



Fakultät für Medizin

Untersuchungen zur Funktion von Peptidase Inhibitor 16 (PI16) im kardialen Krankheitskontext

Michael Andreas Regn

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Thomas Misgeld

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. Stefan Engelhardt
2. Univ.-Prof. Dr. Bernhard Küster

Die Dissertation wurde am 29. Januar 2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 3. August 2016 angenommen.

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb	Abbildung
AMC	Amino Methyl Cumarin
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
C15	Chemerin15 (AS140-154)
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
Cre	engl. <i>Cyclization recombination</i> (Rekombinase aus Bakteriophage P1)
Cy7	Cyanin 7
d	Tag
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DAPI	4',6'-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	engl. <i>Dulbecco's modified eagles medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
F-12	DMEM F-12
FBS	engl. <i>fetal bovine serum</i>
Flp	engl. <i>flippase recombinase, enhanced</i> (Rekombinase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
Frt	engl. <i>Flp recognition target</i> (Flp-Erkennungssequenz)
G418	Geneticin
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HG	Herzgewicht
HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i>
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
LoxP	engl. <i>locus of crossing of P1</i> (Cre-Erkennungssequenz)
MI	Myokardinfarkt

ml	Milliliter
mM	Millimol / Liter
M	Mol / Liter
N	Aminosäure Asparagin
Neo	Neomycin
nm	Nanometer
NRCM	engl. <i>neonatal rat cardiomyocyte</i> (Neonatale Rattenkardiomyozyten)
ns	nicht signifikant
nt	Nukleotide
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PLC	Phospholipase C
PI16	Peptidase Inhibitor 16
PFA	Paraformaldehyd
P/S	Penicillin / Streptomycin
RNase	Ribonuklease
rpm	engl. <i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rs	engl. <i>reference SNP</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s	Sekunde
SD	engl. <i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDS-PAGE	engl. <i>Sodiumdodecylsulfate</i> -Polyacrylamid-Gradientengel Elektrophorese
SEM	engl. <i>standard error of the mean</i> (Standardfehler)
SNP	engl. <i>single nucleotide polymorphism</i> (Einzelbasenaustausch)
TAC	engl. <i>transverse aortic constriction</i> (Transversale Aortenkonstriktion)
TEV	engl. <i>tobacco etch virus</i>
TG	Transgen
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
U	engl. <i>unit</i> (Einheit)
Vol	Volumen
v/v	Volumen / Volumen
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
w/v	Masse / Volumen
µl	Mikroliter

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Pathophysiologie des Herzens.....	1
1.2	Etablierte Therapien bei Herzinsuffizienz.....	5
1.3	Neue Therapieansätze	6
1.4	Das Adipokin Chemerin im kardialen Kontext	8
1.5	Der putative Proteaseinhibitor - Peptidase Inhibitor 16 (PI16).....	10
1.6	Ziel dieser Arbeit	13
2	Material	15
2.1	Chemikalien.....	15
2.2	Enzyme	17
2.3	Verwendete Kits	17
2.4	Allgemeine Puffer und Lösungen	18
2.5	Zellkulturpuffer und -lösungen.....	22
2.6	Oligonukleotide	24
2.7	Antikörper	24
3	Methoden	26
3.1	Methoden der DNA-Analyse	26
3.2	Methoden der RNA-Analyse	29
3.3	Methoden der Proteinanalyse.....	31
3.4	Zellkultur.....	36
3.5	Entnahme von Gewebe und Isolation von primären Zellen	37
3.6	Kardiovaskuläre Phänotypisierung von Mäusen	39
3.7	Histologische Untersuchungen.....	40
3.8	Durchflusszytometrie / Zellsortierung	43
3.9	Aufreinigung von rekombinantem PI16	45
3.10	Genotypisierung.....	45
3.11	Proteaseinhibition von Cathepsin K.....	46
3.12	Statistische Analyse der Ergebnisse	47
4	Ergebnisse.....	48
4.1	Bioinformatische Analyse des murinen PI16-Proteins.....	48
4.2	Membranassoziation von PI16	49
4.3	Untersuchung der Gewebslokalisierung von PI16 in der Maus	52
4.4	PI16 lokalisiert im erkrankten Herz in interstitiellen Zellen	54

4.5	PI16 in isolierten Primärzellen.....	57
4.6	Kardiale Phänotypisierung der global deletierten <i>Pi16</i> ^{-/-} Mäuse	59
4.7	<i>Pi16</i> wird im Myokard nach Myokardinfarkt differentiell exprimiert	67
4.8	Zeitabhängige Hochregulierung von PI16 nach Myokardinfarkt.....	69
4.9	Einfluss von PI16 auf die sterile Entzündung nach Myokardinfarkt.....	70
4.10	Immunologische Charakterisierung der <i>Pi16</i> -defizienten Mäuse.....	71
4.11	Chemerin und PI16.....	75
4.12	PI16 inhibiert die Chemerin-prozessierende Protease Cathepsin K.....	81
5	Diskussion.....	86
5.1	Posttranslationale Modifikationen und subzelluläre Lokalisation von PI16 ...	86
5.2	PI16 als Fibroblasten-sezerniertes Protein.....	88
5.3	Pathologie des Myokardinfarkts und PI16-Modulation.....	90
5.4	PI16 in Leukozyten und im Blutplasma	92
5.5	Effekte von PI16 auf das Adipokin Chemerin.....	94
6	Zusammenfassung.....	98
7	Summary.....	99
8	Literatur	100
9	Danksagung.....	113

1 Einleitung

1.1 Pathophysiologie des Herzens

1.1.1 Weltweite Bedeutung von Herzerkrankungen als Todesursache

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems stellen in der statistischen Auswertung der Weltgesundheitsorganisation die mit Abstand größte Gruppe der Todesursachen dar. Zusammen zeichneten ischämische Erkrankungen des Herzens und Schlaganfälle für über 14 Millionen Todesfälle im Jahr 2012 verantwortlich (**Abbildung 1**)¹, was mehr als 30% aller Todesfälle weltweit ausmachte und hauptsächlich in Ländern mit mittlerem und niedrigem Einkommen zum Tode führte².

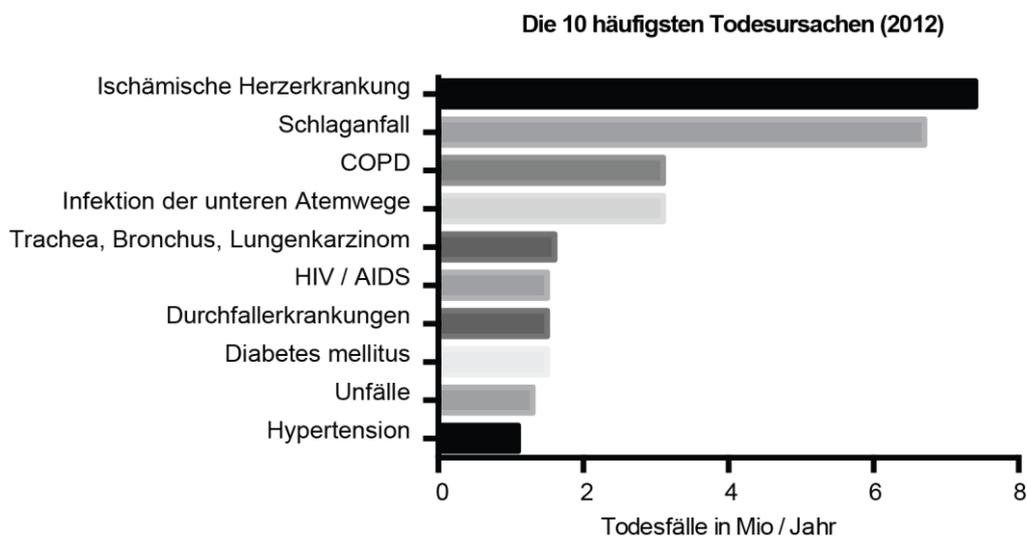


Abbildung 1: Die häufigsten Todesursachen 2012 (adaptiert aus dem WHO Jahresbericht¹)

Damit belegen diese Erkrankungen mit Abstand die ersten beiden Plätze der Rangliste der Weltgesundheitsorganisation, weit vor Lungenerkrankungen wie chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD), Infektionskrankheiten, sowie Tuberkulose und Unfällen. Diese Statistik unterstreicht die Bedeutung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen für die globalen Gesundheitssysteme, die dadurch mit hohen Kosten belastet werden. So beliefen sich die Ausgaben für kardio-vaskuläre Erkrankungen im Jahr 2008 in den USA auf über 300 Milliarden Dollar. Interessant ist dabei die Tatsache, dass davon 77% für die Behandlung, 22% für die Prävention und nur 1% des gesamten Budgets für Forschung ausgegeben wurden. Außerdem ist zu beobachten, dass die Ausgaben im Gesundheitsbereich proportional stärker steigen, als die Ausgaben für die Behandlung von kardio-vaskulären Leiden, was sich in einem schrumpfenden Anteil der Kosten an den Gesamtausgaben zeigt. Der Anteil von kardio-vaskulären Erkrankungen ging hierbei von 12,3% im Jahr 1996 auf

Einleitung

9,8% im Jahr 2008 zurück³. Diese Zahlen unterstreichen dabei deutlich die enorme volkswirtschaftliche Bedeutung. Die Endphase der Erkrankungen markiert in den meisten Fällen die Herzinsuffizienz, welche in den USA ca. 550000 mal pro Jahr *de novo* diagnostiziert wird⁴ und bisher nur symptomatisch behandelt werden kann. Diese hohe Zahl an Neuerkrankungen illustriert hier die enorme Bedeutung der Erforschung der Pathologie und neuer Therapiemöglichkeiten für kardio-vaskuläre Erkrankungen.

1.1.2 Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz bezeichnet Veränderungen in der kardialen Struktur oder Funktion, die dazu führen, dass der Körper nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff für alle lebenswichtigen Prozesse versorgt werden kann, trotz regelrechter Vorlast⁵. Allerdings sind diese Definition und die Beschreibung der Symptome allein nicht ausreichend für eine Therapieentscheidung. Hierfür muss auch die genaue Ursache der Erkrankung, was beispielsweise eine Klappenerkrankung oder eine systolische Fehlfunktion sein kann, diagnostiziert werden. Die Standardmethode hierfür ist die kardiale Echokardiographie und daraus resultierend die Messung der kardialen Ejektionsfraktion⁶, welche eine Klassifizierung des Schweregrades anhand der NYHA- (New York Heart Association) Kriterien in vier Klassen ermöglicht. Als Erweiterung kann für Patienten in der Akutphase des Myokardinfarkts noch die Killig-Klassifizierung verwendet werden⁷.

Neben chronischem Bluthochdruck (Hypertonie) ist eine ischämische oder auch koronare Herzerkrankung häufig Ursache für die Herzinsuffizienz. Bei diesen chronischen Leiden unterscheidet man in der Progression der Herzinsuffizienz eine kompensatorische Phase, in der durch einen verstärkten Sympathikotonus und eine Verdickung der Herzwand (Hypertrophie) eine verringerte Herzfunktion ausgeglichen wird und eine dekomensatorische Phase, in der sich die Herzfunktion progressiv verschlechtert - trotz Hypertrophie und verstärkter Sympathikusaktivität. Ein entscheidender Faktor bei der Transition von der kompensatorischen in die dekomensatorische Phase ist dabei die Ausbildung von interstitieller Fibrose^{8,9}, d.h. die Ablagerung von Extrazellulärmatrix im Interstitium des Myokards, welche die Erkrankung verschlimmert und ein entscheidender Faktor des kardialen Remodelling ist.

1.1.3 Pathologische Prozesse im erkrankten Herz

Kardiales Remodelling beschreibt die zellulären Prozesse, die zum Umbau des Myokards bei einer pathologischen Belastung wie Myokardinfarkt oder Diabetes führen. Es gibt dabei mehrere Hauptfaktoren, die die Pathologie bedingen. Einer ist die sogenannte Hypertrophie (Größenzunahme) von Kardiomyozyten. Dies bedeutet, dass sich der Querschnitt der Muskelzellen vergrößert, was molekular durch eine Zunahme der kontraktilen Einheiten, der

Einleitung

sogenannten Sarkomere, gekennzeichnet ist. Hierbei kann zwischen einer konzentrischen und einer exzentrischen Hypertrophie unterschieden werden. Bei der konzentrischen Hypertrophie ordnen sich die neuen Sarkomere parallel zu den bestehenden an und es kommt zu einer Breitenzunahme der Kardiomyozyten. Bei der exzentrischen Hypertrophie hingegen ordnen sie sich in Reihe an, was zu einem Längenwachstum führt. Makroskopisch manifestiert sich die konzentrische Hypertrophie in einer Myokardwandverdickung (pathologische Hypertrophie), wohingegen die exzentrische Hypertrophie zu einer Dilatation des Ventrikels (physiologische Hypertrophie) führt¹⁰. Diese Form der kardialen Hypertrophie wird auch als „Sportlerherz“ bezeichnet.

Neben der Hypertrophie spielen auch Zelltod und Fibrose im Prozess des Remodellings eine entscheidende Rolle. So kommt es durch die verstärkte Druck- und Volumenbelastung der Herzwand zu Zelluntergängen, sowohl durch Apoptose (programmierter Zelltod) als auch durch Nekrose^{11,12} (**Abbildung 2**), welche dann in Fibrose, Inflammation und Arrhythmien im Myokardgewebe münden und zur Progression der Erkrankung führen.

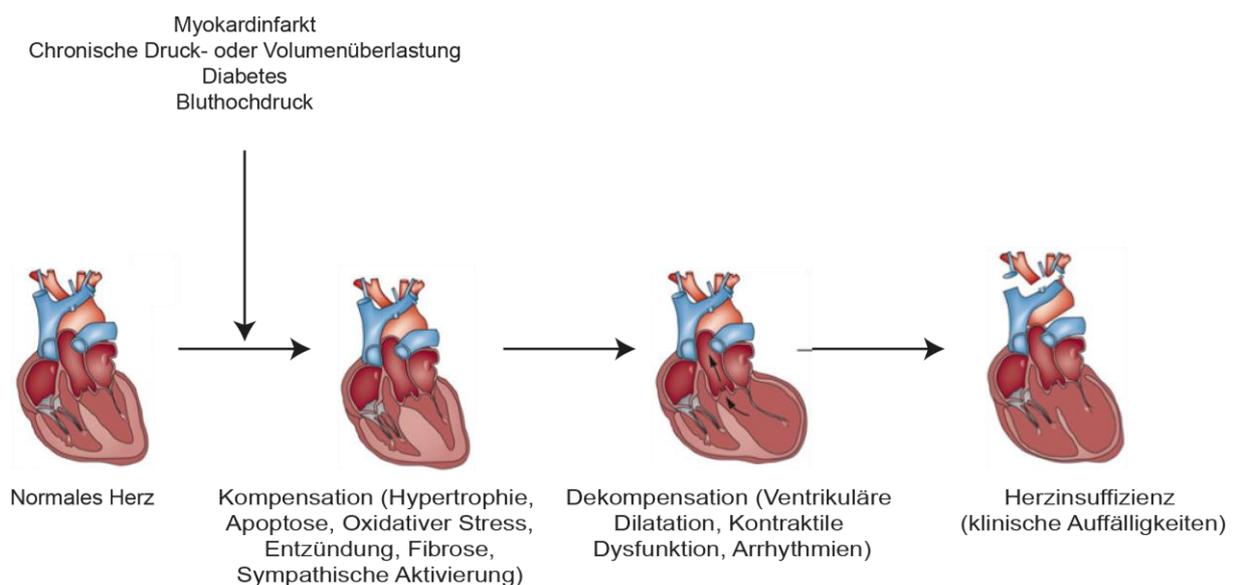


Abbildung 2: Kardiales Remodelling nach pathologischen Stimuli (nach Referenz¹³)

1.1.4 Ischämische Herzerkrankung und Interaktion mit dem Immunsystem

Die ischämische Herzerkrankung ist die häufigste Ursache für Herzinsuffizienz und ist definiert durch einen Prozess bei dem die Herzmuskulatur nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgt wird, was durch eine akute Verengung der Gefäße, beispielsweise durch einen Thrombus, oder auch durch einen progressiven Prozess wie Atherosklerose langsam entstehen kann. Es kann hierbei hauptsächlich zwischen den klinischen Manifestationen der Angina pectoris, bei nicht vollständigem Verschluss der Koronargefäße, sowie dem Myokardinfarkt mit vollständigem Verschluss unterschieden werden. Außerdem zählt der plötzliche Herztod zu dieser Gruppe von Erkrankungen¹⁴. Physiologisch kommt es nach der

Einleitung

Stenose der Koronargefäße innerhalb des Versorgungsgebietes zu einer gravierenden Ischämie, in deren weiterem Verlauf die Kardiomyozyten durch Apoptose und Nekrose zugrunde gehen¹⁵ und sich eine massive sterile Entzündung ausbildet¹⁶. Das Ausmaß der Entzündung ist dabei proportional zur Mortalität nach einem akuten Herzinfarkt¹⁷. Die initiale Immunreaktion nach akuter Ischämie ist in verschiedene Phasen gegliedert, die sich durch unterschiedliche vorherrschende Immunzellpopulationen im Herzmuskel unterscheiden und definieren (**Abbildung 3**). Im gesunden Herzen befinden sich hauptsächlich gewebständige Makrophagen und dendritische Zellen^{18,19}. Diese werden im erkrankten Gewebe allerdings schnell durch andere Immunzellen, vor allem Neutrophile und sogenannte klassische Monozyten (Ly6C^{high}), ersetzt. Die Neutrophilen haben dabei die Funktion nekrotische, abgestorbene Kardiomyozyten und weitere tote Gewebsbestandteile zu phagozytieren. Ein Problem dabei ist allerdings, dass bei diesem Prozess neben den toten Zellen auch eine große Anzahl noch lebensfähiger Herzmuskelzellen zerstört wird und sich damit der Infarktschaden zusätzlich vergrößert²⁰. Die initial einwandernden Monozyten sind ebenfalls pro-inflammatorisch und verstärken die Entzündungsreaktion durch die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Mediatoren, wie beispielsweise Proteasen²¹ (akute Entzündung). Nach den Neutrophilen und Ly6C^{high}-Monozyten in den ersten Tagen des Infarkts migrieren eher anti-inflammatorische Monozyten (Ly6C^{low}) in den Infarktbereich ein und begrenzen die Entzündung, führen zu forcierter Angiogenese und verstärken die Produktion von Bestandteilen der extrazellulären Matrix, damit sich eine stabile Infarktnarbe ausbilden kann²¹ (**Abbildung 3** Heilung). Dies wird vor allem durch die sezernierten, extrazellulären Mediatoren vascular endothelial growth factor (VEGF) und den transforming growth factor β (TGF- β) vermittelt. Am Ende dieser Phase steht eine stabile Infarktnarbe die hauptsächlich von Fibroblasten und Makrophagen gebildet wird (**Abbildung 3** chronische Entzündung).

Neben diesen beschriebenen Zellen des angeborenen Immunsystems haben auch Lymphozyten und dendritische Zellen eine Funktion bei der Immunreaktion nach dem Myokardinfarkt. Für diese konnte zum einen gezeigt werden, dass die Depletion von CD4⁺-T-Helferlymphozyten zu einer verzögerten Konversion der pro-inflammatorischen Monozyten (Ly6C^{high}) zu anti-inflammatorischen Monozyten (Ly6C^{low}) führte und dabei die Heilung des Infarkts verlangsamt wurde. Zum anderen konnte eine ähnliche Beobachtung nach Depletion der gewebständigen dendritischen Zellen gemacht werden, wo sich die Auflösung der Entzündung verzögerte^{22,23}. Diese beiden Zelltypen wirken folglich regulierend auf die Immunreaktion ein, sind dabei allerdings wohl selbst keine Effektoren.

Einleitung

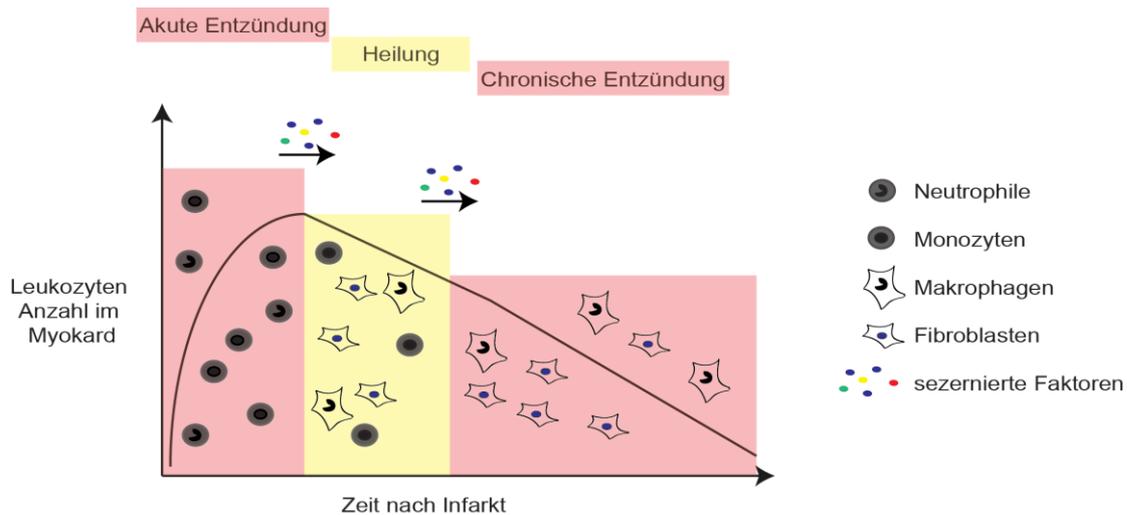


Abbildung 3: Phasen der Entzündung nach Myokardinfarkt mit den vorherrschenden Zellpopulationen (nach Referenz²⁴)

1.2 Etablierte Therapien bei Herzinsuffizienz

Das Ziel aller Therapieansätze im Bereich der Herzinsuffizienz ist es die zugrunde liegende kausale Ursache der Erkrankung zu beseitigen. Dies kann beispielsweise bei einer Klappenstenose der chirurgische Einsatz einer neuen Klappe sein oder bei einer Verengung der Koronargefäße eine Bypassoperation. Des Weiteren sind wichtige Ziele der Therapie die Progression und die Symptome der Patienten einzudämmen. Als großes Ziel steht hierbei immer die Verbesserung der Lebenssituation im Vordergrund. Neben chirurgischen Maßnahmen, wie bereits beschrieben, spielen auch die Veränderung des Lebensstils und die medikamentöse Therapie eine entscheidende Rolle. Die pharmakologische Therapie beruht dabei auf mehreren Grundprinzipien. Zum einen wird die überschießende Sympathikusaktivität im erkrankten Herzen gedämpft. Dies wird vorrangig durch die Gabe von β -Blockern erreicht, was zu einer Nachlastverringern durch niedrigeren Blutdruck und einer verlangsamten Herzfrequenz führt, was den Energie- und Sauerstoffbedarf des Myokards verringert. Es konnte hier in groß angelegten klinischen Studien eine Reduktion der Mortalität um 20% gezeigt werden²⁵, auch in Kombination mit einer weiteren großen Medikamentengruppe in diesem Krankheitsbild, den Angiotensin Converting Enzyme (ACE)-Hemmern. Die ACE ist ein Enzym, welches für die Umsetzung von Angiotensin I zu Angiotensin II zuständig ist. Diese beiden humoralen Mediatoren sind Teil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, welches unter anderem den Gefäßtonus und auch die Wasserretention in der Niere beeinflusst und steuert. Es konnte für ACE-Hemmer als Monotherapie in Studien, wie für β -Blocker, eine signifikante Verringerung der Mortalität, der Entwicklung von Herzinsuffizienz und auch des erneuten Auftretens eines Herzinfarkts gezeigt werden²⁶.

Einleitung

Neben β -Blockern und ACE-Hemmern zählen auch noch Diuretika und Aldosteron-Rezeptor-Antagonisten zur Therapie der Wahl bei Herzinsuffizienzpatienten. Beide Medikamentengruppen fördern die Wasserausscheidung in der Niere und verringern so die Ödembildung in Lunge und / oder Extremitäten und senken die Nachlast und damit auch die Pumparbeit des Herzens. Diuretika sind dabei allerdings in einem engen therapeutischen Fenster einzusetzen, da zu hohe Konzentrationen schnell einen negativen Effekt auf die Mortalität haben können²⁷. Die Applikationsmethode Bolusinjektion scheint hierbei gegenüber kontinuierlicher Infusion keinen Einfluss auf die Wirkung von Diuretika zu haben²⁸, was in früheren Studien postuliert wurde. Die Gabe von Aldosteron-Rezeptor-Antagonisten führte in verschiedenen klinischen Studien zu einer Mortalitätsreduktion von ca. 20% in Patienten nach Myokardinfarkt und bei chronischer Herzinsuffizienz²⁹⁻³¹. Eine Verringerung der Sterblichkeit konnte auch bei additiver Gabe von ACE-Hemmern und Schleifendiuretika gezeigt werden³⁰. Einige Studien zeigten allerdings, dass die Behandlung mit all diesen Arzneimittelgruppen nur zu einer symptomatischen Verbesserung der Erkrankung führt, die Progression der Herzinsuffizienz allerdings nicht aufgehalten werden kann, was die Entwicklung neuer Therapiestrategien gegen die Krankheitsursachen dringend notwendig macht³².

1.3 Neue Therapieansätze

Da die bisherigen medikamentösen Therapiemöglichkeiten der Herzinsuffizienz nur gegen die Symptome und nicht kausal gegen die Ursache der Erkrankung wirken, wird verstärkt an weiteren Medikamenten und Interventionen gearbeitet, die in der Lage sind die Progression der Erkrankung aufzuhalten und dabei auch die Mortalität zu senken.

