindungen zu den intrinsischen und extrinsischen Apoptose-Wegen vermittelt.

1.4. Die Rolle von ER Stress in der Pathogenese von Erkrankungen

Chronischer ER Stress ist mit einer Vielzahl an Erkrankungen assoziiert und kann maßgeblich zu deren Pathophysiologie beitragen. Zu den assoziierten Erkrankungen zählen u.a. neurodegenerative Erkrankungen, virale Infektionen, Diabetes mellitus, inflammatorische Syndrome, Apoplex, Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems und Tumorerkrankungen. Die Schnittmenge dieser heterogenen Entitäten sind intra- oder extrazelluläre Änderungen des Zellmilieus, welche die Proteinfaltung beeinträchtigen und zur Anhäufung von fehlgefalteten Proteinen führen [5].

Im folgenden Abschnitt wird die Pathophysiologie der ER Stress-Antwort in Krebserkrankungen sowie in nicht-alkoholischen Fettlebererkrankungen näher erörtert.

1.4.1. ER Stress in der Pathophysiologie von Krebserkrankungen

Das zelluläre Tumormilieu ist durch ungünstige Umgebungsbedingungen gekennzeichnet, in denen Tumorzellen oft oxidativem Stress, Hypoxie, Glukosedepriktion, Laktatazidose und

einem Mangel an Aminosäuren ausgesetzt sind. Diese extrinsischen Faktoren führen zu Dysfunktionen des ER, der Proteinfaltung und zu einem erhöhten ER Stress-Level in Tumorzellen. Des Weiteren können intrinsische Faktoren, beispielsweise durch die Induktion von Onkogenen oder eine gesteigerte sekretorische Aktivität, wie in Plasmazellen beim Multiplen Myelom, die Proteinbiosynthese steigern und die Last an fehlgefalteten Proteinen erhöhen. Auch Störungen des Redox-Systems, eine erhöhte Mutationsrate oder genomische Instabilität tragen zur Störung der Proteostase bei [33, 34].

Untersuchungen haben hohe Aktivitäten an allen drei Armen der UPR Signalwege in einer Vielzahl von Tumorerkrankungen gezeigt. Hierunter zählen u.a. Magen- und Speiseröhrenkarzinome, Lebertumore, das Multiple Myelom und Mammakarzinome [5].

Die Überexpression des ER Faltungsapparates, insbesondere des Chaperones BiP, geht mit dem Ausmaß an Tumorprogression einher. In einer Untersuchung korrelierte eine höhere histologische Graduierung des hepatozellulären Karzinoms (HCC) mit der mRNA-Überexpression von BiP und p50-ATF-6 [35].

Es gibt Hinweise, dass ER Stress das Tumorwachstum fördert. Eine bedeutende Rolle spielt hierbei der PERK-Signalweg. Eine Untersuchung zeigte ein reduziertes Tumorwachstum und eine verminderte Angiogenese durch K-RAS-transformierte PERK-defiziente Mauszellen (MEFs, mouse embryonic fibroblasts) im Vergleich zu Zellen mit einer intakten UPR-Signalantwort [36].

Die Aktivierung von XBP-1 führt zur Tumorprogression von triple-negativem Brustkrebs und geht mit einem geringeren Gesamtüberleben betroffener Patienten einher [37]. Des Weiteren korreliert die Expression von XBP-1^s auch mit einer schlechten Prognose in Glioblastomen und prä-B akuter lymphoblastischer Leukämie [38, 39].

Die UPR Komponenten BiP und PERK sind auch mit einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika assoziiert. *In vitro*-Untersuchungen zeigten, dass eine p38-abhängige Aktivierung von PERK und Expression von BiP schlafende Tumorzellen über die Inhibierung von BAX vor einer Zytostatika-induzierten Apoptose schützen [40].

Die UPR-Signalkaskaden ermöglichen daher Tumorzellen eine Anpassung an das Tumormikromilieu und fördern tumorogene Eigenschaften, wie Zellüberleben und Proliferation [41].

1.4.2. ER Stress-Induktion durch Glukosedepriuation

Ein Mangel an Nährstoffen, insbesondere die Glukosedepriuation, ist ein Phänomen, das häufig in malignen Zellen auftritt. Begründet ist es einem inadäquaten Verhältnis zwischen der oft eingeschränkten Gefäßversorgung des Tumors und dem hohen Verbrauch an Nährstoffen, die sich aus dem raschen Tumorwachstum und der ineffizienten Glukoseutilisation ergibt [42, 43]. Blutgefäße in Krebszellen unterliegen nicht der physiologischen Angiogenese, sind undicht, chaotisch strukturiert und verfügen über einen nicht-laminaren Blutfluss [42]. Die maligne Transformation geht einher mit einer erhöhten zellulären Glukoseaufnahme und einer akzelerierten, aeroben Glykolyse (Warburg-Effekt), die zu einer raschen Depletion der Glukosespeicher führen kann [44, 45].

Bei Glukosemangel steht Glukose als Baustein für den Hexosamin-Biosyntheseweg und die Synthese des Hauptprodukts, UDP-GlcNAc, nicht zur Verfügung. UDP-GlcNAc ist die Grundlage für posttranslationale Modifikationen von Proteinen im Rahmen der N- bzw. O-Glykolisierung. Die Glukosedepletion führt demnach zu Einschränkungen der Glykoprotein-Synthese und die Akkumulation nicht korrekt glykolisierter Proteine induziert ER Stress [46-48].

Der Mangel an Glukose aktiviert u.a. die UPR-Signalkaskade PERK und führt zur Phosphorylierung von eIF2 α sowie zur Induktion von ATF-4, CHOP und BIP [49]. Zusätzlich induziert Glukosedepriuation über IRE-1 einen JNK-vermittelten Zelltod [46].

1.4.3. Die Rolle von ER Stress in nicht-alkoholischen Fettlebererkrankungen

Nicht-alkoholische Fettlebererkrankungen (engl. non-alcoholic fatty liver diseases, NAFLD) sind der führende Grund für chronische Lebererkrankungen in der westlichen Welt. Die globale Prävalenz der NAFLD wird auf ca. 24% geschätzt [50]. Steigende Zahlen an Patienten,

die unter Adipositas und Insulinresistenz leiden, werden als Hauptgründe für die Zunahme von NAFLD angesehen. Es wird geschätzt, dass ca. 20-30 % der NAFLD in eine nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) übergehen. Eine NASH wiederum bietet die Grundlage für die Entwicklung einer Leberzirrhose, auf deren Boden ein HCC entstehen kann [51].

Als molekulare Grundlage der Progression einer NAFLD zu einer NASH wird eine „two-hit-Hypothese“ postuliert. Die erste Schädigung („first hit“) der Leber erfolgt durch die Akkumulation von Lipiden, die die Hepatozyten gegenüber weiteren Schädigungen empfindlicher macht. Zu den weiteren Schädigungen („second hit“) gehören eine Vielzahl von Ereignissen, wie oxidativer Stress und eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems, die eine Überproduktion pro-inflammatorischer Zytokine beinhaltet [52, 53]. Zu den weiteren schädigenden Ereignissen zählen auch eine mitochondriale Dysfunktion und die Anreicherung reaktiver Sauerstoffspezies [51]. Weiterhin trägt auch die Integration diverser ER Stress-Signale und die Transduktion von UPR-Signalwegen in Leberzellen bedeutend zu den pathophysiologischen Schädigungen („hits“) bei.

Komponenten der UPR-Kaskaden sind unmittelbar in den Metabolismus von Makronährstoffen integriert, beispielsweise XBP-1, der ein Regulator der Lipidsynthese in der Leber ist [54]. Während der Nahrungsaufnahme steigt im Vergleich zu Fastenzeiten in Mausversuchen die mRNA-Expression von BiP und XBP-1 an. In transgenen Mausmodellen führte die forcierte Überexpression der Phosphatase GADD34 über die fortwährende Dephosphorylierung von eIF2 α zur einer Verbesserung der Glukosetoleranz und Minderung einer Hepatosteatois [55]. Ein weiteres Beispiel liegt in der Modulation der Immunantwort, die über eine IRE-1-vermittelte Aktivierung von JNK sowie des NF- κ B-Signalweges erfolgt [53]. Die Akkumulation von langkettigen, gesättigten Fettsäuren kennzeichnet Adipositas sowie NAFLD. Diese Fettsäuren aktivieren in Hepatozyten UPR-Signalkaskaden und eine über JNK-vermittelte Apoptose, die sogenannte Lipapoptose [52, 56].

Im folgenden Abschnitt wird die Wirkung von Palmitat, welches im Rahmen der NAFLD in Leberzellen akkumuliert, auf das ER erläutert.

1.4.4. ER Stress-Induktion durch Palmitat

Zu den gesättigten Fettsäuren, die einen großen Bestandteil der Nahrung des westlichen Lebensstils darstellen, gehört die Palmitinsäure bzw. ihr Salz, das Palmitat. Die gesteigerte Aufnahme von Palmitat ist mit NAFLD, dem metabolischen Syndrom sowie kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert [52].

Ein Überschuss an Palmitat induziert reaktive Sauerstoffspezies im Zytosol (engl. reactive oxygen species, ROS) und stört das intrazelluläre Redox-Gleichgewicht. Oxidativer Stress schränkt die Proteinfaltungskapazität des ER ein und führt zu ER Stress. Weiterhin kann Palmitat die Ca^{2+} -Ionen-Speicher des ER depletieren, wodurch die Funktion von Chaperonen kompromittiert wird und wiederum zur ER Stress-Antwort beiträgt [57]. Palmitat wird unter anderem zu Lysophosphatidylcholin (LPC) und zu Diacylglycerol (DAG) metabolisiert. Gesättigte DAG und LPC akkumulieren im ER, wodurch sich die Struktur der ER Membran ändert. Die Alterationen der ER Membran aktivieren die transmembranären Proteine PERK und IRE-1 und induzieren ihre nachgeschalteten Signalkaskaden [58-60].

Die palmitat-induzierte Aktivierung der UPR-Signalkaskaden basiert daher auf zwei unterschiedlichen Funktionsweisen. Einerseits kann die Störung der ER Homöostase, vermittelt durch ROS oder Depletion der Ca^{2+} -Ionen-Speicher, direkt durch die Sensorproteine IRE-1, PERK und ATF-6 detektiert werden und die kanonischen UPR-Kaskaden aktivieren. Andererseits löst die veränderte Komposition der Lipiddoppelschicht der ER-Membran die Induktion der transmembranären Aktivatorproteine aus, ohne dass ein luminales Signal, wie beispielsweise ein Anstieg an ungefalteten Proteinen, vorliegt. Daher kann eine veränderte Lipidzusammensetzung der ER Membran, unabhängig von den Bedingungen innerhalb des ER, zu einer ER Stress-Antwort führen. Diese Form der palmitat-vermittelten ER Stress-Induktion wird auch lipotoxic oder lipid bilayer ER Stress genannt [61, 62].

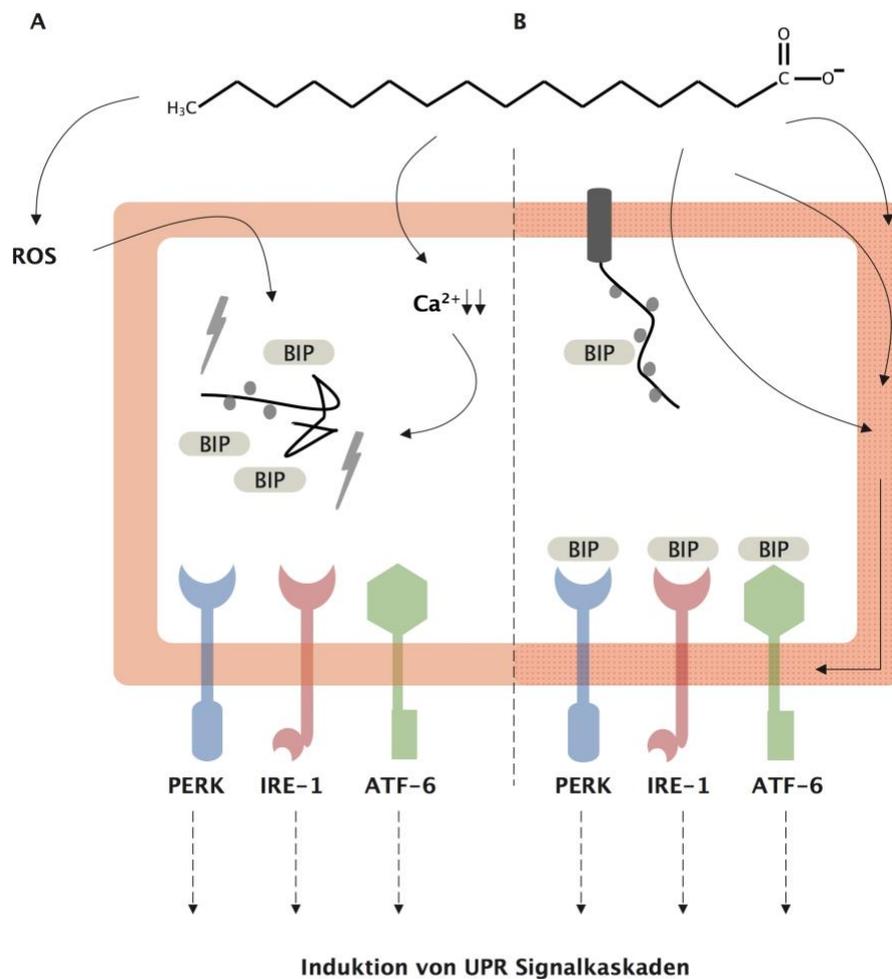


Abbildung 3: ER Stress-Induktion durch Palmitat. **A** Durch die Induktion von ROS im Zytosol stört Palmitat das intrazelluläre Redox-Gleichgewicht. Unter oxidativem Stress wird die Proteinfaltungskapazität des ER eingeschränkt und es entsteht ER Stress. Zudem bewirkt Palmitat eine Depletion der Ca^{2+} -Ionen-Speicher des ER. Hierdurch wird die Funktion von Chaperonen kompromittiert. Fehlgfaltete Proteine akkumulieren und BiP dissoziiert zur Unterstützung der Proteinfaltung von den Sensorproteinen PERK, IRE-1 und ATF-6, wodurch diese in einen aktiven Zustand überführt werden. **B** Metabolite von Palmitat reichern sich in der Membran des ER an und verändern die Komposition der Lipiddoppelschicht. Alterationen der ER Membran können ohne Vorliegen eines endoluminalen Signals die transmembranären Aktivatorproteine induzieren und die nachgeschalteten UPR Signalkaskaden aktivieren. Diese Form der ER Stress Induktion wird „lipid bilayer ER Stress“ genannt [57, 59, 62].

1.5. Pharmaka-basierte ER Stress-Induktion

Neben den beschriebenen (patho-) physiologischen Konditionen, die eine ER Stress-Antwort erzeugen, existieren Pharmaka, die *in vitro* und *in vivo* UPR-Signalwege induzieren, um experimentell ER Stress zu simulieren. Im Folgenden werden die Wirkmechanismen der

klassischen chemischen ER Stress-Induktoren Thapsigargin, Tunicamycin und MG312 dargestellt.

Thapsigargin inhibiert nicht-kompetitiv die SERCA und unterbricht hierbei den aktiven Transport von Ca^{2+} -Ionen aus dem Zytosol in das Lumen des ER [63]. Der Mechanismus beinhaltet die Bindung von Thapsigargin an die SERCA, die eine Konformationsänderung unterbindet und dabei die ATPase-Funktion hemmt. Die luminal Konzentration an Ca^{2+} -Ionen sinkt und führt hierdurch zu Dysfunktionen von Chaperonen und der Prozessierung von Glykoproteinen. Als Folge häufen sich fehlgefaltete Proteine an, es entsteht ER Stress und die Signalwege der UPR werden aktiviert [64].

Tunicamycin ist ein Strukturanalogon von Uridindiphosphat N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) und gehört in die Gruppe der nukleosidischen Antibiotika. Es ist keine Einzelsubstanz, sondern ein homologes Gemisch. Im ER ist UDP-GlcNAc für die N-Glykolisierung wichtig und dient damit der Reifung von sekretorischen Proteinen und Transmembranproteinen. Im ersten Schritt der N-Glykolisierung wird UDP-GlcNAc auf Dolichylphosphat transferiert. Dieser Transfer wird durch Tunicamycin nicht-kompetitiv gehemmt [65]. Die fehlende Proteinreifung bewirkt, dass die Proteine im ER verbleiben, hier akkumulieren und ER Stress auslösen [66].

Inhibitoren des Proteasoms können über die Akkumulation fehlgefalteter Proteine ER Stress induzieren. MG132 gehört als potenter Vertreter zur Gruppe der Proteasom-Inhibitoren. Terminal fehlgefaltete Proteine werden über das ERAD-System aus dem ER in das Zytosol retro-transloziert und über Ubiquitinierung dem 26S-Proteasom-vermittelten Abbau zugeführt. Als Inhibitor des Proteasoms verhindert MG132 diesen Abbau [67]. Unreife und fehlgefaltete Proteine akkumulieren und in der Folge entsteht ER Stress [68].

1.6. Transmission des ER Stress-Signals

Die Induktion von ER Stress und die Regulation der UPR-Signalkaskaden sind durch intrinsische und extrinsische Faktoren bestimmt. In der Literatur häufen sich Hinweise, dass nicht autonome Regulationsmechanismen über eine Modulation des Tumormikromilieus zur ER Stress-Induktion beitragen [41]. Die im folgenden Abschnitt vorgestellten Arbeiten sind für die der Arbeit zugrundeliegenden Hypothesen von großer Bedeutung.

Das Phänomen des übertragbaren ER Stress-Signals (engl. transmission of ER Stress, TERS) wurde von Mahadenvan et al. 2011 erstmalig beschrieben [69]. In einem *in vitro*-Modell wurden Zellkulturüberstände von zuvor mit Thapsigargin behandelten Tumorzellen auf Makrophagen übertragen. Die Behandlung mit den hierbei generierten Kulturüberständen löste in den rezipierenden Zellen eine ER Stress-Antwort aus, die durch eine Induktion von BiP, XBP-1^s, GADD34 sowie CHOP gekennzeichnet war und dem Stress-Profil der spendenden Tumorzelllinie glich. Als weiteren Effekt der Signalübertragung sezernierten die Makrophagen die pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin 6 (IL-6) und die Untereinheit IL-23p19 von IL-23. Die Autoren entwerfen das Konzept eines über UPR-Signalfade manipulierten Tumormikromilieus, welches von Tumorzellen kontrolliert wird und durch die Einflussnahme auf das sekretorische Profil myeloischer Zellen pro-tumorigen wirkt [69].

Weitere Arbeiten von Rodvold et al. zeigten, dass das ER Stress-Signal von Tumorzellen auch auf homologe sowie heterologe Tumorzellen übertragbar ist und den Empfängerzellen eine Adaption an das Tumormikromilieu sowie eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika ermöglicht [70]. Die *in vitro*-Vorbehandlung von Tumorzellen mit durch Thapsigargin konditionierte Zellkulturüberstände (Konditionierte Medien Thapsigargin, CM TG) reduzierte sowohl eine durch Bortezomib als auch durch Paclitaxel induzierte Zelltoxizität [70]. Bortezomib (Velcade®) ist ein Proteasom-Inhibitor und wird in der Behandlung des Multiplen Myeloms eingesetzt [71]. Das Spindelgift Paclitaxel stabilisiert Tubulinpolymere und induziert Zelltod durch einen dysfunktionalen Mikrotubuli-Apparat [72]. Die mit CM TG vorbehandelten Tumorzellen wiesen eine IRE-1-abhängige Aktivierung des Wnt-Signalweges auf. Des Weiteren zeigten diese Tumorzellen eine reduzierte Expression von ATF-4 und CHOP. Zudem waren mit CM TG vorbehandelte MEFs gegenüber einer Behandlung mit Bortezomib, Paclitaxel oder

Nährstoff-Entzug resistenter in Bezug auf die Zellviabilität als ihre Kontrollgruppe. PERK-defiziente MEFs wiesen diese Resistenz nicht auf. Im Gegenteil führte die kombinierte Behandlung aus CM TG und dem Einsatz oben genannter Noxen zu einer deutlichen Reduktion der Zellviabilität PERK-defizienter MEFs im Vergleich zu Wildtyp-MEFs. Die Autoren schlussfolgerten hieraus eine entscheidende Rolle des PERK-Armes in der Rezeption der ER Stress-Transmission und der Vermittlung einer zytoprotektiven Adaptation der Tumorzellen an das umgebende Mikromilieu [70, 73].

Die Zellkulturüberstände von Tumorzellen, die einen Thapsigargin-induzierten ER Stress erfahren, können auch die Eigenschaften von dendritischen Zellen beeinflussen und möglicherweise eine tumor-induzierte T-Zell-vermittelte Immunsuppression herbeiführen. In *in vitro*-Untersuchungen war die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation gegenüber cluster of differentiation 8⁺- (CD8⁺)-T-Zellen durch murine antigen-präsentierende, dendritische Zellen nach Behandlung mit diesen Überständen eingeschränkt [74].

Versuche mit *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) unterstützen die Idee einer ER Stress-Transmission und deuten auf einen phylogenetisch konservierten, spezie-übergreifenden Charakter des transmissiblen Effektes hin. Taylor und Dillin et. al. zeigten in *C. elegans*-basierten Modellen ebenfalls, dass das ER Stress-Signal übertragbar ist und die nicht autonome Kontrolle der UPR Signalwege über den IRE-1-Arm vermittelt werden kann. In *C. elegans* geht die Aktivität von XBP-1^s altersabhängig verloren. Die Re-Induktion von XBP-1^s in neuronalen Zellen aktivierte Signalkaskaden der UPR in distal gelegenen Zellen des Darmes. Somit scheint in diesem Modell eine Transmission des ER Stress-Signals möglich, die sogar mehrere Zellverbände übergreift. Bemerkenswert ist, dass die Signalübertragung von Neuronen auf Darmzellen nur in eine Richtung gelang. Der Phänotyp der Empfängerzellen war durch eine ER Stress-Resistenz und eine verlängerte Lebensspanne gekennzeichnet. In XBP-1^s-defizienten Empfängerzellen ließ sich dieser Phänotyp nicht darstellen [75].

Ein ähnliches Phänomen beobachteten Williams et al. anhand eines Mausmodells, in dem unter anderem die Auswirkungen von XBP-1^s in Proopiomelanocortin-produzierenden Neuronen (POMC-Neuronen) auf die Homöostase des Glukosemetabolismus untersucht wurden. Die ektope, konstitutive Überexpression von XBP-1^s in POMC-Neuronen führte zu

einer Aktivierung von XBP-1^s in murinen Leberzellen [76]. Das hierdurch ausgelöste Transkriptionsprogramm vermittelte sowohl die Expression von UPR-assoziierten Zielgenen, wie BiP, EDEM-1 und ERDJ-4, als auch eine reduzierte endogene Glukosefreisetzung, niedrigere Blutglukose-Spiegel und eine verbesserte Insulinsensitivität [76, 77].

Die zugrundeliegenden Mechanismen der Signalgenerierung und -übertragung sowie die biochemischen Eigenschaften eines postulierten Faktors bleiben jedoch zum gegenwärtigen Stand unklar.

1.7. Kupffer Zellen

Als ortsständige Makrophagen der Leber sind Kupffer Zellen in den Sinusoiden der Leberläppchen lokalisiert. Sie bilden eine heterogene Population und werden nach ihrem Erstbeschreiber Carl von Kupffer benannt. Ihr Anteil an der Gesamtmenge der nicht-parenchymalen Zellen der Leber beträgt ca. 20-35 % [78]. Sie repräsentieren ca. 80-90 % der Population an Gewebsmakrophagen [79].

Aus der zentralen Funktion von Kupffer Zellen, der Phagozytose von Zelldebris, Fremdbestandteilen und Bakterien aus dem zuströmenden arteriellen und portalen Blut, ergibt sich ihre Zugehörigkeit zum mononukleär-phagozytären System (MPS). Kupffer Zellen gehören zur angeborenen, zellvermittelten Immunabwehr des Menschen. Sie dienen der bakteriellen Abwehr und Elimination potentiell schädlicher Partikel. Als Antigen-präsentierende Zelle (engl. antigen-presenting cell, APC) sind Kupffer Zellen befähigt, eine Verbindung zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Teil der Immunabwehr herzustellen [79]. Wachstum und Differenzierung von Makrophagen werden durch verschiedene Zytokine, wie beispielsweise macrophage colony stimulating factor (M-CSF) oder granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) bestimmt [80]. Zytokine sind Peptide, die eine Signalübertragung zwischen Zellen vermitteln [1]. Kupffer Zellen können ihre funktionelle Aktivität an die Umgebung anpassen und reagieren unter anderem auf immunologische Einflüsse oder (Endo)-Toxine. Ein simplifiziertes Erklärungsschema bietet der M1-/M2-Aktivierungsstatus, der analog zu zirkulierenden Makrophagen den pro- oder antiinflammatorischen Phänotyp beschreibt. Durch eine Stimulierung mit den Zytokinen

Interferon γ (IFN- γ), Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und GM-CSF oder mit Lipopolysacchariden (LPS), Bestandteile der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, nehmen Kupffer-Zellen eine M1-Aktivierung ein. Hingegen induzieren die Zytokine IL-4, IL-13 oder IL-33 eine M2-Aktivierung [80, 81]. M1-polarisierte Kupffer Zellen produzieren proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-6, IL-12 und die induzierbare NO Synthase (iNOS). Anti-inflammatorische Mediatoren, wie IL-10, werden von M2-polarisierten Kupffer Zellen freigesetzt [82].

Kupffer Zellen wirken als „erste Linie der Verteidigung“ protektiv. Ihre Dysregulation ist jedoch an den pathophysiologischen Prozessen einer Vielzahl Krankheitsentitäten beteiligt und spielt beispielsweise bei lebereigenen Tumorerkrankungen oder NAFLD eine wichtige Rolle [82]. Weiterhin attenuiert die Depletion von Kupffer Zellen durch Gadolinium(III)-chlorid die Entwicklung einer Steatosis hepatis und Insulinresistenz in Ratten, die eine besonders fett- oder Saccharose-haltige Nahrung erhielten. Diese Diät erhöhte zudem die TNF- α -Sekretion von Kupffer Zellen *in vivo* sowie in M1-polarisierten Kupffer Zellen *in vitro* [83].

Kupffer Zellen tragen über die Aufrechterhaltung einer chronischen Inflammation zur Entwicklung und Progression des hepatozellulären Karzinoms bei. In einem murinen HCC-Modell wurde die frühe hepatozelluläre N-Nitrosodiethylamine (DEN)-induzierte Karzinogenese durch TREM-1-defiziente Kupffer Zellen attenuiert. Der Rezeptor Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 (TREM-1) wird auf myeloischen Zellen exprimiert und kann über Ligandenbindung die Immunantwort modulieren [84].

1.8. Ziele der Promotionsarbeit

Die Signalkaskaden der ER Stress-Antwort sind in die pathophysiologischen Vorgänge einer Vielzahl von Erkrankungen mittelbar oder unmittelbar involviert. Für das Verständnis assoziierter Erkrankungen und Aufdeckung von therapeutischen Ansätzen ist die Charakterisierung der molekularen Abläufe von herausragender Bedeutung. Das Phänomen der ER Stress-Transmission erhöht die Komplexität von Signalweg-Interaktionen mit den UPR-Kaskaden. Diese Theorie bietet gleichzeitig Erklärungsansätze, wie das angeborene und das erworbene Immunsystem durch das umgebene Mikromilieu kontrolliert und von Tumorzellen

gelenkt werden kann. Möglicherweise liegen diese Prozesse auch der Progression von nicht-alkoholischen Fettlebererkrankungen zur nicht-alkoholischen Steatohepatitis und weiter zur Leberzirrhose sowie Entstehung des HCCs zugrunde.

Kupffer Zellen nehmen eine bedeutende Rolle in diesen Vorgängen ein und stehen daher im Zentrum der Experimente dieser Promotionsarbeit. Es wird untersucht, ob eine lipidreiche Zusammensetzung von Kulturmedien Kupffer Zellen *in vitro* affektiert und eine ER Stress-Antwort auslöst. Im Fokus steht der Einsatz von freien Fettsäuren, wie Palmitat, repräsentativ für die Diät des westlichen Lebensstils, und Oleat, einer ungesättigten Fettsäure.

Die Vorgänge der nicht autonome ER Stress-Regulation wurden in verschiedenen Spezies, wie *C. elegans* oder murinen Zelllinien beschrieben. In den folgenden Untersuchungen, wird überprüft, ob diese Abläufe auch in ortsständigen Makrophagen, den Kupffer Zellen stattfinden. Eine Hypothese dieser Arbeit ist, dass die Induktion des ER Stress-Signals in Hepatozyten die Aktivität der UPR-Signalwege in Kupffer Zellen moduliert.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist unklar, welche molekularen Prozesse der ER Stress-Transmission zugrunde liegen, welche Donorzellen in der Lage sind, das „Signal“ zu sezernieren und wie das „Signal“ in Empfängerzellen in rezeptiert wird [41]. Die Identifikation eines möglicherweise sezernierten Faktors oder eines Zusammenspiels mehrerer Faktoren ist bisher noch nicht erfolgt. In *C. elegans* kann die nicht autonome Aktivierung der UPR-Signalwege in distal gelegenen Zellen des Darmes durch Reduktion von Vesikeln, sogenannten small clear vesicles (SCV), verhindert werden. Daher postulierten Taylor und Dillin et al., dass der Signaltransmission möglicherweise Botenstoffe, wie Neurotransmitter, zugrunde liegen, die durch Vesikel freigesetzt werden können [75].

In der vorliegenden Arbeit werden mittels biochemischer Methoden die Eigenschaften der Signalübertragung charakterisiert und Strategien vorgestellt, die zur Aufklärung der Signalübertragung beitragen können.

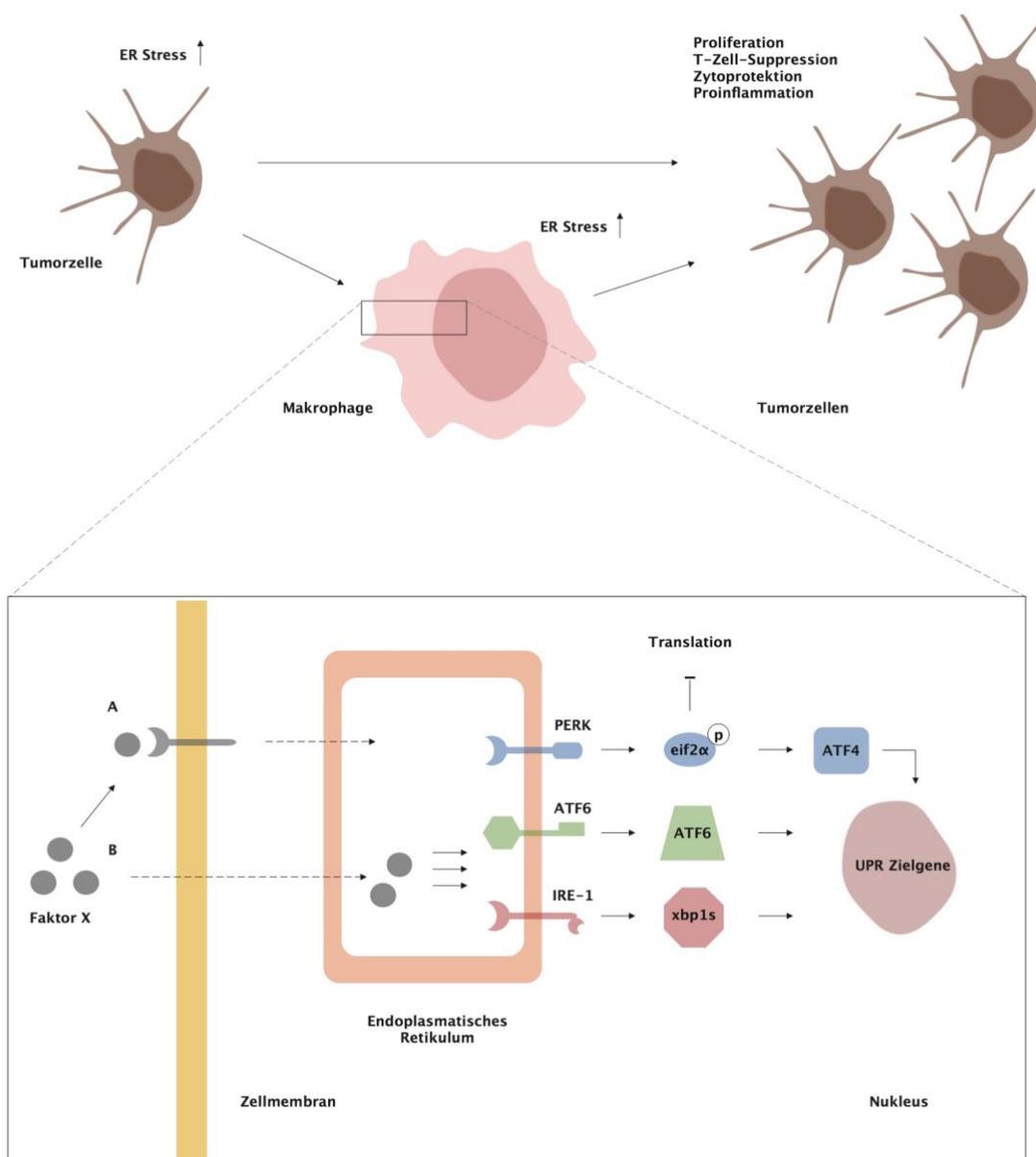


Abbildung 4: Hypothese der Modulation eines Tumormikromilieus über die Transmission des ER Stress-Signals.

Es wird postuliert, dass Tumorzellen ihr umgebendes Mikromilieu über eine nicht autonome Kontrolle von UPR Signalwegen in benachbarten und insbesondere myeloischen Zellen modulieren. Das modulierte, pro-tumorigene Mikromilieu führt zu Tumorzell-Proliferation, T-Zell-Suppression, Resistenz gegenüber Zytostatika und zur Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine. Eine Hypothese dieser Arbeit ist es, dass über bisher nicht identifizierte Mechanismen das ER Stress-Signal von Tumorzellen auf myeloische Zellen übertragen werden kann, welches die zell-intrinsischen UPR-Signalwege moduliert. A Möglicherweise aktiviert ein einzelner von Tumorzellen sezernierter Faktor („Faktor X“) über zellmembranständige Rezeptoren Signalkaskaden, die zu ER Stress führen. B Auch denkbar ist ein Zusammenspiel mehrerer sezernierter Substanzen, die die Homöostase des ER stören oder direkt die Sensorproteine PERK, ATF-6 und IRE-1 und damit die nachgeschalteten UPR Signalwege aktivieren [41, 69, 74].

