

DIE FUNKTIONELLE BEDEUTUNG VON MSP UND  
LACTADHERIN IM RAHMEN DER ATHEROSKLEROSE

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades

“Doktor der Naturwissenschaften”

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

FRIEDERIKE HÄUSER

geb. am 8.3.1984 in Lahnstein

Mainz, 2011



Meiner Familie



## ABSTRACT

---

In this thesis we analyzed the effects of two different biomarkers on atherosclerosis.

*Milk fat globule-EGF factor 8* (MFG-E8, lactadherin) is a glycoprotein secreted by macrophages, smooth muscle cells and endothelial cells. *MFG-E8*<sup>-/-</sup> mice exhibit an accumulation of apoptotic cells in atherosclerotic plaques, impaired regulatory immune response, and accelerated lesion development.

High MFG-E8 expression levels were detected in atherosclerotic plaques of *Apo E*<sup>-/-</sup>, *Apo E*<sup>-/-</sup>/*GPx 1*<sup>-/-</sup> and *LDLR*<sup>-/-</sup> mice by *in situ* hybridization. The expression is restricted to foam cells mainly close to the lipid core whereby it partially colocalizes with the macrophage marker CD 68 and fractalkine. The latter is thought to stimulate MFG-E8 secretion inducing phagocytosis as shown by immunofluorescence staining. In the macrophages of *Apo E*<sup>-/-</sup>, *Apo E*<sup>-/-</sup>/*GPx 1*<sup>-/-</sup> and *GPx 1*<sup>-/-</sup> mice which have an elevated susceptibility to reactive oxygen species, MFG-E8 mRNA expression was 3 fold higher than in murine macrophages from B6 and *LDLR*<sup>-/-</sup>-mice. Incubation of murine and human macrophages with oxLDL and eLDL resulted in no significant increase in MFG-E8 mRNA. However, coculture with apoptotic cells lead to an increase in MFG-E8 expression.

MFG-E8 is important for effective phagocytosis of apoptotic cells in atherosclerotic lesions. The expression is regulated by cytokines (i.e. fractalkine) secreted by (ROS induced) apoptotic cells.

*Macrophage stimulating protein* (MSP) modulates macrophage motility, shape changes and phagocytotic activity. It is known to be involved in inflammation and carcinogenesis; however, its potential role in atherogenesis has not been investigated. The SNP rs3197999 is associated with IBD but also with a lowered risk for atherosclerosis. c2078t is a common polymorphism in the MSP gene resulting in the substitution of an arginine by a cysteine at position 689 of the MSP protein. Both recombinant wild type and mutant MSP stimulated migration and proliferation in THP-1-cells but the mutant type was significantly more effective.

The SNP rs3197999 leads to a “gain of function” in MSP. It increases the stimulatory function of MSP on macrophage migration and proliferation and may also regulate cytokine release. This might lead to an increase in phagocytosis efficiency in atherosclerotic lesions (decreasing the risk of CHD) and to malfunctioning immunological reactions in inflammatory bowel disease (increasing the risk of IBD).

## ZUSAMMENFASSUNG

---

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss zweier möglicher Biomarker auf die Atherosklerose untersucht.

*Milk fat globule-EGF factor 8* (MFG-E8, Lactadherin) ist ein Glycoprotein, das vornehmlich von Makrophagen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen sezerniert wird. *MFG-E8*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen vermehrt apoptotische Zellen in der atherosklerotischen Plaque, verstärkte Inflammationszeichen und vergrößerte Läsionen. *In situ*-Hybridisierung und Immunfluoreszenz zeigen eine starke Lactadherin-Expression in den Schaumzellen atherosklerotischer Plaques von *Apo E*<sup>-/-</sup>, *Apo E*<sup>-/-</sup>/*GPx 1*<sup>-/-</sup> und *LDLR*<sup>-/-</sup> Mäusen, vor allem in der Nähe des Lipid Core. Dort kolokalisiert Lactadherin mit dem Makrophagenmarker CD 68 und dem Chemokin Fraktalkin, das die MFG-E8 Sekretion stimuliert und so die Phagozytose forciert. Untersuchungen mittels RTD-PCR ergaben, dass Peritonealmakrophagen der Genotypen *Apo E*<sup>-/-</sup>, *Apo E*<sup>-/-</sup>/*GPx 1*<sup>-/-</sup> und *GPx 1*<sup>-/-</sup>, deren Gemeinsamkeit eine höhere Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress ist, mehr Lactadherin exprimieren als andere Genotypen (B6, *LDLR*<sup>-/-</sup>). Die Inkubation muriner oder humaner Makrophagen mit oxLDL und eLDL hat keinen Einfluss auf die Expression der MFG-E8 mRNA. Der Kontakt mit apoptotischer Zellen hingegen erhöht die Expression signifikant.

Lactadherin ist entscheidend für die effektive Phagozytose apoptotischer Zellen in der atherosklerotischen Läsion. Seine Expression wird vermutlich durch die Apoptose in der Nähe liegender Zellen und das verstärkte Vorkommen von ROS reguliert.

*Macrophage stimulating protein* (MSP) übt Einfluss auf Migration, Proliferation und Phagozytose von Makrophagen aus. Seine Beteiligung an inflammatorischen Vorgängen und der Karzinogenese ist intensiv untersucht worden, nicht jedoch der Einfluss auf die Atherosklerose. Es ist bekannt, dass der SNP rs3197999 mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) assoziiert ist. Zudem geht er vermutlich mit einem erniedrigten Atheroskleroserisiko einher. Der Polymorphismus c2078t hat den Aminosäureaustausch R689C zur Folge. Rekombinant erzeugtes, mutantes und wildtypisches MSP induziert Migration und Proliferation bei THP-1-Makrophagen. MSP<sup>mut</sup> vermittelt dies jedoch wesentlich effektiver als MSP<sup>wt</sup>. Apoptose hingegen wird durch keine der Formen induziert.

R689C führt zu einem "gain of function" des MSP-Proteins in Bezug auf die Proliferations- und Migrationsfähigkeit von Makrophagen und verändert vermutlich deren Cytokinfreisetzung. Dies führt möglicherweise zu einer erhöhten Phagozytoseeffizienz in der atherosklerotischen Läsion (erniedrigtes Atherosklerose-Risiko), und zu einer aberranten immunologischen Reaktion im Rahmen der CED (erhöhtes CED-Risiko).

# INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>I</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1	EINLEITUNG	3
1.1	Atherosklerose	3
1.1.1	Definition der Atherosklerose	3
1.1.2	Pathophysiologie	4
1.2	Makrophagen in der Atherosklerose	7
1.3	Lactadherin	9
1.3.1	Aufbau	9
1.3.2	Funktion	11
1.4	Fragestellung	14
1.5	MSP & RON	15
1.5.1	Aufbau MSP	15
1.5.2	Aufbau RON	16
1.5.3	Funktion	18
1.5.4	Einfluss von <i>msp</i> -Mutationen	19
1.6	Fragestellung	20
<b>II</b>	<b>MATERIAL UND METHODE</b>	<b>23</b>
2	MATERIAL UND METHODE	25
2.1	Material	25
2.1.1	Chemikalien	25
2.1.2	Tiere & Tierfutter	25
2.1.3	Geräte	26
2.1.4	Verbrauchsmaterialien	29
2.1.5	Vorgefertigte Systeme (Kits)	30
2.1.6	Medien und Zusätze	31
2.1.7	Zellen und Vektoren	32
2.1.8	Antikörper	33
2.1.9	Oligonukleotide	33
2.1.10	Software	33
2.2	Methode	37
2.2.1	Haltung und Zucht der Mäuse	37
2.2.2	Gewinnung von Gewebe zur RNA-Extraktion	37
2.2.3	Gewinnung des Untersuchungsmaterials für Paraffin-schnitte	38
2.2.4	Gewinnung des Untersuchungsmaterials für Cryo-Schnitte	39
2.2.5	Herstellung eines Dünnschichtpräparates mittels Zyto-zentrifuge	39
2.2.6	Präparation und Modifizierung der LDL	40

2.2.7	Rekrutierung und Haltung von peritonealen Mausemakrophagen	41
2.2.8	Zelllinien	42
2.2.9	Inkubation von Zellen mit LDL oder MSP	44
2.2.10	Analyse der Apoptose- und Proliferationsrate bei Zellen	45
2.2.11	Bestimmung der Migrationsrate bei Zellen	46
2.2.12	Kokultur	47
2.2.13	Gewinnung von Zelllysaten	47
2.2.14	RNA-Isolation	47
2.2.15	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	48
2.2.16	Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA	48
2.2.17	PCR-Techniken	49
2.2.18	Nukleinsäure-Gelelektrophorese	55
2.2.19	Aufreinigung von PCR-Produkten	57
2.2.20	Klonierung und Transformation	58
2.2.21	Plasmidpräparation	62
2.2.22	Restriktion	62
2.2.23	Natriumacetatfällung	64
2.2.24	<i>In situ</i> -Hybridisierung	64
2.2.25	Färbung von Präparaten	71
2.2.26	Prokaryote Expression	72
2.2.27	Präparative Proteinaufreinigung	73
2.2.28	Renaturierung des rekombinanten Proteins	73
2.2.29	Kolorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	74
2.2.30	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	74
2.2.31	Trennung und Nachweis von Proteinen	76
2.2.32	Immunfluoreszenz	78
<b>III</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>81</b>
3	ERGEBNISSE	83
3.1	Lactadherin	83
3.1.1	Nachweis von Lactadherin im Gewebe	84
3.1.2	Quantifizierung der Lactadherin mRNA	91
3.1.3	Proteinexpression und Aufreinigung	100
3.1.4	Nachweis von Lactadherin in Plasma und Serum	101
3.1.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	102
3.2	MSP	105
3.2.1	Erzeugung von rekombinantem MSP	105
3.2.2	Nachweis von RON & MSP	106
3.2.3	Physiologische Untersuchungen	107
<b>IV</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>115</b>
4	DISKUSSION	117



4.1	Die Bedeutung von Lactadherin im Rahmen der Atherosklo-	
	se	117
4.1.1	Auswahl von Modellsystemen und Methoden sowie	
	deren Eigenschaften	117
4.1.2	Lactadherin wird überwiegend in Makrophagen expri-	
	miert	120
4.1.3	Lactadherin-Expression wird durch oxidativen Stress	
	und Kontakt mit apoptotischen Zellen induziert, nicht	
	durch modifiziertes LDL	121
4.1.4	Schlussfolgerung	122
4.1.5	Aussichten	123
4.2	MSP	124
4.2.1	MSP hat Einfluss auf die Migrations- & Proliferations-	
	rate	124
4.2.2	Der SNP rs3197999 ist mit chronisch entzündlichen	
	Darmerkrankungen und einem erniedrigtem Athero-	
	skleroserisiko assoziiert	126
4.2.3	Schlussfolgerung	129
4.2.4	Aussichten	130
<b>V</b>	<b>ANHANG</b>	<b>131</b>
<b>A</b>	<b>ANHANG</b>	<b>133</b>
A.1	Puffer & Medien	133
A.2	Sequenzen	138
A.3	Publikationen	139
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>141</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

- Abbildung 1 Entstehung eines Atheroms. LDL-Insudation und Einwanderung von Phagocyten (a). Verstärkte Schaumzellbildung, Einwandern von glatten Muskelzellen und Produktion extrazellulärer Matrixbestandteile (b). Bildung einer fibrösen Kappe und eines nekrotischen Kerns (c). Weitere Plaqueprogression mit starker Lumeneinengung (d) [179]. 4
- Abbildung 2 Darstellung der Domänen von Lactaderin aus Mensch, Maus, Rind und Ratte, sowie der Domänen der Gerinnungsfaktoren V und VIII [verändert nach 173]. 10
- Abbildung 3 Schematischer Aufbau von MSP und Überführung in die aktive Form. Rot: Signalpeptid, blau: Haarnadel-schleife, schwarz: Kringledomänen, gelb: Restriktionsstelle, grün: Serinprotease-like Domäne 15
- Abbildung 4 Schematische Darstellung des Heterodimers RON. Rot: Sema-Domäne, gelb; PSI-Domäne, orangefarben: IPT-Domänen, schwarz: Transmembranregion, blau: Tyrosinkinase-Domäne, grün: cytoplasmatische Schwanz. Die Zellmembran wird durch die gestrichelte Linie angedeutet. [nach 7] 17
- Abbildung 5  $\beta$ -Kette des MSP mit möglicherweise für die Rezeptor-Liganden-Interaktion bedeutsamen Resten [verändert nach 151]. 20
- Abbildung 6 Schematische Darstellung einer Boyden Kammer. In der oberen Kammer befinden sich Zellen und Stimulanz, in der unteren Kammer das Chemoattractant. Die Anzahl der durch das Transwell migrierten Zellen wird nach Ablauf von 24 h bestimmt. 46
- Abbildung 7  $C_T$ -Wert: Am Threshold (rot) steigt die Fluoreszenz des Produkts deutlich über die des Hintergrundes an. Der Zyklus an dem dies stattfindet ist Grundlage für die Berechnung des relativen Verhältnisses. 53
- Abbildung 8 Goldner-Färbung Aorta *ApoE*<sup>-/-</sup>-Maus, 100-fach. Die fortgeschrittene Läsion zeigt eine fibröse Kappe (Pfeil) und Cholesterinkristalle (Asterisk). 84

- Abbildung 9 Nachweis von MFG-E8 in Mausearten mittels PCR. Darstellung im Agarose-Gel. MFG-E8: Detektion beider Formen, MFG-E8 L: Detektion der Langform. Beide Formen wurden in allen Proben nachgewiesen. Proben 1-8: *ApoE*<sup>-/-</sup> WTD (Western Type-Diät), 9-14: Dko WTD, 15-24: B6, 25-26: Positivkontrolle Dünndarm, 27: B6, 28-35: *ApoE*<sup>-/-</sup>, 36-51: Dko, 52-53: Positivkontrolle Dünndarm, LW: Leerwert 85
- Abbildung 10 Lactadherin-Hybridisierung Aorta *ApoE*<sup>-/-</sup>-Maus. 86
- Abbildung 11 Lactadherin-Hybridisierung Aorta *ApoE*<sup>-/-</sup>/*GPx1*<sup>-/-</sup>-Maus. 87
- Abbildung 12 Lactadherin-Hybridisierung Aorta *LDLR*<sup>-/-</sup>-Maus. 88
- Abbildung 13 Lactadherin-Hybridisierung Darm und Lunge Maus. 88
- Abbildung 14 Aortensinus *ApoE*<sup>-/-</sup>-Maus, 100-fach. Grün: CD68, rot: MFG-E8, blau: DAPI, Kolokalisation CD68 und MFG-E8: gelb 89
- Abbildung 15 Aortensinus *ApoE*<sup>-/-</sup>-Maus, 100-fach. Grün: Fraktalin, rot: MFG-E8, blau: DAPI, Kolokalisation Fraktalin und MFG-E8: gelb 90
- Abbildung 16 Aortensinus Dko-Maus, 50-fach. Grün: CD68, rot: MFG-E8, blau: DAPI, Kolokalisation CD68 und MFG-E8: gelb 90
- Abbildung 17 Aortensinus Dko-Maus, 50-fach. Grün: Fraktalin, rot: MFG-E8, blau: DAPI, Kolokalisation Fraktalin und MFG-E8: gelb 91
- Abbildung 18 Lunge Maus, 50-fach. Rot: MFG-E8, blau: DAPI 92
- Abbildung 19 Überprüfung der RNA-Qualität im Glyoxal-Gel anhand des 28S/18S rRNA-Verhältnisses. Die Verhältnisse der ribosomalen RNA zueinander sind ähnlich. 92
- Abbildung 20 Bestimmung der Lactadherin-Expression in verschiedenen Gewebe- und Zelltypen der Maus. 94
- Abbildung 21 Lactadherin-Expression in Peritonealmakrophagen von Mäusen unterschiedlichen Genotyps. Signifikanz s. Tab. 8 96
- Abbildung 22 Lactadherin-Expression in Peritonealmakrophagen von Mäusen unterschiedlichen Genotyps, auf unterschiedlichen Diäten gehalten. 96
- Abbildung 23 Lactadherin-Expression in Peritonealmakrophagen von Mäusen unterschiedlichen Genotyps, auf unterschiedlichen Diäten gehalten, stimuliert mit modifiziertem LDL. 97
- Abbildung 24 Expression von Lactadherin und GILT in THP-1-Zellen mit und ohne Stimulation. 98

- Abbildung 25 Expression von Lactadherin und GILT in THP-1-Zellen mit und ohne Stimulation mit Cytokinen und modifiziertem LDL. 99
- Abbildung 26 Expression von Lactadherin und GILT in THP-1-Zellen mit und ohne Stimulation. 100
- Abbildung 27 Nachweis Lactadherin mittels Western Blot. Es wurde jeweils das gleiche Volumen Serum und Plasma/Spur aufgetragen. Die Intensität der Serumbanden von 1 und 3 sind niedriger, als die von Proband 2. 1: Proband mit akutem Koronarsyndrom, 2: Kontrolle, 3: Proband mit akutem Koronarsyndrom/Ischämischer Herzkrankheit 102
- Abbildung 28 Analyse der MSP-Klone 106
- Abbildung 29 Nachweis von MSP und RON in Mausearten mittels PCR. Darstellung im Agarose-Gel. Proben 1-4: *ApoE*<sup>-/-</sup> WTD (Western Type-Diät), 5-7: Dko WTD, 8-13: B6, 14-17: *ApoE*<sup>-/-</sup>, 18-25: Dko, LW: Leerwert 107
- Abbildung 30 Nachweis von RON in THP-1 Zellen. Darstellung im Agarose-Gel. RON-RNA wird in THP-1 Zellen exprimiert. Proben 1-2: THP-1 Zellen, 3-4: THP-1 Zellen stimuliert, LW: Leerwert 107
- Abbildung 31 Nachweis von RON in THP-1 Zellen. Darstellung im Western Blot im Verhältnis zur Ladekontrolle Actin. RON wird in THP-1-Zellen exprimiert, verstärkt nach Differenzierung. Proben K: Zellen, S: THP-1 Zellen stimuliert. 107
- Abbildung 32 Bestimmung der Anzahl der migrierten THP-1-Zellen in Abhängigkeit von der MSP-Konzentration. Mutantes MSP stimuliert stärker zur Migration als wildtypisches. 109
- Abbildung 33 Maximale Stimulationsfähigkeit der MSP-Klone zur Migration 109
- Abbildung 34 Bestimmung der Anzahl der proliferierten THP-1-Zellen in Abhängigkeit von der MSP-Konzentration. Mutantes MSP stimuliert stärker zur Proliferation als wildtypisches. 110
- Abbildung 35 Maximale Stimulationsfähigkeit der MSP-Klone zur Proliferation 111
- Abbildung 36 Bestimmung der Anzahl der apoptotischen THP-1-Zellen in Abhängigkeit von der MSP-Konzentration mittels Caspaseaktivitätsbestimmung 113
- Abbildung 37 TUNEL-Färbung von THP-1 nach Stimulation mit MSP. Konzentrationen ab 7 ng/ml MSP wirken geringfügig pro-apoptotisch. 114

Abbildung 38 Regulation der Lactadherin-Expression. Apoptose von Zellen (z. T. durch oxidativen Stress bedingt (ROS)) führt zur Ausschüttung von „Find me“-Signalen (LPC Lysophosphatidylcholin), die die Lactadherin-Expression regulieren. Lactadherin erleichtert durch Bindung an Phosphatidylserin (PS) und den Makrophagen die Apoptose. 123

## TABELLENVERZEICHNIS

---

Tabelle 1	Verwendete Antikörper	34
Tabelle 2	Verwendete Oligonukleotide (TD: Touch-down PCR)	35
Tabelle 3	Verwendete Oligonukleotide für die RTD-PCR	36
Tabelle 4	Programm des Einbettautomaten	39
Tabelle 5	Konditionen der RTD-PCR	54
Tabelle 6	Ansatz <i>in vitro</i> -Transkription	79
Tabelle 7	Zusammensetzung Polyacrylamid-Gel	80
Tabelle 8	Signifikanz der Lactadherin-Expression bei verschiedenen Genotypen der Maus. n.s.: nicht signifikant	95
Tabelle 9	Zusammenfassung der Ergebnisse der Lactadherin-Untersuchung an Mäusen. x: kein Einfluss, -: wenig, +: deutlich, ++: sehr deutlich, n.s.: nicht signifikant, *: hohen Standard-Fehler beachten; eine genaue Beschreibung erfolgt im Text.	104

## ABKÜRZUNGEN

---

AS	Aminosäure
Apo B	Apolipoprotein B
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
CCD	charge coupled device
cDNA	Komplementäre DNA
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
cRNA	komplementäre RNA (Transkript der DNA)
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid

ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
ddNTP	2'-3'- Didesoxynukleotid
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme-linked immunsorbent assay
FCS	fetales Kalbsserum
GMCSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
GPx1	Gluthationperoxidase 1
GWAS	Genom-weite Assoziationsstudie
HGF	Hepatocyte Growth Factor
ICAM	intracellular adhesion molecule
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Galactosid
ISH	In situ Hybridisierung
kb	Kilobase
LDL	low density lipoprotein
LDLR	LDL Rezeptor
MAF	Minorallelfrequenz
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MCP-1	macrophage chemoattractant protein-1
MCSF	Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
MET	HGF Rezeptor
MFG-E8	Milk fat globule EGF factor 8
MIF	Makrophagen Migration inhibierender Faktor
MMP	Matrix Metalloprotease
MSP	Makrophagen stimulierendes Protein
NTA	Nitrilotriessigsäure
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PDGF	platelet derived growth factor
PS	Phosphatidyl-L-Serin
RON	Recepteur d'origine nantais
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLE	systemischer Lupus erythematosus
SMR	standardisierte Mortalitätsrate
SNP	nicht-synonymer Einzelbasenaustausch
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TF	Tissue factor
TGF- $\beta$	transforming growth factor- $\beta$
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
U	Unit
v/v	Volumen pro Volumen
VCAM	vascular cell adhesions molecule
VEGF	vascular endothelial growth factor

w/v  
X-Gal

Gewicht pro Volumen  
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactosid





Teil I

EINLEITUNG



## EINLEITUNG

---

### 1.1 ATHEROSKLEROSE

#### 1.1.1 *Definition der Atherosklerose*

Das klinische Wörterbuch Pschyrembel (262. Auflage) definiert die Atherosklerose folgendermaßen: "Arteriosklerose, syn. Atherosklerose; umgangssprachl. Arterienverkalkung; wichtigste u. häufigste pathol. Veränderung der Arterien mit Verhärtung, Verdickung, Elastizitätsverlust und Lumen-einengung" [13]. Die Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen sind die häufigste Todesursache in Deutschland. Im Jahr 2009 sind 8,6 % aller Todesfälle durch chronisch-ischämische Herzkrankheit (ICD-10 I25) bedingt, und belegen damit Rang 1 der häufigsten Todesursachen. Auf Rang 2 folgt der akute Myokardinfarkt (ICD-10 I21) mit 6,6 % (Statistisches Bundesamt).<sup>1</sup>

Der Begriff der Arteriosklerose ist im frühen 19. Jahrhundert eingeführt worden um die harten Verfestigungen der Gefäßwand zu beschreiben [13, S. 124 f.]. Dieser übergeordnete Krankheitsbegriff, mehr aber noch die Bezeichnung Atherosklerose beschreiben das gesamte Erscheinungsbild der Erkrankung, inklusive der, der eigentlichen Atherosklerose vorausgehenden Atherome, Lipidablagerungen in der Intima. Die Atherosklerose ist eine polyätiologische Erkrankung, die sowohl durch die Alterung der Gefäßwände als auch durch ein metabolisches Ungleichgewicht bedingt ist [13, S. 412 f.].

Es werden sechs Typen der atherosklerotischen Läsion nach der American Heart Association (AHA) und acht Typen nach Sary [13, S. 412 ff.] definiert:

- Typ I - Initiailläsion: Makroskopisch nicht erkennbare Lipoproteinsammlung in der Intima oder Lipide in sporadischen Makrophagen; kein Gewebeschaden
- Typ II - Fettstreifen (fatty streak): analog zu Typ I, aber makroskopisch erkennbar
- Typ III - Präatherom (fibrous plaque): analog zu Typ II, aber intensiviertere Veränderungen mit Gewebeschaden
- Typ IV - Atherom: Bildung eines Lipidkerns (core) mit starker Intima-schädigung
- Typ V - Fibroatherom: analog zu Typ IV, aber mit intensiverter Kollagenschichtung (fibrous cap) und myointimaler Zellproliferation

---

<sup>1</sup> Todesursachenstatistik, Statistisches Bundesamt, Zweigstelle Bonn, 6.12.2010

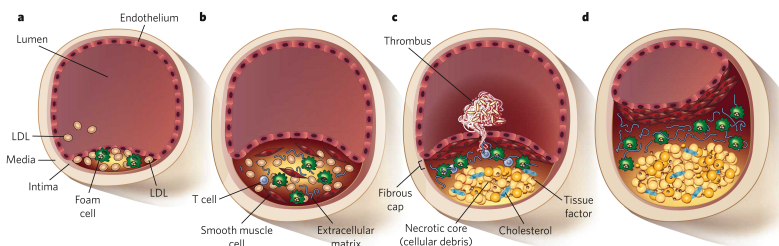


Abbildung 1: Entstehung eines Atheroms. LDL-Insudation und Einwanderung von Phagozyten (a). Verstärkte Schaumzellbildung, Einwandern von glatten Muskelzellen und Produktion extrazellulärer Matrixbestandteile (b). Bildung einer fibrösen Kappe und eines nekrotischen Kerns (c). Weitere Plaqueprogression mit starker Lumeneinengung (d) [179].

- Typ VI - komplizierte Läsion (complicated lesions): analog zu Typ IV und V, aber mit Erosion, Fissur, Thrombose und Hämatom
- Typ VII - verkalkte Läsion: fortgeschrittene, überwiegend aus Kalk bestehende Läsion
- Typ VIII - fibröse Läsion: Kollagenschichten und Vermehrung glatter Muskelzellen ohne Lipidkern.

### 1.1.2 Pathophysiologie

#### Entstehungsmechanismen

Zu Beginn der Pathogenese steht die endotheliale Dysfunktion, ein sehr unscharf definierter Begriff. Er umschreibt Vorgänge wie den Ausfall der Vasodilatationsfähigkeit oder die Störung gerinnungshemmender und anti-proliferativer Eigenschaften des Endothels. In die angegriffene arterielle Gefäßwand, deren Endothelzellen häufig auch Endothelin freisetzen, insudieren Apolipoprotein B-haltige Lipoproteine und werden dort oxidiert oder enzymatisch verändert. Modifizierte LDL (low density lipoprotein) induzieren die Adhäsion von Monocyten am Endothel; diese wandern in den subintimalen Raum ein und differenzieren zu Makrophagen. Die Makrophagen setzen verschiedene Stoffe, unter anderem freie Radikale und Aldehyde frei, welche die LDL oxidieren (oxidativer Stress) oder enzymatisch modifizieren. Dies hat wiederum eine Rekrutierung von Monocyten in die Gefäßwand zur Folge. Auch die Verfügbarkeit des vasodilatatorisch wirkenden Stickstoffmonoxids (NO) ist herabgesetzt. Die reduzierte NO-Verfügbarkeit und der oxidative Stress stimulieren die Bildung proinflammatorischer Cytokine, wie Interleukine, Interferon oder TNF (tumor necrosis factor)- $\alpha$ . Diese Stoffe wirken zudem chemotaktisch, es wandern wiederum Monocyten ein. Modifizierte LDL aggregieren im extrazellulären Raum und werden durch differenzierte

Makrophagen phagozytiert. Übermäßige Aufnahme der atherogenen Lipoproteine führt zur Entstehung von lipidbeladenen Schaumzellen aus den Makrophagen. Durch die Akkumulation von Schaumzellen entstehen Fettstreifen (Abb. 1 a). Glatte Muskelzellen wandern entweder aus der Media ein oder proliferieren in der Intima. Sie sezernieren große Mengen extrazellulärer Matrixbestandteile, z.B. Kollagen. Die Retention und Aggregation von Lipoproteinen schreitet fort. Neben Monocyten wandern nun auch andere Zelltypen, wie z.B. T-Zellen, ein. Es ist der Zustand der chronischen Entzündung erreicht, durch Akkumulation von Lipiden und Schaumzellen und dem stetigen Einwandern verschiedenster Zellen vergrößert sich die Plaque zusehends. Kompensatorisch kann die Größe des Lumens aufrecht erhalten werden, indem der Durchmesser des Gefäßes vergrößert wird (Abb. 1 b). Glatte Muskelzellen bilden unterhalb des Endothels eine fibröse Schicht (fibrous cap). Die Schaumzellen sterben ab. Werden die Zellfragmente nicht phagozytiert so entstehen zellulärer Debris und kristallines Cholesterin. Es bildet sich unterhalb der fibrösen Schicht ein nekrotischer Kern, der durch das Einwandern inflammatorischer Zellen und dem oben beschriebenen Kreislauf weiter vergrößert wird. Rupturiert die fibröse Kappe, so werden thrombogene Substanzen wie Kollagen und Tissue factor (TF) frei und können zur Thrombusbildung führen. Besitzt der Thrombus eine kritische Größe und verlegt entsprechende Gefäße, so können eine instabile Angina pectoris oder ein Myokardinfarkt die Folge sein (Abb. 1 c). Rupturiert das Atherom nicht und nimmt weiterhin an Größe zu, so kann es das Gefäßlumen so stark einengen, dass es unter Belastung zur Angina pectoris kommt (Abb. 1 d). Weitere Konsequenzen können Mikroembolien peripherer Gefäße durch Cholesterinkristalle sein, die beim Bersten der fibrösen Kappe und der Freisetzung des nekrotischen Kerns vom Blutstrom fortgespült werden. Weiterhin können Aneurysmen und intramurale Hämatome eine Folge sein [13, 179].

### *Lipoproteine*

Lipoproteine transportieren Lipide wie beispielsweise Cholesterin im Blut. Ihr Metabolismus ist stark mit der Initiation und Progression der Atherosklerose assoziiert. Die LDL (low density lipoprotein, Dichte  $< 1,063 \text{ kg/l}$ ) kommen im Plasma mit der höchsten Konzentration aller Lipoproteinklassen (2,0 - 3,5 g/l) vor. Lipoproteine bestehen aus zwei Schichten: Dem Kern, sog. Core-Lipiden und der Hülle. Die Core-Lipide sind apolare Cholesterinester, Triglyzeride und andere apolare Substanzen. Die Hülle setzt sich aus polaren Phospholipiden, freiem Cholesterin, Fettsäuren und Apolipoproteinen zusammen. Das Apolipoprotein B (Apo B) bzw. die Unterart Apo B-100 ist das Hauptprotein der LDL. Es vermittelt auch die Bindung der LDL an den LDL-Rezeptor (LDL-R) und dadurch die Aufnahme und den Katabolismus der LDL. Der LDL-R ist ubiquitär exprimiert, seine Expression wird durch den zellulären Cholesteringehalt reguliert. Der LDL-R kann neben Apo B-100 auch Apo E binden [13, S. 11 ff.]. LDL, die über einen längeren Zeitraum im Blut zirkulieren, werden derart modifiziert (chemisch oder enzymatisch), dass sie ihre

Affinität zum LDL-R verlieren. Allerdings können die modifizierten LDL über andere Rezeptoren, Scavenger-Rezeptoren genannt, in die Zelle gelangen. Deren Expression wird nicht durch den zellulären Cholesteringehalt reguliert, so dass große Mengen LDL in die Zelle aufgenommen werden können. Dies forciert die Bildung von Schaumzellen und damit die Atherogenese [13, S. 20 ff.].

Die Modifikation der LDL ist notwendig für die Aufnahme in die Zelle via Scavenger-Rezeptoren. Unklar jedoch ist welcher Art die Modifikation der LDL sein muss. Es gibt unterschiedliche Formen: Oxidation der LDL, enzymatische Veränderung, Acetylierung oder Malondialdehyd-Konjugation [13, S. 42 ff.]. Weithin akzeptiert ist die Annahme, dass die LDL initial oxidativ modifiziert werden (oxLDL) und so die beginnende Atherombildung begünstigen [13, 202]. Die proinflammatorische Wirkung von oxLDL ist bekannt, wie auch die Tatsache, dass oxLDL-induzierte Synthese von Kollagen-degradierenden Matrix-Metalloproteinasen (MMP) zur Plaque-Destabilisierung führen kann [1]. Weiterhin begünstigen oxidativ modifizierte LDL die Bildung von Adhäsionsmolekülen und Cytokinen sowie des TF durch Endothelzellen. Allerdings scheinen LDL vornehmlich intrazellulär oxidiert zu werden [35]. Für die vermehrte Aufnahme aber ist eine extrazelluläre Oxidation notwendig [216]. Extrazellulär werden LDL enzymatisch modifiziert (eLDL). Dies kann mittels Plasmin oder den Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 erfolgen [214]. Enzymatisch modifizierte LDL sind wie oxLDL in der Lage, die MCP-1 (macrophage chemoattractant protein-1)-Expression herauf zu regulieren [112]. Auch die Adhäsion und Migration von Monocyten durch das Endothel wird durch eLDL verstärkt [113]. Weiterhin sind eLDL in der Lage, an C-reaktives Protein zu binden und das Komplementsystem zu aktivieren [26]. Nach der Mainz-Hypothese, die dieses beschreibt, kann auch eLDL als initial in der Atherogenese wirkendes Lipoprotein angesehen werden [25]. Wahrscheinlich sind beide modifizierte LDL-Formen an der Atherogenese beteiligt, schließen sich nicht gegenseitig aus, sondern ergänzen ihre Wirkung [216].

#### *Cytokine, Chemokine & Wachstumsfaktoren*

Mittlerweile hat sich die Annahme, dass es sich bei der Atherosklerose nicht nur um eine Fettstoffwechselstörung, sondern auch um eine chronische Entzündung handelt, etabliert [94]. Bei diesem Entzündungsvorgang spielen sowohl das angeborene (Monocyten/Makrophagen) als auch das erworbene (T-Zellen) Immunsystem eine Rolle [94]. Die Rolle dieser Zellen bei der Atheroprogression ist intensiv untersucht worden [22, 94, 144]. Sie bilden eine Vielzahl von Cyto- und Chemokinen, die sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirken. Gleichzeitig werden sie durch diese Substanzen getriggert. Die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Cyto- und Chemokinen ist entscheidend für die Entwicklung der Läsion. Klar proinflammatorisch wirken in der Läsion die Interleukine IL-1, 2, 12, 18, und 20, die Makrophagen-assoziierten Cytokine TNF- $\alpha$ , IFN (Interferon)- $\gamma$  und MIF (macrophage migrating inhibitory factor) sowie der Kolonie stimulierende

Faktor M-CSF. Nur bei IL-5 und IL-10 handelt es sich um atheroprotektive Cytokine. Die Interleukine IL-4 und IL-6 sowie GM-CSF weisen sowohl pro- als auch antiatherogene Eigenschaften auf [111]. Auch die chemotaktisch wirkenden Cytokine, die Chemokine, haben unterschiedliche Effekte auf den Entzündungsvorgang. Die Chemokine CCL2 und CCL5 fördern die Anheftung von Leukocyten und Lymphocyten an die Gefäßwand und deren Transmigration durch das Endothel [29, 58, 118]. CXCL12 wirkt stabilisierend auf die atherosklerotischen Plaque [249]. Die Aktivierung des Rezeptors der Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11, CXCR3 hat großen Einfluss auf die Rekrutierung von T-Zellen und deren Immunantwort bei der Atherosklerose [249]. Ein Fehlen des Rezeptors setzt die Läsionsprogression herab und fördert die Expression antiinflammatorisch wirkender Stoffe wie IL-10 [225]. Fraktalkin oder CX<sub>3</sub>CL1 kommt sowohl membranständig als auch in freier Form vor. Als freies Chemokin wirkt es chemotaktisch und führt zur Makrophagen und T-Zell-Rekrutierung in die wachsende Läsion [75, 248]. Es kann aber auch anti-apoptotisch wirken [123] oder die Expression des für die Phagozytose wichtigen Proteins Lactadherin anregen [129, 149]. Die Funktion von CXCL16 ist vielseitig. Einerseits reduziert die Abwesenheit von CXCL16 die Expression des proinflammatorischen IFN- $\gamma$  [79], andererseits erhöht ein Fehlen des Chemokins im Mausmodell die Läsionsgröße [11]. Auch CCL19 und CCL21 und ihr Rezeptor CCR7 haben sowohl pro- als auch antiatherogene Effekte. Einerseits erhöht eine hohe Konzentration dieser Stoffe die Ausschüttung von MMP und TF und erzeugt einen inflammatorischen Phänotyp bei T-Zellen und Makrophagen [50], andererseits wurde beobachtet, dass CCL19 und CCL21 die Sekretion von IL-2 herabsetzen [252]. Auch Wachstumsfaktoren haben Einfluss auf die Atherogenese. Die Phagozytose apoptotischer Zellen führt zur Freisetzung von TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ), was vermutlich die Monocyten-Rekrutierung in die entzündliche Läsion unterbindet [84]. Bei der Phagozytose apoptotischer T-Zellen durch Makrophagen und bei der Schaumzellbildung indes wird VEGF (vascular endothelial growth factor) sezerniert, das die Proliferation endothelialer Zellen beeinflusst [82]. VEGF hat auch Einfluss auf die Angiogenese im Umfeld des atherosklerotischen Plaques [37]. Zusätzlich führt die Expression dieses Wachstumsfaktors zur Produktion von pro-inflammatorischen Cytokinen [39, 137, 250]. PDGF (platelet derived growth factor) wird von nahezu allen aktivierten Immunzellen in die Gefäßwand abgegeben [6]. Im Mausmodell stagniert das Läsionswachstum in Abwesenheit des Rezeptors dieses Wachstumsfaktors [192].

## 1.2 MAKROPHAGEN IN DER ATHEROSKLEROSE

Makrophagen tragen neben T-Zellen und glatten Muskelzellen zur Entstehung und Progression eines Atheroms bei. Die Anzahl der Makrophagen in der Läsion wird durch verschiedene Faktoren bestimmt: Zum einen durch das Einwandern von Monocyten/Makrophagen und deren Proliferation. Zum

Anderen durch das Absterben der Makrophagen sowie deren Auswandern [114, 166, 172, 188]. Das Einwandern von Monocyten/Makrophagen in das Endothel wird durch die endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen unterstützt. Bei diesen Molekülen handelt es sich beispielsweise um ICAM (intracellular adhesion molecule) und VCAM (vascular cell adhesion molecule) [21, 178]. Die Expression der Adhäsionsmoleküle wird durch verschiedene Cytokine reguliert [57]. Zusätzlich können oxidierte Phospholipide und kurzkettige Aldehyde, die bei der Lipoproteinoxidation entstehen, die Expression von VCAM erhöhen [42]. Auch das macrophage chemoattractant protein-1 hat Einfluss auf die Rekrutierung von Makrophagen in das Endothel im Rahmen der Plaquentstehung [29, 87]. Ein weiteres Molekül mit Bedeutung für die Monocytenmigration und Differenzierung ist MIF, das in der Lage ist, die Migration von Peritonealmakrophagen zu unterbinden [133, 156]. Er wird von Makrophagen gebildet und kommt verstärkt in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen vor [33, 156]. MIF scheint im instabilen Plaque mit einem erhöhten Vorkommen von MMP-9 zu korrelieren [116].

Im frühen und mittleren Stadium der Atherogenese ist die Schaumzellbildung der Makrophagen, also die Aufnahme und Metabolisierung von Cholesterin aus Lipoproteinen, der entscheidende Prozess. Aufgenommen werden modifizierte Lipoproteine über Scavenger-Rezeptoren wie Scavenger receptor A (SRA), CD36 oder CD68 [44, 175, 182]. Das Cholesterin wird von den Endosomen in das Endoplasmatische Retikulum transportiert, wo es durch das Enzym Acetyl CoA/Cholesterin Acetyl-Transferase (ACAT) verestert wird [32]. Die Cholesterinester sammeln sich in membrangebundenen, cytoplasmatischen Fetttropfen und geben den Zellen so ihr schaumiges Aussehen. Im frühen Stadium wird das Cholesterin HDL-vermittelt aus den Zellen wieder ausgeschleust und über die Leber ausgeschieden (Reverser Cholesterintransport). Schaumzellbildung wirkt pro-atherogen, auch aufgrund der Sekretion inflammatorischer Cytokine und extrazellulärer Matrixmoleküle [138, 210]. Untersuchungen zur Apoptose von Makrophagen in der frühen Läsion der Maus zeigten, dass das Unterbinden der Apoptose zu einer Vergrößerung der Läsion führt. Diese Läsionen sind sehr zellreich [132, 208]. Das Gegenteil ist der Fall bei verstärkter Apoptose: Die Progression der Läsion wird vermindert [8, 115]. In fortgeschrittenen Läsionen sind die funktionellen Konsequenzen der Apoptose der Makrophagen andere als in frühen [209]. Im fortgeschrittenen Atherom ist die Apoptose mit der Bildung eines instabilen Plaques bzw. der Plaquenekrose assoziiert [15]. Die Folgen der Plaqueinstabilität wie Fissur oder Ruptur wurden bereits unter Kap. 1.1.2 beschrieben. Diese gegensätzlichen Konsequenzen der Apoptose lassen sich möglicherweise mit der unterschiedlichen Phagocytoserate der abgestorbenen Zellen erklären. Im frühen Stadium ist die Phagocytose sehr effizient [132, 208]. Dies lässt mit fortschreitender Läsion nach. Werden die apoptotischen Zellen nicht sofort abgeräumt, lysieren sie (sogenannte postapoptotische oder sekundäre Nekrose) [98]. So werden die zellulären Bestandteile unkontrolliert in die extrazelluläre Umgebung entlassen, und können eine Entzündungsreaktion



der umliegenden Immunzellen forcieren [71]. Bei effizienter Phagozytose ist die Anzahl apoptotischer Zellen in der frühen Läsion sehr gering, bei ineffizientem Abbau apoptotischer Makrophagen schreitet die Entzündung fort [15, 130] und die Fettstreifen bzw. die Läsionen vergrößern sich. Die Apoptose selbst ist durch unterschiedliche Signalwege bedingt. Die am besten untersuchten Wege sind diejenigen, die durch die "death receptors" Fas oder TRAIL-Rezeptor (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) induziert werden. Die Folge ist die Aktivierung von Caspasen, welche unter anderem für die Proteolyse und die DNA-Fragmentierung verantwortlich sind [73, 114, 165]. Ursachen der Apoptose können hohe Konzentrationen an oxidiertem LDL, TNF- $\alpha$ , Fas-Ligand oder NO sein, sowie die intrazelluläre Akkumulation von freiem Cholesterin [207]. Es werden unterschiedliche Ursachen der herabgesetzten Phagozytoseleistung der Makrophagen im fortgeschrittenen Atherom diskutiert. Es wurde gezeigt, dass oxidierte Moleküle in der atherosklerotischen Läsion bzw. im nekrotischen Kern die Aufnahme apoptotischer Zellen durch Phagozyten inhibieren können [152]. Su *et al.* postulieren, dass Makrophagen, welche mit freiem Cholesterin beladen sind, die Expression von Lactadherin herunterregulieren, ein Molekül, welches in die Phagozytose von apoptotischen Zellen involviert ist [92, 205]. Zu bedenken ist auch, dass durch die Apoptose der Makrophagen weniger Fresszellen zur Verfügung stehen, die die abgestorbenen Zellen wiederum phagozytieren können [208]. Je nach Position in der atherosklerotischen Plaque (nahe dem Endothel oder nahe dem nekrotischen Kern) zeigen die Makrophagen unterschiedliche Oberflächenmarker [223]. Verschiedene Differenzierungsstadien der Zellen, wie auch unterschiedliche Lipidbeladung können auch ein Grund für die abweichende Phagozytoseeffizienz in frühen und späten Läsionen sein [164, 240].

### 1.3 LACTADHERIN

#### 1.3.1 Aufbau

Lactadherin, SED<sub>1</sub> (Secreted EGF repeat and discoidin domains-containing protein 1) oder BA-46 (Breast epithelial antigen, 46 kDa) ist ein 46 kDa großes Glycoprotein, das von unterschiedlichen Zelltypen, wie epithelialen und vaskulären Zellen [66, 200] sowie aktivierten Makrophagen [92] exprimiert wird. Die humane Form besteht aus 2005 Basen (387 AS), die murine Form aus 2143 Basen (Langform, 463 AS) oder 2032 Basen (Kurzform, 426 AS). Im Jahre 1990 identifizierten Stubbs *et al.* die cDNA eines Oberflächenproteins des Mammaepithels der Maus, das auch in der Milch zu finden ist, und gaben ihm den Namen Milk fat globule EGF factor 8 (MFG-E8) [203]. Die Namensgebung erklärt sich durch die Sequenzähnlichkeit zum Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF). Neben dieser Sequenzähnlichkeit besteht eine weitere zu den Gerinnungsfaktoren V und VIII.

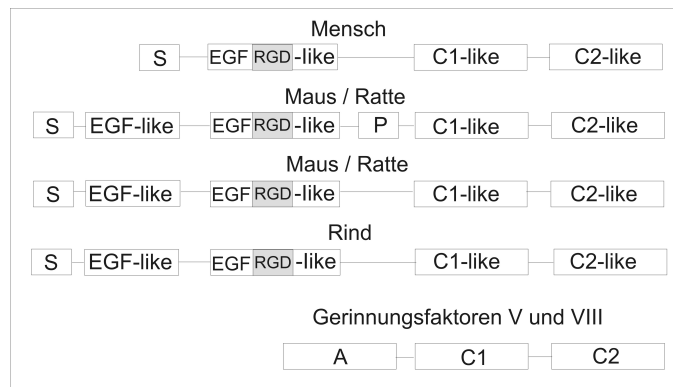


Abbildung 2: Darstellung der Domänen von Lactadherin aus Mensch, Maus, Rind und Ratte, sowie der Domänen der Gerinnungsfaktoren V und VIII [verändert nach 173].

Collins *et al.* klonierten 1997 das humane Ortholog Lactadherin [43]. Das *lactadherin*-Gen liegt auf dem Chromosom 15q25. Es besteht aus 11 Exons und hat eine Größe von 14,75 kb. Humanes Lactadherin besteht -neben eines 24 Aminosäuren langen Signalpeptids- aus drei Domänen: Einer EGF-like Domäne, die eine Arg-Gly-Asp (RGD)-Zelladhäsionssequenz enthält, sowie zwei Discoidin-Domänen (C1 und C2), ähnlich denen der Gerinnungsfaktoren V und VIII [212]. Orthologes Lactadherin der Spezies Ratte, Rind und Maus besitzt eine zusätzliche EGF-like Domäne, Nager-Lactadherin enthält zudem eine Peptidsequenz zwischen den Domänen EGF-like und C1 [238]. Diese Prolin- und Threonin-reiche Domäne (P/T-Domäne) ist nicht zwingender Bestandteil von MFG-E8. Abhängig vom Gewebe wird entweder vornehmlich die 66 kDa große Langform (MFG-E8-L), oder das 53 kDa große alternative Spleißprodukt (MFG-E8-S) exprimiert. Die Langform wirkt vermutlich als Opsonin, während die kurze alternative Spleißvariante, deren Integrin-bindungsfähigkeit wesentlich schwächer ausgeprägt ist, vornehmlich die Gameten-Interaktion begünstigt.

Bis auf die erste EGF-Domäne besitzt humanes Lactadherin eine 64 %ige Sequenzidentität mit der bovinen Form. Die EGF2-Domäne besitzt ein RGD-Motiv [212], das an  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$ -Integrine bindet [5, 103, 200, 212]. Die C2-Domäne ist in der Lage an Phospholipide, besonders an Phosphatidyl-L-Serin (PS) zu binden [5]. Strukturelle Untersuchungen wurden bislang nur am bovinen Lactadherin durchgeführt. Shao *et al.* untersuchten die Kristallstruktur der C2-Domäne des bovinen Lactadherins bei einer Auflösung von 1,67 Å [197]. Entsprechend der Sequenzhomologie ist die Struktur der C2-Domäne des Lactadherins und der C2-Domänen der Gerinnungsfaktoren V (FV-C2) und VIII (FVIII-C2) sehr ähnlich [140, 177]. Die C2-Domäne des Lactadherins besteht aus 19 antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstrukturen, acht dieser Stränge (bezeichnet mit A - H) bilden ein ungleichmäßiges jelly roll  $\beta$ -barrel

[131, 197]. Diese fassförmige Struktur ist hochkonserviert und findet sich bereits bei der bakteriellen Galactose-Oxidase [20]. Die übrigen elf  $\beta$ -Stränge bilden den "Boden" (Strang 2, 3, 4, 6, 7 und 10) bzw. den "Deckel" (Strang 1, 5, 8, 9 und 11) des  $\beta$ -barrel. Eine Disulfid-Brücke verbindet das N-terminale Cys<sup>1</sup> mit dem C-terminalen Cys<sup>158</sup>, analog zu den Disulfid-Bindungen in den C2-Domänen der Faktoren V und VIII. Die Domäne hat die ungefähren Maße  $40 \times 30 \times 25 \text{ \AA}$  [197]. Im Bereich des "Fassbodens" befinden sich drei große Schleifen, die in ähnlicher Ausprägung auch bei fV-C2 und fVIII-C2 zu finden sind und dort als Spikes bezeichnet werden. Sie enthalten membraninteragierende, hydrophobe Aminosäuren [140]. Spike 1 (Tyr<sup>23</sup>- Trp<sup>33</sup>) der Lactadherin C2-Domäne, eine  $\beta$ -Haarnadelschleife, enthält  $\beta$ -Strang 2 und 3 sowie die Schleife, die diese verbindet. Spike 2 (Gln<sup>43</sup>- Asn<sup>47</sup>) ist Teil der Schleife zwischen den Strängen 3 und 4 und Spike 3 (Ala<sup>78</sup>- Gln<sup>85</sup>) besteht aus den antiparallelen Strängen 6 und 7 und deren Verbindungsschleife. Die hydrophoben Reste Trp<sup>26</sup>, Leu<sup>28</sup>, Phe<sup>31</sup> und Phe<sup>81</sup> der Spikes 1 und 3 weisen nach außen, und sind vermutlich für die Membranbindung verantwortlich [4, 5, 173, 197], während basische Reste an das Phosphatidyl-Serin binden [140, 177]. Die Bindung erfolgt mit einer stereoselektiven Präferenz für die L-Form gegenüber der D-Form. Lactadherin ist in der Lage mit niedriger Affinität auch an andere Phospholipide wie Phosphatidylethanolamin oder Phosphatidylcholin zu binden und kompetiert so mit den Faktoren V und VIII um die Phospholipide [131, 197]. Die P/T-Domäne im Lactadherin der Maus erhöht die Affinität für Phosphatidyl-Serin gegenüber der Kurzform [92].

Die EGF-like Domäne des Lactadherins hat im Gegensatz zu vielen anderen Mitgliedern der EGF-Familie keine mitogene Wirkung [46]. Allerdings befindet sich in der Haarnadelschleife zwischen zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, der Matrix präsentierend, die zelladhäsions-vermittelnde Aminosäuresequenz Arg<sup>46</sup>-Gly<sup>47</sup>-Asp<sup>48</sup> (RGD). Diese wurde zuerst bei dem Protein Fibronectin gefunden [174], und ist Bestandteil vieler adhäsions-vermittelnder Proteine. Das RGD-Motiv im Lactadherin ist für die Zelladhäsion verantwortlich und erfolgt über die Integrine  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$  [46, 92, 103, 212]. Integrine sind eine Gruppe hochkonservierter heterodimerer, kationenabhängiger Rezeptoren. Ihre Funktionsweise wurde bereits ausführlich untersucht [60, 104, 204].

### 1.3.2 Funktion

Lactadherin wird von den unterschiedlichsten Zelltypen exprimiert und erfüllt vielfältige Aufgaben, allem voran die Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten. Wie oben beschrieben, besitzt Lactadherin sowohl eine Integrin- als auch eine Phosphatidylserin-bindende Domäne [3, 4, 5, 92, 242] und ist somit in der Lage, als Brücke zwischen zwei Zellen zu wirken.

Es spielt eine entscheidende Rolle bei der Phagocytose der distalen Segmente der Photorezeptoren durch das retinale Pigmentepithel und unterstützt

auch die retinale Adhärenz [34, 160, 162, 161].

Weiterhin führt die Expression von MFG-E8 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer verstärkten Phagozytose von  $\beta$ -Amyloid durch Astrocyten. Umgekehrt ist eine Akkumulation von  $\beta$ -Amyloid-Fibrillen in Gebieten des Hirns mit niedrigem MFG-E8-Vorkommen beobachtet worden [28]. Diese Daten weisen darauf hin, dass MFG-E8 beim Abbau von  $\beta$ -Amyloid im Rahmen der Alzheimer'schen Krankheit eine Rolle spielt.

Auch beim Ab- und Aufbau der Mamma während der Schwangerschaft scheint MFG-E8 eine Rolle zu spielen. Während der ersten 48 h der Involution des Drüsengewebes werden apoptotische Zellen in das Alveolarlumen abgegeben, wo sie unter anderem durch Epithelzellen Lactadherin-vermittelt phagozytiert werden [12, 93]. Neben seiner Aufgabe bei der Involution der Mamma, spielt MFG-E8 beim Aufbau von Brustdrüsen und Ausführungsgängen eine Rolle [67].

Daneben ist Lactadherin auch ein Vermittler der Oocyten-Spermien-Interaktion. Die Gametenbindung ist C-Domänen-vermittelt, Integrine scheinen in diesem Fall keine Rolle zu spielen. Die Adhäsion des Spermiums an das Ei findet entweder durch Dimerisierung des MFG-E8 statt oder durch die Anlagerung eines Moleküls an beide Gameten (C2 an das PS des Spermiums, C1 an Glykoproteine der Zona pellucida) [68]. Aber MFG-E8 beeinflusst nicht nur die Bindung der Gameten, sondern auch die Adhäsion des epididymalen Epithels [181].