Eine gängige Therapieform ist dabei die chirurgische Implantation von Kardioverttern oder Defibrillatoren (ICD's), die bereits in Studien wie der MADIT-CRT-Studie eine signifikante Senkung der Mortalität bewirken konnten³³. Neben chirurgischen Interventionen stellt auch die Gentherapie eine vielversprechende neue Therapieoption dar. Ein Schlüsselmolekül hierbei markiert die sarkoplasmatische Kalzium-Pumpe SERCA, deren Expression im kranken Herzen signifikant verringert ist. In der amerikanischen CUPID-Studie (Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease) wurde versucht dieser verringerten Aktivität bzw. Menge an SERCA mittels Gentherapie entgegenzuwirken. Hierzu wurde das SERCA-Gen durch einen viralen Vektor auf Basis eines Adeno-assoziierten Virus (AAV) in die Koronararterien von Herzinsuffizienzpatienten verbracht, wodurch sich die Menge an SERCA im erkrankten Herzen wieder auf ein physiologisches Level einpendelte. Die ersten Ergebnisse der Phase I und II Studien bezüglich Sicherheit und Wirksamkeit waren sehr vielversprechend³⁴⁻³⁶. Allerdings zeigte sich in einer aktuellen Phase 2b-Studie zur Gabe von AAV-SERCA, die mit einer Dosis von

Einleitung

10¹³ Viruspartikeln in 239 Patienten mit NYHA II-IV durchgeführt wurde, dass keine signifikante Verbesserung gegenüber der Placebo-Gruppe messbar war, was die Gentherapie mit AAV-SERCA zur Behandlung von Herzinsuffizienz nach aktueller Einschätzung eher ungeeignet erscheinen lässt^{37,38}.

Zusätzlich zur chirurgischen Intervention und der Gentherapie stellt die Beeinflussung sezernierter Faktoren innerhalb des erkrankten Myokards einen weiteren Forschungsschwerpunkt dar, da diese Faktoren durch ihre exponierte Lage im Interstitium vergleichsweise leicht zugänglich sind. Sie steuern die Zell-Zell-Kommunikation zwischen unterschiedlichen Zelltypen innerhalb des Myokards und modulieren dadurch auch pathologische Prozesse wie beispielsweise interstitielle Fibrose oder Entzündungen des Herzmuskels. Ein vielversprechender Faktor in diesem Kontext ist der extrazelluläre Botenstoff Transforming Growth Factor- β (TGF- β). Ihm wird sowohl eine zentrale Funktion bei der Herzhypertrophie und -fibrose, als auch bei der Pathologie des Myokardinfarkts zugeschrieben, wo er als zentraler Schalter zwischen der inflammatorischen Phase und der reparativen Phase bezeichnet wird. Die pharmakologische Beeinflussung dieses zentralen Moleküls gestaltet sich allerdings sehr schwierig, da TGF- β viele unterschiedliche Effekte in vielen verschiedenen Geweben aufweist und deshalb eine Hemmung bzw. Aktivierung lokal im Myokard schwer umzusetzen ist³⁹.

Einen weiteren untersuchten pharmakologischen Angriffspunkt stellt der Interleukin 1 Rezeptor dar (IL-1R). Dieser wird durch die rekombinante Form des natürlich vorkommenden Antagonisten Anakinra inhibiert, welcher in klinischen Studien eine deutliche Verbesserung der Herzfunktion nach Myokardinfarkt bewirkte⁴⁰. Anakinra wird dabei nicht nur in der Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen, sondern auch bei rheumatoider Arthritis eingesetzt, wo es in verschiedenen klinischen Studien seine Wirksamkeiten unter Beweis stellen konnte⁴¹. Neben diesen beiden am besten untersuchten Faktoren gilt es noch andere extrazelluläre Proteine zu nennen, die in ersten Studien untersucht wurden. Diese Faktoren sind das Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) und verschiedene pathologische Faktoren der Diabeteserkrankung^{42,43}, die Forschung hierzu steht allerdings noch am Anfang weshalb eine abschließende Beurteilung nicht möglich ist. Was bei den Untersuchungen zu sezernierten Faktoren immer zu beobachten war, war eine starke Heterogenität der einzelnen Patienten. Einige Patienten zeigten eine Neigung zu verstärkter interstitieller Fibrose, andere tendierten eher zu einer überschießenden Immunantwort mit verstärkter Dilatation des Herzbeutels nach dem gleichen pathologischen Stimulus. Die Hemmung eines Signalwegs durch extrazelluläre Faktoren kann also in Patienten mit der gleichen klinischen Manifestation der Erkrankung zu absolut konträren Ergebnissen führen. Für eine erfolgreiche Therapie ist es daher unerlässlich, verlässliche Biomarker für die unterschiedlichen Patientengruppen zu entwickeln, dies könnten beispielsweise zirkulierende

Einleitung

Extrazellulärmatrixbausteine bei verstärkter Fibrose sein⁴⁴⁻⁴⁶. Spezifische Biomarker würden es ermöglichen eine zielgerichtete Therapie für den jeweiligen Patiententyp zu verabreichen und unerwünschte Wirkungen zu minimieren.

1.4 Das Adipokin Chemerin im kardialen Kontext

Chemerin wurde initial in einem Screening für cDNAs entdeckt, deren Expression durch Analoga der Retinolsäure gesteigert wurde. Aus diesem Grund wurde die Chemerin- (*RARRES2*)-cDNA initial *TIG2* (Tazarotene induced gene 2) genannt, da das synthetische Retinoid-Analogon Tazaroten in Keratinozyten die Expression dieser cDNA verstärkte⁴⁷. Später wurde es als Ligand des G-Protein-gekoppelten Rezeptors CMKLR1 (chemokine-like-receptor 1) identifiziert, was eine weitergehende Charakterisierung des Proteins ermöglichte⁴⁸. Funktionell wurden dem sezernierten Protein Chemerin verschiedene Funktionen in unterschiedlichen Organsystemen und Erkrankungen zugeschrieben. Es zeigte Funktionen bei der Anlockung und Regulation verschiedener Immunzellpopulationen, wobei hier beispielsweise die Expression des Chemerin-Rezeptors (CMKLR1) ein Unterscheidungskriterium zwischen verschiedenen Subformen von dendritischen Zellen, den plasmazytoiden und myeloiden dendritischen Zellen, darstellte. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Chemerin die Immunantwort nach einer Infektion mit *Staphylococcus aureus* regulierte und beeinflusste⁴⁹⁻⁵². Des Weiteren wurden noch Funktionen beschrieben bei der Adipogenese⁵³⁻⁵⁵, der Angiogenese⁵⁶, der Myogenese von Skelettmuskelzellen⁵⁷ und bei der Glukosehomöostase^{58,59}, wo Chemerin im Mausmodell Glukose-Intoleranz und in humanen Skelettmuskelzellen eine Insulinresistenz hervorrief.

Einige dieser Funktionen von Chemerin sind nachweislich auf eine proteolytische Prozessierung am C-Terminus des Proteins angewiesen. Hierbei wird im humanen Organismus das Volllängenprotein (Prä-Pro-Chemerin) mit 163 Aminosäuren und einem terminalen Serin (S), nach Abspaltung des Signalpeptids (AS 1-19), zu verschiedenen aktiven Produkten prozessiert (**Abbildung 4**). Diese Modifikation wird durch bisher neun identifizierte Proteasen katalysiert, die humanes Pro-Chemerin (S163) C-terminal prozessieren können. Im Einzelnen sind das Cathepsin G, Cathepsin K, Cathepsin L, Kallikrein 7, Plasmin, Elastase, Chymase, Carboxypeptidase N und B^{50,60} (**Abbildung 4**). Bei der Prozessierung entstehen unterschiedliche Chemerin-Isoformen mit unterschiedlichen Affinitäten zum Chemerinrezeptor CMKLR1. Chemerin-S157⁴⁸ und -F156⁶¹ hatten dabei eine hohe Affinität zum Rezeptor, Chemerin-K158⁶² und -F154^{61,63} hingegen eine niedrige Affinität. Es wurde daher postuliert, dass die unterschiedlichen Chemerin-Prozessierungsvarianten eine Art kompetitive Funktion bei der Rezeptorbindung wahrnehmen, was dann nachgeschaltete biochemische Prozesse auf der Zielzelle regulieren könnte^{60,64}. Die verschiedenen Formen unterschieden sich neben ihrer Länge auch in ihrer

Einleitung

Lokalisation innerhalb des Organismus, so konnte von Zhao et al. gezeigt werden, dass die dominante Form im Plasma von erkrankten Patienten Pro-Chemerin (S163) war, wohingegen in Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis die prozessierte Form K158 vorherrschte⁶⁵. Neben den Isoformen K158 und S157, die als pro-inflammatorisch beschrieben wurden, wurde Chemerin auch eine anti-inflammatorische Funktion zugeschrieben. So konnte gezeigt werden, dass ein Peptid welches die Aminosäuren 140-154 (C15) umfasste, anti-inflammatorische Funktion auf peritoneale Makrophagen ausüben konnte⁶⁶. In weiteren Studien dieser Gruppe konnte außerdem gezeigt werden, dass dieser Effekt CMKLR1-Rezeptor abhängig war und zu einer verstärkten Phagozytose von Zelltrümmern und Neutrophilen nach peritonealer Infektion mit Bakterien führte⁶⁷. Darüber hinaus verringerte eine i.v. Injektion dieses Peptids C15 die vaskuläre Entzündung und den Gewebsschaden in einem Mausmodell für Ischämie / Reperfusion, was auf die anti-inflammatorische Funktion dieses Moleküls zurückzuführen war⁶⁸. Neben dieser Studie im Ischämie / Reperusionsmodell konnte des Weiteren im kardio-vaskulären Kontext gezeigt werden, dass epikardiales Fettgewebe von Patienten die an koronarer Herzkrankheit litten, signifikant mehr Chemerin exprimierte als von Personen ohne diese Erkrankung. Die erhöhte Expression war dabei auf dieses kardiale Fettdepot restringiert, da die Expressionssteigerung in subkutanem Fettgewebe nicht gezeigt werden konnte⁶⁹. Außerdem sind noch weitere, kürzere Chemerin-Isoformen beschrieben worden, die nach der Spaltung durch die Cystein-Proteasen Cathepsin L und Cathepsin K entstanden. Eines, das verkürzte Chemerin R125, konnte dabei den CMKLR1 nicht mehr aktivieren⁵⁰.

Durch all diese Studien zeigte sich, dass nicht nur die absolute Menge von Chemerin für dessen Funktion von entscheidender Bedeutung ist, sondern auch eine posttranslationale, proteolytische Regulation, gesteuert durch die zelluläre Umgebung, essentiell ist. Durch diese proteolytische Kontrolle kann Chemerin direkt am Wirkungsort modifiziert und die Funktion von entzündungsfördernd bis hin zu entzündungshemmend verändert werden, jeweils abhängig von den anwesenden Proteasen.

Einleitung

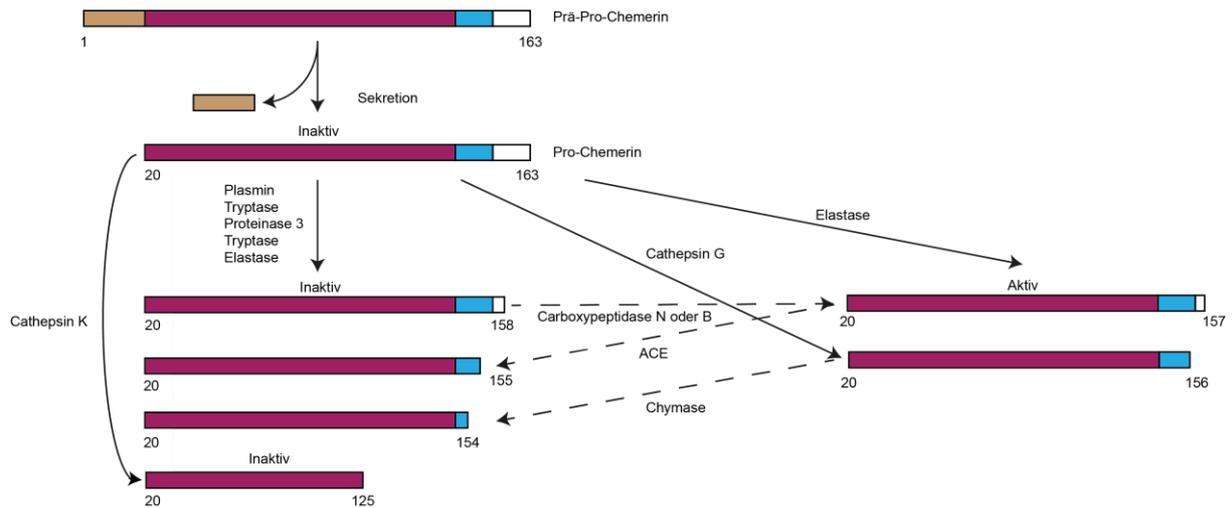


Abbildung 4: Schematische Darstellung der posttranslationalen Prozessierung von Prä-Pro-Chemerin durch verschiedene Serin- und Cystein-Proteasen in aktive (rechts) und inaktive (links) Produkte am CMKLR1-Rezeptor (nach Referenz⁶⁴).

In einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) für Einzelbasenpaaraustausche (SNP's) wurde außerdem eine starke Assoziation von einem SNP (rs1405069) im humanen Locus für *Pi16* mit der Plasmamenge von Chemerin in adipösen Patienten beschrieben, was einen ersten Hinweis auf eine mögliche Assoziation von PI16 und Chemerin im Organismus gab⁷⁰.

1.5 Der putative Proteaseinhibitor - Peptidase Inhibitor 16 (PI16)

PI16 wurde initial in unserer Arbeitsgruppe in einem Hefe-Screening für kardial sezernierte Faktoren entdeckt, wo es eine starke Hochregulation im erkrankten Myokardgewebe zeigte, vergleichbar mit dem atrialen natriuretischen Peptid (ANP), welches als Biomarker für ein erkranktes Herz fungiert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *Pi16* nicht nur im Gewebe exprimiert wird, sondern auch als Protein im Serum bzw. Plasma von Mäusen zu finden war. Die Überexpression in isolierten Kardiomyozyten mittels Adenoviren in Zellkultur und *in vivo* durch ein Kardiomyozyten-spezifisches Transgen, getrieben durch den α -myosin heavy chain (α -MHC)-Promotor, führte zu einem signifikant verringerten Myozytendurchmesser und damit zu einem verminderten Herzgewicht im *Pi16*-transgenen Tier⁷¹, was eine anti-hypertrophe Funktion von PI16 implizierte.

Das PI16-Protein verdankt seinen Namen historisch einer teilweisen Sequenzhomologie zu PI15 (Peptidase Inhibitor 15), einem putativen Proteaseinhibitor der von Glioblastomzellen sezerniert wird^{72,73}. Sowohl PI16 als auch PI15 gehören dabei zur Familie der sogenannten CAP-Proteine, wobei das Acronym für „cysteine-rich secretory proteins, antigen 5 and pathogenesis-related 1“ steht und zeigen die größte Sequenzhomologie zu GLIPR1. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie sind evolutionär stark konserviert, über deren Funktion ist allerdings nur wenig bekannt (**Abbildung 5**). Die starke Konservierung lässt jedoch eine wichtige, als auch ähnliche Funktion der einzelnen Familienmitglieder innerhalb des

Einleitung

Organismus vermuten⁷⁴. Bisher sind für einzelne CAP-Proteine Funktionen als Sterol-bindende Proteine⁷⁵, Ionenkanal-Binder⁷⁶, bei der Spermien-Funktion⁷⁷ und als Onkogen bzw. Tumorsuppressor⁷⁴ beschrieben. Des Weiteren konnten auch verschiedene CAP-Proteine in Schlangengiften nachgewiesen werden, was die große Stabilität dieser Proteine in extrazellulären Flüssigkeiten illustrierte und auf eine mögliche Funktion in der Bindung von Sterolen oder anderen hydrophoben Verbindungen im Gewebe hindeutete⁷⁸.

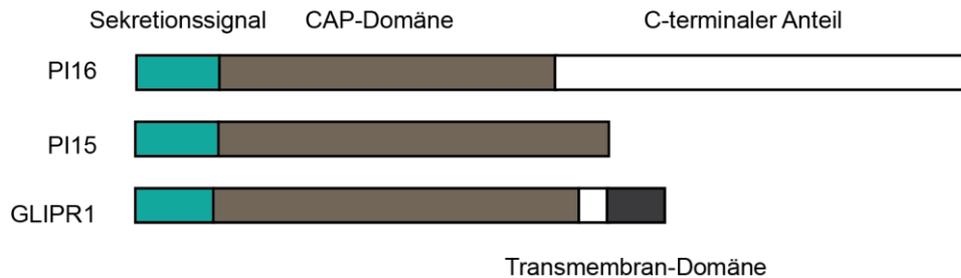


Abbildung 5: Mitglieder der CAP-Familie mit der größten Homologie zu PI16: PI16 besitzt im Vergleich zu vielen anderen Mitgliedern der CAP-Familie einen langen unstrukturierten C-terminalen Anteil. Die CAP-Domäne ist allen Mitgliedern der Superfamilie (hier PI15 und GLIPR1) gemein, GLIPR1 besitzt zusätzlich im C-terminalen Bereich eine Transmembranhelix.

Ein gemeinsames Merkmal dieser Familie ist die Konservierung von Disulfid-Brücken bzw. Cysteinen innerhalb der primären Aminosäuresequenz, die den Proteinen extrazellulär Stabilität und Widerstandsfähigkeit verleiht. Außerdem konnte für PI16 gezeigt werden, dass das Protein in hohem Maße N-glykosyliert vorliegt, was allerdings nicht die charakteristische 3-Banden Struktur und das vermeintlich höhere Molekulargewicht (**Abbildung 6**) im denaturierenden SDS-Gel erklärte⁷¹.

Bezüglich einer extrakardialen Funktion von PI16 wurde bisher beschrieben, dass es an das Serumprotein PSP94 (Prostate Secretory Protein of 94 amino acids) bindet und als möglicher Biomarker für ein erneutes Auftreten einer Krebserkrankung der Prostata nach vollständiger Prostektomie verwendet werden könnte⁷⁹. Dabei korrelierte die PI16-Proteinmenge negativ mit einem Tumor Rezidiv⁸⁰. Neben der absoluten Menge war in dieser Studie auch das Verhältnis von an PSP94 gebundenem PI16 zu freiem PI16 positiv mit dem erneuten Auftreten eines Tumors zu korrelieren⁸⁰. Diese Beobachtung illustrierte, dass nicht nur die absolute Menge von PI16 bedeutungsvoll für die physiologische Aktivität sein könnte, sondern auch die Bindung an mögliche weitere sezernierte Faktoren entscheidend die Funktion von PI16 im Organismus zu beeinflussen vermag⁷⁸.

Neben der Funktion bzw. der freien Lokalisation im Serum scheint PI16 auch auf der Zelloberfläche eine Funktion zu erfüllen. Es wurde hierzu in einem Screening nach Oberflächenmarkern für regulatorische T-Zellen (T_{regs}) beschrieben⁸¹. Diese spezielle Leukozytenpopulation wirkt inhibitorisch auf periphere Entzündungsprozesse wie

Einleitung

beispielsweise Psoriasis und ähnliche Hauterkrankungen. In der Studie wurden in einer genomweiten Analyse Gene untersucht, die durch den Transkriptionsfaktor Foxp3 reguliert wurden. Foxp3 ist spezifisch in regulatorischen T-Zellen aktiv⁸². Dabei konnte PI16 als reguliert und auf der Oberfläche von mehr als 80% aller nicht aktiven T_{regs} nachgewiesen werden und wurde deshalb in Kombination mit anderen Oberflächenmarkern (CD4, CD25) als Marker für regulatorische T-Zellen im Blut propagiert⁸¹. Für diese PI16-positive Lymphozytenpopulation konnte in einer Nachfolgearbeit zusätzlich gezeigt werden, dass sie eine höhere Menge an Foxp3 produzierte, einen T-Gedächtnis-Phänotyp aufwies und dass sie ein verändertes Migrationsverhalten im Gradienten der Chemokine CCL17 und CCL20 zeigte⁸³.

So wurden für PI16 bisher mögliche Funktionen im kardiovaskulären System, im Krebskontext und auch im Immunsystem beschrieben.

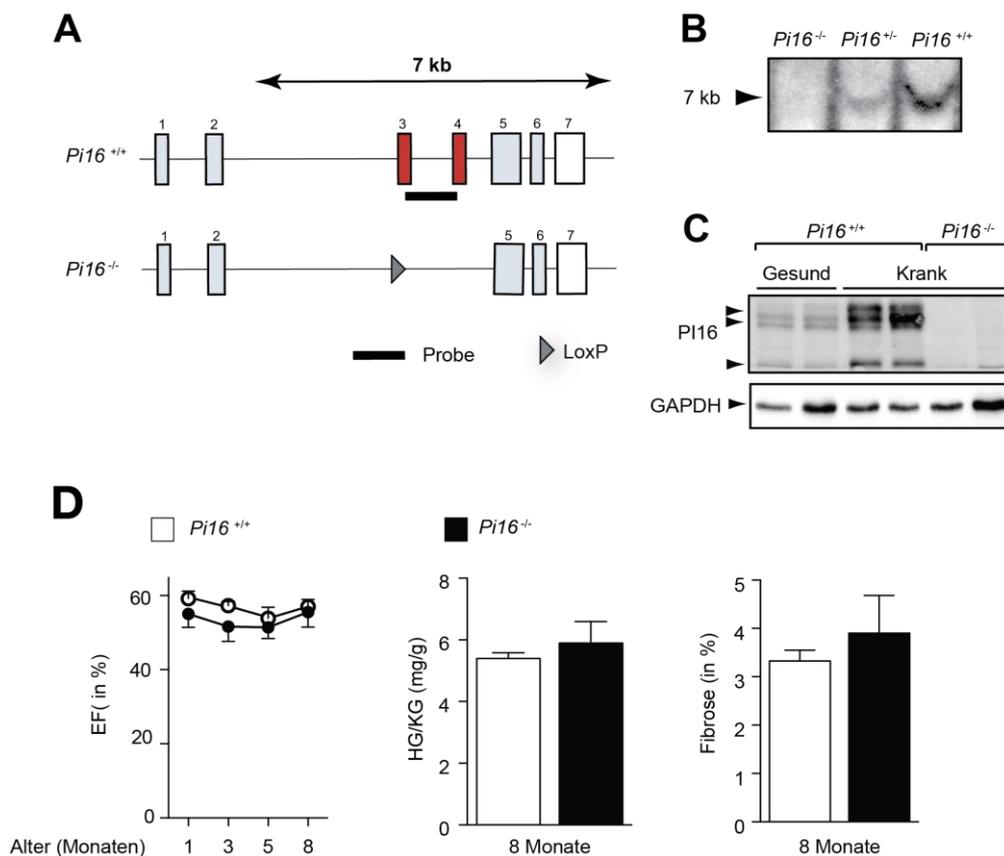


Abbildung 6: Generierung *Pi16*-defizienter Mäuse und basale kardiale Phänotypisierung: (A) Generierung des geflochtenen *Pi16*-Allels; (B) Southern Blot als Kontrolle der Deletion von *Pi16* nach Kreuzung mit der *nestin*-Cre transgenen Mauslinie; (C) Hochregulation von PI16 im erkrankten Myokardgewebe mit *Pi16*^{-/-}-Kontrolle zur Spezifität des Signals; (D) Basale kardiale Phänotypisierung zeigt keine Auffälligkeiten der *Pi16*^{-/-} Mäuse bezüglich Ejektionsfraktion, Hypertrophie (HG/KG) und Fibrose⁸⁴.

Einleitung

Als Vorarbeit zu dieser Dissertation wurden bereits genetisch veränderte Mäuse für das murine *Pi16*-Allel generiert (Insertion von LoxP-Rekombinase Erkennungssequenzen), die mit einer global aktiven Cre-Linie (*nestin-Cre*) verpaart wurden und somit zu einer globalen Defizienz des *Pi16*-Allels in den Mäusen führten⁸⁴. Diese Mäuse zeigten unter basalen Bedingungen keinen kardialen Phänotyp bezüglich funktioneller Echokardiographieparameter, als auch Herzhypertrophie und -fibrose⁸⁴ (**Abbildung 6**). Da *Pi16* erst im erkrankten Herzen stark hochreguliert wird⁷¹, wurden diese Mäuse in der vorliegenden Arbeit trotz des fehlenden basalen Phänotyps im Myokard als Grundlage für die Untersuchung von *Pi16* im kardialen Krankheitskontext verwendet.

1.6 Ziel dieser Arbeit

Übergeordnetes Ziel dieser Arbeit war die Erforschung der Funktion des putativen Peptidaseinhibitors *Pi16* im Kontext des erkrankten Herzens. Dies sollte in drei großen Themengebieten erfolgen:

Zum einen sollte untersucht werden, warum *Pi16* im SDS-Gel ein charakteristisches Drei-Banden Muster aufweist, welches auch nach vollständiger N-Deglykosylierung noch Bestand hat. Dies sollte durch verschiedene bioinformatische Analysen mit anschließenden Verifikationsversuchen geschehen. Diese Versuche umfassten enzymatischen Abbau und weitere biochemische Untersuchungen zu posttranslationalen Modifikationen von *Pi16*.

Zum anderen sollten mögliche Bindungspartner von *Pi16* *in vivo* und *in vitro* identifiziert und charakterisiert werden, um eine Funktion von *Pi16* zu ergründen. Die Bindungspartner sollten durch Ko-Präzipitation von *Pi16* mit einem spezifischen Antikörper aus komplexen Gemischen (Blutplasma, Zellkulturüberstand) abgetrennt und dann mit weiteren Analysemethoden, wie Immunoblot, untersucht werden. Als Kontrolle hierbei sollten die global deletierten *Pi16*^{-/-}-Mäuse dienen, um jedes unspezifische Signal in dieser Präzipitation herauszufiltern.