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Chemikalie	Firma	Katalognummer
6x DNA Loading Dye	Fermentas	R0611
Agarose (SeaKem® LE)	Lonza	50004
Bovines Serum Albumin (BSA) Fraktion V	Roth	80764.4
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	PanReac AppliChem	A2941-0100
BSA low endotoxin fatty acid free	Sigma-Aldrich®	A8806-5G
cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche	4693124001
Deoxyribonuclease I	Invitrogen	18068-015
Dimethylsulfoxid (DMSO)	PanReac AppliChem	A3672,0100
dNTP Mix	Thermo Scientific™	R0192
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich®	ED-1KG
Ethyleneglycoltetraacetic acid (EGTA)	PanReac AppliChem	A0878,0025
Essigsäure (Eisessig)	Merck	1.00063.1000
Ethanol (EtOH) absolute, ≥ 99.8 %, AnalaR, NORMAPUR® ACS	VWR®	20821.330
Ethidiumbromid-Lösung	PanReac AppliChem	A1152,0100
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific™	SM0311
Glycine	PanReac AppliChem	A1067,5000
HCl 37 %	Merck	1.00314.2500
Methanol (MeOH)	Honeywell	32213-2.5L
MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-Leu-al)	Sigma-Aldrich®	C2211-5MG
NaCl	VWR®	27810.295
NaDOC	PanReac AppliChem	A1531,0100
Na ₂ HPO ₄	Merck	1.06574.1000

Natriumfluorid (NaF)	Carl Roth®	P756.1
Non-fat dried milk powder	PanReac AppliChem	A0830,1000
NP-40	PanReac AppliChem	A1694,0250
Oleic acid albumin from bovine serum	Sigma-Aldrich®	03008
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific™	26619
Proteinase K (lyophilisiert)	Carl Roth®	7528.3
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/μL)	Thermo Scientific™	EO0381
RNAse A 10 mg/mL	Fermentas	EN0531
Sodium palmitate	Sigma-Aldrich®	P9767
Sodium dodecyl sulfate (SDS) ultrapure	PanReac AppliChem	A1112,1000
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche	04 906 837 001
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich®	P4864-10mL
Roti®-Load 1	Carl Roth®	K929.2
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth®	3029.1
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	PanReac AppliChem	A1148,0250
Thapsigargin	Tocris®	1138
Tween® 20	PanReac AppliChem	A4974,0100
Water for Chromatography (dH ₂ O für PCR)	Merck	1.15333.2500

Tabelle 1: Chemikalien

2.1.2. Antibiotika

Antibiotika	Firma	Katalognummer
Gentamicin 20 mL (c: 50 ng/ml)	gibco®	15750-037
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Lonza	DE17-603E

Tabelle 2: Antibiotika

2.1.3. Antikörper

Antikörper	Firma	Katalognummer	Verdünnung
Primärantikörper			
Actin (c-2) Antibody	Santa Cruz	sc-8432	1:2000 in 5% TBS-T
ATF-4 (D4B8) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology®	11815	1:2000 in 5% TBS-T
GADD34	proteintech®	10449-1-AP	1:3,000 in 5% BSA in TBS-T
Sekundärantikörper			
ECL™ Anti-mouse IgG	GE Healthcare	NA931V	1:2500 in 5% Milch in TBS-T
ECL™ Anti-rabbit IgG	GE Healthcare	NA934V	1:2500 in 5% Milch in TBS-T

Tabelle 3: Antikörper

2.1.4. Zelllinien

Name der Zelllinie	Spezies / Eigenschaft
AML-12	Murine Leberzelllinie, isoliert aus Hepatozyten einer für TGF α -transgenen Maus [85]
BNL CL.2	Murine Leberzelllinie ohne tumorigene Eigenschaften, isoliert aus Leberzellen der murinen Zuchtlinie BALB/c [86]
CHO-S21	CHO-K1 XBP-1::Turquoise/CHOP::GFP-duale Reporterzelllinie [87]
EA.hy926	Humane Endothelzelllinie [88]
Hepa-1-6	Murine HCC-Zelllinie, isoliert aus HCC-Zellen der männlichen Mausezuchtlinie C57/LJ [89]
HepG2	Humane HCC-Zelllinie [90]
KC-13-2	Murine Kupffer Zelllinie, welche aus der Zuchtlinie C57BL/10 extrahiert wurde und die thermolabile Mutante tsA58 des Simian Virus 40 large T Antigen exprimiert [91]

KUP5	Murine Kupffer Zelllinie, extrahiert aus der Zuchtlinie C57BL/6 und mit c-myc immortalisiert [92]
------	---

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Zelllinien

2.1.5. Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Name der Zelllinie	Zusammensetzung: Medien und Additiva
AML-12	<u>Zusammensetzung:</u> <ul style="list-style-type: none"> – 500 ml DMEM – 10 % FCS – 10 µg/ml Insulin – 5.5 µg/ml Transferrin – 5 ng/ml Selenium – 40 ng/ml Dexamethason
BNL CL.2	<u>Zusammensetzung:</u> <ul style="list-style-type: none"> – 500 ml DMEM – 10 % FCS – 1 % Penicillin/Streptomycin
KC-13-2	<u>Zusammensetzung:</u> <ul style="list-style-type: none"> – 500 ml RPMI 1640 supplementiert – 5 % FCS – 10 % Überstände HepG2 – 10 % Überstände EA.hy926 <u>Zusammensetzung RPMI 1640 supplementiert:</u> <ul style="list-style-type: none"> - 500 ml RPMI 1640 - 5 ml Non-essential-amino-Acids - 5 ml Na-Pyruvat - 5 ml Glutamat - 750 µl HEPES - 150 µl Gentamycin

KUP-5	<u>Zusammensetzung:</u> <ul style="list-style-type: none"> – 500 ml DMEM – 10 µg/ml Insulin – 100 µM β-Mercaptoethanol – 1 % Penicillin/Streptomycin
EA.hy926	<u>Zusammensetzung:</u> <ul style="list-style-type: none"> – 500 ml RPMI 1640 supplementiert – 10 % FCS – 0,25 % Glukose – HT 10 ml
Hepa-1-6	<u>Zusammensetzung:</u> <ul style="list-style-type: none"> – 500 ml DMEM – 10 % FCS – 1 % Penicillin/Streptomycin
HepG2	<u>Zusammensetzung:</u> <ul style="list-style-type: none"> – 500 ml RPMI 1640 supplementiert – 10 % FCS
CHO-S21	<u>Zusammensetzung:</u> <ul style="list-style-type: none"> – 500 ml Ham's F12 – 10 % FCS – 1 % Penicillin/Streptomycin

Tabelle 5: Zusammensetzung der Kulturmedien

2.1.6. Reagenzien für die Zellkultur

Reagenz	Firma	Katalognummer
Bovine Serum Albumin Solution in 10 % PBS	Sigma-Aldrich®	A1595
Dexamethason	Sigma-Aldrich®	D4902
DMEM	gibco®	41965062
DPBS	gibco®	14190-094

Fetal Bovine Serum (FBS) Superior	Biochrom/Merck	S0615
Fetal Bovine Serum (FBS), dialyzed	gibco®	26400-044
Glucose 40% Braun Mini-Plasco connect	B. Braun Melsungen AG	3159304
Ham's F-12 Nährstoffmischung, GlutaMAX™ Supplement	gibco®	31765035
HEPES Puffer Lösung	gibco®	15630-056
HT Supplement 100X (Gemisch aus Natriumhypoxanthin und Thymidin)	gibco®	41065
Insulin-Transferrin-Selen (ITS-G) (100X)	gibco®	41400-045
β-Mercaptoethanol	AppliChem	A1108,100
MEM NEAA 100x non-essential AA 100mL (nicht essentielle Aminosäuren)	gibco®	11140
Natrium-Pyruvat 100 mM	gibco®	11360
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™	gibco®	61870-010
RPMI 1640 no Glucose 500mL	gibco®	11879-020
Trypsin/EDTA 10 x 100 ml	Lonza	BE02-007E

Tabelle 6: Reagenzien für die Zellkultur

2.1.7. Kits

Kits	Firma	Katalognummer
DC Protein Assay	Bio-Rad	500-0116
Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad	1705061
Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution	Bio-Rad	1610436
Maxima™ SYBR™ Green/ROX 2x qPCR Master Mix (2 x)	Thermo Scientific™	K0222
RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (200 U/μL)	Thermo Scientific™	EP0451
Random Hexamer Primer	Thermo Scientific™	SO142

NucleoSpin RNA, Mini kit for RNA purification	Macherey-Nagel	740955.50
---	----------------	-----------

Tabelle 7: Verwendete Kits

2.1.8. Verbrauchsmaterialien

Produkt	Firma	Katalognummer
96 Well Lightcycler Plate	Sarstedt	72.1982.202
Amersham Hyperfilm™ ECL (18 × 24 cm)	GE Healthcare	28906836
Filtropur S 0.2 µm	Sarstedt	831.826.001
Filtropur S 0.45 µm	Sarstedt	831.826
Immobilon®-P., PVDF, Transfermembran	Merck	IPVH00010
LightCycler® 480 Sealing Foil	Roche	04 729 757 001
Neubauer-improved Zählkammer	Marienfeld	0640010
Nunc™ Biobanking and Cell Culture Cryogenic Tubes	Thermo Scientific™	368632
Stericup® vacuum filtration system 0,22 µm	Millipore	SCGPT01RE
Tissue Culture (TC) Inserts	Sarstedt	83.3930.040
TC-Schale, 6-Well	Sarstedt	83.3920
TC-Schale 100, Standard	Sarstedt	83.3902
TC-Schale 60, Standard	Sarstedt	83.3901
TC-Schale 100, Suspension	Sarstedt	83.3902.500
TC-Schale 60, Suspension	Sarstedt	83.3901.500
Zellschaber	Sarstedt	831.830

Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien

2.1.9. Puffer und Lösungen

Puffer	Komponenten	Anmerkung zur Herstellung
10 x SDS-Puffer		
	Tris	151 g
	Glycine	720 g
	SDS	50 g
	dH ₂ O	5 L
10 x Transfer-Puffer		
	Tris	151,5 g
	Glycine	720 g
	dH ₂ O	5 L
10 x TNT-Puffer		
	NaCl 5 M	1500 ml
	Tris pH 7,5 2 M	625 ml
	Tween 20 10 %	250 ml
	dH ₂ O	2625 ml
10 x TBS-Puffer		
	Tris 100 mM	Ziel-pH 7.6 (Adjustierung mit HCl)
	NaCl 1.5 M	
50 x TAE-Puffer		
	Tris	242 g
	Essigsäure (Eisessig)	57.1 ml
	EDTA pH 8.0	50 mM
	H ₂ O	auf 1000 ml auffüllen
1 M Tris pH 6.8		
	121.14 g Tris	Ziel-pH 6.8 (Adjustierung mit HCl)
	H ₂ O	auf 1000 ml auffüllen
1.5 M Tris pH 8.8		
	181.71 g Tris	Ziel-pH 8.8 (Adjustierung mit HCl)
	H ₂ O	auf 1000 ml auffüllen

RIPA-Puffer		
	Materialien (Stock-Konzentration)	Benötigtes Volumen (Zielkonzentration)
	NP-40 10 %	10 ml (1 %)
	DOC 10 %	5 ml (0,5 %)
	SDS 20 %	0,5 ml (0,1 %)
	Tris pH 8,0 1 M	5 ml (50 mM)
	NaCl 5 M	2 ml (80 mM)
	NaF 0,5 M	5 ml (50 mM)
	Na ₂ HPO ₄ 1 M	0,892 g (20 mM)
	EDTA 0,5 M	0,2 ml (1 mM)
	EGTA 0,5 M	0,2 ml (1 mM)
	dH ₂ O	69,1 ml
	Gesamtvolumen	100 ml

Tabelle 9: Pufferlösungen

2.1.10. Ansatz zur Herstellung der SDS-Gele

Name des Gels	Komponenten	Anmerkung zur Herstellung
Sammelgel		
	dH ₂ O	3,92 ml
	Acrylamid 30 %	1,13 ml
	Tris pH 6,8 0,5 M	1,75 ml
	SDS 10 %	70 µl
	APS 10 %	70 µl
	TEMED	7 µl

Trenngel			
		7,5 %	10 %
	dH ₂ O	4,85 ml	4,1 ml
	Acrylamid 30 %	2,5 ml	3,3 ml
	Tris pH 8,8 1,5 M	1,75 ml	
	SDS 10 %	100 µl	
	APS 10 %	105 µl	
	TEMED	15 µl	

Tabelle 10: Komponenten der SDS-Gele

2.1.11. Primer für die qRT-PCR

Name des Primer	Sequenz
mATF	forward: 5` CTATGGATGATGGCTTGGCC 3` reverse: 5` AGGCATCCTCCTTGCCG 3`
mBiP	forward: 5` GACCCTTCGGTGCAGCAG 3` reverse: 5` TTCAACCACCTTGAATGGCA 3`
mGADD34	forward: 5` CTGCAGAGGCGGCTCAGA 3` reverse: 5` CGAAGTGACCTCCGAGCTTT 3`
18s-rRNA	forward: 5` CGGCTACCACATCCAAGGAA 3` reverse: 5` GCTGGAATTACCGCGGCT 3` Sonde: 5` [JOE]TGCTGGCACCAGACTTGCCCTC[TAM] 3`

Tabelle 11: Primer für die qRT-PCR

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung von Zelllinien

Zur Durchführung der *in vitro* Zellexperimente wurden stabile, immortalisierte Zelllinien genutzt. Die verwendeten Zelllinien und die Zusammensetzung der korrespondierenden Medien werden in den Abschnitten 2.1.4 und 2.1.5 beschrieben.

Die Zellen werden bis zu einem Erreichen einer Zelldichte von ca. 70-80 % inkubiert. Wenn Zellen unter *in vitro*-Bedingungen in der Kulturschale sehr dicht wachsen, also eine hohe Konfluenz erreichen, tritt aufgrund der Kontakthemmung ein Wachstumsstopp auf. Um ein Überwachsen zu vermeiden, ist daher die Anlage von Subkulturen, das sogenannte Passagieren notwendig. Nach zwei bis drei Tagen, je nach Wachstumsverhalten der entsprechenden Zelllinie, erfolgt die Anlage einer Subkultur. Für das Ablösen der adhärennten Zellen von der Zellkulturschale wird das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach dem Absaugen wird den Zellen Trypsin/EDTA hinzugegeben. Trypsin ist ein proteolytisches Enzym, das bei 37°C sein Wirkoptimum erreicht und die anhaftenden Zellen durch Verdau von Zelladhäsionsbestandteilen von der Kulturschale ablöst. Der Komplexbildner ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) bindet Calcium- und Magnesium-Ionen von der Zelloberfläche und ermöglicht die Hydrolyse der Peptidbindungen durch Trypsin. Zur Beendigung der Trypsinreaktion wird serumhaltiges Medium auf die Schale gegeben. Für die nächste Passage erhalten die Zellen frisches Nährmedium und werden auf eine neue Kulturschale überführt [93, 94]. Die Medien enthalten Nährstoffe, eine Reihe von Zelllinien-spezifischen Additiva (s. **Tabelle 6: Reagenzien für die Zellkultur**) und fetales Kälberserum (engl. fetal calf serum, FCS), welches den Zellen Wachstumsfaktoren liefert. Zur Vermeidung einer bakteriellen Kontamination sind den Medien die Antibiotika Penicillin/Streptomycin bzw. für die KC-13-2-Medien Gentamycin beigefügt.

Die Zelllinie KC-13-2 wird bei 33 °C und die weiteren, im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Zelllinien werden bei 37 °C in Brutschränken (Incubator Thermo Scientific Heraeus BB 15 CO₂) kultiviert. In diesen Inkubatoren werden ein CO₂-Gehalt von 5 % und eine befeuchtete Atmosphäre erzeugt. Die murine Kupffer Zelllinie KC-13-2 wurde aus einer transgenen Maus

isoliert, die eine thermolabile Mutante tsA58 des Simian Virus 40 large T Antigen unter Kontrolle eines H-2K^b Promotors exprimiert [91]. Für die Komposition des Kulturmediums der Kupfer Zelllinie KC-13-2 werden die Überstände der Zelllinien EA.hy926 und HepG2 benötigt. Diese werden in den entsprechenden Medien (**Tabelle 5: Zusammensetzung der Kulturmedien**) inkubiert und bis zum Erreichen ausreichender Volumina expandiert. Die Überstände werden mittels Stericup[®] Vakuum Filtersystem (Filtergröße: 0,22µm) filtriert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für die Kultivierung der Zelllinie KUP5 wurden non-tissue-Zellschalen verwendet. Werden die Zellen für ein Experiment eingesetzt, wird zur Ermittlung der Zellzahl die Neubauer-Zählkammer (improved) genutzt und die Zellen im Anschluss mit einer berechneten, definierten Zellzahl auf neue Petrischalen gegeben.

Für die Langzeitlagerung werden die genutzten Zellen kryokonserviert. Hierfür werden die Zellen von der Kulturplatte gelöst und das Zellpellet in FCS überführt, welches als Gefrierschutzmittel 10 % Dimethylsulfoxid enthält. Die in FCS/10 %-DMSO gelösten Zellen werden in speziellen Kryo-Röhrchen gegeben und bei -80 °C eingefroren. Zur Langzeitlagerung werden die Zellen in Aufbewahrungstanks mit Flüssigstickstoff transferiert.

2.2.2. Generation konditionierter Medien

Zur Generation der konditionierten Medien (CM) werden die Zelllinien Hepa-1-6 und die CHO-S21 genutzt. Diese Zelllinien werden als Donorzelllinie definiert, während die Kupfer Zelllinien KC-13-2 und KUP-5 sowie ebenfalls die CHO-S21-Zellen als Akzeptorzelllinien bezeichnet werden. Die ER Stress-Induktion erfolgt durch Einsatz von Thapsigargin. Die Donorzellen werden zur Herstellung einer Vehikelkontrolle mit Ethanol (EtOH) behandelt, in welches das Thapsigargin gelöst ist. Dieses konditionierte Kontrollmedium, genannt CM E, dient in den Experimenten als Kontrolle, um ungewünschte Effekte, beispielsweise durch Nährstoffverbrauch, auszuschließen. Der Ablauf zur Generierung der Medien wird im Folgenden beschrieben und ist nach Anpassung dem Protokoll von Mahadevan et al. entnommen [69].

Die Donorzellen werden am Vortag ausgesät. Zur Stimulation der Donorzellen mit dem chemischen ER Stress-Induktor Thapsigargin wird das Kulturmedium gewechselt. Die Zellen

werden mit Thapsigargin (c_{TG} : 0,6 μ M) und dem entsprechenden Volumen EtOH für 2 h behandelt. Im Anschluss wird das Medium entfernt und die Zellen zwei Mal mit PBS vorsichtig gewaschen. Das PBS wird abgesaugt und das jeweilige Medium der entsprechenden Akzeptorzelllinie zu den Donorzellen gegeben. Es erfolgt die Inkubation und „Konditionierung“ der Medien für 16 h. Abschließend wird das konditionierte Medium steril filtriert (Filtergröße: 0,45 μ m) und in Falkons aliquotiert.

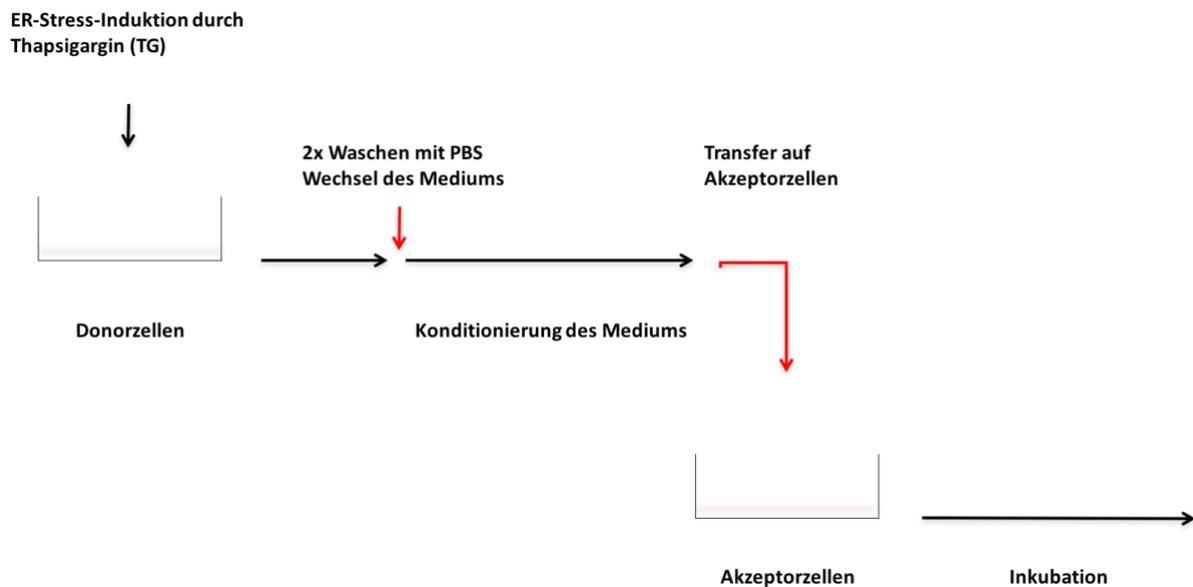


Abbildung 5: Generierung des konditionierten Mediums Thapsigargin

2.2.3. Behandlung von Kupfer Zellen mit freien Fettsäuren

2.2.3.1. Präparation einer an BSA-konjugierten Palmitat-Lösung

Langkettige freie Fettsäuren, wie Palmitat, sind in wässrigen Lösungen nur schwer löslich. Die geringe Löslichkeit limitiert den Einsatz in *in vitro*- oder *in vivo*-Experimenten. Durch Konjugation an bovines Serum-Albumin (BSA) kann Palmitat von Zellen aufgenommen werden und wird für einen experimentellen Einsatz in Zellkulturen verfügbar. Kommerziell erwerbliches Albumin kann durch endogene bovine freie Fettsäuren kontaminiert sein und

eine Bindung an Palmitat beeinträchtigen. Um die Bildung von Artefakten zu vermeiden, ist daher der Einsatz von fettsäure-freiem BSA (engl. fatty acid-free BSA) notwendig [95].

Die Präparation einer 10 mM Palmitat-Stock-Lösung erfolgt gemäß einem modifizierten Protokoll nach Spector [96-98]:

Substanz	Molare Masse	Zielkonzentration c_{final}	Menge pro 1 l	Menge pro 20 ml	Lösung in:
Palmitat	256,4 M [g/mol]	20 mmol/l	5128 mg	102,56 mg	20 ml 0.1M NaOH
Fatty acid-free BSA	66000 M [g/mol]	3,03 mmol/l	200 g	4 g	20 ml 0.1M NaOH
Fatty acid-free BSA	66000 M [g/mol]	3,03 mmol/l	200 g	4 g	20 ml Medium

Tabelle 12: Ansatz zur Konjugation von Palmitat an BSA

Konkret werden 102,56 mg Palmitat in 20 ml 0.1 M NaOH unter Rühren und Erwärmen über 30 min auf 70 °C in Lösung gebracht. Parallel werden je 4 g BSA (fatty acid-free) bei Raumtemperatur in 20 ml KC-13-2-Medium sowie über 30 min bei 70 °C in 20 ml 0.1 M NaOH gelöst. Im Anschluss wird das in NaOH gelöste Palmitat in einem 1:1-Volumenverhältnis zu dem in Medium gelösten BSA gegeben, um ein molares Verhältnis von 1:6,6 (BSA:Palmitat) bei einer angestrebten 10 mM-Palmitatlösung zu erreichen. Zur Generierung der Vehikelkontrolle wird das in 0.1 M NaOH gelöste BSA in einem 1:1-Volumenverhältnis mit dem KC-13-2-Medium verdünnt. Die Lösungen werden steril filtriert (Porengröße: 0,45 µm), in Eppendorf Cups aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.3.2. Behandlung der Kupffer Zellen mit Palmitat und Oleat

Die Kupffer Zellen KC-13-2 werden mit verschiedenen Konzentrationen an Palmitat oder der entsprechenden Vehikelkontrolle BSA behandelt. Die Zielkonzentration des Palmitat/BSA-Konjugates (c_{Stock} :10 mM) betragen c_{final} 1-5: 125 µM; 250 µM; 500 µM; 750 µM und 1000 µM. Es werden die korrespondierenden Volumina der BSA-Lösungen als Kontrolle eingesetzt. Nach

Inkubation für 16 h werden die Zellen für Proteinextraktion geerntet. Die Zellen, welche mit einer Konzentration von $c: 1000 \mu\text{M}$ behandelt wurden, waren nicht mehr adhären und wurden nicht analysiert.

In einem nächsten Experiment werden die Kupffer Zellen KC-13-2 mit einer Kombination aus den Fettsäuren Palmitat und Oleat behandelt. Die bereits an BSA-konjugierte Fettsäure Oleat ist kommerziell erhältlich. Oleat ist in dieser Lösung in einem molaren Verhältnis von 2:1 an BSA gebunden und in PBS gelöst. Die Konzentration an BSA beträgt $c_{\text{BSA}}: 100 \text{ mg/ml}$. In der Zellkultur wurde Oleat in einer Konzentration von $c_{\text{Oleat}}: 150 \mu\text{M}$ ($c_{\text{Stock}}: 3 \text{ mM}$) eingesetzt.

Die Zellen werden mit zwei verschiedenen Konzentrationen an Palmitat $C_{\text{final}1-2}: 150 \mu\text{M}$ und $250 \mu\text{M}$ behandelt. Diese Proben werden zusätzlich mit Oleat ($c: 150 \mu\text{M}$) bzw. einer Vehikelkontrolle bestehend aus BSA, gelöst in PBS, behandelt. Die Zellen werden für 24 h inkubiert und im Anschluss für Proteinanalysen geerntet.

2.2.1. Kultivierung in einem Zwei-Kompartiment-Zellkultursystem

Unter Nutzung eines Zwei-Kompartiment-Zellkultursystem können zwei verschiedene Zelllinien kultiviert und für Sekretionsstudien verwendet werden. Für die kombinierten (Ko-) Kultivierungsexperimente wurden 6-Well-Platten und kompatible Einsätze (Sarstedt Tissue Culture inserts) genutzt. Diese Einsätze verfügen über eine Porengröße von $0,4 \mu\text{m}$ und sind mit einer Polyester-Membran ausgekleidet. Die geringe Porengröße verhindert eine Transmigration von Zellen und vermeidet eine Kreuzkontamination der Zelllinien. Mit diesem System kann eine *in vivo* Zell-Zell-Interaktion *in vitro* simuliert werden, ohne dass die Zellen in direktem Kontakt stehen.

Es werden Hepa-1-6-Zellen sowie KC-13-2-Zellen in 6-Well-Platten und KC-13-2-Zellen in die Einsätze gesät. Am Folgetag werden die Einsätze mittels steriler Pinzette in die 6-Well-Platten eingefügt (s. Abbildung 2). Beide Zelllinien werden in KC-13-2-Zellkulturmedien inkubiert. Nach Beendigung der Experimente werden die Hepa-1-6-Zellen mechanisch und die KC-13-2 enzymatisch von den Oberflächen gelöst. Für die Proteinextraktion werden die Zellen von drei Einsätzen zusammengeführt, um eine suffiziente Proteinkonzentration zu erhalten.

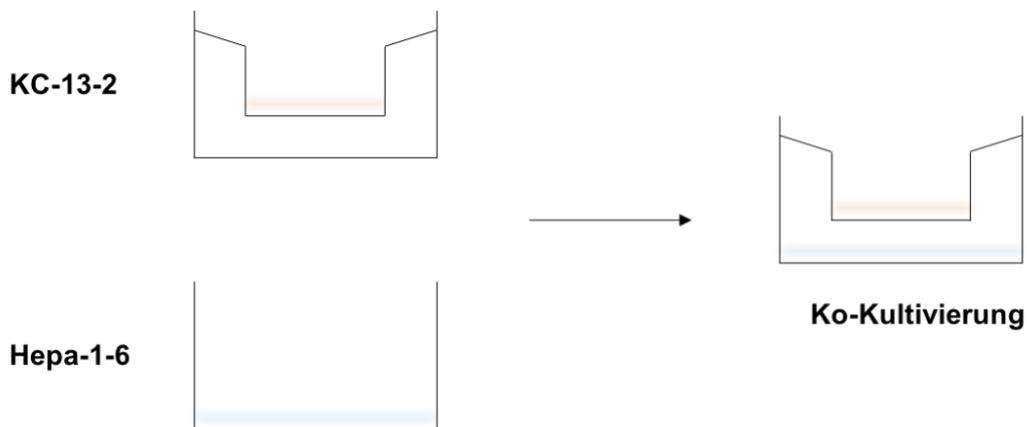


Abbildung 6: Schema der Ko-Kultivierung

2.2.1.1. Ko-Kultivierung nach Behandlung mit Thapsigargin

Die Hepa-1-6- und KC-13-2-Zellen werden mit Thapsigargin (c_{final} : $0,6 \mu\text{M}$) und dem korrespondierenden Volumen an EtOH für 2 h behandelt. Im Anschluss wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS zwei Mal vorsichtig gewaschen. Es wird neues Kulturmedium hinzugegeben. In die 6-Well-Kulturschalen werden die Einsätze mit den adhärenen KC-13-2-Zellen eingefügt und die Zellen für 16 h ko-kultiviert.

2.2.1.2. Ko-Kultivierung nach Glukosedeprivation

Die Hepa-1-6-Zellen werden in 6-Well-Platten ausgesät. Am Folgetag wird das Kulturmedium durch glukosefreies Medium ersetzt. Dieses enthält ein dialysiertes FCS, welches kommerziell erhältlich ist und keine Glukose enthält. Für einen Inkubationszeitraum von 16 h werden die Hepa-1-6-Zellen in glukosefreiem und zur Kontrolle in glukosehaltigem Medium inkubiert. Nach der Glukosedeprivation wird in einem Teil der Medien die üblicherweise in Kulturmedien enthaltene Glukose substituiert, um zu kontrollieren, dass die glukosefreien Medien die Kupffer Zellen nicht im Sinne einer ER Stress-Induktion affektieren. Hepa-1-6 Zellen werden in DMEM-basierten Medium kultiviert, welches eine Glukose-Konzentration von c_{Glc} : $4,5 \text{ g/l}$ gegenüber der Glukose-Konzentration in RPMI-basierten-Medien von c_{Glc} : 2 g/l aufweist. Die

Substitution der Medien erfolgt in diesem Experiment analog der Glukose-Konzentration in DMEM-basierten Kulturmedien mittels Glukose (G 40%). Im Anschluss werden die Einsätze mit den KC-13-2 eingefügt und für weitere 24 h ko-kultiviert.

2.2.1.3. Ko-Kultivierung nach Behandlung mit Palmitat

Die Hepa-1-6 Zellen werden mit Palmitat ($c_{\text{Palm}}: 250 \mu\text{M}$) und dem korrespondierenden Volumen an BSA für 16 h behandelt. Im Anschluss wird das Medium entfernt und die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Nach Hinzugabe des KC-13-2 Kulturmediums werden die Einsätze mit den KC-13-2 Zellen eingefügt. Die anschließende Ko-Kultivierung erfolgt für 24 h.

2.2.2. Biochemische Charakterisierung der Medien

2.2.2.1. Temperaturbehandlung

Im Rahmen dieses Experimentes werden die konditionierten Medien für einen definierten Zeitraum verschiedenen, nicht-physiologischen Temperaturen ausgesetzt, um die Thermostabilität des Mediums zu untersuchen. Zur Vorbereitung werden die konditionierten Medien CM TG und CM E, wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, in Hepa-1-6-Zellen generiert.

Je 2 ml der Medien werden in Eppendorf Cups überführt und für 30 min bei 37 °C, 70 °C und 95 °C inkubiert. Nach der Inkubation wird die Temperatur der Proben wieder auf Raumtemperatur gekühlt, um eine Hitzeeinwirkung auf die Kupffer Zellen zu vermeiden. Eine Erhöhung der Temperatur von Kulturmedien auf 70 °C respektive 95 °C hat große Auswirkungen auf die enthaltenen Inhaltsstoffe und kann durch die Denaturierung der Proteine, z.B. von Wachstumsfaktoren, die Zellen in der Zellkultur beeinträchtigen. Ein durch Denaturierung bedingter Mangel an Wachstumsfaktoren kann Zellstress auslösen, daher wird zu jeder Probe 10 % FCS hinzugegeben. Nach Transfer der Medien auf die Kupffer Zellen werden die Zellen für 24 h inkubiert.

2.2.2.2. Proteinase K-Verdau

Die in diesem Experiment verwendeten Überstände wurden in Hepa-1-6-Zellen (Abschnitt: 2.2.2) generiert. Es wird überprüft, ob die konditionierten Medien auch nach enzymatischem Verdau mit Proteinase K *in vitro* das ER Stress-Signal transmittieren können.

Jeweils 2 ml der Medien CM E und CM TG werden in Eppendorf-Cups überführt. Den Proben wird das Enzym Proteinase K (c_{final} : 50 $\mu\text{g/ml}$; c_{stock} : 20 mg/ml) hinzugegeben [99]. Das Enzym enthält im aktiven Zentrum die Aminosäure Serin und zählt daher zur Klasse der Serin-Proteasen. Die Proteinase K spaltet unspezifisch Peptidbindungen und ist in der Lage, Proteine in wässrigen Lösungen zu degradieren. Die Inkubation erfolgt nach kurzem vortexen bei 56 °C für unterschiedliche Zeiträume. Jeweils ein Probenset – bestehend aus CM E und CM TG – wird für 20 min, 40 min und 60 min inkubiert. Im Anschluss werden die Proben bei 95 °C für 15 min erhitzt. Die Exposition gegenüber hohen Temperaturen inaktiviert die Proteinase K. Das noch aktive Enzym könnte Membranproteine degradieren und hierdurch die Zellen schädigen. Anschließend wird die Temperatur der einzelnen Proben wieder auf Raumtemperatur gekühlt. Da mutmaßlich ein Großteil der enthaltenen Proteine, z.B. Wachstumsfaktoren, proteolytisch degradiert wurde, wird den mit Proteinase K behandelten Proben 10 % FCS hinzugegeben. Im Anschluss werden die Medien auf die Kupffer Zellen gegeben und die Zellen für 24 h hierin inkubiert.

In optimierten Puffer-Lösungen (Proteinase K-Puffer) erhält die Proteinase K ihr Wirkmaximum. Ergänzend wird überprüft, ob die Proteinase K auch in serumhaltigen Zellkulturmedien enzymatisch aktiv ist. Daher wird BSA in einer definierten Konzentration (c_{BSA} : 1 $\mu\text{g/ml}$) in Zellkulturmedien gelöst. Neben einer unbehandelten, in Medium gelösten BSA-Probe, werden drei weitere BSA-Lösungen mit Proteinase K für 5 min, 10 min und 20 min behandelt. Das Vorgehen entspricht der oben beschriebenen Anleitung. Ziel ist es, das ca. 68 kDa-große Protein BSA auf einem Polyacrylamid-Gel mittels Coomassie-Färbung sichtbar zu machen bzw. sein Fehlen nach Degradation darzustellen. Die Polyacrylamid-Gel-Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau R-250 hat eine Empfindlichkeit von ca. 200-400 ng pro 0,5 cm Bande [100]. Der Farbstoff bindet vor allem basische Seitenketten der Aminosäuren.

Hierdurch werden Proteine unspezifisch angefärbt, die als Banden auf einem Polyacrylamid-Gel erscheinen [101].

Die Proben werden in einem Verhältnis 3:1 (v:v) mit dem Probenladepuffer (4x Roti®-Load 1) gemischt und auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Nach Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE wird das Gel mit der Coomassie-Lösung (Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution über Nacht gefärbt. Am Folgetag wird das Gel mit einer Entfärbelösung, bestehend aus dH₂O, 40 % Methanol und 10 % Essigsäure, mehrfach gewaschen.

2.2.2.3. Desoxyribonuklease-Verdau

Die Desoxyribonuklease I ist ein Enzym, das die Hydrolyse von DNA katalysiert. Sie hydrolisiert einzel- als auch doppelsträngige DNA in (Oligo-)Desoxyribonukleotide. Mittels Verdau der Proben durch die Desoxyribonuklease wird die Aktivität der konditionierten Medien nach Degradation von DNA ermittelt. Die in diesem Experiment genutzten Überstände CM E und CM TG wurden in Hepa-1-6-Zellen konditioniert (2.2.2).