Zusätzlich hat Lactadherin weitere Funktionen auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

**ANGIOGENESE** Genau wie das homologe Protein Del-1, das in der embryonalen Vaskulogenese eine Rolle spielt [99], ist MFG-E8 in der Lage, Einfluss auf die Bildung von Blutgefäßen zu nehmen. Lactadherin induziert die Phosphorylierung der Serin-Threonin-Kinase Akt über die Bindung an  $\alpha_v\beta_3$ - bzw.  $\alpha_v\beta_5$ -Integrin. Eine erhöhte Akt-Aktivität im Endothel führt zur Angiogenese [119]. MFG-E8 hat Einfluss auf die VEGF (vascular endothelial growth factor) und VEGF-Rezeptor 2 (VEGF-R2) abhängige Angiogenese, da VEGF-R2 eine Assoziation mit  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin zur Aktivierung des Signalwegs benötigt. Bei einer Überexpression von MFG-E8 kann eine zusätzliche VEGF-unabhängige Akt-Aktivierung beobachtet werden, die direkt über das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin vermittelt wird [200, 201].

**WIRKUNG ALS ANTIKOAGULANZ** Aufgrund der hohen Bindungskapazität der C2-Domäne des Lactadherins an Phosphatidylserin kompetiert es mit den Gerinnungsfaktoren V und VIII um freie Bindungsstellen, beispielsweise auf aktivierten Thrombocyten. MFG-E8 kann im Gegensatz zu FV und FVIII auch an Blutplättchen mit nur teilweiser PS-Präsentation binden. Durch verminderte Bindung der Faktoren V und VIII wird die Produktion des Faktors Xa und des Thrombins *in vitro* als auch *in vivo* inhibiert [198, 199]. Auf diesem Weg kann Lactadherin Einfluss auf die Koagulation bzw. Hämostase nehmen.

ABBAU VON APOPTOTISCHEN ZELLEN UND ZELLFRAGMENTEN Aus unterschiedlichen Geweben werden verschiedenste Zelltypen wie z.B. Lymphocyten [91], ältere Erythrocyten [72], Sichelzellen [88] und aktivierte Thrombocyten [198] Lactadherin-vermittelt phagocytiert.

In gesunden Zellen befindet sich Phosphatidylserin fast ausschließlich an der Innenseite der Zellmembran. Durch die Aminophospholipid-Translokase, eine Flippase, wird diese Asymmetrie bei vitalen Zellen aufrecht erhalten. Aufgrund verschiedener Auslöser, z.B. durch Apoptose, wird die ATP-abhängige Flippase inaktiviert. Durch die Einstellung der Translokation und den Einfluss von Scramblasen kollabiert das asymmetrische System und Phosphatidylserin (und andere Phospholipide) gelangt an die Zelloberfläche [70, 176, 187]. Vor dem Hintergrund der Apoptose der Zelle ist diese PS-Präsentation an der Zelloberfläche ein "Friss-mich-Signal" für Phagocyten. Lactadherin hat eine höhere Affinität für oxidiertes PS als für die nicht-oxidierte Form [30]. Auch die Oxidation des noch internalisierten Phosphatidylserins ist ein Bestandteil des Apoptosevorganges.

Das RGD-Motiv der EGF-like-Domäne des Lactadherins ist in der Lage, sich an die  $\alpha_v$ -Integrine an der Oberflächen der Phagocyten anzulagern und somit die Aufnahme in die Zelle zu vermitteln [92].

"Professionelle" Phagocyten wie Macrophagen aber auch andere Zellen nehmen Lactadherin-vermittelt apoptotische Zellen auf. Dies wurde bei Gliazellen der Ratte beobachtet, welche auf diesem Weg apoptotische Neurone phagocytieren. Die Expression von MFG-E8 der Gliazellen wird als Antwort auf das Chemokin Fraktalkin heraufreguliert, welches von den absterbenden Neuronen freigesetzt wird. Fraktalkin, das einzige bekannte Mitglied der CX<sub>3</sub>C-Familie induziert nicht nur die Expression, es wirkt zusätzlich als chemotaktischer Reiz, durch welchen die Gliazellen in Richtung der Neurone migrieren [129].

Aber Lactadherin scheint mehr zu sein als ein reines Brückenprotein zwischen apoptotischer Zelle und Phagocyt. Zumindest ist es nicht durch ein anderes Opsonin wie z.B. Gas6 zu ersetzen. *MFG-E8*-null-Mäuse zeigen Symptome autoimmuner Erkrankungen, wie Splenomegalie, antinukleäre Antikörper oder Glomerulonephritis [91]. Das humane Ortholog, welches in niedrigen Konzentrationen die Phagocytose forciert, scheint bei höheren Konzentrationen diese zu hemmen. Dies ist von Bedeutung, da bei einigen Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) eine erhöhte Konzentration von Lactadherin im Serum detektiert werden konnte [243]. Eine weitere Ursache für die Lupuserkrankung könnte aber auch aberantes Splicing des Lactadherin-Transkripts sein [244].

Die im Hinblick auf die Atherosklerose bedeutendste Funktion ist der Abbau von apoptotischen Zellen und Zellresten im atherosklerotischen Plaque. Nicht nur apoptotische Zellen, auch Zellfragmente werden Lactadherin-vermittelt phagocytiert. Die Phagocytose von Zelldebris im atherosklerotischen Plaque ist entscheidend für die Homöostase und Aktivierung anti-inflammatorischer Signalwege. Akkumulation abgestorbener Zellen und Zell-

reste führt zur Plaqueprogression und Atherosklerose. Dass MFG-E8 beim Abbau atherosklerotischen Debris eine wichtige Rolle spielt, konnten Ait-Oufalla *et al.* [2] zeigen: Mäuse des Genotyps  $LDLR^{-/-}$ , die in der Lage sind Atherosklerose zu entwickeln, wurden bestrahlt, und das Knochenmark entweder durch wildtypisches oder MFG-E8-defizientes ersetzt. Nach acht Wochen atherogener Diät entwickelten die mit Wildtyp-Knochenmark rekonstituierten Mäuse frühe Läsionen, frei von apoptotischen Zellen. Die Mäuse hingegen, deren Knochenmark durch MFG-E8-defizientes ersetzt wurde, zeigten Läsionen mit einer hohen Anzahl apoptotischer Zellen und einer daraus resultierenden Plaquevergrößerung um etwa 70 %.

#### 1.4 FRAGESTELLUNG

Ait-Oufella *et al.* konnten zeigen, dass Lactadherindefizienz zu vermehrter Zahl apoptotischer Zellen in den Plaques und entsprechend zu vergrößerten Läsionen in  $LDLR^{-/-}$ -Mäusen führt [2]. Ziel dieser Arbeit war es, Lactadherin im Mausmodell und einer humanen Zelllinie eingehender zu untersuchen. Folgende Aufgaben sollten bearbeitet werden:

- Kann Lactadherin auf Protein- und RNA-Ebene *in situ* in Aorten bzw. den atherosklerotischen Läsionen visualisiert werden? Von welchem Zelltyp wird Lactadherin exprimiert? Zusätzlich zu den bereits von Ait-Oufella *et al.* untersuchten Genotypen soll auch der von unserer Arbeitsgruppe verwendeten Genotypen  $ApoE^{-/-}$ ,  $GPx1^{-/-}$  und  $ApoE^{-/-}/GPx1^{-/-}$  analysiert werden.
- In welchen Zell- und Gewebetypen wird Lactadherin-mRNA exprimiert? Wie wird die Lactadherin-Expression reguliert? Haben proatherogenes eLDL oder oxLDL oder der Kontakt zu apoptotischen Zellen Einfluss auf das Expressionsmuster?
- Kann Lactadherin als Marker für die Diagnose der frühen Atherosklerose verwendet werden? Welche in der Routinediagnostik einsetzbaren Methoden (z. B. ELISA) können hierfür etabliert werden?

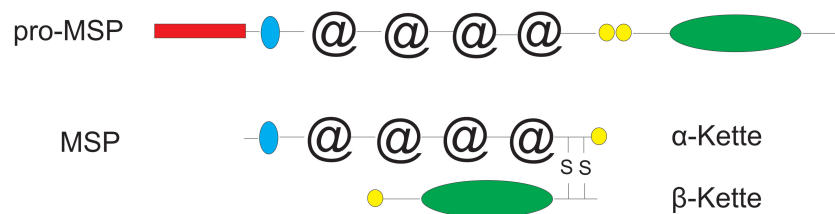


Abbildung 3: Schematischer Aufbau von MSP und Überführung in die aktive Form. Rot: Signalpeptid, blau: Haarnadelschleife, schwarz: Kringledomänen, gelb: Restriktionsstelle, grün: Serinprotease-like Domäne

## 1.5 MSP & RON

### 1.5.1 Aufbau MSP

Das Makrophagen stimulierende Protein MSP (macrophage stimulating 1, hepatocyte growth factor like) ist ein 78 kDa großes, 711 Aminosäuren (2348 bp) langes, dem Plasminogen verwandtes Serumprotein. Es besteht aus 2 Untereinheiten, einer 53 kDa großen  $\alpha$ - und einer 25 kDa großen  $\beta$ -Kette, die über eine Disulfid-Brücke verbunden sind. Das *mst1/msp*-Gen ist etwa 47 kb groß, umfasst 18 Exons und befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3 (3p21) [90]. 1991 und 1993 wurde das *mst1/msp*-Gen unabhängig voneinander sowohl in einer humanen Genomdatenbank als auch als cDNA-Transkript der Zelllinie Hep G2 identifiziert [90, 246]. 15 Jahre zuvor wurde MSP bereits als Serumbestandteil entdeckt, der in der Lage ist, die Chemotaxis in Richtung des Komplementfaktors C5a bei Makrophagen zu verstärken [128].

MSP und der Hepatocyte growth factor/Scatter factor (HGF/SF) zeigen eine 45 %ige Sequenzidentität und einen ähnlichen Aufbau aus sechs Domänen. Sie stammen wie Plasminogen von einem gemeinsamen Vorläuferprotein ab [36]. Auch innerhalb verschiedener Species ist das Protein stark konserviert, wie die cDNA von Mensch, Maus, Huhn und *Xenopus* zeigen [61, 159, 227, 246].

Die homodimere Proform des MSP wird vornehmlich von Hepatocyten, aber auch von anderen Zelltypen wie tubulären Epithelzellen der Niere [180] synthetisiert und zirkuliert mit einer Konzentration von wenigen Nanomol im Blutkreislauf [23, 246]. Die Überführung in die aktive Form erfolgt durch proteolytische Spaltung zwischen den Aminosäuren Arg<sup>483</sup> und Val<sup>484</sup> und die Bildung eines Heterodimers [245]. MSP wird durch Mitglieder der Kallikrein-Familie und Trypsin like-Proteasen, die sich auf der Oberfläche von Makrophagen befinden, gespalten [232]. Die beiden Ketten werden durch eine Disulfid-Brücke zwischen den Cysteinen 468 ( $\alpha$ -Kette) und 588 ( $\beta$ -Kette) verbunden.

Die  $\alpha$ -Kette des Heterodimers besteht aus einer terminalen Haarnadelschleife, homolog zu der im Plasminogen und vier Kringle-Domänen. Kringle-Domänen sind Schleifen aus etwa 80 AS, deren Tertiärstruktur durch drei Disulfid-Brücken stabilisiert wird. Kringle-Domänen gehen Interaktionen mit anderen Proteinen ein. Das Signalpeptid umfasst die ersten 18 Aminosäuren, der N-Terminus der  $\alpha$ -Kette beginnt mit Gln<sup>19</sup> [245, 246], wie auch bei HGF [247].

Die  $\beta$ -Kette besteht aus einer Serinprotease like-Domäne, deren katalytisches Zentrum wie bei HGF durch AS-Austausch inaktiviert wurde. Die Faltung der Kette ist der der Serinproteasen sehr ähnlich. Jeweils sechs Faltblätter bilden zwei antiparallele  $\beta$ -Barrels, verbunden durch insgesamt 13 Schleifen. Die Aminosäuren Gln<sup>522</sup>, Gln<sup>568</sup> und Tyr<sup>661</sup> im vormals aktiven Zentrum sowie die Reste Asn<sup>682</sup> und Arg<sup>683</sup> in der Schleife L13 sind für die Rezeptorbindung von Bedeutung [36]. Arg<sup>683</sup> ist Bestandteil eines Clusters aus drei Argininen (Arg<sup>683</sup>, Arg<sup>687</sup>, Arg<sup>689</sup>), der zusammen mit einem weiteren Cluster in der Schleife L10 (Arg<sup>637</sup>, Arg<sup>639</sup>, Arg<sup>641</sup>) einen stark positiven Bereich auf der Oberfläche der  $\beta$ -Kette bildet und durch den Indolring des Trp<sup>690</sup> stabilisiert wird [36, 53, 151]. Erst durch die proteolytische Aktivierung des MSP befinden sich diese Reste in der Position, um die Bindung an den Rezeptor RON zu vermitteln [36]. Die proForm des MSP ist also nicht in der Lage an RON zu binden [228, 232].

Untersuchungen mit Deletionsmutanten zeigten, dass nur die  $\beta$ -Kette an den Rezeptor bindet, allerdings ohne funktionelle Konsequenz [228, 234]. Zur Aktivierung von RON ist die  $\alpha$ -Kette notwendig. Die Kringle-Domänen 2 und 3 sind für das Scattering notwendig. Schon das Fehlen einer der beiden Domänen führt zu einem völligen Verlust dieser Fähigkeit. Eine Reduktion der Fähigkeit tritt aber auch bei der Deletion der Domäne 4 oder der terminalen Haarnadelschleife ein [228]. Die Kringle-Domänen 1 und 3 sowie die Haarnadelstruktur sind notwendig zur Induktion morphologischer Änderungen der Makrophagen [228]. Die Bindung des eng verwandten HGF an seinen Rezeptor MET hingegen findet über die Kringle-Domänen der  $\alpha$ -Kette statt [196]. Es wird allgemein angenommen, dass die Bindung von Wachstumsfaktoren (zu deren Familie auch MSP und HGF gehören) an ihren Rezeptor mit der Rezeptor-Oligomerisierung und Autophosphorylierung einhergeht [221]. Es wird vermutet, dass die Dimerisierung von RON analog zu der von MET induziert wird. Die  $\beta$ -Kette des Wachstumsfaktors bindet mit hoher Affinität und die  $\alpha$ -Kette über die Kringle-Domänen vermutlich mit niedriger Affinität an RON [53, 234].

### 1.5.2 *Aufbau RON*

RON (Recepteur d'origine nantais) wurde 1993 erstmals als Mitglied der MET Rezeptor-Familie identifiziert [184]. Die Verwandtschaft zum HGF-Rezeptor MET (33 % Sequenzidentität) legt nahe, dass es sich auch bei RON um eine membranständige Rezeptortyrosinkinase handelt. Das einkettige



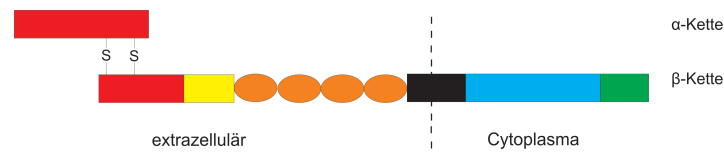


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Heterodimers RON. Rot: Sema-Domäne, gelb; PSI-Domäne, orangefarben: IPT-Domänen, schwarz: Transmembranregion, blau: Tyrosinkinase-Domäne, grün: cytoplasmatische Schwanz. Die Zellmembran wird durch die gestrichelte Linie angedeutet. [nach 7]

Vorläuferprotein besteht aus 1400 Aminosäuren, die mRNA aus 4785 bp. RON ist ein 185 kDa großes Heterodimer, bestehend aus einer 35 kDa großen  $\alpha$ - und einer 150 kDa großen  $\beta$ -Untereinheit. Die Untereinheiten entstehen aus dem einkettigen proRON durch Spaltung an der Position Pro<sup>304</sup>-Lys<sup>305</sup>. Sie sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden [81, 184]. Das *ron*-Gen, wie *mst1/msp* auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3 lokalisiert (Locus 3p21.31), ist 16,9 kb groß und umfasst 20 Exons. Orthologe Proteine zu RON wurden in der Maus (STK) [107, 233], im Huhn (SEA) [227] und in *Xenopus* [159] identifiziert.

RON wird vornehmlich in Zellen epithelialen Ursprungs [80, 81, 184, 236, 229], Osteoklasten [121] und Megakaryocyten [16] exprimiert. Innerhalb der mononucleären Zellen wird RON nur von differenzierten Makrophagen gebildet, welche in der Dermis, dem Peritoneum oder der Leber vorkommen [108, 163]. Nicht exprimiert wird RON von Makrophagen aus Lunge und Milz [108]. Weder in Monocyten des peripheren Blutes, noch in thioglykolatrekrutierten Peritonealmakrophagen der Maus (in den ersten drei Tagen) konnte RON detektiert werden [108].

Der extrazelluläre Teil von RON besteht aus einer Semaphorin- (Sema) Domäne, einer PSI- (Plexin-Semaphorin, Integrin) oder MRS- (MET-related sequence) Domäne sowie vier IPT-Domänen (Immunglobulin-like fold shared by plexins and transcription factors) [9, 31]. Er setzt sich aus der  $\alpha$ - und einem Teil der  $\beta$ -Kette zusammen. Die  $\beta$ -Kette enthält zudem die Transmembran-Region, die Tyrosinkinase-Domäne sowie einen cytoplasmatischen Schwanz (s. Abb. 4). Es sind sechs Isoformen von RON bekannt, die mit verschiedenen Krebserkrankungen im Zusammenhang zu stehen scheinen [237]. Ursächlich für diese Varianten sind alternatives Splicing, alternative Transkription oder vorzeitiger Translationsabbruch [135]. Zusätzlich entdecken Ma *et al.* 2010 eine nicht membranständige Variante von RON (RONDelta85)[139]. Diese besteht aus der  $\alpha$ -Kette und einem 45 kDa großen Teil der  $\beta$ -Kette. Diese verkürzte Form kompetiert mit dem nativen Rezeptor um MSP und hemmt damit die der Phosphorylierung folgenden Signalwege. Die Bindung von MSP an RON erfolgt wahrscheinlich über die Sema-Domäne [7]. Eine Rezeptordimerisierung, wie sie bei der Gruppe der Wachstumsfaktor-induzierten

Rezeptoren üblich ist, und zur Phosphorylierung führt, erfolgt analog zur MET-Dimerisierung und wird durch lediglich ein MSP-Molekül vermittelt [7, 151].

### 1.5.3 Funktion

Die Aktivierung von RON durch MSP hat verschiedene Effekte. Die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) während des Entzündungsprozesses wird unterdrückt [41, 125]. Auch auf die Wundheilung wirkt sich die Aktivierung von RON positiv aus [47, 163]. In Wundnähe liegt das Gesamt-MSP in ähnlicher Konzentration vor wie im Serum (wenige Nanomol [163]). Eingehend untersucht wurde bereits das onkogene Potential von MSP/RON. Die abnorme Akkumulation und Aktivierung von RON oder auch Mutationen können eine kritische Rolle bei der Tumorprogression spielen [235]. Gerade bei Brustkrebs und Colonkarzinomen scheint RON bedeutsam zu sein [141, 213, 251]. Während das Fehlen von MSP keinen Einfluss auf die Embryonalentwicklung der Maus hat und die erwachsenen Tiere phänotypisch annähernd unauffällig sind [24], ist die RON-Defizienz letal. Homozygote *ron*-knockout Mausembryonen sterben etwa zum Zeitpunkt der Gastrulation ab [158].

Bei MSP handelt es sich, wie bei HGF um einen Wachstums- und Beweglichkeitsfaktor. MSP ist der einzige bekannte Ligand für RON. Eine Kreuzreaktion mit MET wurde nicht beobachtet. Auch HGF ist nicht in der Lage an RON zu binden. Die Phosphorylierung von RON hat verschiedene Konsequenzen, abhängig vom RON-exprimierenden Zelltyp und der Phosphorylierungsstelle. Die Phosphorylierung der Tyrosine 1238 und 1239 im katalytischen Bereich hat eine verstärkte Kinase-Aktivität zur Folge [230]. Die Phosphorylierung der C-terminalen Tyrosine 1353 und 1360 führt zur Bildung einer so genannten Docking-Site, die für die Interaktion mit Signal-Transduktionsproteinen entscheidend ist [184]. Das konservierte zweizählige Motiv Y-hydrophob-X-hydrophob-(X)<sub>3</sub>-Y-hydrophob-N-hydrophob wurde sowohl bei RON als auch bei MET untersucht [17, 109, 135]. Die Phosphorylierung des C-Terminus aktiviert unter anderem die MAPKinasen ERK1/2 sowie AKT [109, 135]. Auf welchem Wege andere Kinasen aktiviert werden ist noch unklar. Danilkovitch & Leonard [55] diskutieren zusätzlich die Phosphorylierung des Tyrosins 1101, das wiederum die STAT3-Aktivierung und das Überleben zur Konsequenz hat.

**PI3 UND AKT KINASE** Die Stimulation von Zellen mit MSP kann zur direkten Anlagerung der Phosphatidyl 3-Kinase (PI<sub>3</sub>-K) an RON führen. Dies hat die Phosphorylierung der Kinase zur Folge. Die Aktivierung von PI<sub>3</sub>-K ist für die MSP-abhängige Zelladhäsion und Migration notwendig [229]. Weiterhin kontrolliert PI<sub>3</sub>-K die downstream gelegene Kinase AKT (oder RAC/PKB), die ihrerseits in der Lage ist, das proapoptotische BAD-Protein zu modulieren, und so anti-apoptotisch wirkt [56]. Dieser Signalweg

ist schon für verschiedene Cytokine und Wachstumsfaktoren gezeigt worden [77]. Auch der Sonderform der Apoptose, der Anoikis (gr. "Heimatlosigkeit", Apoptose aufgrund von Adhäsionsverlust) wirkt die AKT/PI<sub>3</sub>-K-Aktivität entgegen [54]. Die Aktivierung von PI<sub>3</sub>-K über MSP wirkt sich inhibierend auf die LPS-induzierte NO-Produktion durch iNOS (inducible Nitric Oxide-Synthase) aus [41].

**FAK** Die Focale Adhäsions Kinase (FAK) ist eine cytoplasmatische Tyrosinkinase und Bestandteil der Wachstumsfaktor-induzierten Signalwege [18, 45]. Auch MSP gehört zur Gruppe der Wachstumsfaktoren. MSP induzierte FAK-Aktivierung führt zu Zelladhäsion und Beweglichkeit, aber auch zur Proliferation [52].

**C-SRC UND MAPKINASEN** Das Proto-Onkogen c-Src kodiert für die cytoplasmatische Tyrosinkinase pp60. Diese kontrolliert Migration, Transformation und andere Prozesse. c-Src ist hoch reguliert und kann durch Wachstumsfaktoren aktiviert werden [69, 170]. In Osteoklasten führt MSP-abhängige Aktivierung zu einer verstärkten Resorption von Knochenmaterial [121, 120]. In epithelialen Zellen wurden mitogene Effekte beobachtet [52]. Der Einfluss von c-Src auf die downstream gelegenen MAPKinasen ist bekannt [63, 195] und hat verstärkte Zellproliferation zur Folge [193]. Mittels MSP induziert, werden die MAPKinasen nur durch c-Src aktiviert, nicht aber durch FAK; beide Wege führen aber zur Proliferation der Zellen [52].

#### 1.5.4 Einfluss von msp-Mutationen

Die Auswirkungen von MSP-Deletionsmutanten sind bereits in Kap. 1.5.1 dargestellt worden. Im Folgenden soll kurz auf Punktmutationen eingegangen werden. Danilkovitch *et al.* untersuchten 1999 sowohl die Auswirkungen der Doppelmutante E648G/N682G als auch die der Mutante R683Q auf die Bindungseigenschaften von MSP an RON. Glutamin ist ähnlich hydrophil wie Arginin und besitzt einen vergleichbar langen Rest. Demzufolge sollte, laut der Arbeitsgruppe, die Struktur der  $\beta$ -Kette durch den Aminosäureaustausch nicht stark verändert werden [53]. Dennoch wird die Bindung von MSP an RON komplett aufgehoben. Dies legt die Vermutung nahe, dass das Arginin an der Rezeptorbindung beteiligt ist. Die oben beschriebene Doppelmutante erniedrigt die Bindungseigenschaften um das 50-fache. Möglicherweise stabilisieren die beiden ausgetauschten Aminosäuren die  $\beta$ -Kette des MSP [53].

**DER EINZELBASENAUSTAUSCH C2078T** Bei den Genome Wide Association Studies der Universitätsmedizin Mainz im Rahmen der Gutenberg Herz-Studie wurde im Mainzer Kollektiv unter anderem der SNP (single nucleotide

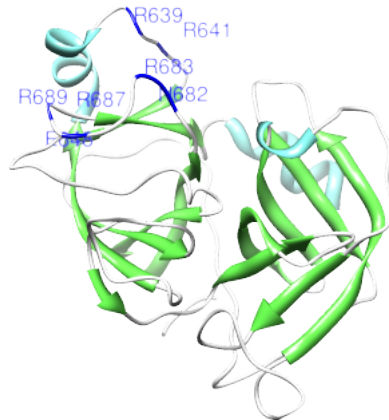


Abbildung 5:  $\beta$ -Kette des MSP mit möglicherweise für die Rezeptor-Liganden-Interaktion bedeutsamen Resten [verändert nach 151].

polymorphism) c2078t (rs3197999) im *msp*-Gen detektiert. Dieser konnte im Rahmen dieser Untersuchung mit der Atherosklerose in Zusammenhang gebracht werden. Bei der Replikation war diese Korrelation bei zwei Kollektiven signifikant, bei einem dritten nicht. Insgesamt ist die Korrelation des SNPs rs3197999 mit der Atherosklerose schwach signifikant (Blankenberg *et al.*, unpublizierte Daten). Der Einzelbasenaustausch c2078t hat die Aminosäuresubstitution Arg689Cys zur Folge. Position 689 befindet sich in der  $\beta$ -Kette des MSP-Proteins in einem Bereich, der für die Ligand-Rezeptor-Interaktion bedeutsam ist (s. Kap. 1.5.1). Folglich ist eine veränderte Affinität von MSP zu RON denkbar, resultierend in veränderten Phosphorylierungsmustern und abnormem Verhalten von Makrophagen während des Entzündungsprozesses. Dies legen auch die bereits untersuchten Punktmutationen [53] und die für die Bindung möglicherweise bedeutsame Arginingruppe nahe [151]. Auch die Algorithmen SIFT (<http://sift.jcvi.org/>; Beurteilung auf Basis von Sequenzhomologie und physikalischen Eigenschaften der Aminosäuren) und PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>; Beurteilung unter Berücksichtigung evolutionärer und physikalischer Protein-/Aminosäureeigenschaften) sagen eine veränderte Proteinstruktur auf Basis dieses SNPs voraus.

## 1.6 FRAGESTELLUNG

Der SNP rs3197999 ist im AtheroGene-Kollektiv (Univerität Mainz) mit der KHK assoziiert (Blankenberg *et al.*, unpublizierte Daten). Dieser Polymorphismus führt zum Aminosäureaustausch R689C im Makrophagen stimulierenden Protein (MSP). Was ist die physiologische Konsequenz dieser Mutation? Zu diesem Zweck wurde ein rekombinantes wildtypisches sowie mutan-

tes MSP-Protein hergestellt. Im Detail sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Welchen Einfluss hat mutantes MSP auf die Migration von Makrophagen?
- Welchen Einfluss hat mutantes MSP auf die Proliferation von Makrophagen?
- Welchen Einfluss hat mutantes MSP auf die Apoptose von Makrophagen?
- Welchen Einfluss übt mutantes MSP auf die Atherogenese aus und wie ist der Unterschied in Assoziationsstudien zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu erklären, dort ist der SNP mit erhöhtem Krankheitsrisiko assoziiert?
- Welcher Pathomechanismus liegt der Atherosklerose und den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vor dem Hintergrund des SNP rs3197999 zugrunde?



Teil II

MATERIAL UND METHODE





## MATERIAL UND METHODE

---

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Laborchemikalien (Qualität „p.A.“, „für die Biochemie“ oder „für die Molekularbiologie“) wurden von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt) und Sigma-Aldrich Produktions GmbH (Steinheim) bezogen. Weitere verwendete Chemikalien werden an gegebener Stelle im Text aufgeführt. Als ddH<sub>2</sub>O wird im Folgenden bidestilliertes Wasser der Firma B. Braun Melsungen AG (Melsungen) bezeichnet. Der Begriff dH<sub>2</sub>O wird für Wasser verwendet, das über eine Milli-Q-Plus Filteranlage (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) gereinigt wurde.

#### 2.1.2 Tiere & Tierfutter

##### Tiere

Die Mäuse (*Mus musculus*, weiblich; Genotypen: Wildtyp: C57BL/6, Knockout: *LDLR*<sup>-/-</sup>, Knockout: *GPx-1*<sup>-/-</sup>, Knockout: *ApoE*<sup>-/-</sup>, Doppelknockout: *GPx-1*<sup>-/-</sup>/*ApoE*<sup>-/-</sup> wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung der Johannes Gutenberg- Universität Mainz (ZVTE) gezüchtet.

##### Futter

Das Futter wird von der Firma Ssniff Spezialdiäten GmbH (Soest) bezogen. Die Futterzusammensetzung entspricht in ihrem Anteil an Aminosäuren, Vitaminen, Mineralstoffen und Spurenelementen im Wesentlichen der vom American Institute of Nutrition publizierten Experimentaldiät.

HALTUNGSDIÄT SSNIFF EF R/M **Rohnährstoffe** [%]: Trockensubstanz 96,2, Rohprotein (N x 6,25) 12,3, Rohfett 4,1, Rohfaser 5,0, Rohasche 2,9 N-freie Extraktstoffe 71,9, Stärke 44,7, Zucker 25,7

**Fettsäuren** [%]: C 14:0 0,02, C 16:0 0,43, C 16:1 0,02, C 18:0 0,19, C 18:1 1,06, C 18:2 2,12, C 18:3 0,26, C 20:0 0,02

WESTERN TYPE DIÄT SSNIFF EF R/M NACH TD88137 **mod. Rohnährstoffe** [%]: Trockensubstanz 97,0, Rohprotein (N x 6,25) 17,1, Rohfett 21,2, Rohfaser 5,0, Rohasche 4,5 N-freie Extraktstoffe 49,3, Stärke 14,5, Zucker 32,8

**Fettsäuren [%]:** C 4:0 0,80, C 6:0 0,53, C 8:0 0,29, C 10:0 0,63, C 12:0 0,72, C 14:0 2,21, C 16:0 5,74, C 16:1 0,38, C 17:0 0,13, C 18:0 2,04, C 18:1 4,63, C 18:2 0,38, C 18:3 0,11, C 20:0 0,04, C 20:1 0,02

**Cholesterol [mg/kg]:** 2.071

### 2.1.3 Geräte

#### Elektrophorese

- horizontale Elektrophoresekammer Wide Mini-Sub Cell GT; Bio-Rad Laboratories GmbH, München
- vertikale Elektrophorese- und Western Blot-Kammer Mini Protean Tetra Cell; Bio-Rad Laboratories GmbH, München
- Geldokumentationssystem Gel-Doc; Bio-Rad Laboratories GmbH, München
- Sequencer CEQ 8000; Beckman Coulter GmbH, Krefeld
- Spannungsgeber PowerPac 300; Bio-Rad Laboratories GmbH, München

#### Glasgeräte

- Bechergläser; Schott Duran GmbH, Mainz
- Erlenmeyerkolben; Schott Duran GmbH, Mainz
- Färbegestell aus Kalk-Soda-Glas; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Kasten mit Deckel aus Kalk-Soda-Glas mit Drathbügel; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Küvette/Färbegestell nach Hellendahl aus Kalk-Soda-Glas; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Laborflaschen ISO 4796; Schott Duran GmbH, Mainz
- Messkolben; Schott Duran GmbH, Mainz
- Mischzylinder; Schott Duran GmbH, Mainz

#### Mikroskope

- Kamera Leica DFC 280; Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar
- Kamera OcrA ER; Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching
- Fluoreszenzmikroskop Leica DM6000 B; Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar
- Mikroskop Leica DM2000; Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar

- inverses Mikroskop für die Zellkultur Leica DM IL; Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar

#### Mischgeräte

- Magnetrührer mit Heizplatte IKA-Combimag Ret; IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
- Rotationsmischer test-tube-rotator, Snijders Scientific BV, Tilburg, NL
- Stabhomogenisierer MICCRA D-1; ART-moderne Labortechnik e.K., Mühlheim
- Vortex; VWR International GmbH, Darmstadt

#### pH-Meter

- pH-Meter pH 211; Hanna Instruments Deutschland GmbH, Kehl/Rhein
- pH-Einstabmesskette senTix 81; WTW GmbH, Weilheim

#### Pipetten und Pipettierhilfen

- Pipetten; Eppendorf AG, Hamburg
- Pipettierhilfe; Eppendorf AG, Hamburg

#### Polymerase-Kettenreaktion

- LightCycler 2.0; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Thermo-Cycler GeneAmp PCR System 9700; Perkin Elmer LAS GmbH, Rodgau- Jügesheim

#### Waagen

- Analysenwaage LC 2200 P; Sartorius AG, Göttingen
- Feinwaage AC 210 S; Sartorius AG, Göttingen

#### Zentrifugen und Zubehör

- Großzentrifuge Varifuge 3.0 R; Heraeus / Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
- Mikrozentrifuge 5415 R; Eppendorf AG, Hamburg
- Shandon Cytospin 4 Zytozentrifuge, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
- Tischkühlzentrifuge Sigma 4K15C; Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
- Ultrazentrifuge CO-XL-90; Beckman Coulter GmbH, Krefeld

- Ultrazentrifugengefäße aus Polyallomer, Re-Seal 39 ml; Beranek Laborgeräte GmbH, Weinheim
- Ultrazentrifugenrotor 70Ti; Beckman Coulter GmbH, Krefeld
- Zentrifugengefäße; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
- Zubehör Zytozentrifuge: Cytofunnel, Filterkarte & Cytoclip; Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold

#### Sonstige Geräte

- Brutschrank Heraeus Function Line UB6; Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
- CO<sub>2</sub>-Inkubator HeraCell 150; Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
- Cryotom; Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar
- Dampfsterilisator EA 115; WEBECO Hygiene in Medizin und Labor GmbH & Co. KG, Selmsdorf
- Einbettautomat TP 1020; Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar
- Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme FPM 3800 AD; Fujifilm Photofilm Europe GmbH, Düsseldorf
- Kontaminationsmonitor LB 124; Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Wildbach
- Luminometer Fluoroskan Ascent; Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
- Hybridisierungssofen HB-1000 Hybridizer; UVP Inc., Upland, CA, USA
- Mikrotiterplatten-Photometer Multiskan Ascent; Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
- Mikrotom RM 2255; Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar
- Orbitalschüttler Titramax 100; Heidolph Instrument GmbH & Co. KG, Schwabach
- Schüttelinkubator Inkubator 1000/Unimax 1010; Heidolph Instrument GmbH & Co. KG, Schwabach
- Szintillationszähler Triathler<sup>TM</sup> Multilabel Tester; Hidex Ltd., Turku, Finnland
- UV/VIS-Spektralphotometer NanoDrop ND 1000; Nanodrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA
- Wasserbad WB 10; P-D Industriegesellschaft mbH, Dresden

#### 2.1.4 Verbrauchsmaterialien

- Abdeckfolien für Mikrotiterplatten "Sealing tapes"; VWR International GmbH, Darmstadt
- Cryo.s Einfrierröhrchen 1 ml; Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
- Deckgläser #1, 24 x 55 mm; Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co KG, Braunschweig
- Einmalskalpell #23; Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
- Hybridisierungsdeckgläser Hybri-Slip 22 x 22 mm; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Injektionskanülen 18 - 26 G; Becton Dickinson GmbH, Heidelberg / B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- Injektionsspritzen, Luer (Lock); Becton Dickinson GmbH, Heidelberg / B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- LightCycler-Kapillaren 20 µl; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Mikrotiterplatten 96 Well MaxiSorp; Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
- Mikrotiterplatten 96 Well PolySorp, weiß; Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
- Nitrocellulosemembran Hybond ECL; GE Healthcare Europe GmbH, München
- Objektträger Superfrost Plus; Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co KG, Braunschweig
- Parafilm; Pechiney Plastic Packaging Inc., Chicago, IL, USA
- Pasteurpipetten Glas 230 mm; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml; Brand GmbH & Co KG, Wertheim
- Petrischalen; Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
- serologische Pipetten; Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
- Pipettenspitzen; Starlab GmbH, Ahrensburg /Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
- Reaktionsgefäße 1,5 ml; Eppendorf AG, Hamburg / Starlab GmbH, Ahrensburg
- Sterilfilter Millex GP, 0,22 µm Porendurchmesser; Millipore GmbH, Schwalbach

- Transwell-Einsätze, 6,5 mm, Polycarbonatmembran mit 5 µm Porengröße; Corning GmbH, Kaiserslautern
- Trocknungsmittel MiniPax; Multisorb Technologies Inc., Buffalo, NY, USA
- Zellkulturflaschen 25 - 175 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche bzw. 650 ml Kulturvolumen; Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
- Zellkulturplatten 6/12/24-Well, Nunclon-beschichtet; Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
- Zellkulturplatten Costar 24 Well, unbeschichtet; Corning GmbH, Kaiserslautern
- Zellkulturschalen 8,8 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche, Nunclon-beschichtet; Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
- Zellschaber 25 cm; Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
- Zentrifugenröhrchen 15 ml & 50 ml; Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
- Zentrifugationssäulen CentriSep; Princeton Separation Inc., Adelphia, NJ, USA

#### 2.1.5 Vorgefertigte Systeme (Kits)

- Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagenzien; GE Healthcare Europe GmbH, München
- β-Gal Staining Set; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Cell Proliferation ELISA, BrdU; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Cholesterol/Cholesteryl-Ester-Quantitation Kit; Calbiochem/Merck KGaA, Darmstadt
- DNA free-Kit; Ambion Inc., Austin, TX, USA
- ELISA Human IL 12p40 DuoSet; R&D Systems GmbH, Wiesbaden
- ELISA Human MSP/MST1 DuoSet; R&D Systems GmbH, Wiesbaden
- ELISA Human TNF-α DuoSet; R&D Systems GmbH, Wiesbaden
- FuGENE HD Transfection Reagent; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- GeneClean II-Kit; Qbiogene Inc., Solon, OH, USA
- GenomeLab DTCS-Quick Start Kit; Beckman Coulter GmbH, Krefeld

- In Situ Cell Death Detection Kit, POD; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- MAXIscript *In vitro* Transcription; Ambion, Inc., Austin, TX, USA
- Modified Lowry Assay; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA
- mRNAlocator in situ Hybridization Kit; Ambion, Inc., Austin, TX, USA
- Ni-NTA Spin-Kit; Qiagen GmbH, Hilden
- Ni-NTA Superflow Columns; Qiagen GmbH, Hilden
- pcDNA3.1/V5-His TOPO TA Expression Kit; Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- Plasmid Midi Kit; Qiagen GmbH, Hilden
- QIAquick PCR Purification Kit; Qiagen GmbH, Hilden
- QuantiTect SYBR Green PCR Kit; Qiagen GmbH, Hilden
- QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit; Stratagene, La Jolla, CA, USA
- Rapid Ligation Kit; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- RNeasy Mini, Midi & Maxi Kit; Qiagen GmbH, Hilden
- SuperScript III Reverse Transkriptase-Kit; Invitrogen, Karlsruhe
- TOPO TA Cloning Kit; Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- Zentrifugationssäulen CentriSep; Princeton Separation, Inc., Adelphia, NJ, USA

#### 2.1.6 Medien und Zusätze

- Ampicillin; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- DMEM Zellkulturmedium; Biochrom AG, Berlin
- F12 Zellkulturmedium; Gibco/Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- FCS Gold; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
- Fetal bovine serum (FCS); Gibco/Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- G-418/Geneticin Disulfat; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- IPTG; AppliChem GmbH, Darmstadt
- Kallikrein, human; Enzyme Research Laboratories Ltd., Swansea, UK

- Kanamycin; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- LB-Agar; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- LB-Medium; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- L-Glutamin 200 mM; Gibco/Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- LPS von *Escherichia coli*; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- LPS von *Salmonella typhosa*; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Natriumpyruvat 100 mM; Gibco/Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- PBS, steril; Gibco/Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- Penicillin (5000 U/ml)/Streptomycin (5000 µg/ml); Gibco/Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- RPMI 1640 Zellkulturmedium; Gibco/Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- SOC-Medium; Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- Trypsin-EDTA (Trypsin 0,25%, 1 mM EDTA); Invitrogen GmbH, Karlsruhe

#### 2.1.7 Zellen und Vektoren

##### Zelllinien

- THP-1 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig): humaner annähernd tetraploider Karyotyp - 94(88-96)<4n>XY/XXY, -Y, +1, +3, +6, +6, -8, -13, -19, -22, -22, +2mar, add(1)(p11), del(1)(q42.2), i(2q), del(6)(p21)x2-4, i(7p), der(9)t(9;11)(p22;q23)i(9)(p10)x2, der(11)t(9;11)(p22;q23)x2, add(12)(q24)x1-2, der(13)t(8;13)(p11;p12), add(18)(q21) - trägt t(9;11) assoziiert mit AML M5
- CHO-K1 (ECACC, Health Protection Agency, Salisbury, UK): Chinese Hamster ovary cells, hypodiploider Karyotyp mit 12 % Polyploidie - 22(20-23)

##### Bakterienstämme

- *E. coli* One Shot TOP 10 Chemically Competent Cells (Invitrogen GmbH, Karlsruhe): F<sup>-</sup> *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 recA1 araD139* Δ(*araleu*) 7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*
- *E. coli* XL10-Gold Ultracompetent Cells (Stratagene, La Jolla, CA, USA): Tet<sup>r</sup> Δ(*mcrA*)183 Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB lacI*<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>]



- *E. coli* Rosetta2 Ultracompetent Cells (DE3)pLysS (Novagen/ Merck Chemicals Ltd., Bad Soden): F<sup>-</sup> *ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm* (DE3) pLysSRARE2 (Cam<sup>R</sup>)

#### Vektoren

- gWIZ  $\beta$ -Galactosidase Mammalian Expression Vector; Genlantis Inc., San Diego, CA, USA
- gWIZ GFP Mammalian Expression Vector; Genlantis Inc., San Diego, CA, USA
- pCR 2.1-TOPO Vektor 4 kb (Invitrogen GmbH, Karlsruhe): LacZ $\alpha$ -Gen, multiple cloning site, Ampicillin- und Kanamycinresistenz, T7-, M13-priming site
- pcDNA3.1/V5-His-TOPO Vektor 4kb (Invitrogen GmbH, Karlsruhe): multiple cloning site, Ampicillin- und Neomycinresistenz, Polyhistidine-Tag, V5-Epitop, T7-priming site
- pCR4Blunt-TOPO Vektor 4 kb (Invitrogen GmbH, Karlsruhe): LacZ $\alpha$ -Gen, multiple cloning site, Ampicillin- und Kanamycinresistenz, T7-, T3-, M13-priming site
- pET30 Vektor 5,4 kb (Novagen / Merck Biosciences GmbH, Schwalbach): multiple cloning site, Kanamycinresistenz, Polyhistidin-Tag, T7-, T7-Terminator priming site

#### 2.1.8 Antikörper

Die Antikörper werden - sofern als Lyophilisat geliefert - in der vom Hersteller angegebenen Menge Wasser oder PBS gelöst. Sämtliche Antikörper werden aliquotiert und bei entsprechender Temperatur gelagert (1).

#### 2.1.9 Oligonukleotide

Die Primer werden von der Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bezogen. Die lyophilisierten Oligonukleotide werden in ddH<sub>2</sub>O gelöst, und auf eine Ausgangskonzentration von 10  $\mu$ mol/l eingestellt. Die Arbeitskonzentration beträgt 1  $\mu$ mol/l.

Die Oligonukleotidsequenzen werden mit Hilfe der PSQ Assay Design-Software 1.0.6 der Firma Biotage AB (Uppsala, Schweden) erstellt bzw. der angegebenen Literatur entnommen (2, 3).

#### 2.1.10 Software

- CodonCode Aligner 1.6.3; CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA

Name	Epitop	Klon	Konjugation	Arbeitskonzentration	Anwendung	Vertrieb
Anti-Actin	C-Terminus	I-19	-	2 µg / ml	WB	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Anti-murCD 68	n. a.	T-16	-	4 µg / ml	IF	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Anti-humFrakalkin	n. a	M-18	-	4 µg / ml	IF	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Anti-humMFG-E8	AS 325 - 384	H-60	-	0,2 - 4 µg / ml	ELISA / WB	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Anti-humMFG-E8	n. a.	MFG-06	-	0,2 - 4 µg / ml	ELISA / WB	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Anti-humMFG-E8	n. a.	278918	-	1 µg / ml	WB	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Anti-murMFG-E8	n. a.	18A2-G10	-	100 µg / ml	IF	MBL International, Woburn, MA, USA
Anti-murMFG-E8	AS 56 - 190	M-135	-	0,2 - 4 µg / ml	ELISA / WB / IF	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Anti-humMSP	n. a.		-	0,6 µg / ml	WB	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Anti-humRON	C-Terminus	C-20	-	2 µg / ml	WB	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Anti-arm.Hamster	IgG H&L		HRPO	0,05 µg / ml	WB	Jackson IR Europe Ltd, Suffolk, UK
Anti-arm.Hamster	IgG H&L		DyLight549	15 µg / ml	IF	Jackson IR Europe Ltd, Suffolk, UK
Anti-Rabbit	IgG H&L		HRPO	0,05 µg / ml	WB	Jackson IR Europe Ltd, Suffolk, UK
Anti-Rabbit	IgG H&L		Biotin	0,2 µg / ml	ELISA	KPL Inc., Gaithersburg, MD, USA
Anti-Rabbit	IgG H&L		AlexaFluor546	20 µg / ml	IF	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Anti-Maus	IgG H&L		HRPO	0,05 µg / ml	WB	Jackson IR Europe Ltd, Suffolk, UK
Anti-Maus	IgG H&L		Biotin	0,2 µg / ml	ELISA	KPL Inc., Gaithersburg, MD, USA
Anti-Ziege	IgG H&L		HRPO	0,1 µg / ml	WB	Jackson IR Europe Ltd, Suffolk, UK
Anti-Ziege	IgG H&L		DyLight488	15 µg / ml	IF	Jackson IR Europe Ltd, Suffolk, UK

Tabelle 1: Verwendete Antikörper

Name	Sequenz	Länge Amplikon	Annealingtemperatur	Zykluszahl	Art	Referenz
Amplifikations-Primer						
humLactadherinC-Term1.for	5' - CATATGATGCCGTAACCTTTGGCTCT - 3'	338 bp	68 °C / TD	10 + 35	Mensch	NM_005928
humLactadherinC-Term2.rev	5' - CTCGAGTCATAATTAAGGGGCTGAGAAG - 3'					
humLactadherinC-Term3.for	5' - GGATCCATGACTGTTTGAGACCCCTGTG - 3'					
humLactadherinC-Term4.rev	5' - CTCGAGTTATTATCAGCCCATGGAAGCAGGAA - 3'					
murLactadherin5.for	5' - ATCCAGGATGAAAGGGTGGAG - 3'	616 bp	58 °C	24	Maus	NM_008594.2
murLactadherin6.rev	5' - TGATCGGGTTATGCCAGGAC - 3'					
murMSP.for	5' - CGTCAAAGGATCCAAGTCACA - 3'	266 bp	56 °C	30	Maus	NM_008243
murMSP.rev	5' - AGAAGGCCATGCCCAAC - 3'					
murRON.for	5' - GGTCCCTCAAGGAATTCATACA - 3'	243 bp	56 °C	30	Maus	NM_009074
murRON.rev	5' - ACAGGCTCTGGCCTTCAA - 3'					
humRON.for	5' - AGCCACGGCTCAGTGTCTAT - 3'	193 bp	51 °C	30	Mensch	[213]
humRON.rev	5' - GGGCACTAGGATCATCTGTCA - 3'					
Mutagenese-Primer						
alps m1.for	5' - ATGGCAAGGTCCTGCTGGCCAGCTGTCTTCACGC - 3'	s. QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit			Mensch	
alps m1.rev	5' - GCGTGAAGACAGCTGGCCAGCAGGACCTTGGGCAT - 3'					
Sequenzier-Primer						
M13.for	5' - GTAACACGACGGCCAG - 3'		50 °C	30	Plasmid	
M13.rev	5' - CAGGAAACAGCTATGAC - 3'		50 °C	30	Plasmid	
T7-Promotor	5' - TAATACGACTCACTATAGGG - 3'		50 °C	30	Plasmid	
T7-Terminator	5' - GCTAGTTATTGCTCAGCGG - 3'		50 °C	30	Plasmid	

Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide (TD: Touch-down PCR)

Name	Sequenz	Länge Amplikon	Annealingtemperatur	Zykluszahl	Art	Referenz
RTD-Primer						
murLactadherin-L.for	5' - TCTGGTGACTTCTGTGACTC - 3'	226 bp	58 °C	45	Maus	NM_008594.2
murLactadherin-L.rev	5' - GGCAC TGGCAGATGTATT C - 3'					
humLactadherin1.for	5' - ACCACTCCCACAAGAGAAC - 3'	242 bp	56 °C	45	Mensch	NM_005928
humLactadherin2.rev	5' - GTGGTGCTGCCTCTGAA - 3'					
humLactadherin3.for	5' - GGCAACCACTGTGAGACGA - 3'	275 bp	56 °C	45	Mensch	NM_005928
humLactadherin4.rev	5' - TACTCATGACTGGCCCAAGCG - 3'					
humGILT.for	5' - GCTGTCGCCAGACACTATCA - 3'	155 bp	50 °C	45	Mensch	[226]
humGILT.rev	5' - AGCTGGGCTGATCTTCCAA - 3'					
18S rRNA.for	5' - GATACCGAGTAGGAATAATG - 3'	105 bp	56 - 58 °C	45	alle Chordaten	NR_003286.2
18S rRNA.rev	5' - GCGCAATACGAATGCC - 3'					

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide für die RTD-PCR

- GeneDoc 2.6; <http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>
- Husar 4.0; <http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de>
- Leica Image Manager IM50; Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar
- USCF Chimera 1.5.2; <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>
- Volocity 4.0; Improvision Deutschland; Tübingen

## 2.2 METHODE

### 2.2.1 Haltung und Zucht der Mäuse

#### *Zucht und Haltung*

Die Mäuse werden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung der Johannes Gutenberg-Universität (ZVTE) gemäß SPC Konditionen und Standard-Tierhaltungsbedingungen in einem 12 h Hell-Dunkel Zyklus gehalten. Die Gruppengröße beträgt 4-5 Tiere pro Käfig. Wasser und Futter sind ad libitum vorhanden.

C57BL/6J-*ApoE*<sup>tm1Unc</sup> Mäuse (*ApoE*<sup>-/-</sup>, Stamm Nr. 2052) und B6.129S7-*Ldlr*<sup>tm1Her</sup>/J Mäuse (*LDLR*<sup>-/-</sup>, Stamm Nr. 2207) zurückgekreuzt auf den C57BL/6 Stamm für 10 Generationen wurden vom Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) bezogen. *GPx-1*<sup>-/-</sup>-Mäuse, zurückgekreuzt auf den C57BL/6 Hintergrund, wurden von Ye-Shi Ho [100] zur Verfügung gestellt. Die Knockout-Mutanten wurden durch Inzucht vermehrt. Der *GPx-1*<sup>-/-</sup>/*ApoE*<sup>-/-</sup> doppelt defiziente Stamm (DKO) wurde durch die Generierung eines F2-Hybrids aus den *ApoE*<sup>-/-</sup> und *GPx-1*<sup>-/-</sup> Eltern-Stämmen hergestellt. Der *GPx-1*<sup>-/-</sup>/*ApoE*<sup>-/-</sup>-Stamm wurde durch Inzucht vermehrt. Die Genotypisierung der Mausstämmen erfolgt mittels PCR durch die ZVTE oder das Institut für Klinische Chemie der Universitätsmedizin mit den vom Jackson Laboratory angegebenen Primern.

#### *Induktion von Diäten*

Für die Induktion der Western Type Diät werden weibliche *LDLR*-, *ApoE*- sowie *GPx-1*-defiziente Mäuse, DKO-Mäuse und Kontrolltiere (C57BL/6) im Alter von etwa 12 Wochen für 6 - 12 Wochen auf Diät gesetzt. Außerdem wird zeitgleich eine Kontrollgruppe auf Halterungsdiät gehalten.

### 2.2.2 Gewinnung von Gewebe zur RNA-Extraktion

Die in Isofluran-Kurzanznarkose durch HWS-Luxation getötete Maus (*Mus musculus*, weiblich, ca. 30 g) wird entlang der Linea alba eröffnet. Es werden

- Lunge,

- Herz mit Aortenbogen und
- der gesamte Dünndarm

entnommen und in Bechergläser mit kaltem PBS gegeben. Die Bechergläser werden auf Eis gelagert. Lunge und Leber werden zerkleinert und in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Darmanteile werden mit PBS durchgespült, zerkleinert und in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Die entnommenen Gewebe werden ausgewogen und die Zentrifugenröhrchen auf Trockeneis zwischengelagert bis mit der RNA-Isolierung begonnen wird.

### 2.2.3 Gewinnung des Untersuchungsmaterials für Paraffinschnitte

Es werden Paraffinschnitte aus Mäusen sämtlicher aufgeführter Genotypen erstellt. Nach der Tötung wird die Maus entlang der Linea alba eröffnet, und die gewünschten Organe herauspräpariert.