Die *Pi16*^{-/-}-Mäuse sollten auch im Fortgang der Arbeit bezüglich eines möglichen kardialen oder extrakardialen Phänotyps im Vergleich zu Geschwisterkontrollen ohne *Pi16*-Deletion charakterisiert werden. Sobald sich ein Phänotyp in einem Krankheitsmodell manifestierte, sollte dieser durch weitere Analysen (biochemisch, genetisch) untersucht werden. Teil dieses Unterpunkts sollte auch die Aufreinigung von *Pi16* aus einem eukaryotischen Zellkultursystem sein, welches dann im Anschluss für eine funktionelle Untersuchung *in vitro* und auch *in vivo* in der Maus verwendet werden könnte. Dabei sollte beispielsweise die Inhibition von Proteasen *in vitro* oder auch die Substitution von *Pi16* in Geweben oder Plasma der *Pi16*^{-/-}-Tiere untersucht werden.

Einleitung

All diese Experimente sollten dabei auf das bessere Verständnis der Funktionalität von PI16 und ein mögliches therapeutisches Potential für die Behandlung von Herzerkrankungen durch Modifikation von PI16 abzielen.

2 Material

2.1 Chemikalien

Name	Hersteller
Aceton	Roth (Karlsruhe, D)
Agar	AppliChem (Darmstadt, D)
Agarose	Peqlab (Erlangen, D)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe, D)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Antibody diluent	Ventana (Tucson, USA)
Bovines Serum Albumin (BSA)	AppliChem (Darmstadt, D)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt, D)
Chloroform	Roth (Karlsruhe, D)
Complete Mini, Proteinaseinhibitoren	Roche (Mannheim, D)
Cryomatrix (Shandon tm)	Thermo Scientific (Bonn, D)
Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	GIBCO (Karlsruhe, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe, D)
Dithiotreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe, D)
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth (Karlsruhe, D)
E-64	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Eosin Y Lösung, wässrig	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem (Darmstadt, D)
Essigsäure 100 %	J.T.Baker (Phillipsburg, USA)
Ethanol	J.T.Baker (Phillipsburg, USA)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Fetales bovines Serum (FBS)	PAN (Aidenbach, D),
Fetales bovines Serum ultra low IgG (FBS)	Thermo Scientific (Bonn, D)
Geneticin (G418)	GIBCO (Karlsruhe, D)
Glukose	Merck (Darmstadt, D)
Glycerol	Merck (Darmstadt, D)
Glycin	AppliChem (Darmstadt, D)
Hefeextrakt	AppliChem (Darmstadt, D)
Hematoxylin-Lösung	Roth (Karlsruhe, D)
HEPES	AppliChem (Darmstadt, D)
Heparin	Ratiopharm (Ulm, D)
Isofluran	Abbott (Wiesbaden, D)
Isopropanol	Merck (Darmstadt, D)
Kaliumchlorid ((KCl)	AppliChem (Darmstadt, D)

Material

Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth (Karlsruhe, D)
Kanamycin	AppliChem (Darmstadt, D)
Laminin	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Magermilchpulver	AppliChem (Darmstadt, D)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck (Darmstadt, D)
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck (Darmstadt, D)
<i>Minimum Essential Eagle (MEM)</i>	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
2-Mercaptoethanol	AppliChem (Darmstadt, D),
Methanol	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt, D)
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem (Darmstadt, D)
Natriumcitrat (Na-Citrat)	AppliChem (Darmstadt, D)
Natriumdihydrogenphosphat	(NaH ₂ PO ₄)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck (Darmstadt, D)
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumlaurylsarcosin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	AppliChem (Darmstadt, D)
Natriumphosphat	Roth (Karlsruhe, D)
Nicht-essentielle Aminosäuren	GIBCO (Karlsruhe, D)
Nonident P40 (NMP-40)	AppliChem (Darmstadt, D)
Nuklease-freies Wasser	GIBCO (Karlsruhe, D)
Opti-MEM® I	GIBCO (Karlsruhe, D)
Paraffin (Parablast)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
(Steriles) <i>Phosphate buffered saline (PBS)</i>	GIBCO (Karlsruhe, D)
Penicillin/Streptomycin	GIBCO (Karlsruhe, D),
Pepton	AppliChem (Darmstadt, D)
Pertex	Medite (Burgdorf, D)
Phenol/Chloroform	Roth (Karlsruhe, D)
Pikrinsäure Lösung (1,3%)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Protease Inhibitor Cocktail (HALT™)	Thermo Scientific (Bonn, D)
RNAse Out Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen (Karlsruhe, D)
RNAPure®	Peqlab (Erlangen, D)
Roti-Histol	Roth (Karlsruhe, D)
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1 Acrylamid-Bisacrylamid)	Roth (Karlsruhe, D)
Saccharose	Roth (Karlsruhe, D)
Salzsäure 37% (HCl)	Merck (Darmstadt, D)
Tertiärer Amylalkohol	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Toluol	Roth (Karlsruhe, D)

Material

2,2,2 Tribromethanol	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Trichloressigsäure (TCA)	AppliChem (Darmstadt, D)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	AppliChem (Darmstadt, D)
TriFast, pegGold	Peglab (Erlangen, D)
Tween® 20	AppliChem (Darmstadt, D)
Trypanblau	AppliChem (Darmstadt, D)
Vitamin B12	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Vectashield® Einbettmedium	Vector Labs
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck (Darmstadt, D)
Xylol	Roth (Karlsruhe, D)
Zeocin®	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Ziegenserum	GIBCO (Karlsruhe, D)
Z-Gly-Pro-Arg-AMC	Peptanova (Sandhausen, D)

2.2 Enzyme

Name	Hersteller
AccuPrime Pfx DNA Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Benzonase	Merck (Darmstadt, D)
Cathepsin K	BioVision (Zürich, CH)
DNase	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Kollagenase	Worthington (Lakewood, USA)
Phosphatidylinositol-Phospholipase C	Thermo Scientific (Bonn, D)
Proteinase K	AppliChem (Darmstadt, D)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (NEB, Frankfurt am Main, D)
Taq DNA Polymerase	GenScript (Piscataway, USA)
Taq DNA Polymerase, recombinant	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Trypsin EDTA	GIBCO (Karlsruhe, D)

2.3 Verwendete Kits

Name	Hersteller
BCA Kit	Thermo Scientific (Bonn, D)
ECL	Thermo Scientific (Bonn, D)
ECL 2	Thermo Scientific (Bonn, D)
Mouse Chemerin Quantikine ELISA kit	R&D Systems (Minneapolis, USA)
PureLink® Plasmid Midi/Maxi Kit	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Power SYBR Green PCR Master Mix	Roche (Mannheim, D)

Material

QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, D)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden, D)
SuperScript II Reverse Transcriptase	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Zinc-Rev-Stain Kit	ThermoScientific (Bonn, D)

2.4 Allgemeine Puffer und Lösungen

Bindepuffer für Proteinaufreinigung

20 mM Natriumphosphat in H₂O

Blockpuffer

Tris-Lösung (1 M, pH 7,5)	100 mM
NaCl	100 mM
Tween® 20	0,1 % (v/v)
ddH ₂ O	ad 300 ml
Magermilchpulver	5%

EDTA-Puffer

EDTA (1 mM, pH 8,0)	
Tween® 20	0,05%

Glycinlösung zur Proteinelution

Glycin	100mM
autoklaviertes ddH ₂ O	
pH = 3	

Eosin-Lösung

Eosin Y Lösung, wässrig	20 ml
ddH ₂ O	80 ml
Essigsäure (100%)	3 Tropfen

Erythrozytenlysepuffer

Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	10 mM
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	155 mM
EDTA	0,1 mM
pH = 7	

Material

Ladepuffer

Agarosegel:

EDTA	50 mM
Glycerol (100%)	3,6 ml
Bromphenolblau	0,001 % (m/v)
ddH ₂ O	ad 12 ml

Polyacrylamidgel:

Glycerol	50%
Bromphenolblau	0,001 % (m/v)
ddH ₂ O	50%

Laufpuffer (10x)

Glycin	1,92 M
Tris	250 mM
SDS	50 mM
ddH ₂ O	

Lysispuffer für Schwanzbiopsien

Tris	100 mM
EDTA	5 mM
NaCl	200 mM
ddH ₂ O	

Lysispuffer für Proteinlysate

Tris (pH 6,7)	50 mM
SDS	2%
Na ₃ VO ₄	1 mM
HALT Protease Inhibitor Cocktail	1:100 Verdünnung in Lysepuffer

Paraformaldehyd (4%)

PFA	20 g
PBS (1x)	480 ml
Lösung auf 60°C erhitzen	
NaOH (1 M) bis pH 7,2	
PBS (1x)	ad 500 ml
Lagerung bei -20°C	

Material

PBS (10x)

NaCl	1,38 M
KCl	30 mM
Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	43 mM
KH ₂ PO ₄	15 mM
ddH ₂ O	

PBST

PBS (10x)	100 ml
Tween® 20	0,1 % (v/v)
ddH ₂ O	ad 1 l

Perfusionspuffer

NaCl	113 mM
KCl	4,7 mM
KH ₂ PO ₄	0,6 mM
Na ₂ HPO ₄	0,6 mM
MgSO ₄	1,2 mM
NaHCO ₃	12 mM
KHCO ₃	10 mM
HEPES	10 mM
Taurin	30 mM

Puffer für *in vitro* Protease Assay

Natriumacetat	50 mM
EDTA	2,5 mM
DTT	1 mM
Triton X-100	0,01% (v/v)
pH = 5,5	

Puffer für Sammelgel (4x)

Tris	500 mM
SDS (10%)	0,004 % (m/v)
ddH ₂ O	
pH = 6,7	

Material

Puffer für Trenngel (4x)

Tris	1,5 M
SDS (10%)	0,004% (m/v)
ddH ₂ O	
pH = 8,8	

Puffer P1 für Primärzellisolation

Perfusionspuffer	9 ml
FCS (PAN)	10 % (v/v)
CaCl ₂	10 mM

Puffer P2 für Primärzellisolation

Perfusionspuffer	47,5 ml
FCS (PAN)	5 % (v/v)
CaCl ₂	10 mM

Sirius Rot-Lösung

ddH ₂ O	15 ml
Direct Red 80	0.125 g
Pikrinsäure Lösung (1,3%)	235 ml

Tris-Acetat-EDTA (TAE) -Puffer für Agarosegele (50x)

Tris	0,2 M
Essigsäure	5,7 %
EDTA	50 mM
ddH ₂ O	

Tris-EDTA (TE) - Puffer

Tris	10 mM
EDTA	1 mM

Transferpuffer

Tris-Lösung (pH 8,3)	250 mM
Glycin	150 mM
Methanol	10 % (v/v)

Material

ddH₂O

Verdünnungspuffer für Proteinlysate

2-Mercaptoethanol	2,5 % (v/v)
Ladepuffer (Immunoblot)	10 % (v/v)
Lysispuffer für Proteinlysate	

2.5 Zellkulturpuffer und -lösungen

Trypsinlösung

Trypsin (1:250)	0,2 % (m/v)
Difco Trypsin 250	1 % (m/v)
CBFHH	20 % (v/v)
DNase	0,2 % (v/v)

Nährmedien

Die Nährmedien für die Zellkultur von Zelllinien, primären Zellen und Bakterien wurden steril filtriert und bei 4°C bis zum Gebrauch gelagert.

10% FCS Medium für Zelllinien (Transfektion)

DMEM	
FCS (Sigma-Aldrich)	10%

10% FCS Medium F-12 für Zelllinien (Transfektion)

DMEM F-12	
FCS (Sigma-Aldrich)	10%

DMEM-G418-Medium

10% FCS-Medium für Zelllinien	
Geneticin	0,04 % (m/v)

DMEM F-12 Zeocin-Medium

10% FCS-Medium F-12 für Zelllinien	
Zeocin	0,04 % (m/v)

10% FCS Medium für Zelllinien

Material

Penicillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml

Einfriermedium-Medium

DMEM	
FCS	20% (v/v)
DMSO	10% (v/v)

LB-Medium

Pepton	1% (m/v)
Hefeextrakt	0,5 % (m/v)
NaCl	90 mM
NaOH	1 mM
ddH ₂ O	

LB-Agar

Agarose	1,5 % (m/v)
LB-Medium	

AMCM (AMCF) Basismedium

MEM	1,08 % (m/v)
Vitamin B12	0,1 % (v/v)
NaHCO ₃	4 mM
ddH ₂ O	
pH = 7,3	

AMCM (AMCF) Kulturmedium

FCS – 0,1%, 1% oder 5% (PAN)	
Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
BrdU (Nur für AMCM Kultur)	1 % (v/v)
NRCM Basismedium	

***Pre-plating* Medium für Primärzellen**

FCS (PAN)	5 % (v/v)
Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
NRCM Basismedium	

Material

2.6 Oligonukleotide

Alle Desoxynukleotide für Genotypisierung, Klonierung und quantitative RT-PCR Analyse wurden bei Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D) bestellt, auf 1 nmol/ μ l Stockkonzentration mit ddH₂O verdünnt und bei -20°C gelagert.

Genotypisierung:

<i>Pi16</i> ^{-/-} Mäuse	5' flloxP1	5'-ACCAACCAACCGAATAACCA-3'	(1119 bp)* (+/+)
	LoxpF	5'-GACAGATTCCATCCTTAAGTCCC-3'	341 bp (-/-)
	Delloxp4R	5'-TCCGCTTAGAGACTGCCTA-3'	146 bp (+/+)

* Dieses Produkt wird aufgrund seiner Länge nur schwierig amplifiziert und ist deshalb zu vernachlässigen.

Real-time PCR:

<i>Pi16</i>	Forward	5'-CCAGTGCCTCTTGGCTAC-3'
	Reverse	5'-ACCTCGGTCACCCTTGGA-3'
<i>RARRES2</i>	Forward	5'-GTGCACAATCAAACCAAACG-3'
	Reverse	5'-GGCAAACCTGTCCAGGTAGGA-3'
<i>Actb</i>	Forward	5'-GCAGCTCCTTCGTTGCCGGT-3'
	Reverse	5'-TACAGCCCGGGGAGCATCGT-3'
<i>IL6</i>	Forward	5'-GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA-3'
	Reverse	5'-CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA-3'
<i>TNF</i>	Forward	5'-TCTTCTCATTCTGCTTGTGG-3'
	Reverse	5'-GGTCTGGGCCATAGAACTGA-3'
<i>IL1B</i>	Forward	5'-TGAAGTTGACGGACCCCAAA-3'
	Reverse	5'-TGATGTGCTGCTGCGAGATT-3'

2.7 Antikörper

	Zielspezies	Wirtsspezies	Verdünnung	Stockkonzentration	Hersteller / Klon
anti-Maus IgG Alexa488	Maus	Ziege	1:200	2 mg/ml	Life Technologies (Darmstadt, D)
anti-Maus IgG Alexa647	Maus	Ziege	1:200	2 mg/ml	Life Technologies (Darmstadt, D)
anti-Kaninchen IgG Alexa568	Kaninchen	Ziege	1:200	2 mg/ml	Life Technologies (Darmstadt, D)
anti-Ziege IgG Alexa488	Ziege	Esel	1:200	2 mg/ml	Life Technologies (Darmstadt, D)
anti-Ratte IgG	Ratte	Ziege	1:200	2 mg/ml	Life Technologies

Material

Alexa488					(Darmstadt, D)
anti-Huhn IgG Alexa488	Huhn	Ziege	1:200	2 mg/ml	Life Technologies (Darmstadt, D)
anti-Kaninchen HRP	Kaninchen	Ziege	1:10000	2 mg/ml	Jackson ImmunoResearch (Newmarket, GB)
anti-Maus HRP	Maus	Ziege	1:10000	2 mg/ml	Jackson ImmunoResearch (Newmarket, GB)
anti-Ziege HRP	Ziege	Esel	1:10000	2 mg/ml	Jackson ImmunoResearch (Newmarket, GB)
PI16-Volllänge	Maus	Kaninchen	IF: 1:50 / WB: 1:1000	1 mg/ml	Eigene Herstellung (ImmunoGlobe)
PI16-Exon 5	Maus	Kaninchen	IF: 1:50 / WB: 1:1000	1 mg/ml	Eigene Herstellung (ImmunoGlobe)
PI16-Peptid	Maus	Kaninchen	IF: 1:50 / WB: 1:1000	1 mg/ml	Eigene Herstellung (ImmunoGlobe)
Serum-Albumin	Maus	Kaninchen	WB: 1:1000	1 mg/ml	Abcam (ab19194)
GAPDH	Maus	Maus	WB: 1:5000	1 mg/ml	Calbiochem (6C5)
Chemerin	Maus	Ziege	WB: 1:1000	1 mg/ml	R&D Systems (2325-CM)
α - Glattmuskel-Aktin	Maus	Maus	1:300	1 mg/ml	Sigma Aldrich (1A4)
Glattmuskel-Aktin 22 α	Maus	Ziege	1:200	1 mg/ml	Abcam (ab10135)
Vimentin	Maus	Huhn	1:300	1 mg/ml	Abcam (ab23525)
CD45	Maus	Maus	1:200	1 mg/ml	BD Pharmigen (69-CD45)
CD68	Maus	Ratte	1:200	1 mg/ml	AbD Serotec (FA/11)
CD31	Maus	Ratte	1:200	1 mg/ml	BD Pharmigen (MEC 13.3)
Ly6G/C	Maus	Ratte	1:300	1 mg/ml	BD Pharmigen (RB6-8C5)

3 Methoden

3.1 Methoden der DNA-Analyse

3.1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde für die Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Klonierung und zur Genotypisierung verschiedener Mauslinien verwendet.

Dabei wurden sowohl 2-Schritt Protokolle als auch 3-Schritt Protokolle verwendet, diese unterscheiden sich durch das Vorhandensein eines Anlagerungsschritts für die Primer zwischen Denaturierung und Elongation des PCR-Produkts. Die 2-Schritt-PCR wurde dabei bevorzugt für lange Primer mit einer hohen Schmelztemperatur verwendet.

Ein typischer PCR-Ansatz sah wie folgt aus:

Reagenz	Endkonzentration / Volumen
Ausgangs-DNA (cDNA, Plasmid, gDNA)	100–1000 ng
10x Reaktionspuffer (inkl. dNTP's)	5 μ l
5'Primer forward (20 pmol/ μ l)	1,5 μ l
3'Primer reverse (20 pmol/ μ l)	1,5 μ l
DNA-Polymerase	1 μ l
Autoklaviertes Wasser	Ad 50 μ l

Die eigentliche Reaktion erfolgte im Thermocycler (Mastercycler, Eppendorf, Hamburg, D) nach folgendem Protokoll:

2-Schritt-Protokoll:

Schritt	Temperatur	Zeit	Häufigkeit
Initiale Denaturierung	95° C	2-5 min	1x
Denaturierung	95°C	15-30 s	25-40x
Elongation	68-75°C	1 min per kb	
Finale Elongation	68°C	5-10 min	1x

3-Schritt-Protokoll:

Methoden

Schritt	Temperatur	Zeit	Häufigkeit
Initiale Denaturierung	95°C	2-5 min	1x
Denaturierung	95°C	15-30 s	25-40x
Hybridisierung	Abhängig von Primersequenz	30 s	
Elongation	68-75°C	1 min per kb	
Finale Elongation	68°C	5-10 min	1x

3.1.2 Agarose-Gel-Elektrophorese und Gelextraktion zur Analyse und Auftrennung von Nukleinsäuren

Um Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe aufzutrennen wurde die horizontale Agarose-Gel-Elektrophorese verwendet. Dabei trennen sich die Nukleinsäuren in Abhängigkeit der Dichte des Gels und deren Größe in einem elektrischen Feld auf. Die Visualisierung der DNA erfolgte mittels Ethidiumbromid, welches unspezifisch in DNA interkaliert, und bei einer Wellenlänge von 312nm die Detektion von DNA ermöglicht.

Die Gele wurden durch Erhitzen von getrockneter Agarose (1,5 g), in TAE-Puffer (100 ml pro Gel) erzeugt. Nachdem die Agarose vollständig gelöst war, wurde die Gelrohmasse auf Raumtemperatur heruntergekühlt, mit Ethidiumbromid versetzt (10 µl pro 100 ml Gel) und in Gelschlitten gegossen in denen entsprechende Taschenformen (Peqlab, Erlangen, D) platziert waren.

Die zu analysierenden Proben wurden mit Ladepuffer versetzt, der entweder Bromphenolblau (hoch-molekulare PCR-Produkte) oder Xylencyanol (niedrigmolekulare PCR-Produkte) als Farbstoff enthielt. Zusätzlich zu den Proben wurde auf jedem Gel ein Größenstandard aufgetragen (New England Biolabs, Frankfurt, D) um die Größe des visualisierten Produkts abzuschätzen. Die Elektrophorese fand bei konstant 140 V für 20-45 min statt. Sollten die DNA-Fragmente weiter verwendet werden, beispielsweise für eine Klonierung, so wurden die betreffenden Gelstücke unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA mittels *QiaQuick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Venlo, NL) nach dem Herstellerprotokoll zurückgewonnen. Nach erfolgreicher Extraktion wurde die Konzentration mittels eines Nanodrop Spektrophotometers ND 1000 (Peqlab, Erlangen, D) gemessen und die Reinheit als Quotient aus der Absorption bei 230/260 nm und 260/280 nm bestimmt.

3.1.3 Restriktionsverdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Der Restriktionsverdau dient zum spezifischen Schneiden von DNA mittels sequenzspezifischer Restriktionsendonukleasen. Dabei ist zwischen sogenannten „Sticky

Methoden

End“ und „Blunt End“ Nukleasen zu unterscheiden, die entweder einen einzelsträngigen Basenüberhang zurücklassen oder nicht.

Ein typischer Restriktionsverdau-Ansatz:

Reagenz	Endkonzentration / Volumen
Ausgangs-DNA (cDNA, Plasmid, gDNA)	1 µg
10x Reaktionspuffer (enzymspezifisch)	5 µl
Restriktionsenzym	1-2 units pro Reaktion
Autoklaviertes Wasser	Ad 50 µl

Wurden 2 verschiedene Enzyme verwendet, so wurden die Pufferkonditionen mittels „Double-Digest-Finder“ (NEB, Frankfurt, D) optimiert. Die Inkubation erfolgte 1-2 Stunden bei 37°C und das entstandene Produkt wurde im Anschluss über Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion aufgereinigt (3.1.2)

3.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4-DNA Ligase Reaktion

Die Ligation wurde benutzt um DNA-Fragmente aus einem Restriktionsverdau oder einer PCR in einen Plasmid-Vektor zu translozieren. Dabei wurden verschiedene Verhältnisse von einzubringendem Fragment und Vektor verwendet von 3:1 (Fragment / Vektor) bis 5:1. Ein typischer Ansatz sah wie folgt aus:

Reagenz	Endkonzentration / Volumen
10x T4 Ligase Reaktions Puffer	1,5 µl
DNA-Fragment (geschnitten)	X µl (je nach Verhältnis)
Vektor (geschnitten)	X µl (je nach Verhältnis)
T4 DNA Ligase	0,5 µl
ddH ₂ O	Ad 15 µl

Inkubationszeit war entweder 1-2 Stunden bei 22°C oder über Nacht bei 16°C.

3.1.5 Elektroporation von Plasmiden in *Escherichia Coli*

Hierzu wurden 50 µl elektrokompente DH10B Zellen auf Eis aufgetaut. Diese wurden im Anschluss mit der Plasmid-DNA (100 ng) in eine Küvette (Gene Pulser®, BIO-RAD, München, D) überführt. Nach einem kurzen elektrischen Puls (1,8 kV) (Micro-Pulser®, BIO-RAD, München, D) wurden die Zellen in LB-Medium aufgenommen und 30 Minuten bei 37°C

Methoden

inkubiert. Anschließend folgte die Ausbringung auf LB-Agar-Platten mit einem entsprechenden Selektionsantibiotikum (Ampicillin: 100 µg/ml; Kanamycin: 33 µg/ml; Zeocin® 25 µg/ml). Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C erfolgte die weitere Analyse der angewachsenen Kolonien.

3.1.6 Plasmidpräparation

Wurden durch Elektroporation erfolgreich Kolonien auf LB-Agar-Platten kultiviert, so erfolgte als nächstes eine Produktion des Plasmids in einem größeren Volumen. Hierzu wurden die Plasmidpräparationskits der Firma Qiagen und Life Technologies verwendet (Qiagen Plasmid Midi / Maxi Kit, Qiagen, Venlo, NL) (Life Technologies PureLink™ HiPure Plasmid Midi- / Maxiprep Kit, Life Technologies, Darmstadt, D). Dazu wurden 100 ml bzw. 200 ml LB-Medium mit entsprechender Antibiotikum-Konzentration (Ampicillin 100 µg/ml, Kanamycin 33 µg/ml, Zeocin 25 µg/ml) mit dem entsprechenden Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte anhand des Herstellerprotokolls. Am Ende wurde die Konzentration photometrisch bestimmt (siehe 3.1.2).

3.1.7 DNA-Sequenzierung:

Jedes neu klonierte Plasmid wurde, um mögliche Punktmutationen auszuschließen, sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte bei einem externen Partner (Eurofins Genomics, Ebersberg, D). Hierzu wurden 50-100 ng/µl Plasmid-DNA in 15 µl Gesamtvolumen an die Firma versandt. Die Analyse der Sequenzen erfolgte mit dem Programm MacVector (MacVector, Cary NC, US).

3.2 Methoden der RNA-Analyse

3.2.1 Isolation von RNA aus Zellen und Geweben

Isolation von RNA aus Zellen wurde direkt in der Zellkulturplatte ohne Ablösen der Zellen mit Trypsin mit RNAPure™ (Peqlab, Erlangen, D) durchgeführt, direkt nach dem Protokoll des Herstellers. Die Isolation aus Gewebe (Myokard, Fettgewebe) erfolgte mit tiefgefrorenem Gewebe (-80°C), ebenfalls nach Herstellerangaben. Nach der Isolation wurde die RNA in RNase-freiem Wasser aufgenommen und die Konzentration und Reinheit mittels Nanodrop-Photometer bestimmt (siehe 3.1.2).