Jeweils 2 ml der Medien CM E und CM TG werden in Eppendorf-Cups überführt und werden mit je 4 µl Desoxyribonuklease I (DNase I, Amp Grade, c_{Stock}: 1 U/µl) behandelt. Die Inkubation erfolgt nach kurzem Mischen der Probe mittels Vortexen bei Raumtemperatur. Je ein Probenet – bestehend aus CM E und CM TG – wird für 20 min, 40 min und 60 min bei 37 °C inkubiert. Nun werden die Proben bei 95 °C für 15 min erhitzt, um die Desoxyribonuklease durch Hitze zu inaktivieren. Die Temperatur der einzelnen Proben wird auf Raumtemperatur gekühlt. Anschließend werden die behandelten Überstände auf die KC-13-2-Zellen gegeben und die Zellen für 24 h inkubiert.

Nachfolgend wird überprüft, ob die Desoxyribonuklease auch in serumhaltigen Zellkulturmedien DNA degradieren kann. Das Enzym wird bei anderen Anwendungen, beispielsweise der Purifikation von RNA für die cDNA-Synthese, in Reaktionspuffern (DNase I reaction Buffer) gelöst, um eine optimale Aktivität zu gewährleisten. Zur Kontrolle der Aktivität in Nährmedien wird Plasmid-DNA (pDNA, Plasmid-Vektor: pEGFP-C1, Menge: 1 µg) in dH₂O oder in serumhaltige Zellkulturmedien überführt. Anschließend werden die Proben

mit und ohne DNase (1 U) für 60 min bei 37 °C verdaut. Nach Hitzeinaktivierung der Desoxyribonuklease über 15 min bei 95 °C werden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen.

Hierfür wird ein Agarosegel (1 %) angefertigt. Agarose wird in Tris-Acetacetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) gegeben und durch Erhitzen in einer Mikrowelle gelöst. Im flüssigen Zustand wird Ethidiumbromid (c_E : 0,5 µg/ml) hinzugegeben und das Gel in einen Gelschlitten gegossen. Es wird ein Kamm zur Bildung präformierter Taschen senkrecht eingeführt. Das Gel festigt sich beim Abkühlen. Anschließend wird es in eine Elektrophoresekammer mit dem Elektrophorese-Puffer (TAE-Puffer) überführt. Die Proben werden mit einem Ladepuffer (6x DNA Loading Dye) gemischt und in die Taschen auf das Gel geladen. Zur Größenabschätzung der Banden wird ein Marker (GeneRuler 1 kb DNA Ladder) aufgetragen. Es wird eine Spannung von 100 V für ca. 40 min angelegt. Die negativ geladenen DNA-Fragmente migrieren in Richtung Anode. Größere DNA-Fragmente durchlaufen die Poren langsamer als kleine. Je höher die Konzentration des Gels, desto kleiner die Porengröße. Der Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der DNA, wodurch sich das Fluoreszenz-Signal nach Anregung mit UV-Licht verstärkt [102]. Die Banden werden mit dem Gel iX20 Imager Geldokumentationssystem (Intas) visualisiert.

2.2.2.4. Lipidextraktion und Fraktionierungen von Zellkulturüberständen

Die verwendeten konditionierten Medien CM E und CM TG wurden in CHO-S21-Zellen generiert (2.2.2). In dem folgenden Abschnitt werden die Methoden vorgestellt, mittels derer lipid-haltige Isolate aus einem Gemisch extrahiert und weiter fraktioniert werden. Die Extraktionen und Fraktionierungen wurden von Herrn Dr. Bernhard Drotleff der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Lämmerhofer vorgenommen.

Zur Lipidextraktion wird die Methode nach Bligh und Dyer gewählt. Es ist ein Verfahren zur Isolierung von Lipidfraktionen aus einer biologischen Matrix. Diese Matrices können Blut, Urin, andere Gewebeproben oder wie in der vorliegenden Arbeit Zellkulturüberstände darstellen. Konkret wird 6 ml Medium in Glasgefäßen mit 22,5 ml eines Methanol/Chloroform-Gemisches (2:1, v:v) und 7,5 ml Chloroform vermischt. Nun wird die untere lipidhaltige Phase

von der wässrigen Phase getrennt und mittels Stickstoffverdampfung getrocknet [103]. Das getrocknete Pellet wurde in 100µl EtOH gelöst und für die weitere Fraktionierung verwendet.

Nun wurde das Lipidextrakt mit der hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in weitere Fraktionen separiert. Diese Chromatographie-Form ist eine Variante der high-performance liquid chromatography (HPLC). Es wurde ein präparativer Ansatz mit dem Ziel gewählt, die resultierenden Fraktionen wieder in der Zellkultur zu testen. Daher war das initiale Einbringen höherer Volumina erforderlich. Das Trennprinzip bei der hydrophilen Interaktionschromatographie basiert auf Nutzung einer polaren stationären Phase und einem Elutionsmittel, welches aus einer wässrigen Pufferlösung sowie einem organischen Lösungsmittel, wie z.B. Acetonitril, besteht. Der Gradient des Elutionsmittels besteht zu Beginn aus einem hohen Anteil des organischen Lösungsmittels und zum Ende aus einem hohen Wasseranteil in der Pufferlösung. Die Trennung der Proben erfolgt durch die Interaktion der enthaltenen Substanzen mit der stationären Phase in Abhängigkeit ihrer polaren bzw. hydrophilen Eigenschaften [104]. Die anschließend getrockneten, fraktionierten Proben werden zunächst in 30 µl EtOH resuspendiert. Das Volumen wird so gewählt, dass die Konzentration an EtOH im Zellmedium bei einem Volumen von V_{Medium} : 2 ml nicht 1,5 % v/v (Volumenprozent) übersteigt. Im Anschluss wird die EtOH-Suspension in Zellmedium überführt und zu den CHO-S21-Zellen gegeben.

2.2.3. RT-qPCR

Für die Durchführung der reverse transcription-quantitative real-time PCR (RT-qPCR) sind zur Vorbereitung der Proben mehrere Einzelschritte notwendig, die aus der RNA-Isolation und der cDNA-Synthese bestehen. Der Funktionsweise der qPCR liegt die Technik der konventionellen polymerase chain reaction (PCR) zugrunde, bei der Nukleinsäuren amplifiziert werden. Im Rahmen der qPCR kann die Menge an synthetisierter DNA der einzelnen Zyklen in Echtzeit quantifiziert und mittels Fluoreszenzsignal visualisiert werden. Als fluoreszierender Farbstoff wird SYBR-Green verwendet. SYBR-Green ist ein Cyanin-Farbstoff, der an doppelsträngige DNA (dsDNA) bindet. Im gebundenen Komplex mit dsDNA erhöht sich die Emission des fluoreszierenden Signals. Da sich die Kopienzahl der dsDNA mit jedem PCR-Zyklus erhöht, steigt auch die Menge an interkaliertem Farbstoff. Die Erhöhung des Fluoreszenzsignals mit

jedem Zyklus kann in Echtzeit quantifiziert werden und gibt einen zeitlichen Aufschluss über die Menge des amplifizierten PCR-Produktes [105]. Als endogene Kontrolle wird eine 18s-rRNA-Oligonukleotidsonde verwendet. Das Gen, das für die 18s-rRNA ribosomale Untereinheit codiert, gilt als Haushaltsgen, da es von eukaryotischen Zellen konstant exprimiert wird. Daher wird es als Kontrolle und zur Normierung der Genexpression genutzt. Die Sonde ist an die entsprechende Sequenz der einzelsträngigen DNA gebunden und wird durch die 5'-Nukleaseaktivität der DNA-Polymerase gespalten. Durch Wegfall der Sonde erhöht sich das Fluoreszenzsignal. Die Stärke des Signals erhöht sich in Abhängigkeit zum synthetisierten PCR-Produkt pro PCR-Zyklus.

2.2.3.1. RNA-Isolation

Zunächst werden die Zellen geerntet und die gesamte Menge an RNA (total RNA) extrahiert. Der Vorgang der RNA-Isolierung erfolgt mithilfe des NucleoSpin® RNA Kits (NucleoSpin RNA, Mini kit for RNA purification) unter Vorgaben der Benutzeranleitung des Herstellers.

2.2.3.2. cDNA-Synthese

Der folgende Schritt beinhaltet die Synthese der komplementären DNA (engl. complementary DNA (cDNA)). In dem Vorgang der reversen Transkription wird die einzelsträngige RNA in doppelsträngige, komplementäre DNA umgeschrieben. Unter Verwendung von sogenannten Random Hexamer Primern, die an die einzelsträngige RNA hybridisieren, ist es dem Enzym reverse Transkriptase möglich, die cDNA zu synthetisieren. Für die Synthese der cDNA wird 1 µg der isolierten tRNA in 11 µl H₂O verdünnt und 1 µl der Random Hexamer Primer hinzugegeben. Bei 65 °C werden die Proben für 5 min inkubiert. Im Anschluss werden die Proben auf Eis gekühlt und der Ansatz für die cDNA-Synthese hinzugegeben (**Tabelle 13**).

Komponente	Volumen pro Ansatz
5x RT Buffer	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor	1 µl
10 mM dNTP	2 µl
RevertAid H Minus Reverse Transcriptase	1 µl
Gesamtvolumem	8 µl

Tabelle 13: Zusammensetzung des Ansatzes für die cDNA-Synthese

Die Temperaturen für die weitere Inkubation zur cDNA-Synthese sind der **Tabelle 14** zu entnehmen. Für die cDNA-Synthese wird der Thermocycler vapo.protect™ von Eppendorf verwendet.

Temperatur	Inkubationsdauer
25 °C	5 min
42 °C	60 min
70 °C	5 min

Tabelle 14: Programm für die cDNA-Synthese

Im Anschluss werden die Proben in einem Volumenverhältnis von 1:2 mit dH₂O verdünnt.

2.2.3.3. RT-qPCR

Im nächsten Schritt wird die cDNA der jeweiligen Proben auf eine 96 Well Lightcycler Platte transferiert und die Ansätze für SYBR-Green und für die 18s-rRNA-Sonde hinzugegeben (siehe **Tabelle 15: Zusammensetzung Reaktionsansatz Sonde und SYBR-Green für die qRT-PCR**). Die Platte wird mit der Verschlussfolie (LightCycler® 480 Sealing Foil) verschlossen. Die genutzten qPCR-Primer sind der **Tabelle 11** zu entnehmen. Die Durchführung erfolgte mittels ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System und die Daten wurden mit Microsoft Excel ausgewertet.

Ansatz: Sonde 18s-rRNA	Ansatz: SYBR-Green
10 µl 2x Taqman Mastermix	10 µl 2x SYBR-Green Mastermix
2 µl sense Primer [200 nM]	3 µl sense Primer [300 nM]
2 µl antisense Primer [200 nM]	3 µl antisense Primer [300 nM]
1 µl Sonde [100 nM]	2 µl H ₂ O
3 µl H ₂ O	
2 µl cDNA [50 ng]	2 µl cDNA [50 ng]

Tabelle 15: Zusammensetzung Reaktionsansatz Sonde und SYBR-Green für die qRT-PCR

2.2.4. Western Blot

Mittels Western Blot können Antigene spezifischer Proteine identifiziert und visualisiert werden. Das Blotting (engl.: to blot, auf Deutsch: klecksen) bezeichnet den Transfer von Substanzen, in der vorliegenden Methode von Proteinen, auf Trägermembranen. Diese Blot-Technik wird auch Immunoblot genannt, weil spezifische Antikörper die Zielantigene innerhalb eines Proteingemisches detektieren. Die Methode lässt sich in mehrere Arbeitsschritte unterteilen, die im Folgenden beschrieben werden.

2.2.4.1. Zellyse und Messung der Proteinkonzentration

Die Zellen werden mechanisch mit Hilfe eines Zellschabers von der Kulturplatte gelöst und im Kulturmedium in ein Eppendorf Cup pipettiert. Nach Zentrifugation bei 2500 g werden die Überstände verworfen. Mit PBS wird das Zellpellet gewaschen und nach Zentrifugation abgesaugt. Das Pellet wird in ca. 150 µl radioimmunoprecipitation assay (RIPA)-Puffer resuspendiert. Der RIPA-Puffer wird auf Eis gelagert und vorab mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren supplementiert, um eine Proteindegradation zu vermeiden. Die Proben werden für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend im Ultraschallbad behandelt. Hierdurch werden die Zellmembranen zerstört, sodass die Proteinextraktion gesteigert wird. Bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit erfolgt eine erneute Zentrifugation der Proben. Die Überstände werden entnommen und in neue Eppendorf Cups überführt.

Im nächsten Schritt wird die Proteinkonzentration der einzelnen Proben ermittelt. Die Proben werden in Triplikaten auf eine 96-Well-Platte aufgetragen und gemäß Herstellerangaben des DC Protein Assay kits von Bio-Rad behandelt. Die Absorption wird bei einer Wellenlänge von 630 nm mithilfe des Mikroplatten-Messgerät Synergy HT von BioTek gemessen. Der Assay nach Bradford verwendet den Farbstoff Coomassie Brilliant blue G-250, welcher als Indikator für den Proteingehalt einer Probe dient. Nach Bindung an die Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes. Die Veränderung der Absorption verhält sich annähernd proportional zum Proteingehalt der Probe [106]. Zur Ermittlung der Proteinkonzentrationen wird eine Eichgerade mit BSA hergestellt. Dazu werden definierte Mengen an BSA in RIPA-Puffer gelöst und im gleichen Assay vermessen.

Die Proben werden mittels RIPA-Puffer jeweils verdünnt, um eine einheitliche Zielkonzentration bei einem Volumen von 75 µl zu erhalten. Es werden 25 µl des Auftragungspuffers (4x Roti®-Load 1) hinzugegeben. Die Proben werden mittels Vortexer gemischt und nachfolgend bei 95 °C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Nach dem Erhitzen werden die Proben erneut mittels Vortexer gemixt und zentrifugiert.

2.2.4.2. SDS-Gelelektrophorese

Um Zielproteine für Untersuchungen besser verfügbar zu machen, müssen die Proteingemische aufgetrennt werden. Mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) kann ein Proteingemisch anhand der Größe seiner einzelnen Proteine aufgetrennt werden. Die Proteinproben werden mit Natrium-Dodecyl-Sulfat (engl. sodium dodecyl sulfate, SDS) vermengt. Hierdurch erhält das Protein eine negative Ladung, welche die Eigenladung überwiegt. Die Bindung erfolgt in einem konstanten Verhältnis von Ladung zu Masse, da sich das SDS in einem stabilen Verhältnis an die Aminosäurekette anlagert. SDS denaturiert die Proteine und verhindert eine Protein-Protein-Bindung, sodass sich keine Quartärstrukturen ausbilden. Die Proben werden in dieser Arbeit mit 4x Roti®-Load 1, einem nach Lämmli modifizierten Protein-Gelladepuffer vermengt, der β-Mercaptoethanol enthält [107]. β-Mercaptoethanol trägt zur Denaturierung der Proteine bei, indem es die Disulfidbrücken löst. Somit nehmen Eigenladung und Form keinen Einfluss auf die Auftrennung. Nun werden die Proben auf das Polyacrylamidgel aufgetragen, an das eine Spannung angelegt wird. Die

negativ geladenen Proteine migrieren durch die Poren des Polyacrylamidgels innerhalb des elektrischen Feldes zur Anode. Die Migrationsgeschwindigkeit ist abhängig von der Porengröße, die abnimmt, je höher die verwendete Acrylamid-Konzentration ist. Zusätzlich wird die Geschwindigkeit durch die Größe der Proteine bestimmt. Hierdurch wird das Proteingemisch entlang seiner Laufstrecke aufgetrennt. Zur Bestimmung der Proteingröße wird gleichzeitig der Proteinmarker (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder) aufgetragen, der parallel zu den Proben migriert. In dem genutzten Protokoll zur Auftrennung mittels SDS-PAGE wird die diskontinuierliche Methode angewendet, bei der die aufgetragenen Proben zunächst durch ein Sammelgel und anschließend durch ein Trenngel migrieren [100].

Die Polyacrylamidgele werden in Glasplatten gegossen, wobei erst das Trenn- und anschließend das Sammelgel angefertigt wird. Die Glasplatten werden mit Klammern aneinandergedrückt und in ein Gelgerüst eingesetzt. In die durch Abstandshalter präformierte Lücke werden die Gele gegossen, dessen Bestandteile der Tabelle 10 zu entnehmen sind. Vorab werden für die Zubereitung die entsprechende Menge Acrylamid, Wasser und Puffer in ein Falcon gegeben. Durch die Hinzugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APS) wird die Reaktion der Polymerisierung gestartet und durch Tetramethylethylenediamin (TEMED) katalysiert. Das APS ist einer Stock-Lösung entnommen, in der 10 % APS in dH₂O gelöst sind. Nun wird das noch flüssige Gel zwischen die Glasplatten gegossen und mit Ethanol bedeckt. Nach Polymerisierung des Trenngels wird das Ethanol entfernt und das flüssige Sammelgel hinzugegeben. Nun wird zwischen die Glasplatten von oben ein Kamm in das Sammelgel eingeführt, der Ladungstaschen in das Gel formt. Die polymerisierten Gele werden in die mit SDS-Puffer gefüllten Kammersysteme von BioRad überführt und mit den Proben beladen. Zum Start der Elektrophorese wird für die Migration durch das Sammelgel eine Spannung von 80 V und für das Trenngel eine Spannung von 120 V angelegt.

2.2.4.3. Proteintransfer

Die nun nach Größe aufgetrennten Proteine können im Rahmen der Western-Blot-Methode von dem Acrylamid-Gel auf eine Trägermembran übertragen werden, um immunologische Nachweisverfahren durchzuführen. Als Trägermembran wird eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran genutzt. Die PVDF-Membran wird in 100 % Methanol (MeOH) für wenige

Sekunden aktiviert und luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Gel und Membran werden von beiden Seiten von Whatman-Papier und Schwämmen umgeben und anschließend in die Transferkassette überführt. Die Transferkassette wird in eine Kammer mit 4 °C-kaltem 1x-Transfer-Puffer überführt, dem 15 % MeOH beigefügt werden. Nun wird erneut eine Spannung angelegt und ein elektrisches Feld erzeugt, wodurch die Proteine senkrecht zum vorherigen Migrationsfeld zur Anode, d.h. von dem Acrylamid-Gel zur PVDF Membran wandern. Der Vorgang des Blottens erfolgt für 1 h bei 100 V sowie 350 mA pro Membran und findet bei 4 °C in einer Kältekammer statt.

2.2.4.4. Proteindetektion

Zielproteine lassen sich in immunologischen Nachweisverfahren unter Verwendung von spezifischen Antikörpern nachweisen. Die Antikörper binden an ein proteinspezifisches Epitop innerhalb eines Proteingemisches, das auf die PVDF-Membran geblottet wurde. An diesen Komplex können nun sekundäre Antikörper binden, welche an Enzyme konjugiert sind, die eine Chemilumineszenz-Reaktion katalysieren. Das Lumineszenz-Signal wird erzeugt, in dem das konjugierte Enzym, die Meerrettich-Peroxidase (engl. horseradish peroxidase, HRP), nach Hinzugabe von Wasserstoffperoxid die Oxidation von Luminol katalysiert. Die freigesetzte Lumineszenz kann auf Röntgenfilmen visualisiert werden. Das Enzym kann mehrere Substrate umsetzen und dadurch das Signal amplifizieren.

Die PVDF-Membran wird für 30 min in 5 %-Trockenmilch in 1x-TBS-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Das Ziel ist es, unspezifische Proteinbindestellen der Membran zu blockieren. Anschließend wird die milchhaltige Blockierlösung entfernt und die Membran dreimal für je 5 min mit 1x-TBS-Puffer gewaschen. Nun wird zur Detektion der Zielproteine der entsprechende Primärantikörper hinzugegeben und die Membran hierin über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wird am Folgetag der Antikörper entfernt und die Membran dreimal für 10 min mit 1x-TBS-Puffer und 0,05 % Tween 20 (TBST) gewaschen. Hierdurch werden ungebundene Antikörper-Reste entfernt. Anschließend wird der Sekundärantikörper hinzugegeben. Primär- und Sekundärantikörper sind in der Tabelle 3 gelistet. Bei Raumtemperatur wird die Membran hierin für 1 h inkubiert. Nachfolgend wird die Membran wieder dreimal für 10 min mit 1x-TBS-Puffer gewaschen. In einem Dunkelraum

wird die Membran in einem 1:1-Volumenverhältnis für 5 min mit der Peroxid-Lösung und der Luminol-Enhancer-Lösung (Clarity™ Western ECL Substrate Kit) inkubiert. Die Membran wird gegenüber einem Film der Firma Amersham Hyperfilm™ ECL exponiert und das Signal anschließend visualisiert.

2.2.5. Durchflusszytometrie

Für die Experimente zur Durchflusszytometrie wurde das Gerät BD FACSCanto™ II der FACS Core Facility Berg (Tübingen) genutzt. Das Akronym FACS steht für fluorescence-activated cell sorting.

2.2.5.1. Zellzyklusuntersuchung mittels Propidiumiodid-Färbung

Die Methode der Propidiumiodid-Färbung kann benutzt werden, um die verschiedenen Zyklusphasen einer Zellpopulation darzustellen. Dies gelingt durch die Verwendung von Substanzen, welche die DNA färben. Hierdurch kann der DNA-Gehalt einer Zelle ermittelt und Rückschlüsse auf die Verteilung der Zellzyklusphasen innerhalb einer Zellpopulation gezogen werden. Als Färbesubstanz wird in der vorliegenden Arbeit Propidiumiodid genutzt. Das Propidiumiodid kann die intakte Zellmembran nicht durchdringen, aber sich nach Destruktion der Lipiddoppelschicht, beispielsweise durch EtOH, an die dsDNA oder auch dsRNA der Zelle binden. Dabei interkaliert der Farbstoff unspezifisch zwischen die Basen der Nukleinsäuren und steigert das Fluoreszenzsignal [108]. Um eine Bindung an dsRNA zu vermeiden, wird das Enzym RNase hinzugegeben, welches die dsRNA abbaut.

Die Zellen der beiden Kupffer-Zelllinien KUP5 und KC-13-2, der AML-12-Zelllinie sowie der Hepa-1-6-Zelllinie werden mit dem konditionierten Medium CM TG und konditionierten Kontrollmedium CM E für 24 h behandelt. Das Medium CM TG und CM E wurde in Hepa-1-6-Zellen generiert (2.2.2). Weiterhin wurden die KC-13-2 einer γ -Strahlung (20 Gy, Gammacell®) ausgesetzt und unmittelbar sowie nach Inkubation über 6 h und 24 h geerntet. Nach der Inkubation werden die Medien abgesaugt und in FACS-Röhrchen überführt. Die adhärenen Zellen werden nach Waschen mit PBS unter Hinzugabe von Trypsin/EDTA gelöst. Vorsichtig werden die Zellen resuspendiert und zum Abstoppen der Trypsinreaktion in das

korrespondierende Medium-enthaltende Röhrchen gegeben. Im Anschluss werden die Zellen zentrifugiert und die Überstände abgesaugt. Es folgt ein weiterer Waschschriff mit PBS, das nach erneuter Zentrifugation ebenfalls abgesaugt wird. Dem übriggebliebenen Zell-Pellet wird tröpfchenweise je 2 ml kaltes Ethanol (70 %, gelagert bei -20 °C) zugeführt. Die nun fixierten Zellen werden für 1 h auf Eis inkubiert oder bei -20 °C gelagert.

Zur Färbung werden die fixierten Zellen zentrifugiert und das Ethanol abgesaugt. Nun werden die Zellen erneut mit PBS gewaschen, welches nach Zentrifugation entfernt wird. Es wird eine PBS-Suspension hergestellt, welche die RNase A (c: 100 µg/ml) und das Propidiumiodid (c: 10 µg/ml) enthält. Das Zellpellet wird in dieser Suspension aufgenommen und für 30 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Nach Überführung in die FACS-Röhrchen werden die Proben gemessen. Pro Probe werden 10.000 Ereignisse gezählt. In einer linearen oder logarithmierten Darstellung wird die Zellanzahl ins Verhältnis zu ihrem DNA-Gehalt gesetzt. Im Anschluss wird die Auswertung mit der Software WinMD bzw. FlowJo Version 8.7 vorgenommen.

2.2.5.2. Aktivitätsmessung mittels dualer Reporterzelllinie (CHO-S21)

Die gentechnisch modifizierte CHO-K1 XBP-1::Turquoise/CHOP::GFP dual reporter (CHO-S21)-Zelllinie fungiert als duales Reportersystem, da sie jeweils ein Reporter gen unter der Kontrolle des Promotors für XBP-1 als auch für CHOP exprimiert. Durch Kopplung der Markergene Turquoise (modifiziertes cyan fluorescent protein (CFP)) an die Expression von XBP-1^s und green fluorescent protein (GFP) an die Expression von CHOP kann mittels Durchflusszytometrie die distinkte Aktivierung der beiden UPR-Arme PERK und IRE-1 auf Ebene der Transkription detektiert werden [87]. Der Name der CHO-Zellen ist ein Akronym für Chinese Hamster Ovary-Zellen. Ursprünglich wurden diese Zellen aus den Ovarien des Chinesischen Zwerghamsters gewonnen [109]. CHO-S21-Zellen werden für die Durchführung von Experimenten auf einer 6-Well-Platte ausgesät. Die Zellen werden mit PBS gewaschen und nach dem enzymatischen Detachment mit Trypsin/EDTA in die Medium-enthaltenden FACS-Röhrchen überführt. Für die Messung der CHO-S21-Zellen werden 10.000 Ereignisse gezählt. Es werden die Farbkanäle der Fluorochrome GFP und Alexa Fluor 405 benutzt. Die Auswertung wird mit der Software FlowJo Version 8.7 durchgeführt.

2.2.6. Erstellung der Grafiken

Die Grafiken der Abbildungen 1 bis 4 und Abbildung 12 wurden mithilfe der Software Wondershare EdrawMax (Version 10.5.3) erstellt. Die übrigen Grafiken – einschließlich der Abbildungen Abbildung 5, Abbildung 6, Abbildung 20, Abbildung 21 und Abbildung 29 – wurden mit der Software Microsoft® PowerPoint (Version 15.39) angefertigt.

3. Ergebnisse

3.1. Expression von ER Stress-Markern in BNL CL.2, Hepa-1-6, KC-13-2 und KUP5 nach Behandlung mit Thapsigargin

Für die Untersuchung des Phänomens der ER Stress-Transmission im Kontext von Leber- bzw. Kupffer Zellen wurden zunächst geeignete Zelllinien zur Etablierung eines *in vitro*-Modells ausgewählt. Hierfür wurden immortalisierte murine Leber- bzw. HCC-Zellen sowie Kupffer Zellen mit dem chemischen ER Stress-Induktor Thapsigargin behandelt und die Modulation der ER Stress-Antwort gemessen. In diesem Experiment wurden die Zelllinien BNL CL.2, Hepa-1-6, KUP5 und KC-13-2 eingesetzt. Die Zelllinie BNL CL.2 ist eine immortalisierte, murine Leberzelllinie, die aus embryonalen Leberzellen der murinen Zuchtlinie BALB/c extrahiert wurde und keine tumorigenen Eigenschaften aufweist [86]. Hingegen entstammt die Zelllinie Hepa-1-6 aus HCC-Zellen der männlichen Mauszuchtlinie C57/LJ [89]. Die murine Kupffer Zelllinie KC-13-2 wurde aus der Leber einer transgenen Maus der Zuchtlinie C57BL/10 isoliert. Die Strategie zur Immortalisierung dieser Linie basiert auf der Expression der thermolabilen Mutante tsA58 des Simian Virus 40 large T Antigen, welche unter Kontrolle eines H-2K^b Promotors steht [91]. Die Zelllinie KUP5 ist ebenfalls murinen Ursprungs. Die Primärkultur dieser Kupffer Zelllinie wurde initial aus der Leber der Zuchtlinie C57BL/6 extrahiert und durch retrovirale Transduktion mit dem humanen Onkogen c-myc immortalisiert [92].

Die Zelllinien BNL CL.2, Hepa-1-6, KUP5 und KC-13-2 wurden für 2 h mit Thapsigargin in zwei Konzentrationen oder der Vehikelkontrolle EtOH behandelt. Die Expression der ER Stress-Marker BiP, ATF-4 und GADD34 wurde mittels RT-qPCR ermittelt, in Bezug zur 18s-rRNA normalisiert und in Relation zu den mit EtOH behandelten Zellen gesetzt. Hierbei bezieht sich die relative Expression der einzelnen ER Stress-Marker auf die mit EtOH behandelten Zellen, denen die Bezugsgröße 1 zugeordnet wurde. Dieses Experiment wurde im Rahmen eines Pilot-Versuches einmal durchgeführt.

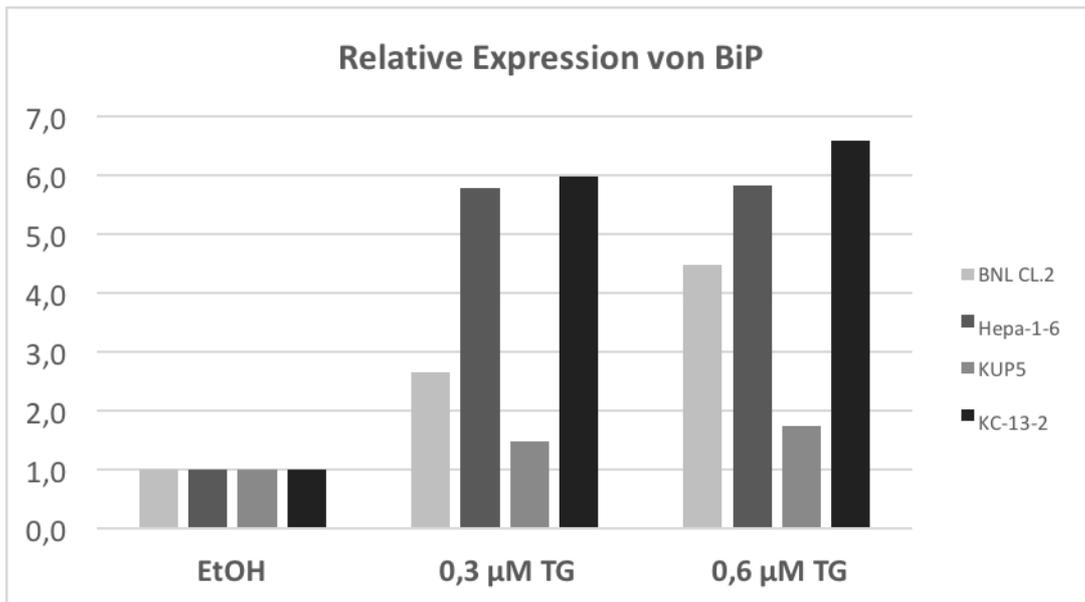


Abbildung 7: Relative Expression von BiP nach Behandlung mit Thapsigargin in murinen Hepatozyten und Kupfer Zellen

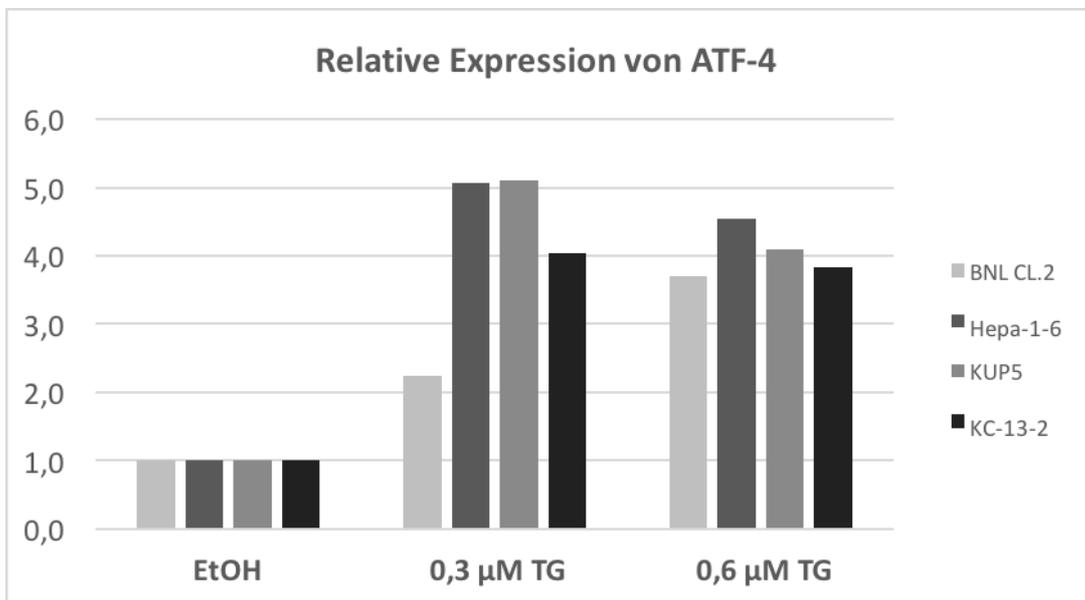


Abbildung 8: Relative Expression von ATF-4 nach Behandlung mit Thapsigargin in murinen Hepatozyten und Kupfer Zellen

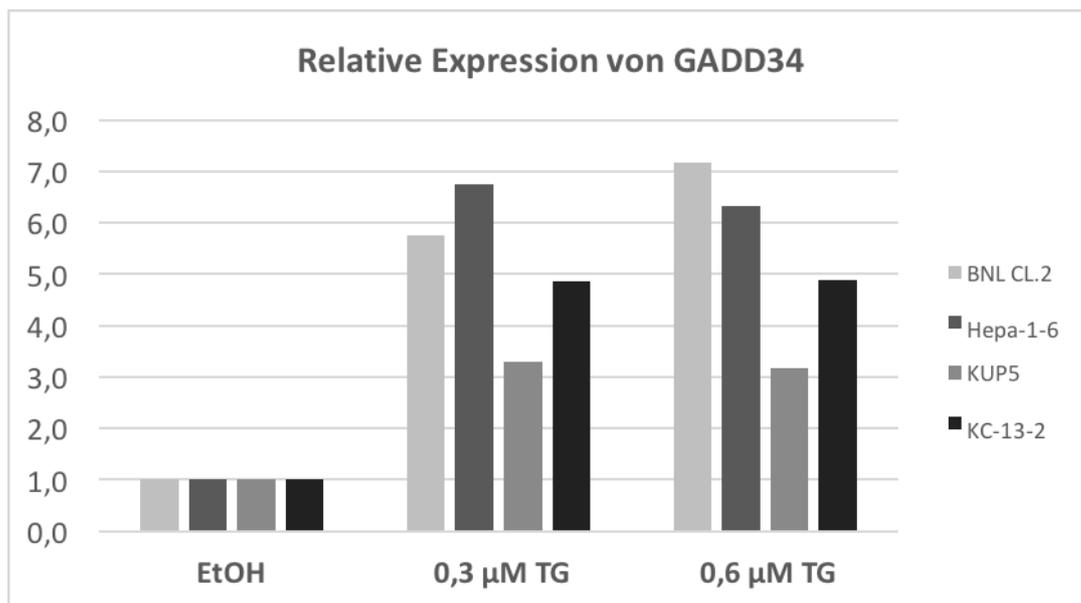


Abbildung 9: Relative Expression von GADD34 nach Behandlung mit Thapsigargin in murinen Hepatozyten und Kupffer Zellen. Die Zelllinien BNL CL.2, Hepa-1-6, KUP5 und KC-13-2 wurden ausgesät und mit Thapsigargin in den Konzentrationen C_{TG1} : 0,3 µM und C_{TG2} : 0,6 µM sowie EtOH für 2 h behandelt. Die Proben wurden geerntet, die totale RNA extrahiert und nach der cDNA-Synthese die Expression der ER Stress-Marker BiP, ATF-4 und GADD34 mittels RT-qPCR ermittelt. Die jeweilige Expression der ER Stress-Marker wurde zur Expression des Haushaltgenes 18s-rRNA normalisiert und in Relation zur Expression der EtOH-Kontrolle gesetzt. Den mit EtOH behandelten Zellen wurde die Bezugsgröße 1 zugeordnet. Die relative Expression wurde in den **Abbildungen 3-5** dargestellt.