Es werden folgende Organe entnommen:

- Lunge
- Leber
- Darm
- Aorta
- Herz

Die Organe werden kurz mit PBS gespült. Sie werden bis zum Abschluss der Organentnahme in PFA 4 % zwischengelagert.

Die Fixation erfolgt über Nacht in PFA, bevor die Gewebe entwässert und in Paraffin eingebettet werden. Die Einbettung des Gewebes wird mit dem Einbettautomaten TP 1020 von Leica durchgeführt. Die Organe werden zu Beginn 2 h gewässert. Im Anschluss werden sie im Einbettautomaten unter den angegebenen Bedingungen inkubiert (s. Tab. 4).

Die Organe werden nach Beendigung des Programms bis zum Ausblocken in flüssigem Paraffin (65 °C) gelagert. Zum Ausblocken wird das Gewebe mit einer geringen Menge Paraffin in einer Einbettkassette fixiert. Im Anschluss wird es vollständig mit flüssigem Paraffin überschichtet und die Einbettkassette verschlossen. Die Paraffinblöcke werden zum Aushärten 10 min bei 4 °C inkubiert.

Mittels Microtom werden 5 µm dicke Schnitte aus den Paraffinblöcken erstellt, auf Superfrost Plus Objektträger aufgebracht und 2 h bei 50 °C fixiert. Die Schnitte werden vor der in situ-Hybridisierung 20 min bei 50 °C nachfixiert.

Lösungsmittel	Dauer	Temperatur
aqua dest.	30 min	RT
70 % Ethanol	2 h	RT
80 % Ethanol	2 h	RT
96 % Ethanol	1 h	RT
96 % Ethanol	2 h	RT
100 % Ethanol	2 h	RT
100 % Ethanol	2 h	RT
Xylol	2 h	RT
Xylol	2 h	RT
Paraffin	2 h	65 °C
Paraffin	4 h	65 °C

Tabelle 4: Programm des Einbettautomaten

#### 2.2.4 Gewinnung des Untersuchungsmaterials für Cryo-Schnitte

Es werden Cryopräparate aus Mäusen sämtlicher aufgeführter Genotypen erstellt. Nach der Tötung wird die Maus entlang der Linea alba eröffnet, und die gewünschten Organe herauspräpariert.

Es werden folgende Organe entnommen:

- Lunge
- Herz mit Aortensinus

Die Organe werden kurz mit PBS gespült und in Tissue-Tek O.C.T. Compound Einbettmedium (Sakura Finetek Germany GmbH; Staufen) eingebettet. Die Präparate werden direkt in Flüssigstickstoff-gekühltem Isopentan eingefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C. Auf dem Cryotom werden 8 µm starke Schnitte angefertigt, auf Superfrost Plus Objektträger aufgezogen und 1 h bei 37 °C getrocknet. Die Lagerung der Objektträger erfolgt bei -80 °C.

#### 2.2.5 Herstellung eines Dünnschichtpräparates mittels Zytozentrifuge

Mit Hilfe des Zentrifugalprinzips werden in der Zytozentrifuge (Shandon Cytospin 4 Zytozentrifuge) Zellen auf einem klar definierten Bereich eines Objektträgers sedimentiert. Restflüssigkeit wird über einen Filter aus der Probenkammer absorbiert.

Durch Zytozentrifugation werden Zellen zudem abgeflacht, um eine gute Zellkerndarstellung zu erzielen. Alle Zelltypen können in gleicher Weise dargestellt werden. Für jedes Präparat werden maximal  $1 \times 10^5$  Zellen verwendet.

Vorbereitend werden auf jeden Objektträger eine Cytospin-Filterkarte sowie ein "Cytofunnel" (Probenreservoir) gelegt. Diese werden mit einem Metall-Shandon Cytoclip zusammengehalten. Die Zellen werden, falls notwendig, dreimal in 1 x PBS gewaschen, in maximal 500 µl PBS aufgenommen und in das Probenreservoir pipettiert. Es folgt eine zehnmünütige Zentrifugation bei 700 U/min und RT. Im Anschluss werden der Cytoclip entfernt, Filterkarte und Probenreservoir entsorgt und der Objektträger 30 min luftgetrocknet. Das Präparat kann nun gefärbt werden.

### 2.2.6 Präparation und Modifizierung der LDL

#### Präparation der LDL

Die Präparation der LDL (Dichte 1,019 - 1,063 g/ml) erfolgt in Anlehnung an die Methode von Havel *et al.* [96] durch sequentielle, isopyknische Ultrazentrifugation im Kaliumbromid-Dichtegradienten. Als Ausgangsmaterial dient nicht-lipämisches, leukozytendepletiertes Frischplasma, bezogen von der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz. Erkrankungen der Spender wie koronare Herzkrankheit, Diabetes mellitus oder Bluthochdruck sind nicht bekannt. Die Ultrazentrifugation erfolgt wiederholt im Rotor 70Ti der Ultrazentrifuge CO-XL-90 von Beckman Coulter über 20 h bei 10 °C und 45000 U/min (149008 x g). Zur Entfernung des KBr werden die so gewonnenen LDL gegen 5 l des folgenden Puffers dialysiert:

- 5 mM Tris
- 150 mM NaCl
- 0,23 mM EDTA (nicht bei späterer oxLDL-Generierung)
- pH 7,4

Die Dialyse erfolgt unter stetigem Rühren über 72 h bei 4 °C. Es wird der Dialyseschlauch Visking 27/32 der Firma Roth (MWCO 14000) verwendet. Nach Ablauf von jeweils 24 h wird der Puffer erneuert. Nach der Dialyse werden die LDL mit Hilfe einer Millex Filtereinheit sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgt nach der Methode von Lowry. Die Gesamt-Cholesterinkonzentration (Cholesterin & Cholesterinester) erfolgt mit dem Cholesterol/Cholesteryl-Ester Quantitation Kit (Calbiochem / Merck Biosciences GmbH, Schwalbach) oder dem Einkomponentenreagenz Klinische Chemie Cholesterin Reagenz (Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) nach dem Protokoll des Herstellers.

Die enthaltene Cholesterinesterase hydrolysiert Cholesterinester zu Cholesterin. Das gesamte Cholesterin wird durch die Cholesterinoxidase zu Cholest-4-en-3-on oxidiert. Das entstehende Wasserstoffperoxid erzeugt durch Reduktion von Resazurin Resorufin, welches photometrisch ( $\lambda = 570 \text{ nm}$ ) oder fluorometrisch detektiert werden kann.



### *Modifizierung der LDL*

Die Modifikationen der LDL erfolgen nach der Methode von Suriyaphol *et al.* [206].

**OXLDL-PRÄPARATION**  $\text{Cu}^{2+}$  ist in der Lage LDL oxidativ zu modifizieren.

Zu 1 ml der LDL-Suspension (EDTA-frei) werden 25  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  gegeben. Die Inkubation erfolgt über 3 d bei 37 °C unter Schütteln. Ist die Suspension nach Ablauf dieser Zeit trüb, so sind die LDL ausreichend oxidiert. Ist dies nicht der Fall, kann die Inkubationszeit verlängert werden.

Zum Abstoppen der Reaktion und Komplexieren des Kupfers werden 0,5 mM EDTA zugegeben.

**ELDL-PRÄPARATION** Initial wird das Apolipoprotein B der LDL proteolytisch gespalten. Im Folgenden werden die nun zugänglichen Cholesterinester mittels Cholesterinesterase in Cholesterin und Fettsäuren gespalten. Die Zugabe des Trypsininhibitors schützt die Cholesterinesterase vor dem Abbau durch das Trypsin und verhindert eine proteolytische Aktivität der modifizierten LDL.

Zu 1 mg Cholesterin werden 2  $\mu\text{g}$  Trypsin (aus bovinem Pankreas; Sigma) gegeben und 24 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Zu diesem Ansatz wird 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Trypsininhibitor (Sigma) sowie 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cholesterolesterase (aus *Candida cylindracea*; Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan) zugegeben und erneut 24 h bei 37 °C inkubiert.

#### 2.2.7 Rekrutierung und Haltung von peritonealen Mausmakrophagen

##### *Zellrekrutierung*

Um differenzierte Makrophagen aus dem Peritoneum der Maus gewinnen zu können, muss eine Peritonitis induziert werden. Dies geschieht durch intraperitoneale Injektion von Thioglykolat (4% in physiologischer Kochsalzlösung; Fluka / Sigma-Aldrich). Nach drei bis vier Tagen werden die Mäuse durch  $\text{CO}_2$ -Exposition abgetötet und bis zur Peritoneallavage auf Eis gehalten.

##### *Kultivierung Primärkultur*

Die Makrophagen werden drei bis vier Tage nach Thioglykolat-induzierter Zellrekrutierung aus dem Peritoneum der getöteten Maus (*Mus musculus*, unterschiedliche Genotypen, weiblich, etwa 30g) durch Spülen mit 6 ml Makrophagenmedium (suppl. DMEM) gewonnen. Die Zellen werden 5 min bei 460 x g pelletiert, in frisches Medium aufgenommen und mit einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät. Nach 3 h Stunden zeigen die Makrophagen Plastikadhärenz; nicht adhärente Zellen werden durch Erneuern des Mediums entfernt.

### 2.2.8 Zelllinien

#### *Kultivierung der Zelllinie THP-1*

Bei der humanen Zelllinie THP-1 handelt es sich um Zellen einer akuten Monocytenleukämie (AML-M5), welche die Eigenschaften und Marker von Monocyten aufweisen [220]. Diese Zellen können, beispielsweise durch Zugabe eines Phorbolesters oder Interferon (IFN)- $\gamma$  und Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , leicht zu einem Makrophagen-ähnlichen Phänotyp ausdifferenziert werden. Bei THP-1 handelt es sich um Zellen, welche als Suspensionskultur in RPMI 1640-Medium mit 10% FCS (v/v), 2 mM L-Glutamin und 1 mM Natrium-Pyruvat (Invitrogen) bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten werden.

Die Zellen haben eine Verdopplungszeit von 35 – 50 h. Folglich werden sie alle zwei bis drei Tage subkultiviert. Die Zellen werden bei einer Dichte von etwa  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml gehalten. Bei einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml befindet sich die Kultur in der Sättigung. Zur Subkultivierung werden die Zellen durch Pipettieren gemischt und in eine Kulturflasche mit der entsprechenden Menge vorgewärmten Mediums überführt. Es findet kein Medienwechsel statt, das Medium wird durch Volumenerhöhung teilweise erneuert.

#### *Kultivierung der Zelllinie CHO-K1*

Bei CHO-K<sub>1</sub>-Zellen handelt es sich um den Subklon einer epithelialen Zelllinie aus dem Ovar des Chinesischen Hamsters. Diese adhären Zellen weisen eine fibroblastoide Morphologie auf. Die Zellen werden in Ham's F12 Nutrient Mix, supplementiert mit 10 % FCS (v/v) und 2 mM L-Glutamin bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten. Die Zellen werden im subkonfluenten Zustand (80 - 90 % Konfluenz) mittels "Shake-off-Verfahren" unter Verwendung von Trypsin-EDTA (0,25%) subkultiviert. Der Medienwechsel erfolgt alle zwei bis drei Tage.

#### *Auftauen der Zellen*

Die Kryo-Ampulle mit etwa  $5 \times 10^6$  THP-1-Zellen wird bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wird in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Es werden tropfenweise 9 ml angewärmtes Medium zugegeben und vorsichtig gemischt. Es schließt sich eine fünfminütige Zentrifugation bei  $460 \times g$  und RT an. Der Überstand wird verworfen. Es werden 5 ml angewärmtes Medium zugegeben und die Zellen mit einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in eine kleine Zellkulturflasche (10 ml Arbeitsvolumen) überführt.

Der Inhalt einer Kryo-Ampulle mit etwa  $5 \times 10^6$  CHO-K<sub>1</sub>-Zellen wird zu 5 ml Medium gegeben und dieses in eine kleine Zellkulturflasche überführt.

### *Zellzahlbestimmung & Vitalfärbung*

Die Zellzahl wird mit Hilfe der Zählkammer nach Neubauer bestimmt. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wird eine Vitalfärbung mit Trypanblau durchgeführt. Trypanblau ist ein polyanionischer Azofarbstoff, welcher an Proteine bindet. Bei intakter Zellmembran kann der saure Farbstoff nicht in die Zelle eindringen. Lebende Zellen werden also im Gegensatz zu abgestorbenen Zellen nicht angefärbt. Maximal  $1 \times 10^5$  Zellen/ml in PBS werden mit einer 0,5 %igen Trypanblaulösung versetzt, so dass eine Arbeitskonzentration von 0,18 % Trypanblau erreicht wird. Nach sorgfältigem Mischen und einer zwei-minütigen Inkubation des Ansatzes bei 37 °C wird die Zellzahl gefärbter sowie ungefärbter Zellen umgehend in der Zählkammer bestimmt.

### *Kryokonservierung der Zellen*

Die Zellen werden in 70 % Kulturmedium, 20 % FCS und 10 % DMSO (v/v) mit einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml/Kryo-Ampulle in der Flüssigphase des Stickstoffs bei – 196 °C gelagert.

### *Differenzierung der Zelllinie THP-1*

Die Stimulierung der Zellen mit den Cytokinen IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  hat vielfältige physiologische Effekte, die zur Ausbildung des Makrophagen-Phänotyps führen. Die Stimulierung der Zellen wird in Anlehnung an das Protokoll von Chen *et al.* [40] durchgeführt.

Die Zellen werden 5 min bei 460  $\times$  g gesammelt, der Überstand wird verworfen. Das Zellpellet wird mit einer Zelldichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml in frisches Medium aufgenommen, dem Folgendes zugesetzt wurde:

- IFN- $\gamma$  (400 U/ml; Calbiochem)
- TNF- $\alpha$  (10 ng/ml; Invitrogen)

Der Kontrollansatz enthält lediglich das Haltungsmedium.

Die Zellen werden 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit unterschiedlichen Stimulanzen inkubiert (s. Kap. 2.2.9).

### *Transfektion der Zelllinie CHO-K1*

Durch Transfektion wird Fremd-DNA in ein eukaryotisches Expressionssystem eingebracht. Dies ermöglicht die Expression eines rekombinanten Proteins. Die DNA wird zuvor in einen entsprechenden Vektor kloniert, prokaryotisch vermehrt und isoliert.

In der vorliegenden Arbeit wurden CHO-K<sub>1</sub>-Zellen mit dem zuvor erzeugten msp-pcDNA<sub>3.1/V5-His-TOPO</sub> Vektor (wildtyp und mutant; vergl. 2.2.20) transfiziert. Zur Transfektion wurde das FuGENE HD Transfection Reagent der Firma Roche Diagnostics verwendet. Zur Feststellung der Cytotoxizität

des Reagenzes und der optimalen Reaktionsbedingungen wurden die Zellen zuvor mit Reportergenen transfiziert (gWIZ  $\beta$ -Galactosidase Mammalian Expression Vector und gWIZ GFP Mammalian Expression Vector; Genlantis Inc). Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Einzelne transfizierte Klone wurden durch Verdünnungsklonierung in Geneticin-haltigem Medium (G-418; 400  $\mu$ g/ml) erzeugt. Die korrekte Expression der rekombinanten msp-DNA wurde mittels PCR und Sequenzierung überprüft. Eine ausführliche Beschreibung dessen ist unter [62] zu finden.

#### *Expression des rekombinanten Proteins durch CHO-K1*

Das rekombinante MSP wird von den transfizierten Zellen synthetisiert und in den Kulturüberstand abgegeben. Dies macht die Gewinnung dieses Proteins sehr einfach.

Die FCS-Konzentration im Medium wurde über einen Zeitraum von mehreren Passagen auf 1 % reduziert, um störende Einflüsse auf die Proteinexpression durch das Serum zu vermeiden. Eine serumfreie Haltung der Zellen erwies sich nicht als förderlich. Der Zellkulturüberstand wird beim Mediumwechsel gesammelt. Der MSP-Gehalt wird mittels ELISA nach dem Protokoll des Herstellers bestimmt. Überstände gewünschter Konzentration werden sterilfiltriert, aliquotiert und bei - 20 °C gelagert.

#### *2.2.9 Inkubation von Zellen mit LDL oder MSP*

Zellen (THP-1-Monocyten, zu Makrophagen ausdifferenzierte Monocyten oder murine Peritonealmakrophagen) können mit oxLDL, eLDL oder MSP (Mutante bzw. Wildtyp) stimuliert werden um später beispielsweise veränderte Expressionsmuster oder Proliferationsraten detektieren zu können.

Nach der Bestimmung der Zellzahl werden die Zellen dreimal mit angewärmten PBS gewaschen. Die Zellen der Zelllinie werden in Normalmedium (RPMI 1640 ohne FCS) aufgenommen, die Zellzahl auf  $5 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Jeweils 0,5 - 2 ml der Zellsuspension wird in ein Well einer Nunclon-beschichteten Multi-Well-Platte (Nunc) gegeben. Das Medium der murinen Makrophagenkultur wird gewechselt. Es wird frisches Normalmedium (suppl. DMEM) zugegeben.

Daraufhin wird in jede Kavität oder Schale die entsprechend modifizierte Form LDL bzw. MSP zugegeben. Die Zellen werden über unterschiedliche Zeitspannen im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS, werden diese in der entsprechenden Menge Lysepuffer aufgenommen. Es schließt sich die RNA-Isolierung oder ein Western Blot an.

### 2.2.10 Analyse der Apoptose- und Proliferationsrate bei Zellen

Nach der Inkubation von Zellen mit verschiedenen Agenzien (Kap.2.2.9) wird die Proliferation bzw. Apoptoserate der Zellen mittels vorgefertigter Systeme untersucht.

**BESTIMMUNG DER APOPTOSERATE (CASPASEAKTIVITÄTS-BESTIMMUNG)**  
Im Rahmen der Apoptose werden unterschiedliche Cysteinproteasen (Caspasen) aktiviert. Die Überführung des Zymogens in seine aktive Form ist ein Indiz für den Zelltod. Die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 wird mit dem Caspase-Glo 3/7-Assay bestimmt. Die aktive Form spaltet ein Asparaginsäure enthaltendes Peptid von der inaktiven Luciferase ab. Nach diesem Vorgang emittiert das Substrat Lumineszenz, proportional zu seiner Menge, und damit proportional zur Menge der aktiven Caspasen. Die Chemolumineszenzbestimmung erfolgt im Fluoroskan. Die Bestimmung wird mit dem Caspase-Glo 3/7-Assay von Promega entsprechend dem Protokoll durchgeführt.

**BESTIMMUNG DER APOPTOSERATE (TUNEL-FÄRBUNG)** Die während der Apoptose auftretende DNA-Fragmentierung durch endogene Endonucleasen zu niedermolekularen Doppelsträngen oder der Einfachstrangbruch kann durch "TdT-mediated dUTP nick end labeling" (TUNEL) nachgewiesen werden. Die Terminale Deoxynucleotidyl-Transferase (TdT) katalysiert die Polymerisation von Fluorescein-konjugierten Nucleotiden mit freien 3'-OH DNA-Enden. Zellkerne mit DNA-Strangbrüchen lassen sich bei einer Wellenlänge von 450 - 500 nm unter dem Fluoreszenzmikroskop detektieren.

Adhärente Zellen werden auf 8-Well Lab-Tek Chamber Slides (Nunc GmbH Co. KG, Langenselbold) gezogen. Alternativ wird aus Suspensionszellen ein Dünnschichtpräparat (Kap.2.2.5) hergestellt. Die Färbung erfolgt mit dem In Situ Cell Death Detection Kit von Roche Applied Science entsprechend dem Protokoll.

**BESTIMMUNG DER PROLIFERATIONSRATE** Das Pyrimidin-Analogon 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) wird im Verlauf der Zellproliferation anstelle des Thymidins in neu synthetisierte DNA eingebaut. Nach Denaturierung der DNA wird das BrdU über einen Peroxidase-konjugierten Antikörper nachgewiesen. Der Peroxidase-katalysierte Substratumsatz erzeugt ein Chemolumineszenzsignal, welches im Luminometer ausgewertet werden kann.

Die differenzierten THP-1-Zellen werden in weißen 96-Well Zellkulturplatten (Nunc GmbH Co. KG, Langenselbold) in serumfreiem Medium gehalten. Es werden unterschiedliche Konzentrationen an MSP (CHO-K1-Überstände) zugegeben. Die Chemolumineszenzbestimmung erfolgt im Fluoroskan. Es wird das Cell Proliferation ELISA BrdU Kit der Firma Roche Applied Science verwendet, und entsprechend dem beigefügten Protokoll verfahren.

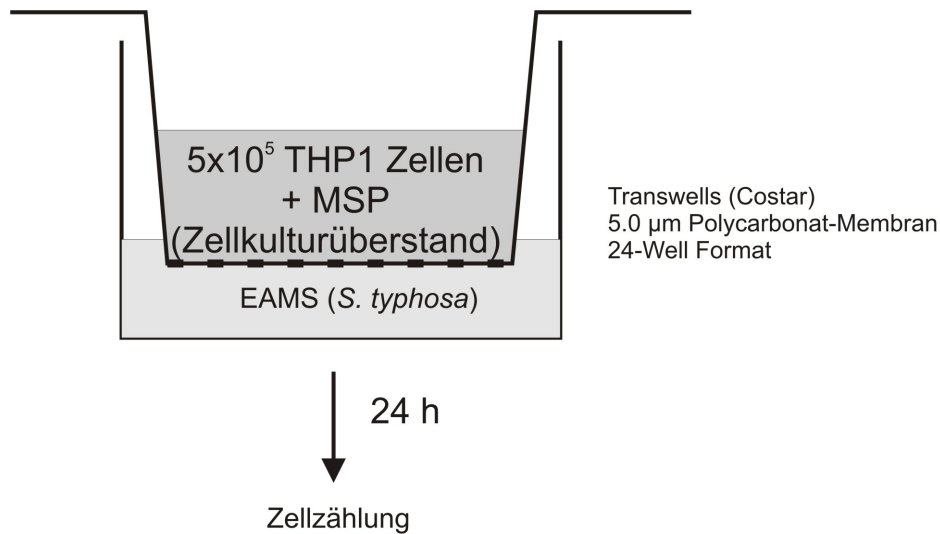


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Boyden Kammer. In der oberen Kammer befinden sich Zellen und Stimulanz, in der unteren Kammer das Chemoattractant. Die Anzahl der durch das Transwell migrierten Zellen wird nach Ablauf von 24 h bestimmt.

#### 2.2.11 Bestimmung der Migrationsrate bei Zellen

Mit dem Migrationsassay soll der Einfluss von MSP auf das Migrationsverhalten von Makrophagen untersucht werden. Dies geschieht in einer sog. Boyden Kammer, bestehend aus unterem und oberem Kompartiment, getrennt durch eine poredurchsetzte Membran (s. Abb 6). Die Zellen migrieren in Richtung eines chemotaktischen Reizes durch die Membran. Diese Zellzahl wird bestimmt.

Am Vortag des Versuches wird eine entsprechende Anzahl Transwell-Einsätze mit RPMI 1640-Medium vorinkubiert. Das untere Kompartiment enthält 500 µl, das obere Kompartiment 200 µl Medium. Die Inkubationsdauer beträgt 24 h.

Nach Ablauf der Präinkubation wird 10 µl/ml endotoxinaktiviertes Mausserum (EAMS; LPS von *S. typhosa*, 10 µg/ml in Mausserum) in 500 µl THP-1-Medium in eine 24 Well-Platte gegeben. Dies entspricht dem unteren Kompartiment der Boyden Kammer. Jedes Well wird mit einem Transwell-Einsatz (Porengröße 5 µm) bestückt. In das obere Kammerkompartiment werden  $5 \times 10^5$  zu Makrophagen ausdifferenzierte THP-1-Zellen in 50 µl Medium (ohne Zusätze) gegeben. Diesen wird eukaryotisch exprimiertes MSP (wildtyp und mutant) in unterschiedliche Konzentration zugegeben. Das Endvolumen beträgt 100 µl. Nach einer 24-stündigen Inkubation wird die Zahl der durch das Transwell migrierten Zellen durch Zählung in der Neubauer-Kammer oder durch ATP-Messung bestimmt.

### 2.2.12 Kokultur

Um den Einfluss apoptotischer Zellen auf Makrophagen und deren Lactadherin-Expression zu untersuchen wird mit Kokultur zweier Zellen gearbeitet. Apoptotische CHO-K1-Zellen werden zusammen mit THP-1-Zellen inkubiert und die Expressionsmuster detektiert. Die Apoptoseinduktion der CHO-K1-Zellen erfolgt in Anlehnung an das Protokoll von Huynh-Delerme *et al.* [102]. Bei der Real-time-detection PCR ist es nicht möglich, die konservierte 18S rRNA des Hamsters (CHO-K1) von der humanen (THP-1) zu unterscheiden. Da die 18S rRNA aber als Haushaltsgen eingesetzt werden sollte, werden die Zellen räumlich getrennt in den unterschiedlichen Kompartimenten einer Boyden-Kammer gehalten.

CHO-K1-Zellen werden mit einer Konfluenz von 50 % in suppl. F12 in das obere Kompartiment einer Boyden-Kammer (Transwell-Einsatz) ausgesät. Am Folgetag haben die Zellen eine Konfluenz von etwa 80 % erreicht, mit 60 nM Okadeinsäure (Calbiochem / Merck Biosciences GmbH, Schwalbach) über einen Zeitraum von 24 h wird bei diesen Zellen Apoptose induziert. Der Erfolg der Apoptoseinduktion wird mit dem TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)-Kit (s. Kap. 2.2.10) nachgewiesen.

Jeweils  $2,5 \times 10^5$  THP-1-Monocyten oder zu Makrophagen ausdifferenzierte Monocyten in 500  $\mu$ l suppl. RPMI 1640 werden in die Kavitäten einer 24 Well-Platte gegeben. Das Okadeinsäure-haltige Medium der CHO-K1-Zellen in den Transwell-Einsätzen wird entfernt, die Einsätze in die Wells mit THP-1-Zellen umgesetzt. Anstelle des F12-Mediums werden 200  $\mu$ l suppl. RPMI 1640 in das obere Kompartiment der Boyden-Kammer gegeben. Beide Zelllinien werden 24 h im Brutschrank kokultiviert. Es schließt sich die im folgenden Kapitel beschriebene Zelllyse an.

### 2.2.13 Gewinnung von Zelllysate

Die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen und unter Zugabe des Lyse-Puffers (RLT des RNeasy Mini Kits) mit einem Zellschaber von der Schale gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Zelllysate wird erst mittels Vortex und dann mit Hilfe einer Injektionsspritze und einer Injektionskanüle (26 G) aufgeschlossen. Die lysierten Zellen werden bis zur RNA-Isolierung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Zur Gewinnung von Zelllysate zur Analyse im Western Blot wird Zelllysepuffer, versetzt mit Protease Inhibitor Cocktail (10  $\mu$ l/ml; Sigma), auf die Zellen gegeben. Es werden 100  $\mu$ l Lysepuffer je  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Der Ablauf der Lyse entspricht der für die RNA-Gewinnung.

### 2.2.14 RNA-Isolation

Die RNA aus dem gewonnenen Gewebe oder den abgeernteten Zellen wird mit den RNeasy Kits von Qiagen isoliert. RNA, mit einer Länge von über 200 bp, bindet unter Hochsalzbedingungen an eine auf Silicagel basierende

Membran, während Kontaminanten ausgewaschen werden können. Zuvor sind Gewebe oder Zellen unter Anwesenheit eines stark denaturierenden Puffers (RLT-Puffer, enthält Guanidinisothiocyanat (GITC)) homogenisiert und lysiert worden. GITC inaktiviert RNasen, um die Isolation intakter RNA zu ermöglichen. Die Isolation von RNA-Molekülen größer 200 bp führt zur verstärkten Isolation von mRNA, während rRNA und tRNA, die meist (tRNA) oder zum Teil (rRNA) kleiner als 200 bp sind, bei entsprechender Molekülgröße nicht an die Silicamembran binden und somit ausgewaschen werden.

Die Gewebe werden ausgewogen und nach Zugabe der entsprechenden Menge RLT-Puffer mit einem Rotor-Stator-Homogenisierer (MICCRA D-1) zerkleinert. Auch zu den Zellen wird, entsprechend ihrer Anzahl, RLT-Puffer zugegeben. Diese Zellsuspension wird zuerst mittels Vortex gemischt und anschließend mit einer Insulinspritze und einer Kanüle der Größe 26 G homogenisiert. Bei den weiteren Isolierungsschritten wird nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Die Zentrifugationsdauer wird der Leistung der Zentrifuge angepasst.

Genomische DNA wird durch Zugabe von DNase I entweder während der Isolierung (DNase I, Qiagen) oder im Anschluss an diese (DNA free, Ambion) nach Herstellerprotokoll entfernt. Die isolierte RNA wird bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### 2.2.15 *Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration*

Der Gehalt von DNA und RNA kann mit dem UV/VIS-Spektralphotometer NanoDrop ND 1000 (Nanodrop Technologies Inc.) bestimmt werden. Da die Probe durch die Oberflächenspannung in Position gehalten wird, ist keine Küvette notwendig. Es kann im  $\mu\text{l}$ -Bereich gearbeitet werden.

2  $\mu\text{l}$  von Leerwert oder Probe werden direkt auf die gereinigte Faseroptik pipettiert. Das System wird geschlossen, die Messung kann über den PC kontrolliert und aufgezeichnet werden. Es wird die Software NanoDrop ND-1000 3.3 verwendet.

#### 2.2.16 *Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA*

Zur Amplifikation von DNA mit Hilfe der PCR wird an der einzelsträngigen RNA mittels einer reversen Transkriptase eine zur RNA komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Diese cDNA dient bei der PCR als Matrize. Die Reverse Transkription wird mit dem SuperScript III Reverse Transkriptase-Kit sowie dem oligo(dT)<sub>12-18</sub>Primer von Invitrogen durchgeführt. Der oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primer ist eine Abfolge von 12 - 18 dTs, der sich an den Poly(A)-Schwanz eukaryotischer mRNA anlagert. Entsprechend steht der oligo(dT)Primer nur für die Reverse Transkription zur Verfügung.



Die maximale Menge an einsetzbarer RNA beträgt 5 µg bzw. 12 µl. Liegt die DNA-Konzentration über 5 µg/12µl, so wird die RNA entsprechend mit Wasser verdünnt. Es wird nach dem Protokoll des Herstellers verfahren.

Die Ansätze werden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.17 PCR-Techniken

##### *Polymerase-Kettenreaktion, prinzipiell*

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) dient der selektiven Vermehrung eines DNA-Abschnitts in einem komplexen DNA-Gemisch.

Die PCR-Ansätze werden entsprechend dem Protokoll des Herstellers zusammengestellt. Grundlegende Bestandteile sind:

- DNA-Template mit dem zu amplifizierenden Bereich,
- Primer, die die Flanken des Bereichs markieren,
- DNA-Polymerase um den Bereich zu vervielfältigen,
- Desoxynukleotide (dNTPs) zur Verlängerung des synthetisierten DNA-Strangs,
- Mg<sup>2+</sup> zur Stabilisierung der DNA wie auch der alpha-Phosphatgruppe der dNTPs (gegebenenfalls bereits im Puffer enthalten).

Die Ansätze werden gemischt und anzentrifugiert. Das Programm des Thermo-Cyclers wird den jeweiligen Gegebenheiten angepasst.

**PCR-AMPLIFIKATION** Die Ansätze für die PCR-Amplifikation werden wie folgt zusammenpipettiert:

- 20 - 200 ng cDNA oder Plasmid-DNA
- 1 µl dNTPs (Ausgangskonzentration jeweils 10 mM)
- 2 µl Primer upstream (5 - 10 pmol/µl)
- 2 µl Primer downstream (5 - 10 pmol/µl)
- 10 x Puffer (entsprechend der verwendeten Polymerase)
- Polymerase (*Taq*: 1U, *Pfu*: 1,25U)
- ggf. 5 x Q-Solution (Qiagen)
- H<sub>2</sub>O (PCR grade) ad 50 µl

Die Wahl der Polymerase ist abhängig von der weiteren Verwendung des PCR-Produkts. Für Standardanwendungen wird mit der *Taq*-Polymerase gearbeitet. Um ein fehlerfreies Amplikon zu erzeugen wird eine "Proofreading-Polymerase" wie die *Pfu* verwendet. Die Q-Solution, deren Zusammensetzung von Qiagen nicht bekannt gegeben wird, soll suboptimale PCR-Systeme mit GC-reichen Templates oder solche mit einem hohen Grad an Sekundärstrukturen verbessern. Da dieser Effekt nicht bei allen Systemen zu verzeichnen ist, wird das Additiv nur bei ausgewählten PCR-Reaktionen verwendet.

Die Zyklenzahl ist abhängig von der gewünschten Menge an PCR-Produkt. Bei einer hohen Zyklenzahl entsteht eine große Menge Produkt, das allerdings eine asymmetrische Verteilung der Menge an sense- und antisense-Strängen aufweist. Eine niedrigere Zyklenzahl führt meist zu einem ausgewogeneren Verhältnis. Die tatsächliche Zyklenzahl (Denaturierung, Annealing, Elongation) liegt zwischen 30 und 36 Zyklen. Die Annealingtemperatur richtet sich nach dem Temperaturoptimum des Primers.

Parameter der Polymerase-Kettenreaktion:

- Einmalige Denaturierung bei 96 °C für 5 min
- Denaturierung bei 96 °C für 45 s
- Annealing bei unterschiedlichen Temperaturen für 55 s
- Elongation bei 72 °C für 1 min
- Terminale Elongation bei 72 °C für 10 min

**Primer und Polymerase** Die Amplifikationsprimer wurden von Invitrogen bezogen. Bei der Polymerase handelt es sich um die *Taq*-Polymerase (5U/μl) von Qiagen (Hilden) bzw. um die *Pfu*-Polymerase (3U/μl) (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot). In Kapitel 2.1.9 sind die optimalen PCR-Parameter sowie die Primer-Sequenzen aufgelistet.

**CYCLE-SEQUENCING** Die Sequenzierreaktion erfolgt nach der Cycle Sequencing-Methode. Die Sequenzierungsprodukte werden durch den Einbau fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide (ddNTPs) markiert. Die ddNTPs liegen im Verhältnis 1:200 gegenüber den dNTPs vor. Die Polymerase diskriminiert nur gering zwischen beiden Nukleotidtypen. Dies führt zur Synthese relativer kurzer, basenspezifischer DNA-Fragmente, da die Kondensation des 3'-Hydroxyendes des DNA-Strangs mit der 5'-Triphosphatgruppe des Terminators (ddNTP) zum Syntheseabbruch führt. Eine Verlängerung des Strangs ist nicht mehr möglich, da keine freie 3'-Hydroxygruppe zur Verfügung steht. Länge des Fragments und Terminortyp können elektrophoretisch bestimmt werden. Die Zugabe einer Pyrophosphatase zum Reaktionsansatz wirkt der Pyrophosphorolyse entgegen. Bei der polymerasekatalysierten DNA-Synthese handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion. Das Reaktionsgleichgewicht ist zur Seite der Kondensationsprodukte verschoben. Dennoch kann es mit

zunehmender Reaktionsdauer zum Abbau von endständigen Didesoxynukleotiden kommen (Pyrophosphorolyse). Die Entfernung von Pyrophosphat aus dem Reaktionsgleichgewicht, z.B. durch eine Pyrophosphatase, führt zu einer fast vollständigen Unterdrückung der Rückreaktion.

Ansätze werden folgendermaßen zusammenpipettiert:

- 700 ng PCR-Produkt oder Plasmid
- 1 µl Primer (5 - 10 pmol/µl)
- 4 µl GenomeLab DTCS Quick Start Mix (Beckman Coulter)
- H<sub>2</sub>O (PCR grade) ad 10 µl

Der GenomeLab DTCS Quick Start Mix enthält dNTPs, ddNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Tris-Cl, Polymerase sowie Pyrophosphatase.

Das "Cycle Sequencing"-Programm besteht aus 30 Zyklen:

- Denaturierung bei 96 °C für 20 s
- Annealing bei 50 °C für 20 s
- Elongation bei 60 °C für 4 min

**Primer und Polymerase** Die Sequenzierprimer

- M13.for
- M13.rev
- T7.for
- T7-Terminator.rev

wurden von Invitrogen bezogen. Die Thermo Sequenase DNA Polymerase ist im GenomeLab DTCS Quick Start Mix enthalten.

*Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (RTD-PCR)*

Die Real-time-detection PCR (RTD-PCR) ist ein empfindliches Verfahren, das die Amplifikation und Quantifizierung einer Nukleinsäuresequenz in Echtzeit ermöglicht.

Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional zur Menge des PCR-Produkts zu. Die Quantifizierung kann nur zu Beginn der exponentiellen Phase der Polymerase-Kettenreaktion erfolgen. Bei der RTD-PCR werden verschiedene fluoreszenzbasierte Methoden eingesetzt, z.B. die Quantifizierung mittels Hybridisierungs- (FRET) oder Hydrolyse-Sonden (TaqMan). In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff SYBR Green I gearbeitet. SYBR Green I lagert sich, wie auch Ethidiumbromid, in Doppelstrang-DNA ein, und emittiert

darauflin ein Fluoreszenz-Signal einer definierten Wellenlänge ( $\lambda = 521 \text{ nm}$ ). Die Zunahme des Amplikons korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Die Messung findet am Ende der Elongation eines jeden Zyklus statt. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist allerdings die geringe Spezifität, da nicht zwischen der Fluoreszenz von PCR-Produkten, unspezifischen Produkten oder Primer-Dimeren unterschieden werden kann. Dieser Nachteil kann durch eine Schmelzkurvenanalyse im Anschluss an die PCR ausgeglichen werden. Anhand des typischen Schmelzverhaltens eines PCR-Produkts können Fragmentlängen und dadurch die Spezifität der PCR bestimmt werden. Weiterhin können die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen, und eine Elektrophorese durchgeführt werden. Auch am Bandenmuster ist die Spezifität des PCR-Produkts zu erkennen.

Im Folgenden wird eine two-step RTD-PCR durchgeführt. Die RNA wird zunächst revers zu cDNA transkribiert; ein Aliquot dieser Reaktion wird im Anschluss für die Echtzeit-PCR eingesetzt. Aus einer Reversen Transkription können verschiedene Transkripte analysiert und verglichen werden. Die one-step RTD-PCR hingegen vereint die Reverse Transkription und die Amplifikation in einem Ansatz.

Die Gen-Expressionsstärke wird durch relative Quantifizierung bestimmt. Nicht die absolute Anzahl der Kopien bzw. die Konzentration wird angegeben, wie bei der absoluten Quantifizierung, sondern ein Verhältnis zwischen dem Zielgen und einem Referenzgen. Dieses Verhältnis verschiedener Proben kann verglichen werden. Als Referenz- oder Haushaltsgen werden Gene verwendet, deren Expression unter den unterschiedlichsten physiologischen Bedingungen annähernd konstant bleibt. Häufig verwendete Haushaltsgene sind 18S rRNA, Histon 3.3a oder  $\beta$ -Actin.

Maßgeblich für die Quantifizierung ist der  $C_T$ -Wert (Threshold Cycle). Der  $C_T$ -Wert entspricht dem Zyklus, während dem die Fluoreszenz deutlich über die des Hintergrunds ansteigt (s. Fig. 7). Dieser Zyklus steht zu Beginn der exponentiellen Phase. Der Vergleich der  $C_T$ -Werte von Ziel- und Haushaltsgen ermöglicht die Berechnung der realtiven Quantität.

Um Fehler durch unterschiedliche Amplifikationseffizienzen, hervorgerufen z.B. durch Unterschiede im Primerannealing, dem GC-Gehalt der zu amplifizierenden Sequenzen oder der Produktgröße, zu kompensieren, wird die Amplifikationseffizienz zuvor bestimmt. Zu diesem Zweck werden Standardkurven für alle Gene erstellt: Die  $C_T$ -Werte der Verdünnungsreihe (Dreifachbestimmung von fünf Verdünnungsstufen mit sämtlichen Primern) einer Referenz-cDNA wird logarithmisch gegen deren Konzentration aufgetragen. Aus der Steigung der Kurve wird rechnerisch die Effizienz ermittelt. Diese fließt in den Algorithmus zur Bestimmung der relativen Quantität mit ein.

Die Echtzeit-PCR wird mit dem QuantiTect SYBR Green PCR-Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt. Während jeden Laufs werden eine Negativkontrolle (Wasser statt cDNA; zum Ausschluss von Verunreinigungen) und eine RNA-Kontrolle (RNA statt cDNA; zur Kontrolle

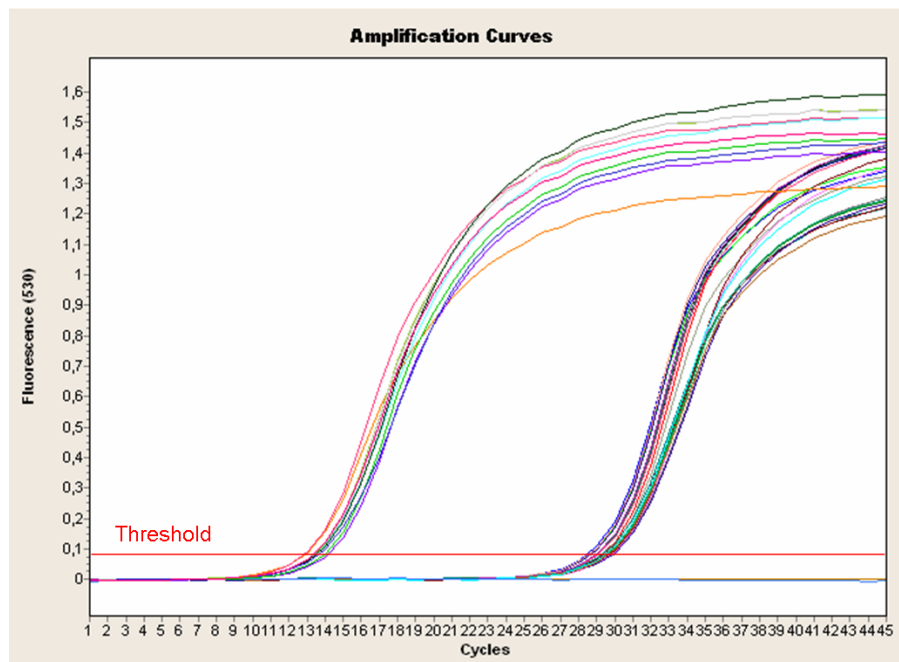


Abbildung 7:  $C_T$ -Wert: Am Threshold (rot) steigt die Fluoreszenz des Produkts deutlich über die des Hintergrundes an. Der Zyklus an dem dies stattfindet ist Grundlage für die Berechnung des relativen Verhältnisses.

der Amplifikation genomischer DNA) mitgeführt. Die Sequenzen der Primer und deren Annealingtemperaturen sind Kap. 2.1.9 zu entnehmen

Folgender Ansatz wird in das Reservoir der gekühlten Glaskapillaren gegeben:

- 2  $\mu$ l cDNA (ca. 15 ng)
- 2  $\mu$ l Primer upstream (5 - 10 pmol/ $\mu$ l)
- 2  $\mu$ l Primer downstream (5 - 10 pmol/ $\mu$ l)
- 10  $\mu$ l 2 x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix
- 4  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O

Der Mastermix setzt sich aus HotStarTaq DNA Polymerase, SYBR Green I, einem passiven Referenzfarbstoff (ROX) und einem KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sowie MgCl<sub>2</sub> enthaltenden Puffer (QuantiTect Sybr Green PCR Buffer) zusammen.

Nach einer 30-sekündigen Zentrifugation der verschlossenen Kapillaren bei 735 x g werden diese in das Karussell des LightCyclers 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) eingesetzt und das Gerät gestartet. Die Amplifikation und Fluoreszenzmessung erfolgt unter folgenden Konditionen:

Die Kontrolle und Auswertung des Laufs erfolgt mit der LightCycler Software 4.05 (Roche Diagnostics). Jede Probe wurde als Duplikat in zwei bis drei Läufen analysiert.

Programmname	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Temperaturänderung [°C/s]	Fluoreszenzaufzeichnung	Anzahl Zyklen
Denaturierung	95	900	20	keine	1
Amplifikation	95	15	20	keine	45
	50 - 58	30	20	keine	
	72	20	20	einmalig	
Extension	72	300	20	keine	1
Schmelzkurve	95	10	20	keine	1
	60	60	20	keine	
	95	0	0,1	kontinuierlich	
Kühlung	40	30	20	keine	1

Tabelle 5: Konditionen der RTD-PCR

### 2.2.18 Nukleinsäure-Gelelektrophorese

#### DNA-Gelelektrophorese

DNA-Moleküle bewegen sich aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld zur Anode und werden in einer Agarosematrix nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgt in horizontalen Agarosegelen, die mit 0,03 µg Ethidiumbromid (EtBr) pro ml Gel versetzt wurden. Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basenpaaren des DNA-Doppelstranges. Auf diese Weise wird das DNA-Molekül im UV-Licht (Wellenlänge  $\lambda = 254$  nm) sichtbar. Die Größenordnung der einzelnen Banden ermöglicht ein zusätzlich aufgetragener Marker (DNA Molecular Weight Marker, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

Die Agarose wird durch Aufkochen in 1 x TAE-Puffer gelöst. Die Agarosekonzentration liegt, je nach Größe der aufzutrennenden DNA bei 0,5 bis 2,5 %. Das Gel wird nach kurzem Abkühlen mit Ethidiumbromid versetzt und in einen abgedichteten, mit Probenkamm versehenen Gelschlitten gegossen. Der Gelschlitten wird mit dem auspolymerisierten Agarosegel in eine Gelkammer (Wide Mini-Sub Cell GT) gelegt und mit 1 x Puffer bedeckt. Anschließend wird der Probenkamm entfernt und die mit Ladepuffer versetzten Proben sowie der Marker in die Taschen pipettiert. Das Gel läuft bei konstanter Spannung von 10 V/cm<sup>2</sup> (Biorad Power Pac 300). Hat die Front des Probenpuffers das untere Drittel des Gels erreicht, wird die Elektrophorese beendet.

Unter dem UV-Transilluminator (Gel Doc 1000) werden die Gele ausgewertet. Sie können zudem photographisch festgehalten werden und am PC bearbeitet werden (Quantity One 4.5).

#### Kapillarelektrophorese - Sequenzierung

Die Sequenz der zuvor in der PCR amplifizierten Fragmente wird mittels Kapillarelektrophorese ermittelt.

Das Prinzip des Cycle Sequencing basiert auf der enzymatischen Didesoxymethode nach Sanger *et al.* [191]. Im Gegensatz zur Flachbett-Gelelektrophorese wird die Kapillarelektrophorese in Kapillaren aus amorphem Quarz mit einem Innendurchmesser von 75 µm durchgeführt. Das Trennmedium ist ein Polymer. Die Trennung findet bei einer elektrischen Feldstärke von mehreren Hundert V/cm statt, die Stromstärke ist auf Grund des kleinen Innendurchmessers der Kapillaren aber gering (im Bereich von 100 µA). Die Detektion der Probe erfolgt mit Hilfe der Fluoreszenzmessung am Detektionsfenster. Eine CCD (charge coupled device)-Kamera nimmt die Daten auf. Die DNA-Fragmente werden in der Kapillarelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und detektiert. Die Sequenz kann aus der Fragmentanalyse berechnet werden. Die Editierung der Sequenz erfolgt durch den CodonCode Aligner 1.6.3. (CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA).

**VORBEREITUNG** Nach dem "Cycle-Sequencing" werden die Ansätze über Säulen aufgereinigt. Nicht verbrauchte ddNTPs, die die Sequenzierungsergebnisse verfälschen könnten, werden aus dem Ansatz entfernt. Das Prinzip der Gelfiltration ist bei Sambrook *et al.* [190] beschrieben. Die Terminatoren werden mit dem CentriSep-System (Princeton Separation) entfernt. Es wird nach der Angabe des Herstellers verfahren. Die aufgereinigte Probe wird in 35 µl SLS (Sample Loading Solution) aufgenommen und kann für die Sequenzierung eingesetzt werden.

#### *Elektrophorese von RNA im Glyoxalgel*

Auch Ribonukleinsäuren lassen sich aufgrund ihrer Eigenladung und Größe im elektrischen Feld auftrennen. Bei der Elektrophorese von RNA sind zwei Dinge von Bedeutung: Eine hohe Trennschärfe sowie die Vermeidung der RNA-Degradation durch RNasen. Diese Bedingungen erfüllt das Glyoxalgel-Gel [147, 38]. Dieses ist dem Formaldehyd-Gel vorzuziehen, da die Trennschärfe besser ist und die Reagenzien weniger toxisch sind [150].

#### **MATERIAL:**

- 40% Glyoxal: 40%ige Glyoxallösung wird durch Filtration durch Ionenaustauscher-Material (BioRad RG 501-XG) so lange deionisiert, bis ein pH-Wert über 5,0 erreicht ist. Deionisiertes Glyoxal wird in 56 µl Aliquots bei -80 °C gelagert.
- Dimethylsulfoxid (DMSO, Apotheke der Universitätsmedizin Mainz)
- 0,5 M Natriumphosphat-Stammlösung: 0,5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> werden 1:1 gemischt.
- Glyoxalmix:
  - 56 µl 40% deionisiertes Glyoxal
  - 200 µl DMSO
  - 8 µl 10% SDS
  - 8 µl 0,5 M Natriumphosphat-Stammlösung
- 10 mM Natriumphosphat-Puffer (aus 0,5 M Natriumphosphat-Stammlösung)
- RNA-Leiter (RiboRuler RNA Ladder High Range, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)
- 2 x RNA Loading Dye (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)
- 0,1 M NaOH
- 0,2 M Natriumacetat-Lösung, pH 5,2: 0,2 M Natriumacetat wird unter Kontrolle des pH-Wertes so lange 0,2 M Essigsäure hinzugefügt, bis ein pH-Wert von 5,2 erreicht ist.



- Ethidiumbromid-Stammlösung (500 µg/ml)

Die RNA wird mit Glyoxal und DMSO denaturiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen und eine Degradation durch RNase A zu verhindern. Die RNA (1 bis 30 µg Gesamt-RNA oder 0,5 bis 10 µg Poly(A)+-RNA in einem Volumen von 5 µl wird mit 10,8 µl Glyoxalmix vermischt und 1 h bei 50 °C inkubiert. Als Molekulargewichtsstandard werden 1 bis 3 µl RNA-Leiter mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O auf 5 µl aufgefüllt und wie die übrigen Proben behandelt.

Zur Überprüfung der RNA-Qualität wird ein 1%iges (RNA < 1 kb) bis 1,4%iges (RNA > 1 kb) Gel gegossen (50 ml). Als Puffer wird Natriumphosphatpuffer (10 mM) verwendet. Zu den glyoxalisierten Proben wird Ladepuffer hinzugegeben und diese Präparation in die Taschen des Gels pipettiert. Der Gellauf findet in einer RNase-freien Elektrophorese-Kammer (Wide Mini-Sub Cell GT) über 1 h bei 70 V in 10 mM Natriumphosphatpuffer statt. Sind die Proben in das Gel eingelaufen, wird der Puffer mit einem Magnetrührer während des Gellaufs stetig umgewälzt.

Die Deglyoxalisierung des Gels erfolgt durch 15-minütige Inkubation mit 0,1 M NaOH. Im Anschluss wird das Gel durch zweimalige 15 min Inkubation mit Natriumacetat, pH 5,2 angesäuert um das Interagieren des Ethidiumbromids mit der RNA zu verbessern. Die Färbung des Gels erfolgt 15 min in EtBr-Lösung, das Entfärben 15 min in ddH<sub>2</sub>O. Unter dem UV-Transilluminator (Gel Doc 1000) werden die Gele ausgewertet.

### 2.2.19 *Aufreinigung von PCR-Produkten*

#### *Aufreinigung von PCR-Produkten über Silicamembranen*

Zur Aufreinigung von PCR Produkten oder DNA aus anderen enzymatischen Reaktionen (z.B. Linearisierung mit Restriktionsendonukleasen) wird das QIAquick PCR Purification Kit verwendet.

Das Prinzip der Auftrennung basiert auf den selektiven Bindeeigenschaften der Silicamembran der Säule. DNA bindet unter Hochsalzbedingungen an die Membran [89], während Kontaminanten die Säule passieren. Die Elution der gewaschenen DNA erfolgt mit Wasser oder salzhaltigem Puffer. Die Aufreinigung erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers.

#### *Aufreinigung von PCR-Produkten über Glasmilch*

Um die Wahrscheinlichkeit, das gewünschte PCR-Produkt zu klonieren, zu maximieren, können die PCR-Produkte vor der Klonierung mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (s. Kap. 2.2.18) und als einzelne Bande isoliert werden. Diese enthält nur PCR-Produkte einer Größe. Eine weitere Anwendung ist die Aufreinigung restringierter DNA. Für die Bandenisolierung aus TAE-Gelen wird das GeneClean II-Kit der Firma Qbiogene Inc. verwendet. DNA bindet in Anwesenheit hoher Konzentrationen eines chaotropen Salzes (hier NaI) an Kieselsäure. Das chaotrope Salz zerstört die Hydrathülle der Silica-Matrix und ermöglicht so die Ausbildung einer Kationenbrücke zwischen

der Kieselsäure und dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der DNA. Eine Erniedrigung der Salzkonzentration ermöglicht die Rehydratisierung der Silica-Matrix und somit ein Lösen der DNA. Ist die DNA reversibel an die Matrix gebunden, können vor der Elution Kontaminanten ausgewaschen werden. Die Aufreinigung erfolgt nach den Anweisungen des Herstellers.

#### 2.2.20 Klonierung und Transformation

##### *Bakterienkulturen*

**PLATTENKULTUR** Die Bakterien werden mittels eines hitzesterilisierten Drigalski-Spatels auf einer Agarplatte ausgestrichen, und anschließend bei 37 °C 16 h inkubiert. Die Platten wurden zuvor mit einem geeigneten Antibiotikum, bei Blau/Weiß-Selektion zusätzlich mit X-Gal und IPTG, versetzt. Zur Lagerung bei 4 °C werden die Platten mit Parafilm luftdicht verpackt.