3.2.2 Reverse Transkription von cDNA

Die Reverse Transkription von RNA zu cDNA ermöglicht die Untersuchung des mRNA-Gehalts in einem bestimmten Material wie Zellen oder spezifischen Geweben. Dabei wird die

Methoden

RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase (Protoscript II, NEB, Frankfurt, D) in stabilere komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Als Primer für die Bindung des Enzyms wurden Oligo(dT)-Primer (Eurofins Genomics, Ebersberg, D) verwendet, die den Poly-A Schwanz, ein spezifisches Merkmal jeder messengerRNA (mRNA), erkannten. An diesen Primer konnte die Reverse Transkriptase binden und den Gegenstrang zur mRNA synthetisieren. Diese cDNA konnte dann für weitere Analysen, beispielsweise für quantitative RT-PCR, verwendet werden. Ein typischer Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

Reagenz	Masse / Volumen
RNA	100-1000 ng
Oligo(dT)-Primer (10 mM)	1 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
RNAse freies Wasser	Ad 12 µl
Inkubation für 10 Min bei 70°C	
Protoscript II Reaktionspuffer	4 µl
DTT (0,1 M)	2 µl
Muriner RNAse Inhibitor	1 µl
Protoscript II Reverse Transkriptase	1 µl

Inkubationszeit war anschließend 60 min bei 42°C, gefolgt von einer Hitzedenaturierung des Enzyms für 5 Min bei 80°C. Im Anschluss wurde die cDNA noch auf 10 ng/µl verdünnt und entweder sofort weiterverwendet oder bei -20°C konserviert.

3.2.3 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) mittels SYBR Green

Zur Quantifizierung der Polymerase-Kettenreaktion wurde hier die spezifische Bindung des Fluorophors SYBR Green in doppelsträngige DNA ausgenutzt. Damit konnte die Amplifikation eines PCR-Produkts in jedem Zyklus als Anstieg der SYBR Green Fluoreszenz gegenüber einer Referenzfluoreszenz, in unserem Fall ROX, beobachtet werden. Als quantitativer Messwert diente dann der Zyklus bei dem die Fluoreszenz für SYBR Green das erste Mal den Wert für ROX signifikant überstieg. Dieser Wert wird Ct-Wert (cycle threshold) genannt und ist ausschlaggebend für die Quantifizierung mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode bei der die absoluten Mengen der eingesetzten cDNAs der Probe und eines Referenzgens, beispielsweise *Actb*, ins Verhältnis gesetzt werden:

$$\text{Menge an Probe} = 2^{-(\Delta\text{Ct}(\text{Mittelwert-Probe}) - \Delta\text{Ct}(\text{Mittelwert-Referenzgen}))}$$

Reaktionsansatz:

Methoden

Reagenz	Masse / Volumen
cDNA (10 ng/µl)	1 µl
Primer fw / rev (20 pmol/µl)	Je 0,25 µl
SYBR Green Master Mix	4,75 µl
RNAse freies Wasser	Ad 12,5 µl

PCR-Protokoll (StepOne Plus, Applied Biosystems, New Jersey, USA):

Schritt	Temperatur	Zeit	Häufigkeit
Initiale Denaturierung	94° C	10 min	1x
Denaturierung	95°C	15 s	40x
Hybridisierung	58°C	30 s	
Elongation	65°C	15 s	
Finale Elongation	65°C	1,5 min	1x

Als Kontrolle für die spezifische Bindung der Primer wurde am Ende jeder PCR-Reaktion eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt um unspezifische Bindungen auszuschließen.

3.3 Methoden der Proteinanalyse

3.3.1 Erstellung von Lysaten aus kultivierten Zellen und Geweben

Um kultivierte Zellen aufzuschließen wurde das Zellkulturmedium abgezogen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Danach wurde je nach Größe der Zellkulturschale 2%-SDS-Lysepuffer zu den Zellen gegeben und diese anschließend mit einem sterilen Schaber von der Platte gekratzt, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und auf Eis gelagert.

Bei Geweben wurde ausschließlich tiefgefrorenes Gewebe verwendet (-80°C). Diese wurden so schnell wie möglich in ein Reagiergefäß überführt und mit 800 µl 2%-SDS-Lysepuffer versetzt. Nach Homogenisierung des Gewebes mit einem Dispergierer (T 10 basic ULTRA-TURRAX®, IKA, Staufen, D) wurden die Proben auf Eis gelagert bis alle Gewebe homogenisiert waren.

Nun wurde sowohl mit den Gewebs- als auch den Zelllysaten gleichermaßen weiterverfahren. Um noch vorhandene Nukleinsäuren in dem Lysat abzubauen, wurde 1/10 Volumen Benzonase (5%) zu den Lysaten gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiterer Inkubation für 5 Minuten im Ultraschallbad wurde 10 µl Proteinlysate für die

Methoden

Proteinbestimmung abgenommen und der verbleibende Rest entweder direkt für weitere Analysen verwendet oder bei -20°C gelagert.

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe einer kolorimetrischen Methode, der Bicinchoninic Acid (BCA)-Methode. Diese Methode beruht auf einer linearen Entwicklung der Farbintensität in der Probe mit der Proteinkonzentration. Setzt man eine standardisierte Menge an Protein in den Assay ein, so kann man anhand dieser Referenzgeraden die Proteinkonzentration in der entsprechenden Probe bestimmen. Als Kit wurde hierzu der Pierce™ BCA Protein Assay Kit verwendet. Die Reagenzien wurden nach Herstellerprotokoll zusammengegeben und zu den 1:20 in 2%-SDS-Lysepuffer verdünnten Proben pipettiert. Nach 30-minütiger Inkubation erfolgte die Quantifizierung der Absorption bei 562 nm in einem Microplate-reader. (Tecan, Infinite M200, Männedorf, CH). Die Proteinmenge konnte im Anschluss anhand der Referenzgeraden errechnet werden.

3.3.3 Gewinnung von Blutplasma aus Mäusen

Vorbereitend wurden 100 Einheiten (100 U) Heparin in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß vorgelegt. Nach Narkotisierung der Tiere mit Isofluran wurde der Venenplexus am Auginnenwinkel der Tiere punktiert und ca. 100 µl Blut entnommen. Nach sofortigem Invertieren der Proben lagerten die Proben bei Raumtemperatur, bis alle Blutentnahmen durchgeführt waren. Anschließend wurden die Blutproben bei 14000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand (Plasma) wurde abgenommen und auf Eis belassen bis alle Proben behandelt waren und im Anschluss entweder sofort weiter verwendet oder bei -20°C gelagert.

3.3.4 Immunpräzipitation aus murinem Blutplasma und Zellkulturüberstand

Zur spezifischen Präzipitation von Proteinen aus komplexen Mischungen wurde die Methode der Immunpräzipitation verwendet. Hierzu wurde das isolierte Blutplasma 1:10 verdünnt und anschließend mit 10 µg Antikörper versetzt und über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert.

Wurde als Ausgangsmaterial Zellkulturüberstand verwendet, so wurde dieser unverdünnt eingesetzt, aber nach dem gleichen Protokoll wie Blutplasma behandelt. Im weiteren Verlauf wurden die Proben mit 20 µl Dynabeads® Protein G (Life Technologies, Darmstadt, D) versetzt und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBS wurden die verbleibenden Bead-Präzipitate mit Immunoblot-Probenpuffer versetzt (50 µl) und

Methoden

10 Minuten bei 99°C gekocht, um die Proben anschließend nach Größe mit SDS-PAGE auftrennen zu können.

3.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen für Immunoblot oder Proteinfärbung wurden Polyacrylamidgele verschiedener Konzentration verwendet, 8-10% Polyacrylamid für die Detektion von Proteinen mit einer Größe zwischen 50 und 200 kDa und 15% Polyacrylamid für die Auftrennung von kleinen Proteinen im Bereich von 10-20 kDa. Als Detergenz zur Neutralisation differentieller Ladungen der Proteine wurde SDS (Natriumdodecylsulfat) im Lauf- und Ladepuffer verwendet. Alle Gele wurden jeweils mit einem Sammelgel überschichtet. Die Zusammensetzung der Gele war wie folgt:

Methoden

Trenngel:

Reagenz	Volumen für 8%	Volumen für 15%
30% Acrylamid-Bisacrylamid	4,0 ml	7,5 ml
Trenngel-Puffer	3,8 ml	3,8 ml
ddH ₂ O	4,7 ml	1,1 ml
Glycerol (100%)	2,5 ml	2,5 ml
Ammoniumpersulfat (10%)	72 µl	72 µl
TEMED	12 µl	12 µl
Total	15 ml	15 ml

Sammelgel:

Reagenz	Volumen
30% Acrylamid-Bisacrylamid	0,5 ml
Sammelgel-Puffer	1,25 ml
ddH ₂ O	3,2 ml
Ammoniumpersulfat (10%)	48 µl
TEMED	6 µl
Total	5 ml

Nach Zugabe der Katalysatoren der Polymerisation (APS, TEMED) wurde die Gelgrundsubstanz für das Trenngel zügig zwischen zwei vorbereitete Glasplatten mit definiertem Abstand (1,0 oder 1,5 mm) (Mini PROTEAN[®] System, BIO-RAD, München, D) gegeben, die in einem Gestell (BIO-RAD, München, D) fixiert waren und mit Wasser überschichtet wurden. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Wasser entfernt und das Gemisch für das Sammelgel auf das Trenngel pipettiert. Zügig wurde in dieses Sammelgel die gewünschte Form (BIO-RAD, München, D) für die Taschengröße (10 oder 15 Taschen) eingesetzt. Nach vollständiger Polymerisation konnten die Gele entweder unverzüglich verwendet werden oder bei 4°C in feuchten Tüchern für mehrere Tage gelagert werden.

Die vertikale Elektrophorese der Proben fand in Gellaufkammern (BIO-RAD, München, D) statt in denen die Gele fixiert und mit Laufpuffer überschichtet wurden. Die Proben wurden wie in 3.3.1 beschrieben vorbereitet und zwischen 25 und 50 µg pro Probe in die vorbereiteten Taschen geladen. Als Größenstandard wurde zusätzlich eine Proteinleiter (Fermentas, St. Leon-Rot, D) aufgetragen. Die Elektrophorese fand dann in 2 Stufen statt, einer initialen Phase bei konstanten 100 V bis die Proben das Trenngel erreicht hatten, gefolgt von einer zweiten Phase mit konstant 0,03 A pro Gel für ca. 90 Minuten.

3.3.6 Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen

Hierzu wurden zwei Versuchsansätze verfolgt, zum einen eine Silberfärbung und zum anderen eine Zink-Imidazol-Färbung mit dem Zinc Reversible Stain Kit (Life Technologies, Darmstadt, D). Zur Färbung wurden die Gele nach durchgeführter Elektrophorese aus den Glasplatten entfernt und mit den entsprechenden Lösungen inkubiert. Das genaue Protokoll für die Silberfärbung sah wie folgt aus:

Reagenz	Volumen pro Gel	Zeit
Fixierlösung	20 ml	30 Min
Waschen mit ddH ₂ O		3 x 2 Min
Sensitivierlösung	20 ml	2 Min
Waschen mit ddH ₂ O		3 x 10 s
0,1% Silbernitratlösung (4°C)	20 ml	30 Min
Waschen mit ddH ₂ O		3 x 30 s
Entwicklerlösung	20 ml	Bis ausreichend Färbung erreicht
1% Essigsäure	20 ml	Lagerung

Nach der Zugabe von 1% Essigsäure konnte das Gel mehrere Tage bei 4°C gelagert werden. Nach Abschluss der Färbung wurde das Bandenmuster mit Hilfe eines Fotoapparates dokumentiert.

Die Protein-Zink-Färbung wurde nach den Herstellervorgaben durchgeführt (Zinc Reversible Stain Kit (Life Technologies, Darmstadt, D). Nach erfolgreicher Färbung wurde das Bandenmuster gegen einen dunklen Hintergrund fotografisch dokumentiert. Die gefärbten Gele wurden anschließend mit einer Entfärberlösung für 1h bei Raumtemperatur entfärbt und konnten für weitere Analysen, beispielsweise Immunoblot, verwendet werden.

3.3.7 Immunoblot

Nach erfolgter Auftrennung durch Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Millipore, Darmstadt, D) mittels Nass-Blot-Verfahren (BIO-RAD, München, D) übertragen. Dabei werden die aufgetrennten Proteine in einer vollständig mit Transferpuffer gefüllten Kammer in einem elektrischen Feld vom Gel gerichtet auf die Membran übertragen. Die Membran wurde vor dem Einsatz 5 Minuten in 100% Methanol aktiviert. Der Blotvorgang fand bei konstant 0,3 A für 90 Minuten statt. Nach erfolgreichem Übertrag der Proteine auf die Membran wurde diese entweder zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit 10% Milchpulver in Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Im Anschluss wurde der Blockpuffer verworfen und durch eine Verdünnung des primären Antikörpers in 5%

Methoden

Milchpulver in Blockpuffer ersetzt, der entweder 4h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert wurde. Diese Antikörperverdünnung wurde bis zu dreimal wiederverwendet und dazu bei -20°C gelagert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T (0,1% Tween-20 in PBS) folgte eine Inkubation für 1h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper, gerichtet gegen die Wirtsspezies des Primärantikörpers (Verdünnung 1:10000 in PBS-T). Der Sekundärantikörper war mit der Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt, die nach Zugabe eines Chemolumineszenz-Substrats (ECL Plus, Life Technologies, Darmstadt, D), ein durch eine Lumineszenzkamera (LAS 4000 Mini, Fujifilm, Düsseldorf, D) detektierbares Signal aussendete. Die aufgenommenen Signale konnten dann mit Hilfe der Multi Gauge Software (Fujifilm, Düsseldorf, D) ausgewertet und quantifiziert werden.

3.3.8 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) für Chemerin in murinem Plasma

Für die quantitative Bestimmung des Chemerin-Proteingehalts in Plasma wurde Plasma wie in 3.3.3 beschrieben isoliert und in den Assay, 1/100 verdünnt in Versuchspuffer, eingesetzt. Die Bestimmung fand mit dem Mouse Chemerin Quantikine ELISA Kit (R&D Systems Wiesbaden, D) statt. Der Versuch wurde nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt, wobei rekombinantes murines Chemerin in verschiedenen Verdünnungen als Standard mitgemessen wurde. Im Einzelnen wurde zuerst das verdünnte Plasma 2 h auf der mit dem Fangantikörper beschichteten Platte bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 5-maligem Waschen wurde für 2 h das Antikörper-Enzym-Konjugat zugegeben. Nach Abschluss weiterer 5 Waschschriffe und 30-minütiger Inkubation mit der Substratlösung konnte die Absorption der Lösung bei 450 nm mit einer Wellenlängenkorrektur bei 540 nm gemessen werden. Die Absorption in diesem Wellenlängenbereich war dabei direkt proportional zur Proteinmenge und konnte durch Korrelation zur Standardkurve absolut quantitative Werte für Chemerin liefern.

3.4 Zellkultur

3.4.1 Kultivierung von Zellen

Alle Zelllinien wurden, wenn nicht anders beschrieben, in DMEM-basierten Medien bei 37°C und 5% CO₂ in befeuchteten Inkubatoren kultiviert. Die Zellen wurden auf Zellkulturschalen (TC-Schalen, Sarstedt, Nürnberg, D) angezogen. Zur Passagierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,05% Trypsin-EDTA (Life Technologies, Darmstadt, D) abgelöst. Nach erfolgreicher Vereinzlung wurden die Zellen in Zellkulturmedium aufgenommen und in entsprechender Zellzahl auf Zellkulturschalen verteilt. War eine Lebend- / Tod-Färbung notwendig, so wurde diese mit Trypanblau durchgeführt. Die Zellzahl

Methoden

wurde mit Hilfe eines automatisierten Zellzählgeräts (Countess, Life Technologies, Darmstadt, D) bestimmt.

3.4.2 Phospholipase C Verdau auf PI16 transfizierten Zellen

Hierzu wurden stabil mit PI16 transfizierte HEK293-Zellen 48 h kultiviert. Nach Sammlung des Zellkulturmediums und 2-maligem Waschen mit kaltem PBS wurden die Zellen 20 Minuten mit einer Einheit (1 U) Phospholipase C (PI-PLC, Life Technologies, Darmstadt, D) in entsprechendem Volumen an PBS inkubiert. Dieser Überstand wurde im Anschluss abgenommen und für die Analyse mittels Immunoblot weiterprozessiert. Die Zellen wurden 2mal mit PBS gewaschen und anschließend lysiert (3.3.1).

3.5 Entnahme von Gewebe und Isolation von primären Zellen

3.5.1 Entnahme von Geweben aus Mäusen

Für die Entnahme von Geweben wurden die Mäuse mittels zervikaler Luxation getötet. Anschließend wurde das Gewebe explantiert und je nach weiterer Analyseform in unterschiedlicher Form weiterprozessiert.

Für eine Einbettung in Cryomatrix und Cryoschnitte mit anschließender Immunfluoreszenzfärbung wurden die Gewebe in 30% Saccharose über Nacht bei 4°C auf einem Rollenschüttler inkubiert. Sollten die Gewebe immunhistochemisch prozessiert werden beispielsweise für H&E- oder Sirius Red / Fast Green-Färbung so wurden sie umgehend nach Explantation in 4% Paraformaldehydlösung gegeben und in dieser über Nacht bei Raumtemperatur fixiert.

Sollte aus den Geweben RNA oder Protein gewonnen werden, wurden die Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur weiteren Verwendung auf -80°C gelagert.

3.5.2 Isolierung von kardialen Myozyten und Nicht-Myozyten aus adultem Mausmyokard

Adulte Kardiomyozyten und Nicht-Myozyten wurden aus Mäusen verschiedener Genotypen gewonnen. Vor der eigentlichen Prozedur wurde den Mäusen ein Gemisch aus 50 µl Heparin und 250 µl 0,9%iger Kochsalzlösung gespritzt.

Nach Verabreichung dieser Lösung wurden die Tiere mit einer intraperitonealen Injektion von Ketamin (12 mg/kg) und Xylazin (80 mg/kg) anästhesiert und die Herzen entnommen. Im Anschluss wurde die Aorta des explantierten Herzens kanüliert und die Koronararterien retrograd 3 Minuten mit Perfusionspuffer und anschließend für weitere 28 Minuten mit Verdauungslösung bei einer Flussrate von 2,5 ml/min perfundiert. In der Folge wurden

Methoden

makroskopisch die verbleibenden Blutgefäße und die Vorhöfe entfernt und der Ventrikel mit Hilfe einer Schere mechanisch zerkleinert. Nach Zugabe von 15 ml P1-Puffer wurden die Zellen aus den Gewebstücken durch auf- und abpipettieren vereinzelt. Die Zellsuspension wurde anschließend durch einen Zellfilter (100 µm, BD, Heidelberg, D) filtriert und 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert, wodurch sich die Kardiomyozyten absetzen konnten. Da sich noch nicht alle Myozyten abgesetzt hatten, wurde der verbleibende Überstand noch zentrifugiert (55 x g, 1 min), um die restlichen Kardiomyozyten zu gewinnen. Diese wurden dann mit dem Sediment vereinigt und in Puffer P2 gelöst. Es folgte eine Kalzium-Rekonstitution in mehreren Schritten (2x 50 µl 10 mM CaCl₂, 100 µl 10 mM CaCl₂, 30 µl 100 mM CaCl₂, 50 µl CaCl₂; mit jeweils 4-minütiger Inkubation zwischen den Zugaben) bis zu einer finalen Konzentration von 100 µM im Puffer. Nach einer weiteren Sedimentation (10 min bei 37°C im Wasserbad) und anschließender Zentrifugation (55 x g, 1 min) des Überstands wurden die Zellpellets in Pre-Plating-Medium aufgenommen und für 1-2 Stunden bei 37°C und 1% CO₂ im Inkubator belassen, bevor sie in Plating-Medium überführt wurden.

Wurden die Kardiomyozyten direkt für RNA oder Proteinisolation verwendet, so wurden die Pellets direkt nach der ersten Sedimentation und Pelletierung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Die weiteren Zellfraktionen neben den Myozyten wurden aus dem Überstand nach dem ersten Pelletierungsschritt gewonnen. Hierzu wurde der Überstand für 5 Minuten bei 250 x g zentrifugiert und das entstehende Pellet in 10% FCS-Medium für Fibroblasten aufgenommen und auf eine 10 cm Zellkulturschale ausplattiert oder direkt für die FACS-Isolation verwendet. Nach 2 h im Inkubator bei 37°C und 1% CO₂ wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen um Kontaminationen zu entfernen und entweder direkt schockgefroren für RNA- oder Protein-Isolation, oder bis zu 7 Tage in 10% FCS-Medium bei 37°C / 1% CO₂ kultiviert.

3.5.3 Isolierung von Leukozyten aus peripherem Blut

Neben der Gewinnung von Blutplasma wurden aus Vollblut auch murine Leukozyten gewonnen und untersucht. Analog zur Plasmagewinnung (3.3.3) wurde Blut aus dem Venenplexus hinter dem Auge der Mäuse gewonnen und bei Raumtemperatur gelagert, bis alle Blutproben abgenommen waren. Die Pelletierung der Leukozyten erfolgte durch Zentrifugation (400 x g, 10 min) des mit Heparin antikoagulierten Bluts. Es wurden Protokolle mit und ohne Lyse der Erythrozyten-Fraktion (hypotoner Erythrozyten-Lyse-Puffer) benutzt und die Zellen im weiteren Verlauf für Durchflusszytometrie-Experimente verwendet.

3.6 Kardiovaskuläre Phänotypisierung von Mäusen

3.6.1 Funktionelle Untersuchung des Herzens mittels Echokardiographie

Für die Untersuchung mittels Echokardiographie wurden die Tiere mit einer Mischung aus 4% Isofluran und 96% Sauerstoff anästhesiert und auf einer Wärmeplatte mit 40°C fixiert. Nach dem Einschlafen der Mäuse wurde die Konzentration an Isofluran auf 1-2% verringert. Zur Untersuchung wurde das Ultraschallgerät Vevo 770 (Visualsonics, Ontario, CA) verwendet. Anschließend wurde auf den rasierten Brustkorb der Mäuse Ultraschallgel und der Ultraschallkopf parasternal aufgesetzt. Im sogenannten B-Mode wurde die lange Achse des linken Ventrikels dargestellt, anschließend der Schallkopf um 90° gedreht und die kurze Achse des Ventrikels im M-Mode vermessen. Aus diesem Echokardiogramm konnten dann folgenden Parameter herausgelesen bzw. berechnet werden, getrennt nach Systole (s) und Diastole (d): *interner Durchmesser des linken Ventrikels (LVID d/s)*, *interner Durchmesser des rechten Ventrikels (RVID d/s)*, *intraventrikuläres Spetum (IVS d/s)* und *links-ventrikulärer Durchmesser der Hinterwand (d/s)* als direkte Parameter und *Verkürzungsfraktion (FS)* und *Ejektionsfraktion (EF)* als daraus errechnete funktionelle Parameter der Herzfunktion.

3.6.2 Das Krankheitsmodell der transversalen Aortenkonstriktion (TAC)

Das Experiment wurde mit 8 Wochen alten Tiere verschiedener Genotypen durchgeführt. Sie wurden durch Inhalationsnarkose mit 4% Isofluran / 96% Sauerstoff initial narkotisiert und auf einer Wärmeplatte mit 40°C fixiert. Nach Einleitung der Narkose wurde die Konzentration von Isofluran auf 1-2% reduziert. Anschließend wurde der Thorax auf Höhe der zweiten Rippe geöffnet (Thorakotomie) und die Aorta transversa vom Thymus und umliegendem Fettgewebe frei präpariert. Die Konstriktion erfolgte durch Anlegen einer 27 Gauge (G) Kanüle mit abgerundetem Ende an die Aorta und Konstriktion mit einem 7-0 Nylonfaden mit 2 Knoten bis zu einem vollständigen Schluss des Blutflusses in dem Gefäß. Anschließend wurde die Kanüle wieder entfernt, wodurch sich der Durchmesser der Aorta auf ca. 0,4 mm verringert hatte. Bei Tieren die einer Kontrolloperation (SHAM) unterzogen wurden, wurde ebenfalls der Thorax eröffnet und die Aorta präpariert, nur die Konstriktion fand nicht statt. Es wurden sowohl vor, als auch 2 bzw. 4 Wochen nach der Operation funktionelle Daten zur Herzfunktion mittels Echokardiographie erhoben.

3.6.3 Krankheitsmodell der permanenten Koronararterienligation (Myokardinfarkt (MI))

Beim Krankheitsmodell des Myokardinfarkts handelt es sich um ein Modell, welches kardiales Remodelling, Inflammation und Heilungsprozesse nach akuter Ischämie des Myokards abbildet. Die initiale funktionelle Studie fand in Kooperation mit der AG molekulare und

Methoden

translationale Kardiologie an der MHH Hannover statt. Hierzu wurden die Mäuse wie in 3.6.2 beschrieben anästhesiert und intubiert. Dann wurde der Thorax geöffnet und der Perikardsack möglichst vorsichtig aufgeschnitten, um die Koronararterien und die Herzoberfläche sichtbar zu machen. Die Ligation der linken, absteigenden Koronararterie (LAD) erfolgte mit einem 8-0 Prolene Faden (Ethicon, Norderstedt, D) mit einem einzigen Knoten. Der Erfolg der Ligation wurde optisch durch ein Abblenden des Myokardgewebes distal der Ligationstelle kontrolliert. War dieser Test positiv wurde der Thorax wieder verschlossen und die Maus extubiert und aus der Narkose erweckt. Die Zeit bis zur vollständigen Remission der Narkose verbrachte die Maus erneut auf einer Wärmeplatte (40°C) um ein etwaiges Auskühlen zu verhindern. Ähnlich zum Vorgehen beim Modell der Aortenkonstriktion wurden auch bei diesen Mäusen vor, sowie 7 und 28 Tage nach der Operation funktionelle Daten zur Herzfunktion mittels Echokardiographie erhoben.