In den Abbildungen 3, 4 und 5 wurde die relative Expression der mRNA von BiP, ATF-4 und GADD34 dargestellt. Thapsigargin induzierte in den vier Zelllinien alle der hier untersuchten ER Stress-Marker. Die Marker BiP und ATF-4 wurden in der murinen HCC-Zelllinie Hepa-1-6 stärker als in der Leberzelllinie BNL CL.2 exprimiert. Im Vergleich der murinen Kupffer Zellen unter einander wurde BiP und GADD34 nach Behandlung mit Thapsigargin stärker in KC-13-2 induziert als in der Zelllinie KUP5. Auch wurde BiP in KUP5 nur unwesentlich stärker nach Behandlung mit Thapsigargin im Vergleich zur Kontrolle exprimiert (s. Abbildung 3).

Als Donorzelllinie wird in dieser Arbeit eine Zelllinie bezeichnet, die nach Behandlung mit einem ER Stress-Induktor, z.B. Thapsigargin, ein konditioniertes Medium generiert. Die Zelllinie Hepa-1-6 wurde für die folgenden Experimente als Donorzelllinie ausgewählt, da sie eine stärkere Expression von BiP und ATF-4 im Vergleich zu den BNL CL.2-Zellen nach ER Stress-Induktion aufwies. Außerdem wurde in den weiteren Untersuchungen die Zelllinie

KC-13-2 als Akzeptorzelllinie verwendet, da die KC-13-2 im Vergleich zu den KUP5-Zellen BiP stärker nach der Behandlung mit Thapsigargin induzierte. Als Akzeptorzelllinien werden die naiven, d.h. primär unbehandelten Zelllinien bezeichnet, die in den konditionierten Medien inkubiert werden.

3.2. Proteinuntersuchung in KC-13-2 nach Behandlung mit konditionierten Medien

Die vorangegangenen Experimente zeigten, dass BiP und Marker des UPR-Armes PERK in Hepa-1-6 und KC-13-2 auf Ebene der Transkription induzierbar sind. Um das in *vitro*-Modell analog der Arbeiten von Mahadevan et al. zu adaptieren [69], wurde zunächst ein durch Hepa-1-6-Zellen konditioniertes Medium generiert. Anschließend wurden die Überstände der Zellen, die einen Thapsigargin-induzierten ER Stress erfuhren, auf naive Kupffer Zellen übertragen. Auf Ebene der Translation wurde dann mittels Western Blot untersucht, ob das konditionierte Medium eine *de novo*-Aktivierung von ER Stress-Markern in KC-13-2 bewirkt.

Die Generierung des konditionierten Mediums CM TG und des konditionierten Kontrollmediums CM E erfolgte, wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, in Hepa-1-6-Zellen. Zusammengefasst wurden hierzu die Donorzellen mit Thapsigargin und als Kontrolle mit EtOH für 2 h behandelt. Es folgten die Entfernung der Thapsigargin- bzw. EtOH-haltigen Medien und zwei weitere Waschschrte mit PBS. Nachfolgend wurde frisches, unverbrauchtes Kulturmedium zu den Zellen gegeben. Hieran schloss sich eine Inkubationsphase von 16 h an, in der das Medium konditioniert wurde. Im Anschluss wurden die Medien CM TG und CM E auf unbehandelte, naive KC-13-2 transferiert und diese für 4 h und 16 h inkubiert. Zur Kontrolle der ER Stress-Induktion auf Proteinebene wurden die Kupffer Zellen ebenfalls für 4 h und 16 mit Thapsigargin ($C_{\text{final}}: 50 \mu\text{M}$) behandelt. Mittels Western Blot wurde die Expression des ER Stress-Markers GADD34 untersucht.

Thapsigargin induzierte die Expression von GADD34 in KC-13-2, wobei die Induktion nach 16 h stärker ausfiel als nach 4 h. Die Behandlung mit dem konditionierten Kontrollmedium CM E führte in KC-13-2 nicht zu einer Induktion der GADD34-Expression über das Ausmaß der basalen Expression – gemessen an den unbehandelten Zellen – hinaus (Abbildung 6, Spur 2

und 5 im Vergleich zu Spur 1). Jedoch führte die Inkubation der KC-13-2 in den Kulturüberständen CM TG für 4 h und 16 h zu einem Anstieg der Expression von GADD34 mit einer zeitabhängigen Zunahme der Expressionsstärke.

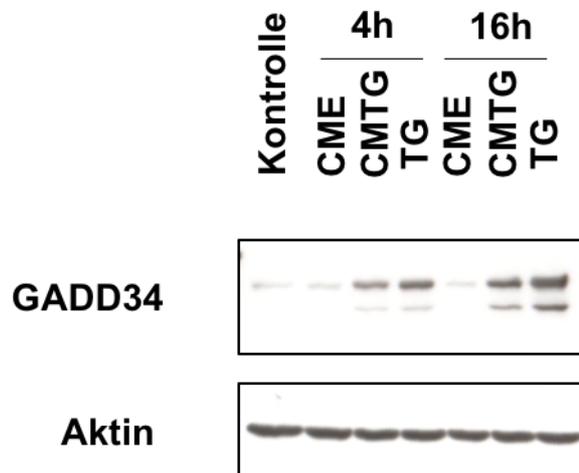


Abbildung 10: Expression von GADD34 in KC-13-2 nach Behandlung mit CM E, CM TG und Thapsigargin. KC-13-2 wurden für 4 h und 16 h mit den konditionierten Medien CM E und CM TG sowie mit Thapsigargin (C_{final} : 50 μ M) behandelt. Die Zellen wurden geerntet und ihre Proteine isoliert. Die Proteine wurden mittels Western Blot analysiert und die Expression von GADD34 im Vergleich zur Ladekontrolle Aktin dargestellt.

3.3. Proteinuntersuchung in Akzeptor- und Donorzellen nach Behandlung mit konditionierten Medien

In den Kupffer Zellen löste die Inkubation in Überständen von Thapsigargin-behandelten HCC-Zellen ER Stress aus und führte zur Expression von GADD34. Somit sind KC-13-2 als Akzeptorzellen in der Lage ein transmittiertes Signal von Donorzellen zu empfangen. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Donorzellen Hepa-1-6 ebenfalls als Akzeptorzellen fungieren und nach Behandlung mit konditionierten Medien Marker einer ER Stress-Antwort exprimieren können. Hierfür wurde CM E und CM TG in Hepa-1-6-Zellen generiert und auf naive, unbehandelte Hepa-1-6-Zellen transferiert. Zur Kontrolle der Aktivität der konditionierten Medien wurden zeitgleich KC-13-2-Zellen behandelt. Im vorangegangenen Experiment zeigte sich eine Zunahme der Expression von GADD34 nach Behandlung mit CM TG in KC-13-2 im Zeitverlauf. Daher wurden nun Hepa-1-6 und KC-13-2 in den konditionierten Medien inkubiert und jeweils nach einem Behandlungsintervall von 4 h, 8 h,

16 h und 24 h geerntet. Nach Extraktion der Proteine, wurde die Expression des Transkriptionsfaktors ATF-4 mittels Western Blot analysiert.

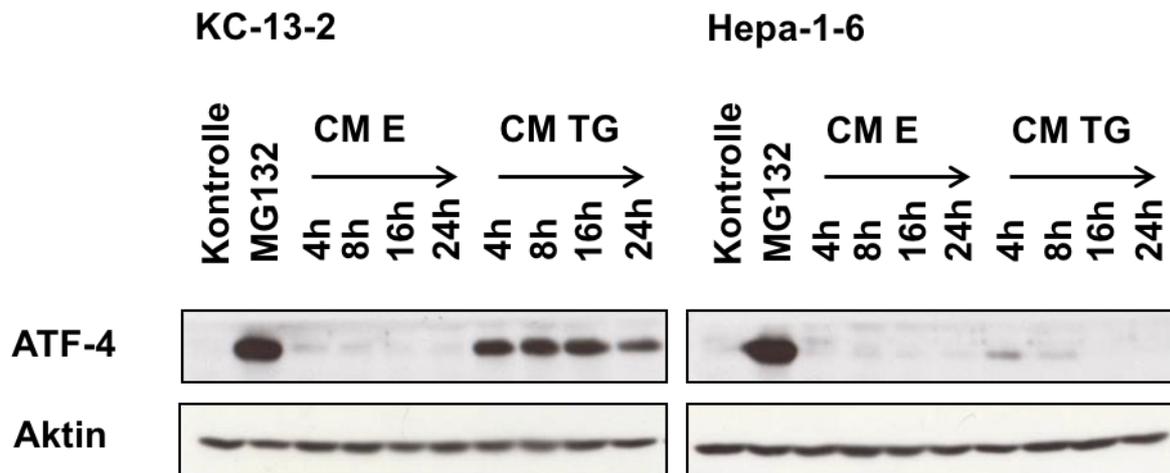


Abbildung 11: Expression von ATF-4 in KC-13-2 und Hepa-1-6 nach Behandlung mit CM E und CM TG. KC-13-2 und Hepa-1-6 wurden ausgesät und am Folgetag für 4 h, 8 h, 16 h und 24 h in den konditionierten Medien CM E und CM TG inkubiert. Zur Kontrolle der ER Stress-Induktion wurden die KC-13-2 und Hepa-1-6 für 4 h mit MG132 (C_{final} : 25 μ M) behandelt. Die Zellen wurden geerntet und ihre Proteine extrahiert. Mittels Western Blot werden die Proben analysiert und die Expression von ATF-4 im Vergleich zur Expression von Aktin dargestellt.

MG132 wurde als Kontrolle eingesetzt und induzierte eine deutliche Expression von ATF-4 in beiden Zelllinien. Die Behandlung mit dem konditionierten Kontrollmedium CM E löste keine ER Stress-Antwort in KC-13-2 und Hepa-1-6 aus. Nach Behandlung mit dem konditionierten Medium CM TG stieg die Expression von ATF-4 in den KC-13-2 an – analog der im vorangegangenen Experiment beobachteten verstärkten Expression von GADD34. Die transferierten Medien CM TG führten in den Hepa-1-6 Zellen hingegen nicht zu einer relevanten Expression von ATF-4.

Die Kupfer Zelllinie wurde in diesem Experiment als rezeptierende Akzeptorzelllinie bestätigt. Die Hepa-1-6-Zellen scheinen in der Lage zu sein, als Donorzelllinie ein Medium nach Behandlung mit Thapsigargin zu generieren, welches in naiven KC-13-2, nicht jedoch in naiven Hepa-1-6-Zellen, ER Stress auslöst.

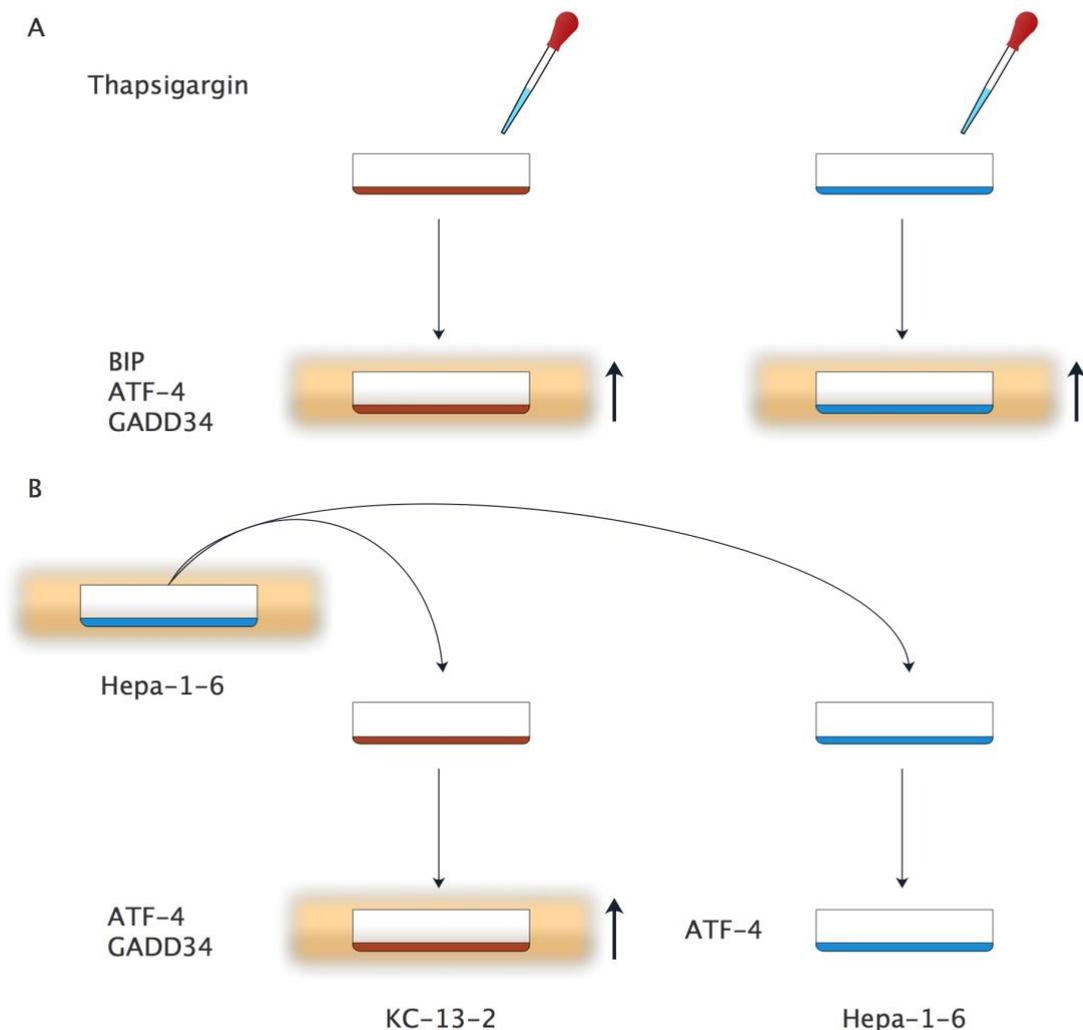


Abbildung 12: Zwischenergebnis – Messung der ER Stress Induktion in KC-13-2 und Hepa-1-6 nach Behandlung mit Thapsigargin und nach Behandlung mit dem konditionierten Medium CM TG. A Die Behandlung mit Thapsigargin führt in den Zelllinien KC-13-2 und Hepa-1-6 zur Induktion der ER Stress Marker BIP, ATF-4 und GADD34. **B** Die Inkubation von naiven KC-13-2 und Hepa-1-6 in den Überständen der vorab mit Thapsigargin behandelten Hepa-1-6 Zellen führt in den KC-13-2 zur Induktion von ATF-4 und GADD34. Das konditionierte Medium CM TG führt in den naiven Hepa-1-6 nicht zu einer messbaren ER Stress-Antwort.

3.4. Zellzyklusuntersuchung in KC-13-2, KUP5, Hepa-1-6 und AML-12 nach Behandlung mit konditionierten Medien

Die Kupfer Zelllinie KC-13-2 ist sensitiv gegenüber der Behandlung mit dem konditionierten Medium CM TG, da es eine *de novo*-UPR-Antwort auslöst. Hingegen kann die Donorzelllinie Hepa-1-6 zwar das ER Stress-Signal über den Transfer der Überstände an Kupfer Zellen

transmittieren, jedoch führt der Transfer auf naive Hepa-1-6-Zellen nicht zu einer ER Stress-Induktion. In den folgenden Versuchen wurde daher untersucht, ob die Behandlung mit den konditionierten Medien weitere Effekte auf die Zellen hat und, ob der Effekt auf die sensitive Zelllinie zelltypspezifisch ist. Zunächst wurde untersucht, welche Auswirkungen die Behandlung mit den konditionierten Medien auf den Zellzyklus von Kupffer Zellen hat – bevor weitere Zelllinien geprüft wurden.

Während eines Zellzyklus durchlaufen Zellen die Synthese (S)-Phase und die Mitose (M)-Phase, zwischen denen die beiden Gap-Phasen G_1 und G_2 liegen. Der DNA-Gehalt der Zelle variiert je nach Phase, in der sich die Zelle befindet. In der S-Phase wird der DNA-Gehalt der Zelle verdoppelt und in der M-Phase wieder halbiert, da die Zelle während der Zellteilung den jeweils gleichen Chromosomensatz an die Tochterzellen weitergibt. Die Veränderung des DNA-Gehaltes in Zellen gibt darüber Aufschluss, in welcher Phase des Zyklus sich eine Zelle befindet. Mittels Propidiumiodid (PI)-Färbung gefolgt von einer durchflusszytometrischen Untersuchung kann der DNA-Gehalt einer Zelle ermittelt werden. Der Farbstoff interkaliert in die DNA, verändert das Absorptionsspektrum und verstärkt in Abhängigkeit zur DNA-Menge die Emission des fluoreszierenden Signals [110].

KC-13-2 wurden für 2 h, 4 h, 8 h, 16 h und 24 h in dem konditionierten Medium CM TG und dem konditionierten Kontrollmedium CM E inkubiert. Für die Kontrollen wurden KC-13-2 mit Thapsigargin und EtOH für je 2 h behandelt sowie Zellen einer γ -Strahlung (20 Gy) ausgesetzt und zu den Zeitpunkten 0 h, 6 h und 24 h nach Inkubation geerntet. Ionisierende Strahlung schädigt die DNA, indem Einzel- und Doppelstrangbrüche durch direkte und indirekte Effekte induziert werden [111]. Durch die Aktivierung von Reparatur- und Zellzyklus kontrollproteinen wird die Progression der Zelle innerhalb des Zellzyklus verlangsamt und Zellen in einzelnen Phasen, z.B. in G_2/M , arretiert [112]. Die Zellen wurden geerntet, mit dem Fluorochrom Propidiumiodid gefärbt und der DNA-Gehalt mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt.

KC-13-2

Behandlung mit konditionierten Medien

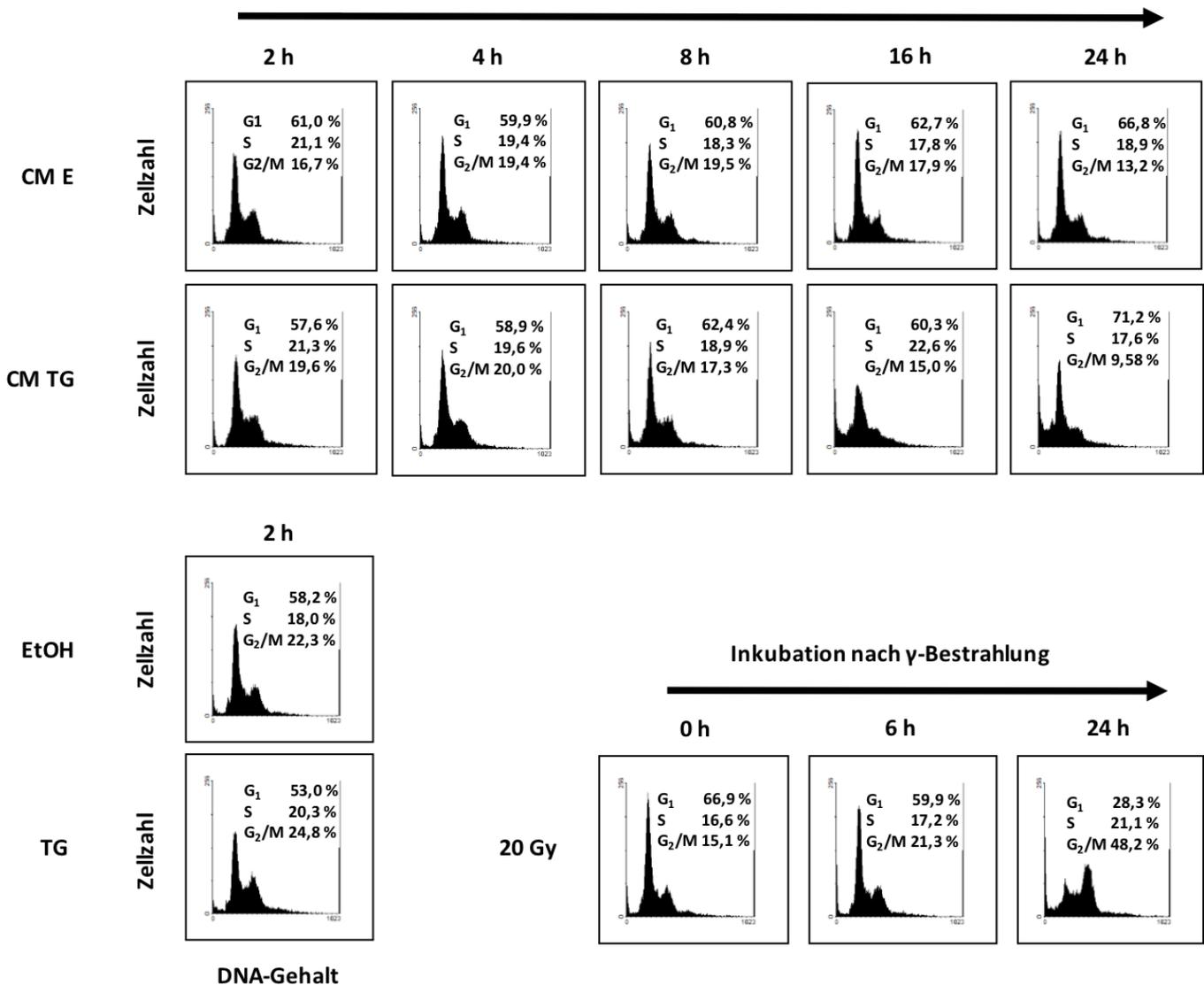


Abbildung 13: Zellzyklus-Untersuchung mittels Propidiumiodid-Färbung nach Behandlung mit konditionierten Medien. KC-13-2 wurden für 2 h, 4 h, 8 h, 16 h und 24 h in den konditionierten Medien CM E und CM TG inkubiert. Kontrollen wurden generiert, indem KC-13-2 für 2 h mit EtOH und Thapsigargin behandelt oder mit 20 Gy bestrahlt und nach 0 h, 6 h und 24 h geerntet wurden. Der Färbung mit Propidiumiodid folgte die durchflusszytometrische Messung. Das Histogramm zeigt den DNA-Gehalt und umfasst auf der X-Achse die Fluoreszenzintensität sowie die Anzahl auf der y-Achse.

Die Färbung mittels Propidium Iodid gibt Aufschluss über den DNA-Gehalt der Zelle sowie über die Verteilung einer Zellpopulation innerhalb einzelner Phasen im Verlauf Zellzyklus [110].

In Abbildung 13 wurde die Anzahl der Ereignisse in Abhängigkeit zum Fluoreszenzsignal unter Verwendung einer linearen Skalierung dargestellt. Der Fokus fiel auf die Verteilung der

Zellzyklusphasen G_1 , S und G_2/M . Die Konfiguration der Verteilung des DNA-Gehaltes der Zellen, die mit CM TG und dem konditionierten Kontrollmedium CM E behandelt wurden, entsprach der Konfiguration der nur mit EtOH behandelten Kontrolle. Eine Arretierung der Zellen in G_2/M wurde in den bestrahlten Zellen nach 20 h Inkubation festgestellt. Es zeigte sich eine Anreicherung der Sub- G_1 -Population nach 16 h bzw. 24 h Behandlung mit CM TG.

In der Sub- G_1 -Population erscheinen Zellen, deren DNA schlechter durch interkalierende Fluorochrome anfärbbar ist und deren Fluoreszenzsignal daher geringer als die der G_1 -Population ausfällt. Ein verringerter DNA-Gehalt lässt sich auch in sterbenden Zellen beobachten. Während der späten Phase der Apoptose entstehen DNA-Fragmente, die aus der permeabilisierten Zellmembran austreten können [113].

Für die Quantifizierung der Sub- G_1 -Population wurde das Experiment in Abwandlung wiederholt und das gemessene Fluoreszenzsignal unter Verwendung einer logarithmischen Skalierung dargestellt. Hierfür wurden die murinen Zelllinien KC-13-2, KUP5, Hepa-1-6 und AML-12 für verschiedene Zeiträume mit CM TG und dem konditionierten Kontrollmedium CM E behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und ihr DNA-Gehalt mittels Durchflusszytometrie gemessen.

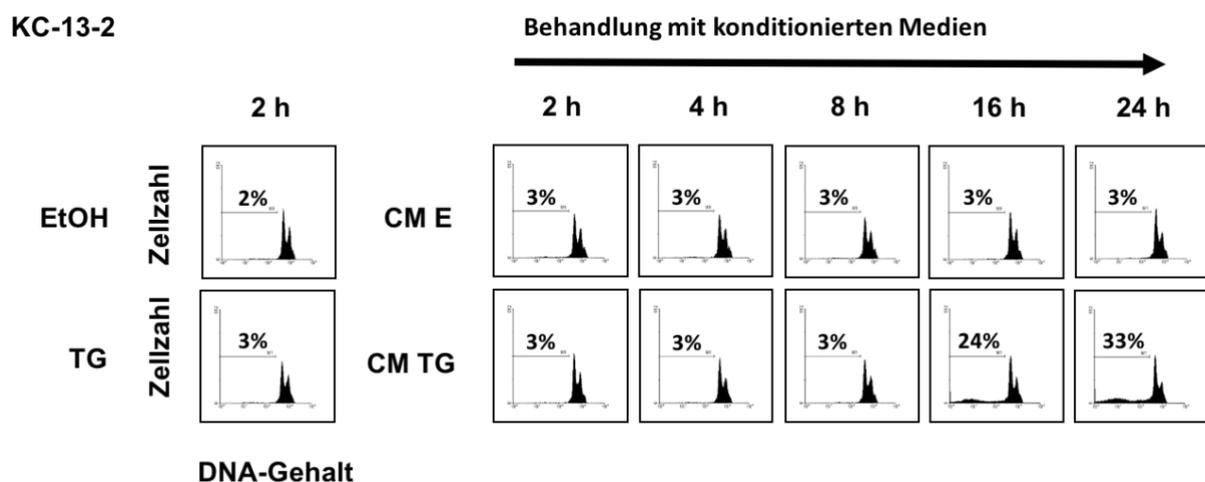


Abbildung 14: Untersuchung der Sub- G_1 -Population mittels Propidiumiodid-Färbung in KC-13-2 nach Behandlung mit CM E und CM TG

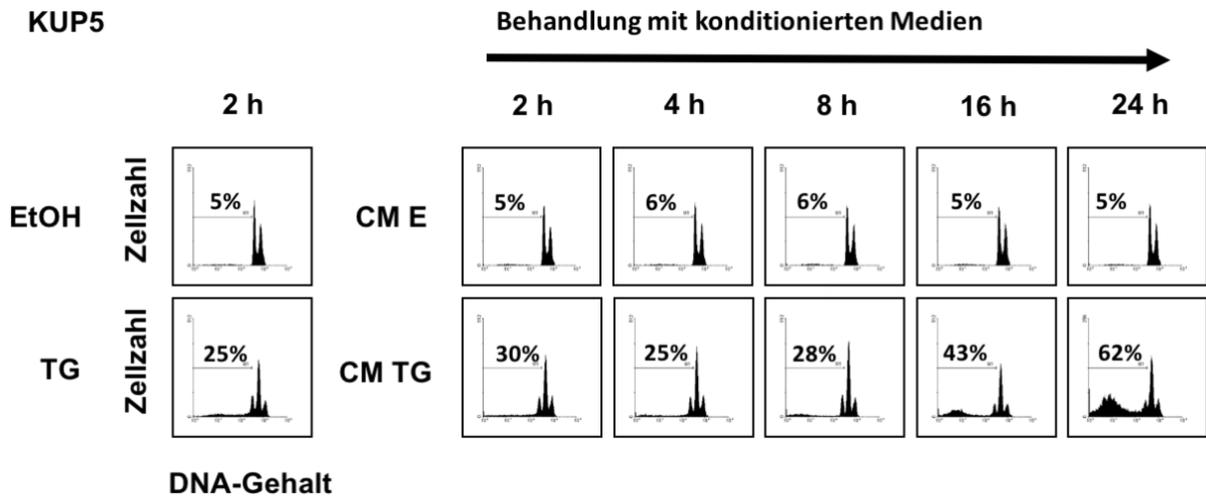


Abbildung 15: Untersuchung der Sub-G₁-Population mittels Propidiumiodid-Färbung in KUP5 nach Behandlung mit CME und CM TG

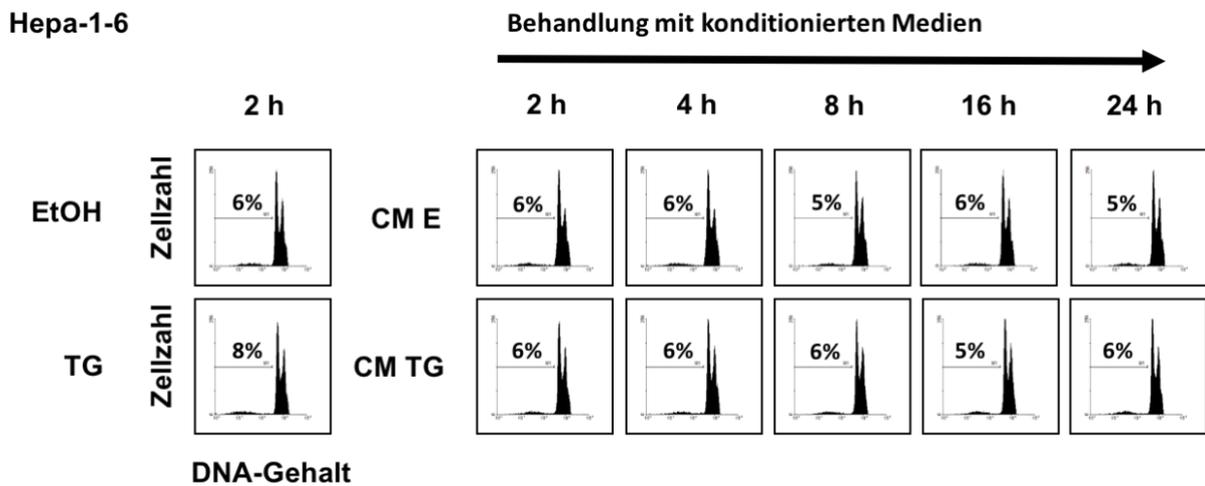


Abbildung 16: Untersuchung der Sub-G₁-Population mittels Propidiumiodid-Färbung in Hepa-1-6 nach Behandlung mit CME und CM TG

AML-12

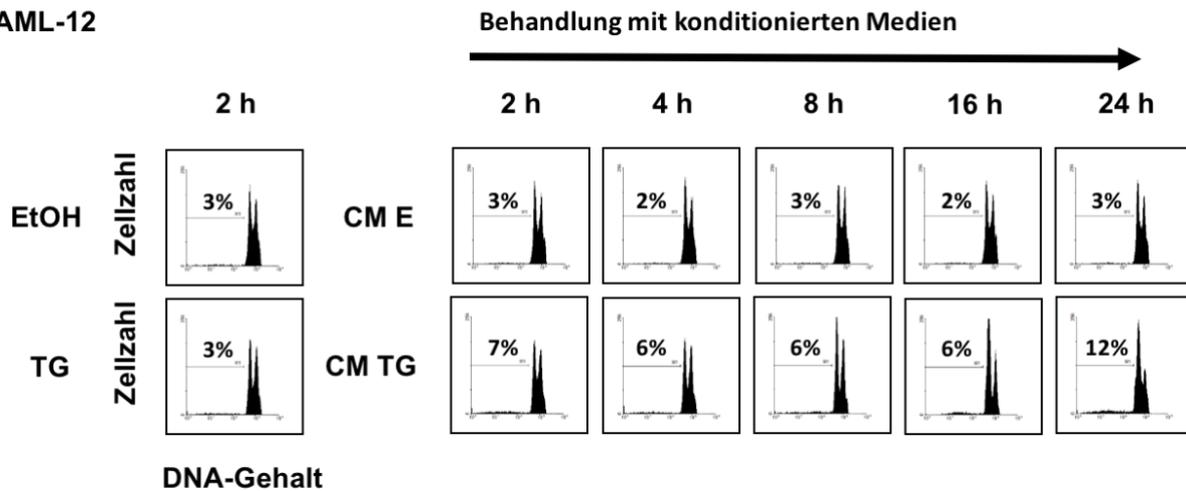


Abbildung 17: Untersuchung der Sub-G₁-Population mittels Propidiumiodid-Färbung in AML-12 nach Behandlung mit CM E und CM TG. KC-13-2, KUP5, Hepa-1-6 und AML-12 wurden ausgesät und für 2 h, 4 h, 8 h, 16 h und 24 h in den Kulturüberständen CM E und CM TG inkubiert oder mit EtOH und Thapsigargin (c: 0,6 µM) für 2 h behandelt. Der Färbung mit Propidiumiodid folgte die durchflusszytometrische Messung. Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz wurde horizontal, logarithmisch skaliert und die Anzahl der Ereignisse vertikal in einem Histogramm dargestellt. Die relative Größe der Sub-G₁-Populationen wird prozentual angegeben und in die Histogramme der getesteten Zelllinien in den **Abbildungen 14-17** eingefügt.

Die Behandlung mit dem konditionierten Medium CM TG erhöhte den prozentualen Anteil der Sub-G₁-Populationen in beiden Kupffer Zelllinien gegenüber der Behandlung mit dem konditionierten Kontrollmedium CM E deutlich. In den KC-13-2 stieg die Sub-G₁-Population nach 16 h bzw. 24 h Inkubation in den Überständen CM TG auf 24 % respektive 33 % an (s. Abbildung 14). Die Behandlung mit Thapsigargin und dem konditionierten Kontrollmedium CM E erhöhte den Anteil der Sub-G₁-Population nicht. Bereits die Inkubation in den Überständen CM TG für 2h führte zu einem Anstieg der Sub-G₁-Population in KUP-5 auf 30 % (s. Abbildung 15). Bei einer Inkubationsdauer von 24 h betrug die Sub-G₁-Population bereits 62 %. Die Behandlungen mit dem konditionierten Medium CM TG sowie dem konditionierten Kontrollmedium CM E lösten in den Hepa-1-6 keinen Anstieg dieser Population aus (s. Abbildung 16). Nach 24 h Inkubation in CM TG zeigte sich in den AML-12-Zellen ein geringer Anstieg der Sub-G₁-Population auf 12 % (s. Abbildung 17).

Die getesteten Kupffer Zell-Linien KC-13-2 und KUP5 waren unterschiedlich sensitiv gegenüber der Behandlung mit CM TG. Nach 24 h Behandlung mit CM TG war ein Großteil der

gemessenen Population der KUP5 bereits in der Sub-G₁-Korhorte zu verorten. Die Inkubation der Akzeptorzelllinie KC-13-2 in CM TG führte nicht nur zur Induktion von ER Stress-Markern, sondern auch zu Zelltod, gemessen an der Sub-G₁-Population. Die untersuchte Donorzelllinie Hepa-1-6 zeigte keine Änderung des Verhaltens innerhalb des Zellzyklus nach Behandlung mit dem Medium CM TG.