**FLÜSSIGKULTUR** Mittels einer sterilen, ungestopften Pipettenspitze wird eine Bakterienkolonie von einer Plattenkultur gepickt und in 3 ml LB-Medium, welches mit entsprechendem Antibiotikum versetzt wurde, überführt. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C und 250 rpm über Nacht im Schüttelinkubator.

**GLYCERINKULTUR** 1,5 Volumen einer Flüssigkultur in der frühen Sättigungsphase ( $OD_{600nm}$ : ~ 0,8) und 1 Volumen steriles Glycerin werden durch Pipettieren gründlich gemischt und bei -80 °C tiefgefroren.

**VORKULTUR** Von einer Glycerinkultur wird mit einer hitzesterilisierten Impföse ein Teil abgenommen und in 3 ml LB-Medium überführt, das zuvor mit einem geeigneten Antibiotikum versetzt wurde. Die Kultur wird über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert.

**HAUPTKULTUR** Zu einem Volumen LB-Medium versetzt mit Antibiotikum wird 1/1000 Volumen einer Vorkultur gegeben. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C und 80 rpm über Nacht im Schüttelinkubator.

##### *TOPO-Klonierung*

Bei der Klonierung werden DNA-Abschnitte in einen Klonierungsvektor eingebaut (Ligation), der in Wirtszellen überführt (transformiert) und vermehrt wird. Diese Methode ermöglicht es, eine große Anzahl an Insertkopien zu erhalten, da die Wirtsbakterien eine hohe Replikationsgeschwindigkeit besitzen. Im Gegensatz zur PCR, die auch die Möglichkeit der DNA-Amplifikation bietet, ist es bei der Klonierung möglich DNA-Fragmente in fehlerfreier und reiner Form zu erhalten.

Nach erfolgter Transformation und Amplifikation kann das Insert wieder aus dem Vektor herausgeschnitten werden. Der Erfolg der Klonierung kann mittels Gelelektrophorese überprüft werden. Es wird sich der schnellen

TOPO Klonierung bedient. Bei diesem Verfahren wird nicht -wie üblich- Ligase zugegeben. Die Ligation erfolgt mit Hilfe einer Topoisomerase I. Bei dieser Variante der Klonierung ist ein überhängendes Desoxyadenosin am PCR-Produkt erforderlich, welches zum Thymidin-Überhang des Vektors komplementär ist (*Taq*-Polymerase- oder mit *Taq/Pfu*-Gemisch amplifiziert). Für die Klonierung wird das TOPO TA Cloning Kit verwendet. Bei dem Vektor handelt es sich um den pCR2.1- oder pCR3.1/V5-TOPO Vektor. Die Klonierung wird nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Der Klonierungsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

- 0,5 - 4 µl PCR-Produkt
- 1 µl Salt Solution
- 1 µl TOPO-Vektor
- steriles H<sub>2</sub>O ad 6 µl

Das Volumen des eingesetzten PCR-Produkts richtet sich nach dem DNA-Gehalt/µl. Dieser wird auf einem Agarosegel densitometrisch abgeschätzt. Vor der Klonierung wird das PCR-Produkt aufgereinigt (s. Kapitel 2.2.19).

#### *Klonierung mit Ligase*

Zur Ligation eines Inserts mit einem durch Restriktionsendonukleasen geschnittenen Vektor (pET30a-c; Vektor zur Expression His Tag-fusionierter Proteine) mit Sticky-ends wird das Rapid DNA Ligation Kit verwendet. Es können max. 200 ng DNA eingesetzt werden; das Insert sollte in einer dreifach höheren Konzentration als der Vektor vorliegen. Diese Methode wird verwendet um das Insert in einen Vektor ohne T-Überhang zu klonieren (keine TOPO-Klonierung möglich) bzw. Inserts umzuklonieren. Das Insert wird restringiert, um zum Vektor komplementäre Sticky-ends zu erzeugen. Die durch die in Kapitel 2.1.9 dargestellten Primer erzeugten Fragmente besitzen im Bereich des forward-Primers eine Schnittstelle für *Bam*HI, im Bereich des reverse-Primers eine Schnittstelle für *Xho*I. Der Vektor wird an seiner multiple cloning site mit den gleichen Enzymen geschnitten. Der Subtyp des pET30-Vektors (a, b oder c, Frameshift um eine Base) wird so gewählt, dass downstream des T7-Promoters eine in frame-Translation von Insert in Protein gewährleistet ist. Die DNA (Vektor bzw. Insert) wird 2 h bei 37 °C verdaut. Als Restriktionsendonukleasen werden *Bam*H I und *Xho* I (New England Biolabs GmbH, Frankfurt) entsprechend der vorhandenen Schnittstellen verwendet. Puffer und BSA werden nach Herstellerangabe eingesetzt. Die Restriktionsansätze werden, wie unter Kap. 2.2.19 beschrieben aufgereinigt und können für die Ligation eingesetzt werden.

Folgender Ansatz wird zusammenpipettiert, vorsichtig gemischt, anzentri-fugiert und 5 min bei RT inkubiert:

- 2 µl 5x DNA Dilution Buffer

- x µl DNA (Vektor und Insert; max. 200 ng)
- ddH<sub>2</sub>O ad 10 µl
- 10 µl 2 x T<sub>4</sub> DNA Ligation Buffer
- 1 µl T<sub>4</sub> DNA Ligase.

Der Ansatz wird bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert bzw. sofort in kompetente Zellen transformiert.

### *Transformation*

Bei der Transformation werden die Plasmide durch Hitzeschock in die kompetenten Wirtszellen aufgenommen. Bestimmte Genabschnitte der Plasmide codieren für Antibiotikaresistenzen. Nur eine erfolgreiche Transformation gewährleistet die Koloniebildung in antibiotikahaltigen Medien. Das Antibiotikum wird entsprechend der Resistenz des Vektors gewählt.

**TOP 10** 2 µl der Klonierungsreaktion werden zu einem Tube mit chemisch kompetenten One Shot TOP10 Zellen gegeben und vorsichtig gemischt. Dieser Ansatz wird für 20 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock erfolgt für exakt 30 s bei 42 °C im Wasserbad. Die Probe wird wieder auf Eis gehalten und 250 µl SOC-Medium zugegeben. Im Anschluss wird der Ansatz für eine Stunde bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Nach der Inkubationszeit wird der gesamte Ansatz auf vorgewärmte X-Gal/IPTG/Antibiotikum-LB-Agarplatten ausplattiert. Die Platten werden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

**XL 10-GOLD** Bei XL-10-Gold handelt es sich um einen ultrakompetenten *E. coli*-Stamm. Dieser wird vornehmlich für die Produktion großer Plasmidmengen eingesetzt.

Der Inhalt eines Tubes XL 10-Gold (etwa 200 µl) wird auf zwei 15 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt und mit je 4 µl β-Mercaptoethanolmix (Erhöhung der Transformationsrate) versetzt. Dieser Ansatz wird 10 min auf Eis inkubiert und währenddessen mehrmals vorsichtig gemischt. Anschließend wird 1 µl der Klonierungsreaktion zugegeben, erneut gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock erfolgt wie bei TOP 10 für 30 s bei 42 °C im Wasserbad. Die Proben werden darauf hin für 2 min auf Eis gehalten bevor 900 µl NZY-Medium zugegeben werden. Bevor der Ansatz auf vorgewärmte Antibiotikum-LB-Agarplatten ausplattiert werden kann, wird er 1 h bei 200 U/min und 37 °C geschüttelt. Die ausplattierten Bakterien werden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

**ROSETTA2 PLYSS** Der Proteinexpressionsstamm Rosetta2-Stamm ist eine Weiterentwicklung des Expressionsstamms BL21. Rosetta2 verfügt zusätzlich über das pRARE2-Plasmid und ermöglicht durch die Bereitstellung seltener prokaryotischer Codons die Expression verschiedenster eukaryotischer Proteine. Eine zusätzliche Stabilisierung der Zielsequenz wird durch eine für

das T7 Lysozym codierende Sequenz erreicht, welche sich zusätzlich auf dem pRARE2-Plasmid befindet. Das T7 Lysozym wirkt als Inhibitor der T7 RNA Polymerase und hemmt somit die Transkription des Inserts in Abwesenheit von IPTG [154, 101]. Dies erhöht die Toleranz der kompetenten Zellen für Plasmide mit toxischen Inserts. Ein weiterer Benefit des pLysS ist die einfachere Präparation der Zellen bei der Proteinextraktion, da das T7 Lysozym in der Lage ist, Peptidoglycane in der Zellwand von *E. coli* aufzuschließen [106].

20 µl Zellsuspension werden in ein gekühltes Reaktionsgefäß vorgelegt. 1 µl der Ligation wird zugegeben und der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgt für 30 s bei 42 °C im Wasserbad. Nach zweiminütiger Inkubation der Proben auf Eis werden 80 µl SOC-Medium (RT) zugegeben. Die Ausplattierung auf vorgewärmte Antibiotikum-LB-Agarplatten erfolgt nach 1 h bei 200 rpm und 37 °C im Schüttler. Die ausplattierten Bakterien werden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### *Blau-Weiß-Selektion*

Die Selektion erfolgt bei Klonierung mit dem pCR 2.1-TOPO Vektor nach der Blau/Weiß-Färbung der Kolonien [124]. Die blauen Kolonien bestehen aus Bakterien, die das LacZΔ-Gen tragen, und in der Lage sind, das Lactoseanalogon X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid), ein artifizielles, chromogenes Substrat für das Enzym β-Galactosidase, zu Galactose und dem Aglycon 5-Brom-4-chlor-indol zu hydrolysieren. 5-Brom-4-chlor-indol wird an der Luft zum tiefblauen 5,5-Dibrom-4,4-dichlor-indigo oxidiert. Blaue Kolonien sind ein Indiz für plasmidtragende Bakterien, da der Wirtsorganismus erst durch das Plasmid in der Lage ist, eine funktionsfähige β-Galactosidase auszubilden.

Trägt das Plasmid ein Insert, so wurde dies in den β-Galactosidase-codierenden Bereich hineinligiert. Daraus resultiert eine weiße Bakterienkolonie, da β-Galactosidase nicht exprimiert und X-Gal nicht umgesetzt wird. Der Zusatz von IPTG dient der Induktion des Lactoseoperons.

Die weißen Kolonien werden mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in kanamycin- bzw. ampicillinhaltiges LB-Medium gegeben. Diese Ansätze werden über Nacht bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt und anschließend einer Plasmidisolierung unterzogen. Bei Verwendung des pET30 Vektors ist keine Blau/Weiß-Selektion möglich (fehlendes LacZΔ-Gen).

#### *In vitro-Mutagenese*

Um gezielt eine Mutation in das Insert eines Vektors (und damit in diesem Fall in das eukaryotisch exprimierte MSP-Protein) einführen zu können, wird sich des QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene bedient. Es werden die unter 2.1.9 angegebenen Mutagenese-Primer verwendet. Diese Primer enthalten an der Position 2078 (des msp-Transkripts), einen Einzelbasenaustausch von C zu T. Dieser SNP wird während der Reaktion in die neu

synthetisierten Vektoren integriert. Der Basenaustausch betrifft die erste Base des Codons 689 (CGC → TGC), was zur Aminosäuresubstitution Arg689Cys führt. Die Mutagenese und der anschließende Verdau der parentalen DNA wird nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

#### 2.2.21 Plasmidpräparation

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgt nach dem Protokoll von Birnboim & Doly [27]. Mittels alkalischer Lyse werden die Zellen aufgebrochen, Proteine und DNA denaturiert. Unter Hochsalzbedingungen präzipitieren die Proteine, während die DNA durch Erniedrigung der Salzkonzentration wieder renaturiert werden kann. Die Aufreinigung der DNA erfolgt entweder mittels Chloroform-Extraktion oder über eine Säule.

##### *Mini-Präparation von Plasmid-DNA*

Die alkalische Lyse erfolgt mit den Puffer-Lösungen des Qiagen Plasmid Midi Kit, die Aufreinigung durch Chloroform-Extraktion.

Die Lyse der Zellen wird nach dem Protokoll des Qiagen Plasmid Midi Kit durchgeführt. Zum aufgereinigten Lysat wird ein Volumen Chloroform zugegeben, der Ansatz mit Hilfe eines Vortex gründlich gemischt und im Anschluss 3 min bei RT und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die wässrige Phase wird abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Eine weitere Extraktion mit Chloroform schließt sich an. Zur Fällung der Plasmid-DNA werden zwei Volumen Ethanol absolut zugegeben und 15 min auf Eis gefällt. Die DNA wird durch 15 min Zentrifugation bei 18000 x g und 4 °C pelletiert. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen (gleiches Volumen wie Ethanol abs.). Es wird, ohne zu mischen, erneut bei obigen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet 10 min bei 37 °C getrocknet, bevor es in 30 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen wird. Die Plasmid-DNA wird bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

##### *Midi- und Maxi-Präparation von Plasmid-DNA*

Die alkalische Lyse erfolgt mit den Puffer-Lösungen des Qiagen Plasmid Midi/Maxi Kit, die Aufreinigung über eine Silica-Gel-Säule. Die Bindung der DNA an die Säule erfolgt über Anionenaustausch. Die Elution findet unter hoher NaCl-Konzentration (1,25 M) und basischem pH (pH 8,5) statt.

In jede Präparation werden 100 - 200 ml Bakteriensuspension eingesetzt. Die Aufreinigung erfolgt nach Herstellerangaben.

#### 2.2.22 Restriktion

Zur DNA-Restriktion werden Restriktionsenzyme des Typs II verwendet.

Die Restriktion dient der Linearisierung eines Plasmids, der Kontrolle der Klonierung (Herausschneiden des Inserts aus dem Vektor) oder der Erzeugung gewünschter DNA-Enden für die Ligation. Neben der einfachen Restriktion wurden auch Doppelverdau durchgeführt. Das Reaktionsmilieu wurde nach Herstellerangaben angepasst.

Sämtliche Restriktionsendonucleasen, sowie die dazugehörigen Puffer wurden von New England Biolabs GmbH (Frankfurt) bezogen.

#### *Standardansatz*

Als Standardansatz gilt folgendes Schema:

- x µg DNA
- 10 x Puffer
- (100 x BSA)
- Restriktionsenzym (2 U/µg DNA)
- dH<sub>2</sub>O ad 40 µl

Der Ansatz wird für 2 h oder 16 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

#### *Linearisierung*

Damit bei der *in vitro*-Transkription (Kap. 2.2.24) nicht zu lange und heterogene cRNA-Fragmente entstehen, wird die Transkription durch das Ende des Plasmid- Templates terminiert. Das Plasmid wird durch Restriktionsendonucleasen linearisiert. Die Wahl des Restriktionsenzym ist wie bereits oben beschrieben abhängig von der Restriktionsstelle des Vektors, die downstream der zu transkribierenden Sequenz liegt. Für den Vektor pCR2.1 TOPO wird das Restriktionsenzym *Bam*HI verwendet.

Es wird folgender Ansatz pipettiert:

- 20 µg Plasmid-DNA
- 4 µl 10 x NEBuffer 3
- 0,4 µl 100 x BSA
- 2 µl Restriktionsenzym *Bam*HI (20000 U/ml)
- dH<sub>2</sub>O ad 40 µl

Der Ansatz wird 16 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Der Erfolg des Verdau wird mittels Gelelektrophorese überprüft, bevor der Verdau mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) und NaAc-Fällung aufgereinigt wird.

### 2.2.23 Natriumacetatfällung

Bei linearisierten Vektoren, die für die *in vitro*-Transkription eingesetzt werden sollen, empfiehlt es sich, vor der NaAc-Fällung eine Aufreinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit (s. Kap. 2.2.19) sowie eine einmalige Chloroform-Extraktion (s. Kap. 2.2.21) durchzuführen.

Nach der Aufreinigung werden 1/10 Volumen 3 M NaAc und 2,5 Volumen abs. Ethanol zur Probe gegeben. Der Ansatz wird gemischt und 1 h bei -80 °C gefällt (alternativ 16 h, -20 °C). Die gefällte DNA wird im Anschluss pelletiert (Zentrifugation: 30 min, 4 °C, max. Geschwindigkeit). Der Überstand wird verworfen und das Pellet durch Zugabe von 1 Volumen kaltem 70 %igem Ethanol gewaschen. Es schließt sich eine 15-minütige Zentrifugation bei 4 °C und max. Geschwindigkeit an. Der resultierende Überstand wird erneut verworfen. Das Pellet wird bei 37 °C etwa 10 min getrocknet und in 30 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Die DNA-Konzentration wird spektrometrisch bestimmt und die Probe auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die DNA wird bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.2.24 In situ-Hybridisierung

#### In vitro Transkription

Für die *in vitro*-Transkription wird die RNA-Polymerase des T7 Bakteriophagen verwendet. Das Template benötigt den entsprechenden Promotor upstream der zu transkribierenden Sequenz. Es wurde zuvor für die Klonierung ein Vektor mit entsprechendem Promotor (T7) gewählt. Zu Beginn der Transkription bindet die RNA-Polymerase an die doppelsträngige Promotorsequenz und trennt die DNA-Stränge. Der 3'-5'-Strang wird als Template verwendet, folglich synthetisiert die RNA-Polymerase durch Einbau von NTPs einen komplementären 5'-3'-Strang. Die Synthese wird erst durch das Templateende terminiert (sog. run-off transcription). Aus diesem Grund wird der, das Insert enthaltende Vektor downstream der zu transkribierenden Sequenz mit einem geeigneten Enzym restringiert, zirkuläre Plasmidtemplates würden ein zu langes und heterogenes Transkript generieren.

Um mRNA (Orientierung 5'-3') *in situ* zu detektieren, muss eine komplementäre cRNA (antisense cRNA) transkribiert werden. Folglich ist die Lage des Promotors, der Erkennungssequenz der Endonuclease wie auch die Orientierung des Inserts im Vektor von Bedeutung. Sense cRNA (bedingt durch die entgegengesetzte Orientierung des Inserts im Vektor) wird dennoch transkribiert. Diese dient bei der *in situ*-Hybridisierung als Negativkontrolle. Der Benefit einer Hybridisierung mit RNA-Transkripten ist die Stabilität. Ein RNA-RNA-Hybrid ist deutlich stabiler als ein DNA-DNA-Hybrid. Dies kann zu einer höheren Nachweissensibilität führen, wodurch auch gering exprimierte (low abundant) mRNA nachgewiesen werden kann.

Es werden folgende NTPs eingesetzt:



- ATP
- CTP
- GTP
- [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]UTP

Neben UTP kann äquivalent auch markiertes CTP verwendet werden. Der Einbau von ATP hingegen ist weit weniger effizient als der der anderen Nukleotide. GTP scheint während der Lagerung sehr anfällig für Abbau zu sein [148]. Üblicherweise werden neben [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]- auch [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-, [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]- und <sup>3</sup>H- Nukleotide verwendet.

Bei der radioaktiven Markierung wird ein stabiles natürliches Isotop durch ein instabiles Isotop an unterschiedlichen Positionen eines Nucleosidtriphosphats ausgetauscht. Die chemische Struktur des NTPs wird nicht geändert. Beim hier verwendeten [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]UTP befindet sich die Austauschposition an der  $\alpha$ -Position des Phosphatrests des Uridintriphosphats. [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]UTP liegt in einer limitierenden Konzentration vor. Je höher die Konzentration des limitierenden Nukleotids ist, desto größer ist die Menge an vollständig synthetisierten Transkripten. Wird allerdings unmarkiertes UTP verwendet um die Konzentration des limitierenden Nukleotids zu erhöhen, so sinkt die spezifische Aktivität des Transkripts. Ideal sind Transkripte mit einer niedrigen spezifischen Aktivität (reduzierter Hintergrund auf dem Schnitt), deren Sensitivität es allerdings noch ermöglicht, das Hybrid zu detektieren. Für die *in situ*-Hybridisierung stellen vollständig synthetisierte Transkripte mit hoher spezifischer Aktivität allerdings kein Problem dar.

Im Folgenden wird [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]UTP (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) in einer Konzentration von 370 MBq (10 mCi)/ml und etwa 92 TBq (2500 Ci)/mmol eingesetzt. Sämtliche für die *in vitro*-Transkription verwendeten Reagenzien, mit Ausnahme des [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]UTP, sind dem MAXIscript *In vitro* Transcription Kit der Firma Ambion entnommen. Die Transkription wird in Anlehnung an das Protokoll des Herstellers durchgeführt. pTRI- $\beta$ -Actin (im MAXIscript *In vitro* Transcription Kit enthalten) dient als Kontrolltemplate. Die transkribierte Sonde wird auf Cryoschnitte, die das mRNAlocator *in situ* Hybridization Kit bereitstellt aufgetragen.

Die Ansätze setzen sich, wie in Tabelle 6 angegeben, zusammen.

Die eingesetzte DNA sollte eine Konzentration von 0,5 bis 0,8  $\mu$ g haben. Es ist darauf zu achten, dass [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]UTP immer als vorletztes und das Enzym als letztes zugegeben werden. Die *in vitro*-Transkription wird nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

#### *Abtrennen nicht eingebauter Nukleotide*

Zum Abtrennen nicht eingebauter Nukleotide wird das CentriSep-System von Princeton Separation verwendet.

Es wird nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Die aufgereinigten Zentrifugate werden mit dem Kontaminationsmonitor auf Radioaktivität

überprüft. Der Inhalt der Reaktionsgefäße sollte deutlich radioaktiv sein. Die Reaktionsgefäße werden an zentrifugiert, mit Parafilm abgedichtet und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### *Messung der Sondenmarkierung*

Zur Messung der Sondenmarkierung wird  $1\text{ }\mu\text{l}$  der gereinigten cRNA in ein Szintillationsgefäß gegeben, es werden  $5\text{ ml}$  Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint eco plus; Roth) addiert. Die Stärke der Sondenmarkierung wird im Anschluss im Szintillationszähler (Triathler Multilabel Tester) bestimmt. Das Ergebnis wird in counts per minute (cpm) ausgegeben. Die gewonnenen Werte werden für die Verdünnung der Sonden benötigt. Die Sonden werden mit Hybridisierungslösung auf etwa  $5 \times 10^4\text{ cpm}/\mu\text{l}$  verdünnt.

#### *In situ-Hybridisierung*

Wird die DNA-Doppelhelix über ihre Schmelztemperatur hinaus erhitzt, so denaturiert sie zu zwei Einzelsträngen. Kühlen die Einzelstränge aber wieder ab, so sind sie in der Lage, wieder zu Doppelhelices zu hybridisieren [145]. Neben DNA-Doppelhelices können sich auch DNA-RNA-Hybride sowie RNA-RNA-Hybride bilden. Allerdings muss sich die Sequenzabfolge der komplementären Basen innerhalb antiparalleler Nukleinsäurestränge entsprechen. Aus diesen Erkenntnissen entwickelte sich die Technik der Nukleinsäurehybridisierung. Sämtliche Hybridisierungsverfahren basieren auf der Detektion von Nukleinsäurezielsequenzen, was über die Hybridisierung komplementärer, markierter Nukleinsäuresonden erfolgt. Die Stabilität des Hybridkomplexes sowie die Stringenz definieren die Spezifität der Hybridisierung. Die Hybridstabilität ist abhängig von der Schmelztemperatur ( $T_m$ ). Diese ergibt sich aus Länge und GC-Gehalt des Hybrids, der Salzkonzentration im Medium, der Anwesenheit helix-destabilisierender Additiva, sowie dem Typ der zu hybridisierenden Nukleinsäurestränge (DNA-DNA, DNA-RNA oder RNA-RNA). Eine hohe Stringenz wird durch eine Erhöhung der Temperatur (bis max.  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  unterhalb  $T_m$ ) sowie eine Erniedrigung der Ionenstärke der Pufferlösungen während der Waschschrte erreicht. Dies führt zu einer Destabilisierung des Hybridkomplexes nach der Hybridisierung. Eine spezifische Wasserstoffbrückenbindung zwischen den komplementären Basenpaaren von Sonde und Zielsequenz erfolgt verstärkt unter hoch stringenten Bedingungen.

Die *in situ*-Hybridisierung (ISH) dient der Lokalisation und Visualisierung spezifischer mRNA (und DNA) *in situ*, also in Zellen und Geweben [153]. Sie ist ein sehr empfindliches Nachweisverfahren, da mRNA in bestimmten Zell- bzw. Gewebetypen verstärkt vorliegt. Neben der Lokalisation der Expressionsmuster kann auch der Expressionszeitpunkt bestimmt werden, was bei Expressionsstudien während der Embryonalentwicklung zum Tragen kommt. Die mRNA kann durch stringente Hybridisierung des markierten Transkripts mit der homologen mRNA *in situ* auf Gewebeschnitten nachgewiesen werden.

Die *in situ*-Hybridisierung arbeitet nach dem gleichen Prinzip wie andere Nukleinsäurehybridisierungstechniken, allerdings wurden einige Parameter modifiziert. Der Hauptunterschied liegt darin, dass die Ziel-Nukleinsäuren nicht, wie bei den meisten anderen Hybridisierungstechniken in Lösung oder membrangebunden vorliegen, sondern in fixierten Zellen oder Geweben. Für ein gutes Ergebnis müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

Die mRNA in den Zellen muss intakt bleiben und die cRNA in der Lage sein, die Zielsequenz zu erreichen und mit ihr zu hybridisieren. Zellen bzw. Gewebe müssen aber dennoch erhalten bleiben. Neben der radioaktiven ISH [48], haben sich weiterhin Methoden etabliert, die sich nicht-radioaktiv markierter Sonden bedienen [65].

In dieser Arbeit erfolgte die Hybridierung einer radioaktiv-markierten RNA-Sonde mit mRNA auf 5 µm starken Paraffin-Gewebeschnitten (Aortenbogen, Herz und Lunge der Maus, unterschiedliche Genotypen). Die Gewinnung des Gewebes für die mikroskopischen Präparate ist in Kap. 2.2.3 beschrieben.

Der Entwicklung der bereits mehrere Wochen an der Photoemulsion (Hypercoat LM-1) exponierten Schnitte schließt sich eine HE-Färbung an (s. Kap. 2.2.25). Die histologischen Präparate können unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden. Bei erfolgter Hybridisierung fällt durch die  $\beta$ -Strahlung des  $^{33}\text{P}$ -Isotops elementares Silber aus der Photoemulsion aus. Dies ist als schwarze Körnung auf den Präparaten sichtbar. Aufgrund der HE-Gegenfärbung ist die Lokalisation des Isotops und damit die des Hybrids sowie der mRNA im Gewebe ersichtlich.

Für die radioaktive Sonde wird der  $\beta$ -Strahler  $^{33}\text{P}$  verwendet.  $^{33}\text{P}$  besitzt eine gute Auflösung sowie Strahlungsdichte. Da die Streustrahlung nicht übermäßig stark ist, kann man auf den entwickelten Schnitten distinkte Signale bei einzelnen Zell- und Gewebetypen detektieren.

Sämtliche für die *in vitro*-Transkription verwendeten Reagenzien, mit Ausnahme der Alkohole, sind dem mRNAlocator *in situ* Hybridization Kit von Ambion entnommen. Die Hybridisierung wird in Anlehnung an das Protokoll des Herstellers durchgeführt. Alle Mengenangaben beziehen sich auf eine Küvette.

#### VORBEREITUNG

**Hydratisierung** Die Präparate auf den Objektträgern werden durch eine absteigende Alkoholreihe hydratisiert.

Die Hydratisierung besteht aus folgenden Arbeitsschritten:

Die Objektträger

- 3 x 5 min in Xylol waschen.
- 3 x 3 min in Ethanol abs. inkubieren.
- 1 x 3 min in 90%igem Ethanol,

- 1 x 3 min in 80%igem Ethanol und
- 1 x 3 min in 70 %igem Ethanol hydratisieren. Anschließend werden die Objektträger
- 3 x 5 min in 1x PBS äquilibriert.

Kontrollkryoschnitte (Gehirn, Maus; im mRNAlocator *in situ* Hybridization Kit enthalten) werden erst ab der PBS-Äquilibration mitgeführt, da eine Hydratisierung wie bei Paraffinschnitten nicht notwendig ist.

**Proteinase K Verdau** Eine Lösung aus 50 ml 1x PBS und 2,5 µl Proteinase K (20 mg/ml) wird auf die Objektträger gegeben. Die Schnitte werden 10 min bei RT inkubiert.

**Triethanolamin-Inkubation** Für eine dreiminütige Inkubation, die den unspezifischen Hintergrund reduzieren soll, wird folgende Lösung auf die Schnitte gegeben:

- 660 µl Triethanolamin
- 250 µl konz. HCl
- dH<sub>2</sub>O ad 50 ml

**Säureanhydrid-Inkubation** Zu einer Lösung bestehend aus

- 660 µl Triethanolamin
- 250 µl konz. HCl
- dH<sub>2</sub>O ad 50 ml

werden 120 µl Säureanhydrid addiert. Diese Lösung wird auf die Schnitte gegeben und 10 min inkubiert. Anschließend werden die Objektträger 5 min in 1x PBS gewaschen.

**Herstellung der feuchten Kammern und Inkubation der Objektträger** Aus sterilen, leeren Pipettenspitzenboxen werden feuchte Kammern hergestellt. Die Boxen werden zu einem Drittel mit dH<sub>2</sub>O sowie Zellstoff befüllt. Der Pipettenspitzeninsatz wird wieder in die Box gelegt. Darauf können nun die Objektträger plaziert werden. Die feuchten Kammern werden im Hybridisierungssofen auf die Hybridisierungstemperatur vorgewärmt.

**Prähybridisierung** Die Objektträger werden mit Papiertüchern sorgfältig getrocknet. 80 µl der auf 50 °C temperierten Prähybridisierungslösung werden auf jeden Schnitt gegeben, wobei die Flüssigkeit durch die Oberflächenspannung gehalten werden sollte. Die feuchten Kammern werden mit Parafilm gründlich verschlossen und zusätzlich mit Aluminiumfolie umwickelt. Die Objektträger werden 2 bis 4 h bei 50 °C im Hybridisierungssofen inkubiert.

## HYBRIDISIERUNG

**Sondeneinsatz für die Hybridisierung** Die Sonden werden in Hybridisierungslösung (50 °C) so verdünnt, dass eine Konzentration von  $5 \times 10^4$  cpm/ $\mu$ l Hybridisierungslösung erreicht wird. Die verdünnten Sonden werden 20 min bei 60 °C im Wasserbad denaturiert.

**Hybridisierung der Schnitte** Die feuchte Kammer wird, nachdem sie aus dem Hybridisierungssofen genommen wurde, von Aluminiumfolie und Parafilm befreit. Von den Objektträgern wird mittels Pipette und Papiertuch die Prähybridisierungslösung entfernt. Pro Schnitt werden etwa 60  $\mu$ l der mit der Sonde versetzten Hybridisierungslösung aufpipettiert. Anschließend wird jeder Schnitt mit einem Hybri-Slip bedeckt. Zu viel Hybridisierungslösung erzeugt einen erhöhten Hintergrund auf dem Schnitt. Sind alle Objektträger in einer Kammer mit Hybridisierungslösung beschichtet und mit Hybri-Slips bedeckt, so wird die feuchte Kammer wieder mit Parafilm und Aluminiumfolie verschlossen. Die feuchten Kammern werden über Nacht (16 h) bei 50 °C im Hybridisierungssofen inkubiert. Schwankungen in der Stringenz der einzelnen Sonden erfordern eine Temperaturanpassung um die Signalintensität auf dem Schnitt aufrecht zu erhalten. Während der Hybridisierung dürfen die Schnitte keinesfalls austrocknen, dies würde ebenfalls den unspezifischen Hintergrund erhöhen.

**Waschen der Objektträger** Nach der 16-stündigen Inkubation werden die Objektträger gewaschen. Die Objektträger werden aus der feuchten Kammer genommen und in einen vorgewärmten, mit 50 °C warmer 4 x SSC-Lösung mit DTT (0,1 mM) befüllten, Kasten mit Färbegestell eingesetzt. Die Hybri-Slips fallen durch Schwenken des Färbegestells von den Schnitten ab. Anschließend wird der Kasten 5 min bei 50 °C im Wasserbad inkubiert. Die Objektträger werden in eine, mit 50 °C warmen 2 x SSC mit DTT (0,1 mM) gefüllte, Küvette umgesetzt und 30 min bei 50 °C im Wasserbad inkubiert. Es schließt sich eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C mit RNase A-Lösung an. Die RNase entfernt unspezifisch gebundene RNA aus dem Gewebe. RNA-RNA-Hybride sind gegenüber dem Verdau mit RNase A unempfindlich. Die Objektträger werden erneut bei 50 °C 30 min in einer unbenutzten Küvette mit 2 x SSC mit 0,1 mM DTT inkubiert. Als letzter Waschschrift schließt sich eine 30-minütige Inkubation mit 0,1 x SSC bei 50 °C im Wasserbad an. Bevor mit dem Entwässern der Schnitte fortgefahren wird, sollten die Küvetten mit den Objektträgern auf RT abkühlen.

**Entwässern der Schnitte** Die Schnitte werden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Dafür werden die Objektträger mit folgenden Lösungen inkubiert:

- 2 min in 70 %iger Ethanol

- 2 min in 90 %iger Ethanol
- 2 min in Ethanol abs.

Die Objektträger werden mit einem Papiertuch getrocknet und 1 h bei RT aufrecht stehend getrocknet.

#### *Autoradiographie*

Die Objektträger werden mit Klebefilm in einer gereinigten Röntgenkassette befestigt. Im Dunkelraum wird bei Rotlicht ein Film (Kodak BOMAX MR) auf die Schnitte aufgelegt. Die Kassette wird verschlossen und in einer lichtdichten Tasche drei Tage bei RT exponiert. Nach Ablauf von drei Tagen wird der Film in der Entwicklungsmaschine (FPM 3800AD, Fujifilm) entwickelt.

#### *Mikroautoradiographie mit Photoemulsion*

Die verwendete Photoemulsion (Hypercoat LM-1) muss in Dunkelheit mindestens 15 min bei 43 °C erwärmt werden. Die angewärmte Hypercoat-Lösung wird in ein Zentrifugenröhrchen umgefüllt. Das Zentrifugenröhrchen wird erneut 5 min bei 43 °C im Wasserbad inkubiert. Mit der so angewärmten Emulsion können 15 - 20 Objektträger behandelt werden. Zu Beginn werden drei Test-Objektträger getaucht. Der Objektträger wird langsam senkrecht in die Emulsion getaucht, verbleibt dort ca. 5 s und wird langsam wieder aus der Emulsion heraus gezogen. Der Objektträger wird mit der Unterkante auf einem saugfähigen Papiertuch 5 s abgestellt, und im Anschluss in nahezu vertikaler Position getrocknet (min. 5 min). Mit den weiteren Objektträgern wird ebenso verfahren.

Die Objektträger werden in einem Objektträger-Kasten 1 h bei RT im Dunkelraum getrocknet. Im Anschluss wird Trocknungsmittel in den Kasten eingefüllt. Dieser wird lichtdicht verschlossen und etwa 3 Wochen bei 4 °C inkubiert. Die Dauer richtet sich nach der Signalintensität auf dem zuvor entwickelten Röntgenfilm. Während der Inkubation fällt, bedingt durch das Radioisotop, elementares Silber aus der Emulsion (0,09 g Ag / g Hypercoat LM-1) aus, das als schwarze Körnung auf dem Schnitt sichtbar wird.

#### *Entwicklung der Schnitte*

Schnitte und Lösungen müssen vor der Entwicklung auf RT äquilibriert werden.

Im Dunkelraum unter Rotlicht werden die Schnitte wie folgt entwickelt:

- 5 min in Entwicklerlösung entwickeln, dabei werden die Objektträger im Färbegestell gelegentlich geschwenkt
- 30 s die Reaktion in Stop-Lösung abstoppen
- 10 min fixieren, dabei werden die Objektträger gelegentlich geschwenkt

- 15 min unter fließendem Wasser spülen.

Abschließend werden die Schnitte mit einer HE-Färbung, wie in Kap. 2.2.25 beschrieben, gegengefärbt.

#### 2.2.25 Färbung von Präparaten

##### *HE-Färbung*

Bei der HE-Färbung handelt es sich um eine Hämatoxylin/Eosin-Färbung. Im Folgenden wird mit Mayers Hämalaun (Merck) gearbeitet, also einem mit Alaun (Aluminiumkaliumsulfat) versetztem Hämatoxylin. Bei der HE-Färbung handelt es sich um eine Sukzedanfärbung; die Färbungen mit Hämalaun und Eosin (Merck) erfolgen nacheinander. Diese Methode basiert auf dem Prinzip der elektrostatischen Absorption. Hämalaun (progressive Färbung) lagert sich durch Chelatbildung an das negative Phosphatrückgrat der DNA an. Es färbt die basophilen Kerne. Eosin (regressive Färbung) färbt das Zellplasma, oder vielmehr die eosinophilen, kationischen, im Plasma befindlichen Proteine. Der Färbevorgang besteht bei entparaffinierten Präparaten aus folgenden Schritten:

- 45 s Inkubation in Mayers Hämalaun-Lösung
- kurzes Spülen mit dH<sub>2</sub>O
- 10 min Differenzieren unter fließendem Wasser (Bläuen)
- 1 min Inkubation in 1%iger Eosinlösung (w/v) + 1 Tr. Eisessig/100ml

Im Anschluss werden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder entwässert. Dafür werden die Objektträger mit folgenden Lösungen inkubiert:

- 1 min in 70 %igem Isopropanol
- 1 min in 90 %igem Isopropanol
- 1 min in Isopropanol abs.
- 10 min in Xylol

Abschließend werden die Objektträger mit Eukitt (Kindler GmbH, Freiburg) und einem Deckglas (50 x 24 mm, Menzel) eingedeckt. Die Präparate können nach Aushärten des Eindeckmediums unter dem Mikroskop betrachtet und ausgewertet werden.

##### *Panoptische Färbung nach Pappenheim*

Die panoptische Färbung nach Pappenheim oder May-Grünwald-Giemsa-Färbung beruht auf der Kombination der Jenner-May-Grünwald-Färbung mit der Giemsa-Färbung. Da mit dieser Methode eosinophile, basophile und

neutrophile Strukturen dargestellt werden, wird sie auch als panoptische Färbung bezeichnet. Sie ermöglicht es, Blutzellen aufgrund unterschiedlicher Anfärbung des Cytoplasmas zu differenzieren. Die May-Grünwald-Lösung besteht aus einer Mischung von mit Eosin angesäuertem Methylenblau und Methanol, welche in Wasser gelöst wird. Basophile Granula erscheinen durch die Anfärbung mit Methylenblau tiefblau bis violett, während saure Granula Eosin anreichern und damit leuchtend rot erscheinen. Neutrale Granula weisen nach Färbung einen hell- bis purpurroten, aber blassen Farbton auf. Das Cytoplasma der Erythrozyten wird durch die May-Grünwald-Lösung hellrot, das der Thrombozyten leicht bläulich angefärbt. Die Giemsa-Lösung besteht aus einer Mischung der Farbstoffe Azur A-Eosinat, Azur B-Eosinat, Methylenblau-Eosinat und Methylenblauchlorid in Methanol. Sie färbt Zellkerne durch Komplexbildung der Farbstoffe mit der DNA tiefrot.

Das luftgetrocknete Präparat wird 3 min in May-Grünwald-Lösung (Merck) inkubiert und anschließend kurz in Leitungswasser gespült. Es schließt sich eine 15-minütige Färbung mit Giemsa-Lösung (Merck) an. Diese wird vor dem Färbevorgang aus einer Stammlösung durch 10-faches Verdünnen mit aqua dest. frisch hergestellt. Abschließend wird das Präparat erneut mit Wasser gespült und in Schrägstellung luftgetrocknet. Der pH-Wert des verwendeten Wassers sollte bei 7,2 liegen um ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen den einzelnen Farben auf dem Präparat zu erhalten. Das Präparat kann mit Glyceringelatine wie oben beschreiben eingedeckt werden.

#### 2.2.26 *Prokaryote Expression*

##### *Induktion von Rosetta2 mit IPTG zur Analyse der Expressionsstärke*

Es empfiehlt sich, mehrere Kolonien einer Platte auf ihre Expression hin zu untersuchen, da es Kolonie-zu-Kolonie Varianzen bei der Proteinexpression geben kann. Von Kolonien mit hoher Expressionsrate werden Glycerinkulturen angelegt.

Von mehreren Kolonien einer Platte werden ÜN-Kulturen angelegt. Am Folgetag wird 1 ml LB-Medium mit 50 µl dieser ÜN-Kultur inokuliert. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C und 250 U/min wird die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (Arbeitskonzentration 1 mM) induziert. Zuvor wird ein Aliquot der nicht-induzierten Kultur zur weiteren Analyse abgenommen und auf Eis gelagert. Die Induktion erfolgt 2 h bei 37 °C und 250 U/min. Jeweils 20 µl der induzierten sowie der nicht-induzierten Flüssigkulturen werden mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese auf ihre Expressionstärke hin untersucht.

##### *Induktion von Rosetta2 mit IPTG zur Proteinexpression*

1 Liter antibiotikumhaltiges LB-Medium wird 1:60 mit einer nicht-induzierten ÜN-Kultur angeimpft und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bei 37 °C und 50 U/min inkubiert. Vor Zugabe des IPTGs wird 1 ml Probe abgenom-



men (nicht-induzierte Kontrolle) und bis zur Analyse bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingelagert. Die Induktion erfolgt in Anwesenheit von IPTG (Endkonzentration  $1\text{ mM}$ ) bei obigen Bedingungen über  $4\text{ h}$ . Im Anschluss werden die Bakterien  $20\text{ min}$  bei  $3500 \times g$  pelletiert und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 2.2.27 Präparative Proteinaufreinigung

Bei der Aufreinigung der bakteriell exprimierten Proteine wird sich der Affinitätschromatographie, im engeren Sinne der "immobilized-metal affinity chromatography" (IMAC) bedient.

Bei der stationären Phase handelt es sich um den chelatbildenden Liganden Nitrilotriessigsäure (NTA, N,N-Bis(carboxymethyl)glycin). Die vierzählige NTA komplexiert mit kationischem Nickel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) als Zentralteilchen. Der zweite Ligand des Nickels ist das aufzureinigende Protein in der mobilen Phase. Durch Klonierung des Inserts in den pET<sub>30</sub>-Vektor kann ein Protein erzeugt werden, welches am C-terminalen Ende sechs Histidin-Reste, den sog.  $6 \times \text{His-Tag}$  trägt (Expression des  $6 \times \text{His-Tag}$  auch N-terminal möglich, hier aber nicht durchgeführt). Dieser  $6 \times \text{His-Tag}$  bindet an das stationäre Nickel. Die übrigen, in der mobilen Phase befindlichen Verunreinigungen werden unter stringenten Bedingungen ausgewaschen. Die Elution des rekombinanten Proteins erfolgt im sauren Milieu. Die Histidin-Reste werden protoniert und das Protein dissoziiert von der stationären Phase.

Die Proteinaufreinigung erfolgt unter denaturierenden Bedingungen. Zum Aufbrechen der Einschluss-Körperchen, in die das eukaryotische Protein gefasst wird, wird  $6\text{ M}$  Guanidin-Hydrochlorid verwendet. Die denaturierende Wirkung des Harnstoffs ist für diese Anwendung nicht ausreichend. Die Proteine werden über die Chromatographie-Säulen von Qiagen (Hilden) aufgereinigt. Abhängig vom Kulturvolumen und der zu erwartenden Menge Protein werden Ni-NTA-Spin Säulen (max.  $150\text{ }\mu\text{g}$   $6 \times \text{His-Tag-Protein}$ ) oder Ni-NTA Superflow Säulen (max.  $15\text{ mg}$   $6 \times \text{His-Tag-Protein}$ ) verwendet.

Die Aufreinigung erfolgt nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung des mitgelieferten Puffers.

#### 2.2.28 Renaturierung des rekombinanten Proteins

Das unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigte rekombinante Protein wird durch schrittweises Entfernen der störenden Agenzien renaturiert. Zu diesem Zweck werden D-Tube Dialysatoren der Firma Novagen/Merck Biosciences GmbH (Schwalbach) verwendet. Die D-Tubes besitzen eine Dialysemembran aus inerter Zellulose. Die Porengröße der Membran wird in Abhängigkeit von der Proteingröße gewählt (der Cut-off der Membran entspricht max.  $50\%$  der Proteingröße).

Für die aufgereinigten Proteine wurden Dialysemembranen mit der Porengröße  $3500\text{ MWCO}$  verwendet.

Das Eluat der Proteinaufreinigung wird mittels D-Tube Mega Dialyser (15 ml Fassungsvermögen) entsalzt. Dies geschieht in einer schrittweisen Dialyse bei 4 °C. Der Harnstoffgehalt des Elutionspuffers wird in drei Dialyseschritten von 7 M auf 0 M reduziert. Der pH-Wert wird von pH = 4,5 auf pH = 7,3 heraufgesetzt. Die Dialyse erfolgt unter ständigem Umwälzen des Puffers. Das Volumen des Dialysepuffers entspricht etwa dem 500-fachen der zu dialysierenden Probe. Während des Dialysevorgangs verdoppelt sich das Volumen der Probe.

1. PBS, 5 M Harnstoff, pH = 5,5; Dauer 3 h.
2. PBS, 2,5 M Harnstoff, pH = 6,5; Dauer 3 h.
3. PBS, pH 7,3; Dauer 16 h.

Durch das mehrfache Erneuern des Dialysepuffers wird die Probe langsam und kontinuierlich entsalzt. Die aus der Aufreinigung stammenden Detergenzien werden entfernt und das Protein wieder renaturiert.

#### 2.2.29 *Kolorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry*

Die Methode nach Lowry [134] ist neben dem Bradford-Test der meistgenutzte Assay zur Proteinquantifizierung. Er ermöglicht es, bereits geringe Proteinmengen zu detektieren (Bereich: 1 µg/ml - 1500 µg/ml).

Das Modified Lowry Protein Assay Kit von Pierce/Thermo Fisher Scientific Inc. (Rockford, IL, USA) enthält neben dem Standard (BSA) sämtliche benötigten Reagenzien. Der Test wird nach dem Protokoll des Herstellers in einer Mikrotiterplatte durchgeführt und die Extinktion bei 450 nm im Ascent Multiskan bestimmt.

#### 2.2.30 *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*

Im ELISA, dem enzymgekoppelten Immunadsorptionstest wird die Bindung von Analyt und Antikörper nachgewiesen. Wie in der Immunhistochemie wird der zum Antigen proportionale, enzymatische Substratumsatz detektiert. Analyt und Antikörper werden bei dem hier beschriebenen Verfahren (ähnlich einem Sandwich-ELISA) über ein Fänger-molekül an eine Festphase (Mikrotiterplatte) gebunden. Nicht gebundene Stoffe werden in Waschschritten entfernt. Die Antigen-Antikörper-Bindung wird mit Hilfe der enzymatischen Reaktion quantifiziert. Der Substratumsatz wird luminometrisch detektiert und ist proportional zur Menge des gebundenen Analyten. Ein zusätzlicher Standard ermöglicht neben dem qualitativen Nachweis auch eine Quantifizierung. Im Folgenden handelt es sich um einen indirekten ELISA, der Nachweis des Antigens erfolgt mittels primären Antikörpers, an den wiederum ein sekundärer, biotinkonjugierter Antikörper bindet. Die Kopplung des Markerenzym an den sekundären Antikörper erfolgt über das Avidin-Biotin-System. Als Enzym wird Alkalische Phosphatase verwendet, die das

Lumigen PPD 3-(2'-Spiroadamantan)-4-methoxy-4-(3'-phosphoryloxy)phenyl-1,2-dioxethan umgesetzt. Die entstehende Chemolumineszenz hat ihr Maximum bei einer Wellenlänge von 530 nm. Der Avidin-Biotin-Komplex dient der Signalverstärkung, da pro spezifischem Antikörper, welcher den Analyten gebunden hat, mehr Enzyme binden können, als bei einer direkten Markierung des Antikörpers mit Enzym. Der folgende ELISA wurde in Anlehnung an das Protokoll von Andersen *et al.* [5] durchgeführt. Dieses Verfahren nutzt die Fähigkeit des Lactadherins, an oxidiertes Phosphatidylserin (1,2-Diacyl-sn-glycerol-3-phospho-L-serin; PS) zu binden. PS wird als Fängermolekül auf einer lipophilen Festphase (Nunc PolySorb Mikrotiterplatte, weiß) eingesetzt. Der Nachweis erfolgt mit einem polyklonalen Antikörper.

#### **Ablauf:**

**Ansatz PS:** Das als amorphes Pulver gelieferte PS wird in Chloroform/Methanol (95:5) mit einer Konzentration von 50 mg/ml gelöst. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C. Die Arbeitskonzentration beträgt 3 µg/ml in Methanol.

Die Kavitäten der Mikrotiterplatte werden mit 100 µl PS in Methanol beschichtet. Das Methanol ist nach Ablauf von 12 h bei RT unter Schütteln (60 U/min) komplett verdunstet. Zur Absättigung von freien Bindungskapazitäten der Platte werden 300 µl Blockier-Reagenz (TBS + 0,05 % Gelatine Gold; Dr. August Oetker Nahrungsmittel KG, Bielefeld) in jede Vertiefung pipettiert. Die Mikrotiterplatte wird, mit einer adhäsiven Folie verschlossen, 90 min bei 37 °C und 60 U/min in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird sämtliche Flüssigkeit entfernt und Standard sowie Proben auf die Platte gegeben. Neben dem Leerwert wird der Standard über 5 Stufen mit TBS verdünnt. Standards sowie Proben werden in Doppelbestimmung mit je 50 µl eingesetzt. Die Inkubation der abgedeckten Platte erfolgt für 1 h bei 37 °C und 60 U/min in der feuchten Kammer. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (TBS + 0,05% Tween 20) werden 50 µl des primären Antikörpers (Verdünnung 1:500 in Blockier-Reagenz s. Kap. 2.1.8) in jede Kavität gegeben und die Platte 20 h bei 4 °C in der feuchten Kammer inkubiert. Es schließt sich ein dreifacher Waschschrift an. 50 µl des biotinylierten, sekundären Antikörpers in einer 1:2500-Verdünnung in Blockier-Reagenz werden in jede Vertiefung pipettiert. Es folgt ein weiterer Inkubationsschritt für 1 h bei 37 °C und 60 U/min in der feuchten Kammer. Nach drei Waschschriften werden je Vertiefung 50 µl Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Jackson IR Europe LTD; Suffolk, UK) in einer Konzentration von 1 µg/ml in Blockier-Reagenz hinzugegeben. Der Ansatz wird 1 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wird die Platte dreimal gewaschen und 25 µl einer 50% Lumiphos 530 -Lösung (Lumigen Inc., Southfield, MI, USA) in jede Kavität gegeben. Die Platte wird für 45 min bei RT inkubiert. Die Lumineszenz wird anschließend am Luminometer (Fluoroskan) bestimmt. Dabei wird die Anzahl der rlu (relative luminescence units) pro 100 msec ermittelt.

### 2.2.31 Trennung und Nachweis von Proteinen

#### *Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)*

Die Elektrophorese wird mit einem vertikalen Gelsystem in einem diskontinuierlichen Puffersystem in Anlehnung an die von Laemmli [122] beschriebene Methode durchgeführt. Die 40 %ige Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (37,5:1) wird von Bio-Rad bezogen. Ammoniumpersulfat (APS) und TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin) von der Firma Roth. Die Zusammensetzung sämtlicher Puffer ist im Anhang beschrieben.

Die Gele werden entsprechend Tab. 7 angesetzt. Das Volumen ist ausreichend für 2 Gele der Stärke 0,75 mm. Das flüssige Trenngel wird in die Gelkassetten pipettiert und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wird der Alkohol abgegossen und das Sammelgel hinzugegeben. Die Polymerisationsdauer beträgt mindestens 3 h.

Die Probestaschen werden mit jeweils 15 µl Probe beschickt. Das Volumen des Molekulargewichtsmarkers (Prestained Protein Molecular Weight Marker; Fermentas, St. Leon-Rot) beträgt 5 µl. Der Elektrophoreselauf wird bei 100 V durchgeführt und beendet, sobald die Laufmittelfront das Gelende erreicht hat.

#### *Nachweis der aufgetrennten Proteine*

Die durch Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine werden durch Coomassie-Blau-Färbung oder Westernblot nachgewiesen.

**COOMASSIE-BLAU-FÄRBUNG** Das Gel wird mindestens 2 h in der Färbelösung inkubiert und anschließend bis zur Entfärbung des Hintergrunds mit Entfärbelösung behandelt. Für eine elektronische Dokumentation wird das Gel in Kunststoff eingeschweißt. Alle Inkubationsschritte erfolgen auf einem Orbitalschüttler.

**WESTERNBLOT** Die Durchführung des Westernblots erfolgt in einer vertikalen Blottingkammer in Anlehnung an die Methode von Towbin *et al.* [217].

Die Blotkassette wird nach der Anleitung des Herstellers zusammengesetzt. Als Transfermembran dient Nitrozellulose (Hybond-ECL; GE Healthcare Europe GmbH, München). Der Transfer erfolgt für 3 h bei 300 mA. Nach 90 min wird die Kühleinheit ausgewechselt und, bei gleichzeitigem Blotting zweier Membranen, die Position der Blotkassetten getauscht.

**Nachweis immunogener Proteine mittels Chemolumineszenz** Die Detektion der Proteine erfolgt über einen spezifischen Primärantikörper mit Hilfe der an den sekundären Antikörper gebundenen Meerrettich-Peroxidase (POD). Die durch die POD-katalysierte Reduktion des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führt zur Oxidation von Luminol (5-Amino-2,3-dihydrophthalazin-1,4-dion), das daraufhin in einem

angeregten Zustand vorliegt. Beim Übergang in den Grundzustand emittiert Luminol blaues Licht ( $\lambda = 430 \text{ nm}$ ), das von einem chemolumineszenzsensitiven Film detektiert wird.