3.6.4 Histologische Bestimmung der Infarktgröße

Neben der funktionellen Charakterisierung des Infarkts mittels Echokardiographie wurden die nach 28 Tagen Ligation der LAD entnommenen Herzen auch histologisch untersucht. Hierzu wurden Kryoschnitte des linken Ventrikels nach Myokardinfarkt mit Sirius Rot / Fast Green gefärbt um die Infarktnarbe sichtbar zu machen. Diese Herzschnitte wurden als Ganzes mit einem automatisierten Mikroskopiesystem (AxioObserver.Z1, Zeiss, Oberkochen, D) aufgenommen. Anschließend wurde der Endokardumfang und der Anteil des Endokardumfangs mit Infarktnarbe mit der Image J Software quantifiziert und daraus ein Quotient (Infarktnarbe / Endokardumfang) berechnet. Diese Messung wurde bei jedem Infarkttherz an drei definierten Positionen durchgeführt, aus dem ein Mittelwert für die Quantifizierung gebildet wurde.

3.7 Histologische Untersuchungen

3.7.1 Immunfluoreszenzfärbung von kultivierten Zellen

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden sowohl transfizierte Zelllinien als auch primäre Zellen wie kardiale Fibroblasten verwendet. Diese wurden entweder auf Glas-Coverslips in Zellkulturschalen oder in 96-well Platten mit optisch aktivem Boden (μ -Plate, Ibidi, Martinsried, D) kultiviert. Zur Färbung erfolgte eine Fixierung der Zellen für 10 Minuten mit 4% PFA bei Raumtemperatur. Nach 3-maligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 0,2% Triton X-100 in PBS für weitere 5 Minuten inkubiert und anschließend erneut 3mal mit PBS gewaschen. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu blockieren, wurden die fixierten Zellen im Anschluss mit 10% Ziegen Serum (Serum aus der Spezies des Wirts des Sekundärantikörpers) für 1 h bei RT inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurden die

Methoden

Antikörperverdünnungen, jeweils in 10% Ziegen Serum in PBS, zu den Zellen gegeben und entweder 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen folgte die Sekundärantikörperverdünnung in PBS (1:200), die auch DAPI als Kernfarbstoff enthielt (1:200). Um unspezifisch bindende Antikörper abzuwaschen, wurde im Anschluss an die 60-minütige Inkubation erneut dreimal mit PBS gewaschen und die Zellen dann entweder mit Einbettmedium überschichtet (Coverslips) (Vectashield®, Vector Labs, Peterborough, UK), oder in den 96-well Platten mit 50% Glycerol überschichtet und bei 4°C gelagert.

3.7.2 Immunfluoreszenzfärbung von Gewebe

Zur Immunfluoreszenzfärbung von Myokardgewebe wurden Cryoschnitte aus fixierten Mauseherzen angefertigt. Dazu wurden die explantierten Herzen über Nacht in 30% Saccharose in PBS inkubiert und anschließend in Cryomatrix (OCT Cryomatrix, Thermo Scientific, Braunschweig, D) eingebettet. Nach Anfertigung von 5 µm Schnitten mit Hilfe eines Kryotoms und dem Aufziehen der Schnitte auf Objekträger (SuperFrost Ultra Plus®, Thermo Scientific, Braunschweig, D) folgte eine 30-minütige Auftauphase gefolgt von der Fixierung, entweder mit 4% PFA für 10 min bei Raumtemperatur oder mit Aceton bei -20°C, ebenfalls für 10 Minuten. Wurden die Proben mit PFA fixiert, so war eine Permeabilisierung notwendig (5 min mit 0,2% Triton X-100 in PBS), bei Acetonfixierung war dieser Schritt obsolet. Im weiteren Verlauf wurde bei der Färbung wie bei der Färbung von kultivierten Zellen verfahren (3.7.1) und am Ende ebenfalls mit Einbettmedium überschichtet (Vectashield®, Vector Labs, Peterborough, UK). Für Ko-Färbungen wurden die Sekundärantikörper immer so gewählt, dass die Emissionsspektren möglichst klar voneinander getrennt waren und dadurch der Übersprung in den jeweils anderen Detektionskanal minimiert wurde.

3.7.3 Immunhistochemische Färbung in explantierten Organen

Die immunhistochemische Untersuchung von verschiedenen Mausorganen fand in Kooperation mit der Pathologie am Helmholtz Zentrum München statt. Hierzu wurden 8-10 Wochen alte, anästhesierte Mäuse mit 20 ml 4% PFA in PBS perfundiert. Dies erfolgte durch Kanülierung des linken Ventrikels mit einer 20 G Kanüle und das Eröffnen des rechten Ventrikels. Die Mäuse wurden so lange mit einem Druck von ca. 100 mmHg perfundiert, bis die Organe abblassten. In der Folge wurden die Organe noch über Nacht in 4% PFA immersionsfixiert.

Die Färbung fand im Anschluss, nach Paraffineinbettung und Erstellung von 2 µm Schnitten, in einer automatisierten Färbeapparatur (Discovery® Xt, Roche, Mannheim, D) statt. Dabei wurde der Antikörper gegen PI16 in einer Konzentration von 1:500 eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Hitze-induzierte Antigen-Renaturierung verwendet (EDTA pH = 8).

Methoden

Als Gegenfärbung diente entweder die Hämatoxylin & Eosin-Färbung (H&E), die das Zytoplasma rosa und die Nuklei blau erscheinen lässt (3.7.4), oder eine Gomori-Masson-Färbung, die den unspezifischen Hintergrund im Zytoplasma des Gewebes deutlich verringerte und vor allem für die Färbung von P116 im erkrankten Gewebe verwendet wurde. Bei dieser Färbung erscheint das Zytoplasma der Muskelzellen rot und Kollagenfibrillen blau.

3.7.4 Hämatoxylin & Eosin (H&E) und Sirius Rot & Fast Green Färbung

Hämatoxylin und Eosin (H&E) sowie die Sirius Rot / Fast Green Färbung für die Visualisierung von extrazellulärer Matrix wurden auf 5 µm Paraffinschnitten gefärbt. Diese wurden folgendermaßen erstellt: Die explantierten Mausherzen wurden 24 h bei RT auf einem Rollenschüttler inkubiert und in der Folge dreimal mit PBS gewaschen. In einem automatisierten Spin Tissue Processor (STP 120, Thermo Scientific, Braunschweig, D) wurde anschließend eine Ethanolreihe steigender Konzentration (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 2 x 100%; jeweils 2 h) durchlaufen, gefolgt von Roti-Histol (2 x 2 h) und flüssigem Paraffin (2 x 2 h). Nach dieser Prozedur wurden die Herzen in Paraffinblöcke gegossen und mit einem Mikrotom (HM 335 E, Microm, Walldorf, D) 5 µm dicke Schnitte erstellt, die auf Polylysin beschichtete Objektträger (Thermo Scientific, Braunschweig, D) aufgezogen und getrocknet wurden (42°C).

Vor den Färbungen wurden die Schnitte mit Toluol entparaffiniert (2 x 10 min) und in einer Ethanolreihe mit absteigender Konzentration rehydriert (2 x 100%, 90%, 70%, 50%, ddH₂O; jeweils 5 min).

Die Färbung mit Hämatoxylin & Eosin diente zur morphologischen Untersuchung der Gewebe und als Gegenfärbung zur Immunhistochemie. Bei dieser Färbemethode erschien das Zytoplasma rosa und die Zellkerne blau. Die Färbung begann mit rehydrierten Paraffinschnitten, die in einer Hämatoxylin-2-Lösung inkubiert wurden (2 min) und anschließend 3mal mit Leitungswasser gewaschen wurden (10 s, 30 s, 2 min). Im nächsten Schritt wurden die Schnitte 10 s mit Clarifier-2 inkubiert und anschließend 60 s in Wasser getaucht. Anschließend folgte ein Bad in Bluing Reagent (30-60 s), gefolgt von einem erneuten Waschschrift (60 s). Nach einem finalen Färbeschrift in Eosin-Lösung (1 min) wurden die Proben erneut 10 s in Leitungswasser gewaschen und im Anschluss in einer aufsteigenden Ethanolreihe (80% 30 s, 100% 1 min) und Toluol (3 min) dehydriert. Die Konservierung der Färbung erfolgte mit Depex, welches über Nacht bei Raumtemperatur aushärtete.

Für die Quantifizierung von Bindegewebe innerhalb des Myokards und zur Infarktgrößenbestimmung wurde die Sirius Rot & Fast Green Färbung verwendet. Diese Färbung lässt zelluläres Zytoplasma grün und interstitielles Bindegewebe rot erscheinen. Zur

Methoden

Färbung wurden auch hier, wie für H&E, rehydrierte, entparaffinierte 5 µm Schnitte verwendet. Diese wurden für 60 min in vorgewärmte Bouin's Lösung (58°C) gegeben. Nach einem Waschschrift (10 min) folgten 0,1% Fast Green-Lösung (30 min), 1% Essigsäure (1 min) und erneutes Waschen mit Wasser (5 min). Nach dem finalen Färbeschrift mit Sirius Rot-Lösung (0,01%, 30 min) und Dehydrierung wurden die Proben, wie für H&E beschrieben, mit Depex konserviert.

3.7.5 Erstellung von mikroskopischen Aufnahmen

Für die Quantifizierung von interstitieller Fibrose, Infarktgröße und Leukozyteninvasion wurden mikroskopische Aufnahmen des gesamten linken Ventrikels erstellt. Hierzu wurden mit dem automatisierten Mikroskopiesystem AxioObserver.Z1 (Zeiss, Oberkochen, D) und einem 10-fach Objektiv Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen erstellt, die dann im Anschluss mit der Metamorph[®] Software (Molecular Devices, Sunnyvale CA, US) zu einem Übersichtsbild zusammengefügt wurden. Dieses Bild konnte dann im Anschluss entweder mit der Metamorph oder der Image J Software untersucht und quantifiziert werden.

Die Immunfluoreszenzaufnahmen für die Kolokalisationsstudie und die intrazelluläre Distribution wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica TCS SP5 Confocal Laser Scanning Microscope, Leica Microsystems, Mannheim, D) aufgenommen.

3.8 Durchflusszytometrie / Zellsortierung

3.8.1 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie (FACS)-Experimente wurden in Kooperation mit dem Institut für Immunologie der TU München und der German Mouse Clinic am Helmholtz Zentrum München-Neuherberg durchgeführt. Dazu wurden aus Tieren verschiedener Genotypen Leukozyten isoliert (3.5.3). Für jede Messung, die in Triplikaten durchgeführt wurde, wurden Leukozyten aus 20 µl Vollblut verwendet, die nach 2-maligem Waschen 20 Min bei Raumtemperatur mit Fc-Block inkubiert wurden. Nach weiterem 2-maligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Antikörper-Gemische, ebenfalls verdünnt in FACS-Puffer, zugegeben. Die gekoppelten Fluorophore und Zielproteine sind in der Tabelle mit dem jeweiligen Detektionskanal dargestellt:

Kanal (Filterset)	Fluorophor	Zielprotein Hauptpopulationen	Zielprotein Subpopulationen
FL-1	FITC	CD11c	CD44
FL-2	PE	NK1.1 / NKp46	γδ TCR
FL-3	PE-TR	CD3	PI

Methoden

FL-4	PECp Cy5.5	Ly6C	Ly6C
FL-5	PECy7	CD19	CD62L
FL-6	APC	CD5	CD25
FL-7	A700	CD45	CD45
FL-8	APC-A750	B220	CD8
FL-9	eF450	CD116	CD5+CD3
FL-10	PO/bu570	Ly6G	CD4

Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen 2mal mit FACS-Puffer gewaschen und danach in 40 µl FACS-Puffer für die Messung im Durchflusszytometer (Gallios™ 10 Farben, 4 Laser, Beckman Coulter, Krefeld, D) aufgenommen und dort vermessen. Die Analyse der Rohdaten erfolgte mit der FlowJo Software (FlowJo, Ashland OR, US).

3.8.2 Fluoreszenz-aktivierte-Zellsortierung

Die Zellsortierung wurde mit Hilfe des S3™ Cell Sorters (Bio-Rad, München, D) und Antikörpern gegen zelltypspezifische Oberflächenmarker durchgeführt. Die Zellen wurden durch Verdau des kompakten Myokardgewebes vereinzelt (siehe 3.5.2). Die aufgeteilte Nicht-Myozyten-Fraktion wurde anschließend mit jeweils einem der entsprechenden Antikörper gegen die Oberflächenantigene inkubiert, eine vollständige Liste der verwendeten Antikörper ist unten angehängt. Alle für die Isolation verwendeten Antikörper waren mit dem Fluorophor PE-Cy7 konjugiert, was eine direkte Markierung der Antigene auf den lebendigen Zellen ermöglichte. Die Zellen wurden nach abgeschlossener Färbeprozedur in FACS-Puffer aufgenommen und in den S3™ Cell Sorter geladen. Dort wurden die Zellen anhand Ihrer Granularität und Ihrer Zellgröße (Side und Forward Scatter) vermessen und im Anschluss die Intensität des Signals im FL-4 Kanal (PE-Cy7) gemessen. 50000 Zellen mit einem positiven Signal für PE-Cy7 wurden in 1,5ml Eppendorf-Gefäße sortiert. Negative Zellen für PE-Cy7 wurden als Kontrolle in ein zweites Gefäß verbracht. Im Anschluss erfolgte die Isolation von RNA aus den fraktionierten Zellen.

	Klon	Fluorophor	Konzentration	Hersteller
CD45	30-F11	PE-Cy7	1:100	eBioscience
CD140c	APA5	PE-Cy7	1:100	eBioscience
CD105	MJ7/18	PE-Cy7	1:100	eBioscience

3.9 Aufreinigung von rekombinantem PI16

3.9.1 Erzeugung von stabil transfizierten Zelllinien

Zur Aufreinigung von verschiedenen PI16-Varianten wurden stabil exprimierende CHO-Zellen generiert. Diese wurden durch Transfektion von CHO-Zellen mit Lipofektamin 2000 (Life Technologies, Darmstadt, D) mit anschließender Selektion in Medium mit 0,8 g/l G418 (Life Technologies, Darmstadt, D) erzeugt. Die Selektion der stabil exprimierenden Zellen dauerte zwei Wochen, wobei jeden Tag frisches Medium zu den Zellen gegeben wurde. Nach Ablauf dieser initialen Selektion wurden die noch lebenden Zellen auf mehrere Zellkulturplatten verteilt und für alle weiteren Schritte in Medium mit 0,4 g/l G418 gehalten, um den Selektionsdruck aufrecht zu halten und eine Deletion des Transgens in den Zellen zu verhindern.

3.9.2 Reinigung von rekombinantem PI16 aus Zellkulturüberständen

Wie bereits beschrieben wurden die rekombinanten PI16-Varianten in CHO-Zellen überexprimiert. Für eine Aufreinigung wurden 2 l Zellkulturmedium der entsprechenden Zellkultur verwendet. Die Zellen wurden hierfür in Medium kultiviert, welches 1% IgG-depletiertes FBS (Ultra-low IgG FBS, Life Technologies, Darmstadt, D) enthielt. Dieses mit den PI16-Varianten angereicherte Medium wurde dann mit Hilfe einer Peristaltikpumpe mit einer konstanten Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min bei 4°C über eine mit Protein A beschichtete Sepharosesäule (HiTrap® Protein A 1ml, GE Healthcare, Freiburg, D) gepumpt. Diese war vorher mit 10 ml Bindepuffer gespült worden. Nach dem Durchlauf des Zellkulturüberstands wurde die Säule erneut mit 10 ml Bindepuffer gewaschen. Die Elution erfolgte im Anschluss mit 5 ml 100 mM Glycinlösung (pH = 3,0), welche in Sammelgefäßen mit Neutralisationspuffer sofort auf einen pH-Wert von ca. 7 gebracht wurde, um etwaige Schäden am aufgereinigten Protein zu minimieren. Die Proteinkonzentration wurde anschließend durch Messung Absorption bei 280 nm mittels eines Nanodrop Spektrophotometers (ND 1000, Peqlab, Erlangen, D) durchgeführt.

3.10 Genotypisierung

Zur Genotypisierung von genetisch veränderten Mäusen wurde diesen eine distale Schwanzbiopsie mit einer Länge von ca. 2 mm entnommen. Diese wurde anschließend mit 500 µl Lysepuffer für Phenol/Chloroform-Aufreinigung von genomischer DNA und 10 µl Proteinase K (Fermentas, Life Technologies, Darmstadt, D, 1000 U/ml) versetzt und über Nacht bei 55°C in einem Heizblock bei 900 rpm geschüttelt, bis sich die Biopsie vollständig aufgelöst hatte. Anschließend wurden 500 µl Phenol/Chloroform (Carl Roth, Karlsruhe, D)

Methoden

zugegeben und die Proben 10 min bei RT und 14000 rpm zentrifugiert. Nach erfolgreicher Zentrifugation war eine klare Phasentrennung in eine wässrige, Inter- und Phenol-Phase zu erkennen, wobei die wässrige Phase ca. 60% des Volumens ausmachte. Diese wurde sodann in ein neues Gefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt, was zur Fällung der DNA aus dem Gemisch führte. Nach erneuter Zentrifugation (14000 rpm, 10 min, 4°C) wurden die DNA-Pellets mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (14000 rpm, 5 min, 4°C). Nach diesem Schritt wurden die Pellets bei Raumtemperatur getrocknet, bis kein Ethanol mehr vorhanden war und anschließend in 100 µl Wasser für die PCR-Analyse aufgenommen. Der Nachweis der veränderten Allele erfolgte mit Hilfe einer spezifischen PCR-Reaktion (siehe 3.1.1).

3.11 Proteaseinhibition von Cathepsin K

3.11.1 Inhibition von Cathepsin K durch rekombinantes, aufgereinigtes PI16

Um eine mögliche Proteaseinhibitorfunktion von PI16 nachzuweisen, wurden Versuche mit der Cystein-Protease Cathepsin K in einem kontrollierten *in vitro* Experiment durchgeführt. Hierzu wurde ein chromogenes Substrat (Z-Gly-Pro-Arg-AMC, Peptanova, Sandhausen, D) der Protease zusammen mit dem rekombinanten Enzym und einer entsprechenden Konzentration des Proteaseinhibitors inkubiert und der Anstieg der Absorption bei 350 nm über einen Zeitraum von 30 Minuten in einem Spektralphotometer gemessen.

Im Einzelnen wurde als Positivkontrolle für die Inhibition der Protease der Small-Molecule Inhibitor E-64 (0,1 mM, Sigma-Aldrich, Steinheim, D) verwendet, der vor Zugabe des Substrats 30 min bei 37°C mit der Protease vorinkubiert wurde. Auf die gleiche Weise wurde auch mit den rekombinanten Proteinen für PI16 bzw. Fc verfahren. Nach dieser Inkubation wurde das Substrat zugegeben und unverzüglich mit der Messung begonnen. Als Maß für die Proteaseinhibition wurde der Substratumsatz nach 30 Minuten verwendet und auf den Umsatz ohne Inhibitor normalisiert.

3.11.2 Inhibition von Cathepsin K durch präzipitiertes PI16 aus Zellkulturüberstand

Um die Inhibition der Protease Cathepsin K auch in einem nativen System darzustellen wurde der gleiche Versuch wie in 3.11.1 beschrieben mit nativ präzipitiertem PI16 durchgeführt. Es wurden hierzu stabil-transfizierte CHO-Zellen verwendet, welche PI16-FL-ΔGPI-Fc, PI16-CAP-Fc oder Fc in den Zellkulturüberstand sezernierten. Nach 48 h in Kultur mit Zellkulturmedium ohne IgG wurde der Überstand abgenommen und 20 µl Protein G Dynabeads® (Life Technologies, Darmstadt, D) zugegeben. Nach Inkubation auf einem Schüttler über Nacht bei 4°C wurden die Beads abgetrennt, 3mal mit PBS gewaschen und dann die Bestandteile des Proteaseinhibitionsversuchs (3.11.1) zugegeben und wie

Methoden

beschrieben behandelt. Im Gegensatz zur Messung mit gereinigtem PI16 wurde hier allerdings keine Kinetik gemessen, sondern nur der Substratumsatz nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C, da die Dynabeads® mit dem geladenen PI16-Varianten zur Messung abgetrennt werden mussten und somit zur Messung kein Inhibitor mehr präsent war. Die Präzipitationseffizienz wurde im Anschluss durch SDS-Gelelektrophorese der beladenen Beads und Protein-Zink Färbung (3.3.6) oder Immunoblot (3.3.7) kontrolliert.

3.12 Statistische Analyse der Ergebnisse

Durchschnittswerte wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) dargestellt. Statistische Analysen wurden mit der Software Prism 6.0c (GraphPad, San Diego, USA) durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde bei zwei Gruppen durch einen T-Test ermittelt, bei mehreren Gruppen mit der gleichen Intervention durch einen One-way-ANOVA-Test mit Bonferroni Post-Test und bei mehreren Gruppen mit mehreren Interventionen mit einem Two-way ANOVA Test gefolgt von einem Bonferroni Post-Test. Unterschiede in den p-Werten wurden wie folgt illustriert: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

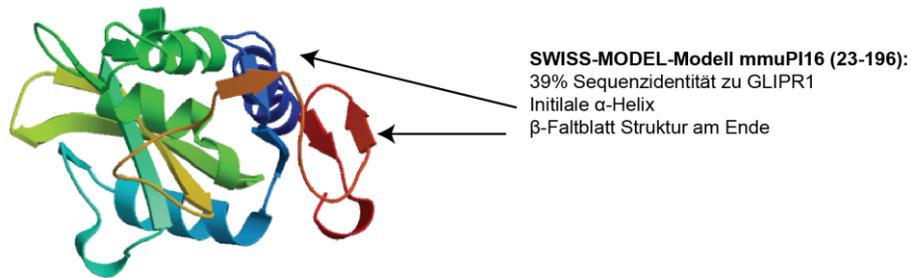
4 Ergebnisse

4.1 Bioinformatische Analyse des murinen PI16-Proteins

PI16 war initial in einem Screening nach sezernierten Faktoren im erkrankten Herzen identifiziert worden⁷¹. Hierbei diente der N-terminale Teil des Proteins, der eine Signalsequenz zur Translokation in den Exportweg der Zelle trägt, als Indikator für die Sekretion des Proteins. Um zu klären ob PI16 ausschließlich sezerniert wird, oder auch zellulär vorliegt, wurden verschiedene bioinformatische Analysen zu posttranslationalen Modifikationen der Proteinsequenz durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass neben der Signalsequenz und der bekannten CAP-Domäne auch eine Erkennungssequenz für die Anheftung eines Glycosylphosphatidylinositol-(GPI-) Ankers im C-terminalen Bereich des Proteins zu finden war (<http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi;>). Bei dieser Modifikation wird der Lipidanker an die terminale COOH-Gruppe des Proteins angehängt, welche bei murinem PI16 das Asparagin an Position 466 darstellte, die folgenden terminalen Aminosäuren gehen bei der Anheftung verloren (**Abbildung 7b**). Neben dieser Erkenntnis lieferte die bioinformatische Analyse auch eine partielle Strukturvorhersage des murinen PI16-Proteins, welche mit dem SWISS-MODEL Algorithmus^{85,86} generiert wurde. Diese Untersuchung zeigte einen hohen Gehalt von α -Helices und β -Faltblättern innerhalb der CAP-Domäne des Proteins und eine vergleichsweise hohe Homologie (39%) zu verschiedenen anderen extrazellulären Proteinen mit CAP-Domänenmotiven, wie beispielsweise GLIPR1 (GLI-pathogenesis related 1) und Proteinen die in Schlangengiften zu finden waren. All diese Proteine weisen eine charakteristische α -helikale Struktur im N-terminalen Bereich und eine β -Faltblattstruktur am C-terminalen Ende der CAP-Domäne auf, welche auch im Modell für murines PI16 beobachtet werden konnte (**Abbildung 7a**). Für den C-terminalen Teil wurde hingegen keine Homologie zu bekannten Proteinen vorhergesagt. Dieses Modell der Proteinstruktur gab somit erste Hinweise auf eine mögliche Funktion von PI16, da für einige der Strukturhomologa bereits funktionelle Erkenntnisse vorlagen, die von Ionenkanalbindung bis zu Proteaseinhibition reichten.

Ergebnisse

A



B

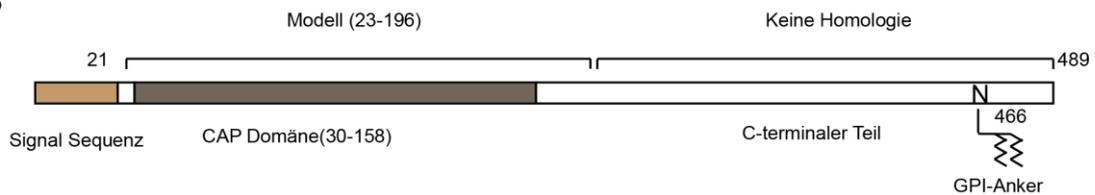


Abbildung 7: In silico Modell des murinen PI16 zeigt partielle Homologie zu GLIPR1: (A) Modell der PI16-Struktur von Position 23-196 wurde mit Hilfe des SWISS-MODEL Algorithmus^{85,86} erstellt und zeigt einen hohen Anteil von α -Helices und β -Faltblättern in dieser stark phylogenetisch konservierten CAP-Domänen-Struktur von PI16 mit initialer α -Helix und terminaler β -Faltblattstruktur. (B) Schematische Darstellung des murinen PI16-Proteins (489 Aminosäuren) mit der Domänenstruktur und der GPI-Anker Anheftungsstelle an Asparagin 466.