In naiven Kupffer Zellen führte die Behandlung mit dem konditionierten Medium CM TG zu ER Stress und Zelltod (s. Abbildung 10, 11 bzw. 13 und 14). Der Effekt ließ sich in den getesteten Leberzelllinien Hepa-1-6 nicht oder nur begrenzt in den AML-12 in Bezug auf die Sub-G₁-Population nach 24 h Behandlung nachweisen (s. Abbildung 1 und 16 bzw. 17). Dies könnte Hinweise auf eine zelltypabhängige Wirkung der ER Stress-Transmission geben.

3.5. Proteinuntersuchung in KC-13-2 nach Behandlung mit freien Fettsäuren

Die Hemmung der SERCA durch Thapsigargin führt zu einer robusten ER Stress-Antwort in Hepa-1-6-Zellen, dessen Signal nach Transfer der Überstände auf KC-13-2 übertragen werden kann. Die Induktion der ER Stress-Signalfade erfolgt durch Nutzung eines Pharmakons und basiert daher auf einem artifiziellen System [64]. Ein ER Stress-Induktor im pathophysiologischen Kontext von Erkrankungen, z.B. der NAFLD, ist die gesättigte Fettsäure Palmitat, die zu einer Depletion der Ca²⁺-Ionen-Speicher und zu Alterationen der ER Membran führen kann [57, 62].

3.5.1. Nach Behandlung mit Palmitat

Palmitat ist in wässrigen Lösungen, wie Zellkulturmedien, nur schwer löslich. Um Kulturmedien mit Palmitat anzureichern und *in vitro* eine gesteigerte Lipidkomposition des umgebenen Milieus für Kupffer Zellen zu simulieren, ist eine Konjugation an ein Protein, wie z.B. BSA, notwendig [95]. Palmitat wurde in einem molaren Verhältnis von 6,6:1 an BSA gemäß einem modifizierten Protokoll nach Spector konjugiert und in den folgenden Experimenten eingesetzt [96]. Als Konjugat für Palmitat und zur Kontrolle in der Zellkultur wurde endotoxin-freies BSA eingesetzt, welches von endogenen freien Fettsäuren gereinigt wurde. Die

Kulturmedien für die Behandlung mit dem Palmitat-BSA-Konjugat enthalten lediglich 1 % FCS [114].

Die murinen Kupffer Zellen wurden in aufsteigender Konzentration mit Palmitat und den korrespondierenden Volumina an BSA für 16 h behandelt. Die höchste eingesetzte Konzentration von c_{Palmitat} : 1000 μM führte zu unspezifischem Zelltod.

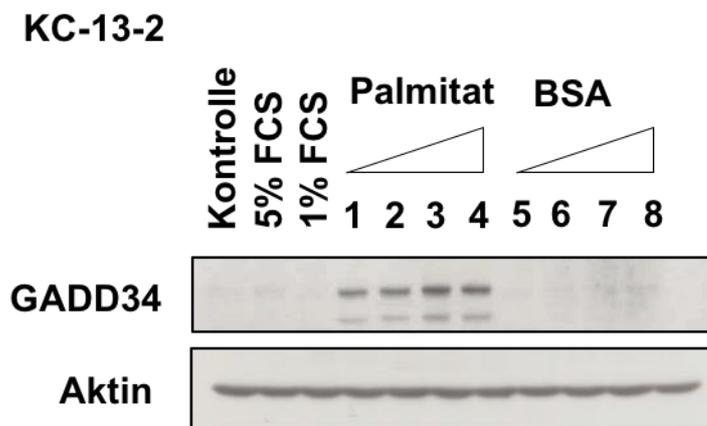


Abbildung 18: Expression von GADD34 in KC-13-2 nach Behandlung mit Palmitat. KC-13-2 wurden ausgesät und für 16 h in steigenden Konzentrationen mit dem Konjugat Palmitat/BSA und BSA behandelt. Die Nummerierungen 1-4 stellen die Konzentrationen in aufsteigender Reihenfolge c_{1-4} : 150 μM , 250 μM , 500 μM , 750 μM dar. Die Behandlung mit der Kontrolle BSA (Nummern 5-8) erfolgte in korrespondierenden Volumina, deren Konzentrationen ($c_{\text{BSA}5-8}$) ein molares Verhältnis zum konjugierten Palmitat von 1:6,6 ergeben. Die Proben wurden geerntet, die Proteine extrahiert und die Expression von GADD34 mittels Western Blot untersucht.

Die Proben wurden geerntet und nach Proteinextraktion die Expression von GADD34 mittels Western Blot untersucht. Das Palmitat/BSA-Konjugat führte in den Konzentrationen von c_1 : 150 μM , c_2 : 250 μM , c_3 : 500 μM und c_4 : 750 μM zu einer Expression von GADD34. Eine ER Stress-Induktion durch Behandlung mit BSA und den Medien mit reduziertem FCS-Gehalt zeigte sich nicht (s. Abbildung 18).

3.5.2. Nach kombinierter Behandlung mit Palmitat und Oleat

Eine Anreicherung der Kulturmedien mit dem Salz der gesättigten Fettsäure Palmitinsäure führt zu ER Stress in KC-13-2. Die Zusammensetzung der freien Fettsäuren im Serum von Menschen ist durch verschiedene Faktoren, wie der Diätform und des Insulinmetabolismus, bestimmt und kann variieren [115]. Zu den häufigsten freien Fettsäuren im menschlichen Plasma gehört neben der Palmitinsäure die ungesättigte freie Fettsäure Ölsäure. Palmitinsäure trägt mit ca. 27 % und Ölsäure mit ca. 31 % zur Gesamtmenge der freien Fettsäuren bei [116].

Durch Hinzugabe von Oleat wurde überprüft, ob sich die ER Stress-Antwort in Kupffer Zellen durch die mit Palmitat angereicherten Nährmedien modulieren lässt.

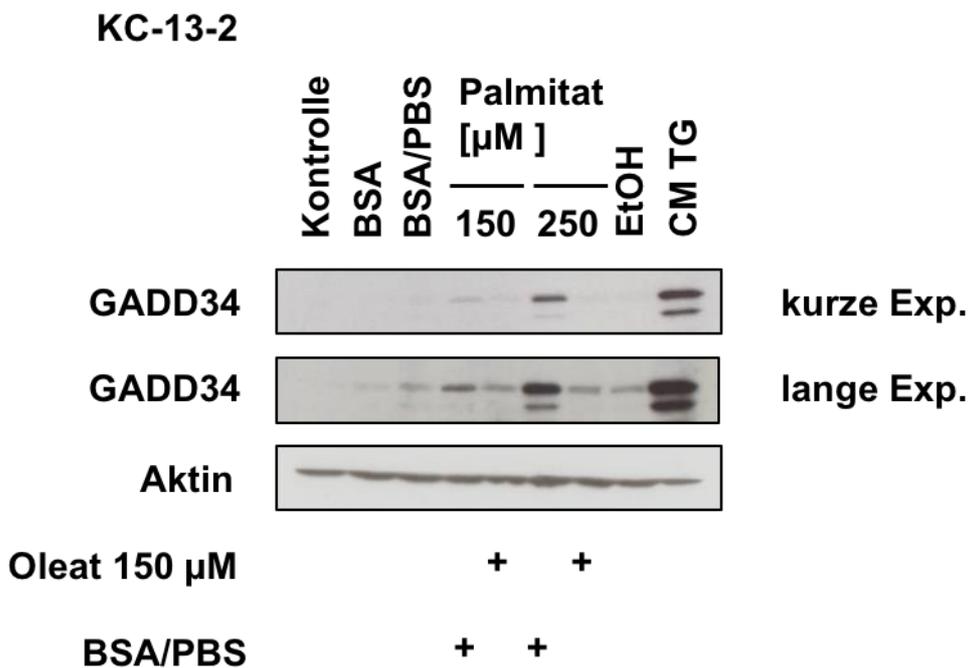


Abbildung 19: Expression von GADD34 in KC-13-2 nach kombinierter Behandlung mit Palmitat und Oleat. KC-13-2 wurden ausgesät und für 24h mit dem Palmitat/BSA-Konjugat ($C_{\text{Palmitat}1}$: 150 μM und $C_{\text{Palmitat}2}$: 250 μM) unter Hinzugabe von Oleat (C_{Oleat} : 150 μM) oder BSA/PBS behandelt. Als Positivkontrolle diente die Inkubation in CM TG. Die Proben wurden geerntet und die Expression von GADD34 in den extrahierten Proteinen mittels Western Blot dargestellt. Die Abbildung umfasst zwei unterschiedlich lange Expositionszeiten (Exp.).

Das kommerziell erhältliche Oleat ist an BSA konjugiert und in PBS gelöst. Die Kulturmedien wurden mit Palmitat/BSA in zwei Konzentrationen sowie mit Oleat in jeweils einer Konzentration angereichert und die Kupfer Zellen KC-13-2 hierin für 16 h inkubiert. In dem extrahierten Proteinlysate wurde die Expression von GADD34 mittels Western Blot analysiert. Die Kontrollen BSA und das in PBS gelöste BSA induzierte GADD34 nicht. Nach Behandlung mit Palmitat in der Konzentration $c_{\text{Palmitat}2}$: 250 μM und abgeschwächt in der Konzentration $c_{\text{Palmitat}1}$: 150 μM wurde in KC-13-2 GADD34 induziert. Die Hinzugabe von Oleat reduzierte die Expressionsstärke von GADD34 (s. Spuren 5 und 7, Abbildung 19). Hingegen minderte BSA/PBS die durch Palmitat-induzierte Expression von GADD34 nicht.

Die veränderte Zusammensetzung der Fettsäuren in Kulturmedien moduliert demnach die ER Stress-Antwort in KC-13-2.

3.6. Proteinuntersuchung in KC-13-2 und Hepa-1-6 nach Ko-Kultivierung

Die Inkubation der Kupfer Zellen in den konditionierten Medien aktiviert die UPR-Signalkaskaden. In dem bisher genutzten System wurden die Überstände von einer Petrischale nach Beendigung der Konditionierung in den Donorzellen auf die sensitiven Akzeptorzellen transferiert. Der Transfer dieser Medien ist artifiziell und bedingt eine räumliche und zeitliche Trennung der biologischen Effekte. Mit einem Zwei-Kompartiment-Zellkultursystem wird zwischen den Donor- und Akzeptorzellen eine räumliche Nähe erzeugt. Hierdurch können die Überstände stimulierter Donorzellen unmittelbar auf die benachbarten Akzeptorzellen einwirken.

3.6.1. Nach Behandlung mit Palmitat oder Glukosedeprivation

Zur Auslösung einer ER Stress-Antwort in den Donorzellen wurde als pathophysiologischer Stimulus die Behandlung mit Palmitat gewählt. Als weiterer Mechanismus zur ER Stress-Induktion wurde in einem separaten Experiment den Nährmedien der Donorzellen Glukose entzogen. Das Tumormikromilieu ist oft durch einen Mangel an Nährstoffen, insbesondere Glukose gekennzeichnet. Der Entzug an Glukose hat vielfältige Auswirkungen auf den

Zellmetabolismus und beeinträchtigt u.a. die Hexosaminbiosynthese. Durch die Akkumulation nicht korrekt glykolisierter Proteine wird ER Stress induziert [46].

Im folgenden Experiment wurden Hepa-1-6-Zellen mit beiden Konditionen behandelt und anschließend mit den KC-13-2 in einem Zwei-Kompartiment-Zellkultursystem kultiviert.

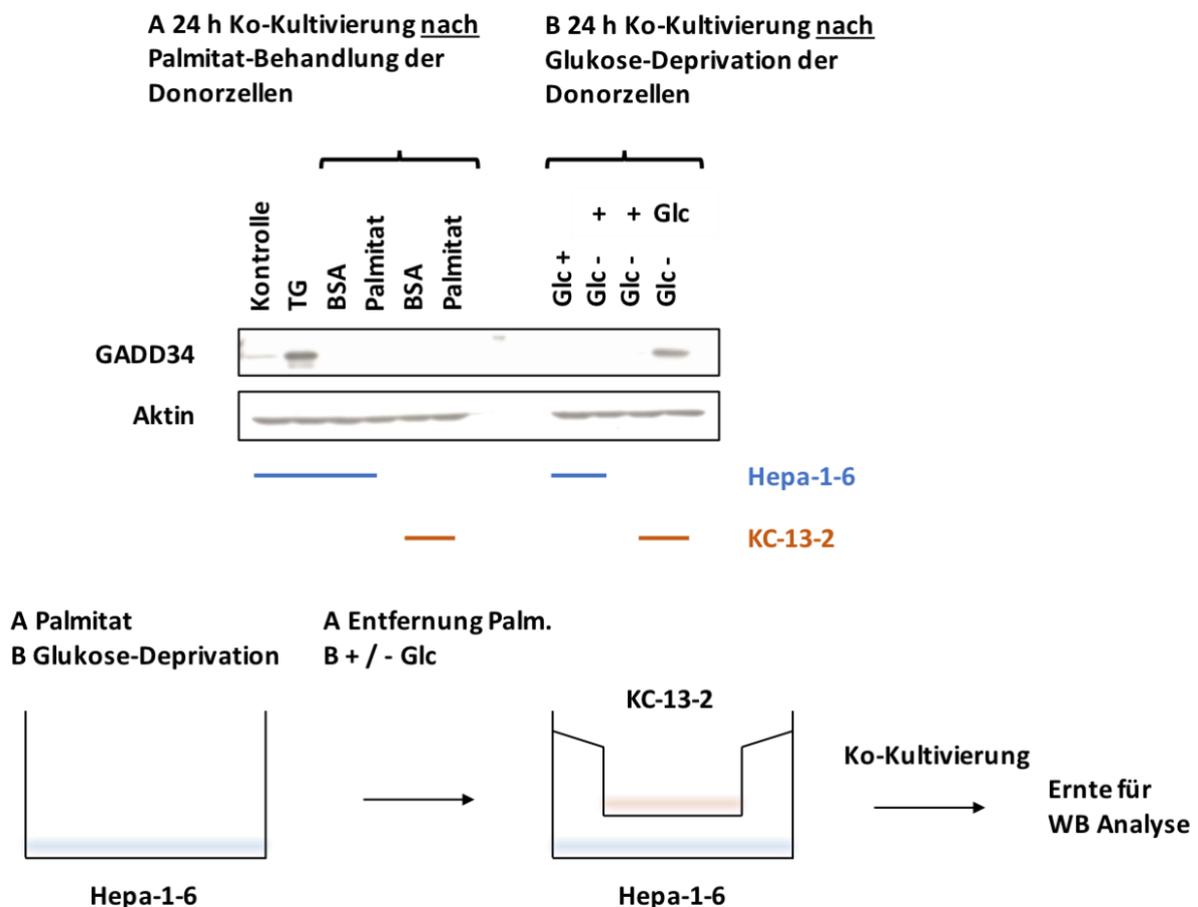


Abbildung 20: Expression von GADD34 in Hepa-1-6 und KC-13-2, kultiviert in einem Zwei-Kompartiment-Kultursystem, nach A Palmitat-Behandlung und B Glukose-Deprivation der Donorzellen. Hepa-1-6 (blau) wurden in einem 6-Well-Format und KC-13-2 (rot) in kompatiblen Ko-Kultur-Einsätzen ausgesät. KC-13-2 fungierten als Akzeptor-Zelllinie und Hepa-1-6 als Donor-Zelllinie. Die Hepa-1-6-Zellen wurden (A) mit Palmitat (C_{Palmitat} : 250 μM) oder BSA für 16 h behandelt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde frisches KC-13-2-Medium hinzugegeben. (B) Hepa-1-6 wurden für 16 h in glukosehaltigem Medium (Spur 7) oder in glukosefreiem Medium (Spur 8) inkubiert. Nun wurde die fehlende Glukose substituiert (Spuren 8 und 9) oder die Zellen weiter glukosedepriert (Spur 10). Die Ko-Kultur-Einsätze wurden in die 6-Well-Platten integriert und die Zellen für 24 h ko-kultiviert. Mittels Western Blot wurde nach Ernte der Zellen die Expression von ATF-4 untersucht.

In **Teil A** des Experimentes wurden Hepa-1-6-Zellen für 16 h mit Palmitat und BSA behandelt. Die mit BSA und Palmitat angereicherten Medien wurden entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und neues Medium hinzugefügt. In **Teil B** wurden Hepa-1-6-Zellen in Nährmedien ohne und mit Glukose für 16h kultiviert. Anschließend wurde die fehlende Menge an Glukose hinzugegeben. Die Kultur-Einsätze trugen die Akzeptorzellen KC-13-2 und wurden in die Kulturschalen der Donorzellen eingefügt. Zusammen wurden beide Zelllinien für 24 h bei 33 °C kultiviert. Zur Kontrolle der Wirkung der Glukosedepriuation wurde eine Ko-Kultur-Einheit aus Donor- und Akzeptorzellen ohne Glukose weiter inkubiert.

Die Ko-Kultivierung für 24 h, nachdem die Donorzellen mit Palmitat oder BSA behandelt wurden, führte nicht zu einer Induktion von GADD34 in Hepa-1-6 oder KC-13-2 (Abbildung 20 A, Spuren 3-6). Ebenfalls wurde GADD34 in ko-kultivierten Donor- und Akzeptorzellen nicht induziert (Abbildung 20 B, Spuren 8-9), wenn in Donorzellen nach Glukosedepriuation die fehlende Glukose wieder hinzugegeben wird. In den Akzeptorzellen führte das glukosefreie Medium – ohne nachträgliche Substitution von Glukose – zur Induktion von GADD34 (Abbildung 20 B, Spur 10; Donorzellen nicht aufgetragen).

Als Teilergebnis ist festzuhalten, dass die Ko-Kultivierung mit den Donorzellen, die zuvor einer Palmitat-Behandlung oder einem Glukoseentzug ausgesetzt waren, unter den gewählten Konditionen nicht zu einer ER Stress-Antwort in KC-13-2 führt.

3.6.2. Nach Behandlung mit Thapsigargin

Mit dem eingesetzten Zwei-Kompartiment-Zellkultur-System können Sekretionsstudien anhand von zwei Zellpopulationen durchgeführt werden. Im nächsten Experiment wurde erneut versucht das *in vitro*-Modell zur Transmission des ER Stress-Signals zwischen zwei Zelllinien in das Ko-Kultur-System zu adaptieren. Hierzu wurde zum einen eine Reihe von Konditionen, wie z.B. die Inkubationstemperatur, verändert und zum anderen in den Donorzellen eine robustere ER Stress-Antwort durch Thapsigargin erzeugt.

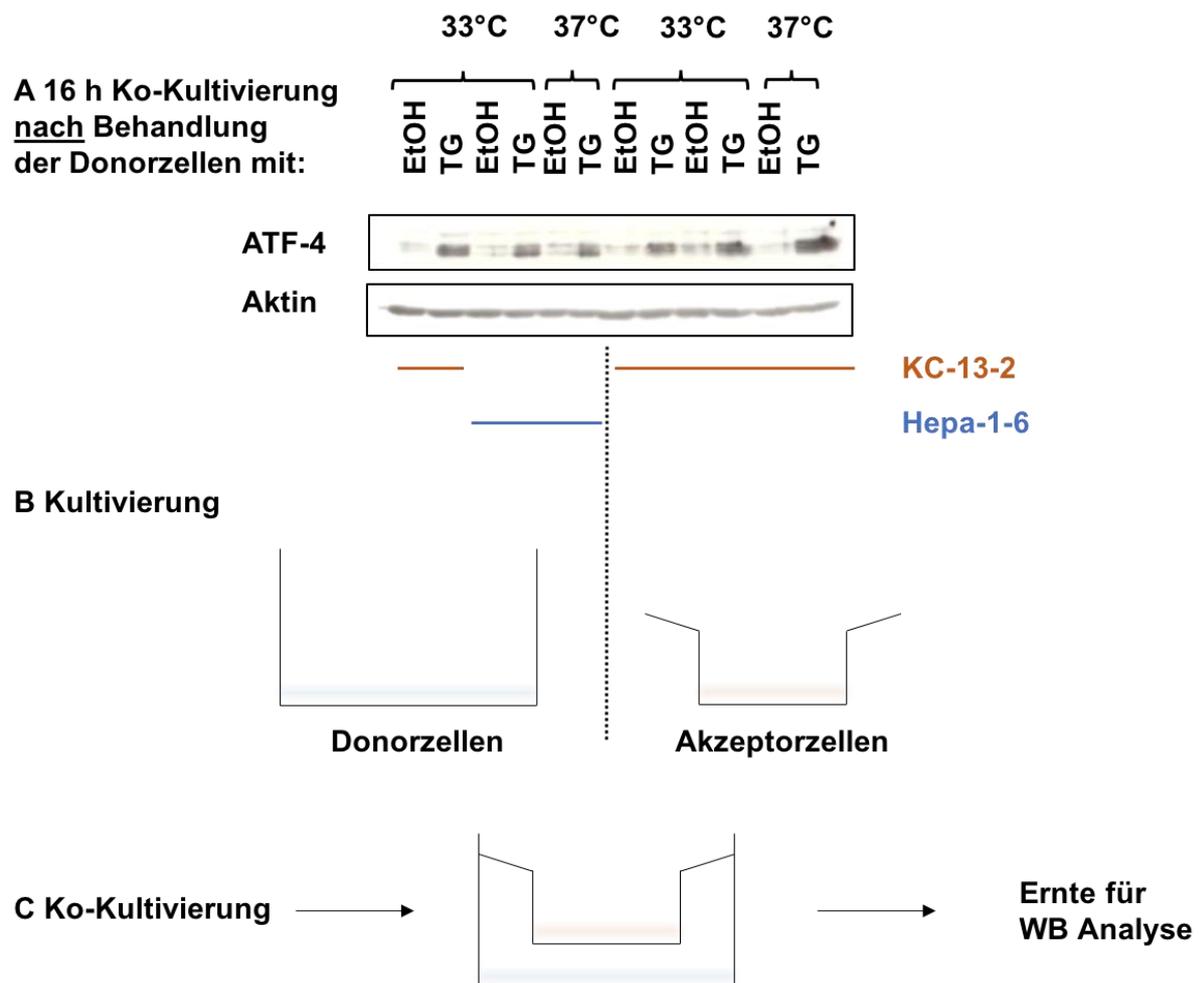


Abbildung 21: Expression von ATF-4 in Hepa-1-6 und KC-13-2, kultiviert in einem Zwei-Kompartiment-Kultursystem, nach Behandlung der Donorzellen mit Thapsigargin (TG) oder Ethanol (EtOH). Hepa-1-6 (blau) und KC-13-2 wurden in 6-Well-Platten und KC-13-2 zusätzlich in kompatiblen Ko-Kultur-Einsätzen ausgesät. KC-13-2 fungierten als Donor- (Spuren 1 und 2) und Akzeptor-Zelllinie (Spuren 7 bis 12) und Hepa-1-6 ausschließlich als Donorzelllinie (Spuren 3-6). Die Inkubationstemperatur lag bei 33 °C und 37 °C. Die Donorzellen (Spuren 1-6) wurden mit Thapsigargin (c_{TG} : 0,6 μ M) für 2 h behandelt (siehe B), das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und frisches KC-13-2-Kulturmedium hinzugefügt. Die Ko-Kultur-Einsätze wurden in die 6-Well-Platten integriert und die Zellen für 16 h ko-kultiviert (siehe C). Nach Ernte der Zellen erfolgte die Proteinextraktion und Analyse der Expression von ATF-4 mittels Western Blot (siehe A).

In diesem Experiment wurden neben den Hepa-1-6 auch KC-13-2 als Donorzellen eingesetzt. Als Akzeptorzellen fungierten lediglich KC-13-2. Die Donorzellen wurden für 2 h mit Thapsigargin oder EtOH behandelt. Nach den Waschschrinen wurden die Zellkultureinsätze mit den KC-13-2 in die mit den Donorzellen beladenen Wells integriert und die Zellen für 16 h

zusammen inkubiert. Die Kultivierung erfolgte bei 33 °C und 37 °C. Mittels Western Blot wurde die Expression von ATF-4 analysiert.

Die Ko-Kultivierung nach Behandlung der Donorzellen mit Thapsigargin führte in KC-13-2 und Hepa-1-6 zur Expression von ATF-4 bei 33 °C und bei 37 °C. Auch in den Donorzellen wurde 16 h nach Beendigung der Behandlung mit Thapsigargin die Expression von ATF-4 induziert. Abbildung 21 zeigt auch, dass die ER Stress-Antwort in diesem Ko-Kultur-System von KC-13-2 auf ko-kultivierte, naive KC-13-2 übertragbar ist und eine Induktion von ATF-4 auslöst.

3.7. Proteinuntersuchung in Kupfer Zellen nach Behandlung mit konditionierten Medien

In dem zweiten Teil der Arbeit werden die biochemischen Eigenschaften der Kulturüberstände untersucht, die eine Zell-zu-Zell-Übertragung des ER Stress-Signals vermitteln. Aus den bisherigen Untersuchungen lassen sich bereits zwei Charakteristika in Bezug auf Löslichkeit und Stabilität ableiten. Da Kulturüberstände eine *de novo* UPR-Induktion bewirken, muss das enthaltende „Signal“ in Wasser löslich sein. Weiterhin werden in dem Prozess zwischen Generierung der Medien (2.2.2) bei 37 °C und dem Transfer auf naive Zellen die Medien bei -20 °C eingefroren, ohne dass die biologische Aktivität verloren geht. Hieraus lässt sich eine Stabilität der Proben in einem Temperaturbereich zwischen -20 °C und 37 °C postulieren.

3.7.1. Nach Temperaturbehandlung der konditionierten Medien

Über die Eingrenzung des Temperaturbereiches, innerhalb dessen die konditionierten Medien aktiv sind, d.h. eine ER Stress-Signal-Übertragung bewirken, können auch Rückschlüsse auf die Substanzklassen des vermittelnden Signals gezogen werden. Bei höheren Temperaturbereichen steigt die Wahrscheinlichkeit, dass Proteine denaturieren und ihre Funktion verlieren [117].

Im folgenden Aktivitätstest wurden das konditionierte Medium CM TG und das konditionierte Kontrollmedium CM E bei verschiedenen Temperaturen jeweils für 30 min inkubiert und ihre ER

Stress-induzierende Wirkung in KC-13-2 überprüft. Als Behandlungstemperaturen wurden jeweils 37 °C, 70 °C und 95 °C festgelegt.

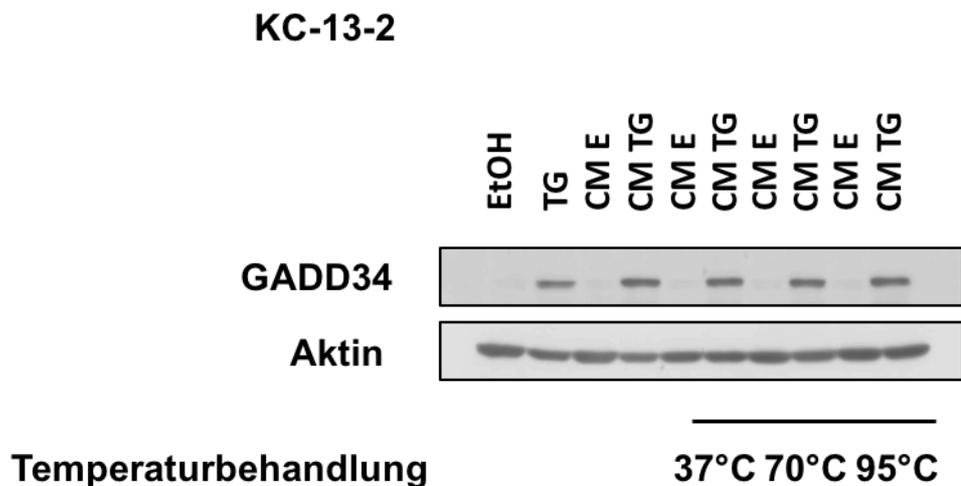


Abbildung 22: Expression von GADD34 in KC-13-2 inkubiert in CM E und CM TG nach Temperaturbehandlung der Medien. CM E und CM TG wurden in Hepa-1-6-Zellen generiert. Die Medien wurden für 30 min bei 37 °C, 70 °C und 95 °C inkubiert. Nach Kühlung der Medien auf Raumtemperatur wurde 10 % FCS hinzugegeben und die Medien auf KC-13-2 transferiert. Die Inkubation der Zellen in den behandelten Überständen erfolgte für 24 h. Nach Ernte der Zellen wurden die Proteine extrahiert und die Expression mittels Western Blot untersucht.

Zur Überprüfung, ob die biologische Aktivität der Medien durch die Temperaturbehandlung beeinflusst wird, wurden KC-13-2 in temperaturbehandelten und in unbehandelten konditionierten Medien CM TG und CM E inkubiert. Die konditionierten Medien CM TG induzierten nach 24 h Behandlung die Expression von GADD34 in den KC-13-2 im Vergleich zu den konditionierten Kontrollmedien CM E unabhängig davon, ob eine Temperaturbehandlung erfolgte oder nicht. Die Höhe der eingesetzten Temperaturen (37 °C, 70 °C oder 95 °C) reduzierte die Expression von GADD34 in KC-13-2 nach Inkubation in den entsprechenden Medien nicht.

Über den Temperaturbereich von -20 °C bis 95 °C sind die konditionierten Medien thermostabil. Folglich ist es eher unwahrscheinlich, dass die enthaltenden Substanzen, die den Effekt vermitteln, aus der Klasse der Proteine stammen. Proteine würden, abhängig von der Höhe der einwirkenden Temperatur, denaturieren und könnten ihre Funktion, insbesondere zur Signalübertragung, verlieren [117].

Hierbei sollte die Existenz von thermostabilen Proteinen, wie DNA-Polymerasen aus thermophilen Bakterien, z.B. *Thermus aquaticus*, erwähnt werden. Diese sind hitzebeständig und trotz hoher Temperaturen funktionsfähig [118].

3.7.2. Nach Proteinase K-Verdau der konditionierten Medien

Um weiter auszuschließen, dass Proteine – vor allem hitzebeständige Peptide – an der Zell-zu-Zell-Übertragung des ER Stress-Signals beteiligt sind, wurden das konditionierte Medium CM TG und das konditionierte Kontrollmedium CM E mit einem proteolytischen Enzym, der Proteinase K behandelt. Die Serin-Protease Proteinase K degradiert über die Spaltung unspezifischer Peptidbindungen eine Vielzahl von denaturierten als auch nativen Proteinen [119].

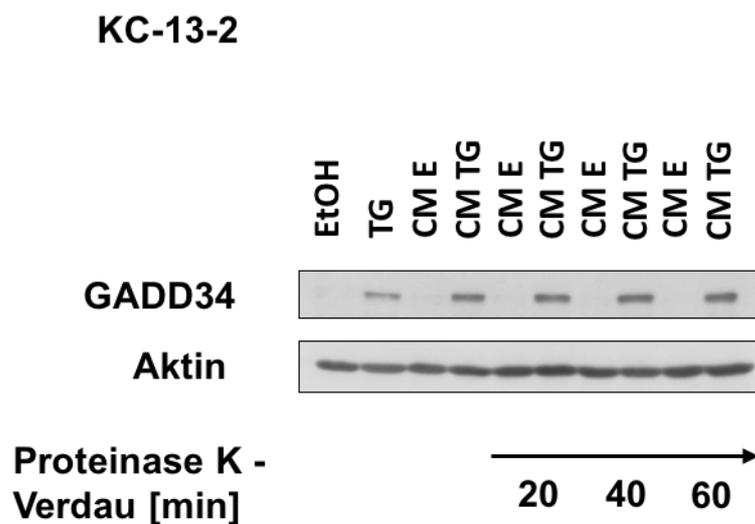


Abbildung 23: Expression von GADD34 in KC-13-2 inkubiert in CM E und CM TG nach Proteinase K-Verdau der Medien. CM E und CM TG wurden in Hepa-1-6-Zellen generiert. Den Medien wurde Proteinase K (c: 50 µg/ml) hinzugegeben und für 20 min, 40 min und 60 min behandelt, gefolgt von einer Inkubation bei 95 °C für 5 min zur Hitzeinaktivierung der Proteinase K. Nach Transfer auf die KC-13-2 wurden die Zellen für 24 h inkubiert und die Zellen im Anschluss geerntet. Mittels Western Blot wurde die Expression von GADD34 analysiert.

Das konditionierte Medium CM TG und das konditionierte Kontrollmedium CM E wurden mit Proteinase K (c: 50 µg/ml) für verschiedene Zeitintervalle behandelt. Anschließend wurde die Proteinase K mittels Hitze (95 °C) inaktiviert und die KC-13-2 wurden in den behandelten Medien für 24 h inkubiert. Nach Proteinase K-Verdau blieb die biologische Aktivität der

konditionierten Medien CM TG in Bezug auf die Induktion der Expression von GADD34 bestehen. In Abbildung 23 zeigte sich nach Behandlung mit CM TG eine ungefähr gleichmäßige Expression von GADD34 unabhängig davon, ob und wie lange ein Verdau mit Proteinase K stattfand. Die Behandlung der KC-13-2 mit CM E und den CM E nach Proteinase K-Verdau induzierte die Expression von GADD34 nicht. Somit scheint die unspezifische Degradierung von Proteinen die ER Stress-Transmission nicht zu beeinträchtigen.

Die Fähigkeit der Proteinase K zur proteolytischen Degradierung von Proteinen in Kulturmedien wurde in einem zusätzlichen Experiment überprüft. Hierzu wurde BSA in Nährmedien der KC-13-2 gelöst und für 5 min, 10 min und 20 min mit Proteinase K verdaut. Nach Auftrennung der BSA-Lösung mittels SDS-PAGE erfolgte die Anfärbung mittels Coomassie-Brillant-Blau R-250. Abbildung 24 zeigt das angefärbte Polyacrylamidgel. Nach Anfärbung ist das in Kulturmedium gelöste BSA sichtbar (Spur 2), das BSA nach Proteinase K-Verdau jedoch nicht mehr. Die proteolytische Aktivität des Enzymes bleibt folglich auch in Kulturmedien erhalten.

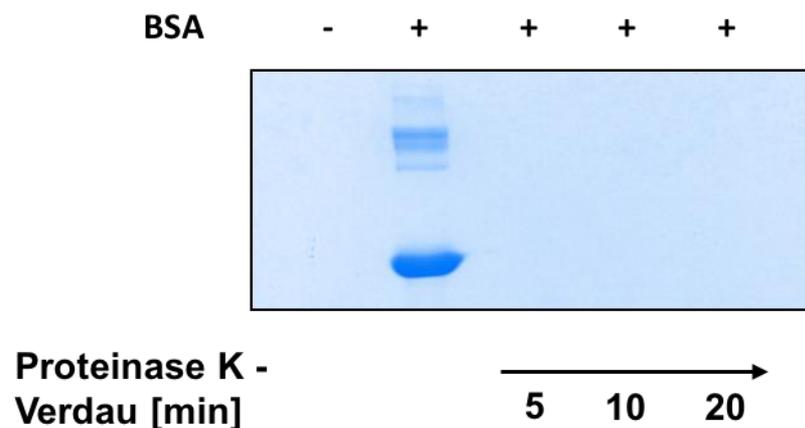


Abbildung 24: SDS-PAGE und Coomassie-Färbung von BSA-Proben in Medien nach Proteinase K-Verdau. BSA wurde in Kulturmedien gelöst (c_{BSA} : 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und mit Proteinase K (c : 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 5 min, 10 min und 20 min behandelt. Nach Separation der Proteine mittels SDS-PAGE folgte die Anfärbung des Polyacrylamid-Gels mit Coomassie-Brillant-Blau R-250.