Nach dem Transfer wird die Nitrozellulosemembran in 5 %igem Magermilchpulver (in TBS-T) 1 h bei RT blockiert, um unspezifische Antikörperbindung an die Membran zu verhindern. Anschließend wird die Membran dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen. Die Bindung des primären Antikörpers erfolgt über Nacht bei 4 °C unter stetigem Schütteln. Die Verdünnungen der Antikörper in 2,5 % Magermilchpulver (in TBS-T) sind Kapitel 2.1.8 zu entnehmen. Nach drei 20-minütigen Waschschritten mit TBS-T wird der peroxidasekonjugierte sekundäre Antikörper 1 h bei RT gebunden. Nicht gebundene Immunglobuline werden durch Waschen mit TBS-T (drei Mal 20 min) entfernt. Beide Komponenten des ECL-Systems (Amersham ECL-Western Blotting Detection Reagents; GE Healthcare, Europe GmbH, München) werden in dem, vom Hersteller angegebenen Verhältnis gemischt und gleichmäßig auf die Membran gegeben. Nach Ablauf von 2 min kann im Dunkelraum die Belichtung des Chemolumineszenzfilm (Amersham Hyperfilm ECL; GE Healthcare Europe GmbH, München) stattfinden. Der Film wird mit einer 1:10-Verdünnung des Kodak GBX Developer and replenishers (Kodak GmbH, Stuttgart) entwickelt, bis die Banden, die gewünschte Intensität zeigen. Nach 45-секündigem Fixieren in Kodak GBX Fixer and replenisher (1:10, Kodak GmbH, Stuttgart) wird der Film in Leitungswasser gespült und aufrecht stehend getrocknet. Zur besseren Orientierung wird das Muster des Markers auf den Film übertragen.

Um die spezifische Bindung des primären Antikörpers zu untersuchen, wird der Antikörper mit der 1,35-fachen Menge eines Blockierpeptids 60 min bei 37°C in 2,5 % Magermilchpulver (in TBS-T) präinkubiert. Im Anschluss wird der Antikörper-Peptid-Komplex auf die Membran gegeben, und wie oben beschrieben verfahren. Die spezifischen Banden auf dem Chemolumineszenzfilm werden ausgelöscht.

Zur Untersuchung der Spezifität des sekundären Antikörpers wird während der Primärantikörperinkubation lediglich 2,5 % Magermilchpulver in TBS-T auf die Membran gegeben, und im Folgenden wie oben beschrieben verfahren. Unspezifische, durch den Zweitantikörper hervorgerufene Banden, können auch jetzt noch detektiert werden.

**WIEDERHOLTE VERWENDUNG VON WESTERN BLOT-MEMBRANEN** Nach einer ECL-Detektion können die Membranen erneut mit einem Antikörper inkubiert, und Antigene detektiert werden. Zuvor aber muss die Membran einer Waschprozedur unterzogen werden.

Die Membran wird 30 min in "Stripping"-Puffer inkubiert. Es schließt sich dreimaliges Waschen mit TBS-T über 20 min an. Es wird, wie oben beschrieben, mit dem Blockieren der Membran fortgefahren.

### 2.2.32 Immunfluoreszenz

Bei der Immunfluoreszenz werden, wie in der Immunhistochemie Proteine mittels spezifischer Antikörper sichtbar gemacht. Im Folgenden werden Cryopräparate verwendet. Neben dem Primärantikörper wird ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper eingesetzt. Der Primärantikörper erkennt das zu detektierende Antigen, der Sekundärantikörper bindet an den primären Antikörper und wird, bei entsprechender Anregung, unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

Parallel zu jedem Versuch werden Kontrollen mitgeführt. Sie werden nicht mit primärem Antikörper, sondern lediglich mit der Verdünnungslösung (1 % BSA in PBS), wohl aber mit Sekundärantikörper inkubiert. Ziel ist die Kontrolle der Spezifität, vor allem der Bindung des sekundären Antikörpers.

Die Präparate, eingelagert bei -80 °C, werden auf Raumtemperatur gebracht, und im Anschluss 15 min in kaltem Aceton fixiert. Nachdem die Objektträger in PBS + 0,1% BSA 2 x 7 min gewaschen wurden, werden die einzelnen Schnitte sorgfältig mit einem Fettstift (Dako GmbH, Hamburg) umkreist, um ein Verlaufen der aufgetropften Lösungen zu verhindern. Es schließt sich eine 30-minütige Blockierung mit 8 % BSA in PBS bei RT in der feuchten Kammer an. Der Primärantikörper wird in 1 % BSA in PBS verdünnt und unter Auslassung des Waschschritts auf die Schnitte gegeben. Die optimale Antikörperverdünnung ist in Kap. 2.1.8 angegeben. Die Inkubationsdauer beträgt 18 h bei 4 °C in der feuchten Kammer. Es kann auch eine Mischung verschiedener Primärantikörper auf die Präparate gegeben werden, wenn unterschiedliche Antigene parallel nachgewiesen werden sollen. Die Schnitte werden 30 min gewaschen, bevor der fluorochromkonjugierte sekundäre Antikörper zugegeben wird. Dieser wird in 1 % BSA in PBS 1:100 verdünnt. Wurde eine Kombination aus primären Antikörpern eingesetzt, so wird auch eine entsprechende Mischung an Sekundärantikörpern auf die Schnitte gegeben. Nach dreistündiger Inkubation bei RT im Dunkeln schließt sich ein weiterer Waschschritt an. Die Doppelstrang-DNA des Nucleus wird 2 min mit DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid, Thermo Fisher Scientific Pierce; Rockford, IL, USA, 1µg/ml) angefärbt. Es folgt ein abschließender Waschschritt. Zuletzt werden die Präparate mit einem "Antifading"-Reagenz (Mowiol/DABCO) eingedeckt. Die Präparate können nach 16 h Trockenzeit am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

Reagenz	antisense-Sonde	sense-Sonde	Kontrolle
Linearisierte DNA	6 $\mu$ l	6 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Nuklease-freies Wasser	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	7 $\mu$ l
10 x Transkriptionspuffer	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
ATP	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
CTP	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
GTP	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
$[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{UTP}$	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
T7 Enzym-Mix (15 U / $\mu$ l)	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
Summe	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l

Tabelle 6: Ansatz *in vitro*-Transkription

Trenngel 12,5% PAA		Sammelgel 5% PAA	
Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung 40%	2,65 ml	Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung 40%	682,5 µl
1 M Tris-HCl, pH 8,9	3,15 ml	1 M Tris-HCl, pH 6,8	700 µl
bidest. Wasser	2,4 ml	bidest. Wasser	4,08 ml
20% (w/V) SDS-Lösung	42 µl	20% (w/V) SDS-Lösung	28 µl
TEMED	7 µl	TEMED	7 µl
10% APS	35 µl	10% APS	35 µl

Tabelle 7: Zusammensetzung Polyacrylamid-Gel



Teil III

ERGEBNISSE



## ERGEBNISSE

---

### 3.1 LACTADHERIN

Die Defizienz des Opsonins Lactadherin bei atherosklerotischen Mäusen führt vermutlich zu einer Anhäufung apoptotischer Zellen in der atherosklerotischen Läsion und forciert so die Atheroprogession [2]. In dieser Arbeit wurde die Regulation der Lactadherin-Expression von Makrophagen und die mögliche Verwendbarkeit des Proteins als Biomarker untersucht. Die Expressionsuntersuchung wurde an zwei Systemen durchgeführt. Zum einen an einer humanen Monocyten-Zelllinie, welche Lactadherin exprimiert und deren Zellen zum makrophagenähnlichen Phänotyp differenziert werden können, und zum anderen am Mausmodell. Es wurden für alle Versuche Tiere der Genotypen  $ApoE^{-/-}$ ,  $GPx1^{-/-}$ ,  $ApoE^{-/-}/GPx1^{-/-}$ , sowie  $LDLR^{-/-}$  auf einem C57/BL6-Hintergrund verwendet, welche zur Induktion der Atherosklerose auf cholesterinreicher Western Type-Diät gehalten wurden. Wildtypische Mäuse entwickeln selbst unter pro-atherogener Diät kaum Läsionen. Um das Krankheitsbild der Atherosklerose untersuchen zu können, muss auf Knock out-Modelle zurückgegriffen werden. Der Ausfall des LDL Rezeptors führt beim Menschen zur familiären Hypercholesterinämie. Das Fehlen des LDLR in der  $LDLR^{-/-}$ -Maus verlängert die LDL und VLDL Halbwertszeit im Plasma und führt, wenn die Tiere mit Western Type-Diät (WTD) gefüttert werden, zur Atherosklerose [117].  $ApoE^{-/-}$ -Tiere sind defizient für das Apolipoprotein E, welches für die Aufnahme von Chylomikron-Remnants in die Leber und den Abbau der VLDL verantwortlich ist. Das Fehlen von Apo E führt beim Menschen unter anderem zu verschiedenen Formen der Hyperlipoproteinämie. Wie auf der MGI-Webseite und von Moghadasian *et al.* beschrieben, konnten wir bei unseren Tieren bei normaler Entwicklung verstärkt atherosklerotische Läsionen im Bereich der Aorta detektieren (<http://www.informatics.jax.org/searches/reference.cgi?74154>; 13.4.2011, [155], s. Abb. 8). Unabhängig vom Lipoproteinstoffwechsel erfüllt das Apolipoprotein E weitere Aufgaben: Es hat einen antioxidativen Effekt und wirkt anti-apoptotisch [97, 211]. Dies wurde nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* beim Menschen beobachtet [110]. Der Knockout des ApoE hat in Mäusen neben der Anhäufung apoptotischer Zellen auch ein verstärktes Auftreten von Makrophagen in den entsprechenden Geweben zur Folge [84]. Ein weiteres, in unserem Institut bereits ausführlich untersuchtes Modell ist die Glutathionperoxidase 1 (GPx-1) knockout Maus. Die Tiere entwickeln zwar keine atherosklerotischen Läsionen, auch wenn sie auf proatherogener Diät gehalten wurden [215],  $GPx1$  Defizienz kann aber zu oxidativem Stress und dadurch zu einer verstärkten Oxidation von LDL führen, sowie eine Neigung

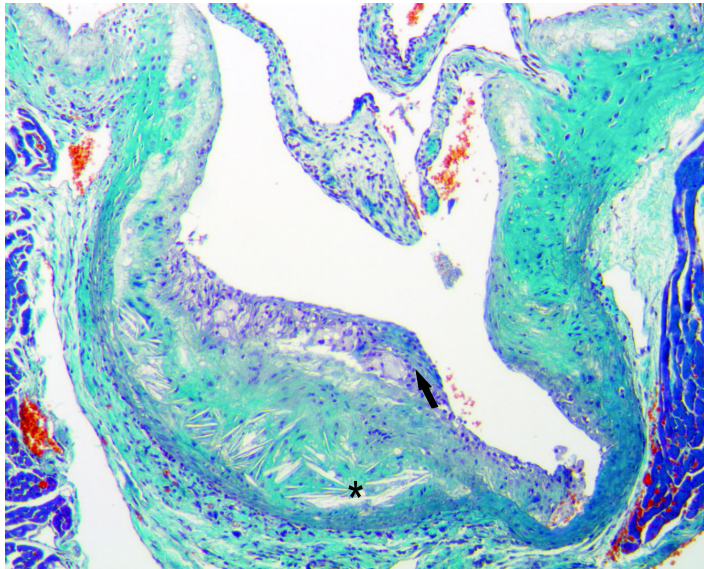


Abbildung 8: Goldner-Färbung Aorta  $ApoE^{-/-}$ -Maus, 100-fach. Die fortgeschrittene Läsion zeigt eine fibröse Kappe (Pfeil) und Cholesterinkristalle (Asterisk).

zu endothelialer Dysfunktion z. B. bei Homocysteinämie und Apoptose zur Folge haben [49, 59, 139]. Um den Einfluss dieser Faktoren auf die Atherosklerose weiter zu untersuchen, wurden  $GPx1^{-/-}$ -Mäuse mit  $ApoE^{-/-}$ -Tieren gekreuzt. Die Doppelknockout-Tiere entwickeln unter WTD stärkere Läsionen als  $ApoE^{-/-}$ -defiziente Einfachknockout-Mäuse. Fortschreitende Diättdauer führt zu einer Plaqueprogression bezüglich Größe und Stadium, belastet aber auch die Tiere, deren Mortalitätsrate proportional zur Diättdauer steigt. Aus diesem Grund wurden die Tiere 12 Wochen auf WTD gehalten. In diesem Zeitraum bilden die Mäuse deutlich nachweisbare Läsionen aus, befinden sich aber noch in einem guten Allgemeinzustand, was nach 24 Wochen Diät nicht mehr bei allen Tieren der Fall ist.

### 3.1.1 Nachweis von Lactadherin im Gewebe

#### *Nachweis von Lactadherin-mRNA in Mausaorten mittels PCR*

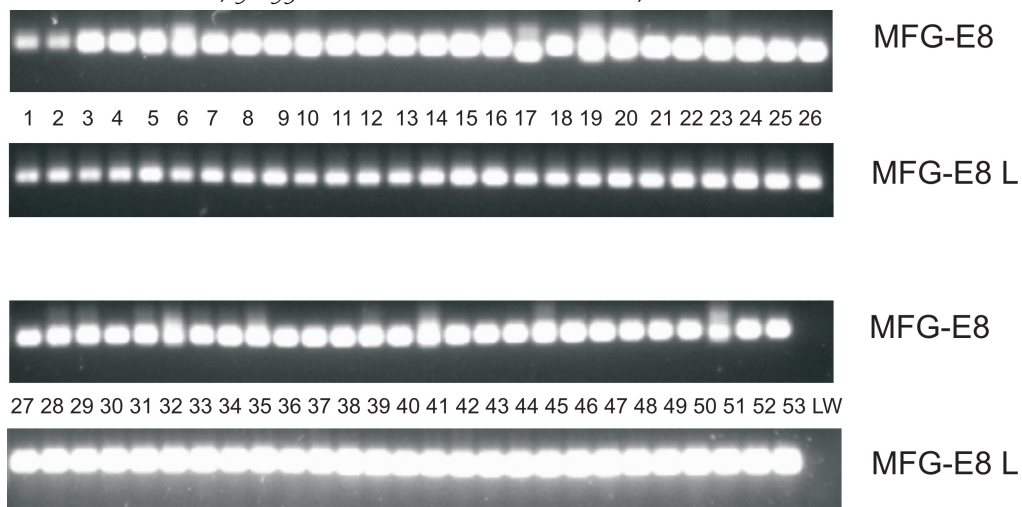
Wie bereits beschrieben (s.Kap. 1.3.2), postulieren Ait-Oufella *et al.*, dass MFG-E8 Einfluss auf die Pathogenese der Atherosklerose hat, bzw. das Fehlen zu einer Anhäufung apoptotischer Zellen in der Läsion führt [2]. Von dieser Arbeitsgruppe wurde Lactadherin immunhistochemisch und mittels Western Blot in humanen und murinen Aorten nachgewiesen. Die von der Arbeitsgruppe gezeigten Ergebnisse der Expressions- und Lokalisationsuntersuchungen sind aber widersprüchlich. Um diese Ergebnisse zu überprüfen, sollte die MFG-E8-Expression in den Aorten von Mäusen im Folgenden er-

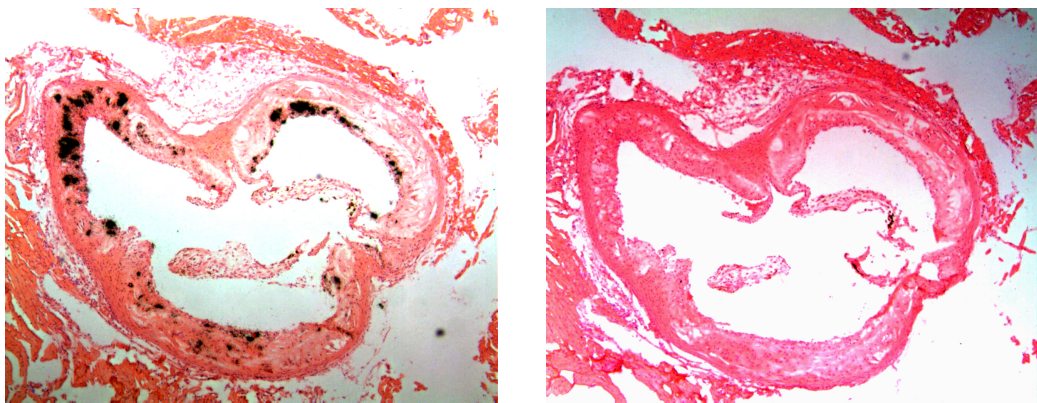
neut untersucht werden. Aus Aorten gewonnene cDNA wurde sowohl mit einem Primerpaar amplifiziert, welches nur die Langform erfasst (MFG-E8 L), als auch mit einem Paar, welches beide Lactadherinformen (MFG-E8) vervielfältigt. Beide MFG-E8-Formen finden sich bei allen untersuchten Genotypen (s. Abb. 9). Lactadherin wird unabhängig davon exprimiert, ob den Tieren Haltungsdiät oder die proatherogen wirkende Western Type-Diät zur Verfügung gestellt wurde. Eine quantitative Aussage kann mit dieser Methode nicht getroffen werden.

#### *Lokalisation von Lactadherin-mRNA in atherosklerotischen Läsionen mittels in situ-Hybridisierung*

Im Folgenden sind die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierung abgebildet. Das Ziel der Methode ist der Nachweis der Lactadherin-RNA *in situ*, um die Lokalisation der Lactadherin-Expression in der Läsion näher bestimmen zu können. Dies ist notwendig, da die vorangegangene PCR lediglich das Vorkommen, nicht aber die Lokalisation nachweist. Die Gewebeschnitte wurden unter dem Mikroskop Leica DM 2000 betrachtet und mit der Kamera Leica DFC 280 aufgenommen. Bewertet wird bei allen Abbildungen die Lokalisation und Intensität des elementaren Silbers, das sich als schwarze Körnung auf den Gewebeschnitten darstellt. Das elementare Ag entsteht durch Reduktion des in der Photoemulsion Hypercoat LM-1 enthaltenen  $\text{Ag}^+$  aufgrund der  $\beta$ -Strahlung des radioaktiven Isotops  $^{33}\text{P}$ . Das  $^{33}\text{P}$  befindet

Abbildung 9: Nachweis von MFG-E8 in Mausearten mittels PCR. Darstellung im Agarose-Gel. MFG-E8: Detektion beider Formen, MFG-E8 L: Detektion der Langform. Beide Formen wurden in allen Proben nachgewiesen. Proben 1-8:  $\text{ApoE}^{-/-}$  WTD (Western Type-Diät), 9-14: Dko WTD, 15-24: B6, 25-26: Positivkontrolle Dünndarm, 27: B6, 28-35:  $\text{ApoE}^{-/-}$ , 36-51: Dko, 52-53: Positivkontrolle Dünndarm, LW: Leerwert





(a) Antisense-Hybridisierung. Signal in der Läsion (schwarz). 50-fache Vergrößerung.

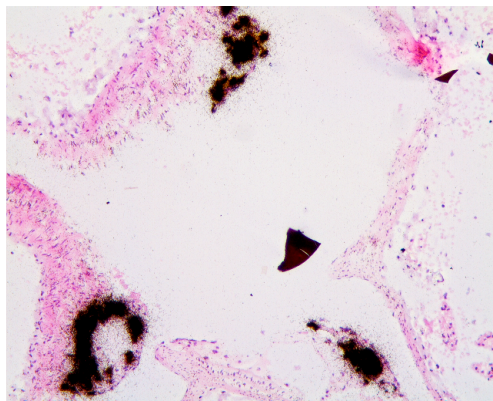
(b) Sense-Hybridisierung. Kontrolle ohne Signal. 50-fache Vergrößerung.

Abbildung 10: Lactadherin-Hybridisierung Aorta  $ApoE^{-/-}$ -Maus.

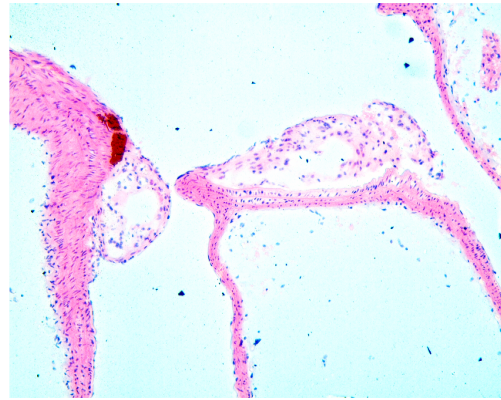
sich an der  $\alpha$ -Position des Phosphatrests des in der *in vitro*-Transkription verwendeten UTPs. Die während der *in vitro*-Transkription erzeugte cRNA-Sonde hybridisiert mit der Zielsequenz auf dem Gewebeschnitt. Folglich entspricht die Position der Silberkörnung auf dem Schnitt der Zielsequenz. Die Ergebnisse sollten aber nicht als absolut angesehen werden, da durch die leichte Streustrahlung des  $^{33}P$  auch elementares Silber in direkter Nähe der Zielsequenz erzeugt werden kann. Desweiteren lässt sich ein leichter Hintergrund oftmals nicht vermeiden. Es wurde jeweils die cRNA von Lactadherin (Sondensequenz s. Anhang) auf Geweben von Mäusen unterschiedlichen Genotyps hybridisiert. Zu jeder Antisense-Hybridisierung wurde eine entsprechende Sense-Kontrolle durchgeführt. Bei dieser wurde eine revers orientierte Sonde ( $3' \rightarrow 5'$ ) auf das Gewebe gegeben. Diese kann unter normalen Umständen nicht mit der Zielsequenz hybridisieren. Signale auf diesen Schnitten entsprechen lediglich dem Hintergrund. Die Existenz eines Hintergrundsignals sollte in die Bewertung der Antisense-Hybridisierung einbezogen werden. Alle Präparate wurden HE gefärbt.

Sowohl in der Aorta der  $ApoE^{-/-}$ , der  $ApoE^{-/-}/GPx1^{-/-}$  (Abb. 10a, 11c) als auch der  $LDLR^{-/-}$ -Maus (Abb. 12a) sind starke Signale im Bereich der Tunica intima zu erkennen. Diese Signale befinden sich ausschließlich im Bereich der atherosklerotischen Läsion und hier wiederum in nicht nekrotisierten und zum Teil mit Cholesterinkristallen durchsetzten Bereichen. Nicht betroffen sind die Gefäßklappen. In den Sense-Kontrollen ist kaum Körnung zu sehen. Ergibt sich ein dezentes Hintergrundsignal, dann erscheint es gleichmäßig über das Gewebe verteilt.

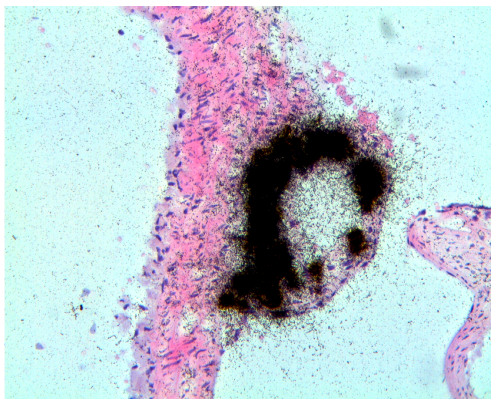
Bei allen Maus-Genotypen (exemplarisch gezeigt:  $ApoE^{-/-}/GPx1^{-/-}$ -Maus, Abb. 11c) tritt das Signal im zelligen Bereich der atherosklerotischen Läsion



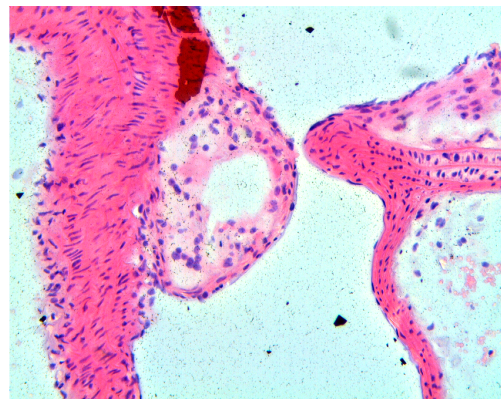
(a) Antisense-Hybridisierung. Signal in der Läsion (schwarz). 100-fache Vergrößerung.



(b) Sense-Hybridisierung. Kontrolle ohne Signal. 100-fache Vergrößerung.



(c) Antisense-Hybridisierung. Signal in der Läsion (schwarz). 200-fache Vergrößerung.

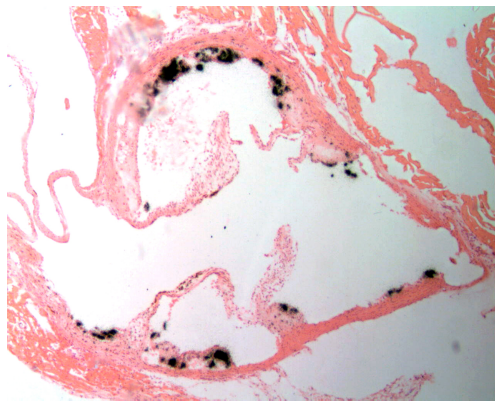


(d) Sense-Hybridisierung. Kontrolle ohne Signal. 200-fache Vergrößerung.

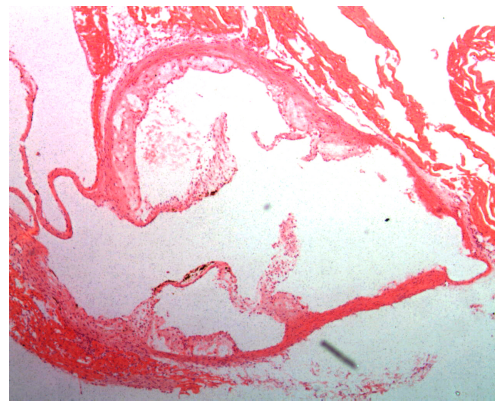
Abbildung 11: Lactadherin-Hybridisierung Aorta  $ApoE^{-/-}/GPx1^{-/-}$ -Maus.

auf, in der Media findet sich kein Signal. Das Muster der Lactadherin-mRNA Expression in der Läsion, mit Betonung der um den Lipid-Core gelegenen, schaumig aufgetriebenen Zellen, legt nahe, dass das Protein hauptsächlich in zu Schaumzellen differenzierten Makrophagen abgeschrieben wird. Zwischen  $LDLR^{-/-}$ ,  $ApoE^{-/-}$  und Dko-Tieren ist kein Unterschied bezüglich Lokalisation und Intensität der Anfärbung der Läsionen zu erkennen. Voraussetzung für die erfolgreiche Hybridisierung ist allerdings die Entwicklung einer Läsion, was bei den Tieren der obigen Genotypen (Alter ca. 36 Wochen) durch 12-wöchige Fütterung mit Western Type-Diät induziert wurde.

Um Sensitivität und Spezifität der Hybridisierung abzuschätzen, wurden zudem Kontrollorgane untersucht. Wie erwartet fand sich auf dem Präparat des Ileums einer Maus (Abb. 13a) im Peyerschen Plaque ein starkes Signal. Die Sense-Kontrolle zeigt lediglich eine distinkte Körnung, aber keine Färbung des lymphatischen Gewebes. Die Kontrolle wurde nicht abgebildet.

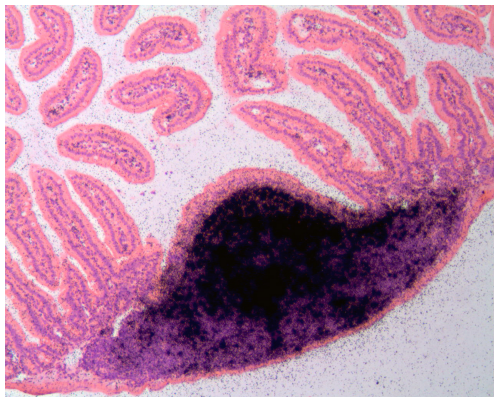


(a) Antisense-Hybridisierung. Signal in der Läsion (schwarz). 50-fache Vergrößerung.

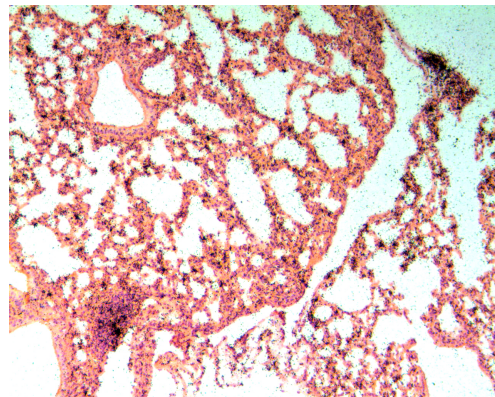


(b) Sense-Hybridisierung. Kontrolle ohne Signal. 50-fache Vergrößerung.

Abbildung 12: Lactadherin-Hybridisierung Aorta  $LDLR^{-/-}$ -Maus.



(a) Darm. Antisense-Hybridisierung. Signal im Peyer'schen Plaque (schwarz). 100-fache Vergrößerung. Sense-Hybridisierung nicht abgebildet.



(b) Lunge. Antisense-Hybridisierung. Gleichmäßige Signal (schwarz). 100-fache Vergrößerung. Sense-Hybridisierung nicht abgebildet.

Abbildung 13: Lactadherin-Hybridisierung Darm und Lunge Maus.

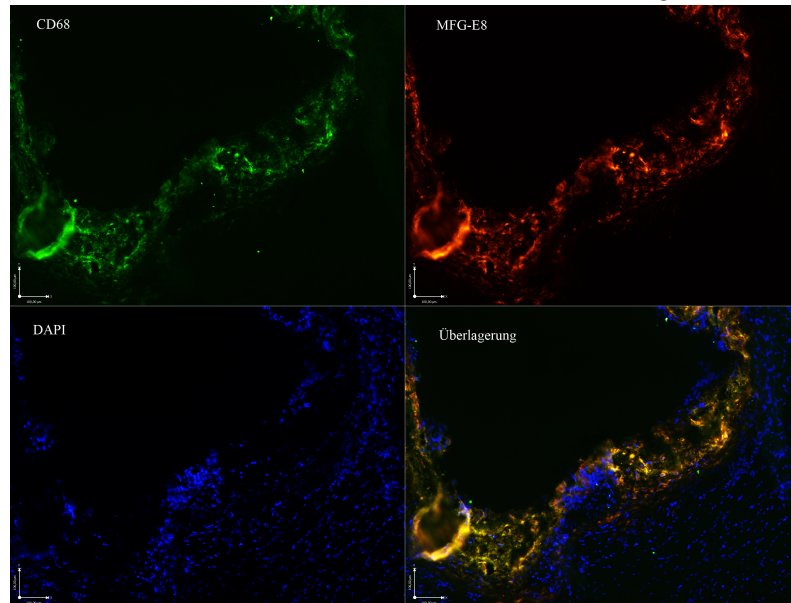
Die Lunge (Abb. 13b), die ebenfalls als Positivkontrolle dient, zeigt punktuelle Signale. Die Alveolarmakrophagen imponieren, als in das Lungengewebe eingestreute Bereiche mit starker Signalintensität. Auch in Abschnitten lymphatischen Gewebes sind Signale zu beobachten. Lunge und Darm zeigen über alle Genotypen hinweg identische Hybridisierungsmuster.

#### *Nachweis des Lactadherin-Proteins mittels Immunfluoreszenz*

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Immunfluoreszenz auf Kryopräparaten abgebildet. Dies dient dem Expressionsnachweis von Lactadherin auf Proteinebene und der Zuordnung der Expression zu bestimmten Zelltypen. Zusätzlich sollte eine eventuelle Kolo-kalisation mit anderen Proteinen geklärt werden. Neben Lactadherin wurden CD68 und Fraktalkin nachgewiesen.



Abbildung 14: Aortensinus *ApoE*<sup>-/-</sup>-Maus, 100-fach. Grün: CD68, rot: MFG-E8, blau: DAPI, Kolokalisation CD68 und MFG-E8: gelb



Bei CD 68 handelt es sich um einen Makrophagenmarker. Die Kolokalisation mit Fraktalkin wurde untersucht, da dieses Chemokin in Makrophagen vermutlich die Lactadherin-Expression reguliert (s. Kap. 1.1.2). Die Gewebeschnitte wurden unter dem Mikroskop Leica DM6000 B betrachtet und mit der Kamera Ocracore ER aufgenommen. Bewertet wird bei allen Abbildungen die Lokalisation und Intensität der Fluoreszenz. Die Empfindlichkeit der Kamera wurde so justiert, dass die Autofluoreszenz der Gewebe nicht detektiert wird. Die Fluoreszenz auf dem Schnitt entspricht der Position des untersuchten Proteins. DAPI interkaliert mit der Doppelstrang-DNA des Kerns, welcher unter UV-Anregung blau erscheint. Zu jedem Präparat wurde auch eine Negativkontrolle mitgeführt. Diese wird wie das eigentliche Präparat behandelt, lediglich die primären Antikörper werden nicht auf das Gewebe gegeben. Dies ermöglicht die Detektion einer unspezifischen Hintergrundfärbung, z.B. durch den sekundären Antikörper. Da diese Färbung sehr schwach, und mit der Kamera nicht detektierbar war, ist sie im Folgenden nicht dargestellt. Nachgewiesen wurden Lactadherin, CD 68 und Fraktalkin auf Aorten von Mäusen des Genotyps *ApoE*<sup>-/-</sup> (s. Abb 14 und 15) und Doppelknockout-Mäusen (s. Abb. 16 und 17), die im Alter von 24 Wochen für weitere 12 Wochen mit Western Type-Diät gefüttert wurden. Bei beiden Genotypen ist die Proteinexpression annähernd identisch.

Abbildung 15: Aortensinus  $ApoE^{-/-}$ -Maus, 100-fach. Grün: Fraktalin, rot: MFG-E8, blau: DAPI, Kolokalisation Fraktalin und MFG-E8: gelb

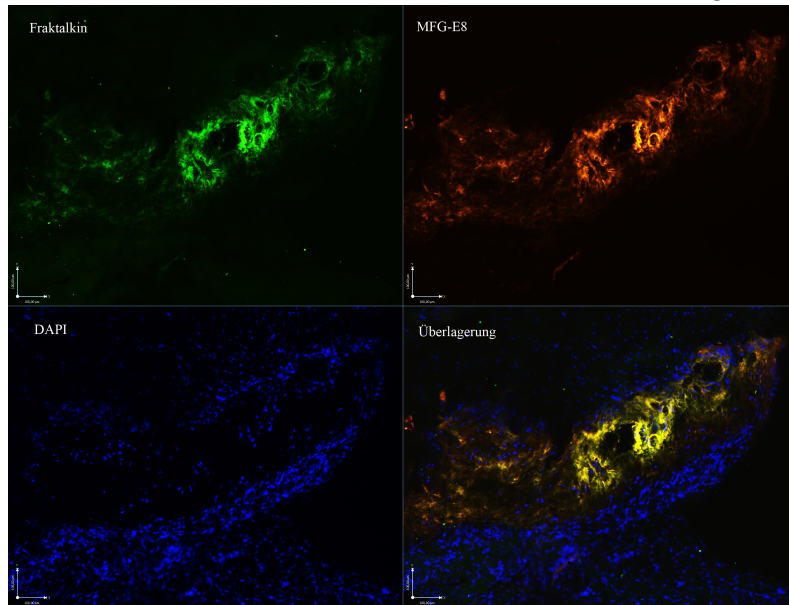
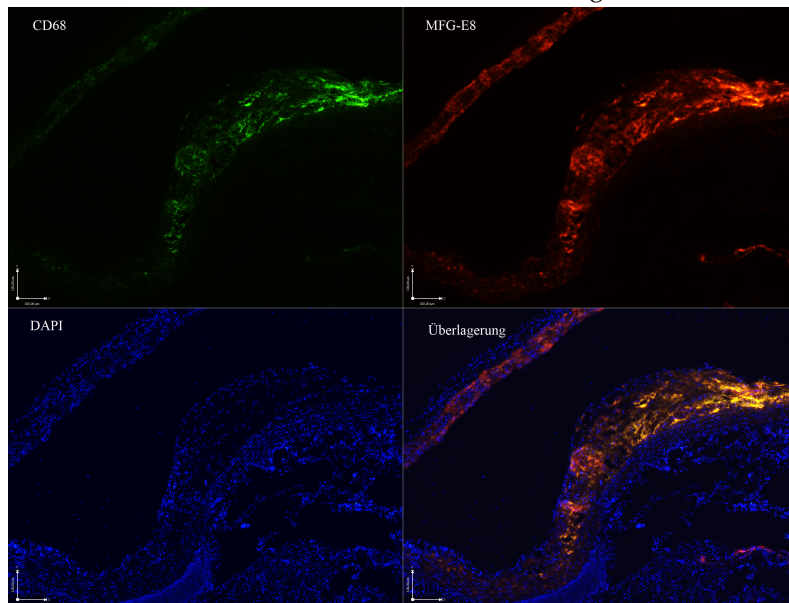
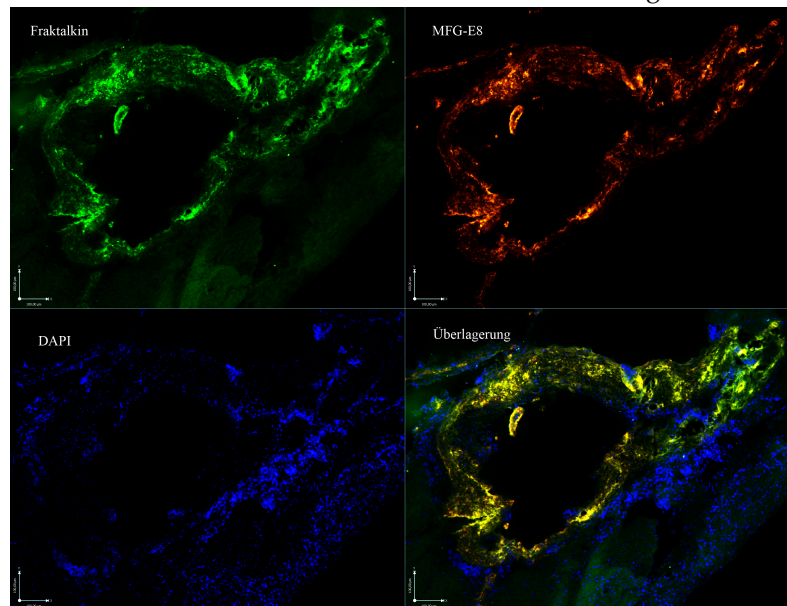


Abbildung 16: Aortensinus Dko-Maus, 50-fach. Grün: CD68, rot: MFG-E8, blau: DAPI, Kolokalisation CD68 und MFG-E8: gelb



Wie bei der *in situ*-Hybridisierung ist auch bei der Immunfluoreszenz ein Lactadherin-Signal (rot) entlang der Intima zu sehen. Dieses Signal erstreckt sich allerdings nicht bis in die Media, wie in der Kernfärbung mit DAPI (blau) zu erkennen ist. Im Bereich der stärksten Lactadherinfluoreszenz sind die DAPI-gefärbten Zellkerne unregelmäßig angeordnet (Läsionen), wäh-

Abbildung 17: Aortensinus Dko-Maus, 50-fach. Grün: Fraktalkin, rot: MFG-E8, blau: DAPI, Kolokalisation Fraktalkin und MFG-E8: gelb

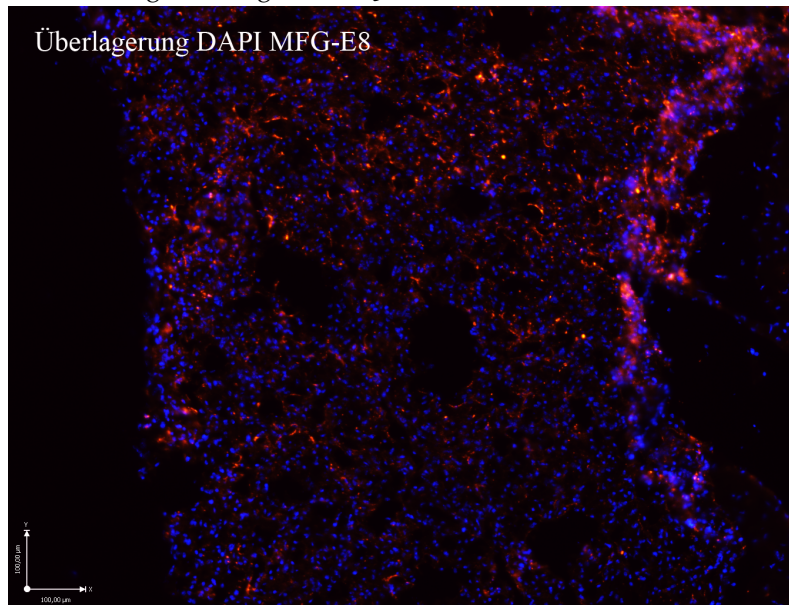


rend ihre Verteilung ansonsten sehr homogen ist (übriges Gewebe). In der Überlagerung ist zu erkennen, dass Lactadherin sowohl mit dem Makrophagenmarker CD68, als auch mit Fraktalkin (beides grün) kolokalisiert, die Überlagerung erscheint gelb. Die Fluoreszenzintensitäten von Lactadherin zu CD68 oder Fraktalkin sind jeweils annähernd proportional. Als Positivkontrolle wurden die Alveolarmakrophagen der Lunge einer Maus mit MFG-E8 angefärbt. Über das Gewebe verteilt sind Zellen Lactadherin-positiv und leuchten rot. Die Kolokalisation der Proteine bestätigt die Beobachtungen der *in situ*-Hybridisierung: Lactadherin wird von Makrophagen exprimiert. Auch Fraktalkin kommt zusammen mit MFG-E8 vor. Die Untersuchung der Kontrollorgane deckt sich mit den Ergebnissen der RTD-PCR (s. Folgekapitel); der Darm und besonders die Lunge mit ihrer hohen Makrophagendichte weisen ein deutliches Lactadherin-Vorkommen auf.

### 3.1.2 Quantifizierung der Lactadherin mRNA

Neben der Lokalisation sollte auch die Quantität der Lactadherin mRNA bzw. deren Regulation bestimmt werden. Nach den Beobachtungen von Ait-Oufella *et al.* stellte sich die Frage, wo Lactadherin in welchem Maße vorkommt, und ob es in den Makrophagen der Läsion reguliert wird. Als Ursache für die Regulation kommt neben der Apoptose auch proatherogen wirkendes, modifiziertes LDL in Frage. Da isolierte Läsionsmakrophagen nicht für die Untersuchung zur Verfügung stehen, wurde auf primär kultivierte Peritonealmakrophagen der Maus zurückgegriffen; so kann zudem

Abbildung 18: Lunge Maus, 50-fach. Rot: MFG-E8, blau: DAPI



ein möglicher Einfluss unterschiedlicher Genotypen erfasst werden. Zusätzlich wurde eine immortale Tumorzelllinie untersucht. Im Vergleich mit den Peritonealmakrophagen der Maus hat eine Tumorzelllinie den Vorteil, dass genetisch homogenes Untersuchungsmaterial in großer Menge zur Verfügung steht.

#### *Kontrolle der RNA-Qualität im RNA-Gel*

1 - 5 µg RNA wurden nach der Isolierung im Glyoxal-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Anhand des Verhältnisses der rRNA

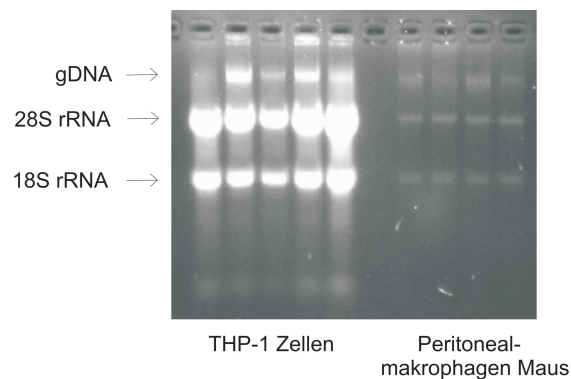


Abbildung 19: Überprüfung der RNA-Qualität im Glyoxal-Gel anhand des 28S/18S rRNA-Verhältnisses. Die Verhältnisse der ribosomalen RNA zueinander sind ähnlich.

mit den Sedimentationskonstanten 18 und 28S wird die Qualität eingeschätzt. Sind die Verhältnisse gleich, so ist die RNA nicht degradiert und kann für die Quantifizierung eingesetzt werden. Die Quantifizierung störende genomische DNA wird durch Zugabe von DNase verdaut. In Abb. 19 ist exemplarisch die gesamtRNA von THP-1 Zellen sowie von murinen Peritonealmakrophagen aufgetragen. Die unterschiedliche Intensität der Banden ist durch unterschiedliche Mengen an aufgetragener RNA zu erklären.

#### *Real time detection-PCR zur semiquantitativen Detektion der mRNA-Expression*

Die Echtzeit-Polymerasekettenreaktion oder Real time detection-PCR (RTD-PCR, im Unterschied zu RT-PCR: Reverse Transkription) dient der Quantifizierung von RNA und damit der Analyse von Expressionsmustern. Aus Zellen oder Gewebe isolierte RNA wird revers zu cDNA transkribiert und im LightCycler 2.0 mit SYBR Green I quantifiziert. Die Fluoreszenzintensität des SYBR Green I zu Beginn der exponentiellen Phase wird zur Quantifizierung herangezogen. Bestimmt wird das Verhältnis des "gene of interest" zu einem Haushaltsgen, in diesem Fall 18S rRNA. Die Effizienz eines jeden Primerpaares wurde durch die Erstellung einer Standardkurve bestimmt, welche in die Berechnung miteingeflossen ist. Wurde das zu untersuchende Gen nicht im selben Lauf mit dem Haushaltsgen analysiert, so kam in beiden Einzelläufen jeweils ein identischer Kalibrator zum Einsatz. Die Werte des Kalibrators wurden zueinander in Bezug gesetzt und anhand dessen die Ergebnisse beider Läufe normalisiert. Je Ansatz wurden 15 ng cDNA eingesetzt, zusätzlich lief eine cDNA-freie Kontrolle mit. Auch die RNA wurde in dieser Form amplifiziert, um so die Anwesenheit genomischer DNA auszuschließen, die die Ergebnisse verfälscht hätte. Im Balkendiagramm dargestellt sind die Mittelwerte aus n Versuchen, der Fehlerbalken beschreibt den Standardfehler des Mittelwerts. Bei der Expressionshöhe handelt es sich um keine absoluten Werte, die Ziffern der Ordinate sind arbiträr. Verglichen werden lediglich die Verhältnisse der einzelnen Werte zueinander. Die Signifikanzhypothese wurde mit dem T-Test geprüft, die Normalverteilung mit dem Chi-square Test, wenn die Gruppengröße dies zugelassen hat. Es wurden Kurz- und Langform des murinen Lactadherins quantifiziert. Eindeutige Unterschiede im Expressionsmuster weisen auf verschiedene Transkripte in unterschiedlichen Zelltypen mit möglicher physiologischer Bedeutung hin (s. Kap. 1.3.1). Werden die beiden Formen gleich stark exprimiert, so ist dies als Bestätigung der Ergebnisse zu werten, da unterschiedliche Primer / PCR-Produkte zu ähnlichen Ergebnissen führen.

**UNTERSUCHUNG DER LACTADHERIN-EXPRESSION IM MAUSMODELL UND DEREN BEDEUTUNG** Mit Hilfe der RTD-PCR wurde die Expression von Lactadherin in verschiedenen Geweben und Zellen der Maus untersucht (Abb. 20). Eine besonders hohe Expression in bestimmten Geweben lässt möglicherweise Rückschlüsse auf die Funktion von Lactadherin zu. Die geringste Expression findet sich in der Leber, die Expression in der Lunge ist um das

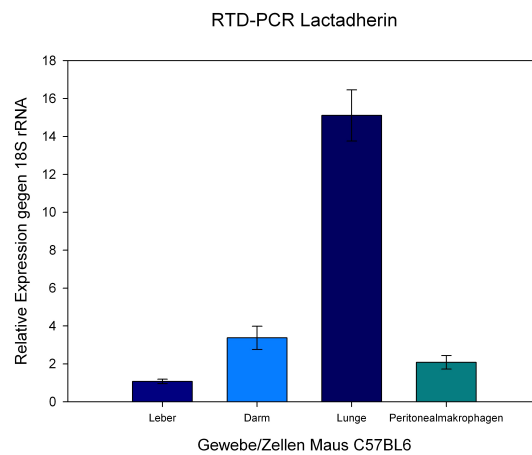


Abbildung 20: Bestimmung der Lactadherin-Expression in verschiedenen Gewebe- und Zelltypen der Maus.

15-fache höher, auch der Darm zeigt eine dreifach so hohe Expression, wie die Leber. Die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierung und der Immunfluoreszenz legen nahe, dass Lactadherin in den untersuchten Organen fast ausschließlich in Makrophagen und eventuell in weiteren Immunzellen lymphatischer Gewebe exprimiert wird.

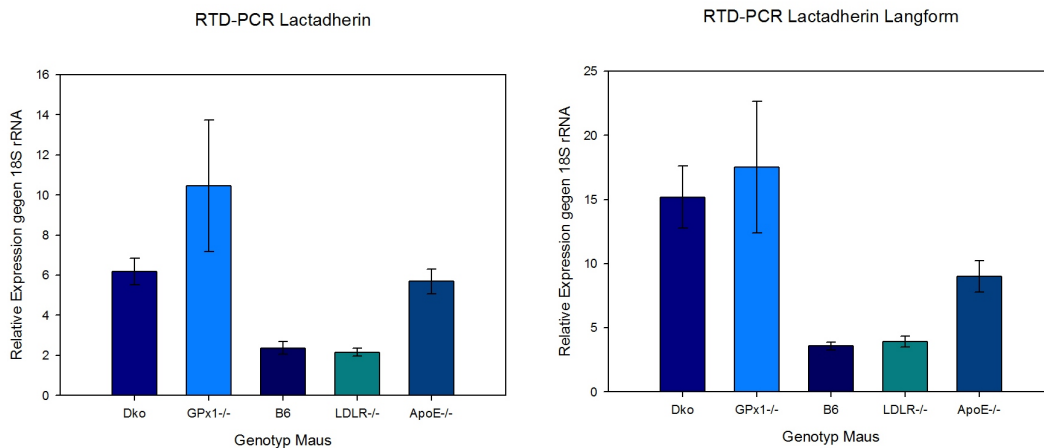
Im Folgenden soll die Frage geklärt werden, aus welchem Grund Makrophagen-Typen wie Alveolarmakrophagen und Schaumzellen wesentlich mehr Lactadherin exprimieren, als andere Makrophagen. Als Modell kamen murine Peritonealmakrophagen zum Einsatz, die primär kultivierbar und damit auch gezielt stimulierbar sind. Gerade weil ihr Expressionsniveau nicht dem der Schaumzellen in der Läsion entspricht, könnten Stimulationsexperimente Auskunft über mögliche Stimuli geben, die in der Lage sind, Expressionssteigerungen ähnlich denen in der Läsion zu verursachen.

#### Untersuchung der Lactadherin-Expression bei verschiedenen Genotypen

Die Abbildungen 21a bis 23b zeigen unterschiedliche Berechnungen einer identischen Untersuchungsreihe. In Abbildung 21a und 21b ist die Expression von Lactadherin in thioglykolatrekrutierten Peritonealmakrophagen der Maus dargestellt. Die Mäuse (drei bis sechs Tiere pro Gruppe) waren 36 Wochen alt. Die Lactadherin-Expression ist bei der wildtypischen C57BL/6 Maus ähnlich der Expression der *LDLR*<sup>-/-</sup>-Tiere. Auch das Expressionsniveau von *ApoE*<sup>-/-</sup> und *ApoE*<sup>-/-</sup>/*GPx1*<sup>-/-</sup>-Tieren ist gleich, aber dreimal höher als das des Wildtyps. Die Expression der *GPx1*-defizienten Makrophagen ist dem Niveau, der *ApoE*-defizienten sehr ähnlich. Das Expressionsmuster der

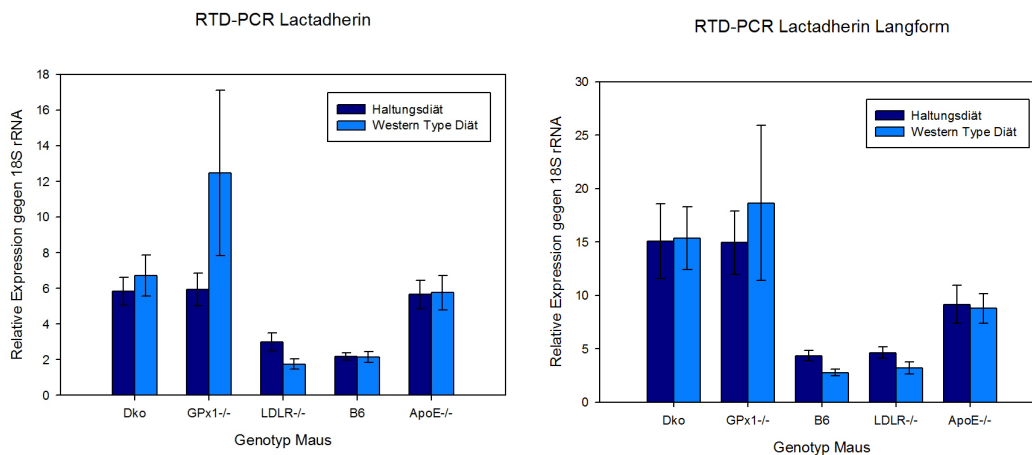
		MFG-E8 Expression		MFG-E8-L Expression	
gegenüber		Erhöhung um Faktor	Signifikanzniveau	Erhöhung um Faktor	Signifikanzniveau
B6	Dko	2,87	p < 0,0001	4,26	p < 0,0001
	GPx-1 ko	4,85	p < 0,005	4,91	p < 0,005
	Apo E ko	2,64	p < 0,0001	2,52	p < 0,0001
	LDLR ko	1,09	n.s.	1,10	n.s.
LDLR ko	Dko	2,62	p < 0,0001	3,88	p < 0,0005
	GPx-1 ko	4,44	p < 0,05	4,48	p < 0,05
	Apo E ko	2,413	p = 0,0001	2,30	p < 0,001

Tabelle 8: Signifikanz der Lactadherin-Expression bei verschiedenen Genotypen der Maus. n.s.: nicht signifikant



- (a) Die Lactadherin-Expression der *LDLR*-defizienten Mäuse liegt auf dem Niveau des Wildtyps, die der übrigen Genotypen steigt um das Doppelte bis Dreifache.
- (b) Die Lactadherin-L-Expression der *LDLR*-defizienten Mäuse liegt auf dem Niveau des Wildtyps, die der übrigen Genotypen steigt um das Doppelte bis Dreifache.