4.2 Membranassoziation von PI16

Wie bereits beschrieben, konnte durch bioinformatische Analyse der PI16-Sequenz ein möglicher GPI-Anker am C-Terminus des PI16-Proteins identifiziert werden. Um diese Hypothese experimentell zu überprüfen wurde murines PI16 in Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellen überexprimiert, die anschließend fixiert und mit einem anti-PI16 Exon 5 Antikörper angefärbt wurden, um Membranlokalisierung, neben der bereits bekannten Sekretion ins Zellkulturmedium, von PI16 zu zeigen. Die Signale wurden mit Hilfe eines gegen den anti-PI16-Antikörper gerichteten und mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörpers sichtbar gemacht und in einem konfokalen Mikroskop detektiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass PI16 an der Plasmamembran der Zellen lokalisierte und auch in Vesikel-ähnlichen Strukturen innerhalb der Zellen zu finden war, was auf den stark vergrößerten Aufnahmen der einzelnen Zellen gut zu erkennen war (**Abbildung 8a**). Um zu klären, ob diese Lokalisation auf der Existenz eines GPI-Ankers beruhte, wurden biochemische Versuche mit einem GPI-Anker schneidenden Enzym, der Phosphoinosit-Phospholipase C (PI-PLC), durchgeführt (**Abbildung 8b**). Es zeigte sich hierbei, dass die Gabe von PI-PLC auf intakte, mit PI16 transfizierte HEK293-Zellen zu einer Freisetzung von PI16 von der Zelloberfläche führte, die mittels Immunoblot im Überstand und korrespondierend in der Zellfraktion nachgewiesen werden konnte. Das detektierte Produkt

Ergebnisse

entsprach dabei vom Laufverhalten im SDS-Polyacrylamidgel der PI16-Form, die auch nach 48-stündiger Kultur im Medium nachgewiesen werden konnte (**Abbildung 8b** erste und letzte Spur). Die Quantifizierung des PI16-Signals im Immunoblot in vier unabhängigen Experimenten ($n = 4$) zeigte, dass das Gesamtsignal für PI16 in der zellulären Fraktion nach PLC-Behandlung abnahm, dieses aber in ähnlicher Quantität im Überstand wieder auftauchte.

Ergebnisse

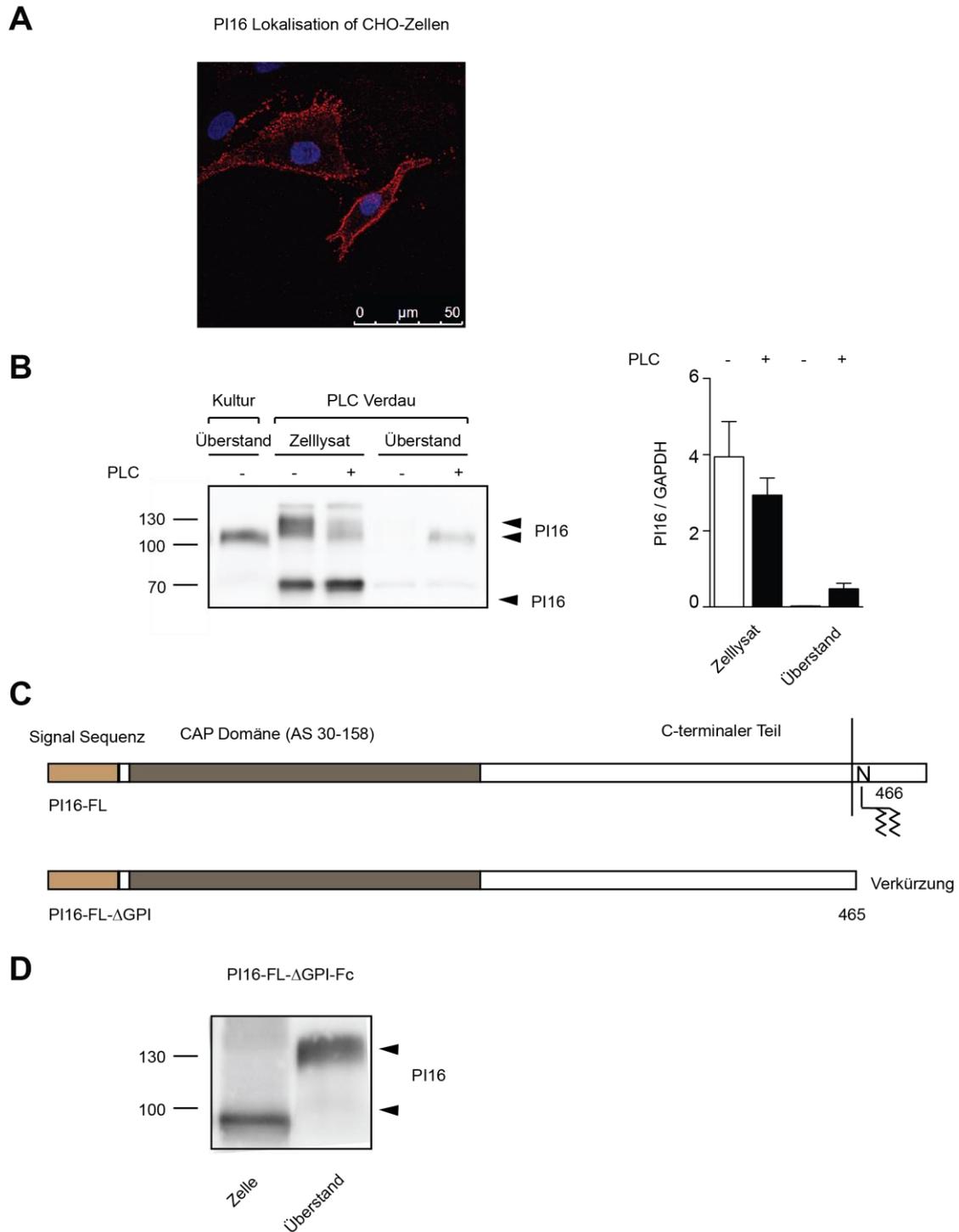


Abbildung 8: PI16 lokalisiert an der Plasmamembran von Zellen durch Anheftung eines GPI-Ankers: (A) Immunfluoreszenz-Färbung von PI16 mit einem PI16-spezifischen Antikörper auf stabil transfizierten CHO-Zellen; (B) Immunoblot-Analyse für PI16 nach Transfektion von HEK293-Zellen mit PI16 und 20-minütiger Behandlung mit Phospholipase C (PLC) (n = 4). (C) Schematische Darstellung der Deletion der GPI-Anheftungsseite. (D) Immunoblot des GPI-deletierten Konstrukts aus transient transfizierten HEK-Zellen (Daten in Teilen in Masterarbeit Sonja Sichler veröffentlicht⁸⁷)

Ergebnisse

Zusätzlich zur enzymatischen Modifikation des GPI-Ankers wurde die *Pi16*-Sequenz auch auf genetischer Ebene verändert, um die Anheftungsstelle in der Aminosäuresequenz einzugrenzen. Hierbei wurde die bioinformatisch identifizierte C-terminale hydrophobe Aminosäuresequenz, die sich für das Anhängen des Ankers verantwortlich zeigte, deletiert (**Abbildung 8c**). Nach Expression dieses trunkierten Konstrukts in HEK293-Zellen war im Immunoblot ein vollständiges Verschwinden der höhermolekularen Banden in den Zelllysaten zu beobachten. Die höchste Bande im SDS-Gel fand sich im Kulturmedium (Überstand), was auf eine ungehinderte Sekretion von PI16 hindeutete (**Abbildung 8d**), die in diesem Konstrukt nicht durch einen GPI-Anker behindert wurde. Diese Versuche klärten so die Identität der höhermolekularen Banden von PI16 in Zell- und Gewebslysaten auf. Die Banden stellten dabei GPI-modifizierte Formen dar, die durch eine verringerte Motilität im SDS-Polyacrylamidgel und damit mit einer vermeintlich höheren molekularen Masse charakterisiert waren.

4.3 Untersuchung der Gewebslokalisierung von PI16 in der Maus

Eine weitere wichtige Fragestellung dieser Arbeit befasste sich mit der Identifikation der Gewebe in denen PI16 im Organismus exprimiert wurde. Um diese Gewebe innerhalb des murinen Organismus zu identifizieren, wurde eine Vielzahl von Organen in einem immunhistochemischen Screening, in Kooperation mit dem Helmholtz Zentrum München, untersucht. Dabei diente die global deletierte *Pi16*^{-/-}-Maus als Kontrolle für eine spezifische Färbung mit dem anti-PI16-Antikörper unter den Versuchsbedingungen. Konkret wurden hierzu Mäuse fachgemäß getötet und unverzüglich mit 4% Paraformaldehyd-Lösung intraventrikulär perfundiert, um den nativen Zustand möglichst gut zu konservieren. Besonderer Fokus bei der Auswahl der zu untersuchenden Organe lag in dieser Untersuchung auf den Drüsen und den Fortpflanzungsorganen der Maus, da in diesen Organen bereits PI16-Funktionen beschrieben waren^{79,80}.

In den Drüsengeweben stellte sich das Bild wie folgt dar: In der Schilddrüse konnte eine Färbung mit dem anti-PI16-Antikörper im Kolloid beobachtet werden. Diese war allerdings auch in der Kontrollgruppe zu sehen, was auf eine unspezifische Färbung hinwies (**Abbildung 9**). In der Analyse der Fortpflanzungsorgane und -drüsen, im Speziellen des Nebenhodens (Epididymis), zeigte sich, dass zwar Signale für PI16 in den Wildtypmäusen zu sehen waren, beispielsweise in den Zilien des Nebenhodens, diese Signale allerdings eine Unspezifität des Antikörpers darstellten, da die Signale auch in den *Pi16*^{-/-}-Tieren lokalisierten. Es bleibt also festzuhalten, dass PI16 sowohl in den untersuchten Fortpflanzungsorganen als auch in der Schilddrüse, in diesem immunhistochemischen Screening, nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte, da die eingesetzten Antikörper eine unspezifische Bindung in diesen Geweben zeigten.

Ergebnisse

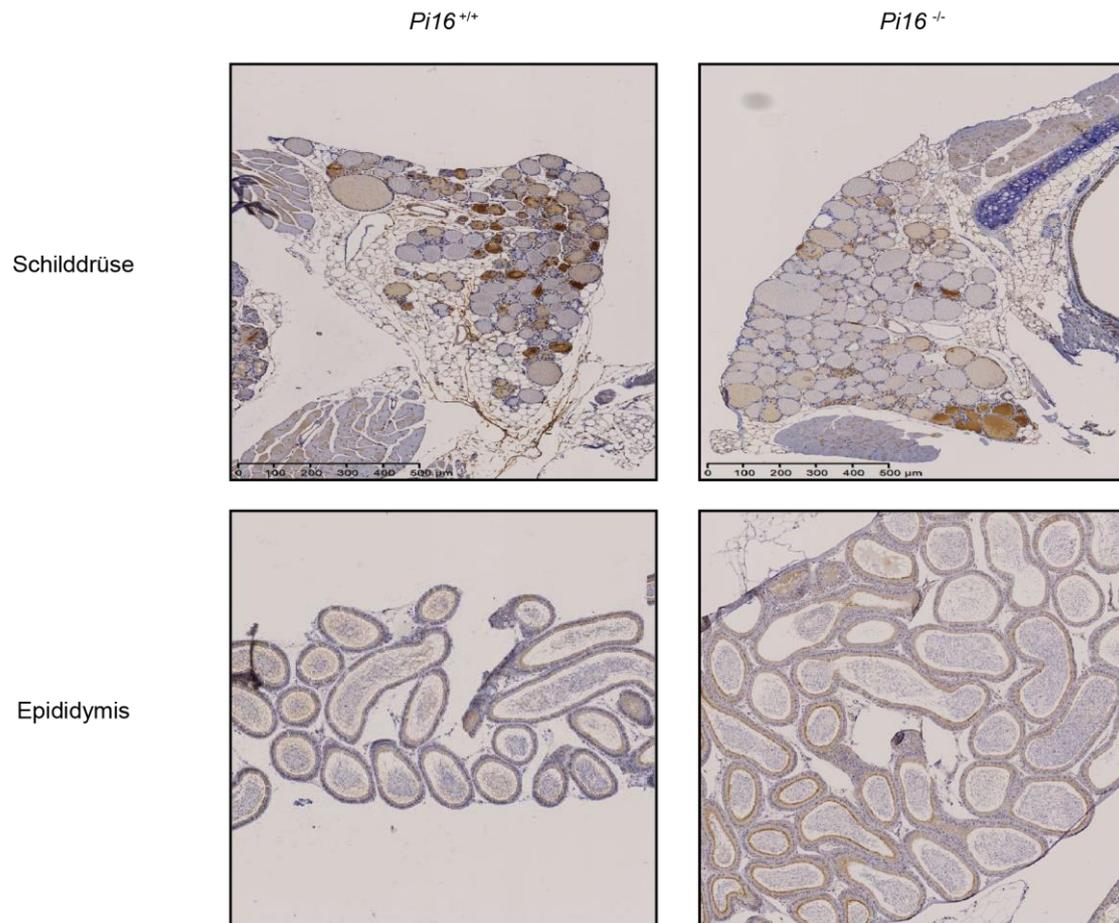


Abbildung 9: PI16-Antikörper zeigt unspezifische Färbungen in der Schilddrüse und im Epididymis: Immunhistochemische Färbung von PI16 auf HE-gefärbten Schnitten der Schilddrüse und des Epididymis von *Pi16^{+/+}*- und *Pi16^{-/-}*-Mäusen (Skalierung 500 µm).

Neben der Untersuchung der Drüsen und Fortpflanzungsorgane wurden auch weitere Organe auf PI16-Lokalisation untersucht, mit besonderem Augenmerk auf die Organe des kardiovaskulären Systems und der Luftwege. Dabei zeigte sich eine spezifische Färbung für PI16 in den größeren Gefäßen der Lunge (**Abbildung 10**), die in den *Pi16^{-/-}*-Mäusen nicht zu beobachten war. Das Signal lokalisierte dabei in den tieferen Schichten der Gefäße und schien nicht diffus im Extrazellulärraum zu liegen, sondern spezifisch Zellen der Gefäße zu markieren. Diese wiesen eine spindelförmige Morphologie auf und könnten somit Fibroblasten der Adventitia der Gefäßwand darstellen.

Betrachtete man nicht krankes Myokardgewebe des linken Ventrikels, so zeigten sich hier ebenfalls zelllokalisierte PI16-Signale, die von der Morphologie her an interstitielle Zellen, beispielsweise Fibroblasten oder Endothelzellen erinnerten. Auch diese Färbung wurde mit der entsprechend genetisch modifizierten Maus kontrolliert (**Abbildung 10**) und damit spezifiziert. Aus diesen Färbungen blieb also festzuhalten, dass PI16 in spindelförmigen

Ergebnisse

interstitiellen Zellen lokalisierte, die sich sowohl in Gefäßnähe in der Lunge, als auch im Interstitium des nicht erkrankten Herzen fanden.

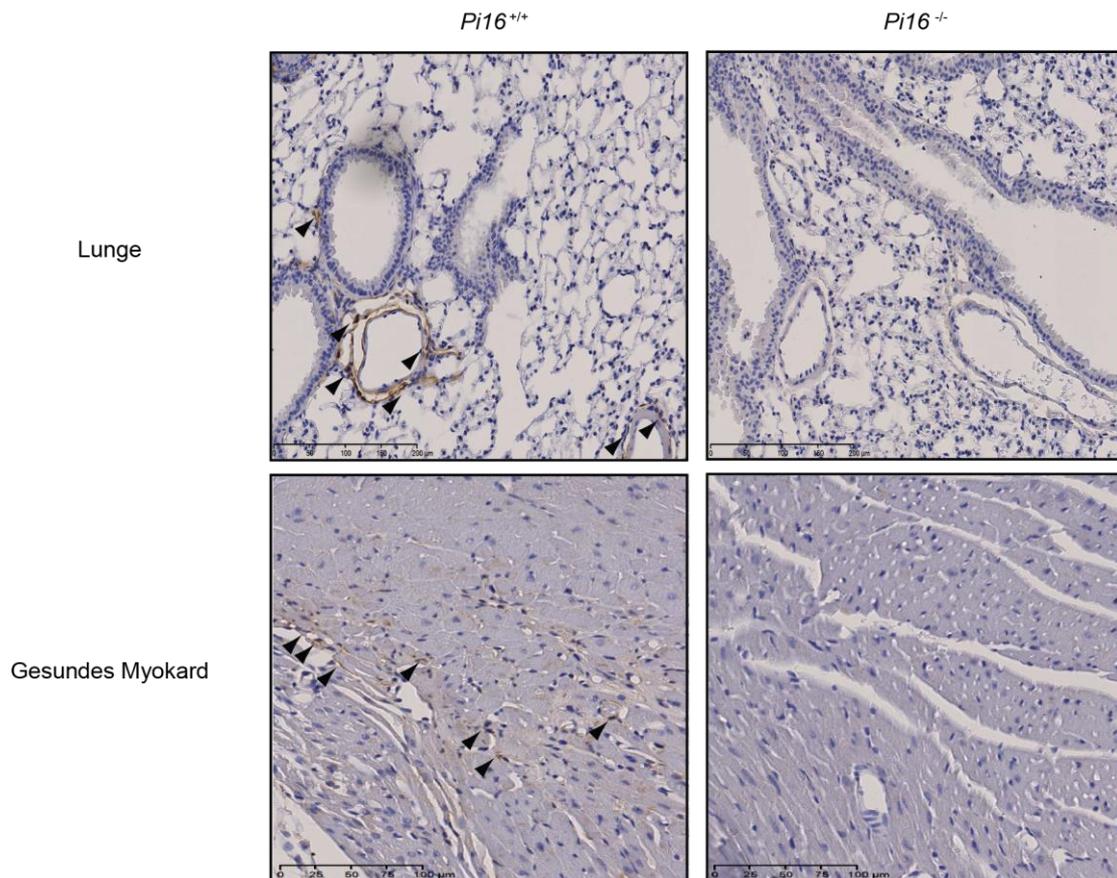


Abbildung 10: PI16 lokalisiert in großen Gefäßen der Lunge und interstitiellen Zellen des Myokards: Immunhistochemische Färbung von PI16 auf HE-gefärbten Schnitten in Lungen- und linkem Ventrikelgewebe von $Pi16^{+/+}$ - und $Pi16^{-/-}$ -Mäusen (Skalierung: 200 µm (Lunge); 100 µm (Myokard))

4.4 PI16 lokalisiert im erkrankten Herz in interstitiellen Zellen

Wie bereits erläutert wurde PI16 als stark hochreguliert im erkrankten Herzen unter thorakaler Aortenkonstriktion (TAC) und in $\beta 1$ -Adrenozeptor-transgenen Mäusen beschrieben (**Abbildung 6c**)⁷¹. Um genauer zu spezifizieren welcher Zelltyp für diesen Anstieg des PI16-Protein- und mRNA-Gehalts verantwortlich zeichnete, wurden TAC-operierte Tiere mit gesunden Tieren in immunhistochemischen Färbungen für PI16 verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Signale für PI16 in den TAC-Tieren, wie in den SHAM-Tieren, in interstitiellen Zellen lokalisierten, sich die absolute Anzahl der positiven Zellen zwischen den Kontrolltieren (SHAM) und den kranken Tieren (TAC) allerdings stark unterschied (**Abbildung 11**). In den TAC-Mäusen konnte eine deutlich erhöhte Anzahl positiver Signale beobachtet werden. Viele dieser Signale befanden sich in den fibrotisch-veränderten Bereichen des kranken Myokards. Diese interstitielle Fibrose tritt erst als Spätfolge im hypertrophen Herzmuskel auf, da durch Sauerstoffminderversorgung und mechanische Schädigung viele Kardiomyozyten zu Grunde

Ergebnisse

gehen und diese Lücke im Anschluss durch Extrazellulärmatrix (EZM) und einwandernde Fibroblasten geschlossen wird.

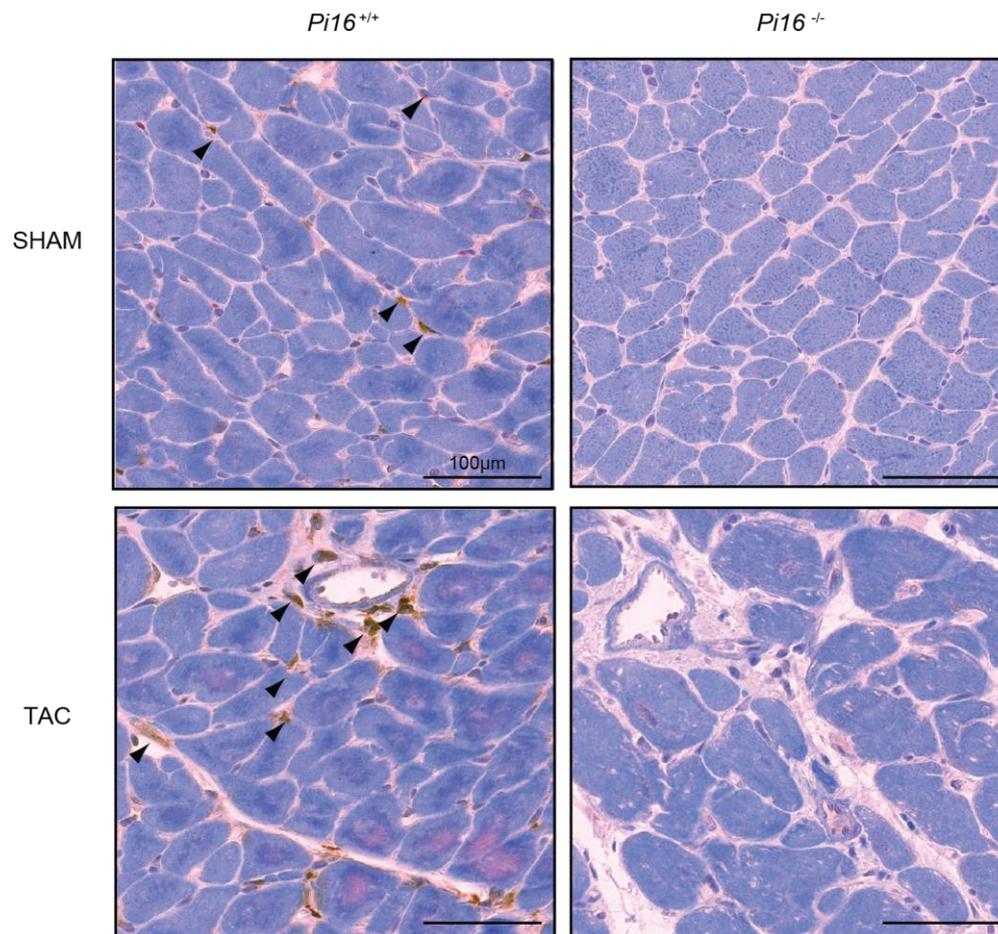


Abbildung 11: PI16 lokalisiert im Myokard in interstitiellen Zellen und zeigt nach TAC ein vermehrtes Signal: Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen PI16 Exon 5 in *Pi16*^{+/+}- und *Pi16*^{-/-}-Mäusen 4 Wochen nach TAC- bzw. SHAM-Operation mit Masson-Gegenfärbung (Skalierung 100 µm).

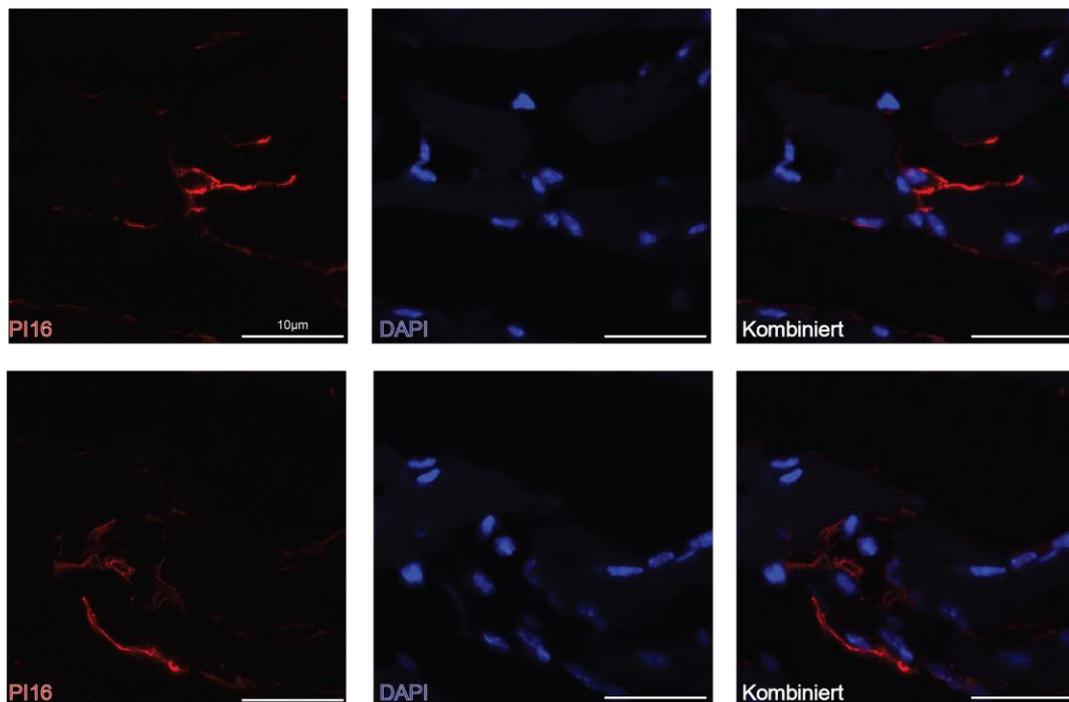
Die Synthese der Proteine dieser EZM findet in aktivierten Fibroblasten, den sogenannten Myofibroblasten statt. Deshalb wurde mittels Immunfluoreszenz die subzelluläre Lokalisation von PI16 im Myokardgewebe mit einer hohen Vergrößerung im Konfokalmikroskop untersucht um den PI16-produzierten Zelltyp enger einzugrenzen. Mittels dieser Methode ließ sich nur das zellassoziierte-PI16 detektieren, das frei im Interstitium liegende PI16 wurde wahrscheinlich bei der Färbeprozedur ausgewaschen, die Färbung stellte also nur einen Bruchteil des nativ präsenten PI16 im Myokard dar. In den Ergebnissen dieser Untersuchung zeigte sich eine membranähnliche Lokalisation von PI16 in interstitiellen Zellen, die sich ähnlich der Lokalisation von PI16 in überexprimierenden Zellen darstellte (vgl. **Abbildung 8**, **Abbildung 12a**).