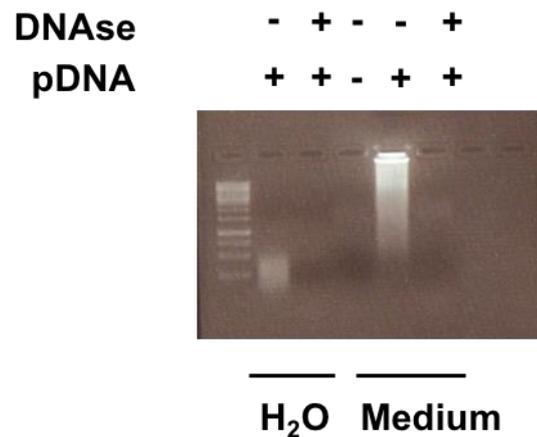


Abbildung 26: Agarose-Gel und Ethidiumbromid-Färbung von pDNA-Proben in H₂O und Medien nach DNase-Verdau. Jeweils in einem Ansatz von 50 µl wurde 1 µg pDNA in H₂O oder Kulturmedien gelöst und mit DNase (1 U) und ohne DNase für 60 min bei 37 °C behandelt. Eine Probe enthielt ausschließlich Medium (Spur 3). Zur Hitzeinaktivierung der DNase folgte die Inkubation der Proben für 15 min bei 95 °C. Mittels Gelelektrophorese wurden die Proben auf einem Agarosegel separiert und die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt.

Ergänzend wurde die Fähigkeit der DNase I, in Kulturmedien DNA zu degradieren, überprüft. Dazu wurde 1 µg pDNA in Wasser und Kulturmedien gelöst und mit DNase I behandelt. Die Proben wurden nach Separation mittels Gelelektrophorese auf einem Agarosegel mit Ethidiumbromid angefärbt. In den Spuren 2 und 6 (Abbildung 26) zeigte sich, dass DNase I in Kulturmedien oder Wasser DNA suffizient degradiert.

Zusammenfassend ist die biologische Aktivität der Medien durch eine hohe Thermostabilität gekennzeichnet. Proteine oder DNA-Moleküle scheinen an der Signalübertragung nicht beteiligt zu sein. Die biochemischen Eigenschaften der in den Medien enthaltenen Substanzen, die die ER Stress-Signalübertragung vermitteln, ähneln daher den Charakteristika von Lipiden.

3.8. Durchflusszytometrische Untersuchung von CHO-S21-Zellen nach Behandlung mit konditionierten Medien

Für die weitere Suche nach der molekularen Grundlage der ER Stress-Transmission ist der Einsatz identifizierender Nachweisverfahren, wie beispielsweise die Massenspektrometrie, hilfreich. Ein Hindernis stellt die Zusammensetzung der serumhaltigen Kulturmedien dar. Denn diese bestehen aus einer Vielzahl von Einzelkomponenten, wie Fetten, Aminosäuren oder auch funktionellen Proteinen, wie Wachstumsfaktoren. Dies erschwert die Eingrenzung potentieller Substanzen, die die Signalübertragung vermitteln. Um Kandidaten weiter einzugrenzen, war es notwendig die Medien in Fraktionen zu unterteilen und ihre jeweilige Aktivität *in vitro* zu testen. Hierfür wurde ein Bio-Assay etabliert, der die zügige Aktivitäts-Untersuchung von Proben auch im erweiterten Maßstab ermöglichte.

Grundlage der Aktivitätstestung war die CHO-K1 XBP-1::Turquoise/CHOP::GFP dual reporter (CHO-S21)-Zelllinie. Die Induktion der UPR-Arme PERK und IRE-1 in CHO-S21-Zellen kann mittels Durchflusszytometrie gemessen werden, da durch gentechnische Modifikationen die Promotoren für XBP-1 und CHOP die Expression gekoppelter Fluorochrome kontrollieren. Daher sind CHO-S21-Zellen als duales Reportersystem einsetzbar [87].

Zunächst wurde die ER Stress-Induktion in CHO-S21 durch Thapsigargin und die Behandlung mit konditionierten Medien untersucht. Die Generierung der konditionierten Medien erfolgte ebenfalls in CHO-S21-Zellen analog der Herstellung in Hepa-1-6-Zellen (2.2.2). Nach Behandlung mit Thapsigargin und CM TG wurde ER Stress in CHO-S21 induziert, gemessen an der Stärke des Fluoreszenzsignals der Fluorochrome gekoppelt an XBP-1 bzw. CHOP. EtOH und die Inkubation in CM E induzierten die Induktion von XBP-1 und CHOP in CHO-S21 nicht (s. Abbildung 27).

In CHO-S21 wurde nach Inkubation in den konditionierten Medien CM TG eine *de novo*-ER Stress-Antwort induziert. Die aus Ovarialzellen des Chinesischen Zwerghamsters gewonnene Zelllinie ist als Donor und Akzeptor befähigt, die Signaltransmission zu vermitteln und eignet sich daher für weitere Aktivitätstestungen [109].

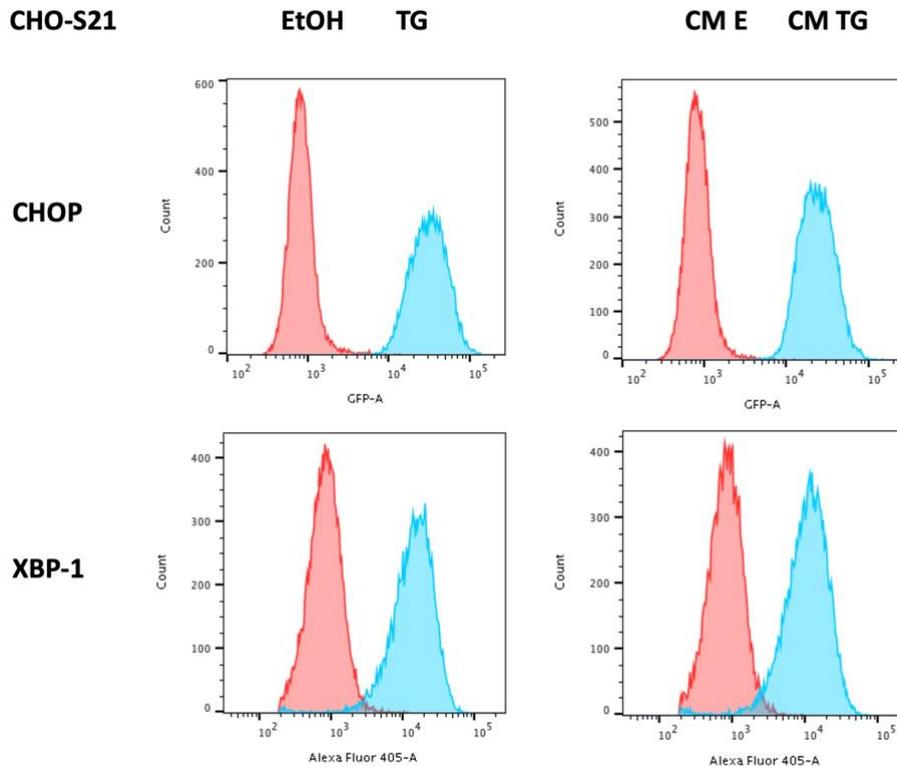


Abbildung 27: Fluoreszenzsignal in CHO-S21-Zellen nach Behandlung mit CM E und CM TG. Die dualen Reporterzellen CHO-S21 wurden für 24 h mit EtOH bzw. Thapsigargin (c: 100 nM) oder in den Medien CM E bzw. CM TG inkubiert. Die Herstellung der Medien erfolgte in CHO-S21-Zellen. Nach Ernte der Zellen wurden die Fluoreszenzsignale für die Fluorochrome GFP (CHOP) und Alexa Fluor 405 (XBP-1) mittels Durchflusszytometrie gemessen und in einem Histogramm dargestellt.

3.8.1. Nach Lipidextraktion des konditionierten Mediums CM TG und des konditionierten Kontrollmediums CM E

Die an der ER Stress-Signalübermittlung beteiligten Medienbestandteile verfügen über Eigenschaften, die den Charakteristika von Lipiden ähnlich sind. Daher wurde im folgenden Versuch die gesamte Fraktion der Lipide aus dem Gemisch des konditionierten Mediums extrahiert und die Aktivität *in vitro* überprüft. Die gewählte Methode zur Lipidextraktion nach Bligh und Dyer basiert auf der Verwendung von Methanol, Chloroform und der wässrigen Lösung, in diesem Fall des Kulturmediums, in einem definierten Volumenverhältnis [103]. Die Extrakte wurden mittels Stickstoffverdampfung getrocknet, in das Lösungsmittel Ethanol aufgenommen und den Nährmedien für die CHO-S21 beigefügt. Die Lipidextraktionen und Stickstoffverdampfung wurden durch Herrn Dr. Bernhard Drotleff (Arbeitsgruppe Prof. Lämmerhofer) durchgeführt. Nach 24 h Inkubation der CHO-S21 in den gelösten Lipidextrakten der konditionierten Medien CM E und CM TG wurde die Induktion der

Signalarme PERK und IRE-1 durchflusszytometrisch gemessen. Die Lipidfraktion des konditionierten Mediums CM TG induzierte XBP-1 und CHOP in den CHO-S21-Zellen (Abbildung 28).

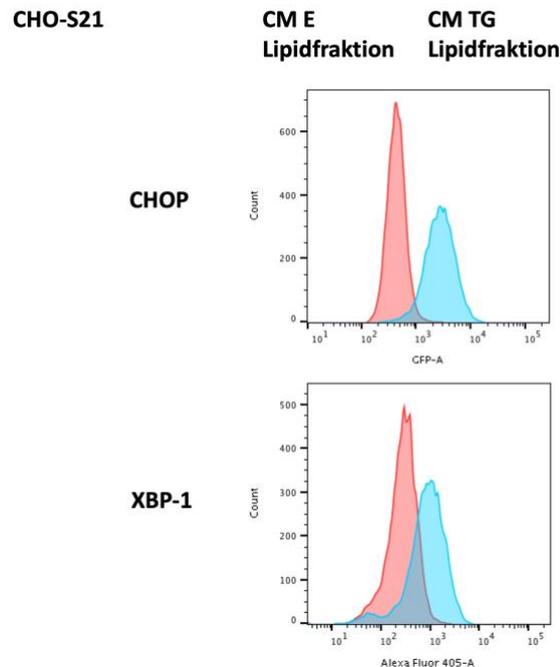


Abbildung 28: Fluoreszenzsignal in CHO-S21-Zellen nach Behandlung mit den Lipidextrakten aus CM E und CM TG. Die konditionierten Medien wurden in CHO-S21 generiert. Mittels Chloroform-Methanol-Extraktion wurde aus beiden Medien die totale Lipidfraktion gewonnen und unter Stickstoffverdampfung getrocknet. Nach Aufnahme in Nährmedien wurden die CHO-S21 hierin für 24 h inkubiert. Die Fluoreszenzsignale für die Fluorochrome GFP (CHOP) und Alexa Fluor 405 (XBP-1) wurden mittels Durchflusszytometrie gemessen und in einem Histogramm dargestellt.

Durch Behandlung mit den Lipidextrakten der konditionierten Medien CM E erfolgte hingegen keine Induktion der ER Stress-Arme PERK und IRE-1. Dies zeigte, dass die eingesetzten Lösungsmittel wie Methanol und Chloroform ausreichend verdampft waren und die Menge an Ethanol, die verwendet wurde um die Extrakte in Lösung zu bringen, keine unspezifische, UPR-induzierende Toxizität in den CHO-S21 erzeugte.

Dieses kombinierte Verfahren ermöglichte es, die ER Stress-vermittelnden Faktoren im konditionierten Medium CM TG mittels Lipidextraktion von den restlichen Kulturbestandteilen zu trennen und in Nährmedien zu lösen, die erneut eine ER Stress-

Antwort in naiven Zellen induzieren. Um die gesamte Lipidfraktion weiter aufzutrennen, wurde das Verfahren der Hydrophilen Interaktions-Flüssigchromatographie (HILIC) im präparativen Format verwendet. Die Abbildung 29 zeigt schematisch, wie das Verfahren der HILIC in die Sequenz aus Generation der konditionierten Medien, der Lipidextraktion und der Aktivitätstestung mittels Durchflusszytometrie eingefügt wurde. Chromatographisch wurden die Extrakte in weitere Fraktionen unterteilt, die wiederum dem Nährmedium der CHO-S21 beigefügt wurden. In einem gekoppelten Bio-Aktivitäts-Assay wurde die ER Stress-Induktion in CHO-S21 mittels Durchflusszytometrie untersucht. Es entstand ein iterativer Prozess, in dem die aktiven Fraktionen wiederum mittels HILIC (sub)-fraktioniert und nachfolgend *in vitro* getestet wurden. Die Reduktion der in den Medien enthaltenen Substanzmenge wird durch Aktivitätsnachweise kontrolliert und kann die Substanzzuordnung mittels identifizierender Verfahren erleichtern. Die HILIC-basierten Fraktionierungen wurden durch Herrn Dr. Bernhard Drotleff (Arbeitsgruppe Prof. Lämmerhofer) durchgeführt.

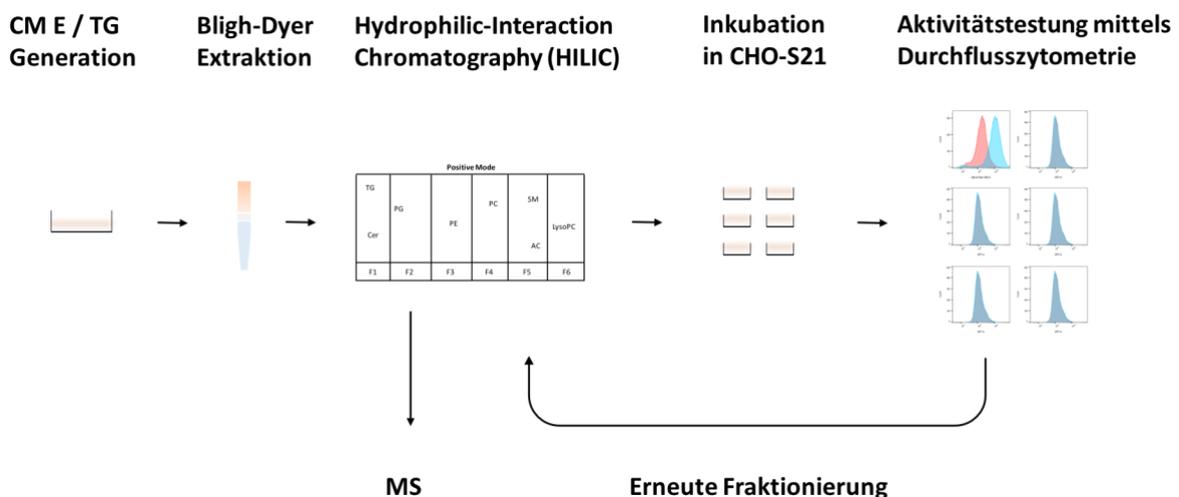


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Aktivitäts-geführten Fraktionierung. Die Medien CM TG und CM E werden in CHO-S21 konditioniert. Durch die Chloroform-Methanol-Extraktion wird die Lipidphase aus den Medien gewonnen, mittels hydrophiler Interaktionschromatographie (HILIC) weiter aufgetrennt und in verschiedene Fraktionen unterteilt. Die Fraktionen werden in Nährmedium gelöst und zu den CHO-S21-Zellen gegeben. Nach der Inkubation wird die Aktivität der einzelnen Fraktionen in den Reporterzellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. In einem iterativen Prozess wird die aktive Fraktion mittels HILIC weiter subfraktioniert und die Aktivität der Subfraktionen erneut überprüft. Der Vorgang wird zur Reduktion der Substanzmenge in der aktiven Fraktion wiederholt, um die Kandidaten für identifizierende Nachweisverfahren (z.B. Massenspektrometrie, MS) einzugrenzen.

3.8.2. Nach HILIC-basierter Fraktionierung der konditionierten Medien

Aus den konditionierten Medien CM TG und CM E wurde die totale Lipidfraktion extrahiert und mittels HILIC weiter aufgetrennt. Die Fraktionen wurden in Nährmedien aufgenommen und für 24 h zu den CHO-S21 gegeben. Abbildung 30 zeigt die Induktion von CHOP und XBP-1 gemessen an der Zunahme des Fluoreszenzsignals ihrer gekoppelten Fluorochrome unter Verwendung der Durchflusszytometrie. Die Fraktionen F1 und F2 der konditionierten Medien CM TG induzierten CHOP und XBP-1 in CHO-S21 nach 24 h Inkubation im Vergleich zu den äquivalenten Fraktionen der konditionierten Kontrollmedien CM E. Die übrigen Fraktionen sowohl in der CM E als auch in der CM T Gruppe führten nicht zu einer ER Stress-Antwort in den CHO-S21.

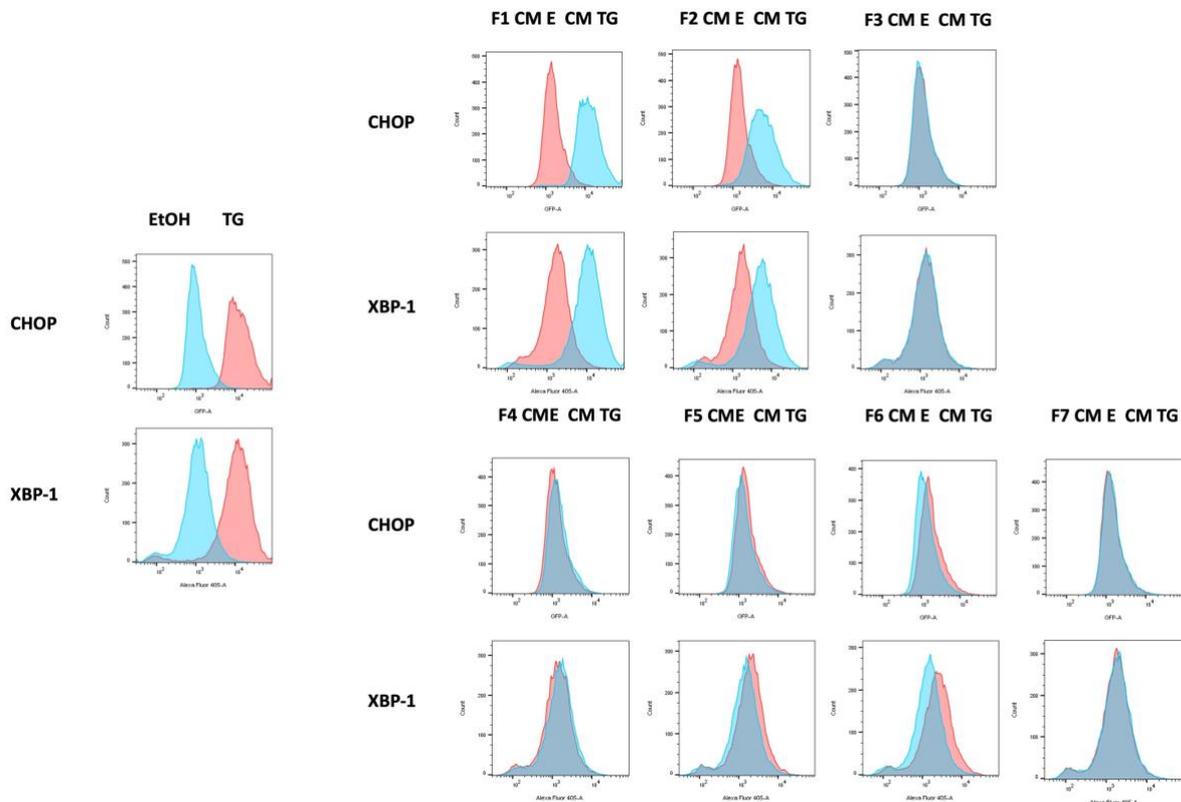


Abbildung 30: Fluoreszenzsignal in CHO-S21-Zellen inkubiert in CM E und CM TG nach HILIC-basierter Fraktionierung. Die konditionierten Medien wurden in CHO-S21 hergestellt und ihre lipidhaltige Fraktion extrahiert. Das Extrakt wurde mittels HILIC in 7 Fraktionen aufgetrennt und wieder in Kulturmedien aufgenommen. Die 7 Fraktionen der CM E und CM TG-Extrakte wurden zu den CHO-S21-Reporterzellen gegeben. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen geerntet und die Fluoreszenzsignale mittels Durchflusszytometrie gemessen. Das Histogramm zeigt horizontal die Stärke des Fluoreszenzsignals für die Fluorochrome GFP (CHOP) sowie Alexa Fluor 405 (XBP-1) und vertikal die Zahl der Ereignisse.

Die Population der mit Fraktion F6 der CM E-Gruppe behandelten Probe zeigte eine geringe Verschiebung der Fluoreszenzstärke.

3.8.3. Nach HILIC-basierter Sub-Fraktionierung der konditionierten Medien

Die Fraktionen F1 und F2 der konditionierten Medien wurden zusammengeführt und erneut mit Hilfe des HILIC-basierten Trennverfahrens in Subfraktionen unterteilt. Die Subfraktionen

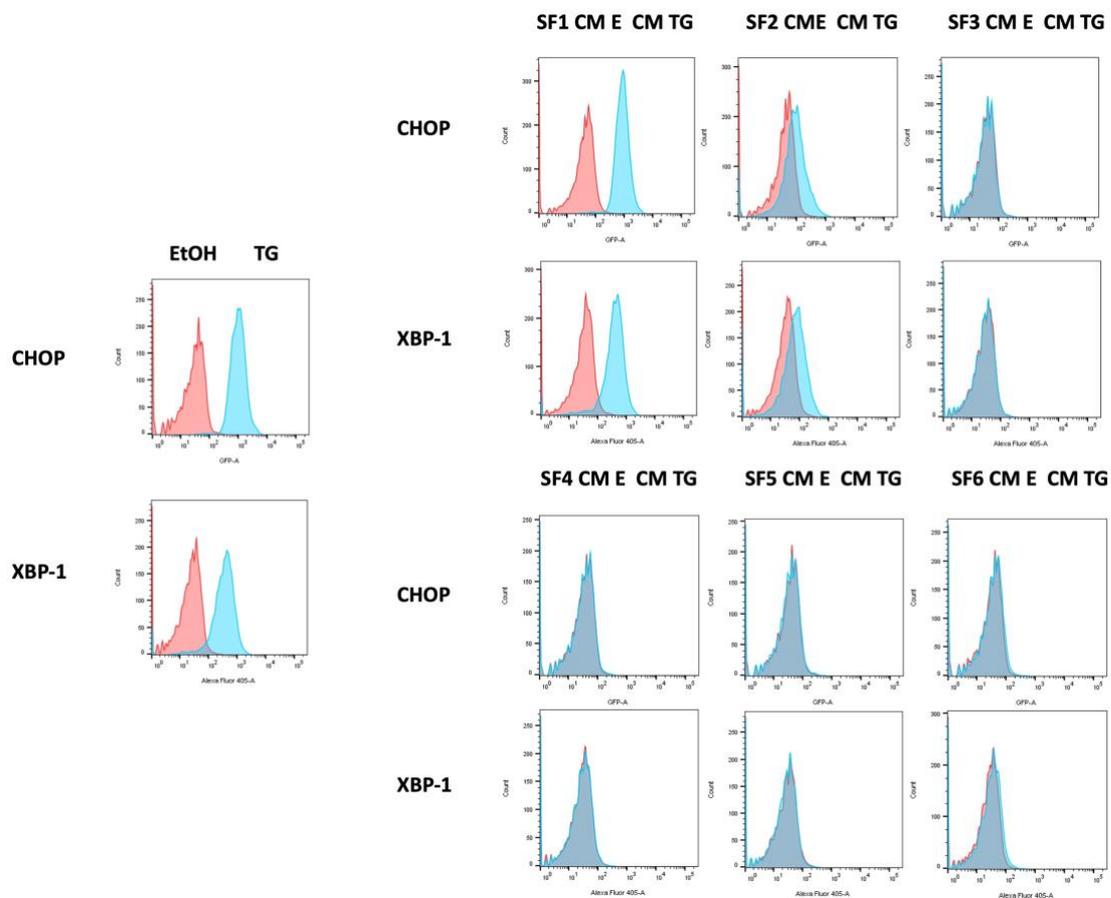


Abbildung 31: Fluoreszenzsignal in CHO-S21-Zellen inkubiert in CM E und CM TG nach HILIC-basierter Subfraktionierung. Die konditionierten Medien wurden in CHO-S21 hergestellt und ihre lipidhaltige Fraktion extrahiert. Das Extrakt wurde zunächst mittels HILIC fraktioniert und die ersten beiden Fraktionen zusammengeführt und erneut mittels HILIC aufgetrennt. Die 7 Subfraktionen der CM E und CM TG-Fraktionen (F1 und F2) wurden in Kulturmedien aufgenommen und zu den CHO-S21-Zellen gegeben. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen geerntet. Die Zellen, die mit CM E SF6 und CM TG SF6 behandelt wurden, waren von der Kulturplatte gelöst und wurden nicht weiter untersucht. Nun wurden die Fluoreszenzsignale mittels Durchflusszytometrie gemessen. Das Histogramm zeigt horizontal die Stärke des Fluoreszenzsignals für die Fluorochrome GFP (CHOP) sowie Alexa Fluor 405 (XBP-1) und vertikal die Zahl der Ereignisse.

wurden analog zu Abschnitt 3.8.2 in die Kulturmedien der CHO-S21 überführt. Nach 24 h Inkubation induzierte die Subfraktion SF1 und in geringerem Maße die Subfraktion SF2 der konditionierten Medien CM TG im Vergleich zur Kontrolle CHOP und XBP-1. Die restlichen Subfraktionen von CM E und CM TG führten nicht zu einer ER Stress-Antwort in CHO-S21. Nach Behandlung mit den Subfraktionen SF 6 beider Mediengruppen waren die CHO-S21 nicht mehr adhärent – mutmaßlich aufgrund der Zell-Toxizität noch enthaltender Lösungsmittel – und wurden nicht mittels Durchflusszytometrie gemessen.

4. Diskussion

Das konzertierte Zusammenspiel der UPR-Signalwege ermöglicht eukaryotischen Zellen die Adaption an intrinsische und extrinsische Stimuli sowie die Wiederherstellung der zellulären Homöostase [120]. Durch die Integration einer Vielzahl von Signalwegen umspannt die UPR-Antwort ein Kontinuum, welches von protektiven zu pro-apoptotischen und zelldestruktiven Mechanismen reicht [30]. Die UPR-Signalkaskaden sind an pathophysiologischen Vorgängen einer Vielzahl von Erkrankungen beteiligt und daher für das Verständnis von Pathogenese sowie Entdeckung neuer therapeutischer Ansatzpunkte zentral [121]. Forschungsarbeiten der vergangenen Jahrzehnte heben die Bedeutung der UPR-Kaskaden in Tumorerkrankungen hervor und decken die mechanistischen Zusammenhänge zwischen einzelnen Komponenten der ER Stress-Antwort sowie den Kennzeichen von Krebserkrankungen auf. Die Aktivierung von XBP-1 führt beispielsweise in triple-negativem Brustkrebs zur Progression der Erkrankung und ist entitätsübergreifend mit einer schlechteren Prognose assoziiert [37-39]. Krebszellen, die ER Stress ausgesetzt sind, können durch bisher nicht geklärte Mechanismen in naiven myeloischen Zellen, z.B. Makrophagen und dendritischen Zellen, eine *de novo*-UPR auslösen. Die Transmission des ER Stress-Signals kann eine Änderung des Phänotyps hin zur Sekretion pro-tumorigener Zytokine bewirken [69, 122].

Persistierender ER Stress stellt ein bedeutender Treiber einer Reihe komplexer, metabolischer Erkrankungen dar. Kennzeichnend für die Pathogenese und Progression von atherosklerotischen Gefäßveränderungen sind in die Gefäßwände eingewanderte Makrophagen, in denen eine anhaltende Aktivierung der UPR-Signalkaskaden stattfindet, wodurch eine kontinuierliche Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine hervorgerufen wird. Es entsteht ein Mikromilieu metabolisch-induzierter, chronischer Inflammation, der sog. Metaflammation [123, 124]. Maßgeblich führt eine Akkumulation von Lipiden in Makrophagen zur Aufrechterhaltung des chronischen ER Stress-Signals. Auf ihrer Oberfläche exprimieren Endothelzellen lectin-like oxidized low-density Lipoprotein (LDL)- Rezeptoren (LOX-1). Diese ermöglichen die Bindung der LDL-Partikel und den Transfer der Lipoproteine in die innere bzw. mittlere Schicht der arteriellen Gefäßwand. Über die Scavenger-Rezeptoren (SR) LOX-1, CD36 und SR-A1 werden die oxidierten LDL-Partikel von Makrophagen aufgenommen, in Lysosomen weiter prozessiert und in freie Fettsäuren sowie Cholesterin-

Metabolite konvertiert [125, 126]. Die resultierenden Störungen der ER Homöostase und die Alterationen der ER Membran bewirken eine Aktivierung der UPR-Signalwege [57, 62]. Eine exzessive Internalisierung dieser Lipide führt zur Änderung des äußeren Erscheinungsbildes der Makrophagen, der Transformation in Schaumzellen, die ein zentrales Element in allen Phasen der Plaquebildung darstellen [125].

Die Bedeutung des persistierenden ER Stress-Signals in der Pathogenese der atherosklerotischen Plaquebildung wurde durch eine pharmakologische Modulation der UPR-Signalwege in *in vivo*-Untersuchungen demonstriert. Die Applikation eines spezifischen IRE-1-Inhibitors in ApoE-defizienten Mäusen, die einer fettreichen Diät ausgesetzt waren, führte neben der Reduktion des UPR-Signals auch zur Abnahme atherosklerotischer Plaques, einer verminderten Zytokinproduktion und einer reduzierten lipid-assoziierten Inflammation [124].

Im Zentrum der Untersuchungen dieser Arbeit stehen ortständige Makrophagen der Leber, die Kupffer Zellen. Sie fungieren als Treiber innerhalb der Sequenz nicht-alkoholischer Fettlebererkrankungen. In einem Mikromilieu, das durch eine Überladung von Lipiden gekennzeichnet ist, sezernieren Kupffer Zellen pro-inflammatorische Zytokine, die eine hepatozelluläre Schädigung auslösen können [78]. Kupffer Zellen halten eine chronische Inflammation der Leber aufrecht, die die Grundlage für die Entwicklung und Progression des hepatozellulären Karzinoms darstellt [127].

In dieser Arbeit wurde die unfolded protein response in murinen Kupffer Zellen untersucht – als Resultat einer unmittelbaren Induktion und einer mittelbaren Aktivierung durch nicht autonome Regulationsmechanismen. Des Weiteren wurden methodische Strategien zur weiteren biochemischen Charakterisierung der Signalübertragung zwischen Leber- und Kupffer Zellen vorgestellt, die die Grundlage für die Identifizierung transmissibler Substanzen darstellen könnten. Diese Ergebnisse werden nachfolgend diskutiert und in den Kontext des aktuellen wissenschaftlichen Standes eingeordnet.

4.1. Effekte der konditionierten Medien in Hepatozyten und Kupffer Zellen

Über den Transfer von Kulturmedien in einem *in vitro*-Modell wurde in myeloischen Zellen auf transkriptionaler Ebene eine pharmakologisch ausgelöste ER Stress-Reaktion in Krebszellen induziert. Diese Beobachtung prägte den Begriff der ER Stress Transmission und wurde erstmalig zwischen murinen Prostatakarzinomzellen und myeloischen Zellen beschrieben [69]. In der vorliegenden Arbeit wurde zu Beginn die Hypothese aufgestellt, dass dieses Phänomen ebenfalls in einem Wechselspiel zwischen parenchymatösen und nicht-parenchymatösen Zellen der Leber auftritt und Hepatozyten die Aktivität der UPR-Signalwege in Kupffer Zellen modulieren können.

Für die Adaption des Modells wurden geeignete lebereigene Zelllinien gesucht. Daher wurden jeweils eine murine Hepatozyten- bzw. HCC-Zelllinien und zwei murine Kupffer Zelllinien mit Thapsigargin behandelt und überprüft, ob UPR-Marker (s. Abbildung 7, Abbildung 8 und Abbildung 9) in diesen Zellen induziert werden. In allen vier Zelllinien stieg die relative Expression der mRNA von BiP, ATF-4 und GADD34 an. Da die Zelllinien Hepa-1-6 und KC-13-2 die stärkste relative Expression bezogen auf alle drei Marker aufwiesen, wurden sie als Donor- bzw. Akzeptorzelllinie für die folgenden Überstandsexperimente ausgewählt. Die konditionierten Medien CM E und CM TG wurden folglich in Hepa-1-6-Zellen generiert.

Die Behandlung der murinen Kupffer Zelllinie KC-13-2 mit dem Medium CM TG induzierte eine *de novo*-ER Stress-Antwort gemessen an der Expression von GADD34 (s. Abbildung 10) und ATF-4 (s. Abbildung 11). Die Kulturüberstände der Hepa-1-6, die mit EtOH behandelt wurden, induzierten keine Expression der analysierten Proteine. Als konditionierte Medien werden Überstände von Zelllinien *in vitro* bezeichnet, die durch die Kultivierung von Zellen erzeugt werden. Dieses Medium beinhaltet das sogenannte Sekretom von Zellen, welches sezernierte Proteine umfasst, die N-terminal eine bestimmte Signalsequenz aufweisen und deshalb über das Endoplasmatische Retikulum sowie nachfolgend den Golgi-Apparat prozessiert werden. Im weiteren Sinne werden alle durch die Zellen sezernierten Substanzen hinzugezählt: Wachstumsfaktoren, Interleukine, Enzyme und lösliche Mediatoren, aber auch Metabolite, wie Aminosäuren und Glukose [128]. *In vitro* kultivierte Tumorzellen sezernieren nicht nur Substanzen in die konditionierten Medien, sondern entziehen den Medien auch Nährstoffe,

abhängig von ihrer metabolischen Aktivität. Eine Behandlung mit diesen Medien birgt somit die Gefahr, Zellen einer unspezifischen Nährstoff-Deprivation auszusetzen.

In einer *in vitro*-Arbeit wurde der Einfluss eines tumorassoziierten konditionierten Mediums auf den sekretorischen Phänotyp von humanen Monozyten untersucht. Die Kulturüberstände von vier verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien wurden über einen Zeitraum von 72 h generiert. Analog hierzu wurde ein Kontrollmedium in Fibroblasten konditioniert. In den THP-1 Zellen führte die Behandlung mit den Tumorzell-assoziierten Medien im Vergleich zum Kontrollmedium zu einer deutlichen Reduktion der Proliferationsrate und einem gemischten M1/M2-Polarisations-Phänotyp [129]. Um eine unspezifische Zell-Toxizität durch Nährstoffentzug in Medien von schnell proliferierenden Tumorzellen in dem vorliegenden Assay zu vermeiden, wurde die Inkubationsphase über 16 h im Anschluss an die zweistündige Stimulationsphase mit EtOH oder Thapsigargin nicht überschritten. Unter diesen Konditionen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der KC-13-2 mit den konditionierten Kontrollmedien CM E keine UPR-Induktion im Hinblick auf die Expression von GADD34 und ATF-4 auslöste oder zu Zelltod gemessen an der Anhäufung der Sub-G₁-Population (s. Abbildung 10, Abbildung 11 und Abbildung 14) führte.