Abbildung 21: Lactadherin-Expression in Peritonealmakrophagen von Mäusen unterschiedlichen Genotyps. Signifikanz s. Tab. 8

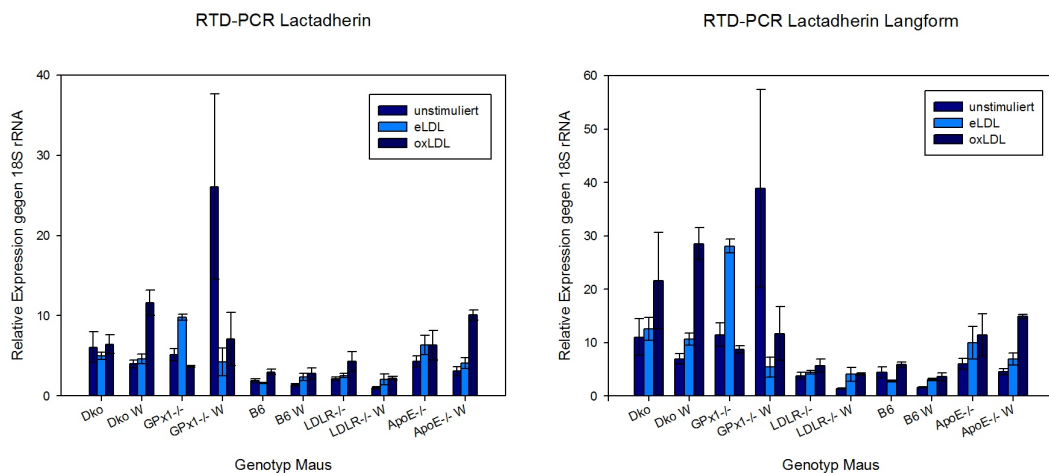


- (a) Die Lactadherin-Expression der *LDLR*-defizienten Mäuse bleibt unverändert, die der übrigen Genotypen steigt um das Doppelte bis Vierfache.
- (b) Die Lactadherin-L-Expression der *LDLR*-defizienten Mäuse bleibt unverändert, die der übrigen Genotypen steigt um das Doppelte bis Vierfache.

Abbildung 22: Lactadherin-Expression in Peritonealmakrophagen von Mäusen unterschiedlichen Genotyps, auf unterschiedlichen Diäten gehalten.

Langform ist mit dem des Gesamtlactadherins annähernd identisch. Die Unterschiede der Expressionshöhe gegenüber dem Wildtyp ist bei allen Knockout-Mäusen signifikant, mit Ausnahme des *LDLR*-Knockouts. Das Signifikanzniveau ist in Tab. 8 angegeben.





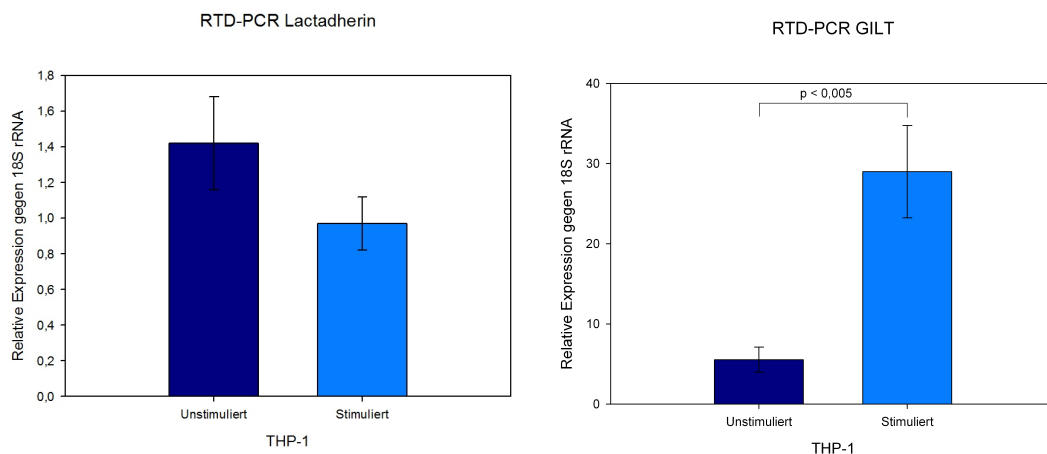
(a) Die LDL-Stimulation hat keinen entscheidenden Einfluss auf die Lactadherin-Expression (b) Die LDL-Stimulation hat keinen entscheidenden Einfluss auf die Lactadherin-L-Expression

Abbildung 23: Lactadherin-Expression in Peritonealmakrophagen von Mäusen unterschiedlichen Genotyps, auf unterschiedlichen Diäten gehalten, stimuliert mit modifiziertem LDL.

**Untersuchung der Lactadherin-Expression nach proatherogener Diät** Werden die Genotypen nach Diät aufgeteilt (zwei bis drei Tiere je Gruppe, 12 Wochen Western Type-Diät), ändert das wenig am bereits beschriebenen Ergebnis (s. Abb. 22a und 22b). Die Expression des Gesamtlactadherins als auch der Langform ist bei *ApoE*<sup>-/-</sup>- und Dko-Mäusen doppelt so hoch wie bei *LDLR*<sup>-/-</sup>- und B6-Tieren.

**Untersuchung der Lactadherin-Expression nach Stimulation mit LDL** Die durch Peritoneallavage aus einem Tier (zwei bis drei Tiere je Gruppe) gewonnenen, thioglykolatrekrutierten Makrophagen wurden auf drei Schalen verteilt. 72 h nach Aussaat wurden die Zellen für 14 h mit enzymatisch und oxidativ modifiziertem LDL inkubiert (10 µg/ml). Die Zellen der dritten Schale wurden nicht stimuliert. Bei der Bestimmung der Expression ergibt sich für Gesamtlactadherin und die Langform ein ähnliches Bild (Abb. 23a und 23b). Durch die Zugabe von modifizierten LDL wird die Variabilität der Messwerte zwar deutlich gesteigert, signifikante Unterschiede bezüglich der Lactadherin-Expression zwischen unstimulierten und mit eLDL oder oxLDL inkubierten Peritonealmakrophagen finden sich jedoch weder bei Mäusen eines bestimmten Genotyps, noch bei Mäusen auf Western Type Diät.

Da die Tiere auch innerhalb einer Gruppe sehr individuelle Lactadherin-Expression zeigten, wurden die Versuche zusätzlich an einer permanenten Zelllinie durchgeführt. Die Zellen sind in ihrer phänotypischen Ausprägung homogen und bieten zusätzlich die Möglichkeit der Differenzierung.

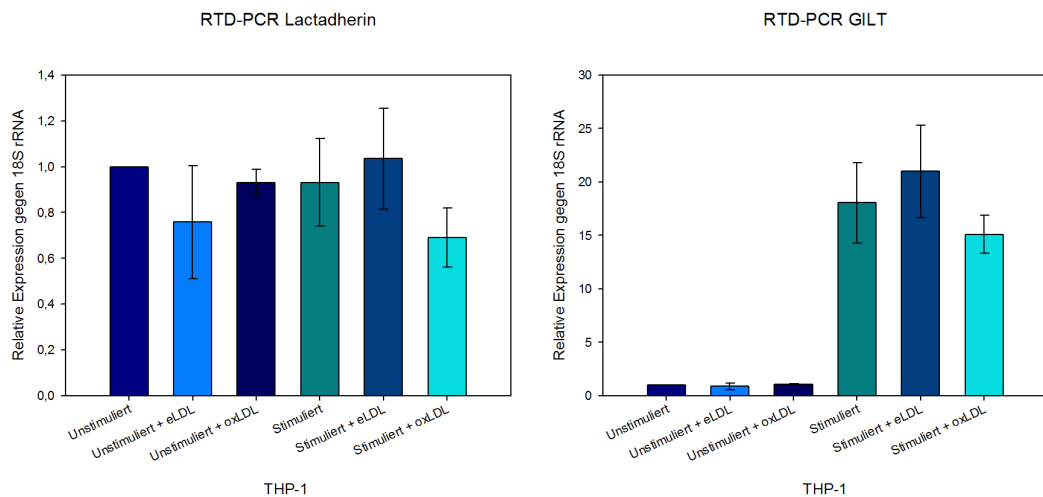


(a) Die Lactadherin-Expression ist in beiden Differenzierungsstadien ähnlich. (b) Die GILT-Expression ist bei differenzierten Zellen erhöht.

Abbildung 24: Expression von Lactadherin und GILT in THP-1-Zellen mit und ohne Stimulation.

**UNTERSUCHUNG DER LACTADHERIN-EXPRESSION IN THP-1-ZELLEN** Wie bei den murinen Peritonealmakrophagen wurde bei der humanen Tumorzelllinie THP-1 die Lactadherin-Expression vor dem Hintergrund verschiedener Stimulanzen untersucht. Bei THP-1 handelt es sich um Zellen einer akuten myeloischen Leukämie (AML M<sub>5</sub>). Diese Monocyten lassen sich durch Zugabe von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  zu einem makrophagenähnlichen Phänotyp differenzieren. Der Vorteil dieser Zelllinie ist die Expressionsuntersuchung sowohl bei Monocyten als auch Makrophagen identischen Genotyps. Die Differenzierung zum Makrophagen wurde sowohl morphologisch (Pappenheim-Färbung von Dünnschichtpräparaten, nicht abgebildet) als auch auf RNA-Ebene nachgewiesen. Zu diesem Zweck wurde der Makrophagenmarker GILT untersucht. Bei GILT ( $\gamma$ -IFN induzierbare lysosomale Thiolreduktase) handelt es sich nicht um einen klassischen Marker, wie beispielsweise ein "cluster of differentiation", sondern vielmehr um eine Protease, die in den Lysosomen der Makrophagen besonders stark akkumuliert [10]. Auch die Protease Cathepsin D wurde hinsichtlich ihrer Expression untersucht und zeigte nach Differenzierung einen deutlichen, wenn auch nicht so starken Anstieg wie GILT (Daten nicht dargestellt).

**Untersuchung der Lactadherin-Expression nach Differenzierung** In Abb. 24b ist der Anstieg von GILT nach Stimulation der Zellen mit IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  aufgetragen. Die GILT-Expression steigt in den differenzierten Zellen um das 15-fache an. Die Lactadherin-Expression verändert sich nicht signifikant (Abb. 24a), ein Hinweis darauf, dass allein die Differenzierung zum Makrophagen nicht zu der enormen Hochregulation führt, wie dies in den Schaumzellen der atherosklerotischen Läsion zu beobachten ist.

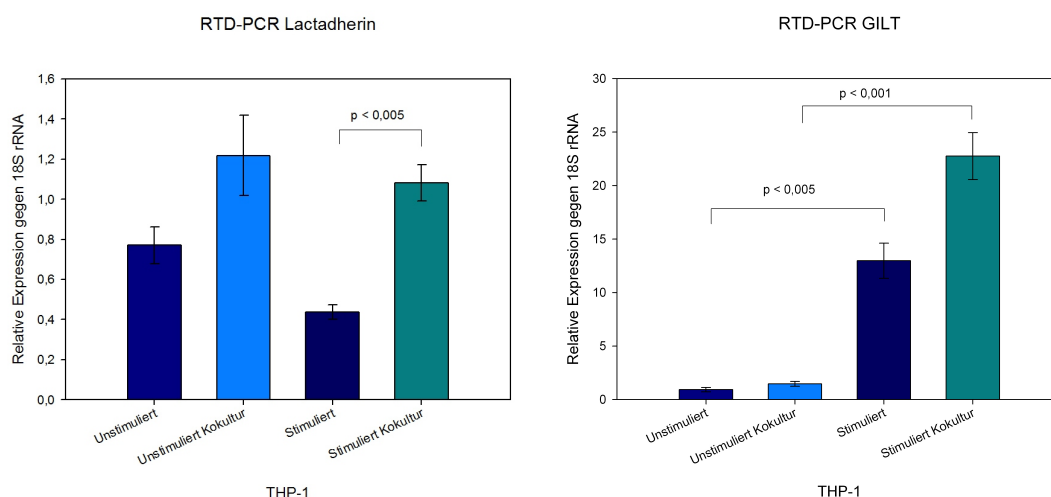


(a) Die Lactadherin-Expression ist unter Einfluss aller Stimulanzen ähnlich. (b) Die GILT-Expression ist bei differenzierte Zellen erhöht, LDL nimmt keinen Einfluss.

Abbildung 25: Expression von Lactadherin und GILT in THP-1-Zellen mit und ohne Stimulation mit Cytokinen und modifiziertem LDL.

**Untersuchung der Lactadherin-Expression nach Stimulation mit LDL** Um analog den murinen Peritonealmakrophagen- modifizierte LDL als Ursache für die Lactadherin-Expression zu untersuchen, wurden differenzierte und undifferenzierte THP-1-Zellen mit 10 µg/ml eLDL und oxLDL über 14 h inkubiert. Die Lactadherin-Expression ändert sich nicht (Abb. 25a), die Expression von GILT steigt nach der Zugabe von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  massiv an (s. Abb. 25b) wie dies schon zuvor zu beobachten war (Abb. 24b). Die LDL-Zugabe hat aber, wie bei Lactadherin, keinen Einfluss auf das Expressionsmuster.

**Untersuchung der Lactadherin-Expression nach Kokultur mit apoptotischen Zellen** Da weder die Differenzierung noch die LDL-Beladung Einfluss auf die Lactadherin-Expression hat, wurde Kontakt zu apoptotischen Zellen als weiterer möglicher Faktor untersucht. Apoptotische Zellen kommen gehäuft in der atherosklerotischen Plaque vor, und werden via Lactadherin von Makrophagen phagozytiert (s. Kap. 1.3.2). In den Abbildungen 26a und 26b sind die Ergebnisse der Kokultur-Experimente dargestellt. Unbehandelte oder mit IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  präinkubierte THP-1-Zellen wurden mit CHO-K1-Zellen in einer Boyden-Kammer kokultiviert. Die CHO-K1-Zellen wurden mit 60 nM Okadeinsäure vorbehandelt. Okadeinsäure, ein Protein Phosphatase 1- und 2A-Inhibitor, führt bei diesen Zellen zur Apoptose. Die 24-stündige Kokultur der THP-1-Zellen mit den apoptotischen CHO-K1-Zellen erhöht die Lactadherin-Expression um das Dreifache. Dies geschieht sowohl bei Zellen mit Monocyten- als auch mit Makrophagen-ähnlichem Phänotyp. Auch bei



(a) Ein Teil der Zellen wurde in Kokultur mit apoptotischen CHO-K1-Zellen gehalten, dies erhöht die Lactadherin-Expression. (b) Ein Teil der Zellen wurde in Kokultur mit apoptotischen CHO-K1-Zellen gehalten, dies erhöht die GILT-Expression geringfügig.

Abbildung 26: Expression von Lactadherin und GILT in THP-1-Zellen mit und ohne Stimulation.

GILT steigt die Expression an, allerdings deutlich schwächer als bei Lactadherin.

Weder das Differenzierungsstadium noch die Beladung mit modifizierten LDL haben Einfluss auf die Lactadherin-Expression bei Monocyten/Makrophagen. Der Kontakt mit apoptotischen Zellen hingegen erhöht diese deutlich.

### 3.1.3 Proteinexpression und Aufreinigung

Da Lactadherin als möglicher Marker für die Atherosklerose beim Menschen in Frage kam, sollte ein ELISA für die quantitative Messung von MFG-E8 in humanem Serum entwickelt werden. Da bisher kein günstiges, prokaryot exprimiertes Protein kommerziell erhältlich ist, und eukaryot exprimiertes Lactadherin zu teuer ist um es im großen Maßstab als ELISA-Standard einzusetzen, war das Ziel, selbst ein prokaryotes Expressionssystem für MFG-E8 zu erzeugen.

**PROTEINEXPRESSION** Rekombinantes humanes Lactadherin wurde prokaryot exprimiert, um es beispielsweise als Standard für ein ELISA einsetzen zu können. Der das Insert enthaltende Vektor wurde in das Expressionssystem Rosetta2 pLysS kloniert. Der *E. coli*-Stamm Rosetta2 stellt seltene Codons zur Verfügung und hat eine hohe Toleranz gegenüber toxischen Inserts. Dennoch war lediglich die Expression eines C-terminalen Fragments von Lactadherin möglich (Sequenz s. Anhang). Das Gesamtprotein als auch ein N-terminales Fragment waren nicht exprimierbar. Die Expression des C-Terminus konnte

im SDS-Gel und auch auf dem Western Blot nachgewiesen werden (Daten nicht abgebildet).

**PROTEINAUFREINIGUNG** Das rekombinant exprimierte Protein wurde über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigt. Es konnte in reiner Form im SDS-Gel und im Western Blot nachgewiesen werden. Zum Aufbrechen der Einschlusskörperchen erfolgte die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen. Während der schrittweisen Renaturierung präzipitierte das Protein, wenn der pH über 5,5 angehoben wurde, oder der Harnstoffgehalt unter 1 mol/l fiel. Dies geschah sowohl bei Verwendung des D-Tube Mega Dialysers als auch bei der Verwendung einer Zentrifugationssäule zum Umpuffern. Bei Absenken des pH-Wertes oder Erhöhen der Harnstoffkonzentration ging das Protein wieder in Lösung. Nach Renaturierung des noch an die stationäre Phase der Ni-NTA-Säule gebundenen Proteins, war eine Elution mit nativem Puffer nicht möglich.

Die Herstellung eines homogenen, von *E. coli* exprimierten Standards für den Lactadherin-ELISA war nicht möglich. Zukünftig soll die Erzeugung des rekombinanten Proteins im eukaryoten Zellsystem erfolgen.

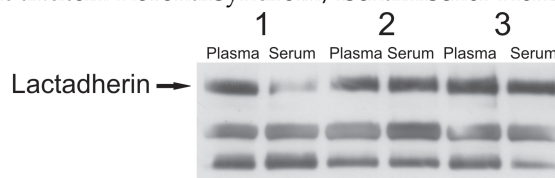
#### 3.1.4 Nachweis von Lactadherin in Plasma und Serum

##### ELISA

Um die Lactadherinkonzentration in humanem Serum zu quantifizieren, sollte das Enzyme-linked immunosorbent assay etabliert werden. Obwohl das Protein bereits 1997 kloniert wurde, ist bislang kein kommerzieller ELISA für die Quantifizierung erhältlich. Neben der bereits beschriebenen Methode, die zum Nachweis der Discoidin-Domäne verwendet wurde (s. Kap. 2.2.30), wurden zusätzliche Varianten des Festphasen-ELISA verwendet. Es wurden Mikrotiterplatten verschiedener Oberflächenbeschaffenheit und Farbe verwendet. Neben dem bereits beschriebenen PS wurden auch verschiedene Antikörper unterschiedlicher Konzentration, wie bei Yamaguchi et al. [243] beschrieben, als Fängermolekül eingesetzt. Auch Detektionsantikörper und Sekundärantikörper variierten in Konzentration und Herkunft. Freie Bindungsstellen wurden nicht nur mit Gelatine, sondern auch mit BSA blockiert. Als Detergenz wurde zusätzlich zu Tween 20 auch Triton X-100 eingesetzt. Neben der luminometrischen Auswertung wurde der Substratumsatz auch colorimetrisch bestimmt.

Mit keiner der z. T. in der Literatur beschriebenen Methoden ließ sich eine reproduzierbare Standardkurve erzeugen, weder mit dem selbst erzeugten, noch mit kommerziell erworbenem Lactadherin. Hier stellt sich die Frage, ob auch das kommerzielle, eukaryot exprimierte Protein dazu neigt auszufallen, und so eine Wiederfindung erschwert. Zusätzlich gelang es in keiner Matrix (Serum, Plasma, PBS) das Lactadherin reproduzierbar zu detektieren. Unterschiedliche Verdünnungsstufen erzeugten keinen proportionalen Abfall der

Abbildung 27: Nachweis Lactadherin mittels Western Blot. Es wurde jeweils das gleiche Volumen Serum und Plasma/Spur aufgetragen. Die Intensität der Serumbanden von 1 und 3 sind niedriger, als die von Proband 2. 1: Proband mit akutem Koronarsyndrom, 2: Kontrolle, 3: Proband mit akutem Koronarsyndrom/Ischämischer Herzkrankheit



Enzymaktivität. Ein der Probe zugesetzter Standard wurde in der Analyse nicht mehr wiedergefunden.

Die Etablierung eines ELISA war somit nicht möglich. In diesem Zusammenhang fällt auf, dass auch keiner der in der Literatur beschriebenen Assays ein weiteres Mal in einer Veröffentlichung Verwendung fand.

#### Western Blot

Auch im Western Blot wurde das Vorkommen von Lactadherin in Serum und Plasma untersucht, da sich die Etablierung des ELISA als sehr aufwendig erwies. So sollte geprüft werden, ob überhaupt Unterschiede in der Lactadherinkonzentration bei Patienten mit Atherosklerose und Kontrollen zu finden sind. Gleiche Volumina verdünnten Serums und Plasmas (1:40) wurden aufgetragen. Die Hitzedenaturierung fand bei 42 °C statt. In Abb. 27 sind exemplarisch die Serum/Plasmapaare dreier Probanden aufgetragen. Bei der oberen Bande handelt es sich um die Lactadherinbande. Die Spezifität wurde im Wettbewerbsexperiment untersucht. Die Proben 1 und 3 sind Plasma und Serum von Probanden mit akutem Koronarsyndrom bzw. ischämischer Herzkrankheit. Es fielen keine deutlichen Lactadherin-Konzentrationsunterschiede zwischen Probanden und Kontrollen auf.

Der Nachteil dieses Verfahrens ist der Aufwand bei der Untersuchung größerer Probandenkollektive. Zudem sind die Banden nur eingeschränkt quantifizierbar. Folglich wäre doch das ELISA zur schnellen Quantifizierung wünschenswert. Da sich aber die Etablierung als problematisch erwies und keine großen Unterschiede in der Lactadherin-Serumkonzentration zu erwarten waren, wurde der experimentelle Weg zunächst verlassen. Lactadherin scheint als Atherosklerose-Marker ungeeignet.

#### 3.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse der Untersuchung der Knockout-Mäuse zusammengefasst.  $GPx1^{-/-}$  und Wildtyp-Mäuse entwickeln im gegensatz zu den anderen Genotypen auch unter WTD kaum Läsionen (<http://jaxmice.jax>).

org/strain/000664.html; 19.4.2011, [215]). Mittels *in situ*-Hybridisierung und Immunfluoreszenz konnten wir Lactadherin-mRNA in Läsionen von Mäusen nachweisen. Da  $GPx1^{-/-}$ - und Wildtyp-Tiere kaum Läsionen entwickeln, war ein Nachweis *in situ* nicht möglich. Die PCR zeigt allerdings, dass MFG-E8 auch in wildtypischen Mäusen basal exprimiert wird. Mit diesen Methoden ist allerdings keine quantitative Aussage möglich. Diese konnte mit relativer Quantifizierung der mRNA in Peritonealmakrophagen getroffen werden. Allein durch den Genotyp ist die Expression gegenüber der Wildtyp-Kontrolle um mehr als das Doppelte signifikant erhöht. Dies trifft jedoch nicht bei  $LDLR^{-/-}$ -Tieren zu, dort ist keine Erhöhung zu erkennen. Die pro-atherogene WTD hat kaum Einfluss auf die Expressionshöhe, gleichsam der Stimulation mit modifizierten LDL. Bei der Betrachtung der Daten ist der Standard-Fehler bei der mRNA der  $GPx1^{-/-}$ -Tiere zu beachten.

Ein ähnliches Bild zeigt die Untersuchung der THP-1-Zellen, dort wird eine signifikante Erhöhung der Lactadherin-Expression nur durch Kokultur mit apoptotischen Zellen, nicht durch die Inkubation mit eLDL oder oxLDL hervorgerufen. Bei diesen differenzierbaren Zellen hat auch der Phänotyp (Monocyt/Makrophage) keinen Einfluss auf die Transkription.

Maus	Läsionen bei WTD	MFG-E8-Expression in Läsionen	MFG-E8-Expression in P-Makrophagen		Einfluss der WTD		Einfluss mod. LDL
			x fach B6 basal	Signifikanz	x fach Haltungsdiät	Signifikanz	
Dko	++	++	2,87	p < 0,0001	1,15	n. s.	x
GPx 1 ko	-	keine Läsion	4,85*	p < 0,005	2,10*	n. s.	x
B6	-	keine Läsion	-	-	0,99	n. s.	x
LDLR ko	+	++	1,09	n. s.	0,58	n. s.	x
Apo E ko	+	++	2,64	p < 0,0001	1,02	n. s.	x

Tabelle 9: Zusammenfassung der Ergebnisse der Lactadherin-Untersuchung an Mäusen. x: kein Einfluss, -: wenig, +: deutlich, ++: sehr deutlich, n.s.: nicht signifikant, \*: hohen Standard-Fehler beachten; eine genaue Beschreibung erfolgt im Text.



### 3.2 MSP

Am AtheroGene-Kollektiv der Gutenberg Herz-Studie der Universitätsmedizin Mainz wurde mit dem Affymetrix Human 20K cSNP Panel eine Genomweite Assoziationsstudie durchgeführt. Unter anderem wurde die Assoziation des SNP rs3197999 mit der koronaren Herzkrankheit (KHK) untersucht (Blankenberg *et al.*, unpublizierte Daten). Dieser SNP führt wie bereits beschrieben zur Aminosäuresubstitution R689C (c2078t) in MSP. Schon während der Replikationsphase dieser Studie wurde begonnen, den Einfluss des mutanten MSP auf Makrophagen zu untersuchen. Obwohl die Replikation der Assoziation des SNP mit der KHK nicht in allen hierzu rekrutierten Kollektiven möglich war, wurden die bereits vielversprechenden Untersuchungen am Protein fortgeführt. Dies geschah besonders vor dem Hintergrund, dass mehrere Genom-weite Assoziationsstudien einen Zusammenhang dieses SNP mit den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen herstellen konnten, welcher hochsignifikant war. Auch bei dieser Erkrankung spielen, ähnlich der Atherosklerose, Makrophagen eine entscheidende Rolle.

#### 3.2.1 Erzeugung von rekombinantem MSP

##### *Klonierung, Transformation, Mutagenese und Transfektion*

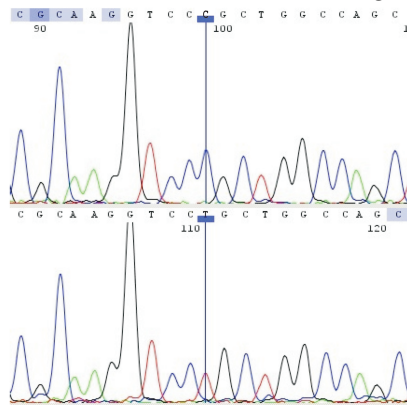
Um wildtypisches (689R) und mutantes (689C) MSP auf funktionelle Unterschiede hin zu untersuchen, wurden beide Varianten des Proteins in einem eukaryoten Zellsystem wie folgt exprimiert.

Wie bereits beschrieben [62] wurde die fehlerfrei amplifizierte *mst1/msp*-DNA in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO von Invitrogen kloniert, und dieser in TOP10 Zellen transformiert. Im Anschluss erfolgte eine ReTransformation in den stabileren Stamm XL10. Der C→T-Austausch an Position 2078 wurde mit dem QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit vorgenommen. Mit den erfolgreich mutierten und den wildtypischen Vektoren wurden CHO-K1-Zellen transfiziert.

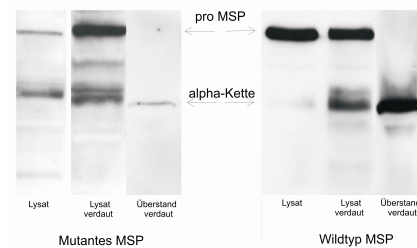
##### *Kloncharakterisierung*

Zur Charakterisierung der MSP-produzierenden Zellen wurde der Erfolg der *mst1/msp*-Mutagenese durch Sequenzierung überprüft. Der c→t-Austausch an Position 2078 ist in Abb. 29a dargestellt. Einzelne Klone wurden durch Verdünnungsklonierung erzeugt. Auf Protein-Ebene wurde die MSP-Expression untersucht. Sowohl im Lysat der transfizierten CHO-K1-Zellen, als auch in deren Überstand ist MSP nachweisbar (Abb. 29b). MSP wird als inaktive pro-Form sezerniert und durch extrazelluläre Proteasen (Kallikrein) aktiviert (vergl. Kap. 1.5.1). Dies geschieht z. T. schon durch das im Kulturmedium enthaltene FCS. Der vollständige Verdau wurde durch Inkubation mit Kallikrein erreicht. Wie im Western-Blot zu sehen und durch den ELISA bestätigt, wird wildtypisches MSP in höherer Konzentration exprimiert als mutantes. Dies

Abbildung 28: Analyse der MSP-Klone



(a) Chromatogramm beider *mst1/msp*-Klone. Oben: Wildtyp, unten: Mutante mit c→t-Austausch an Position 2078 im *msp*-Transkript.



(b) Western-Blot. Nachweis von mutan-tem und wildtypischem MSP in Ly-sat und Zellkulturüberstand der MSP-produzierenden CHO-K1-Zellen. Der Antikörper weist die alpha-Kette des Proteins nach.

war nicht nur in den exemplarisch gezeigten Abbildungen der Fall. Es erwies sich als Charakteristikum aller untersuchten Klone, obwohl die Amplifikation der genomischen *mst1/msp*-cDNA bei wildtypischem und mutan-tem MSP eine ähnliche genomische Integrationsrate suggerierte.

### 3.2.2 Nachweis von RON & MSP

Da die funktionelle Untersuchung des MSP zunächst hauptsächlich auf die Bedeutung des Proteins im Rahmen der Atherosklerose abzielte, wurde zunächst die Expression von MSP und seines Rezeptors in der atherosklero-tischen Läsion der Maus untersucht. RON/STK wird unter anderem von Makrophagen exprimiert, MSP vornehmlich von Hepatocyten. Ron cDNA wurde erfolgreich in den Aorten von Mäusen unterschiedlichen Genotyps, mit und ohne Western Type-Diät amplifiziert (Abb. 29). Bei drei Proben war zusätzlich MSP-Expression zu detektieren. Ein quantitative Aussage kann mit dieser Methode nicht getroffen werden. Die Grundvoraussetzung für eine MSP-Wirkung ist damit in der atherosklero-tischen Läsion gegeben. Das zur Stimulation von RON notwendige MSP stammt aber diesen Daten zufolge wahrscheinlich nicht aus der Läsion, sondern aus den Hepatocyten. Eine lokale Regulation der MSP-Wirkung in der Läsion scheint also hauptsächlich über RON und seine Expression zu erfolgen.

Da die folgenden Experimente (Stimulation mit MSP) mit der humanen Zelllinie THP-1 durchgeführt wurden, war eine RON-Expression in diesen

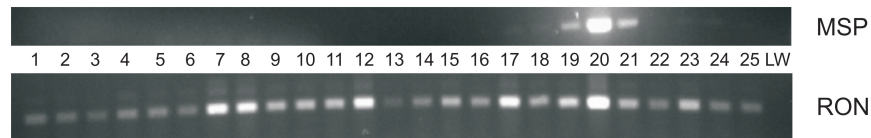


Abbildung 29: Nachweis von MSP und RON in Mausearten mittels PCR. Darstellung im Agarose-Gel. Proben 1-4:  $ApoE^{-/-}$  WTD (Western Type-Diät), 5-7: Dko WTD, 8-13: B6, 14-17:  $ApoE^{-/-}$ , 18-25: Dko, LW: Leerwert

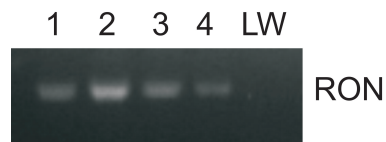


Abbildung 30: Nachweis von RON in THP-1 Zellen. Darstellung im Agarose-Gel. RON-RNA wird in THP-1 Zellen exprimiert. Proben 1-2: THP-1 Zellen, 3-4: THP-1 Zellen stimuliert, LW: Leerwert



Abbildung 31: Nachweis von RON in THP-1 Zellen. Darstellung im Western Blot im Verhältnis zur Ladekontrolle Actin. RON wird in THP-1-Zellen exprimiert, verstärkt nach Differenzierung. Proben K: Zellen, S: THP-1 Zellen stimuliert.

Zellen zu zeigen. Ron-RNA konnte sowohl in nativen THP-1-Zellen, als auch in Zellen, die mit  $IFN-\gamma$  und  $TNF-\alpha$  zu Makrophagen-ähnlichen Zellen differenziert wurden, mittels PCR nachgewiesen werden (Abb. 30). Auch auf Proteinebene ist RON detektierbar (Abb. 31). Bei mit  $IFN-\gamma$  und  $TNF-\alpha$  differenzierten Zellen geringfügig stärker als bei unstimulierten Zellen. Die Induzierbarkeit von RON durch  $IFN-\gamma$  und  $TNF-\alpha$  ist auch in der Literatur beschrieben [40].

### 3.2.3 Physiologische Untersuchungen

Um einen eventuell vorhandenen Unterschied zwischen wildtypischem und mutantem MSP zu detektieren, wurden die rekombinant hergestellten MSP-Varianten dazu genutzt, Makrophagen-ähnliche Zellen zu stimulieren. Beurteilt wurden die Zellfunktionen, die bekanntermaßen durch MSP moduliert werden: Migration, Proliferation und Apoptose-Neigung. Die Untersuchung der MSP-abhängigen Interleukin-Sekretion ist zudem geplant.

*Untersuchung der Migrationsrate*

Zunächst sollte die Wirkung der beiden MSP-Klone auf die Migrationsrate von Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration bestimmt werden. Dies wurde in der Boyden-Kammer untersucht. Nicht differenzierte THP-1-Zellen migrierten sehr stark und MSP-unabhängig in das untere Kompartiment der Boyden-Kammer. Zu Makrophagen differenzierte THP-1-Zellen wurden während der Migration mit unterschiedliche Konzentrationen MSP (wildtyp und mutant) inkubiert. Nach 24 h wurde die Anzahl der durch die Filtereinsätze migrierten Zellen durch Zählung im Hämocytometer oder Messung des ATP-Umsatzes bestimmt (Abb. 32). Die Ordinate gibt den Prozentsatz der migrierten Zellen an. Im Diagramm dargestellt ist der Anteil der migrierten Zellen an der eingesetzten Gesamtzellzahl in Abhängigkeit von der MSP-Konzentration. Es wurde der Überstand dreier Wildtyp-MSP produzierender Klone zugegeben, sowie der Überstand von drei Klonen welche mutantes MSP exprimieren. Für den mutanten Klon begrenzte die limitierte Protein-Expression den MSP-Einsatz im Stimulationsexperiment. Der Einsatz höherer Wildtyp-MSP-Konzentrationen wäre möglich gewesen, allerdings befindet sich die Kurve ab einer Konzentration von etwa 4 ng/ml in der Sättigung, Konzentrationen über 7 ng/ml reduzieren die Migrationsrate.

Sämtliche Kurven zeigen im Bereich bis 1 ng/ml einen steilen Anstieg, um dann abzuflachen und, wenn noch höhere Konzentrationen eingesetzt wurden, in die Sättigung zu kommen. Der Kurvenanstieg der Zellen, die mit mutantem MSP stimuliert wurden ist dreimal so stark wie der der Zellen, denen wildtypisches MSP zugesetzt wurde (s. Abb. 33a). Dieser Unterschied ist signifikant. Sowohl in Abbildung 32 als auch in Abbildung 33b deutlich zu erkennen ist die Konzentration, bei der die MSP-Varianten sich in ihrer Wirkung maximal unterscheiden. Die Gesamtzahl der migrierten Zellen ist bei einer Konzentration von 0,5 ng/ml mutantem MSP doppelt so hoch, wie bei der gleichen Konzentration der Wildtyp-Form. Steigung und Wirkung errechnen sich beide aus Abbildung 32. Für Abbildung 33a wurde die Steigung an der steilsten Stelle der Kurve bestimmt und ein Mittelwert aus der Steigung der jeweils drei Kurven gebildet. Der maximale Unterschied der Wirksamkeit von mutantem und wildtypischem MSP ergibt sich aus den aus den Kurven abgelesenen Werten bei einer MSP-Konzentration von 0,5 ng/ml.

Diese Versuche wurden mit zwei Chargen der CHO-K1-Überstände durchgeführt und erbrachten ein annähernd gleiches Ergebnis, hier sind die Daten der ersten Charge dargestellt.

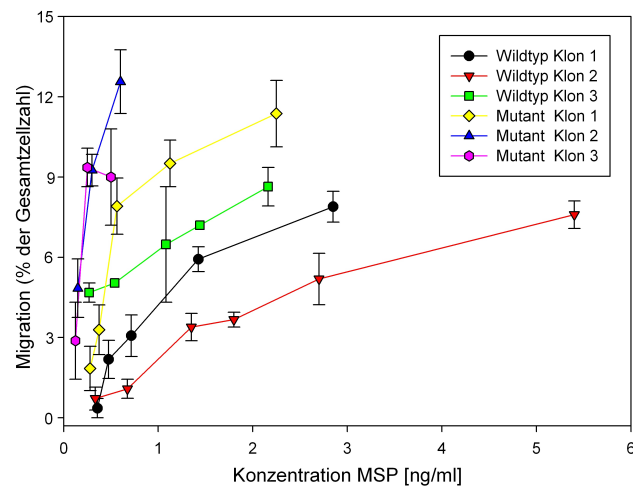
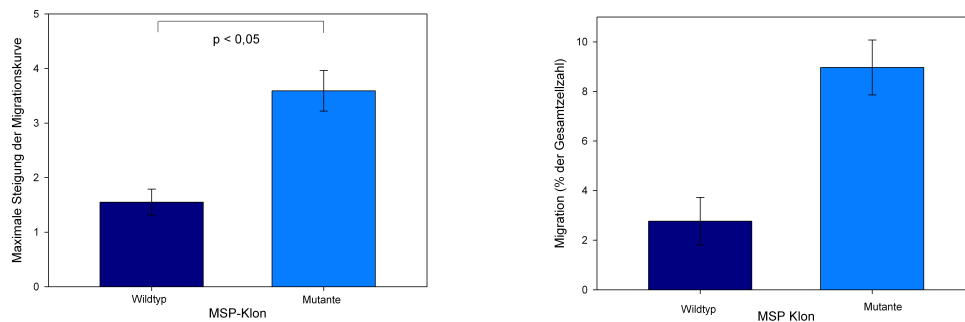


Abbildung 32: Bestimmung der Anzahl der migrierten THP-1-Zellen in Abhängigkeit von der MSP-Konzentration. Mutantes MSP stimuliert stärker zur Migration als wildtypisches.



(a) Darstellung der maximalen Steigung der Auftragung des Migrationsassays im Durchschnitt aller MSP-Klone. Die maximale Steigung ist bei Stimulation mit mutantem MSP signifikant erhöht.

(b) Darstellung des maximalen Unterschieds der Wirksamkeit von wildtypischem und mutantem MSP (Durchschnitt aller MSP-Klone), ermittelt anhand der Auftragung bei einem x-Wert von 0,5 ng/ml MSP

Abbildung 33: Maximale Stimulationsfähigkeit der MSP-Klone zur Migration

### Untersuchung der Proliferationsrate

Neben der MSP-induzierten Migration sollte auch die Auswirkung des Proteins auf die Proliferation untersucht werden. Die Proliferationsrate wurde mit dem Cell Proliferation ELISA BrdU Kit von Roche bestimmt. Detektiert wurde die BrdU-Inkorporation nach 24-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Mengen an MSP (wildtyp und mutant). Je höher die Proliferationsrate ist, desto mehr BrdU wird während der Mitose in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut. BrdU wird luminometrisch nachgewiesen. Die Werte werden als relative Lumineszenz je Sekunde (rlu/s) ausgegeben und dargestellt. In Abbildung 34 ist die Lumineszenz, und damit die Proliferationsrate der differenzierten THP-1-Zellen gegen die MSP-Konzentration aufgetragen.

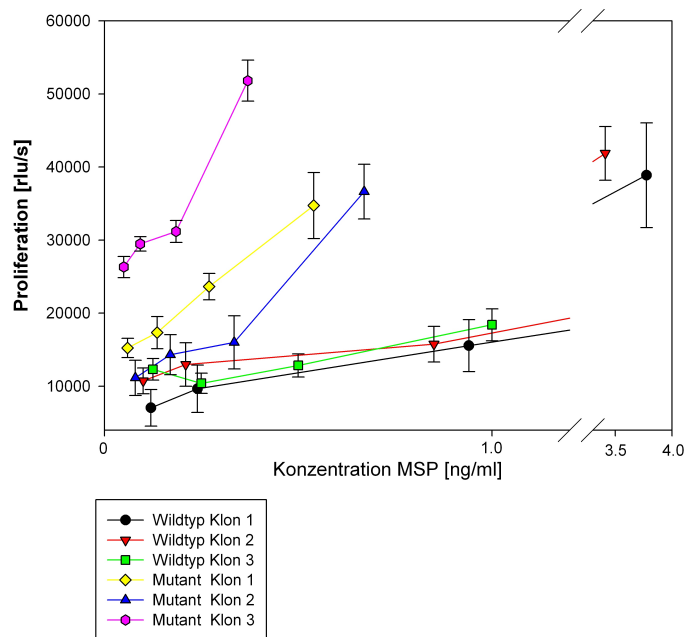
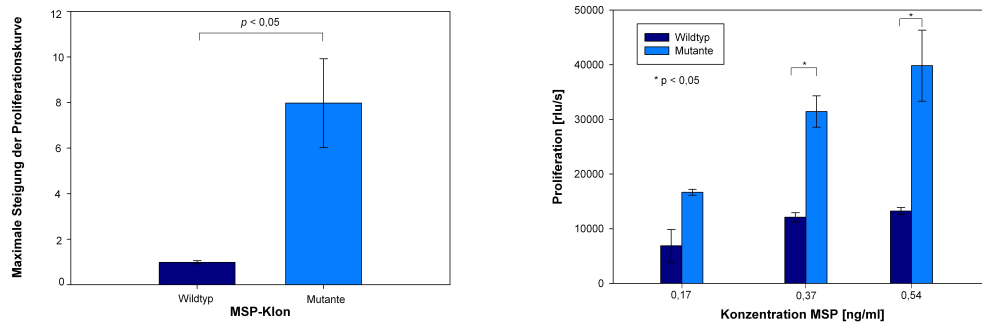


Abbildung 34: Bestimmung der Anzahl der proliferierten THP-1-Zellen in Abhängigkeit von der MSP-Konzentration. Mutantes MSP stimuliert stärker zur Proliferation als wildtypisches.

Die MSP-Konzentration war, wie bereits in Kap. 3.2.3 beschrieben, limitiert. Die Proliferation ist im Verlauf ähnlich der Migration. Auch hier zeigen die Kurven im Bereich bis 1 ng/ml einen steilen Anstieg. Eine Sättigung ist hier nicht erkennbar, allerdings wurde infolge der Erfahrung aus den Migrationsexperimenten (Abb. 32), nicht solch hohe MSP-Konzentrationen eingesetzt. Der Kurvenanstieg der Zellen, die mit mutantem MSP stimuliert wurden, ist etwa sechsmal so stark wie der der Zellen, denen wildtypisches MSP zugesetzt wurde (s. Abb. 35a). In Abbildung 35b ist zu erkennen, dass wie bei der Migration auch bei der Proliferation die maximale Wirkung des mutantem MSP stärker ist, als die des wildtypischen. Die Proliferationsrate ist bis zu doppelt so hoch, wenn mutantem MSP zugegeben wurde. Die Berechnung der Steigung und des maximalen Unterschieds der Wirksamkeit von wildtypischem und mutantem Klon bezüglich der Proliferation wurde gleich der der Migration ermittelt.

Diese Versuche wurden mit zwei Chargen der CHO-K1-Überstände durchgeführt und erbrachten ein annähernd gleiches Ergebnis, hier sind die Daten der zweiten Charge dargestellt.



- (a) Darstellung der maximalen Steigung der Auftragung des Proliferationsassays im Durchschnitt aller MSP-Klone. Die maximale Steigung ist bei Stimulation mit mutantem MSP erhöht.
- (b) Darstellung des Unterschieds zwischen wildtypischem und mutantem MSP bei unterschiedlichen MSP-Konzentration, ermittelt anhand der Auftragung des Proliferationsassays.

Abbildung 35: Maximale Stimulationsfähigkeit der MSP-Klone zur Proliferation

#### Untersuchung der Apoptoserate

Um auszuschließen, dass der Unterschied der Migrations- und Proliferationsrate unter MSP-Einfluss auf den Tod der Zellen zurückzuführen ist, wurde die Apoptoserate bestimmt. Unter bestimmten Bedingungen ist MSP in der Lage Apoptose zu induzieren.

Während der Apoptose werden über verschiedene Signalwege Caspasen aktiviert. Die Aktivierung von Caspasen ist, wie auch die Induktion von DNA-Strangbrüchen, ein Indiz für den programmierten Zelltod. In dieser Arbeit wurde die Aktivierung der Effektor-Caspasen 3 und 7 als Antwort auf die Inkubation mit MSP untersucht. Durch diese Caspasen werden auch Endonukleasen aktiviert, die die DNA gezielt fragmentieren. Auch dieser Vorgang wurde untersucht.

**BESTIMMUNG DER CASPASEAKTIVITÄT** Die aktivierten Caspasen 3 und 7 setzen ein im Caspase-Glo 3/7-Assay enthaltenes Substrat um. Dieses Substrat erzeugt ein Lumineszenz-Signal, proportional zur Menge an umsetzendem Enzym. Mit  $\text{IFN-}\gamma$  und  $\text{TNF-}\alpha$  stimulierte THP-1-Zellen wurden 2 Stunden mit unterschiedlichen MSP-Konzentrationen (wildtyp und mutant) inkubiert, und die Caspaseaktivität bestimmt. Weder das wildtypische noch das mutante MSP haben einen Einfluss auf die Apoptose (Abb. 36). Lediglich hohe MSP-Konzentrationen (ab 4 ng/ml) wirken, wie auch schon im Migrationsassay vermutet, leicht pro-apoptotisch. Eine Verlängerung oder Verkürzung der Inkubationszeit erhöht bzw. erniedrigt die absoluten Ergebnisse, die Verhältnisse bleiben jedoch gleich.

**TUNEL-FÄRBUNG** Durch die TUNEL-Färbung werden freie 3'-OH DNA-Enden fluoreszenzmarkiert. Die freien Enden entstehen durch die Nuclease-Fragmentierung der DNA, wie sie nur bei der Apoptose vorkommt.

THP-1-Zellen, differenziert mit IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , wurden über 24 h mit unterschiedlichen MSP-Konzentrationen inkubiert und anschließend mit dem In Situ Cell Death Detection Kit gefärbt. Als Positivkontrolle wurden THP-1-Zellen mit DNase I inkubiert, um eine Strang-Fragmentierung hervorzurufen (Abb. 37a). Die Zellen zeigen sowohl bei der Inkubation mit wildtypischen (Abb. 37c und 37d) als auch mit mutantern MSP (Abb. 37e und 37f) bei gleicher Konzentration etwa den selben Apoptosegrad. Mit steigender Konzentration nimmt die Apoptose geringfügig zu (Abb. 37b). Dies korreliert mit den Ergebnissen der Caspaseaktivitäts-Bestimmung.



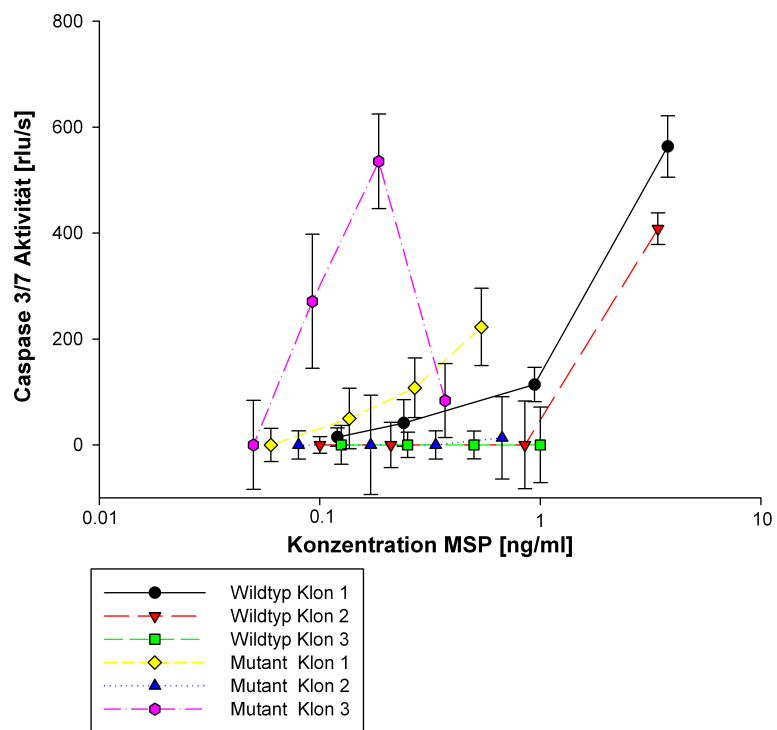
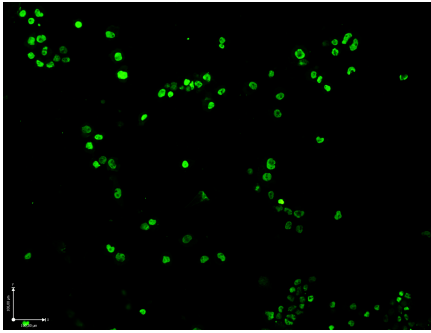
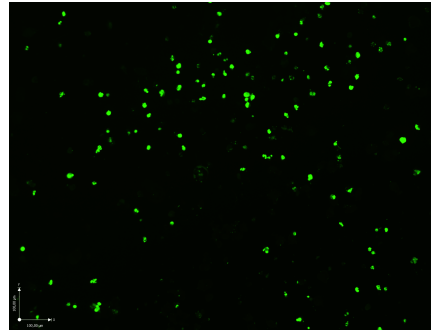


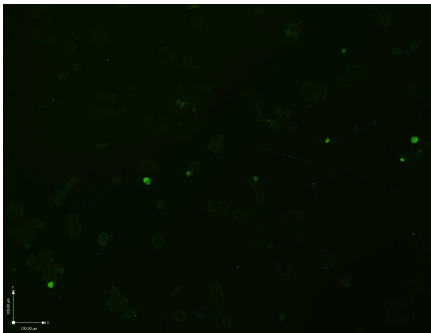
Abbildung 36: Bestimmung der Anzahl der apoptotischen THP-1-Zellen in Abhängigkeit von der MSP-Konzentration mittels Caspaseaktivitätsbestimmung



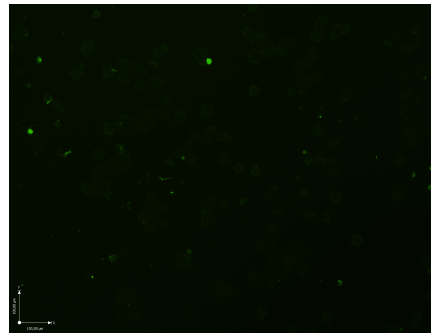
(a) TUNEL-Färbung von THP-1 nach Verdau der DNA mit DNase I.



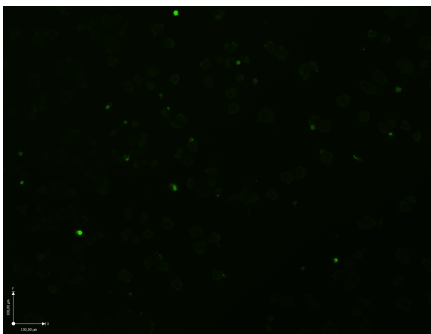
(b) TUNEL-Färbung von THP-1 nach Behandlung mit Wildtyp-MSP (7,0 ng/ml).



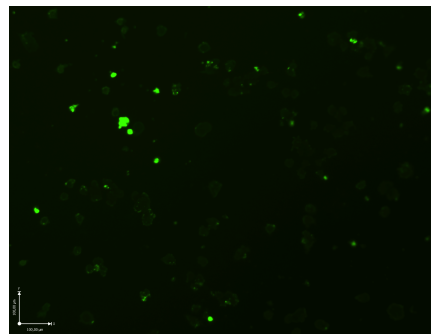
(c) TUNEL-Färbung von THP-1 nach Behandlung mit Wildtyp-MSP (0,325 ng/ml).



(d) TUNEL-Färbung von THP-1 nach Behandlung mit Wildtyp-MSP (2,2 ng/ml).



(e) TUNEL-Färbung von THP-1 nach Behandlung mit mutantem MSP (0,4 ng/ml).