Um den PI16-exprimierenden Zelltyp innerhalb der Fraktion der interstitiellen Zellen genauer eingrenzen zu können wurden die unterschiedlichen Zelltypen des Myokards mittels

Ergebnisse

Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS) isoliert und anschließend der Gehalt von *Pi16*-mRNA in den isolierten Zellfraktion bestimmt. Dabei zeigte sich eine präferentielle Expression von *Pi16* in kardialen Fibroblasten (PDGFR⁺), die ca. 5mal so hoch war wie in Endothelzellen (CD105⁺), Myozyten oder Leukozyten (CD45⁺) aus dem Myokard (**Abbildung 12b**). Somit bleibt aus diesen Experimenten festzuhalten, dass PI16 im erkrankten Herzen verstärkt in interstitiellen Zellen, genauer in kardialen Fibroblasten, nachzuweisen war und dort membranlokalisiert vorlag. Folglich konnte der kardiale Fibroblast als Hauptproduzent von PI16 identifiziert werden.

A



B

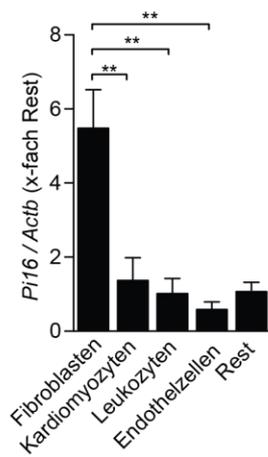


Abbildung 12: PI16 lokalisiert an der Zellmembran von interstitiellen Zellen und wird präferentiell von kardialen Fibroblasten exprimiert: (A) Hohe Vergrößerung (630x) von PI16-positiven Zellen nach IF-Färbung mit anti-PI16 Exon 5 Antikörper in erkranktem Myokard zeigt Membranlokalisation in interstitiellen Zellen (Skalierung 10 μ m). (B) qRT-PCR für *Pi16* in FACS-isolierten Zellfraktionen des Myokards (n = 4-8).

4.5 PI16 in isolierten Primärzellen

Um einen detaillierteren Eindruck der subzellulären Lokalisation von PI16 zu erhalten wurden primäre Fibroblasten aus Rattenherzen isoliert und für 7 Tage in Kultur genommen. Nach Immunfluoreszenzfärbung für PI16, α -SMA (α -Glattmuskelaktin) und DAPI in den fixierten Fibroblasten wurden die Bilder in einem Konfokalmikroskop aufgenommen. Dabei zeigte sich

Ergebnisse

PI16 innerhalb der Zellen stark angereichert an der Plasmamembran. Alle für PI16 positiven Zellen zeigten auch ein Signal für das Strukturprotein α -SMA, was die Befunde aus der Gewebsstudie untermauerte und auf Expression in kardialen Fibroblasten hinwies (**Abbildung 13**). PI16 kam also nicht nur in CHO-Zellen, welche PI16 überexprimierten, sondern auch im nativen System in Zellen die einen Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp zeigten, membranständig vor.

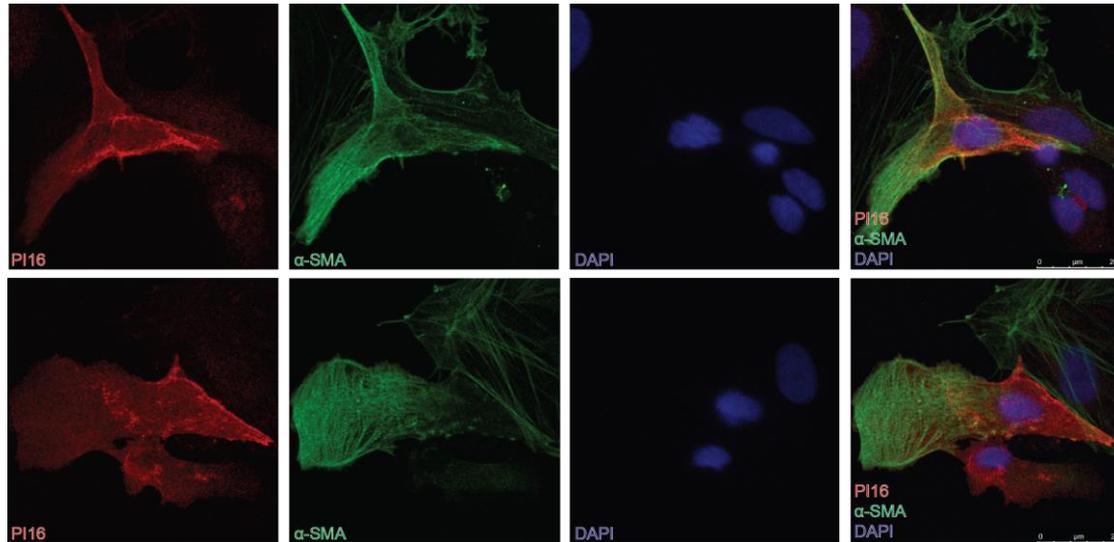


Abbildung 13: PI16 lokalisiert an der Membran von isolierten, aktivierten kardialen Rattenfibroblasten: Immunfluoreszenzfärbung für PI16, α -SMA (α -Glattmuskelaktin) und DAPI in isolierten kardialen Rattenfibroblasten nach 7 Tagen in Kultur (Skalierung 20 μ m).

Ergebnisse

Unterstützend für diesen Befund war auch ein weiteres Experiment, bei dem primäre Zellen aus dem Myokard von Mäusen isoliert wurden. Hierbei wurde eine Myozyten und eine Nicht-Myozyten Fraktion mittels gradueller Zentrifugation aufgetrennt. Die isolierten Populationen wurden im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR auf den Gehalt an *Pi16*-mRNA untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die *Pi16*-mRNA in Nicht-Myozyten deutlich stärker exprimiert war als in der Myozyten-Fraktion, was mit den Ergebnissen aus FACS-isolierten Zellen übereinstimmte (**Abbildung 12**). Dieser Unterschied vervielfachte sich allerdings nach Kultivierung der Nicht-Myozyten für 7 Tage (**Abbildung 14**). Diese Beobachtung unterstrich die Befunde aus den Immunfluoreszenzstudien mit isolierten Fibroblasten, wo eine Ko-Lokalisation von PI16 mit α -SMA gezeigt werden konnte. Denn Fibroblasten, die sich längere Zeit in Kultur befinden, entwickeln einen Myofibroblasten-ähnlichen, sekretorischen Phänotyp.

Es bleibt folglich als Zusammenschau der beschriebenen Experimente festzuhalten, dass PI16 im erkrankten und gesunden Myokard hauptsächlich in Nicht-Myozyten zu finden war, die Marker von aktivierten kardialen Fibroblasten trugen.

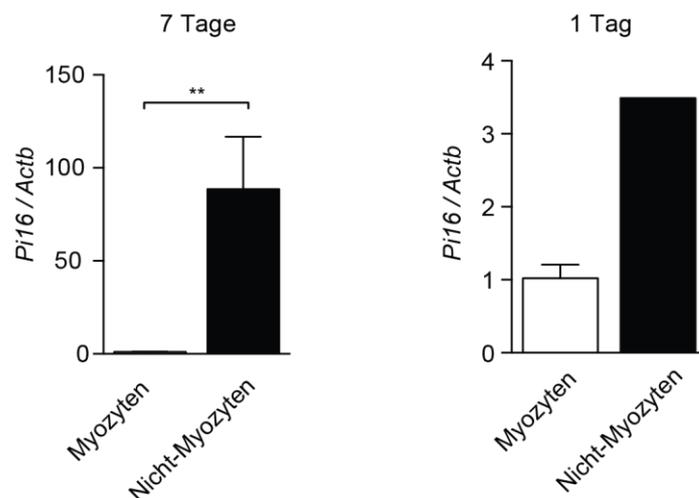


Abbildung 14: *Pi16*-mRNA Expression erhöht sich bei *in vitro* Aktivierung von kardialen Fibroblasten: Quantitative RT-PCR Analyse von *Pi16* in primären Myozyten und Nicht-Myozyten (n = 5) zu verschiedenen Zeitpunkten (1d, 7d) nach Isolation.

4.6 Kardiale Phänotypisierung der global deletierten *Pi16*^{-/-} Mäuse

4.6.1 Genotypisierung der genetisch modifizierten Mäuse

In der Vorgängerarbeit von Jentzsch C (Identifizierung und Charakterisierung funktionell relevanter kardialer Faktoren, 2011⁸⁴) wurden genetisch modifizierte Mäuse generiert, die eine globale Deletion des *Pi16*-Lokus trugen (**Abbildung 6**). Dabei wurden die terminalen Exons 3 und 4 der CAP-Domäne des murinen *Pi16* mittels des Cre / LoxP-Systems global in den Mäusen deletiert (**Abbildung 15**). Die Genotypisierung der Mäuse fand mittels einer

Ergebnisse

PCR mit 3 Primern statt, die komplementär zu Bindestellen upstream von Exon 3 und 4 und downstream von Exon 4 waren (vgl. **Abbildung 15**). Für das Wildtyp-Allel wurden so zwei PCR-Produkte generiert, eines 146 bp lang und ein anderes 1119 bp lang, wobei das lange Fragment aufgrund seiner Länge und der relativ kurzen Amplifikationszeit selten zu sehen war. Das genetisch modifizierte Allel führte zu einer Bande von 341 bp Länge. Durch diese PCR-Reaktion mit anschließendem Auftrag auf ein 1,5% Agarose-Gel konnte zwischen Wildtypmäusen (146 bp), heterozygot-modifizierten (146 und 341 bp) und homozygot-modifizierten Mäusen (341 bp) unterschieden werden.

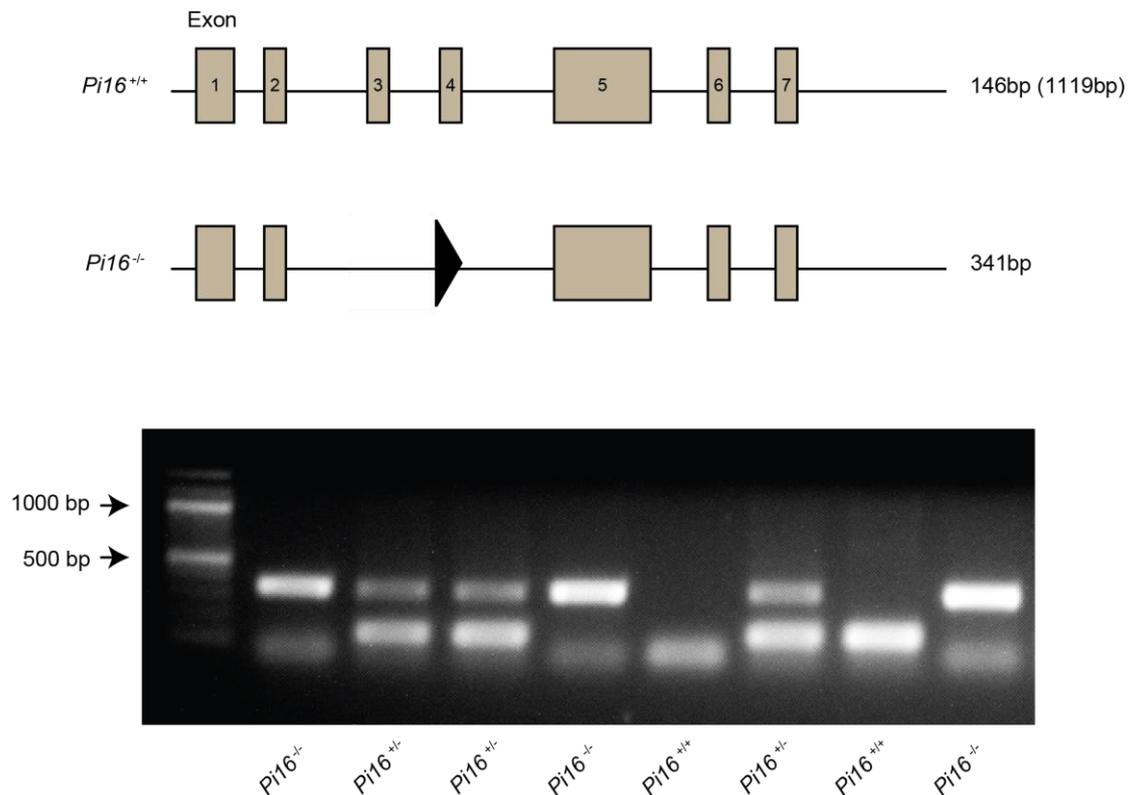


Abbildung 15: Schematische Darstellung des murinen *Pi16*-Lokus mit den 7 Exons und der Deletion von Exon 3 und 4 in den *Pi16*^{-/-}-Tieren, sowie ein repräsentatives Agarose-Gel einer Genotypisierungs-PCR für das modifizierte *Pi16*-Allel.

4.6.2 *Pi16*^{-/-}-Mäuse zeigen keine Auffälligkeiten im kardialen Hypertrophie Modell (TAC)

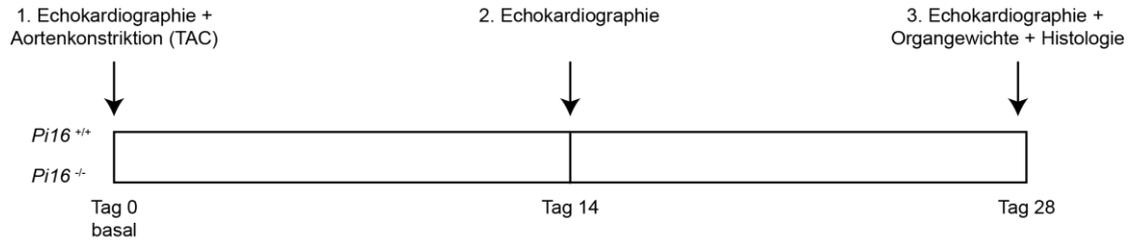
Da *Pi16* in früheren Publikationen als verstärkt exprimiert im murinen Krankheitsmodell TAC beschrieben wurde, sollten mit diesem Experiment die Auswirkungen der globalen Deletion von *Pi16* auf Herzfunktion und Morphologie nach einem starken kardialen Hypertrophie-Stimulus untersucht werden. Hierzu wurden *Pi16*-defiziente Tiere zusammen mit *Pi16*^{+/+}-Tieren, die ein unverändertes *Pi16* trugen, einer thorakalen Aortenkonstriktion (TAC) unterzogen. Vor Beginn des Versuchs wurde als Eingangskriterium die basale Herzfunktion mittels transthorakaler Echokardiographie gemessen. Weitere Echokardiographiemessungen

Ergebnisse

fanden 14 bzw. 28 Tage nach der Operation statt, wobei nach vier Wochen zusätzlich die Tiere artgerecht getötet wurden und die entnommenen Organe, Herz und Lunge, histologisch untersucht wurden (**Abbildung 16a**). Betrachtete man die funktionellen Daten der Auswurfraction und der Verkürzungsfraction, so zeigte sich eine progressive Abnahme der systolischen Herzfunktion zwei bzw. vier Wochen nach Operation der Tiere. Die Werte verminderten sich für die Ejektionsfraction von ca. 70% (Basalwert) auf nur noch 45% am Ende des Experiments. Gleiches ließ sich auch bei der Verkürzungsfraction beobachten, wo die Werte von 38% (Basalwert) auf 23% fielen. Allerdings war sich für diese Parameter kein Einfluss des Genotyps der untersuchten Mäuse messbar. Sowohl die *Pi16*^{+/+}- als auch die *Pi16*^{-/-}-Mäuse zeigten ein identisches Ansprechen auf die TAC-Operation und die Funktion nahm in gleichem Maß ab (**Abbildung 16b**). Auch die Volumina des linken Ventrikels in der Systole (LV Vol s) und in der Diastole (LV Vol d) zeigten keine durch die *Pi16*-Deletion bedingten Auffälligkeiten.

Ergebnisse

A



B

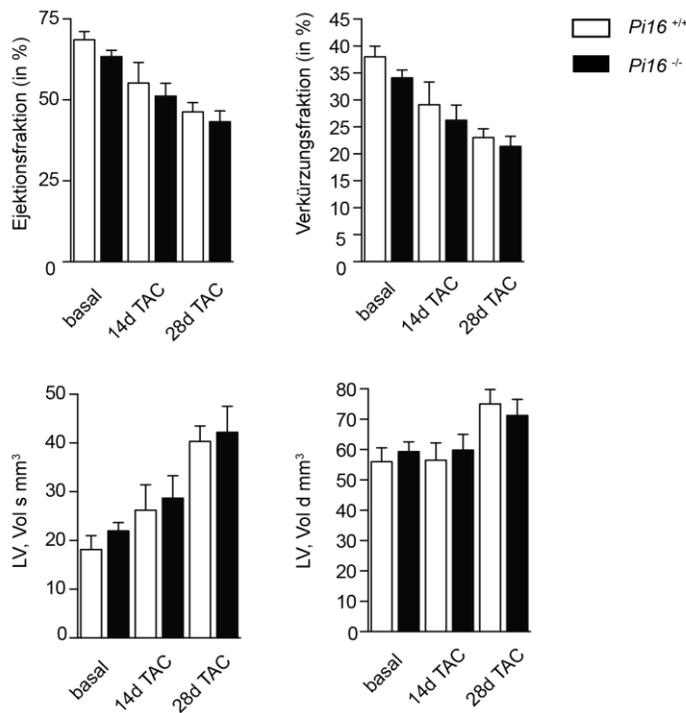


Abbildung 16: *Pi16*^{-/-}-Mäuse zeigen keine Auffälligkeiten im Krankheitsmodell der thorakalen Aortenkonstriktion: (A) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. (B) Echokardiographie Ergebnisse vor und nach TAC Operation (14d und 28d), Echokardiographieparameter Ejektionsfraktion, Systolische Verkürzungsfraktion, Linksventrikuläres Volumen in der Systole (LV Vol s), Linksventrikuläres Volumen in der Diastole (LV Vol d) (n = 7/14).

Die histologische Analyse der explantierten Herzen der operierten Tiere nach vier Woche zeigte bezüglich des Verhältnisses von Herzgewicht zu Körpergewicht ebenfalls keine Auffälligkeiten. Die Werte bewegten sich in beiden untersuchten Gruppen bei ca. 9 und damit im Normbereich nach 4 Wochen TAC (**Abbildung 17a**). Auch die Lungengewichte waren unauffällig. Die Quantifizierung der interstitiellen Fibrose nach TAC zeigte zwar eine Tendenz zu einer verstärkten Fibrose in den *Pi16*-deletierten Tieren, dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant und könnte somit auch einen Zufallsbefund darstellen. Die Mittelwerte der beiden Gruppen betragen in dieser Analyse 6,3% für die *Pi16*^{+/+}- und 7,8% für die *Pi16*^{-/-}-

Ergebnisse

Gruppe (**Abbildung 17b**). Zum Abschluss der Untersuchung der *Pi16*^{-/-}-Tiere nach TAC bleibt festzustellen, dass die globale Deletion von *Pi16* in einem Modell für kardiale Hypertrophie nicht zu einem Phänotyp bezüglich der Herzfunktion, -hypertrophie oder der interstitiellen Fibrose führte.

Ergebnisse

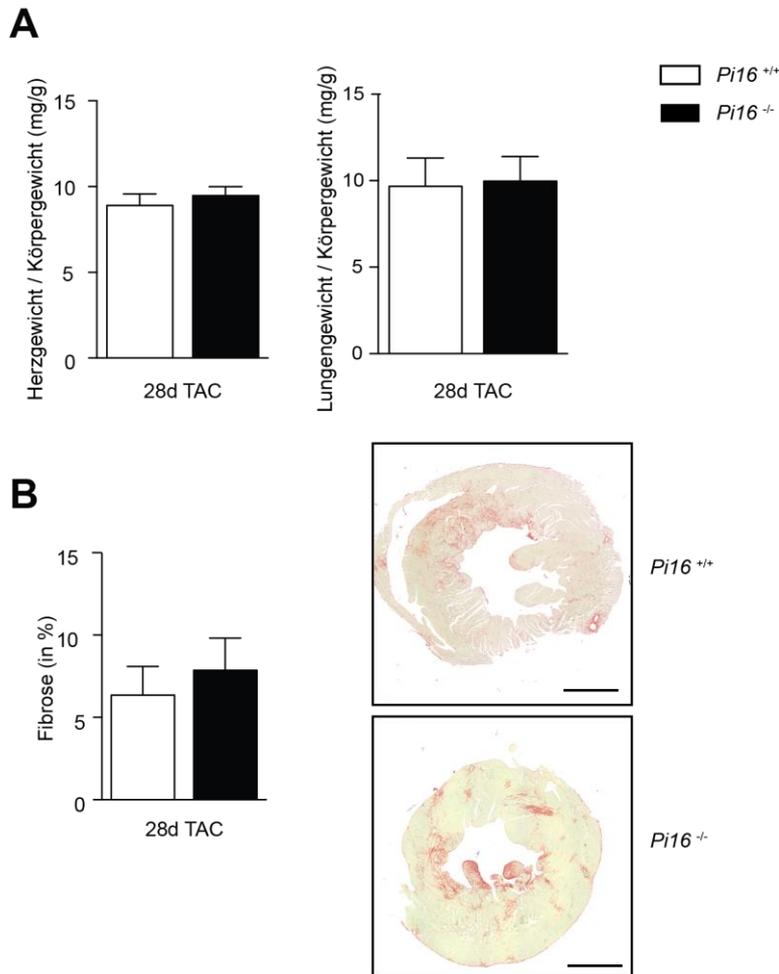


Abbildung 17: Keine Auffälligkeiten in histologischer Analyse der entnommenen Herzen nach 4 Wochen transversaler Aortenkonstriktion: (A) Herzgewicht / Körpergewicht- und Lungengewicht / Körpergewicht-Verhältnis zeigt keine Unterschiede zwischen den Genotypen (n = 9/18). (B) Sirius Rot & Fast Green Färbung von transversalen Herzschnitten. Quantifizierung der interstitiellen Fibrose (Rotfärbung) zeigt keine Genotyp-bedingten Unterschiede (interstitielle Fibrose %) (Skalierung: 2 mm).

4.6.3 *Pi16*^{-/-}-Mäuse zeigen Auffälligkeiten im kardialen Krankheitsmodell des Myokardinfarkts (MI)

Da die *Pi16*-defizienten Mäuse keinen Phänotyp im Krankheitsmodell der kardialen Hypertrophie (TAC) gezeigt hatten, wurden die Mäuse in einem weiteren Modell untersucht. Um zusätzlich zur Hypertrophie von Kardiomyozyten, welche mit TAC nachgebildet wird, noch ein Krankheitsmodell mit einem Fokus auf apoptotische, inflammatorische und

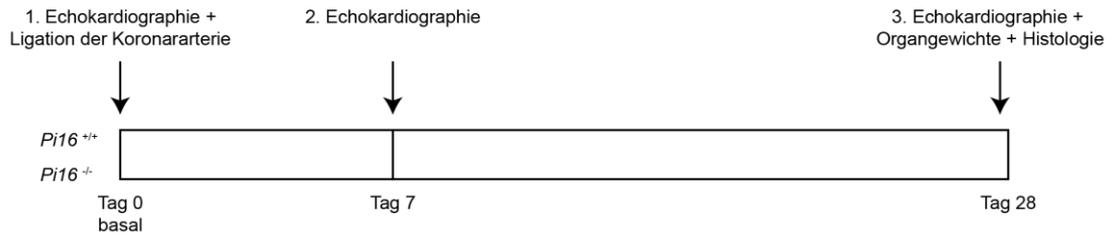
Ergebnisse

nekrotische Prozesse im Herzmuskel zu untersuchen, wurde die permanente Ligation der linken absteigenden Koronararterie gewählt. Dieses Modell der akuten ischämischen Herzerkrankung führte zu einem apikalen, transmuralen Infarkt im linken Ventrikel der operierten Maus. Kontrollierend wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (vor Infarkt, 7d nach Infarkt, 28d nach Infarkt) echokardiographische Funktionsmessungen des Herzens durchgeführt. Vier Wochen nach Induktion des Infarkts wurden die Tiere artgerecht getötet und die Herzen für weitere Untersuchungen bezüglich Histologie und Infarktgröße entnommen (**Abbildung 18a**). Betrachtete man die funktionellen Daten so zeigte sich basal, d.h. vor der Intervention, kein Unterschied zwischen den *Pi16*^{+/+}- und *Pi16*^{-/-}-Mäusen. Die dynamischen Parameter Auswurffraktion und systolische Verkürzungsfraktion lagen im Normbereich und auch systolischer und diastolischer Ventrikeldurchmesser zeigten keine Auffälligkeiten. Nach Ligation der Koronararterie nahm in den *Pi16*^{+/+}-Mäusen die Verkürzungsfraktion im Mittelwert von 56% auf 11% (28d) ab, wohingegen in der *Pi16*^{-/-}-Kohorte eine Protektion mit einer Abnahme der Funktion von 53% auf 24,5% (28d) beobachtet werden konnte (**Abbildung 18b**). Die Funktion nahm also in der *Pi16*-deletierten Gruppe signifikant weniger stark ab, als in der Gruppe mit *Pi16*. Dieser Phänotyp war auch bereits in den funktionellen Daten nach 7 Tagen zu erkennen, in denen ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den Kohorten zu detektieren war. In der *Pi16*^{-/-}-Gruppe verbesserte sich die Auswurffraktion sogar von 7d zu 28d nach Infarkt von 21,5% auf 24,5%, wohingegen sie in der *Pi16*^{+/+}-Gruppe bei 11% stagnierte.