Die Behandlung mit CM TG löste in KC13-2 eine robuste ER Stress-Antwort aus, führte jedoch in den Hepa-1-6 nicht zur Induktion der Expression von ATF-4 (s. Abbildung 11). Diese Beobachtung zeigt, dass die Hepa-1-6 zwar als Donorzellen in der Lage sind ein „aktives“ Medium zu konditionieren, jedoch als naive Akzeptorzellen keine *de novo*-UPR ausbilden. Möglicherweise ist der zugrundeliegende Mechanismus der ER Stress-Übertragung zelltypspezifisch.

Um weitere Zelllinien zu identifizieren, die das übertragene ER Stress-Signal detektieren und in eine UPR-Aktivierung transformieren können, wurden weitere Zelllinien untersucht. Auch wurde die Testmodalität geändert, um mögliche, zusätzliche Effekte des in Hepa-1-6 konditionierten Mediums zu studieren. Zunächst wurde die Auswirkung des konditionierten Mediums auf den Zellzyklus der KC-13-2 untersucht. In Überstandsexperimenten mit THP-1-Makrophagen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit tumorzellassoziierten konditionierten Medien eine Arretierung der Zellen in der G₁-Phase bewirkte [129].

Eine weitere Studie untersuchte *vice versa* den Zellzyklus von Kolonkarzinomzellen nach Behandlung mit konditionierten Medien von THP-1-Makrophagen. Die konditionierten Medien von Makrophagen, die nach Stimulierung mit LPS und INF γ einen M1-Phänotyp einnahmen, arretierten die Kolonkarzinom-Zellen in G₂/M im Gegensatz zur Behandlung mit Medien von M2-polarisierten Makrophagen [130].

In Gegenüberstellung zu den vorliegenden Versuchen dieser Arbeit führte die Behandlung der KC-13-2 mit den Medien CM E und CM TG nicht zu substantiellen Unterschieden der Populationen, die den Phasen G₁, S oder G₂/M zugeordnet werden können (s. Abbildung 13). Stattdessen fand sich, abgeleitet vom gemessenen DNA-Gehalt, eine gesteigerte Anzahl an Zellen in der Sub-G₁-Population wieder. Diese Beobachtung bezog sich auf die murinen Kupffer Zelllinien KC-13-2 und KUP5. CM TG führt in den murinen Kupffer Zellen deutlich, jedoch nicht in Hepa-1-6 und nur begrenzt in AML-12 zu Zelluntergang (s. Abbildung 14, Abbildung 15, Abbildung 16 und Abbildung 17). Die getesteten Zellen reagierten damit unterschiedlich sensitiv auf die Behandlung. Beispielsweise starben 24 h nach Inkubation in CM TG ca. 62 % der KUP5-Zellen, geschätzt an der Sub-G₁-Population. In diesem Kontext reagierten die Hepa-1-6-Zellen nicht sensitiv nach Inkubation in CM TG. Dieses Ergebnis unterstützt die Theorie, dass der Transfer der UPR-Antwort ein zellspezifisches Phänomen ist.

Hingegen zeigten Rodvold et al., dass Überstände von Thapsigargin-behandelten Prostatakarzinomzellen in homologen naiven Zellen als auch heterologen unbehandelten Zelllinien eine *de novo*-Induktion der mRNA von BiP, XBP-1^s und CHOP nach 1, 3 und 5 Tagen der Behandlung induziert. Eine Vorbehandlung mit den konditionierten Medien wirkte protektiv auf die Prostatakarzinomzellen. Die zweitägige Prä-Konditionierung mit CM TG gefolgt von einer Erholung in normalem Nährmedium verminderte zum einen die Paclitaxel-vermittelte Zytotoxizität sowie die Anzahl an behandelten Zellen, die durch Glukoseentzug in Apoptose gingen [70].

4.2. Nicht-pharmakologische ER Stress-Induktion in Kupffer Zellen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Ergebnisse der nicht autonomen ER Stress-Aktivierung in Kupffer Zellen unter Verwendung pharmaka-freier Kultursysteme zu reproduzieren.

Durch Anreicherung der Kupffer Zell-Nährmedien mit freien Fettsäuren, bzw. ihren Salzen, wurde die Akkumulation von Lipiden in der Leber analog zum pathophysiologischen Geschehen nicht-alkoholischer Fettlebererkrankungen simuliert. Die Vertreter Palmitat und Oleat sind reichlich in der Nahrung vertreten und haben divergierende Effekte auf die Zellen der Leber. Die Behandlung von humanen Leberzelllinien mit freien Fettsäuren führt zur intrazellulären Anreicherung von Triglyzeriden. In *in vitro*-Untersuchungen war diese Akkumulation nach Behandlung mit Oleat stärker ausgeprägt als mit Palmitat. In den Nährmedien von Leberzellen vermittelte Palmitat hingegen eine Lipotoxizität, die durch eine Induktion von Apoptose und eine Aktivierung der Effektor-Caspasen 3 und 7 charakterisiert war [131].

In murinen Kupffer Zellen führt die Anreicherung der Nährmedien mit dem Konjugat aus Palmitat und BSA zu einer dosisabhängigen ER Stress-Induktion (s. Abbildung 18 und Abbildung 19). Die verwendeten Konzentrationen bewegen sich im mikromolaren Bereich und entsprechen den gemessenen Serumspiegeln an freien Fettsäuren von adipösen Patienten. Die Serumspiegel freier Fettsäuren in dieser Patientenkohorte können, nach Durchführung eines intravenösen Glukosetoleranztestes, die in dieser Arbeit *in vitro* genutzten Konzentrationen deutlich übersteigen [115]. Da die Zusammensetzung der Lipide in der Nahrung nicht nur auf eine Fettsäure begrenzt ist, wurde den Zellkulturmedien Palmitat und Oleat in zwei unterschiedlichen Konzentrationen hinzugefügt. In Bezug auf die ER Stress-Induktion divergierten die Effekte der langkettigen Fettsäuren. Die kombinierte Behandlung aus Oleat und Palmitat führt zu einer geringeren Induktion von GADD34 als die alleinige Behandlung mit Palmitat (s. Abbildung 19). Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass Oleat die palmitat-induzierte ER Stress-Antwort in Kupffer Zellen abschwächen kann. Diese Beobachtung deckt sich mit Untersuchungen an Zellen des exokrinen Pankreas, in denen die Behandlung mit Oleat eine dosisabhängige Induktion von ATF-4 und XBP-1^s durch Palmitat

verminderte [132]. Somit entscheidet die Zusammensetzung der verschiedenen Fettsäuren in Nährmedien, wie stark die Signalwege der UPR aktiviert werden.

In Untersuchungen an murinen und humanen Skelettmuskelzellen konnte gezeigt werden, dass die Modulation der UPR-Induktion durch Palmitat und Oleat vom Aktivierungsstatus des AMP-activated protein kinase (AMPK)-Signalweges abhing. Analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit induzierte Palmitat ER Stress und die kombinierte Behandlung mit Oleat reduzierte die Expression von ER Stress-Markern in palmitat-behandelten Zellen. Die palmitat-vermittelte ER Stress-Induktion konnte durch Aktivatoren des AMPK-Signalweges verhindert werden. Umgekehrt unterblieb der protektive Effekt von Oleat nach Behandlung mit dem AMPK-Inhibitor compound C [133, 134].

Die biologischen Effekte – bestehend aus der ER Stress-Induktion, Konditionierung der Medien in den Donorzellen sowie die Rezeption des ER Stress-Signales in den Zielzellen – liefen in dem bisherigen Modell räumlich und zeitlich getrennt voneinander ab und zeigen die Grenzen dieses *in vitro*-Systems auf. Um sich einer *in vivo*-Situation anzunähern, wurde ein Zwei-Kompartiment-Zellkultursystem genutzt. Hierbei können Hepatozyten und Kupffer Zellen in direkter Nachbarschaft kultiviert werden. Das Sekretionsverhalten der einen Zelllinie kann unmittelbar auf die benachbarte Zelllinie einwirken und ihre UPR-Antwort dennoch getrennt voneinander analysiert werden. Mit Hilfe der Nutzung einer nicht pharmaka-basierten ER Stress-Induktion gelang die Übertagung des Signals unter den gewählten Konditionen nicht. Denn die Ko-Kultivierung der vorab mit Palmitat behandelten oder unter Entzug von Glukose inkubierten Donorzellen führte nicht zu einer ER Stress-Induktion in Donor- oder Akzeptorzellen (s. Abbildung 20). Zwar konnte gezeigt werden, dass die Ko-Kultivierung der beiden Zelllinien unter fortgesetzter Glukosedeprivation zur Induktion von GADD34 in KC-13-2 führte (s. Abbildung 20, Spur 10). Nach dem die Glukose vor Zusammenführung der Kultureinheiten substituiert und der Glukoseentzug faktisch beendet wurde, konnte jedoch keine Induktion von GADD34 in KC-13-2 nachgewiesen werden (s. Abbildung 20, Spur 9).

In ihren Arbeiten zur ER Stress-Transmission führen Mahadevan et al. ebenfalls ein Experiment zur Glukosedeprivation an. Zunächst wurde das konditionierte Medium in Tumorzellen über 24 h mittels Inkubation in glukosefreiem Medium hergestellt.

J774 Makrophagen wurden in diesem glukosefreien, zuvor von Tumorzellen konditionierten Medium und zur Kontrolle lediglich in glukosefreiem Medium kultiviert. Die ER Stress-Antwort, gemessen an der relativen Expression der mRNA von BiP, GADD34 und CHOP, wurde verglichen und überwog in den Makrophagen, die in den glukosefreien konditionierten Medien von Tumorzellen kultiviert wurden, gegenüber den Zellen nach Inkubation in glukosefreien Medien. Die Differenz der Expressionsstärke, so postulierten die Autoren, sei durch die Auswirkung eines transmissiblen Faktors bedingt, der in Addition zum Effekt der Glukosedeprivation die ER Stress-Induktion verstärkte [69]. Möglicherweise kann der beobachtete Effekt auch durch Entzug weiterer Nährstoffe in den Medien durch die Tumorzellen bedingt sein und in den Zielzellen eine unspezifische Nährstoff-Deprivation erzeugen, die alleine nicht, jedoch in Kombination mit anderen Stimuli zu ER Stress führt. Hinweise dafür finden sich in der hier vorliegenden Studie zum Glukoseentzug (s. Abbildung 20), da die Induktion von GADD34 nach Ko-Kultivierung durch Substitution von Glukose aufgehoben wurde.

Zwei-Kompartiment-Kultivierungssysteme sind für Sekretionsstudien zur ER Stress-Transmission grundsätzlich geeignet. Als *proof of principle* wurde die Ko-Kultivierungsstudie unter Verwendung des chemischen ER Stress-Induktors Thapsigargin wiederholt. Die Ko-Kultivierung von murinen HCC-Zellen und Kupffer Zellen, die zuvor mit Thapsigargin behandelt wurden, und naiven Kupffer Zellen führte zur Induktion der Expression von ATF-4. Die KC-13-2 fungieren als Akzeptorzellen und können das „Signal“ auch als Donorzellen in die Medien sezernieren. Die Ko-Kultivierung mit den KC-13-2 für 16 h nach Behandlung mit Thapsigargin führte in den Hepa-1-6 zu einer robusten Induktion von ATF-4 (s. Abbildung 21) im Gegensatz zur Mono-Kultivierung in CM TG, generiert in homologen Zellen (s. Abbildung 11), die keine Induktion von ATF-4 bewirkte.

Van Ziel et al. wendeten zwei verschiedene Modelle zur Untersuchung einer ER Stress-Transmission auf Basis einer nicht-pharmakologisch induzierten UPR an. Als Donorzellen wurden modifizierte HeLa-Zellen eingesetzt, die über ein Mifepriston-induzierbares System IgM Schwereketten exprimieren und hierüber eine genetisch-induzierbare UPR-Aktivierung entfalten können. Nach UPR-Aktivierung mit Mifepriston in den Donorzellen löste die Ko-Kultivierung in HeLa Reporterzellen keine messbare ER Stress-Antwort aus. Weiterhin

bediente sich dieselbe Arbeitsgruppe eines Modells, in dem neuronale Zellen durch Nährstoff-Entzug eine ER Stress-Induktion erfahren und ihr Kulturmedium konditionieren. Vor der Inkubation der Akzeptorzellen in diesen konditionierten Medien wurden die fehlenden Nährstoffe (B27 Supplement) wiederum ergänzt, analog zur Glukosesubstitution in den vorliegenden Überstandsexperimenten, die auf Basis einer Glukosedepriavation erfolgten (s. Abbildung 20). In den Akzeptorzellen führte jedoch diese Behandlung im Vergleich zum Kontrollmedium nicht zu einer höheren Induktion der mRNA von BiP, CHOP und XBP-1^s. Die Autoren Van Ziel et al. bezweifeln daher die Existenz einer UPR-Transmission auf Basis einer pharmaka-freien ER Stress-Induktion [135].

Diesen Schlussfolgerungen müssen die *in vivo*-Studien von Taylor und Dillin et. al. sowie Williams et al. gegenübergestellt werden. Die Expression eines konstitutiv aktiven XBP-1^s induzierte in *C. elegans* gewebeübergreifend die UPR-Aktivierung in Zellen des Darmes [75]. In einem murinen Mausmodell konnten Williams et al. zeigen, dass in POMC-Neuronen eine konstitutive Überexpression von XBP-1^s wiederum zur Aktivierung von XBP-1^s in Zellen der Leber führte [76].

4.3. Physikalische und biochemische Charakteristika putativer transmissibler Faktoren

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Methoden vorgestellt, die die biochemischen Charakteristika der Signalübertragung untersuchen und daher grundlegend für die Aufdeckung der molekularen Prozesse der ER Stress-Transmission sind.

Die Vielzahl an Inhaltsstoffen in Zellkulturüberständen, die mit FCS angereichert sind, erschwert eine nicht-gerichtete Faktorensuche in konditionierten Medien. In hohen Konzentrationen maskieren die verschiedenen Makromoleküle, Wachstumsfaktoren und insbesondere Trägereiweiße, wie BSA, die von Zellen in die Medien sezernierten Substanzen. Eine Möglichkeit, den Einsatz identifizierender Nachweißverfahren zu erleichtern, ist die Reduktion des Serumgehaltes in den genutzten Medien. Jedoch kann eine Veränderung der Kulturbedingung auch den Phänotyp und die Sekretionsleistung der kultivierten Zellen beeinträchtigen [128].

Um die Faktoren, die die ER Stress-Transmission vermitteln, einer Substanzklasse zuzuordnen, wurden eine Reihe von physikalischen und biochemischen Untersuchungen an den konditionierten Medien durchgeführt, denen jeweils eine gekoppelte Aktivitätsüberprüfung *in vitro* folgte. Zunächst wurde die Thermostabilität der Medien überprüft. Je höher der Temperaturbereich gewählt wurde, desto höher war die Wahrscheinlichkeit, dass die in den Medien enthaltenen Proteine thermisch denaturieren. Der Begriff der Denaturierung bezeichnet den Prozess, in dem durch Auflösung von Wasserstoffbindungen ein Protein von seiner nativen, tertiären Form in einen weniger geordneten Status übergeht. Dieser Vorgang geht meist mit einem Funktionsverlust des Proteins einher. Eine thermische Denaturierung entsteht in Säugetierzellen, wenn Temperaturen von 40-42 °C überschritten werden. Proteine reagieren unterschiedlich sensitiv auf die thermische Behandlung und können Gruppen mit unterschiedlichen Transitionstemperaturen zugeordnet werden, die zu einer Proteindenaturierung führen [117, 136]. Nach thermischer Behandlung führten die konditionierte Medien CM TG unabhängig von der gewählten Temperatur zur Induktion von ER Stress in den KC-13-2 (s. Abbildung 21). Eine Zuordnung der signalvermittelnden Faktoren zu einer Transitionstemperatur war daher nicht möglich. Vielmehr deutete dieses Ergebnis darauf hin, dass die signalvermittelnden Faktoren nicht aus der Substanzklasse der Proteine stammen. Jedoch existieren hitzebeständige Proteine, die höhere Temperaturbereiche tolerieren, ohne ihre spezifische Funktion zu verlieren. Hierzu zählen hitzestabile Proteine, wie DNA-Polymerasen oder sog. Hitzeschockproteine (HSP) [118]. HSP binden an denaturierte Proteine, um eine Aggregation zu vermeiden, oder unterstützen – falls der Prozess reparabel ist – eine korrekte Faltung von Proteinen [136]. Mahadevan et al. führten ebenfalls eine thermische Behandlung der konditionierten Medien durch und konnten zeigen, dass die konditionierten Medien hitzeresistent waren. Nach Inkubation von J774 Makrophagen in den konditionierten Medien nach Hitzebehandlung, wurde eine Induktion von BiP und IL-6 nachgewiesen. Bemerkenswert war, dass die konditionierten Medien nach Behandlung mit 95 °C zu einer stärkeren Induktion der Expression von BiP und IL-6 in den Empfängerzellen führte als nach Temperaturbehandlung bei 37 °C oder 56 °C [69]. Die gesuchten Faktoren lösten sich möglicherweise bei 95 °C von denaturierten Proteinen in den Medien, wodurch sich ihre Bioverfügbarkeit erhöhte.

Um die Beteiligung dieser hitzestabilen Proteine auszuschließen, wurden die konditionierten Medien einer enzymatischen, proteolytischen Degradation zugeführt. Auch nach Verdau des konditionierten Mediums CM TG und des konditionierten Kontrollmediums CM E mit Proteinase K konnte die Aktivität im Sinne einer ER Stress-Induktion in KC-13-2 weiterhin nachgewiesen werden (s. Abbildung 23). Die Resistenz gegenüber der Serin-Protease unterstützt die Vermutung, dass die Signalvermittlung nicht durch Proteine erfolgt. Denn die Proteinase K degradiert unspezifisch eine Vielzahl von Proteinen, in dem Peptidbindungen angrenzend an die Karboxylgruppen gespalten werden [119]. Auch nach Desoxyribonuklease-Verdau der konditionierten Medien blieb die Fähigkeit zur ER Stress-Signalübertragung nach Transfer auf die naiven KC-13-2 erhalten (s. Abbildung 25). Somit stammen die an der Signalübertragung beteiligten Substanzen möglicherweise aus der Klasse der Lipide. In der Literatur wird diese Untersuchungsserie – bestehend aus der thermischen Behandlung, dem Proteinase K- und Desoxyribonuklease-Verdau, jeweils gefolgt von Aktivitätsüberprüfungen – häufig in biologischen Matrices angewandt, um Substanzklassen zu identifizieren. Beispielsweise konnte unter Nutzung dieser Methoden die Substanzklasse eines Lockstoffs für phagozytierende Zellen in Überständen von apoptotischen Zellen auf Lipide eingegrenzt werden, indem Proteine und DNA als Überträgermoleküle ausgeschlossen wurden. Auf dieser Grundlage konnte das Phospholipid, Lysophosphatidylcholin als ein Lockstoff identifiziert werden [99]. Taylor und Dillin et al. zeigten in ihren Untersuchungen in *C. elegans*, dass die Reduktion von Vesikeln die nicht autonome Aktivierung der UPR-Signalwege in den Zellen des Darmes verhindert. Diese Ergebnisse begründeten die Hypothese, nach der möglicherweise Neurotransmitter die ER Stress-Transmission vermitteln [75]. Trotz Berücksichtigung der Speziesunterschiede sowie der *in vivo*-Bedingungen, ist es nicht wahrscheinlich, dass Neurotransmitter nach thermischer Behandlung und Proteinase K-Verdau in den in dieser Arbeit durchgeführten Überstandsmodellen die ER Stress-Transmission vermitteln.

4.4. Aktivitätstestungen der konditionierten Medien nach Lipidextraktion und HILIC-basierter Fraktionierung

Mit Hilfe der vorangestellten physikalischen und biochemischen Untersuchungen der konditionierten Medien wurden die gesuchten Faktoren in die Substanzklasse der Lipide eingeordnet. Lipide sind meistens hydrophobe Moleküle und lassen sich mithilfe von

Lösungsmitteln wie Methanol und Chloroform aus wässrigen Stoffgemischen abtrennen [103]. Durch die Abtrennung mittels Extraktion nach Bligh und Dyer konnte demonstriert werden, dass die ER Stress-vermittelnden Substanzen in den konditionierten Medien in den Lösungsmitteln Chloroform und Methanol aufgenommen werden können. Denn das Lipidextrakt, gewonnen aus dem konditionierten Medium CM TG, konnte wieder in Nährmedien überführt werden und in der Reporterzelllinie CHO-S21 XBP-1 und CHOP induzieren (s. Abbildung 28). Vielmehr war die biologische Aktivität der Faktoren im konditionierten Medium CM TG auch nach weiteren HILIC-basierten Fraktionierungen stabil und konnte eine robuste ER Stress-Antwort in CHO-S21-Zellen auslösen (s. Abbildung 30). Schlussendlich wurden die aktiven Fraktionen, in einem Prozess aus HILIC-basierten Fraktionierungen und gekoppelten *in vitro*-Aktivitätsmessungen auch in Subfraktionen der zusammengeführten aktiven Fraktionen 1 und 2 nach Lipidextraktion der CM TG gefunden. Die Subfraktion SF1 und begrenzt die Subfraktion SF2 der CM TG lösten eine ER Stress-Antwort in CHO-S21 aus (s. Abbildung 31).

Neben Kohlenhydraten, Proteinen und Nukleinsäuren gehört die Klasse der Lipide zu den vier Substanzklassen, die die Baustoffe von lebenden Organismen bilden. Lipide stellen eine äußerst heterogene Substanzklasse dar und sind durch ihre fehlende bzw. partielle Löslichkeit in Wasser charakterisiert [137]. Im menschlichen Körper erfüllen Lipide eine Vielzahl von Funktionen. Zu diesen gehören ihre Eignung als Energiespeicher, die Beteiligung am Aufbau von Zellmembranen und ihre Fähigkeit zur Signalvermittlung [1]. Die strukturelle Komposition von Lipiden variiert stark und ist in Bezug auf ihre primäre Struktur komplexer als der Aufbau der DNA und von Proteinen, die aus Kombinationen von linear angeordneten Nukleinsäuren bzw. Aminosäuren bestehen [138]. Analog des LIPID MAP® Konsortiums lassen sich Lipide in acht übergeordnete Kategorien unterteilen. Hierzu zählen Fettsäuren, Glycerolipide, Glycerophospholipide, Sphingolipide, Sterollipide, Prenollipide, Glykolipide und Polyketide [137]. Als Teilmenge des Metaboloms umfasst das Lipidom das vollständige Lipidprofil einer Zelle, eines Gewebes oder Organismus. Das zugehörige Forschungsfeld der Lipidomik befasst sich mit der umfassenden Analyse und funktionellen Charakterisierung von Lipidmolekülen [138]. Die hydrophoben Eigenschaften der Lipide werden vor allem durch Kohlenstoffketten vermittelt. Als Beispiel ist Palmitat (C16:0) zu nennen, welches aus einer Carboxygruppe und einer unverzweigten Kohlenstoffkette besteht, die die geringe Löslichkeit in Wasser bedingt

[134]. Zur Herstellung der *in vitro*-Bioverfügbarkeit für die Kupffer Zellen in der vorliegenden Arbeit war es notwendig, Palmitat an BSA zu binden. Hierdurch war die freie Fettsäure, bzw. das Salz, für die Zellen verfügbar und induzierte die Expression von GADD34 in KC-13-2 (s. Abbildung 18). Freie Fettsäuren und ihre Salze, wie Palmitat, verändern die Zusammensetzung der ER-Membranen und aktivieren die transmembranären Proteine PERK und IRE-1 ohne Vorliegen eines endoluminalen Signals [62]. Sollte der gesuchte Faktor eine rein lipophile Substanz sein, wie eine freie Fettsäure, wäre er in den Überständen nur schwer in Lösung zu bringen und würde zur Bindung beispielsweise Trägerproteine benötigen. Es existieren eine Vielzahl an amphiphilen Molekülen, die ebenfalls zur Stoffgruppe der Lipide gehören, wie Phospholipide oder Glykolipide, die jedoch vielmehr als Strukturträger an dem Aufbau biologischer Membranen beteiligt sind [1].

Es ist nicht *per se* unwahrscheinlich, dass Moleküle aus der Klasse der Lipide die Transmission des ER Stress-Signals vermitteln, denn es existieren eine Reihe von Lipiden, die im menschlichen Organismus als Signalvermittler wirken und in Zellen ER Stress auslösen können. Dies wird am Beispiel der Cholesterine veranschaulicht. Cholesterine sind Vorläufermoleküle für die Synthese von Steroidhormonen, wie Sexualhormone oder Glukokortikoide, die in endokrinen Drüsen gebildet werden und über einen nukleären Rezeptor wirken [1]. Die Behandlung mit dem Steroid 5-Androsten-3 β ,17 α -diol führte in der Glioblastomzelllinie T98G zur Induktion von BiP und der Expression von CHOP [139]. Auch in der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP löste die Behandlung mit dem Androgenderivat R1881, die Induktion von XBP-1^s und BiP aus. Jedoch erfolgte die Aktivierung der UPR erst 24 h bzw. 48 h nach der Behandlung [140, 141]. Die Latenz der ER Stress-Induktion reflektiert möglicherweise die Wirkweise von Steroidhormonen. Vermittelt durch ihre lipophilen Eigenschaften permeieren Steroidhormone die Zellmembran, bilden intrazellulär mit einem nukleären Rezeptor einen Komplex, der an konservierte DNA-Sequenzen bindet und hierüber die Genexpression reguliert [1]. In den Kupffer Zellen KC-13-2 konnte nach Behandlung mit CM TG die Induktion der Expression von ATF-4 bereits nach 4 h detektiert werden (s. Abbildung 10 und Abbildung 11). In den KUP5-Zellen führte die Behandlung mit CM TG bereits nach 2 h zum Absterben der Zellen (s. Abbildung 15). Hieraus lässt sich schließen, dass die gesuchten Substanzen einen raschen Wirkeintritt vermitteln müssen.

Zu einem weiteren wichtigen Vorläufermolekül gehört die Arachidonsäure, welche die Verbindung der Lipidbiosynthese zu UPR-Signalwegen offenlegt. Ihre Derivate, wie Leukotriene oder Prostaglandine, werden ubiquitär in menschlichen Geweben synthetisiert und verfügen über ein vielfältiges Wirkspektrum, das von Vaso- und Bronchodilatation (Prostaglandin E₂) zur Mediation inflammatorischer Prozesse (Leukotriene) reicht [1]. Das Arachidonsäure-Derivat 12(S)-HETE und sein Vorläufermolekül 12(S)-HPETE induzieren die Expression von ER Stress-Markern in der Adipozyten-ähnlichen Zelllinie 3T3-L1 [142]. Das Enzym 12/15-Lipoxygenase setzt die Arachidonsäure zu 12(S)-HPETE um, welches durch ubiquitär vorkommende Peroxidasen zu 12(S)-HETE reduziert wird [143]. Die *in vitro*-Behandlung mit dem ER Stress-Induktor Tunicamycin erhöhte die Expression der 12/15-Lipoxygenase in 3T3-L1-Zellen und führte zur Sekretion von 12(S)-HETE in die Kulturüberstände. Hingegen schwächte die Hemmung der 12/15-Lipoxygenase eine Tunicamycin-vermittelte ER Stress-Induktion ab [142]. Diese Beobachtung zeigt, wie Veränderungen des Lipidstoffwechsels eine UPR modulieren können und, dass Zellen als Antwort auf eine chemische ER Stress-Induktion Lipide in Überstände sezernieren, die über das Potential verfügen, eine *de novo*-UPR auszulösen. Zellen können ihre Kulturüberstände möglicherweise auch mit mehreren Faktoren anreichern, die als Zusammenspiel verschiedener Lipide in konditionierten Medien die Transmission von ER Stress vermitteln.

4.5. *de novo*-UPR auf Basis einer pharmakologischen ER Stress-Induktion *in vitro* als reales Phänomen oder Artefakt – ein Ausblick

Die vorliegende Arbeit bietet eine Grundlage für die Identifizierung möglicher Faktoren in Überständen, die in naiven Zellen eine *de novo*-UPR auslösen. Nach Chloroform-Methanol-Extraktion und weiterer HILIC-basierter Fraktionierung konnte das gesuchte Signal stabil in den Reporterzellen CHO-S21 reproduziert werden (s Abbildung 31). Dieser aufwändige Vorgang trennt die gesuchte Substanz von den weiteren Inhaltsstoffen der Medien ab, die als Störfaktoren gesuchte Substanzen in identifizierenden Nachweisemethoden maskieren. Mit jeder Stufe der Fraktionierung bzw. Subfraktionierung erfolgt eine weitere Reduktion enthaltener Stoffe. Hieran angeschlossen sollte eine ungerichtete Suche mittels Massenspektrometrie (MS) erfolgen, die die aktive Fraktion des konditionierten Mediums CM TG mit der korrespondierenden Probe des konditionierten

Kontrollmediums CM E vergleicht. Nach einer solchen Untersuchung müsste zwingend eine biologische Aktivitätsuntersuchung erfolgen. Substanzen, die möglicherweise in CM TG und nicht bzw. weniger in CM E enthalten sind, sollten daher *in vitro* getestet und ihre biologische Aktivität mit der des CM TG verglichen werden. Weiterhin kann auch eine gerichtete, MS-gestützte Untersuchung der Medien bzw. ihrer Fraktionen erfolgen, als sogenannter *targeted approach*. Gezielt sollte dabei in den CM TG nach lipidartigen Substanzen gesucht werden, die bekanntermaßen eine ER Stress-Induktion auslösen können, wie z.B. das Arachidonsäurederivat 12-S-HETE [142]. Aufgrund der molekularen Verbindungen zwischen den Signalwegen der UPR und der Lipidsynthese könnte durch pharmakologische Eingriffe in die Synthesewege der einzelnen Lipidklassen eine Modulation der ER Stress-Transmission überprüft werden. Konkret könnte untersucht werden, ob die Inhibition von Schlüsselenzymen der Lipidsynthese in den Donorzellen zu einem Aktivitätsverlust der konditionierten Medien CM TG in den Akzeptorzellen führt, wodurch die Anzahl an Lipidgruppen potentieller Kandidaten weiter eingegrenzt wird.

Die Eignung der pharmaka-basierten Protokolle zur Untersuchung der ER Stress-Transmission kann mit Blick auf eine mögliche Verschleppung der ER Stress-Induktoren kritisch beurteilt werden. Residuelle Konzentrationen an Thapsigargin in den konditionierten Medien könnten die eigentliche Ursache der UPR-Induktion in den Akzeptorzellen sein. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass es in den eigenen Modellen, die auf einer Palmitatbehandlung und Glukosedepriuation basierten, nicht gelang eine *de novo*-UPR in Akzeptorzellen zu erzeugen (s. Abbildung 20). Auch die Arbeitsgruppe von van Ziel et al. konnte anhand von genetisch-induzierbaren ER Stress-Modellen oder nach Nährstoffentzug in ihren *in vitro*-Untersuchungen keine Evidenz für ein funktionierendes, pharmaka-freies Transmissionsprotokoll erkennen. Als einen indirekten Beweis für die Verschleppung der Induktoren in der Phase der Generation der konditionierten Medien, stellen die Autoren ein Experiment vor, in dem die Medien in Kulturschalen mit Donorzellen und in Kulturschalen ohne Donorzellen unter Verwendung von Thapsigargin hergestellt werden. Nach Transfer induzierten beide Medien in der naiven Neuroblastomzelllinie SK-N-SH die UPR-Marker BiP, ATF-4 und XBP-1^s [135]. Dieses Phänomen lässt sich durch eine Adhärenz der Substanz Thapsigargin an der Plastikoberfläche der Kulturschalen erklären, jedoch ist anzumerken, dass die Autoren für die initiale UPR-Induktion in den Donorzellen mit Thapsigargin eine

Konzentration von c_{TG} : 5 μ M verwendeten. Diese liegt in einem deutlich höheren Bereich als die eingesetzte Konzentration an Thapsigargin von c_{TG} : 0,6 μ M in dieser Arbeit oder auch in den Arbeiten von Mahadevan et al (c_{TG} : 0,3 μ M) [69, 135]. Allerdings adressieren die Autoren ein Problem der *in vitro*-Medikamentenforschung, da insbesondere lipophile Substanzen mit der Polystyroloberfläche von Zellkulturschalen interagieren und in Konzentrationen adhären können, die weiterhin biologisch aktiv sind [144]. Gekoppelte Verfahren, wie HPLC-MS/MS, könnten den direkten Beweis erbringen, ob in den konditionierten Medien CM TG oder den aktiven Fraktionen Thapsigargin enthalten ist. Mahadevan et al. fanden in ihren MS-basierten Untersuchungen keinen Hinweis auf residuelle Konzentrationen von Thapsigargin [69]. Insbesondere vor dem Hintergrund einer möglichen Adhärenz von Thapsigargin an Polystyroloberflächen sollten diese Messungen wiederholt werden. Falls Thapsigargin mittels MS-basierter Methoden in den Fraktionen der CM TG nachgewiesen werden kann, sollte die Aktivität der jeweiligen Fraktionen *in vitro* getestet und eine Quantifizierung angeschlossen werden. Anhand einer *in vitro*-getesteten Verdünnungsreihe von Thapsigargin müsste der Grenzwert ermittelt werden, an dem eine UPR-Induktion gerade noch detektierbar ist, und der gemessenen Konzentration an Thapsigargin in dem Medium CM TG gegenübergestellt werden.

5. Zusammenfassung

UPR-Signalwege sind in die pathophysiologischen Vorgänge einer Vielzahl von Erkrankungen integriert. Neuen Erkenntnissen zufolge unterliegt die Aktivierung der ER Stress-Antwort nicht nur zelleigenen Prozessen, sondern auch nicht autonomen Regulationsmechanismen. Tumorzellen, in denen UPR-Signalwege induziert sind, können in myeloischen Zellen eine *de novo*-UPR auslösen. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu überprüfen, ob die UPR-Induktion in Hepatozyten auch zu einer Modulation der ER Stress-Antwort in Kupffer Zellen führt. Für die Untersuchung dieser Signalübertragung wurde die Zelllinie Hepa-1-6 als geeignete Donorzellen identifiziert, da sie, nach Stimulation mit dem SERCA-Inhibitor Thapsigargin, eine robuste ER Stress-Induktion entfaltet (s. Abbildung 7, Abbildung 8 und Abbildung 9). Das konditionierte Medium CM TG und das konditionierte Kontrollmedium CM E wurden in Hepa-1-6 generiert und auf die Kupffer Zelllinie KC-13-2 transferiert. Diese Behandlung induzierte in den Akzeptorzellen KC-13-2 eine *de novo*-UPR (s. Abbildung 10 und Abbildung 11), nicht jedoch in den Donorzellen Hepa-1-6 (s. Abbildung 11). Die zelltypabhängige Wirkung der ER Stress-Transmission wurde in den Experimenten zur Zellzyklusanalyse in KC-13-2, KUP5, AML-12 und Hepa-1-6 bestätigt. Nach Behandlung mit den konditionierten Medien konnte in den beiden Kupffer Zelllinien KC-13-2 und KUP5 mit 33 % respektive 62 % ein erhöhter Anteil an Zellen der Sub-G₁-Population zugeordnet werden (s. Abbildung 14 und Abbildung 15). Hingegen wurde in den Zelllinien AML-12 lediglich eine geringe und in den Hepa-1-6 keine relevant erhöhte Population durchflusszytometrisch detektiert, die mit einem Zelluntergang assoziiert war (s. Abbildung 16 und Abbildung 17). Da das pharmaka-basierte Modell der ER Stress-Übertragung artifiziell ist, wurde versucht, die Zell-zu-Zell-Transmission des UPR-Signals unter Verwendung von ER Stress-Stimuli zu reproduzieren, die im pathophysiologischen Kontext von Erkrankungen auftreten, wie eine Palmitatbehandlung oder Glukosedeprievation. Zunächst wurde zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit in wässrigen Lösungen Palmitat an BSA konjugiert und in Nährmedien angereichert. Hierdurch wurde eine Akkumulation von Lipiden im umgebenen Milieu der Kupffer Zellen erzeugt, die die Vorgänge in nicht-alkoholischen Fettlebererkrankungen simulierte. Die Behandlung mit Palmitat führte zu einer Induktion von GADD34 in KC-13-2 (s. Abbildung 18). Diese UPR-Induktion konnte durch Hinzugabe von Oleat in die palmitathaltigen Nährmedien abgeschwächt werden (s. Abbildung 19). Als Zwischenergebnis lässt sich daher

festhalten, dass die Komposition freier Fettsäuren in Nährmedien einen entscheidenden Einfluss auf die ER Stress-Intensität nimmt.