(f) TUNEL-Färbung von THP-1 nach Behandlung mit mutantem MSP (1,6 ng/ml).

Abbildung 37: TUNEL-Färbung von THP-1 nach Stimulation mit MSP. Konzentrationen ab 7 ng/ml MSP wirken geringfügig pro-apoptotisch.

Teil IV

DISKUSSION



## DISKUSSION

---

### 4.1 DIE BEDEUTUNG VON LACTADHERIN IM RAHMEN DER ATHEROSKLEROSE

#### 4.1.1 Auswahl von Modellsystemen und Methoden sowie deren Eigenschaften

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Rolle Lactadherin bei der Atherosklerose spielt. Lactadherin ermöglicht die Phagozytose apoptotischer Zellen, indem es sowohl an den Phagozyten als auch an die apoptotische Zelle bindet [92]. Im atherosklerotischen Plaque unterstützt es also die Entfernung abgestorbener Zellen und reduziert vermutlich so die Atheroprogression. Als Modelltiere kamen Mäuse zum Einsatz, die auf der Basis unterschiedlicher proatherogener Genotypen und bei Fütterung einer Western Type Diät Atherosklerose entwickeln:  $ApoE^{-/-}$ ,  $LDLR^{-/-}$  und  $ApoE^{-/-}/GPx1^{-/-}$  Mäuse. Letztere entwickeln mit fortschreitendem Alter stärkere Läsionen als Tiere mit  $ApoE$ -ko. Zusätzlich wurden  $GPx1$  einfachdefiziente Mäuse untersucht. Dieser Knockout erhöht den oxidativen Stress der Tiere. Er kann zusätzlich zu endothelialer Dysfunktion führen und hat einen additiven Effekt bezüglich der Atheroprogression bei  $ApoE$ -ko Mäusen. Neben diesen Modellen wurde zusätzlich eine immortale Zelllinie untersucht, die geno- und phänotypisch homogen und zu Makrophagen differenzierbar ist.

Ait-Oufella *et al.* beschreiben den Einfluss von MFG-E8 auf die Pathogenese der Atherosklerose, bzw. dass das Fehlen zu einer Anhäufung apoptotischer Zellen in der Läsion führt [2]. Widersprüchlich sind allerdings die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe bezüglich der Expression des Proteins. Im Western Blot wird gezeigt, dass die Expression in normalen Aorten höher ist, als in Aorten mit atherosklerotischen Plaques. In der Immunhistochemie hingegen ist das Protein stärker in den Läsionen zu finden, nicht in der gesunden Aorta. Zudem erscheint eine genauere Zuordnung der Lactadherin-Expression zu bestimmten Zelltypen auf Basis der gezeigten Abbildungen schwierig.

Die Lokalisation von Laktadherin wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit revalidiert. Eine höhere zelluläre Auflösung, dünnere Präparate und das Fehlen von Gefrierschäden spricht für Praffin-eingebettete Präparate, allerdings war auf diesen das Protein nicht nachweisbar. Ein zuverlässiges Lactadherin-Signal ergab sich nur auf Cryo-Präparaten, weshalb auf diese im Weiteren zurückgegriffen wurde. Auch das Anfärben zweier Proteine auf einem Präparat ermöglicht die Immunfluoreszenz mit relativ geringem Aufwand, so dass dieser Methode, trotz des erhöhten Hintergrunds, Vorrang vor der Immunhistochemie gewährt wurde.

Lactadherin wurde sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene *in situ* nachgewiesen. Die Methode der radioaktiven *in situ*-Hybridisierung ermöglicht eine gute Eingrenzung der RNA. Die Auflösung erreicht bei Verwendung einer Photoemulsion die zelluläre Ebene. Eine sehr scharfe Abgrenzung ist allerdings aufgrund der Streustrahlung des  $\beta$ -Strahlers schwierig. Die farb-basierende Hybridisierungsmethode, die keine Streustrahlung erzeugt ist weniger sensitiv als die radioaktive. Für alle *In situ* Hybridisierungsmethoden gilt, dass nicht alle Sonden gleich gut in das Gewebe eindringen. Problematisch ist bei beiden Formen der Hybridisierung häufig die unterschiedliche Markierbarkeit der Sonde. Bei der radioaktiv basierten ISH ist allerdings eine Anpassung der Sense- und Antisense-Sonde durch Einsatz der gleichen Menge von vergleichbar markierter Nukleinsäure möglich. Ein Problem aller ISH-Methoden sind Kreuzhybridisierungen mit ähnlichen mRNAs. Es wird versucht, diesen mit geeigneter Sondenauswahl, hoher Hybridisierungstemperatur und stringentem Waschen der Schnitte entgegen zu wirken. Weiterhin können durch hybridisierungsunabhängige Methoden wie der PCR die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierung untermauert werden.

Eine starke Expression von Lactadherin-RNA und Protein wurde in den atherosklerotischen Läsionen der Aorta und des Aortensinus von Mäusen nachgewiesen. Zusätzlich kolokalisiert das Protein Lactadherin in großen Teilen der Läsion mit dem Makrophagenmarker CD68 und dem Chemokin Fraktalkin. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass Lactadherin von CD68-positiven Makrophagen exprimiert wird und diese Makrophagen mit Fraktalkin in Berührung kommen. Die massiv Lactadherin exprimierenden Makrophagen der Läsionen fanden sich zudem besonders häufig gruppiert um den Lipid Core. Eine starke Expression im Endothel und in glatten Muskelzellen, wie beschrieben bei Ait-Oufella *et al.* war nicht zu beobachten.

Su *et al.* beschreiben, analog zu den Ergebnissen der Untersuchung auf Proteinebene von Ait-Oufella, eine erniedrigte mRNA-Expression des Lactadherins in atherosklerotischen Läsionen von Mäusen im Verhältnis zum läsionsfreien Gefäß [205]. Dies widerspricht sowohl der Immunhistochemie von Ait-Oufella *et al.*, als auch unseren Beobachtungen *in situ*. Aus diesem Grund haben auch wir versucht, die Lactadherin-Expression in den Läsionen von Mäusen mittels RTD-PCR zu quantifizieren.

Die Ergebnisse einer semiquantitativen RTD-PCR sind unter anderem von der Qualität der isolierten RNA abhängig. Die RNA darf nicht degradiert sein. Darüber hinaus muss sie aus unterschiedlichen Zelltypen einer Probe gleichermaßen gut isoliert werden. Auch die Wahl des Haushaltgens ist von Bedeutung. Da ribosomale RNA stabiler ist als mRNA, ist diese als letzte von Degradation betroffen, lässt sich also in diesem Falle noch in höherem Maße nachweisen als mRNA und verfälscht das Ergebnis der relativen Quantifizierung. Dennoch wurde in dieser Arbeit vornehmlich 18S rRNA als Haushaltgen verwendet, da auch die Gene strukturbildende Zellelemente (z.B.  $\beta$ -Actin) bei der Stimulation der untersuchten Zellen einer Regulation

unterworfen waren. Bei der Beurteilung der relativen Quantifizierung können nur die Verhältnisse der Expressionsstärke eines Gens in unterschiedlichen Proben beurteilt werden, ein Vergleich unterschiedlicher Gene ist schwerlich möglich.

Sämtliche von uns untersuchte Makrophagen-Marker waren in den Läsionen von Mäusen verschiedener Genotypen niedriger exprimiert, als in den Aorten der Kontrolltiere. Dies war gegenüber allen von uns eingesetzten Haushaltsgenen (18S rRNA,  $\alpha$ -Actin,  $\beta$ -Actin und Myosin-Leichtkette) der Fall. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der RTD-PCR, ist die Expression von Lactadherin, CD68 und den Glutathion-Peroxidasen 1 und 4 in der Immunfluoreszenz bzw. der *in situ*-Hybridisierung in den Läsionen deutlich stärker, als in den Aorten gesunder Mäuse (s. Kap. 3.1.1, Cheng *et al.*, unpublizierte Daten). Eine Ursache dieses Phänomens ist zum Einen möglicherweise die Quantifizierung weiterer Zelltypen, deren mRNA unbeabsichtigterweise mit isoliert wurde, die aber in histologischen Präparaten nicht dargestellt waren, oder zum Anderen die RNA-Isolierung. Die RNA lässt sich aus Geweben und Zelltypen, welche sehr fetthaltig und/oder kalkreich sind, nicht in gleichem Maße isolieren, wie aus dem umgebenden gesunden Gewebe, z.B. Muskulatur und Endothel, was zu einer Verschiebung der Ergebnisse führt. Dies sollte bei allen mRNA-Expressionsuntersuchungen ohne ergänzende Kontrolluntersuchungen bedacht werden. Unter Umständen besteht ein ähnliches Phänomen beim Zellaufschluss für den Western-Blot. Dies kann die widersprüchlichen Ergebnisse bei Ait-Oufella *et al.* erklären. Der Nachweis des Proteins im Western-Blot scheint prinzipiell schwierig. Untersuchungen am Lysat von Peritonealmakrophagen erbrachten bei uns ähnliche Bandenmuster wie sie auch von Ait-Oufella *et al.* detektiert wurden. Allerdings war das Signal durch Einsatz des geeigneten Kompetitors nicht auszulöschen, was starke Zweifel an der Spezifität des Signals rechtfertigt und somit auch die inkongruenten Ergebnisse erklärt.

Auch im ELISA war eine Quantifizierung nicht möglich. Dies deckt sich mit den Beobachtungen, dass in der Literatur zwar verschiedene Ansätze zur Detektion von Lactadherin im ELISA-Format verfolgt werden, aber keine Methode in mehreren Publikationen zum Einsatz kam [5, 243]. Bei genauerer Lektüre lassen die Verfahren Zweifel an ihrer Sensitivität und/oder Spezifität aufkommen.

Das für das ELISA als Standard notwendige rekombinante Lactadherin konnte nicht prokaryotisch exprimiert werden. Dies gelang weder beim Gesamtprotein noch bei einem den N-Terminus umfassendem Fragment. Lediglich der C-Terminus war exprimierbar. Die Renaturierung des denaturiert aufgereinigten Fragments war nicht möglich, das Protein präzipitierte während des Vorgangs. Auch in der Literatur ist vornehmlich die eukaryotische Expression beschrieben, in den meisten Fällen in der Hefe *Pichia pastoris* [131], lediglich bei Shao *et al.* ist die Expression eines Fragments im Prokaryoten durchgeführt worden [197]. Andersen *et al.* gelang die Expression des Gesamtproteins [5], aber auch diese, wie alle anderen Arbeitsgruppen,

beschreiben lediglich die Discoidin (C1 und C2)-Domänen des Lactadherins [131, 197]. Die EGF-like Domänen wurden noch bei keiner Spezies untersucht, was auf allgemeine Probleme bei der Expression und Strukturanalyse des Proteins schließen lässt.

Der Nachweis im ELISA ist kurzfristig nicht realisierbar (eukaryote Expression von Lactadherin und Erzeugung eines geeigneten Antikörpers notwendig), im Western Blot ist er bis auf Weiteres unsicher und eignet sich nicht für die Routinediagnostik im Labor. Aus diesem Grund, und auch weil eine kleine, Western Blot basierte Voruntersuchung nicht auf große Unterschiede zwischen Atherosklerose-Patienten und Kontrollen schließen ließ, erscheint Lactadherin als Marker für die Atherosklerose eher ungeeignet.

#### 4.1.2 *Lactadherin wird überwiegend in Makrophagen exprimiert*

Vergleicht man benachbart gelegene Schnitte, die mit Lactadherin-Sonden *in situ* hybridisiert wurden, stellt man fest, dass das Signal in Regionen hoher Schaumzellichte besonders hoch ist. In der Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass Lactadherin mit dem Makrophagenmarker CD68 kolokalisiert, was darauf schließen lässt, dass das Protein von Makrophagen exprimiert wird. Dies konnte im RTD-PCR-Experiment an Peritonealmakrophagen und THP-1-Zellen bestätigt werden, und steht im Einklang mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen [14, 92]. Zusätzlich kolokalisiert Lactadherin mit Fraktalkin, einem Chemokin. Fraktalkin wird von Endothelzellen und Makrophagen exprimiert [85]. Die Konzentration von Fraktalkin und dem Rezeptor CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub> ist bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit stark erhöht [51, 136] und konnte auch in der atherosklerotischen Läsion immunhistochemisch nachgewiesen werden [241]. CX<sub>3</sub>CL<sub>1</sub> wirkt als Adhäsionsmolekül und Chemoattractant [105, 222]. Zusätzlich hat es Einfluss auf die Expression von Lactadherin. Dies wurde zuerst von Leonardi-Essmann *et al.* in Gliazellen der Ratte beobachtet [129]. Aber auch in der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 und in Peritonealmakrophagen der Ratte wurde nach Stimulation mit Fraktalkin eine erhöhte Lactadherinexpression sowie eine höhere Phagozytoseleistung detektiert [149]. Sowohl in der Immunfluoreszenz als auch in der *in situ*-Hybridisierung konnten wir die stärkste Lactadherin-Expression um den nekrotischen Kern bzw. im Zentrum der Läsion detektieren, ein Ort mit einem hohen Aufkommen apoptotischer Zellen. In läsionsfreien Präparaten ist der Nachweis von Lactadherin kaum möglich. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen der Immunhistochemie von Ait-Oufella *et al.* [2], nicht aber mit deren Western Blot-Ergebnissen, was allerdings oben beschriebene Gründe haben kann (unspezifisches Signal).

Lactadherin wird in hohem Maße von Makrophagen in der atherosklerotischen Läsion exprimiert. Diese Expression wird teilweise durch Fraktalkin reguliert, welches auch chemotaktischen Einfluss auf die Makrophagen nimmt. Gelegen in enger Nachbarschaft zum Lipid Core haben Lactadherin-



exprimierende Schaumzellen höchstwahrscheinlich Kontakt zu apoptotischen Zellen.

#### 4.1.3 *Lactadherin-Expression wird durch oxidativen Stress und Kontakt mit apoptotischen Zellen induziert, nicht durch modifiziertes LDL*

Lactadherin wird in Makrophagen exprimiert. Untersucht wurde die Expression in Makrophagenzelllinien, thioglykolatrekrutierten Peritonealmakrophagen und unterschiedlichen Geweben. Es wurde die Expression der Langform und beider Formen des murinen Lactadherins untersucht, um zu überprüfen, ob die Expression der Langform sich von der der Kurzform unterscheidet. Die Langform wirkt als Opsonin, während die Kurzform für Gameten-Interaktion verantwortlich zu sein scheint [3, 68, 91, 92]. In den von uns untersuchten Geweben und Zelltypen zeigte sich kein Unterschied im Expressionsmuster. Die Expression ist in Geweben mit einer hohen Anzahl an Makrophagen am höchsten, so in der Lunge, in der eine große Anzahl Alveolarmakrophagen vorkommt. Dies konnte auch in der Immunfluoreszenz gezeigt werden. Auch in der Leber finden sich Makrophagen in Form von Kupfferschen Sternzellen. Im Darm wird Lactadherin in den Peyerschen Plaques exprimiert. Die Lactadherinexpression ist bei Mäusen unterschiedlicher Genotypen verschieden. Die Expression der  $LDLR^{-/-}$ -Peritonealmakrophagen ist etwa so hoch wie die der Peritonealmakrophagen der Wildtyp-Maus. Auch bei den  $ApoE^{-/-}$ ,  $ApoE^{-/-}/Gpx1^{-/-}$  und  $Gpx1^{-/-}$ -Tieren ist das Expressionsniveau ungefähr gleich, aber mindestens dreimal höher als das des Wildtyps. Die Fütterung der Tiere mit proatherogener Western-Type-Diät veränderte das Expressionsniveau kaum.

Der Unterschied der  $ApoE^{-/-}$ ,  $ApoE^{-/-}/Gpx1^{-/-}$  und  $Gpx1^{-/-}$ -Tiere zu den  $LDLR^{-/-}$  und Wildtyp-Mäusen liegt nicht in der Entwicklung einer Atherosklerose (dies tun auch  $LDLR$ -defiziente Tiere), sondern in der Gemeinsamkeit der Folgen des Knockouts. Die Änderung des  $ApoE$ -Genotyps führt beim Menschen entweder zum Bild der Hyperlipoproteinämie Typ III (Isoform apoE2) oder zu einem leichten Anstieg des LDL-Cholesterins und einer Neigung zu M. Alzheimer (apoE4). Auch die Lactadherin-Defizienz hat die Typ III Hyperlipoproteinämie zur Folge. Zusätzlich sind Patienten mit ApoE4 und auch  $ApoE^{-/-}$ -Mäuse empfänglicher für oxidativen Stress [110, 211]. Es ist bekannt, dass die Anwesenheit von ApoE vor Apoptose schützt, die durch oxidativen Stress induziert wurde [97]. Zusätzlich zum Schutz vor Apoptose scheint ApoE auch eine Aufgabe bei der Vernichtung apoptotischer Zellen zuzukommen [84]. Wie bei ApoE führt auch die Defizienz der Glutathion-Peroxidase 1 zu vermehrter Apoptose. In neuronalen Zellen der  $Gpx1^{-/-}$ -Maus konnte gezeigt werden, dass die Glutathion-Peroxidase 1 durch die Neutralisierung von Wasserstoffperoxid eine wichtige Rolle in der Regulation der Apoptose dieser Zellen inne hat [49]. Das Fehlen des LDL-Rezeptors führt in der Maus zwar zur Entwicklung einer Atherosklerose, hat aber keinen Einfluss auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffspe-

zies (ROS) und damit den oxidativen Stress. Folgende Erklärung für die erhöhte Lactadherin-Expression bei Peritonealmakrophagen aus *ApoE*<sup>-/-</sup>, *GPx1*<sup>-/-</sup>- und *ApoE*<sup>-/-</sup>/*GPx1*<sup>-/-</sup>-Mäusen scheint uns also plausibel: Das verstärkte Vorkommen reaktiver Sauerstoffspezies und die dadurch induzierte Apoptose führt zu einer Hochregulation von Lactadherin in benachbarten Makrophagen. Der Kontakt zu apoptotischen Zellen als Ursache erhöhter Lactadherin-Expression in Makrophagen konnte auch im Kokulturrexperiment an THP-1-Zellen gezeigt werden. Das starke Vorkommen von Lactadherin-mRNA und Protein in den Läsionen, die reich sind an apoptotischen Zellen, unterstreicht dies nochmals. Die starke Lactadherin-Expression in den Alveolarmakrophagen der Lunge, also Zellen, die besonderem oxidativen Stress ausgesetzt sind, bestätigt auch dessen Beteiligung an der Expressionsregulation. Im Gegensatz zu diesen Zellen zeigen beispielsweise Kupffersche Sternzellen oder Zellen der Peyerschen Plaques ein deutlich niedrigeres Expressionsniveau; diese Zelltypen haben aber auch keinen direkten Kontakt zu Luftsauerstoff. Diese Beobachtungen decken sich mit der Hypothese von Ait-Oufella *et al.* [2].

Keine Bedeutung für die Lactadherin-Expression in Peritonealmakrophagen hat hingegen die durch WTD induzierte Atherosklerose des Tieres. Auch die Beladung mit modifiziertem LDL in physiologischen Konzentrationen hat keinen Einfluss. Zusätzlich wurde an der humanen Zelllinie der Effekt der Differenzierung vom Monocyten- zum Makrophagen-Genotyp untersucht. Dies blieb ohne Effekt für die MFG-E8-Expression.

Ursächlich scheint vielmehr der Kontakt von Monocyten/Makrophagen zu apoptotischen Zellen, wobei es sich nicht um direkten Zell-Zell-Kontakt handeln muss (im THP-1-Kokulturrexperiment standen Makrophagen und apoptotische Zellen nur über das Medium in Kontakt miteinander). Als „Signalübermittler“ oder „Find me“-Signale kommen beispielsweise Lyso-phosphatidylcholin (LPC) oder Fraktalkin in Frage [126, 219]. Von letzterem konnten wir die Kolo-kalisation mit Lactadherin in Makrophagen zeigen, und ein regulatorischer Effekt bezüglich des Lactadherins ist bekannt [129].

#### 4.1.4 Schlussfolgerung

Das Protein Lactadherin selbst wirkt weder pro- noch antiatherogen. Allerdings spielt Lactadherin eine wichtige Rolle beim Abbau apoptotischer Zellen, auch in der atherosklerotischen Läsion. Ein Fehlen von Lactadherin führt deshalb zur Atheroprogression. Es erleichtert als Brückenmolekül die Phagozytose. Es wird von Makrophagen exprimiert, seine Expression wird unter anderem von Fraktalkin und anderen Substanzen apoptotischer Zellen reguliert. Zum Teil scheint diese Apoptose ROS-induziert (s. Abb. 38).

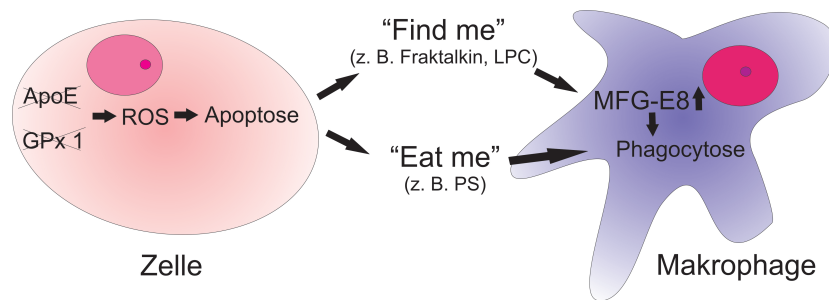


Abbildung 38: Regulation der Lactadherin-Expression. Apoptose von Zellen (z. T. durch oxidativen Stress bedingt (ROS)) führt zur Ausschüttung von „Find me“-Signalen (LPC Lysophosphatidylcholin), die die Lactadherin-Expression regulieren. Lactadherin erleichtert durch Bindung an Phosphatidylserin (PS) und den Makrophagen die Apoptose.

#### 4.1.5 Aussichten

Zukünftig sollen Peritonealmakrophagen auf eventuell gesteigerten oxidativen Stress untersucht werden, um die These zu untermauern, dass dieser - z. B. bedingt durch den Genotyp - die Apoptose und damit auch die Lactadherinausschüttung erhöht. Auch die Apoptoserate selbst soll bei Makrophagen unterschiedlichen Genotyps untersucht werden. Zusätzlich sollen Peritonealmakrophagen und andere Gewebe verschiedener Genotypen auf Expressionsunterschiede hin untersucht und quantifiziert werden (*in situ*-Hybridisierung und RTD-PCR).

## 4.2 MSP

Wie bereits in der Einleitung dargestellt (vergl. Kap. 1.5.4), fiel bei einer Genome Wide Association Study (GWAS) der Universitätsmedizin Mainz im Rahmen der AtheroGene-Studie unter anderem der SNP (single nucleotide polymorphism) c2078t (rs3197999) im *mst1/msp*-Gen auf: Er konnte im Rahmen dieser Untersuchung mit der koronaren Herzkrankheit (KHK) in Zusammenhang gebracht werden (Blankenberg *et al.*, unpublizierte Daten). Der Einzelbasenaustausch c2078t hat die Aminosäuresubstitution Arg689Cys zur Folge. Position 689 befindet sich in der  $\beta$ -Kette des MSP-Proteins in einem Bereich, der für die Ligand-Rezeptor-Interaktion bedeutsam ist. Die Ergebnisse der Algorithmen SIFT und PolyPhen2 legen eine funktionelle Bedeutung des Polymorphismus nahe. Die Minorallelfrequenz liegt nach den Daten der dbSNP ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=3197999](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=3197999); 20.4.2011) bei 0,213, was auch ungefähr der Häufigkeit im AtheroGene-Kollektiv (0,29) entspricht.

Noch während der Replikationsphase der GWAS wurde mit der eukaryoten Expression von wildtypischem und mutantern MSP begonnen, um einen funktionellen Unterschied dieser beiden Formen zu untersuchen. Obwohl die Assoziation nicht in allen Kollektiven der Replikation bestätigt werden konnte, wurden die vielversprechenden Experimente fortgeführt. Zusätzlich zu der Assoziationsuntersuchung der AtheroGene-Studie wurden von vielen weiteren Arbeitsgruppen GWAS durchgeführt, die zeigten, dass der Polymorphismus mit einem erhöhten Risiko für chronisch entzündliche Darmerkrankungen einhergeht.

Vor dem Hintergrund all dieser Studien wurden verschiedene Eigenschaften des Makrophagen stimulierenden Proteins und die unterschiedliche Wirkung von Wildtyp und Mutante, die zuvor als rekombinante Proteine in einem eukaryoten Zellsystem exprimiert worden waren, untersucht. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Migration und die Proliferation von Makrophagen unter MSP-Einfluss gelegt.

### 4.2.1 MSP hat Einfluss auf die Migrations- & Proliferationsrate

Mit Hilfe des Migrationsassay kann die MSP-abhängige Migration von Zellen bestimmt werden, mit Hilfe des Proliferationsassay die Proliferation. Die Zellen sind bei diesen Versuchen lediglich einem Stimulus ausgesetzt, dem MSP. Dies entspricht nicht den physiologischen Bedingungen, wie sie beispielsweise in der Gefäßwand herrschen. Dort sind Makrophagen nicht nur einem Stimulus ausgesetzt. Durch verschiedene Zelltypen werden Cytokine und Wachstumsfaktoren abgesondert, die sowohl pro- als auch antimigratorisch wirken können. Andererseits kann so isoliert die Wirkung des MSP auf die Zelle untersucht werden. Zudem wurden bei diesen Versuchen, wie bei vielen anderen in vitro-Untersuchungen dieser Arbeit auf die Tumorzelllinie THP-1 zurückgegriffen, deren Zellen immortal sind und zum Entdifferen-

zieren neigen. Dieser Tatsache wurde versucht entgegenzuwirken, indem ausschließlich Zellen der frühen Passagen in die Versuche eingesetzt wurden. Zusätzlich muss bei der Interpretation der Daten bedacht werden, dass diese Zellen weder geno- noch phänotypisch den Monocyten/Makrophagen des peripheren Blutes vollständig entsprechen.

Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurde auf ein Assay zurückgegriffen, dessen Thymidin durch 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) ersetzt wird. Zwar ist der radioisotopenbasierte Assay (Einsatz von  $^3\text{H}$ -Thymidin) etablierter, als der BrdU-Assay, welcher auf eine Antikörpermarkierung zurückgreift, jedoch ist der hier verwendete sicherer und einfacher in der Handhabung. Nach Herstellerangaben ist die Sensitivität beider Methoden vergleichbar.

Zu Makrophagen differenzierte THP-1-Zellen wurden mit mutantern und wildtypischem MSP unterschiedlicher Konzentrationen stimuliert. Das Protein wirkt in den Konzentrationen, in denen der maximale Unterschied zwischen wildtypischem und mutantern MSP bezüglich der Migration und der Proliferation beobachtet wurde, weder in seiner wildtypischen noch seiner mutanten Form proapoptotisch. Sowohl das Ergebnis des Caspase-Aktivitätsassays als auch der TUNEL-Färbung war negativ. Lediglich höhere MSP-Konzentrationen (4 - 7 ng/ml in der TUNEL-Färbung, ab 1 ng/ml in der Caspaseaktivitäts-Bestimmung) führten zu einem dezenten Anstieg der Apoptoserate. Die physiologische Konzentration des Pro-MSP im Serum ist 2 - 5 nM (160 - 400 ng/ml) [231], diese Konzentrationen konnten im Überstand der MSP-exprimierenden CHO-K1-Zellen nicht erreicht werden. Allerdings wird davon ausgegangen, dass MSP erst in Wundnähe oder im extravasculären Raum vollständig in seine aktive Form überführt wird. In welcher Konzentration das aktive Protein schließlich im Gewebe oder im atherosklerotischen Plaque vorliegt ist unklar. Wir gehen aber von maximal einem Zehntel der Serumkonzentration aus. Proliferations- und Migrationsassay zeigen eine konzentrationsabhängige Dynamik der MSP-Wirkung im Bereich zwischen 0,05 und 1,0 ng/ml.

Nach Stimulation mit MSP (wildtyp und mutant) wurde die Migrationsrate der THP-1-Zellen in der Boyden-Kammer und die Proliferationsrate im Immunoassay bestimmt. Der Verlauf der Kurven ist für beide Methoden sehr ähnlich. Die Kurven steigen zu Beginn sehr steil an (bis etwa 1 ng/ml MSP), um im weiteren Verlauf, bei entsprechend hoher Konzentration, abzufachen. Die Kurve verläuft bei Stimulation mit mutantern MSP wesentlich steiler als bei Stimulation mit dem wildtypischen Protein. Auch die Zahl der insgesamt migrierten/proliferierten Zellen ist nach Zugabe von  $\text{MSP}^{\text{mut}}$  höher als nach  $\text{MSP}^{\text{wt}}$ -Zugabe. Somit verstärkt mutantes MSP im Vergleich zum wildtypischen Protein die Proliferations- und Migrationsrate mindestens um den Faktor 2. Aus den Ähnlichkeiten der Proliferations- und Migrationskurven ergibt sich die Frage, ob der Unterschied bezüglich der Migration nicht auch eine Folge der vermehrten Proliferation ist. Die Gesamtzahl der Zellen vor und nach Migration (Addition der Werte der Zellzählung aus oberer und unterer Kammer am Ende der Experimente und Vergleich mit der Zahl der

eingesetzten Zellen) bleibt jedoch konstant. Da im Rahmen des Migrationsexperiments also keine signifikante Proliferation zu beobachten war, ist davon auszugehen, dass MSP unter den Bedingungen dieses Assay lediglich die Migration anregt. Wie in Proliferationsexperimenten gezeigt, wird durch MSP aber auch die Proliferationsrate gesteigert.

MSP stimuliert als wildtypisches und mutantes Protein die Proliferation und Migration von Makrophagen. Die mutante Form hat einen stärkeren Effekt als die wildtypische.

#### 4.2.2 *Der SNP rs3197999 ist mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und einem erniedrigtem Atheroskleroserisiko assoziiert*

In Genom-weiten Assoziationsstudien (GWAS) werden Hunderttausende Einzelbasenaustausche (SNP) und ihre Assoziation zu den verschiedensten Erkrankungen untersucht. Die untersuchten Kollektive umfassen mehrere hundert bis mehrere tausend Probanden. Diese Methodik hat die Untersuchung genetischer Einflüsse auf komplexe Krankheiten revolutioniert. Dennoch dürfen bei der Interpretation dieser Studien einige Punkte nicht aus den Augen gelassen werden. Durch die große Anzahl an untersuchten Markern sind auch viele Ergebnisse zufällig positiv. Dieser Tatsache wird mathematisch Rechnung getragen (Bonferroni-Korrektur) [169, 183]. SNPs mit einer sehr geringen Minorallelfrequenz (0,01 - 0,05) werden aus der Auswertung entfernt, da Assoziationen mit einer Erkrankung statistisch nicht aussagekräftig sind [169]. Auch monogene Erbkrankheiten werden aufgrund ihrer Seltenheit in diesen Studien nicht erfasst. Folglich wird nur ein schmaler Bereich von Assoziationen durch diese Studien detektiert. Auch die getestete Population ist kritisch zu betrachten. Nur entsprechend große Populationen halten einer Signifikanzprüfung stand. Werden verschiedene genetisch heterogene Gruppen in einer Studie analysiert, so muss dies in der Auswertung beachtet werden, da unterschiedliche Allelfrequenzen auch durch den genetischen Drift hervorgerufen werden können [169]. Zusätzlich müssen die Genotypfrequenzen im Hardy-Weinberg-Equilibrium liegen. Die Assoziation eines SNPs mit einer Erkrankung bedeutet lediglich, dass dieser Polymorphismus in der Kontrollgruppe seltener detektiert wurde, als im erkrankten Kollektiv [183]. Nur in wenigen Studien, die Assoziationen zeigen, wird die physiologische Konsequenz des SNP untersucht. Dies zeigt sich auch in einer Veröffentlichung von Franke *et al.* aus dem Jahre 2010 [76]. Dort gelten die Gene *mst1/msp*, *gpx1* und *bsn* als mögliche Kandidaten, die als Ursache der Assoziation des SNP rs3197999 mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen infrage kommen. Funktionelle Untersuchungen zur Klärung der Frage, welcher der Kandidaten tatsächlich verantwortlich ist, wurden nicht unternommen. Die Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit zeigen aber eindeutig, dass der Polymorphismus rs3197999 zu einem „gain of function“ bei MSP führt, also deutliche, funktionelle Auswirkungen auf die Makrophagenfunktion hat. Da Makrophagen sowohl für die Pathogenese von

chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, wie auch für die Atherogenese eine wichtige Rolle spielen, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass rs3197999 im *mst1/msp*-Gen selbst Ursache der gefundenen Assoziation ist.

Am AtheroGene-Kollektiv der Universitätsmedizin Mainz wurde mit dem Affymetrix Human 20K cSNP Panel eine Genom-weite Assoziationsstudie durchgeführt. Etwa 20000 Gene wurden auf Polymorphismen untersucht. Das AtheroGene-Kollektiv besteht aus 694 Probanden, davon 344 mit nachgewiesener koronarer Herzkrankheit (KHK) und 350 Kontrollen. Als Validationskollektiv wurde das PRIME-5yr-Kollektiv, bestehend aus 510 Probanden, davon 249 Personen mit nachgewiesener KHK und 261 Kontrollen herangezogen. Unter anderem wurde die Assoziation des SNP rs3197999 mit KHK untersucht (Blankenberg *et al.*, unpublizierte Daten). Dieser SNP führt wie bereits beschrieben zur Aminosäuresubstitution R689C (c2078t) in MSP. Die Minorallelfrequenz (MAF) bei dieser Untersuchung beträgt 0,215 bei den Probanden und 0,31 bei den Kontrollen des AtheroGene-Kollektivs. Die Odds ratio liegt bei 0,610 mit einem 95 % confidence interval (95 % CI) von 0,475 - 0,783. Die Odds ratio der Meta-Analyse (AtheroGene- & PRIME-5yr-Kollektiv) liegt bei 0,688 (95 % CI 0,572 - 0,828) und hat einen p-Wert von  $7,9 \times 10^{-6}$ . Die Replikation dieser Studie gelang allerdings nicht in allen hierfür vorgesehenen Kollektiven. Die im AtheroGene-Kollektiv detektierte Assoziation konnte bislang also nicht definitiv bestätigt werden.

Die Untersuchungen zur Auswirkung des Aminosäureaustauschs R689C im MSP auf die Stimulierbarkeit von Makrophagen wurden nach den Ergebnissen der ersten Assoziationsstudie begonnen, und auch nach unvollständiger Replikation fortgeführt. Zum Einen zeichnete sich zu diesem Zeitpunkt bereits ein Effekt des mutanten MSP ab, zum Anderen wurde in anderen GWAS die Assoziation des SNP rs3197999 mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) nachgewiesen. Im Jahr 2008 beschrieben Goyette *et al.* und Barrett *et al.* die Assoziation verschiedener Loci mit der chronisch inflammatorischen Erkrankung Morbus Crohn, einer dieser SNP ist rs3197999 [19, 83]. Die Odds ratio liegt hier bei 1,2 ( $p = 1,15 \times 10^{-12}$ ). Auch für die ulcerative Colitis wurden ähnliche Ergebnisse erhoben, hier ist die Assoziation aber stärker, die Odds ratio des homozygoten Austauschs liegt bei 1,45 ( $p = 8 \times 10^{-6}$ ) [74]. Die Odds ratios legen den Schluss nahe, dass der SNP rs3197999 mit dem erhöhten Risiko an einer CED zu erkranken assoziiert ist. Gleichzeitig ist das Risiko der CED-Patienten eine KHK zu entwickeln, nicht erhöht; eine durchaus erstaunliche Tatsache, wenn man bedenkt, dass chronische Entzündungen zum Teil zu einem sehr deutlichen Anstieg des Atherosklerose-Risikos führen. Dies wird auch durch weitere Untersuchungen bestätigt: Dorn & Sandler führten eine Meta-Analyse durch und bestimmten die standardisierte Mortalitätsrate (SMR) aufgrund von Herz-Kreislauf-Erkrankungen bei Patienten mit CED. Diese ist gegenüber den Kontrollen aber weder bei Patienten mit M. Crohn noch mit Colitis ulcerosa erhöht [64]. Zum gleichen Schluss kommen Maharshak *et al.* durch die Messung der Intima-Mediadicke in der Carotis. Diese Arbeitsgruppe

stellt zusätzlich die Hypothese auf, dass CED-Patienten durch eine noch nicht geklärte Ursache verstärkt vor Atherosklerose geschützt sind [143]. Es gibt allerdings auch die Beobachtung, dass CED-Patienten eine verstärkte Intima-Mediadicke in der Carotis aufweisen [167]. Die Arbeitsgruppen einigten sich im Rahmen einer publizierten Korrespondenz allerdings darauf, dass die Ursache hierfür in den unterschiedlichen Kollektiven zu suchen sei [168]. Wie oben bereits angemerkt, ist die verhältnismäßig niedrige Zahl an Atherosklerose-Erkrankungen in CED-Kollektiven ungewöhnlich, da das Risiko eine Herz-Kreislauf-Erkrankung oder die ursächliche Atherosklerose zu entwickeln bei Patienten mit chronischer Entzündung erhöht ist. Prototypen der chronischen Inflammation sind die rheumatoide Arthritis oder der systemische Lupus erythematosus. Abhängig von der Studie ist das Risiko einer Herz-Kreislauf-Erkrankung für Arthritis-Patienten um den Faktor 1,6 bis 6 erhöht, für Lupus-Patienten sogar um das 0,6 bis 17-fache [78, 95, 189].

Einer der Faktoren für die inverse Korrelation der Atherosklerose mit den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist möglicherweise der Einfluss des MSP auf die Makrophagen. Chronische Dysregulation der Homöostase der Darmmukosa sind die Ursache der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen M. Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU), die ein ähnliches klinisches Bild zeigen. Es handelt sich um chronische Entzündungen des Verdauungstraktes, die mit Diarrhoe und Abdominalschmerzen einhergehen. Der Unterschied zwischen den beiden Erkrankungen besteht in der Lokalisation der Entzündung, ihrem histologischen Bild und der zu Grunde liegenden Immunreaktion. Die genaue Etiologie dieser Erkrankungen ist bis heute ungeklärt, allerdings spielt neben Umwelteinflüssen, der genetischen Disposition und der mikrobiotischen Besiedlung des Darms auch die Immunaktivierung der Zellen der Mukosa eine wichtige Rolle. All dies führt zur chronischen Entzündung [194]. Untersuchungen zur NOD2/CARD15-Expression im Darm legten nahe, dass Epithelzellen und Makrophagen primär vom pathophysiologischen Defekt betroffen sind, und die T-Zell-Aktivierung erst sekundär erfolgt und zur chronischen Ausprägung der Erkrankungen führt [224]. Entsprechend dem ähnlichen klinischen Phänotyp sind auch die Suszeptibilitätsloci für die Erkrankungen zum Teil deckungsgleich. Eines der ersten untersuchten Gene war *nod2/card15*. Ein weiterer dieser Loci, die sowohl mit MC und CU assoziiert sind, ist der von uns untersuchte Polymorphismus rs3197999 [76, 239]. War bei Franke *et al.* noch unklar, ob dieser SNP die Gene *mst1/msp*, *gpx-1* oder *bsn* betrifft [76], sprechen die hier vorgelegten Untersuchungen sehr stark für *mst1/msp*. Das wildtypische und das mutante Protein haben einen unterschiedlichen Einfluss auf Makrophagen. Diese Beobachtung muss allerdings in den physiologischen Kontext eingeordnet werden.

Im Darm kommt die größte Population residenter Makrophagen im Körper vor, welche Teil des angeborenen Immunsystems sind [127]. Bei Kindern mit unbehandeltem M. Crohn ist die Anzahl der Makrophagen im untersuchten Darmabschnitt wesentlich höher als beim Kontrollkollektiv gleichen Alters



[171]. Bei ulcerativer Colitis tritt dies aber kaum zu Tage. Diese Beobachtung allein, kann den Einfluss, den MSP auf die CED nimmt nicht erklären, da die ulceröse Colitis ähnlich stark mit dem SNP assoziiert ist, wie die Crohn-Erkrankung im Colon [239]. Bekannt ist aber auch, dass im Rahmen der CED eine immature CD14<sup>+</sup>Makrophagensubpopulation aus dem Blutssystem einwandert [86, 185], welche proinflammatorische Eigenschaften aufweist, die die Gewebsmakrophagen nicht zeigen [186]. Möglicherweise regt mutantes MSP die Gewebsmakrophagen und die CD14<sup>+</sup>Makrophagen zur Proliferation und Migration an und wirkt so immunstimulatorisch. Dies hat einen negativen Einfluss auf das Entzündungsgeschehen.

Bei der CED spielt das angeborene Immunsystem eine wichtige Rolle. Aktivierte Dendritische Zellen und Makrophagen setzen eine Vielzahl unterschiedlicher Cytokine frei. Diese stimulieren verschiedene Klassen von T-Zellen, und setzen so die adaptive Immunantwort in Gang. Störungen in der Regulation der T-Zellen haben Einfluss auf die Entwicklung und Progression der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Wie Morrison *et al.* zeigen konnten setzen stimulierte Makrophagen T-Zell triggernde Cytokine wie IL12 p40 (und damit auch IL23 p40) und TNF- $\alpha$  frei. Dies kann durch Prästimulation mit MSP IL-10 unabhängig vermindert werden. Auch die Freisetzung von IL6 wird auf diese Weise heraufgesetzt [157]. IL12 spielt eine Rolle bei der Entwicklung von Th1-Zellen und unterdrückt zeitgleich Th2-Antworten [218]. Im Mausmodell waren IL-12 defiziente Tiere nicht mehr in der Lage Th1-Antworten via IFN- $\gamma$  zu erzeugen, und zeitgleich stärker empfänglich für Infektionen durch intrazelluläre Pathogene [142, 146]. Da rs3197999 einen „gain of function“ des MSP-Proteins zur Folge hat, wäre folgender Pathomechanismus für die CED denkbar: Durch Stimulation mit der Mutante wandert eine größere Zahl CD14<sup>+</sup>Makrophagen in die Darmwand ein, und proliferiert verstärkt, gleich den Gewebsmakrophagen. Durch die Erniedrigung des IL12 ist die Empfänglichkeit für eine Infektion durch Mikroorganismen des Darms erhöht. Weiterhin sezernieren diese Makrophagen proinflammatorisch wirkendes IL6, aktivieren damit T-Zell Subpopulationen und forcieren die Entzündung.

Im Rahmen der Atherosklerose hingegen könnte eine größere Anzahl Makrophagen antiinflammatorisch wirken, da sie in der Lage sind große Mengen apoptotischer Zellen, Zelldebris, modifiziertes und nichtmodifiziertes LDL aufzunehmen. Das LDL kann zusätzlich über den reversen Cholesterintransport wieder ausgeschieden werden.

Somit hätte der gleiche Stimulus bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen zwei ganz unterschiedliche Konsequenzen.

#### 4.2.3 Schlussfolgerung

Mutantes MSP hat einen stärkeren Einfluss auf die Migrations- und besonders Proliferationsrate der Makrophagen als das wildtypische Protein. Der Aminosäureaustausch im MSP ist mit erhöhtem CED- und erniedrigtem

Atheroskleroserisiko assoziiert. Die erhöhte Zellzahl und eine eventuell veränderte Cytokinfreisetzung könnten in beiden Erkrankungen unterschiedliche Konsequenzen haben und pro- oder antiinflammatorisch wirken.

#### 4.2.4 *Aussichten*

Um die möglicherweise durch  $MSP^{mut}$  und  $MSP^{wt}$  unterschiedlich veränderte Cytokinfreisetzung zu untersuchen, sollen THP-1-Zellen oder primäre Makrophagen analog zu dem bei Morrison *et al.* angegebenen Protokoll stimuliert, und die Cytokin-Ausschüttung im Kulturüberstand untersucht werden [157]. Nach  $MSP^{mut}$ -Zugabe wurde eine erhöhte Makrophagen-Proliferationsrate im Zellkultorexperiment detektiert. Zu klären wäre, ob MSP in der Läsion den gleichen Effekt hat, und ob sich die Makrophagen in der Läsion überhaupt vermehren, oder verstärkt einwandern. Eine Untersuchung am Mausmodell ist bereits in Planung. Die Signaltransduktionskaskade unter Einfluss verschiedener Stimuli soll analysiert werden, besonders die RON- und die Transkriptionsfaktor-Aktivierung bedarf weiterer Untersuchungen.

Zudem soll zur Bestätigung der GWAS-Ergebnisse eine Untersuchung des PreventIt-Kollektivs (Gutenberg Herz-Studie) erfolgen. Bei dieser prospektiven Studie sollen die Probanden bezüglich des SNP rs3197999 genotypisiert werden und deren MSP-Spiegel im Serum bestimmt werden. In einer Pilotstudie konnte in unserem Labor bereits ein Zusammenhang zwischen Genotyp und MSP-Serumspiegel gezeigt werden (Glowacki *et al.*, unpublizierte Daten). Zusätzlich ist die Abfrage der KHK, der CED und anderer entzündlicher Erkrankungen im Prevent it-Kollektiv geplant, um einen direkten Zusammenhang zwischen dem SNP, der Atherosklerose und der CED herstellen zu können.

Teil V

ANHANG



## ANHANG

## A.1 PUFFER &amp; MEDIEN

LB-Medium	20 g LB-Broth dH <sub>2</sub> O ad 1l pH 7,0
LB-Agar	20 g Agar-Agar LB-Medium ad 1 l
NZY-Medium	1 % Caseinhydrolysat 0,5 % Hefeextrakt 85 mM NaCl pH 7,5
SOC-Medium	2 % Trypton 0,5% Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM Glucose
Ampicillin	100 mg/ml Ampicillin in dH <sub>2</sub> O
Kanamycin	100 mg/ml Kanamycin in dH <sub>2</sub> O
IPTG	20 mM in dH <sub>2</sub> O
X-Gal	40 mg/ml in DMF
Plasmid-Präp-Puffer 1	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 100 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
Plasmid-Präp-Puffer 2	0,2 M NaOH 1% SDS

Plasmid-Präp-Puffer 3	60 % 5 M Kaliumacetat 11,5 % Eisessig 28,5% dH <sub>2</sub> O
Plasmid-Präp-Puffer QBT	750 mM NaCl 50 mM MOPS 15% Ethanol 0,15% Triton X-100 pH 7,0
Plasmid-Präp-Puffer QC	1,0 M NaCl 50 mM MOPS 15% Ethanol pH 7,0
Plasmid-Präp-Puffer QF	1,25 M NaCl 50 mM Tris/HCl 15% Ethanol pH 8,5
Natriumacetat-Lösung	3 M NaAc pH 5,2
LDL-Dialyse-Puffer	5 mM Tris 150 mM NaCl 0,23 mM EDTA (nicht bei späterer oxLDL-Generierung) pH 7,4
Mowiol/DABCO "Anti-Fading"-Eindeckmedium	6 g Glycerin 2,4 g Mowiol 4-88 6 ml aqua dest. 12 ml 0,2 M Tris/HCl pH 8,5 25 mg/ml 1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)octan (DABCO)
10 x PBS	1,37 M NaCl 27 mM KCl 43 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 14 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,2

20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Na Citrat pH 7,0
TBS	13 mM Tris 150 mM NaCl
TBS-T	TBS 0,1 % Tween-20
DNA-Ladepuffer	30 % Glycerin (v/v) 0,4 % Bromphenolblau (w/v)
50 x TAE	2 M Tris 100 mM EDTA mit Eisessig auf pH 8,0 einstellen
ISH-Entwickler	400 ml dH <sub>2</sub> O (50°C) 81 g Kodak D-19 Developer Trockensubstanz dH <sub>2</sub> O (RT) ad 507 ml
ISH-Fixier-Lösung	290 ml dH <sub>2</sub> O 100 ml Kodak Rapid Fixer-Lösung A 11 ml Kodak Rapid Fixer-Lösung B
ISH-Stop-Lösung	1 % Essigsäure
EAMS (Endotoxin aktiviertes Mausserum)	3 mg / ml LPS aus <i>S. typhosa</i> Inkubation 90 min bei 37 °C Inkubation 30 min bei 56 °C Zentrifugation 30 min bei 40000 x g und 4 °C Lagerung aliquotiert bei - 80 °C
Zellkulturmedium THP-1	RPMI 1640 10% FCS 2 mM L-Glutamin 1 mM NaPyruvat

Zellkulturmedium CHO-K1	F 12 10% FCS 2 mM L-Glutamin
Zellkulturmedium Primärkultur	DMEM 10 % FCS 1 % Pen/Strep 2 mM L-Glutamin
Laemmli-Elektrophoresepuffer	25 mM Tris/HCl 192 mM Glycin 0,1 % SDS (w/v)
Denaturierender Lysepuffer	50 mM Tris/HCl 5 mM EDTA 1% SDS (w/v) pH 7,4
Entfärbe-Lösung	20 % Isopropanol 7 % Essigsäure
Färbe-Lösung	40 % Methanol 7,5 % Essigsäure 1 % Coomassie Brilliant Blue R 250 (w/v)
2 x Protein-Ladepuffer	4 ml SDS (20%ig; w/v) 1 ml $\beta$ -Mercaptoethanol 2 ml Glycerin Spatelspitze Bromphenolblau 3,6 ml Stabilisierungspuffer
Sammelgelpuffer	1 M Tris/HCl 0,4 % SDS (w/v) pH 6,8
Stabilisierungspuffer	0,05 M Tris/HCl 5 mM CaCl <sub>2</sub> 5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,15 M NaCl pH 7,4



“Stripping”-Puffer	200 mM Glycin 0,1 % SDS (w/v) 1% Tween 20 pH 2,2
Tobwin-Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % Methanol pH 8,3
Trenngelpuffer	1 M Tris/HCl 0,4 % SDS (w/v) pH 8,9

## A.2 SEQUENZEN

*Aminosäuresequenz (Proteinexpression)*

## Lactadherin C-Terminus kurz (1/2)

1 MHHHHHSSG LVPRGSGMKE TAAAKFERQH MDSPDLGTDD DDKAMADIGS  
 51 EFALHMMARN FGSVQFVASY KVAYSNDSAN WTEYQDPRTG SSKIFPGNWD  
 101 NHHKKNLFE TPILARYVRI LPVAWHNRIA LRLELLGC

## Lactadherin C-Terminus lang (3/4)

1 MHHHHHSSG LVPRGSGMKE TAAAKFERQH MDSPDLGTDD DDKAMADIGS  
 51 EFALGSMNLF ETPVEAQYVR LYPTSCHTAC TLRFELLGCE LNGCANPLGL  
 101 KNNSIPDKQI TASSSYKTWG LHLFSWNPSY ARLDKQGNFN AWWAGSYGND  
 151 QWLQVDLGSS KEVTGIITQG ARNFGSVQFV ASYKVAYSND SANWTEYQDP  
 201 RTGSSKIFPG NWDNHHSHKKN LFETPILARY VRILPVAWHN RIALRLELLG  
 251 C

*Nukleotidsequenz (in situ Hybridisierung)*

## murines Lactadherin (5/6)

841 atccaggatg aaagcggtag agacaaggag tttttgggta acctggacaa  
 891 caacagcctg aaggttaaca tgttcaacc gactctggag gcacagtaca  
 941 taaagctgta ccctgtttcg tgccaccgag gctgcaccct ccgcttcgag  
 991 ctctctgggct gtgagttgca cggatgttct gagcccctgg gcctgaagaa  
 1041 taacacaatt cctgacagcc agatgtcagc ctccagcagc tacaagacat  
 1091 ggaacctgag tgcttttggc tggtagccccc acttgggaag gctggataat  
 1141 cagggcaaga tcaatgcctg gacggctcag agcaacagtg ccaaggaatg  
 1191 gctgcagggtt gacctgggca ctccagaggca agtgacagga atcatcacc  
 1241 agggggcccg tgactttggc cacatccagt atgtggcgct ctacaaggta  
 1291 gccacagtg atgatggtgt gcagtggact gtatatgagg agcaaggaag  
 1341 cagcaaggtc ttccagggca acttggacaa caactcccac aagaagaaca  
 1391 tcttcgagaa acccttcagc gctcgtctacg tgcgtgtcct tccagtgtcc  
 1441 tggcataacc gcatca

## A.3 PUBLIKATIONEN

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit werden in folgende Publikationen eingehen:

- Effect of the IBD-associated nonsynonymous coding variant rs3197999 in macrophage stimulin protein on macrophage function.
- ROS-induced apoptosis regulates lactadherin expression and phagocytosis in murine and human macrophages.



## LITERATURVERZEICHNIS

---

- [1] Masanori Aikawa and Peter Libby. The vulnerable atherosclerotic plaque: Pathogenesis and therapeutic approach. *Cardiovasc Pathol*, 13(3):125–138, 2004. (Zitiert auf Seite 6.)
- [2] Hafid Ait-Oufella. Lactadherin Deficiency Leads to Apoptotic Cell Accumulation and Accelerated Atherosclerosis in Mice. *Circulation*, (115):2168–2177, 2007. (Zitiert auf den Seiten 14, 83, 84, 117, 120, und 122.)
- [3] Shin Akakura. The opsonin MFG-E8 is a ligand for the avh5 integrin and triggers DOCK180-dependent Rac1 activation for the phagocytosis of apoptotic cells. *Exp Cell Res*, (292):403–416, 2004. (Zitiert auf den Seiten 11 und 121.)
- [4] Mikkel Holmen Andersen. Bovine PAS-6/7 Binds av $\beta$ 5 Integrin and Anionic Phospholipids through two Domains. *Biochemistry*, (36):5441–5446, 1997. (Zitiert auf Seite 11.)
- [5] Mikkel Holmen Andersen. Functional Analyses of Two Cellular Binding Domains of Bovine Lactadherin. *Biochemistry*, (39):6200–6206, 2000. (Zitiert auf den Seiten 10, 11, 75, und 119.)
- [6] Johanna Andrae. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*, 22(10):1276–1312, 2008. (Zitiert auf Seite 7.)
- [7] Debora Angeloni. The Soluble Sema Domain of the RON Receptor Inhibits Macrophage-stimulating Protein-induced Receptor Activation. *J Biol Chem*, 279(5):3726–3732, 2004. (Zitiert auf den Seiten x, 17, und 18.)
- [8] Satoko Arai. A role for the apoptosis inhibitory factor AIM/Spal-pha/Ap16 in atherosclerosis development. *Cell Metab*, 1(3):201–213, 2005. (Zitiert auf Seite 8.)
- [9] Stefania Artigiani. Plexins, Semaphorins, and Scatter Factor Receptors: A Common Root for Cell Guidance Signals? *IUBMB Life*, 48(5):477–482, 1999. (Zitiert auf Seite 17.)
- [10] Balasubramanian Arunachalam. Enzymatic reduction of disulfide bonds in lysosomes: Characterization of a Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT). *PNAS*, 97(2):745–750, 2000. (Zitiert auf Seite 98.)
- [11] Ara M. Aslanian and Israel F. Charo. Targeted Disruption of the Scavenger Receptor and Chemokine CXCL16 Accelerates Atherosclerosis. *Circulation*, 114(6):583–590, 2006. (Zitiert auf Seite 7.)

- [12] Kamran Atabai. Mfge8 Is Critical for Mammary Gland Remodeling during Involution. *Mol Biol Cell*, (16):5528–5537, 2005. (Zitiert auf Seite 12.)
- [13] Martina Bach, editor. *Pschyrembel: Klinisches Wörterbuch 2011*. De Gruyter, Berlin, 262 edition, 2010. ISBN 978-3-11-021152-8. (Zitiert auf den Seiten 3, 5, und 6.)
- [14] Carolina Bagnato. Proteomics Analysis of Human Coronary Atherosclerotic Plaque: A feasibility study of direct tissue proteomics by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, (6):1088–1102, 2007. (Zitiert auf Seite 120.)
- [15] R. Y. Ball. Evidence that the death of macrophage foam cells contributes to the lipid core of atheroma. *Atherosclerosis*, 114(1):45–54, 1995. (Zitiert auf den Seiten 8 und 9.)
- [16] N. Banu. Modulation of megakaryocytopoiesis by human macrophage-stimulating protein, the ligand for the RON receptor. *J Immunol*, 156(8):2933–2940, 1996. (Zitiert auf Seite 17.)
- [17] A. Bardelli. Identification of functional domains in the hepatocyte growth factor and its receptor by molecular engineering. *J Biotechnol*, 37(2):109–122, 1994. (Zitiert auf Seite 18.)
- [18] Veronique Baron. p125Fak Focal Adhesion Kinase Is a Substrate for the Insulin and Insulin-like Growth Factor-I Tyrosine Kinase Receptors. *J Biol Chem*, 273(12):7162–7168, 1998. (Zitiert auf Seite 19.)
- [19] Jeffrey C. Barrett. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn’s disease. *Nat Genet*, 40(8):955–962, 2008. (Zitiert auf Seite 127.)
- [20] Stefan Baumgartner. The discoidin domain family revisited: New members from prokaryotes and a homology-based fold prediction. *Prot Sci*, 7(7):1626–1631, 1998. (Zitiert auf Seite 11.)
- [21] V. Benson. ICAM-1 in acute myocardial infarction: a potential therapeutic target. *Cur Mol Med*, 7(2):219–227, 2007. (Zitiert auf Seite 8.)
- [22] Jurgen Bernhagen. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med*, 13(5):587–596, 2007. (Zitiert auf Seite 6.)
- [23] J. A. Bezerra. Hepatocyte-specific expression of the mouse hepatocyte growth factor-like protein. *Hepatology*, 18(2):394–399, 1993. (Zitiert auf Seite 15.)
- [24] J. A. Bezerra. Biological effects of targeted inactivation of hepatocyte growth factor-like protein in mice. *J Clin Invest*, 101(5):1175–1183, 1998. (Zitiert auf Seite 18.)

- [25] Sucharit Bhakdi. Beyond cholesterol: the enigma of atherosclerosis revisited. *Thromb Haemost*, (91):639–645, 2004. (Zitiert auf Seite 6.)
- [26] Sucharit Bhakdi. Possible Protective Role for C-Reactive Protein in Atherogenesis: Complement Activation by Modified Lipoproteins Halts Before Detrimental Terminal Sequence. *Circulation*, 15(109):1870–1876, 2004. (Zitiert auf Seite 6.)
- [27] H. C. Birnboim and J. Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7(6):1513–1523, 1979. (Zitiert auf Seite 62.)
- [28] Jacques Boddaert. Evidence of a Role for Lactadherin in Alzheimer's Disease. *Am J Pathol*, (170):921–929, 2007. (Zitiert auf Seite 12.)
- [29] Landin Boring. Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*, 394(6696):894–897, 1998. (Zitiert auf den Seiten 7 und 8.)
- [30] G. G. Borisenko. Milk fat globule epidermal growth factor 8 (MFG-E8) binds to oxidized phosphatidylserine: implications for macrophage clearance of apoptotic cells: Letter to the Editor. *Cell Death Differ*, (11):943–945, 2004. (Zitiert auf Seite 13.)
- [31] Peer Bork. Domains in plexins: links to integrins and transcription factors. *Trends Biochem Sci*, 24(7):261–263, 1999. (Zitiert auf Seite 17.)
- [32] Michael S. Brown. The Cholesteryl Ester Cycle in Macrophage Foam Cells. *J Biol Chem*, 255(19):9344–9352, 1980. (Zitiert auf Seite 8.)
- [33] Anke Burger-Kentischer. Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Different Stages of Human Atherosclerosis. *Circulation*, 105(13):1561–1566, 2002. (Zitiert auf Seite 8.)
- [34] Barry L. Burgess. MFG-E8 in the retina and retinal pigment epithelium of rat and mouse. *Mol Vis*, (12):1437–1447, 2006. (Zitiert auf Seite 12.)
- [35] Federico Calara. An Animal Model to Study Local Oxidation of LDL and Its Biological Effects in the Arterial Wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18(6):884–893, 1998. (Zitiert auf Seite 6.)
- [36] Federico Carafoli. Crystal structure of the  $\beta$ -chain of human hepatocyte growth factor-like/macrophage stimulating protein. *FEBS Journal*, 272(22):5799–5807, 2005. (Zitiert auf den Seiten 15 und 16.)
- [37] Peter Carmeliet. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 9(6):653–660, 2003. (Zitiert auf Seite 7.)
- [38] Gordon G. Carmichael and Gary K. McMaster. The analysis of nucleic acids in gels using glyoxal and acridine orange. *Methods Enzymol*, (65):390–391, 1985. (Zitiert auf Seite 56.)

- [39] Francesca L. Celletti. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med*, 7(4):425–429, 2001. (Zitiert auf Seite 7.)
- [40] Qiuyan Chen. Induction of met Proto-oncogene (Hepatocyte Growth Factor Receptor) Expression during Human Monocyte-Macrophage Differentiation. *Cell Growth Differ*, 7(6):821–832, 1996. (Zitiert auf den Seiten 43 und 107.)
- [41] Yi-Qing Chen. Activation of the RON Receptor Tyrosine Kinase Inhibits Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Expression by Murine Peritoneal Exudate Macrophages: Phosphatidylinositol-3 Kinase Is Required for RON-Mediated Inhibition of iNOS Expression. *J Immunol*, 161(9):4950–4959, 1998. (Zitiert auf den Seiten 18 und 19.)
- [42] Tucker Collins and Myron I. Cybulsky. NF-kappa B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest*, 107(3):255–264, 2001. (Zitiert auf Seite 8.)
- [43] Colin Collins. Mapping of a Newly Discovered Human Gene Homologous to the Apoptosis Associated-Murine Mammary Protein, MFG-E8, to Chromosome 15q25. *Genomics*, (1):117–118, 1997. (Zitiert auf Seite 10.)
- [44] Sophie Collot-Teixeira. CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, 75(3):468–477, 2007. (Zitiert auf Seite 8.)
- [45] Rosario Cospedal. Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) regulation of migration and focal adhesion kinase phosphorylation in rabbit aortic vascular smooth muscle cells: roles of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinases. *Cardiovasc Res*, 41(3):708–721, 1999. (Zitiert auf Seite 19.)
- [46] Joseph R. Couto. Cloning and sequence analysis of human breast epithelial antigen BA46 reveals an RGD cell adhesion sequence presented on an epidermal growth factor-like domain. *DNA Cell Biol*, (4):281–286, 1996. (Zitiert auf Seite 11.)
- [47] Allison Cowin. Hepatocyte growth factor and macrophage-stimulating protein are upregulated during excisional wound repair in rats. *Cell Tissue Res*, 306(2):239–250, 2001. (Zitiert auf Seite 18.)
- [48] Kathleen H. Cox. Detection of mRNAs in sea urchin embryos by in situ hybridization using asymmetric RNA probes. *Dev Biol*, 101(2):485–502, 1984. (Zitiert auf Seite 67.)
- [49] Peter J. Crack. Increased infarct size and exacerbated apoptosis in the glutathione peroxidase-1 (Gpx-1) knockout mouse brain in response to ischemia/reperfusion injury. *Journal of Neurochemistry*, 78(6):1389–1399, 2001. (Zitiert auf den Seiten 84 und 121.)



- [50] Jan K. Damas. Enhanced Expression of the Homeostatic Chemokines CCL19 and CCL21 in Clinical and Experimental Atherosclerosis: Possible Pathogenic Role in Plaque Destabilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(3):614–620, 2007. (Zitiert auf Seite 7.)
- [51] Jan K. Damas. Expression of Fractalkine (CX<sub>3</sub>CL<sub>1</sub>) and its Receptor, CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub>, Is Elevated in Coronary Artery Disease and Is Reduced During Statin Therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25(12):2567–2572, 2005. (Zitiert auf Seite 120.)
- [52] A. Danilkovitch and E. J. Leonard. Kinases involved in MSP/RON signaling. *J Leukoc Biol*, 65(3):345–348, 1999. (Zitiert auf Seite 19.)
- [53] Alla Danilkovitch. Interaction of Macrophage-stimulating Protein with Its Receptor: RESIDUES CRITICAL FOR BETA CHAIN BINDING AND EVIDENCE FOR INDEPENDENT ALPHA CHAIN BINDING. *J Biol Chem*, 274(42):29937–29943, 1999. (Zitiert auf den Seiten 16, 19, und 20.)
- [54] Alla Danilkovitch. Two Independent Signaling Pathways Mediate the Antiapoptotic Action of Macrophage-Stimulating Protein on Epithelial Cells. *Mol Cell Biol*, 20(6):2218–2227, 2000. (Zitiert auf Seite 19.)
- [55] A. Danilkovitch-Miagkova and Edward J. Leonard. Anti-apoptotic action of macrophage stimulating protein (MSP). *Apoptosis*, 6(3):183–190, 2001. (Zitiert auf Seite 18.)
- [56] Sandeep Robert Datta. Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. *Cell*, 91(2):231–241, 1997. (Zitiert auf Seite 18.)
- [57] Peter F. Davies. Spatial Hemodynamics, the Endothelium, and Focal Atherogenesis: A Cell Cycle Link? *Circ Res*, 86(2):114–116, 2000. (Zitiert auf Seite 8.)
- [58] Tracey C. Dawson. Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*, 143(1):205–211, 1999. (Zitiert auf Seite 7.)
- [59] Sanjana Dayal. Deficiency of Glutathione Peroxidase-1 Sensitizes Hyperhomocysteinemic Mice to Endothelial Dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22(12):1996–2002, 2002. (Zitiert auf Seite 84.)
- [60] Shoukat Dedhar. Integrins and signal transduction. *Curr Opin Hematol*, 6(1):37, 1999. (Zitiert auf Seite 11.)
- [61] Sandra J. F. Degen. Characterization of the mouse cDNA and gene coding for a hepatocyte growth factor-like protein: expression during development. *Biochemistry*, 40(30):9781–9791, 1991. (Zitiert auf Seite 15.)

- [62] Carolin Deyle. *Herstellung eines Wildtyp- und eines mutanten (c.C2078T, p.Arg689Cys) MSP (Macrophage Stimulating Protein) Konstrukts und deren Expression in einem eukaryonten Zellsystem (CHO-K1)*. PhD thesis, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, 30.6.2009. (Zitiert auf den Seiten 44 und 105.)
- [63] Ivan Dikic. A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature*, 383(6600):547–550, 1996. (Zitiert auf Seite 19.)
- [64] Spencer D. Dorn and Robert S. Sandler. Inflammatory Bowel Disease Is Not a Risk Factor for Cardiovascular Disease Mortality: Results from a Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol*, 102(3):662–667, 2007. (Zitiert auf Seite 127.)
- [65] L. F. Eng. Astrocyte culture on nitrocellulose membranes and plastic: detection of cytoskeletal proteins and mRNAs by immunocytochemistry and in situ hybridization. *J Neurosci Res*, 16:239–250, 1986. (Zitiert auf Seite 67.)
- [66] Michael Ensslin. Identification by affinity chromatography of boar sperm membrane-associated proteins bound to immobilized porcine zona pellucida. Mapping of the phosphorylethanolamine-binding region of spermadhesin AWN. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 12(376):733–738, 1995. (Zitiert auf Seite 9.)
- [67] Michael A. Ensslin. The EGF repeat and discoidin domain protein, SED1/MFG-E8, is required for mammary gland branching morphogenesis. *PNAS*, (8):2715–2720, 2007. (Zitiert auf Seite 12.)
- [68] Michael A. Ensslin and Barry D. Shur. Identification of Mouse Sperm SED1, a Bimotif EGF Repeat and Discoidin-Domain Protein Involved in Sperm-Egg Binding. *Cell*, 114(4):405–417, 2003. (Zitiert auf den Seiten 12 und 121.)
- [69] Thorsten Erpel and Sara A. Courtneidge. Src family protein tyrosine kinases and cellular signal transduction pathways. *Curr Opin Cell Biol*, 7(2):176–182, 1995. (Zitiert auf Seite 19.)
- [70] Bengt Fadeel and Ding Xue. The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease. *DNA Cell Biol*, 44(5):264–277, 2009. (Zitiert auf Seite 13.)
- [71] Valerie A. Fadok. Regulation of macrophage cytokine production by phagocytosis of apoptotic and post-apoptotic cells. *Biochem Soc Trans*, 26(4):653–656, 1998. (Zitiert auf Seite 9.)
- [72] Marcel H. A. M. Fens. Angiogenic endothelium shows lactadherin-dependent phagocytosis of aged erythrocytes and apoptotic cells. *Blood*, (111):4542–4550, 2008. (Zitiert auf Seite 13.)

- [73] Walter Fiers. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene*, 18(54):7719–7730, 1999. (Zitiert auf Seite 9.)
- [74] Sheila A. Fisher. Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nat Genet*, 40(6):710–712, 2008. (Zitiert auf Seite 127.)
- [75] Alan M. Fong. Fractalkine and CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub> Mediate a Novel Mechanism of Leukocyte Capture, Firm Adhesion, and Activation under Physiologic Flow. *J Exp Med*, 188(8):1413–1419, 1998. (Zitiert auf Seite 7.)
- [76] Andre Franke. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet*, 42(12):1118–1125, 2010. (Zitiert auf den Seiten 126 und 128.)
- [77] Thomas F. Franke. PI<sub>3</sub>K: Downstream AKTion Blocks Apoptosis. *Cell*, 88(4):435–437, 1997. (Zitiert auf Seite 19.)
- [78] Louise Full. The inextricable link between atherosclerosis and prototypical inflammatory diseases rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*, 11(2):217, 2009. (Zitiert auf Seite 128.)
- [79] Elena Galkina. CXCR6 Promotes Atherosclerosis by Supporting T-Cell Homing, Interferon- $\gamma$  Production, and Macrophage Accumulation in the Aortic Wall. *Circulation*, 116(16):1801–1811, 2007. (Zitiert auf Seite 7.)
- [80] G. Gaudino. The proto-oncogene RON is involved in development of epithelial, bone and neuro-endocrine tissues. *Oncogene*, 11(12):2627–2637, 1995. (Zitiert auf Seite 17.)
- [81] Giovanni Gaudino. Ron is a heterodimeric tyrosine kinase receptor activated by the HGF homologue MSP. *EMBO Journal*, 13(15):3524–3532, 1994. (Zitiert auf Seite 17.)
- [82] Heiko A. Golpon. Life after corpse engulfment: phagocytosis of apoptotic cells leads to VEGF secretion and cell growth. *FASEB J*, 18(14):1716–1718, 2004. (Zitiert auf Seite 7.)
- [83] P. Goyette. Gene-centric association mapping of chromosome 3p implicates MST1 in IBD pathogenesis. *Mucosal Immunol*, 1(2):131–138, 2008. (Zitiert auf Seite 127.)
- [84] David J. Grainger. Apolipoprotein E Modulates Clearance of Apoptotic Bodies In Vitro and In Vivo, Resulting in a Systemic Proinflammatory State in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *J Immunol*, 173(10):6366–6375, 2004. (Zitiert auf den Seiten 7, 83, und 121.)
- [85] David R. Greaves. Linked Chromosome 16q13 Chemokines, Macrophage-Derived Chemokine, Fractalkine, and Thymus- and

- Activation-Regulated Chemokine, Are Expressed in Human Atherosclerotic Lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21(6):923–929, 2001. (Zitiert auf Seite 120.)
- [86] M. C. Grimm. Direct evidence of monocyte recruitment to inflammatory bowel disease mucosa. *J Gastroenterol Hepatol*, 10(4):387–395, 1995. (Zitiert auf Seite 129.)
- [87] Long Gu. Absence of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Reduces Atherosclerosis in Low Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *Molecular Cell*, 2(2):275–281, 1998. (Zitiert auf Seite 8.)
- [88] Prasenjit Guchhait. Lactadherin mediates sickle cell adhesion to vascular endothelial cells in flowing blood. *Haematologica*, (92):1266–1267, 2007. (Zitiert auf Seite 13.)
- [89] K. Hamaguchi and E. P. Geiduschek. The effect of electrolytes on the stability of deoxyribonucleate helix. *J Am Chem Soc*, (84):1329, 1962. (Zitiert auf Seite 57.)
- [90] S. Han. Characterization of the DNF15S2 locus on human chromosome 3: identification of a gene coding for four kringle domains with homology to hepatocyte growth factor. *Biochemistry*, 30(40):9768–9780, 1991. (Zitiert auf Seite 15.)
- [91] Rikinari Hanayama. Autoimmune Disease and Impaired Uptake of Apoptotic Cells in MFG-E8-Deficient Mice. *Science*, (304):1147–1150, 2004. (Zitiert auf den Seiten 13 und 121.)
- [92] Rikinari Hanayama. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature*, (417):182–187, 2002. (Zitiert auf den Seiten 9, 11, 13, 117, 120, und 121.)
- [93] Rikinari Hanayama and Shigekazu Nagata. Impaired involution of mammary glands in the absence of milk fat globule EGF factor 8. *PNAS*, (102):16886–16891, 2005. (Zitiert auf Seite 12.)
- [94] Göran K. Hansson and Peter Libby. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, 6(7):508–519, 2006. (Zitiert auf Seite 6.)
- [95] Sahena Haque. Atherosclerosis in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Lipidol*, 19:338–343, 2009. (Zitiert auf Seite 128.)
- [96] Richard J. Havel. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest*, 9(34):1345–1353, 1955. (Zitiert auf Seite 40.)

- [97] Hideki Hayashi. Protection of Neurons from Apoptosis by Apolipoprotein E-containing Lipoproteins Does Not Require Lipoprotein Uptake and Involves Activation of Phospholipase C $\beta$ 1 and Inhibition of Calcineurin. *Journal of Biological Chemistry*, 284(43):29605–29613, 2009. (Zitiert auf den Seiten 83 und 121.)
- [98] Peter M. Henson. Apoptotic cell removal. *Curr Biol*, 11(19):R795 – R805, 2001. (Zitiert auf Seite 8.)
- [99] Chiaki Hidai. Cloning and characterization of developmental endothelial locus-1: An embryonic endothelial cell protein that binds the avb3 integrin receptor. *Genes Dev*, (12):21–33, 1998. (Zitiert auf Seite 12.)
- [100] Ye-Shih Ho. Mice Deficient in Cellular Glutathione Peroxidase Develop Normally and Show No Increased Sensitivity to Hyperoxia. *J Biol Chem*, 272(26):16644–16651, 1997. (Zitiert auf Seite 37.)
- [101] Jianbin Huang. Mechanisms by which T7 Lysozyme Specifically Regulates T7 RNA Polymerase during Different Phases of Transcription. *J Mol Biol*, (293):457–475, 1999. (Zitiert auf Seite 61.)
- [102] C. Huynh-Delerme. Characteristics of okadaic acid—induced cytotoxic effects in CHO K1 cells. *Environ Toxicol*, 18(6):383–394, 2003. (Zitiert auf Seite 47.)
- [103] Jane Hvarregaard. Characterization of glycoprotein PAS-6/7 from membranes of bovine milk fat globules. *Eur J Biochem*, (240):628–636, 1996. (Zitiert auf den Seiten 10 und 11.)
- [104] Richard O. Hynes. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*, 110(6):673–687, 2002. (Zitiert auf Seite 11.)
- [105] Toshio Imai. Identification and Molecular Characterization of Fractalkine Receptor CX $\beta$ CR1, which Mediates Both Leukocyte Migration and Adhesion. *Cell*, 91(4):521–530, 1997. (Zitiert auf Seite 120.)
- [106] Masayori Inouye. Bacteriophage T7 Lysozyme Is an N-Acetylmuramyl-l-alanine Amidase. *J Biol Chem*, 248(20):7247–7252, 1973. (Zitiert auf Seite 61.)
- [107] A. Iwama. Molecular cloning of a novel receptor tyrosine kinase gene, STK, derived from enriched hematopoietic stem cells. *Blood*, 83(11): 3160–3169, 1994. (Zitiert auf Seite 17.)
- [108] A. Iwama. Terminal differentiation of murine resident peritoneal macrophages is characterized by expression of the STK protein tyrosine kinase, a receptor for macrophage-stimulating protein. *Blood*, 86(9): 3394–3403, 1995. (Zitiert auf Seite 17.)

- [109] Atsushi Iwama. STK/RON receptor tyrosine kinase mediates both apoptotic and growth signals via the multifunctional docking site conserved among the HGF receptor family. *EMBO Journal*, 15(21): 5866–5875, 1996. (Zitiert auf Seite 18.)
- [110] Laia Jofre-Monseny. Impact of apoE genotype on oxidative stress, inflammation and disease risk. *Mol. Nutr. Food Res.*, 52(1):131–145, 2008. (Zitiert auf den Seiten 83 und 121.)
- [111] Robert Kleemann. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res*, 79(3):360–376, 2008. (Zitiert auf Seite 7.)
- [112] Mariam Klouche. Atherogenic Properties of Enzymatically Degraded LDL: Selective Induction of MCP-1 and Cytotoxic Effects on Human Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18(9):1376–1385, 1998. (Zitiert auf Seite 6.)
- [113] Mariam Klouche. Enzymatically Modified, Nonoxidized LDL Induces Selective Adhesion and Transmigration of Monocytes and T-Lymphocytes Through Human Endothelial Cell Monolayers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19(3):784–793, 1999. (Zitiert auf Seite 6.)
- [114] Mark M. Kockx. Apoptosis in the Atherosclerotic Plaque: Quantitative and Qualitative Aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18(10):1519–1522, 1998. (Zitiert auf den Seiten 8 und 9.)
- [115] Mark M. Kockx and Arnold G. Herman. Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? *Cardiovasc Res*, 45(3):736–746, 2000. (Zitiert auf Seite 8.)
- [116] Yao-Zhong Kong. Macrophage migration inhibitory factor induces MMP-9 expression: implications for destabilization of human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*, 178(1):207–215, 2005. (Zitiert auf Seite 8.)
- [117] Mark C. Kowala. Characterization of atherosclerosis in LDL receptor knockout mice: macrophage accumulation correlates with rapid and sustained expression of aortic MCP-1/JE. *Atherosclerosis*, 149(2):323–330, 2000. (Zitiert auf Seite 83.)
- [118] Regina Krohn. Y-Box Binding Protein-1 Controls CC Chemokine Ligand-5 (CCL5) Expression in Smooth Muscle Cells and Contributes to Neointima Formation in Atherosclerosis-Prone Mice. *Circulation*, 116(16):1812–1820, 2007. (Zitiert auf Seite 7.)
- [119] Yasuko Kureishi. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med*, 6(9):1004–1010, 2000. (Zitiert auf Seite 12.)

- [120] N. Kurihara. Macrophage-stimulating protein (MSP) and its receptor, RON, stimulate human osteoclast activity but not proliferation: effect of MSP distinct from that of hepatocyte growth factor. *Exp Hematol*, 26 (11):1080–1085, 1998. (Zitiert auf Seite 19.)
- [121] N. Kurihara. Macrophage-stimulating protein activates STK receptor tyrosine kinase on osteoclasts and facilitates bone resorption by osteoclast-like cells. *Blood*, 87(9):3704–3710, 1996. (Zitiert auf den Seiten 17 und 19.)
- [122] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, (227):680–685, 1970. (Zitiert auf Seite 76.)
- [123] Limor Landsman. CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub> is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood*, 113(4):963–972, 2009. (Zitiert auf Seite 7.)
- [124] K. E. Langley. Molecular basis of beta-galactosidase alpha-complementation. *PNAS*, 72(4):1254–1257, 1975. (Zitiert auf Seite 61.)
- [125] Debra L. Laskin. Role of STK in mouse liver macrophage and endothelial cell responsiveness during acute endotoxemia. *J Leukoc Biol*, 88(2): 373–382, 2010. (Zitiert auf Seite 18.)
- [126] Kirsten Lauber. Clearance of Apoptotic Cells: Getting Rid of the Corpses. *Molecular Cell*, 14(3):277–287, 2004. (Zitiert auf Seite 122.)
- [127] S. H. Lee. Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues: Immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80. *J Exp Med*, 161(3):475–489, 1985. (Zitiert auf Seite 128.)
- [128] Edward J. Leonard and Alison Skeel. A serum protein that stimulates macrophage movement, chemotaxis and spreading. *Exp Cell Res*, 102 (2):434–438, 1976. (Zitiert auf Seite 15.)
- [129] Fernando Leonardi-Essmann. Fractalkine-upregulated milk-fat globule EGF factor-8 protein in cultured rat microglia. *J Neuroimmunol*, 160(1-2): 92–101, 2005. (Zitiert auf den Seiten 7, 13, 120, und 122.)
- [130] Peter Libby. Cytokines Regulate Vascular Functions Related to Stability of the Atherosclerotic Plaque. *J Cardiovasc Pharmacol*, 25(Suppl 2):S2 – S9, 1995. (Zitiert auf Seite 9.)
- [131] Lin Lin. Crystal Structure of the Bovine Lactadherin C2 Domain, a Membrane Binding Motif, Shows Similarity to the C2 Domains of Factor V and Factor VIII. *J Mol Biol*, (371):717–724, 2007. (Zitiert auf den Seiten 11, 119, und 120.)

- [132] June Liu. Reduced Macrophage Apoptosis Is Associated With Accelerated Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Null Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25(1):174–179, 2005. (Zitiert auf Seite 8.)
- [133] Elias Lolis and Richard Bucala. Macrophage migration inhibitory factor. *Expert Opin Ther Targets*, 7(2):153–164, 2003. (Zitiert auf Seite 8.)
- [134] Oliver H. Lowry. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, (193):265–275, 1951. (Zitiert auf Seite 74.)
- [135] Yi Lu, Hang-ping Yao, and Ming-Hai Wang. Significance of the entire C-terminus in biological activities mediated by the RON receptor tyrosine kinase and its oncogenic variant RON160. *Clin Cancer Res*, 27(1):55, 2008. (Zitiert auf den Seiten 17 und 18.)
- [136] Andrew D. Lucas. Smooth Muscle Cells in Human Atherosclerotic Plaques Express the Fractalkine Receptor CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub> and Undergo Chemotaxis to the CX<sub>3</sub>C Chemokine Fractalkine (CX<sub>3</sub>CL<sub>1</sub>). *Circulation*, 108(20):2498–2504, 2003. (Zitiert auf Seite 120.)
- [137] Markus Lucerna. Vascular endothelial growth factor-A induces plaque expansion in ApoE knock-out mice by promoting de novo leukocyte recruitment. *Blood*, 109(1):122–129, 2007. (Zitiert auf Seite 7.)
- [138] Aldons J. Lusis. Atherosclerosis. *Nature*, 407(6801):233–241, 2000. (Zitiert auf Seite 8.)
- [139] Q. Ma. Inhibition of MSP-RON signaling pathway in cancer cells by a novel soluble form of RON comprising the entire sema sequence. *Int J Oncol*, 6(36):1551–1561, 2010. (Zitiert auf den Seiten 17 und 84.)
- [140] Sandra Macedo-Ribeiro. Crystal structures of the membrane-binding C2 domain of human coagulation factor V. *Nature*, (402):434–439, 1999. (Zitiert auf den Seiten 10 und 11.)
- [141] Piera Maggiora. Overexpression of the RON gene in human breast carcinoma. *Oncogene*, 16:2927–2933, 1998. (Zitiert auf Seite 18.)
- [142] J. Magram. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity*, 5(4):471–481, 1996. (Zitiert auf Seite 129.)
- [143] Nitsan Maharshak. Inflammatory Bowel Disease Is Not Associated With Increased Intimal Media Thickening. *Am J Gastroenterol*, 102(5):1050–1055, 2007. (Zitiert auf Seite 128.)
- [144] Harald Mangge. Beyond cholesterol - inflammatory cytokines, the key mediators in atherosclerosis: Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *CCLM*, 42(5):467–474, 2004. (Zitiert auf Seite 6.)



- [145] J. Marmur and O. Doty. Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids. *J Mol Biol*, (3):585–594, 1961. (Zitiert auf Seite 66.)
- [146] Frank Mattner. Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarized Th2 cell response. *Eur. J. Immunol.*, 26(7):1553–1559, 1996. (Zitiert auf Seite 129.)
- [147] Gary K. McMaster and Gordon G. Carmichael. Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *PNAS*, 74(11):4835–4838, 1977. (Zitiert auf Seite 56.)
- [148] D. A. Melton. Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res*, 12(18):7035–7056, 1984. (Zitiert auf Seite 65.)
- [149] Michael Miksa. Fractalkine-Induced MFG-E8 Leads to Enhanced Apoptotic Cell Clearance by Macrophages. *Mol Med*, (13):553–560, 2007. (Zitiert auf den Seiten 7 und 120.)
- [150] K. Miller. Gel electrophoresis of RNA. *Bathesda Res Lab Focus*, (9):14, 1987. (Zitiert auf Seite 56.)
- [151] Maria Miller and Edward J. Leonard. Mode of receptor binding and activation by plasminogen-related growth factors. *FEBS Letters*, 429(1): 1–3, 1998. (Zitiert auf den Seiten x, 16, 18, und 20.)
- [152] Yury I. Miller. Minimally Modified LDL Binds to CD14, Induces Macrophage Spreading via TLR4/MD-2, and Inhibits Phagocytosis of Apoptotic Cells. *J Biol Chem*, 278(3):1561–1568, 2003. (Zitiert auf Seite 9.)
- [153] Thomas Ray Moench. In situ hybridization. *Mol Cell Probes*, 1(3): 195–205, 1987. (Zitiert auf Seite 66.)
- [154] Barbara A. Moffatt and F. William Studier. T7 Lysozyme Inhibits Transcription by T7 RNA Polymerase. *Cell*, (49):221–227, 1987. (Zitiert auf Seite 61.)
- [155] Mohammed H. Moghadasian. Pathophysiology of apolipoprotein E deficiency in mice: relevance to apo E-related disorders in humans. *FASEB J*, 15(14):2623–2630, 2001. (Zitiert auf Seite 83.)
- [156] E. F. Morand. New therapeutic target in inflammatory disease: macrophage migration inhibitory factor. *Intern Med J*, 35(7):419–426, 2005. (Zitiert auf Seite 8.)

- [157] Amy C. Morrison. Macrophage-Stimulating Protein, the Ligand for the Stem Cell-Derived Tyrosine Kinase/RON Receptor Tyrosine Kinase, Inhibits IL-12 Production by Primary Peritoneal Macrophages Stimulated with IFN-gamma and Lipopolysaccharide. *J Immunol*, 172(3):1825–1832, 2004. (Zitiert auf den Seiten 129 und 130.)
- [158] Rebecca S. Muraoka. The Ron/STK receptor tyrosine kinase is essential for peri-implantation development in the mouse. *J Clin Invest*, 103(9):1277–1285, 1999. (Zitiert auf Seite 18.)
- [159] Takahiro Nakamura. Cloning and Expression of Xenopus HGF-Like Protein (HLP) and Ron/HLP Receptor Implicate Their Involvement in Early Neural Development. *Biochem Biophys Res Commun*, 224(2):564–573, 1996. (Zitiert auf den Seiten 15 und 17.)
- [160] Emeline F. Nandrot. Essential role for MFG-E8 as ligand for  $\alpha v\beta 5$  integrin in diurnal retinal phagocytosis. *PNAS*, (104):12005–12010, 2007. (Zitiert auf Seite 12.)
- [161] Emeline F. Nandrot. Novel role for alphavbeta5-integrin in retinal adhesion and its diurnal peak. *Am J Physiol Cell Physiol*, 290(4):C1256–1262, 2006. (Zitiert auf Seite 12.)
- [162] Emeline F. Nandrot, Yoonhee Kim, Scott E. Brodie, Xiaozhu Huang, Dean Sheppard, and Silvia C. Finnemann. Loss of Synchronized Retinal Phagocytosis and Age-related Blindness in Mice Lacking alphavbeta5 Integrin. *J Exp Med*, 200(12):1539–1545, 2004. (Zitiert auf Seite 12.)
- [163] L. B. Nanney. Proteolytic cleavage and activation of pro-macrophage-stimulating protein and upregulation of its receptor in tissue injury. *J Invest Dermatol*, 111(4):573–581, 1998. (Zitiert auf den Seiten 17 und 18.)
- [164] Christine Neumann and Clemens Sorg. Sequential expression of functions during macrophage differentiation in murine bone marrow liquid cultures. *Eur J Immunol*, 10(11):834–840, 1980. (Zitiert auf Seite 9.)
- [165] Thomas Q. Nhan. Role of Caspases in Death and Survival of the Plaque Macrophage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25(5):895–903, 2005. (Zitiert auf Seite 9.)
- [166] René R. S. Packard and Guo-Ping Shi. Atherosclerosis progression and monocyte emigration from plaque. *Future Cardiol*, 2(4):415–418, 2006. (Zitiert auf Seite 8.)
- [167] Alfredo Papa. Early atherosclerosis in patients with inflammatory bowel disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 10:7–11, 2006. (Zitiert auf Seite 128.)

- [168] Alfredo Papa. Intima-Media Thickness in Inflammatory Bowel Disease Patients: A Still Open Question. *Am J Gastroenterol*, 103(2):490 – 490, 2008. (Zitiert auf Seite 128.)
- [169] Guillaume Pare. Genome-Wide Association Studies—Data Generation, Storage, Interpretation, and Bioinformatics. *J Cardiovasc Transl Res*, 3(3): 183–188, 2010. (Zitiert auf Seite 126.)
- [170] J. Thomas Parsons and Sarah J. Parsons. Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol*, 9(2):187–192, 1997. (Zitiert auf Seite 19.)
- [171] Gøri Perminow. Increased number and activation of colonic macrophages in pediatric patients with untreated Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 15(9):1368–1378, 2009. (Zitiert auf Seite 129.)
- [172] Wendy Peters and Israel F. Charo. Involvement of chemokine receptor 2 and its ligand, monocyte chemoattractant protein-1, in the development of atherosclerosis: lessons from knockout mice. *Curr Opin Lipidol*, 12(2): 175–180, 2001. (Zitiert auf Seite 8.)
- [173] Jerry A. Peterson. Glycoproteins of the Human Milk Fat Globule in the Protection of the Breast-Fed Infant against Infections. *Biol Neonate*, (74): 143–162, 1998. (Zitiert auf den Seiten x, 10, und 11.)
- [174] Michael D. Pierschbacher. The cell attachment determinant in fibronectin. *J Cell Biochem*, 28(2):115–126, 1985. (Zitiert auf Seite 11.)
- [175] E. A. Podrez. A novel family of atherogenic oxidized phospholipids promotes macrophage foam cell formation via the scavenger receptor CD36 and is enriched in atherosclerotic lesions. *J Biol Chem*, 277(41): 38517–38523, 2002. (Zitiert auf Seite 8.)
- [176] T. Pomorski and A. Menon. Lipid flippases and their biological functions. *CMLS*, 63(24):2908–2921, 2006. (Zitiert auf Seite 13.)
- [177] Kathleen P. Pratt. Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution. *Nature*, (402):439–442, 1999. (Zitiert auf den Seiten 10 und 11.)
- [178] D. J. Preiss and N. Sattar. Vascular cell adhesion molecule-1: a viable therapeutic target for atherosclerosis? *Int J Clin Pract*, 61(4):697–701, 2007. (Zitiert auf Seite 8.)
- [179] Daniel J. Rader and Daugherty Alan. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature*, (451):904–913, 2008. (Zitiert auf den Seiten x, 4, und 5.)
- [180] Teresa Rampino. Macrophage-Stimulating Protein Is Produced by Tubular Cells and Activates Mesangial Cells. *J Am Soc Nephrol*, 13(3): 649–657, 2002. (Zitiert auf Seite 15.)

- [181] Adam S. Raymond and Barry D. Shur. A novel role for SED1 (MFG-E8) in maintaining the integrity of the epididymal epithelium. *J Cell Sci*, 122(6):849–858, 2009. (Zitiert auf Seite 12.)
- [182] P. C. Rensen. Selective targeting of liposomes to macrophages using a ligand with high affinity for the macrophage scavenger receptor class A. *Curr Drug Discov Technol*, 3(2):135–144, 2006. (Zitiert auf Seite 8.)
- [183] Robert Roberts. The Genome-Wide Association Study—A New Era for Common Polygenic Disorders. *J Cardiovasc Transl Res*, 3(3):173–182, 2010. (Zitiert auf Seite 126.)
- [184] C. Ronsin. A novel putative receptor protein tyrosine kinase of the met family. *Oncogene*, 8(5):1195–1202, 1993. (Zitiert auf den Seiten 16, 17, und 18.)
- [185] J. Rugtveit. Increased macrophage subset in inflammatory bowel disease: apparent recruitment from peripheral blood monocytes. *Gut*, 35(5):669–674, 1994. (Zitiert auf Seite 129.)
- [186] J. Rugtveit. Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of mucosal macrophages from inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 112(5):1493–1505, 1997. (Zitiert auf Seite 129.)
- [187] Santosh Kumar Sahu. Phospholipid scramblases: An overview. *Arch Biochem Biophys*, 462(1):103–114, 2007. (Zitiert auf Seite 13.)
- [188] Masakazu Sakai. Macrophage proliferation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 11(5):503–509, 2000. (Zitiert auf Seite 8.)
- [189] Jane E. Salmon and Mary J. Roman. Subclinical Atherosclerosis in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus: Heightened Risk of Cardiovascular Disease in Patients with Rheumatoid Arthritis, Heightened Risk of Cardiovascular Disease in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Am J Med*, 121(10, Supplement 1):S3–S8, 2008. (Zitiert auf Seite 128.)
- [190] Joe Sambrook. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 3 edition, 2001. ISBN 0-87969-577-3. (Zitiert auf Seite 56.)
- [191] F. Sanger. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*, (94):441–448, 1975. (Zitiert auf Seite 55.)
- [192] Hideto Sano. Functional Blockade of Platelet-Derived Growth Factor Receptor-beta but Not of Receptor-alpha Prevents Vascular Smooth Muscle Cell Accumulation in Fibrous Cap Lesions in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Circulation*, 103(24):2955–2960, 2001. (Zitiert auf Seite 7.)

- [193] M. M. Santoro. Constitutive activation of the RON gene promotes invasive growth but not transformation [Erratum in *Mol Cell Biol* 1997;17(3):1758]. *Mol Cell Biol*, 16(12):7072–7083, 1996. (Zitiert auf Seite 19.)
- [194] R. Balfour Sartor. Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, 134(2):577–594, 2008. (Zitiert auf Seite 128.)
- [195] Bernhard Schieffer. Angiotensin II Controls p21 Activity via pp60. *J Biol Chem*, 271(17):10329–10333, 1996. (Zitiert auf Seite 19.)
- [196] R. H. Schwall. Heparin induces dimerization and confers proliferative activity onto the hepatocyte growth factor antagonists NK1 and NK2. *J Cell Biol*, 133(3):709–718, 1996. (Zitiert auf Seite 16.)
- [197] Chenghua Shao. Crystal Structure of Lactadherin C2 Domain at 1.7Å Resolution with Mutational and Computational Analyses of Its Membrane-binding Motif. *J Biol Chem*, (283):7230–7241, 2008. (Zitiert auf den Seiten 10, 11, 119, und 120.)
- [198] Jialan Shi. Lactadherin blocks thrombosis and hemostasis in vivo: correlation with platelet phosphatidylserine exposure. *J Thromb Haemost*, (6):1169–1174, 2008. (Zitiert auf den Seiten 12 und 13.)
- [199] Jialan Shi and Gary E. Gilbert. Lactadherin inhibits enzyme complexes of blood coagulation by competing for phospholipid-binding sites. *Blood*, (101):2628–2636, 2003. (Zitiert auf Seite 12.)
- [200] Jean-Sebastien Silvestre. Lactadherin promotes VEGF-dependent neovascularization. *Nat Med*, 11(5):499–506, 2005. (Zitiert auf den Seiten 9, 10, und 12.)
- [201] Jean-Sebastien Silvestre. La lactadhérine, nouvel acteur de l'angiogenèse. *Med Sci (Paris)*, (21):683–685, 2005. (Zitiert auf Seite 12.)
- [202] Daniel Steinberg. Low Density Lipoprotein Oxidation and Its Pathobiological Significance. *J Biol Chem*, 272(34):20963–20966, 1997. (Zitiert auf Seite 6.)
- [203] John D. Stubbs. cDNA cloning of a mouse mammary epithelial cell surface protein reveals the existence of epidermal growth factor-like domains linked to factor VIII-like sequences. *PNAS*, (87):8417–8421, 1990. (Zitiert auf Seite 9.)
- [204] Dwayne Stupack. The biology of integrins. *Oncology (Williston Park)*, 21:6–12, 2007. (Zitiert auf Seite 11.)
- [205] Yan Ru Su. Reduced ABCA1-Mediated Cholesterol Efflux and Accelerated Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice Lacking Macrophage-Derived ACAT1. *Circulation*, 111(18):2373–2381, 2005. (Zitiert auf den Seiten 9 und 118.)

- [206] Prapat Suriyaphol. Interleukin-8 in Human Endothelial Cells: Role of Free Fatty Acids Enzymatically Modified Nonoxidized Low-Density Lipoprotein Induces Interleukin-8 in Human Endothelial Cells: Role of Free Fatty Acids. *Circulation*, (106):2581–2587, 2002. (Zitiert auf Seite 41.)
- [207] I. Tabas. Apoptosis and plaque destabilization in atherosclerosis: the role of macrophage apoptosis induced by cholesterol. *Cell Death Differ*, 11(S1):S12 – S16, 2004. (Zitiert auf Seite 9.)
- [208] Ira Tabas. Consequences and Therapeutic Implications of Macrophage Apoptosis in Atherosclerosis: The Importance of Lesion Stage and Phagocytic Efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25(11):2255–2264, 2005. (Zitiert auf den Seiten 8 und 9.)
- [209] Ira Tabas. Macrophage Apoptosis in Atherosclerosis: Consequences on Plaque Progression and the Role of Endoplasmic Reticulum Stress. *Antioxid Redox Signal*, 11(9):2333–2339, 2009. (Zitiert auf Seite 8.)
- [210] Ira Tabas. Subendothelial Lipoprotein Retention as the Initiating Process in Atherosclerosis: Update and Therapeutic Implications. *Circulation*, 116(16):1832–1844, 2007. (Zitiert auf Seite 8.)
- [211] Evelyne Tarnus. Apolipoprotein E limits oxidative stress-induced cell dysfunctions in human adipocytes. *FEBS Letters*, 583(12):2042–2048, 2009. (Zitiert auf den Seiten 83 und 121.)
- [212] Michael R. Taylor. Lactadherin (formerly BA46), a membrane-associated glycoprotein expressed in human milk and breast carcinomas, promotes Arg-Gly-Asp (RGD)-dependent cell adhesion. *DNA Cell Biol*, (16):861–869, 1997. (Zitiert auf den Seiten 10 und 11.)
- [213] Amairaj Thanasamy. Recepteur d'Origine Nantais Tyrosine Kinase Is a Direct Target of Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$ -mediated Invasion of Breast Carcinoma Cells. *J Biol Chem*, 21(284):14001–14010, 2009. (Zitiert auf den Seiten 18 und 35.)
- [214] Michael Torzewski. Enzymatic Modification of Low-Density Lipoprotein in the Arterial Wall: A New Role for Plasmin and Matrix Metalloproteinases in Atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, (24):2130–2136, 2004. (Zitiert auf Seite 6.)
- [215] Michael Torzewski. Deficiency of Glutathione Peroxidase-1 Accelerates the Progression of Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(4):850–857, 2007. (Zitiert auf den Seiten 83 und 103.)
- [216] Michael Torzewski and Karl J. Lackner. Initiation and progression of atherosclerosis – enzymatic or oxidative modification of low-density lipoprotein? *CCLM*, 44(12):1389–1394, 2006. (Zitiert auf Seite 6.)

- [217] H. Towbin. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS*, (76):4350–4354, 1979. (Zitiert auf Seite 76.)
- [218] Giorgio Trinchieri. Interleukin-12: A Proinflammatory Cytokine with Immunoregulatory Functions that Bridge Innate Resistance and Antigen-Specific Adaptive Immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 13(1):251–276, 1995. (Zitiert auf Seite 129.)
- [219] Lucy A. Truman. CX<sub>3</sub>CL<sub>1</sub>/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood*, 112(13):5026–5036, 2008. (Zitiert auf Seite 122.)
- [220] S. Tsuchiya. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*, 26(2):171–176, 1980. (Zitiert auf Seite 42.)
- [221] Axel Ullrich and Joseph Schlessinger. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 61(2):203–212, 1990. (Zitiert auf Seite 16.)
- [222] Hisanori Umehara. Fractalkine and vascular injury. *Trends Immunol*, 22(11):602–607, 2001. (Zitiert auf Seite 120.)
- [223] Allard C. van der Wal. Macrophage Differentiation in Atherosclerosis: An in Situ Immunohistochemical Analysis in Humans. *Am J Pathol*, 141(1):161–168, 1992. (Zitiert auf Seite 9.)
- [224] S. R. Vavricka and G. Rogler. New insights into the pathogenesis of Crohn's disease: are they relevant for therapeutic options? *Swiss Med Wkly*, 139(37 - 38):527–534, 2009. (Zitiert auf Seite 128.)
- [225] Niels R. Veillard. Differential Influence of Chemokine Receptors CCR<sub>2</sub> and CXCR<sub>3</sub> in Development of Atherosclerosis In Vivo. *Circulation*, 112(6):870–878, 2005. (Zitiert auf Seite 7.)
- [226] Kitty C. M. Verhoeckx. A combination of proteomics, principal component analysis and transcriptomics is a powerful tool for the identification of biomarkers for macrophage maturation in the U937 cell line. *Proteomics*, (4):1014–1028, 2004. (Zitiert auf Seite 36.)
- [227] Robert C. Wahl. Chicken Macrophage Stimulating Protein Is a Ligand of the Receptor Protein-tyrosine Kinase Sea. *J Biol Chem*, 274(37):26361–26368, 1999. (Zitiert auf den Seiten 15 und 17.)
- [228] Susan E. Waltz. Functional Characterization of Domains Contained in Hepatocyte Growth Factor-like Protein. *J Biol Chem*, 272(48):30526–30537, 1997. (Zitiert auf Seite 16.)

- [229] M. H. Wang. Requirement of phosphatidylinositol-3 kinase for epithelial cell migration activated by human macrophage stimulating protein. *Oncogene*, 10(13):2167–2175, 1996. (Zitiert auf den Seiten 17 und 18.)
- [230] M. H. Wang. Macrophage-stimulating protein and RON receptor tyrosine kinase: potential regulators of macrophage inflammatory activities. *Scand J Immunol*, 56(6):545–553, 2002. (Zitiert auf Seite 18.)
- [231] M. H. Wang. Antibodies to macrophage stimulating protein (MSP): specificity, epitope interactions, and immunoassay of MSP in human serum. *J Leukoc Biol*, 54(4):289–295, 1993. (Zitiert auf Seite 125.)
- [232] M. H. Wang. Proteolytic cleavage and activation of pro-macrophage-stimulating protein by resident peritoneal macrophage membrane proteases. *J Clin Invest*, 97(3):720–727, 1996. (Zitiert auf den Seiten 15 und 16.)
- [233] Ming-Hai Wang. The murine stk gene product, a transmembrane protein tyrosine kinase, is a receptor for macrophage-stimulating protein. *PNAS*, 92(9):3933–3937, 1995. (Zitiert auf Seite 17.)
- [234] Ming-Hai Wang. Macrophage Stimulating Protein (MSP) Binds to Its Receptor via the MSP  $\beta$  Chain. *J Biol Chem*, 272(27):16999–17004, 1997. (Zitiert auf Seite 16.)
- [235] Ming-Hai Wang. Oncogenic and invasive potentials of human macrophage-stimulating protein receptor, the RON receptor tyrosine kinase. *Carcinogenesis*, 23(8):1291–1300, 2003. (Zitiert auf Seite 18.)
- [236] Ming-Hai Wang. Macrophage-Stimulating Protein Induces Proliferation and Migration of Murine Keratinocytes. *Exp Cell Res*, 226(1):39–46, 1996. (Zitiert auf Seite 17.)
- [237] Ming-Hai Wang. Oncogenesis of RON receptor tyrosine kinase: a molecular target for malignant epithelial cancers. *Acta Pharmacol Sin*, 27(6):641–650, 2006. (Zitiert auf Seite 17.)
- [238] Tatsuya Watanabe. Production of the long and short forms of MFG-E8 by epidermal keratinocytes. *Cell Tissue Res*, 321(1):185–193, 2005. (Zitiert auf Seite 10.)
- [239] Matti Waterman. Distinct and overlapping genetic loci in crohn's disease and ulcerative colitis: Correlations with pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis*, im Druck, 2010. (Zitiert auf den Seiten 128 und 129.)
- [240] E. S. Wintergerst. Differential expression of CD14, CD36 and the LDL receptor on human monocyte-derived macrophages. *Histochem Cell Biol*, 110(3):231–241, 1998. (Zitiert auf Seite 9.)



- [241] Brian W. C. Wong. Characterization of fractalkine (CX<sub>3</sub>CL<sub>1</sub>) and CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub> in human coronary arteries with native atherosclerosis, diabetes mellitus, and transplant vascular disease. *Cardiovasc Pathol*, 11(6): 332–338, 2002. (Zitiert auf Seite 120.)
- [242] Yi Wu. Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. *Trends Cell Biol*, 16(4):189–197, 2005. (Zitiert auf Seite 11.)
- [243] Hiroshi Yamaguchi. Milk fat globule EGF factor 8 in the serum of human patients of systemic lupus erythematosus. *J Leukoc Biol*, 5(83): 1300–1307, 2008. (Zitiert auf den Seiten 13, 101, und 119.)
- [244] Hiroshi Yamaguchi. Aberrant splicing of the milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) gene in human systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol*, 40(6):1778–1785, 2010. (Zitiert auf Seite 13.)
- [245] Wataru Yoshikawa. Characterization of Free alpha- and beta-Chains of Recombinant Macrophage-Stimulating Protein. *Arch Biochem Biophys*, 363(2):356–360, 1999. (Zitiert auf den Seiten 15 und 16.)
- [246] Teizo Yoshimura. Cloning, sequencing, and expression of human macrophage stimulating protein (MSP, MST<sub>1</sub>) confirms MSP as a member of the family of kringle proteins and locates the MSP gene on chromosome 3. *J Biol Chem*, 268(21):15461–15468, 1993. (Zitiert auf den Seiten 15 und 16.)
- [247] Y. Yoshiyama. Identification of the N-terminal residue of the heavy chain of both native and recombinant human hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 175(2):660–667, 1991. (Zitiert auf Seite 16.)
- [248] Alma Zerneck. Combinatorial Model of Chemokine Involvement in Glomerular Monocyte Recruitment: Role of CXC Chemokine Receptor 2 in Infiltration During Nephrotoxic Nephritis. *J Immunol*, 166(9):5755–5762, 2001. (Zitiert auf Seite 7.)
- [249] Alma Zerneck and Christian Weber. Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, 86(2):192–201, 2010/05/01. (Zitiert auf Seite 7.)
- [250] Qingwei Zhao. Vascular Endothelial Growth Factor Is Necessary in the Development of Arteriosclerosis by Recruiting/Activating Monocytes in a Rat Model of Long-Term Inhibition of Nitric Oxide Synthesis. *Circulation*, 105(9):1110–1115, 2002. (Zitiert auf Seite 7.)
- [251] Yong-Qing Zhou. Altered expression of the RON receptor tyrosine kinase in primary human colorectal adenocarcinomas: generation of different splicing RON variants and their oncogenic potential. *Oncogene*, 22(2):186–197, 2003. (Zitiert auf Seite 18.)

- [252] Ekkehard Ziegler. CCR7 Signaling Inhibits T Cell Proliferation. *J Immunol*, 179(10):6485–6493, 2007. (Zitiert auf Seite 7.)

## ERKLÄRUNG

---

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt, und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Mainz, den 27. April 2011

---

Friederike Häuser