In einem Ko-Kultivierungssystem gelang die Induktion einer *de novo*-UPR in KC-13-2 unter Verwendung einer pharmaka-basierten, nicht jedoch auf Grundlage einer pharmaka-freien ER Stress-Induktion in den Donorzellen (s. Abbildung 20 und Abbildung 21). So führte die Ko-Kultivierung der vorab mit Palmitat behandelten oder unter Entzug von Glukose inkubierten Donorzellen nicht zu einer ER Stress-Induktion in Donor- oder Akzeptorzellen. Hingegen induzierte die Ko-Kultivierung mit Donorzellen, die zuvor mit Thapsigargin behandelt wurden, eine ER Stress-Antwort in KC-13-2.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit umfasste die physikalische und biochemische Charakterisierung der möglicherweise von Donorzellen sezernierten Faktoren, die in den Akzeptorzellen eine *de novo*-UPR auslösen können. Um die Faktoren einer Substanzklasse zuzuordnen, wurden die konditionierten Medien einer thermischen Behandlung ausgesetzt und weiterhin einem Proteinase K- sowie Desoxyribonuklease-Verdau unterzogen. Nach angeschlossener Aktivitätstestung führte das Medium CM TG weiterhin zu einer ER Stress-Induktion in KC-13-2, wodurch der robuste, thermisch stabile Charakter der enthaltenden, aktivitäts-vermittelnden Substanzen demonstriert wurde (s. Abbildung 22, Abbildung 23 und Abbildung 25). Folglich war es nicht anzunehmen, dass DNA-Moleküle an der Vermittlung der Transmission beteiligt sind oder die gesuchten Faktoren der Substanzklasse der Proteine angehören. Durch eine Chloroform-Methanol-Extraktion wurde die vollständige, lipidhaltige Phase der konditionierten Medien abgetrennt, die in den CHO-S21-Reporterzellen zu einer Induktion der UPR-Arme PERK und IRE-1 führte (s. Abbildung 27). Somit gelang unter Ausnutzung ihrer lipophilen Eigenschaften die Zuordnung der gesuchten Faktoren in die Substanzklasse der Lipide. Mithilfe einer HILIC-basierten Trennmethode wurde das Lipidextrakt der konditionierten Medien in mehrere Fraktionen unterteilt und die Aktivität in CHO-S21-Reporterzellen untersucht (s. Abbildung 28). Die Fraktionen F1 und F2 der Medien CM TG induzierten die UPR-Marker CHOP und XBP-1 in CHO-S21 und wurden erneut in Subfraktionen aufgetrennt. Aus der Abfolge von HILIC-basierten Fraktionierungen und gekoppelten *in vitro*-Aktivitätstestungen entstand ein iterativer Prozess, der es ermöglichte, die aktive Probe in einer zweiten Ebene der Fraktionierung den Subfraktionen SF1 und in einem geringeren Maße

SF2 zuzuordnen (s. Abbildung 30 und Abbildung 31). Diese Methode führte zur Reduktion der in den Medien enthaltenen Substanzen und bietet daher die Grundlage für in Zukunft folgende identifizierende Nachweisverfahren.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der UPR Signalkaskaden.	14
Abbildung 2: ER Stress und Zelltod.	20
Abbildung 3: ER Stress-Induktion durch Palmitat.	26
Abbildung 4: Hypothese der Modulation eines Tumormikromilieus über die Transmission des ER Stress-Signals.	33
Abbildung 5: Generierung des konditionierten Mediums Thapsigargin.....	46
Abbildung 6: Schema der Ko-Kultivierung.....	49
Abbildung 7: Relative Expression von BiP nach Behandlung mit Thapsigargin in murinen Hepatozyten und Kupffer Zellen	65
Abbildung 8: Relative Expression von ATF-4 nach Behandlung mit Thapsigargin in murinen Hepatozyten und Kupffer Zellen	65
Abbildung 9: Relative Expression von GADD34 nach Behandlung mit Thapsigargin in murinen Hepatozyten und Kupffer Zellen.	66
Abbildung 10: Expression von GADD34 in KC-13-2 nach Behandlung mit CM E, CM TG und Thapsigargin.	68
Abbildung 11: Expression von ATF-4 in KC-13-2 und Hepa-1-6 nach Behandlung mit CM E und CM TG.	69
Abbildung 12: Zwischenergebnis – Messung der ER Stress Induktion in KC-13-2 und Hepa-1-6 nach Behandlung mit Thapsigargin und nach Behandlung mit dem konditionierten Medium CM TG.	70
Abbildung 13: Zellzyklus-Untersuchung mittels Propidiumiodid-Färbung nach Behandlung mit konditionierten Medien.	72
Abbildung 14: Untersuchung der Sub-G ₁ -Population mittels Propidiumiodid-Färbung in KC-13-2 nach Behandlung mit CM E und CM TG.....	73
Abbildung 15: Untersuchung der Sub-G ₁ -Population mittels Propidiumiodid-Färbung in KUP5 nach Behandlung mit CME und CM TG	74
Abbildung 16: Untersuchung der Sub-G ₁ -Population mittels Propidiumiodid-Färbung in Hepa-1-6 nach Behandlung mit CME und CM TG	74
Abbildung 17: Untersuchung der Sub-G ₁ -Population mittels Propidiumiodid-Färbung in AML-12 nach Behandlung mit CM E und CM TG.....	75

Abbildung 18: Expression von GADD34 in KC-13-2 nach Behandlung mit Palmitat.	77
Abbildung 19: Expression von GADD34 in KC-13-2 nach kombinierter Behandlung mit Palmitat und Oleat.	78
Abbildung 20: Expression von GADD34 in Hepa-1-6 und KC-13-2, kultiviert in einem Zwei-Kompartiment-Kultursystem, nach A Palmitat-Behandlung und B Glukose-Deprivation der Donorzellen.	80
Abbildung 21: Expression von ATF-4 in Hepa-1-6 und KC-13-2, kultiviert in einem Zwei-Kompartiment-Kultursystem, nach Behandlung der Donorzellen mit Thapsigargin (TG) oder Ethanol (EtOH).	82
Abbildung 22: Expression von GADD34 in KC-13-2 inkubiert in CM E und CM TG nach Temperaturbehandlung der Medien.	84
Abbildung 23: Expression von GADD34 in KC-13-2 inkubiert in CM E und CM TG nach Proteinase K-Verdau der Medien.	85
Abbildung 24: SDS-PAGE und Coomassie-Färbung von BSA-Proben in Medien nach Proteinase K-Verdau.	86
Abbildung 25: Expression von GADD34 in KC-13-2 inkubiert in CM E und CM TG nach DNase-Verdau der Medien.	87
Abbildung 26: Agarose-Gel und Ethidiumbromid-Färbung von pDNA-Proben in H ₂ O und Medien nach DNase-Verdau.	88
Abbildung 27: Fluoreszenzsignal in CHO-S21-Zellen nach Behandlung mit CM E und CM TG.	90
Abbildung 28: Fluoreszenzsignal in CHO-S21-Zellen nach Behandlung mit den Lipidextrakten aus CM E und CM TG.	91
Abbildung 29: Schematische Darstellung der Aktivitäts-geführten Fraktionierung.	92
Abbildung 30: Fluoreszenzsignal in CHO-S21-Zellen inkubiert in CM E und CM TG nach HILIC-basierter Fraktionierung.	93
Abbildung 31: Fluoreszenzsignal in CHO-S21-Zellen inkubiert in CM E und CM TG nach HILIC-basierter Subfraktionierung.	94

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien	35
Tabelle 2: Antibiotika	35
Tabelle 3: Antikörper	36
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Zelllinien	37
Tabelle 5: Zusammensetzung der Kulturmedien	38
Tabelle 6: Reagenzien für die Zellkultur	39
Tabelle 7: Verwendete Kits	40
Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien	40
Tabelle 9: Pufferlösungen.....	42
Tabelle 10: Komponenten der SDS-Gele	43
Tabelle 11: Primer für die qRT-PCR	43
Tabelle 12: Ansatz zur Konjugation von Palmitat an BSA	47
Tabelle 13: Zusammensetzung des Ansatzes für die cDNA-Synthese	56
Tabelle 14: Programm für die cDNA-Synthese.....	56
Tabelle 15: Zusammensetzung Ansatz Sonde und SYBR-Green für die qRT-PCR	57

8. Literaturverzeichnis

1. Heinrich PC, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. In; 2014: Online-Ressource (XXIX, 1073 S, online resource). doi:10.1007/978-3-642-17972-3
2. Adams CJ, Kopp MC, Larburu N et al. Structure and Molecular Mechanism of ER Stress Signaling by the Unfolded Protein Response Signal Activator IRE1. 2019; 6. doi:10.3389/fmolb.2019.00011
3. Smith MH, Ploegh HL, Weissman JS. Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science (New York, NY)* 2011; 334: 1086-1090. doi:10.1126/science.1209235
4. Olivari S, Molinari M. Glycoprotein folding and the role of EDEM1, EDEM2 and EDEM3 in degradation of folding-defective glycoproteins. *FEBS letters* 2007; 581: 3658-3664. doi:10.1016/j.febslet.2007.04.070
5. Oakes SA, Papa FR. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol* 2015; 10: 173-194. doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104649
6. Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci* 2016; 73: 79-94. doi:10.1007/s00018-015-2052-6
7. Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda, Md)* 2007; 22: 193-201. doi:10.1152/physiol.00050.2006
8. Walter P, Ron D. The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. 2011; 334: 1081-1086. doi:10.1126/science.1209038 %J Science
9. Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods* 2005; 35: 373-381. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.10.010>
10. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007; 8: 519-529. doi:10.1038/nrm2199
11. Lindholm D, Korhonen L, Eriksson O et al. Recent Insights into the Role of Unfolded Protein Response in ER Stress in Health and Disease. 2017; 5. doi:10.3389/fcell.2017.00048
12. Kim RS, Hasegawa D, Goossens N et al. The XBP1 Arm of the Unfolded Protein Response Induces Fibrogenic Activity in Hepatic Stellate Cells Through Autophagy. *Sci Rep* 2016; 6: 39342-39342. doi:10.1038/srep39342
13. Fritz JM, Dong M, Apsley KS et al. Deficiency of the BiP cochaperone ERdj4 causes constitutive endoplasmic reticulum stress and metabolic defects. 2014; 25: 431-440. doi:10.1091/mbc.e13-06-0319
14. Maurel M, Chevet E, Tavernier J et al. Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends in biochemical sciences* 2014; 39: 245-254. doi:10.1016/j.tibs.2014.02.008
15. Cao SS, Kaufman RJ. Unfolded protein response. *Current Biology* 2012; 22: R622-R626. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.004>
16. Choy MS, Yusoff P, Lee IC et al. Structural and Functional Analysis of the GADD34:PP1 eIF2alpha Phosphatase. *Cell reports* 2015; 11: 1885-1891. doi:10.1016/j.celrep.2015.05.043

17. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology* 2012; 13: 89-102. doi:10.1038/nrm3270
18. Ye J, Rawson RB, Komuro R et al. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Molecular cell* 2000; 6: 1355-1364. doi:10.1016/s1097-2765(00)00133-7
19. Yoshida H, Okada T, Haze K et al. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Molecular and cellular biology* 2000; 20: 6755-6767. doi:10.1128/mcb.20.18.6755-6767.2000
20. Hetz C, Chevet E, Oakes SA. Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nature Cell Biology* 2015; 17: 829-838. doi:10.1038/ncb3184
21. Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes & development* 2004; 18: 3066-3077. doi:10.1101/gad.1250704
22. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO et al. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Molecular and cellular biology* 2001; 21: 1249-1259. doi:10.1128/mcb.21.4.1249-1259.2001
23. Lu M, Lawrence DA, Marsters S et al. Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis. *Science (New York, NY)* 2014; 345: 98-101. doi:10.1126/science.1254312
24. Zlotorynski E. DR5 unfolds ER stress. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014; 15: 499-499. doi:10.1038/nrm3843
25. Wang C, Youle RJ. The role of mitochondria in apoptosis*. *Annual review of genetics* 2009; 43: 95-118. doi:10.1146/annurev-genet-102108-134850
26. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116: 205-219. doi:10.1016/s0092-8674(04)00046-7
27. Wei MC, Zong WX, Cheng EH et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science (New York, NY)* 2001; 292: 727-730. doi:10.1126/science.1059108
28. Shore GC, Papa FR, Oakes SA. Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. *Current opinion in cell biology* 2011; 23: 143-149. doi:10.1016/j.ceb.2010.11.003
29. Li J, Lee B, Lee AS. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *The Journal of biological chemistry* 2006; 281: 7260-7270. doi:10.1074/jbc.M509868200
30. Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature Cell Biology* 2011; 13: 184-190. doi:10.1038/ncb0311-184
31. Urano F, Wang X, Bertolotti A et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science (New York, NY)* 2000; 287: 664-666. doi:10.1126/science.287.5453.664
32. Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 2008; 27: 6245-6251. doi:10.1038/onc.2008.301
33. Urra H, Dufey E, Avril T et al. Endoplasmic Reticulum Stress and the Hallmarks of Cancer. *Trends in cancer* 2016; 2: 252-262. doi:10.1016/j.trecan.2016.03.007

34. Wang M, Kaufman RJ. The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nature Reviews Cancer* 2014; 14: 581-597. doi:10.1038/nrc3800
35. Shuda M, Kondoh N, Imazeki N et al. Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis. *Journal of hepatology* 2003; 38: 605-614. doi:10.1016/s0168-8278(03)00029-1
36. Blais JD, Addison CL, Edge R et al. Perk-dependent translational regulation promotes tumor cell adaptation and angiogenesis in response to hypoxic stress. *Molecular and cellular biology* 2006; 26: 9517-9532. doi:10.1128/MCB.01145-06
37. Chen X, Iliopoulos D, Zhang Q et al. XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 α pathway. *Nature* 2014; 508: 103-107. doi:10.1038/nature13119
38. Pluquet O, Dejeans N, Bouche-careilh M et al. Posttranscriptional regulation of PER1 underlies the oncogenic function of IRE α . *Cancer research* 2013; 73: 4732-4743. doi:10.1158/0008-5472.Can-12-3989
39. Kharabi Masouleh B, Geng H, Hurtz C et al. Mechanistic rationale for targeting the unfolded protein response in pre-B acute lymphoblastic leukemia. 2014; 111: E2219-E2228. doi:10.1073/pnas.1400958111 %J Proceedings of the National Academy of Sciences
40. Ranganathan AC, Zhang L, Adam AP et al. Functional coupling of p38-induced up-regulation of BiP and activation of RNA-dependent protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase to drug resistance of dormant carcinoma cells. *Cancer research* 2006; 66: 1702-1711. doi:10.1158/0008-5472.Can-05-3092
41. Zanetti M, Rodvold JJ, Mahadevan NR. The evolving paradigm of cell-nonautonomous UPR-based regulation of immunity by cancer cells. *Oncogene* 2016; 35: 269-278. doi:10.1038/onc.2015.108
42. Jo H, Lee J, Jeon J et al. The critical role of glucose deprivation in epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma under hypoxia. *Sci Rep* 2020; 10: 1538. doi:10.1038/s41598-020-58124-1
43. Hay N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nature Reviews Cancer* 2016; 16: 635-649. doi:10.1038/nrc.2016.77
44. Dang CV, Semenza GL. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends in biochemical sciences* 1999; 24: 68-72. doi:10.1016/s0968-0004(98)01344-9
45. Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science (New York, NY)* 1956; 123: 309-314
46. Palorini R, Cammarata FP, Balestrieri C et al. Glucose starvation induces cell death in K-ras-transformed cells by interfering with the hexosamine biosynthesis pathway and activating the unfolded protein response. *Cell Death Dis* 2013; 4: e732. doi:10.1038/cddis.2013.257
47. Iurlaro R, Püschel F, León-Annicchiarico CL et al. Glucose Deprivation Induces ATF4-Mediated Apoptosis through TRAIL Death Receptors. *Molecular and cellular biology* 2017; 37: e00479-00416. doi:10.1128/MCB.00479-16
48. Wang Zhao V, Deng Y, Gao N et al. Spliced X-Box Binding Protein 1 Couples the Unfolded Protein Response to Hexosamine Biosynthetic Pathway. *Cell* 2014; 156: 1179-1192. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.014>
49. de la Cadena SG, Hernández-Fonseca K, Camacho-Arroyo I et al. Glucose deprivation induces reticulum stress by the PERK pathway and caspase-7- and calpain-mediated caspase-12 activation. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 2014; 19: 414-427. doi:10.1007/s10495-013-0930-7

50. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2018; 15: 11-20. doi:10.1038/nrgastro.2017.109
51. Vanni E, Bugianesi E, Kotronen A et al. From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 2010; 42: 320-330. doi:10.1016/j.dld.2010.01.016
52. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845. doi:10.1016/s0016-5085(98)70599-2
53. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. 2010; 52: 1836-1846. doi:10.1002/hep.24001
54. Lee AH, Scapa EF, Cohen DE et al. Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science (New York, NY)* 2008; 320: 1492-1496. doi:10.1126/science.1158042
55. Oyadomari S, Harding HP, Zhang Y et al. Dephosphorylation of translation initiation factor 2alpha enhances glucose tolerance and attenuates hepatosteatosis in mice. *Cell metabolism* 2008; 7: 520-532. doi:10.1016/j.cmet.2008.04.011
56. Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW et al. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *The Journal of biological chemistry* 2006; 281: 12093-12101. doi:10.1074/jbc.M510660200
57. Xu S, Nam SM, Kim JH et al. Palmitate induces ER calcium depletion and apoptosis in mouse podocytes subsequent to mitochondrial oxidative stress. *Cell Death & Disease* 2015; 6: e1976-e1976. doi:10.1038/cddis.2015.331
58. Kim SK, Oh E, Yun M et al. Palmitate induces cisternal ER expansion via the activation of XBP-1/CCTα-mediated phospholipid accumulation in RAW 264.7 cells. *Lipids in health and disease* 2015; 14: 73. doi:10.1186/s12944-015-0077-3
59. Akoumi A, Haffar T, Moustergi M et al. Palmitate mediated diacylglycerol accumulation causes endoplasmic reticulum stress, Plin2 degradation, and cell death in H9C2 cardiomyoblasts. *Experimental Cell Research* 2017; 354: 85-94. doi:<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.032>
60. Borradaile NM, Han X, Harp JD et al. Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. *Journal of lipid research* 2006; 47: 2726-2737. doi:10.1194/jlr.M600299-JLR200
61. Parthasarathy G, Revelo X, Malhi H. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: An Overview. *Hepatology Communications* 2020; 4: 478-492. doi:10.1002/hep4.1479
62. Volmer R, van der Ploeg K, Ron D. Membrane lipid saturation activates endoplasmic reticulum unfolded protein response transducers through their transmembrane domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2013; 110: 4628. doi:10.1073/pnas.1217611110
63. Lytton J, Westlin M, Hanley MR. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *The Journal of biological chemistry* 1991; 266: 17067-17071
64. Bahar E, Kim H, Yoon H. ER Stress-Mediated Signaling: Action Potential and Ca(2+) as Key Players. *International journal of molecular sciences* 2016; 17. doi:10.3390/ijms17091558
65. Heifetz A, Keenan RW, Elbein AD. Mechanism of action of tunicamycin on the UDP-GlcNAc:dolichyl-phosphate Glc-NAc-1-phosphate transferase. *Biochemistry* 1979; 18: 2186-2192. doi:10.1021/bi00578a008

66. Bull VH, Thiede B. Proteome analysis of tunicamycin-induced ER stress. 2012; 33: 1814-1823. doi:10.1002/elps.201100565
67. Maki CG, Huibregtse JM, Howley PM. In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1). Cancer research 1996; 56: 2649-2654
68. Nakajima S, Kato H, Takahashi S et al. Inhibition of NF-kappaB by MG132 through ER stress-mediated induction of LAP and LIP. FEBS letters 2011; 585: 2249-2254. doi:10.1016/j.febslet.2011.05.047
69. Mahadevan NR, Rodvold J, Sepulveda H et al. Transmission of endoplasmic reticulum stress and pro-inflammation from tumor cells to myeloid cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2011; 108: 6561-6566. doi:10.1073/pnas.1008942108
70. Rodvold JJ, Chiu KT, Hiramatsu N et al. Intercellular transmission of the unfolded protein response promotes survival and drug resistance in cancer cells. Science signaling 2017; 10. doi:10.1126/scisignal.aah7177
71. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW et al. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. The New England journal of medicine 2005; 352: 2487-2498. doi:10.1056/NEJMoa043445
72. Rowinsky EK, Donehower RC. Paclitaxel (Taxol). 1995; 332: 1004-1014. doi:10.1056/nejm199504133321507
73. Rodvold JJ, Zanetti M. Insidious communication amongst cancer cells. Molecular & cellular oncology 2018; 5: e1356898. doi:10.1080/23723556.2017.1356898
74. Mahadevan NR, Anufreichik V, Rodvold JJ et al. Cell-extrinsic effects of tumor ER stress imprint myeloid dendritic cells and impair CD8(+) T cell priming. PloS one 2012; 7: e51845. doi:10.1371/journal.pone.0051845
75. Taylor RC, Dillin A. XBP-1 is a cell-nonautonomous regulator of stress resistance and longevity. Cell 2013; 153: 1435-1447. doi:10.1016/j.cell.2013.05.042
76. Williams KW, Liu T, Kong X et al. Xbp1s in Pomc neurons connects ER stress with energy balance and glucose homeostasis. Cell metabolism 2014; 20: 471-482. doi:10.1016/j.cmet.2014.06.002
77. Mardones P, Dillin A, Hetz C. Cell-nonautonomous control of the UPR: mastering energy homeostasis. Cell metabolism 2014; 20: 385-387. doi:10.1016/j.cmet.2014.07.009
78. Li P, He K, Li J et al. The role of Kupffer cells in hepatic diseases. Molecular Immunology 2017; 85: 222-229. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.02.018>
79. Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver 2006; 26: 1175-1186. doi:10.1111/j.1478-3231.2006.01342.x
80. Gordon S. Alternative activation of macrophages. Nature reviews Immunology 2003; 3: 23-35. doi:10.1038/nri978
81. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. The Journal of pathology 2013; 229: 176-185. doi:10.1002/path.4133
82. Dixon LJ, Barnes M, Tang H et al. Kupffer cells in the liver. Compr Physiol 2013; 3: 785-797. doi:10.1002/cphy.c120026
83. Huang W, Metlakunta A, Dedousis N et al. Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. Diabetes 2010; 59: 347-357. doi:10.2337/db09-0016

84. Wu J, Li J, Salcedo R et al. The proinflammatory myeloid cell receptor TREM-1 controls Kupffer cell activation and development of hepatocellular carcinoma. *Cancer research* 2012; 72: 3977-3986. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0938
85. Wu JC, Merlino G, Fausto N. Establishment and characterization of differentiated, nontransformed hepatocyte cell lines derived from mice transgenic for transforming growth factor alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 91: 674-678. doi:10.1073/pnas.91.2.674
86. Gonzales AJ, Goldsworthy TL, Fox TR. Chemical transformation of mouse liver cells results in altered cyclin D-CDK protein complexes. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1093-1102. doi:10.1093/carcin/19.6.1093
87. Sekine Y, Zyryanova A, Crespillo-Casado A et al. Paradoxical Sensitivity to an Integrated Stress Response Blocking Mutation in Vanishing White Matter Cells. *PLoS one* 2016; 11: e0166278. doi:10.1371/journal.pone.0166278
88. Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1983; 80: 3734-3737. doi:10.1073/pnas.80.12.3734
89. Darlington GJ, Bernhard HP, Miller RA et al. Expression of liver phenotypes in cultured mouse hepatoma cells. *Journal of the National Cancer Institute* 1980; 64: 809-819
90. Knowles BB, Aden DP. Human hepatoma derived cell line, process for preparation thereof, and uses therefor. In; 1983
91. Dory D, Echchannaoui H, Letiembre M et al. Generation and functional characterization of a clonal murine periportal Kupffer cell line from H-2Kb -tsA58 mice. *Journal of leukocyte biology* 2003; 74: 49-59. doi:10.1189/jlb.0302133
92. Kitani H, Sakuma C, Takenouchi T et al. Establishment of c-myc-immortalized Kupffer cell line from a C57BL/6 mouse strain. *Results in Immunology* 2014; 4: 68-74. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rinim.2014.08.001>
93. Barker K. *Das Cold Spring Harbor Laborhandbuch für Einsteiger*. 2. Aufl. Aufl. Berlin ; Heidelberg: Springer Spektrum; 2013
94. Schmitz S, -, Desel C, -. *Der Experimentator Zellbiologie*. In, *Experimentator*. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2018. doi:<https://doi.org/10.1007/978-3-662-56111-9>
95. Oliveira AF, Cunha DA, Ladriere L et al. In vitro use of free fatty acids bound to albumin: A comparison of protocols. *BioTechniques* 2015; 58: 228-233. doi:10.2144/000114285
96. Spector AA. Fatty acid binding to plasma albumin. *Journal of lipid research* 1975; 16: 165-179
97. Spector AA. Structure and lipid binding properties of serum albumin. *Methods in enzymology* 1986; 128: 320-339. doi:10.1016/0076-6879(86)28077-5
98. Pardo V, González-Rodríguez Á, Guijas C et al. Opposite cross-talk by oleate and palmitate on insulin signaling in hepatocytes through macrophage activation. *The Journal of biological chemistry* 2015; 290: 11663-11677. doi:10.1074/jbc.M115.649483
99. Lauber K, Bohn E, Kröber SM et al. Apoptotic Cells Induce Migration of Phagocytes via Caspase-3-Mediated Release of a Lipid Attraction Signal. *Cell* 2003; 113: 717-730. doi:10.1016/S0092-8674(03)00422-7
100. Rehm H, Letzel T. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. In: Rehm H, Letzel T eds, *Experimentator*. 7. Aufl. 2016 ed. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2016. doi:<https://doi.org/10.1007/978-3-662-48851-5>

101. Tal M, Silberstein A, Nusser E. Why does Coomassie Brilliant Blue R interact differently with different proteins? A partial answer. *The Journal of biological chemistry* 1985; 260: 9976-9980
102. Mülhardt C. *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. In: Mülhardt C ed, *Der Experimentator*. 7., aktualisierte Auflage ed. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2013. doi:<https://doi.org/10.1007/978-3-642-34636-1>
103. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* 1959; 37: 911-917. doi:10.1139/o59-099
104. Dejaegher B, Vander Heyden Y. HILIC methods in pharmaceutical analysis. *Journal of separation science* 2010; 33: 698-715. doi:10.1002/jssc.200900742
105. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G et al. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Bio/Technology* 1993; 11: 1026-1030. doi:10.1038/nbt0993-1026
106. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 1976; 72: 248-254. doi:10.1006/abio.1976.9999
107. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685. doi:10.1038/227680a0
108. Cummings BS, Schnellmann RG. Measurement of Cell Death in Mammalian Cells. 2004; 25: 12.18.11-12.18.22. doi:10.1002/0471141755.ph1208s25
109. Puck TT, Cieciura SJ, Robinson A. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *The Journal of experimental medicine* 1958; 108: 945-956. doi:10.1084/jem.108.6.945
110. Brockhoff G. Dynamische Proliferationsanalysen mittels Durchflusszytometrie. *BIOspektrum* 2015; 21: 285-288. doi:10.1007/s12268-015-0575-x
111. Powell S, McMillan TJ. DNA damage and repair following treatment with ionizing radiation. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 1990; 19: 95-108. doi:10.1016/0167-8140(90)90123-e
112. Bernhard EJ, Maity A, Muschel RJ et al. Effects of ionizing radiation on cell cycle progression. *Radiation and Environmental Biophysics* 1995; 34: 79-83. doi:10.1007/BF01275210
113. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992; 13: 795-808. doi:10.1002/cyto.990130802
114. Kono N, Amin-Wetzel N, Ron D. Generic membrane-spanning features endow IRE1 α with responsiveness to membrane aberrancy. *Molecular biology of the cell* 2017; 28: 2318-2332. doi:10.1091/mbc.E17-03-0144
115. Soriguer F, García-Serrano S, García-Almeida JM et al. Changes in the serum composition of free-fatty acids during an intravenous glucose tolerance test. *Obesity (Silver Spring, Md)* 2009; 17: 10-15. doi:10.1038/oby.2008.475
116. Staiger H, Staiger K, Stefan N et al. Palmitate-Induced Interleukin-6 Expression in Human Coronary Artery Endothelial Cells. *Diabetes* 2004; 53: 3209. doi:10.2337/diabetes.53.12.3209
117. Bischof JC, He X. Thermal Stability of Proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006; 1066: 12-33. doi:10.1196/annals.1363.003
118. Brock TD, Freeze H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *Journal of bacteriology* 1969; 98: 289-297

119. Ebeling W, Hennrich N, Klockow M et al. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *European Journal of Biochemistry* 1974; 47: 91-97. doi:10.1111/j.1432-1033.1974.tb03671.x
120. Pakos-Zebrucka K, Koryga I, Mnich K et al. The integrated stress response. *EMBO reports* 2016; 17: 1374-1395. doi:10.15252/embr.201642195
121. Lin JH, Walter P, Yen TSB. Endoplasmic Reticulum Stress in Disease Pathogenesis. 2008; 3: 399-425. doi:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151434
122. Mahadevan NR, Zanetti M. Tumor stress inside out: cell-extrinsic effects of the unfolded protein response in tumor cells modulate the immunological landscape of the tumor microenvironment. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2011; 187: 4403-4409. doi:10.4049/jimmunol.1101531
123. Choudhury RP, Lee JM, Greaves DR. Mechanisms of Disease: macrophage-derived foam cells emerging as therapeutic targets in atherosclerosis. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 2005; 2: 309-315. doi:10.1038/ncpcardio0195
124. Tufanli O, Telkoparan Akillilar P, Acosta-Alvear D et al. Targeting IRE1 with small molecules counteracts progression of atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2017; 114: E1395-e1404. doi:10.1073/pnas.1621188114
125. Sukhorukov VN, Khotina VA, Bagheri Ekta M et al. Endoplasmic Reticulum Stress in Macrophages: The Vicious Circle of Lipid Accumulation and Pro-Inflammatory Response. *Biomedicines* 2020; 8: 210. doi:10.3390/biomedicines8070210
126. Chistiakov DA, Melnichenko AA, Myasoedova VA et al. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. *Journal of Molecular Medicine* 2017; 95: 1153-1165. doi:10.1007/s00109-017-1575-8
127. Ju C, Tacke F. Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases: from pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Cellular & Molecular Immunology* 2016; 13: 316-327. doi:10.1038/cmi.2015.104
128. Dowling P, Clynes M. Conditioned media from cell lines: a complementary model to clinical specimens for the discovery of disease-specific biomarkers. *Proteomics* 2011; 11: 794-804. doi:10.1002/pmic.201000530
129. Sawa-Wejksza K, Dudek A, Lemieszek M et al. Colon cancer-derived conditioned medium induces differentiation of THP-1 monocytes into a mixed population of M1/M2 cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2018; 40: 1010428318797880. doi:10.1177/1010428318797880
130. Engström A, Erlandsson A, Delbro D et al. Conditioned media from macrophages of M1, but not M2 phenotype, inhibit the proliferation of the colon cancer cell lines HT-29 and CACO-2. *International journal of oncology* 2014; 44: 385-392. doi:10.3892/ijo.2013.2203
131. Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2009; 24: 830-840. doi:10.1111/j.1440-1746.2008.05733.x
132. Ben-Dror K, Birk R. Oleic acid ameliorates palmitic acid-induced ER stress and inflammation markers in naive and cerulein-treated exocrine pancreas cells. *Bioscience Reports* 2019; 39. doi:10.1042/BSR20190054
133. Salvadó L, Coll T, Gómez-Foix AM et al. Oleate prevents saturated-fatty-acid-induced ER stress, inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an

- AMPK-dependent mechanism. *Diabetologia* 2013; 56: 1372-1382. doi:10.1007/s00125-013-2867-3
134. Palomer X, Pizarro-Delgado J, Barroso E et al. Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2018; 29: 178-190. doi:10.1016/j.tem.2017.11.009
135. van Ziel AM, Wolzak K, Nölle A et al. No evidence for cell-to-cell transmission of the unfolded protein response in cell culture. 2020; 152: 208-220. doi:10.1111/jnc.14856
136. Lepock JR. Cellular effects of hyperthermia: relevance to the minimum dose for thermal damage. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 2003; 19: 252-266. doi:10.1080/0265673031000065042
137. Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC et al. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of lipid research* 2009; 50 Suppl: S9-S14. doi:10.1194/jlr.R800095-JLR200
138. Fahy E, Cotter D, Sud M et al. Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et biophysica acta* 2011; 1811: 637-647. doi:10.1016/j.bbalip.2011.06.009
139. Jia W, Loria RM, Park MA et al. The neuro-steroid, 5-androstene 3 β ,17 α diol; induces endoplasmic reticulum stress and autophagy through PERK/eIF2 α signaling in malignant glioma cells and transformed fibroblasts. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2010; 42: 2019-2029. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.09.003>
140. Sheng X, Arnoldussen YJ, Storm M et al. Divergent androgen regulation of unfolded protein response pathways drives prostate cancer. 2015; 7: 788-801. doi:10.15252/emmm.201404509
141. Zheng X, Andruska N, Yu L et al. Interplay between steroid hormone activation of the unfolded protein response and nuclear receptor action. *Steroids* 2016; 114: 2-6. doi:<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.03.014>
142. Cole BK, Kuhn NS, Green-Mitchell SM et al. 12/15-Lipoxygenase signaling in the endoplasmic reticulum stress response. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2012; 302: E654-E665. doi:10.1152/ajpendo.00373.2011
143. Pace-Asciak CR. Pathophysiology of the heparanases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2015; 1851: 383-396. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.09.007>
144. Palmgrén JJ, Mönkkönen J, Korjamo T et al. Drug adsorption to plastic containers and retention of drugs in cultured cells under in vitro conditions. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV* 2006; 64: 369-378. doi:10.1016/j.ejpb.2006.06.005

9. Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit wurde an der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität in Tübingen in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Nisar P. Malek im Zeitraum von 2013 bis 2021 angefertigt.

Die Konzeption der Versuche und der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Przemyslaw M. Bozko, Laborleiter der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Nisar P. Malek.

Nach Einarbeitung durch Frau Hildegard Keppeler, bis 2016 biologisch-technische Assistentin der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Nisar P. Malek, und Herrn Dr. Przemyslaw M. Bozko wurden die Versuche von mir eigenständig durchgeführt.

Die Lipidextraktionen und nachfolgenden Fraktionierungen der Kulturüberstände mittels HPLC wurden durch Herrn Dr. Bernhard Drotleff (Arbeitsgruppe Prof. Michael Lämmerhofer) durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Hamburg, den 09.05.2022

Julian Götze