Neben den funktionellen Parametern unterschieden sich auch die morphologischen Parameter des systolischen und diastolischen Durchmessers des linken Ventrikels (LV, $V_{s(d)}$) signifikant zwischen den beiden Gruppen (**Abbildung 18b**), was auch in den repräsentativen Echokardiographieaufnahmen in der Diastole nach Myokardinfarkt bildlich zu sehen war. Zusammenfassend zeigten die global *Pi16*-defizienten Mäuse 7 und 28 Tage nach Myokardinfarkt eine deutlich verbesserte Herzfunktion im direkten Vergleich zur Kontrollgruppe.

Ergebnisse

A



B

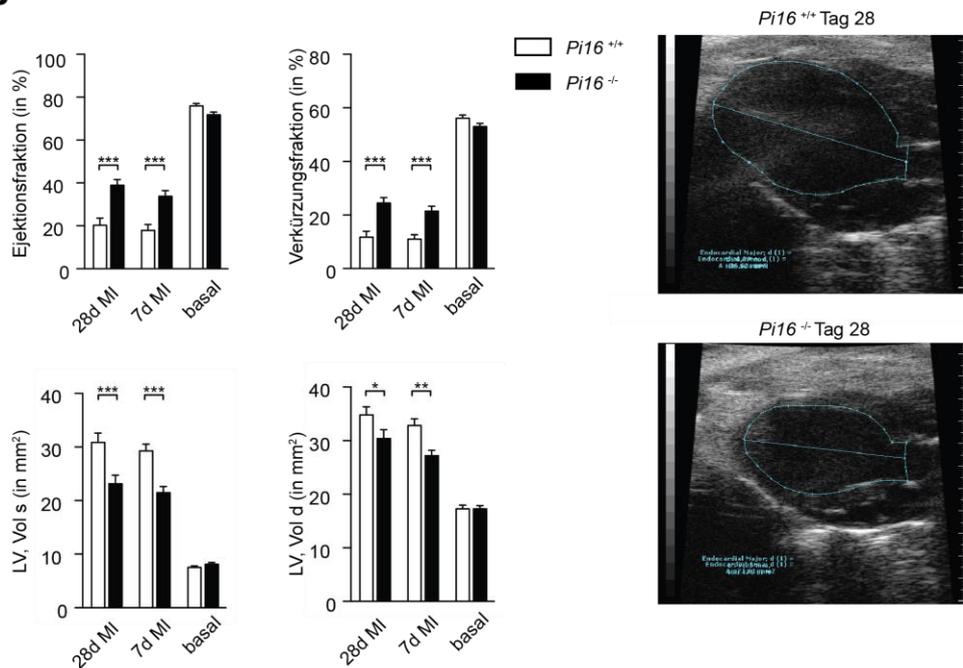


Abbildung 18: $Pi16^{-/-}$ -Mäuse zeigen nach permanenter Ligatur der linken absteigenden Koronararterie eine bessere Funktion als die Kontrolltiere der $Pi16^{+/+}$ -Gruppe: (A) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. (B) Echokardiographische Daten zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Ligatur der Koronararterie (basal, 7d, 28d), mit einer repräsentativen Echoaufnahme, die die diastolische Dilatation des linken Ventrikels nach MI zeigt ($n = 9/15$) (In Kooperation mit dem Institut für molekulare und translationale Kardiologie der MHH Hannover).

Neben der Untersuchung der Funktion mittels Echokardiographie wurden die Herzen der operierten Tiere auch histologisch untersucht. Nach Explantation der Herzen an Tag 28 nach Myokardinfarkt erfolgte hierzu eine Färbung der geschnittenen linken Ventrikel mit Sirius Rot & Fast Green, einer Färbemethode die Bindegewebe, vor allem Kollagen, rot und zelluläre Bestandteile grün färbte. Dadurch war eine Visualisierung der Infarkt Narbe in mikroskopischen Aufnahmen des gesamten Ventrikels leicht möglich. Die Narbe wurde in der Folge an der endokardialen Kante vermessen und ins Verhältnis zum gesamten

Ergebnisse

Endokardumfang des dilatierten Ventrikels gesetzt. Die Quantifizierung der Infarktgröße in den Versuchstieren zeigte eine verringerte Infarktgröße in den *Pi16*^{-/-}-Tieren, was in Einklang mit den funktionellen Befunden der verbesserten Herzfunktion und geringeren Dilatation nach MI stand. Dieser Unterschied war statistisch signifikant im t-Test der beiden Gruppen (**Abbildung 19**).

Abschließend bleibt zu der 4-wöchigen Myokardinfarktstudie festzuhalten, dass genetische Ablation von *Pi16* in der Maus zu einer signifikant besseren Herzfunktion und einer verringerten Infarktgröße vier Wochen nach Infarkt führte - globale *Pi16*-Deletion folglich protektiv auf das Myokard nach Infarkt wirkte.

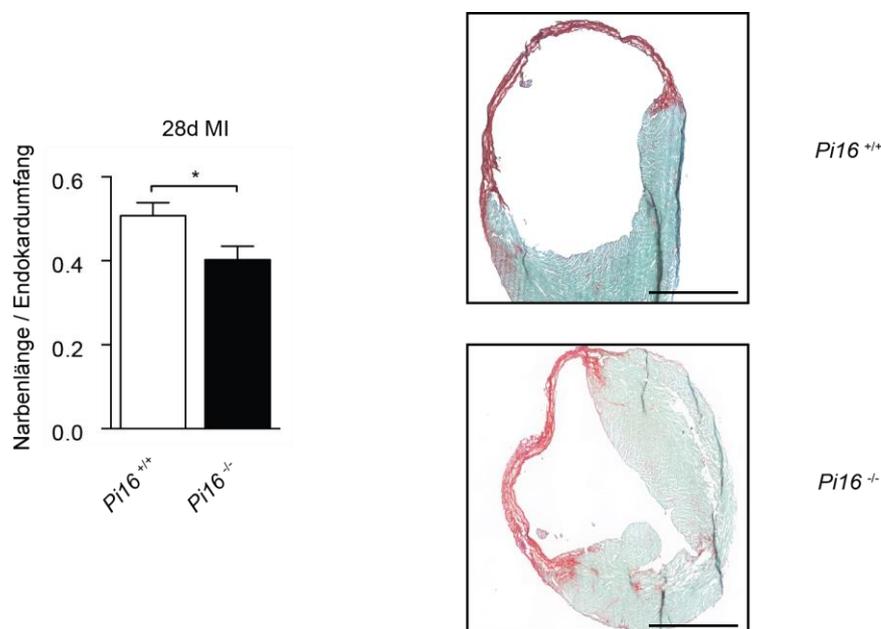


Abbildung 19: Signifikant verringerte Infarktgröße in den *Pi16*^{-/-}-Mäusen: Histologische Untersuchung der Infarktgrößen nach 28d Ligation der Koronararterie. Färbung mit Sirius Rot & Fast Green. Quantifizierung der Infarktgröße durch Messung der endokardialen Länge der Infarktnarbe, im Verhältnis zum Gesamtendokardumfang (n = 7/11). Die Bilder zeigen repräsentative Aufnahmen 28 Tage nach Myokardinfarkt im Transversalschnitt (Skalierung: 2 mm).

4.7 *Pi16* wird im Myokard nach Myokardinfarkt differentiell exprimiert

In vorherigen Arbeiten wurde die Regulation von PI16 im TAC-Modell und in β 1-Adrenozeptor-transgenen Mäusen gezeigt. Um zu untersuchen, ob PI16 auch im ischämischen Krankheitsmodell des Myokardinfarkts reguliert war, wurde die *Pi16*-Expression und der Proteingehalt im Myokard mittels quantitativer RT-PCR und Immunoblot untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Proteinmenge von PI16 vier Tage nach Infarkt um den Faktor 4 erhöht war und auch die mRNA für *Pi16* um ungefähr das Dreifache zunahm (**Abbildung 20a**). Diese Zunahme von PI16 war dabei lokal auf das erkrankte Myokard

Ergebnisse

begrenzt, da im Plasma, in dem PI16 bereits unter basalen Bedingungen in sehr hoher Konzentration vorlag, keine Zunahme nach Myokardinfarkt zu beobachten war. Die Quantifizierung des repräsentativen Blots mit Normalisierung auf Albumin zeigte keine Veränderung des Proteingehalt von PI16 vor und nach Myokardinfarkt im Plasma (**Abbildung 20b**). Eine weitere Frage die in diesem Kontext zu klären war, betraf die intramyokardiale Verteilung von PI16 nach Myokardinfarkt. Hierzu wurden von den Mäusen vier Tage nach Infarkt Biopsien des Infarktbereichs und auch des nicht-ischämischen Herzgewebes entnommen und auf den *Pi16*-mRNA-Gehalt hin untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikant höhere Expression von *Pi16* im Nicht-Infarkt Bereich (**Abbildung 20c**), als Kontrolle dienten auch hier Gewebeproben von *Pi16*^{-/-}-Mäusen. Diese ca. 2,5-fach höhere Expression im Vergleich zum Infarkt deutete auf eine Expression im noch intakten Herzgewebe und nicht im Entzündungsbereich des Infarkts vier Tage nach OP hin, der von Leukozyten und Zelltrümmern dominiert ist.

Ergebnisse

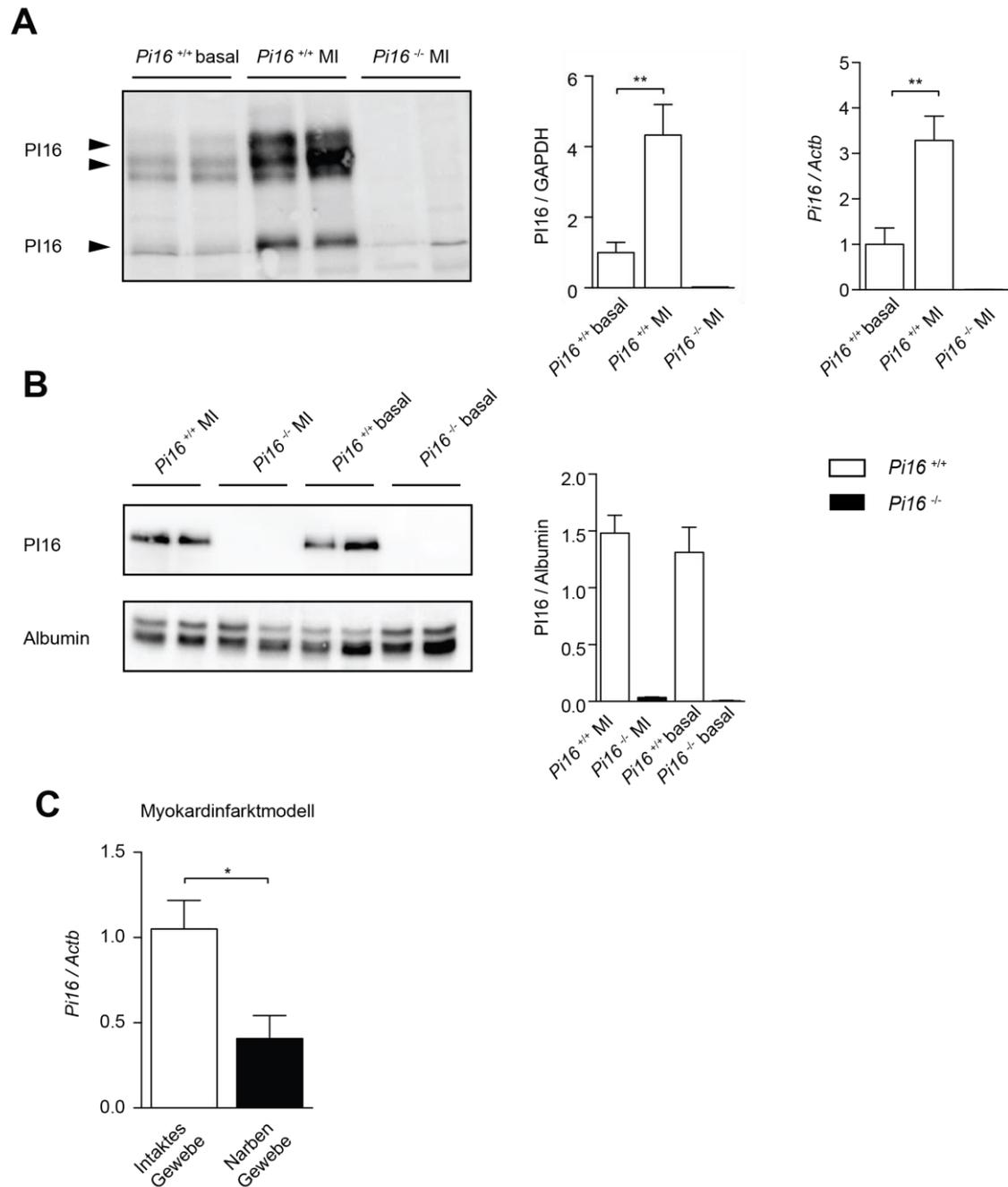


Abbildung 20: PI16-Regulation nach Myokardinfarkt: (A) Immunoblot gegen PI16 und quantitative RT-PCR Analyse der *Pi16*-mRNA im Myokard vor und 4 Tage nach Myokardinfarkt. Proteingehalt normalisiert auf GAPDH ($n = 3-4$), mRNA-Gehalt normalisiert auf β -Aktin (*Actb*) ($n = 4$). (B) Analyse des PI16-Gehalts im Plasma von *Pi16*^{+/+}- und *Pi16*^{-/-}-Mäusen vor und 4 Tage nach Myokardinfarkt mittels Immunoblot gegen PI16 zeigte keine Unterschiede. Quantifizierung normalisiert zu Albumin ($n = 2$). (C) Analyse der Lokalisation der *Pi16*-mRNA im erkrankten Herzen von *Pi16*^{+/+}-Mäusen zeigt eine signifikant höhere Expression von *Pi16* im Intakten Gewebe im Vergleich zum Infarkt-Gewebe (Narbengewebe) ($n = 5$).

4.8 Zeitabhängige Hochregulierung von PI16 nach Myokardinfarkt

Da die bisherigen Experimente nur eine statische Betrachtung des PI16-Gehalts an einem bestimmten Zeitpunkt ermöglichten, sollte in diesem Versuch der zeitliche Verlauf der *Pi16*-

Ergebnisse

Expression bzw. Proteinakkumulation nach MI untersucht werden. Hierzu wurden Herzen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Myokardinfarkt (1d, 4d und 7d) explantiert und die PI16-Proteinmenge mittels Immunoblot untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Menge an PI16-Protein, normalisiert zum Referenzprotein GAPDH, von einem Mittelwert von 1,7 (PI16 / GAPDH) an Tag 1 über den Wert 4,3 an Tag 4 bis auf 16 an Tag 7 anstieg. Der signifikante Anstieg war auch im repräsentativen Blot schön zu visualisieren (**Abbildung 21**). Es konnte folglich gezeigt werden, dass PI16 im zeitlichen Verlauf der Erkrankung im Gesamtmyokardgewebe stark akkumulierte.

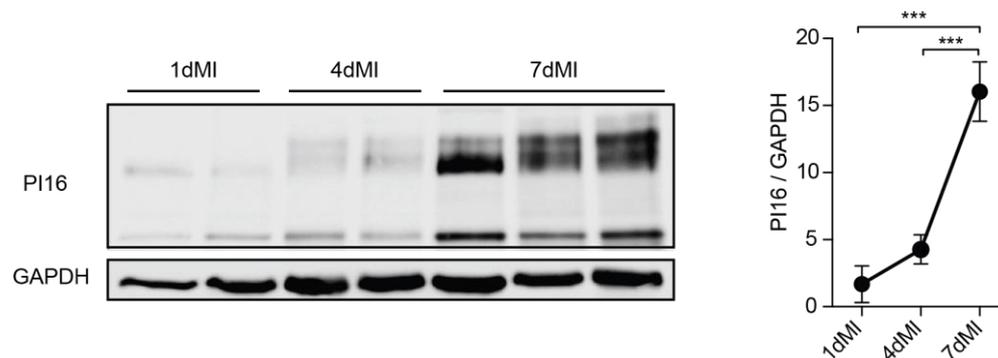


Abbildung 21: Anreicherung des PI16-Proteins nach Myokardinfarkt: Immunoblot für PI16 mit dem PI16 Exon 5-Antikörper aus Myokardgewebe 1, 4 und 7 Tage nach Myokardinfarkt. Quantifizierung zeigt PI16-Signale normalisiert zu GAPDH (n = 5 pro Gruppe).

4.9 Einfluss von PI16 auf die sterile Entzündung nach Myokardinfarkt

Da durch die vorher illustrierten Ergebnisse gezeigt werden konnte, dass globale *Pi16*-Deletion nach Myokardinfarkt protektiv wirkte und dieser Effekt bereits deutlich nach sieben Tagen zu beobachten war, wurde als erste Phase nach Myokardinfarkt die initiale akute Entzündung in den *Pi16*^{-/-}-Tieren genauer betrachtet. In dieser Phase wandert eine große Anzahl von Immunzellen in das Gewebe ein, um es von abgestorbenen Zellen und anderen schadhafte Substanzen zu säubern. Den Großteil der Zellen dieser massiven Einwanderung stellen dabei Neutrophile und klassische, sogenannte Ly6C^{high}-Monozyten dar. Die Anzahl dieser Zellen wurde mit Hilfe eines Antikörpers, der sowohl das Neutrophilen-Oberflächen-Antigen Ly6G als auch Ly6C erkennt, im Myokard vier Tage nach Infarkt quantitativ bestimmt. Hierzu wurden die positiven Signale bzw. Zellen innerhalb eines gesamten Herzquerschnitts mit Hilfe der Metamorph[®] Software quantifiziert. Dabei zeigte sich eine signifikant erhöhte Zahl von Neutrophilen und Monozyten in den *Pi16*^{+/+}-Mäusen im Vergleich mit den *Pi16*^{-/-}-Mäusen (**Abbildung 22a**).

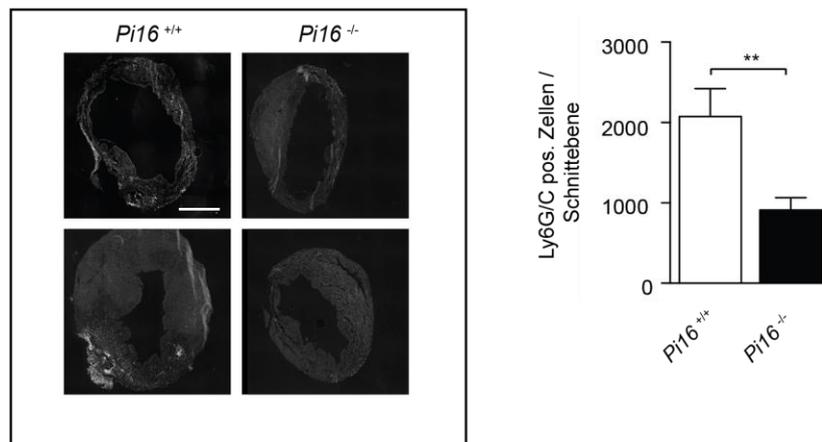
Neben dem Befund der verringerten Einwanderung von Leukozyten wurde auch in der Analyse der Zytokinexpression ein signifikanter Unterschied gefunden. Die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin 6 (*IL6*) und Interleukin 1 β (*IL1B*) war in den *Pi16*^{-/-}

Ergebnisse

-Mäusen deutlich reduziert, für IL-6 war dieser Unterschied auch statistisch hoch signifikant (**Abbildung 22b**). Für den weiteren pro-inflammatorischen Marker TNF- α (*TNF*) zeigte sich kein Unterschied in den Proben.

Zusammenfassend konnte durch dieses Experiment gelernt werden, dass die Deletion von *Pi16* zu einer verringerten sterilen Entzündung nach Myokardinfarkt führte, was durch eine verminderte Einwanderung von pro-inflammatorischen Leukozyten und eine verminderte Expression pro-inflammatorischer Zytokine gezeigt werden konnte.

A



B

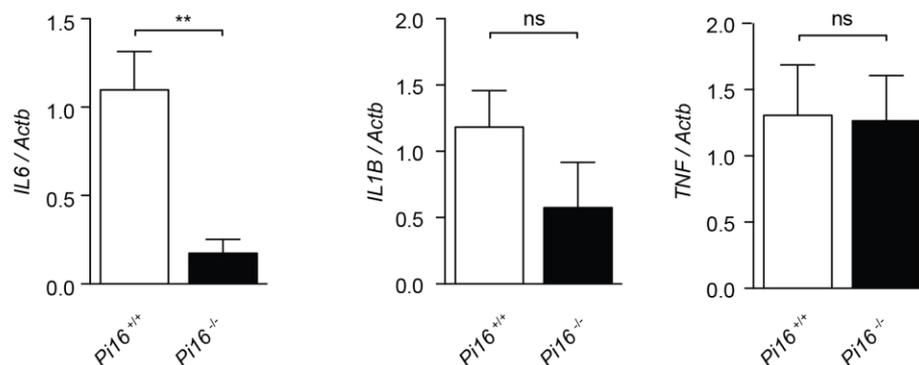


Abbildung 22: *Pi16*-defiziente Mäuse zeigen eine verringerte Einwanderung von Neutrophilen und Monozyten an Tag 4 nach Myokardinfarkt: (A) Quantifizierung der in den linken Ventrikel eingewanderten Neutrophilen und Monozyten mit repräsentativen Bildern (n = 7/9) (Skalierung: 2 mm). (B) Quantitative RT-PCR Analyse der Zytokinexpression von *IL6*, *IL-1B* und *TNF* vier Tage nach MI (n = 7/6 bzw. 7/4). (Daten in Teilen in Masterarbeit Sonja Sichler veröffentlicht⁸⁷)

4.10 Immunologische Charakterisierung der *Pi16*-defizienten Mäuse

Um aufzuklären, ob der gezeigte Effekt auf die Leukozyteneinwanderung auf einer verminderten Gesamtzahl von Leukozyten in den *Pi16*^{-/-}-Mäusen beruhte, wurde getestet ob sich die einzelnen Zelltypen des Immunsystems in ihrer Relation zueinander oder in ihrer

Ergebnisse

absoluten Menge unterschieden. Hierzu wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Immunologie der TUM (Prof. Busch) und der German Mouse Clinic (AG Immunology Screen) am Helmholtz Zentrum München eine Analyse der verschiedenen Zellpopulationen im Vollblut von *Pi16*^{+/+}- und *Pi16*^{-/-}-Mäusen durchgeführt. Die Identifikationsstrategie der Zellen im Durchflusszytometer ist in **Abbildung 23** dargestellt. Primär wurden die Zellen auf CD45 (allgemeiner Leukozytenmarker) positive Zellen eingegrenzt. Aus diesem Pool wurden dann zuerst B-Zellen anhand der Marker B220 (Protein Tyrosin Phosphatase) und CD19 (Cluster of Differentiation 19) analysiert. Nur Zellen, die positiv für beide Marker (B220 und CD19) waren, wurden als B-Zellen gezählt. Mit den nicht doppelt positiven Zellen wurde weiterverfahren und die T-Zellen anhand der Marker CD3 (Cluster of Differentiation 3) und CD5 (Cluster of Differentiation 5) identifiziert und quantifiziert. Auch hier wurden nur doppelt positive Zellen in die Analyse einbezogen. Im Folgenden wurden aus dem Rest die Granulozyten isoliert, welche doppelt positiv für die Marker CD11b (Integrin alpha M) und Ly6G (Lymphozyten Antigen Komplex G) waren. Aus den nun verbleibenden Zellen, die weder B- oder T-Lymphozyten, noch Granulozyten waren wurden mit Hilfe der Marker NK1.1 (Killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1) und NKp46 Natürliche Killer-Zellen gated. Diese Zellen waren negativ für den Granulozyten-Marker CD11b und somit von anderen Zellpopulationen abzugrenzen. Positiv für den Marker CD11b, aber negativ für Ly6G und damit klar von den Granulozyten abzugrenzen waren die Monozyten, die zusätzlich noch anhand des spezifischen Markers Ly6C (Lymphozyten Antigen Komplex C) herausgefiltert wurden (**Abbildung 23a**). Die Gegenüberstellung der Anteile der einzelnen Zellpopulationen an den CD45-positiven Zellen aus 6 bzw. 5 Mäusen zeigte keine Auffälligkeiten zwischen den *Pi16*^{-/-}- und den Kontrolltieren. Somit konnte geschlossen werden, dass unter basalen Bedingungen, d.h. vor einem Entzündungsstimulus, die relativen Anteile der unterschiedlichen Subpopulationen am Gesamtpool der Leukozyten zwischen den Genotypen nicht signifikant unterschiedlich waren.

Neben den absoluten Anteilen der einzelnen Populationen wurde auch die Stimulationsfähigkeit der Leukozyten getestet. Hierzu wurden die Zellen, wie vorher beschrieben, isoliert und 20 Minuten mit dem unspezifischen Leukozytenstimulanz PMA / Ionomycin, einem PKC (Proteinkinase C)-Aktivator inkubiert. Danach wurde in den in **Abbildung 23** beschriebenen Populationen die Hochregulation des Aktivierungsmarkers CD69 (ein C-Typ Lektin) mittels Durchflusszytometrie gemessen (**Abbildung 24a**). Dabei zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen *Pi16*^{+/+} und *Pi16*^{-/-}. In beiden Kohorten ließen sich CD8⁺-, nicht CD8⁺-, B1- und auch B2-Zellen zu fast 100% stimulieren. Auch die Basalwerte unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen. Die weiteren Zellpopulationen (NK-Zellen, Monozyten, Granulozyten, restliche Gr1⁺-Zellen und weitere

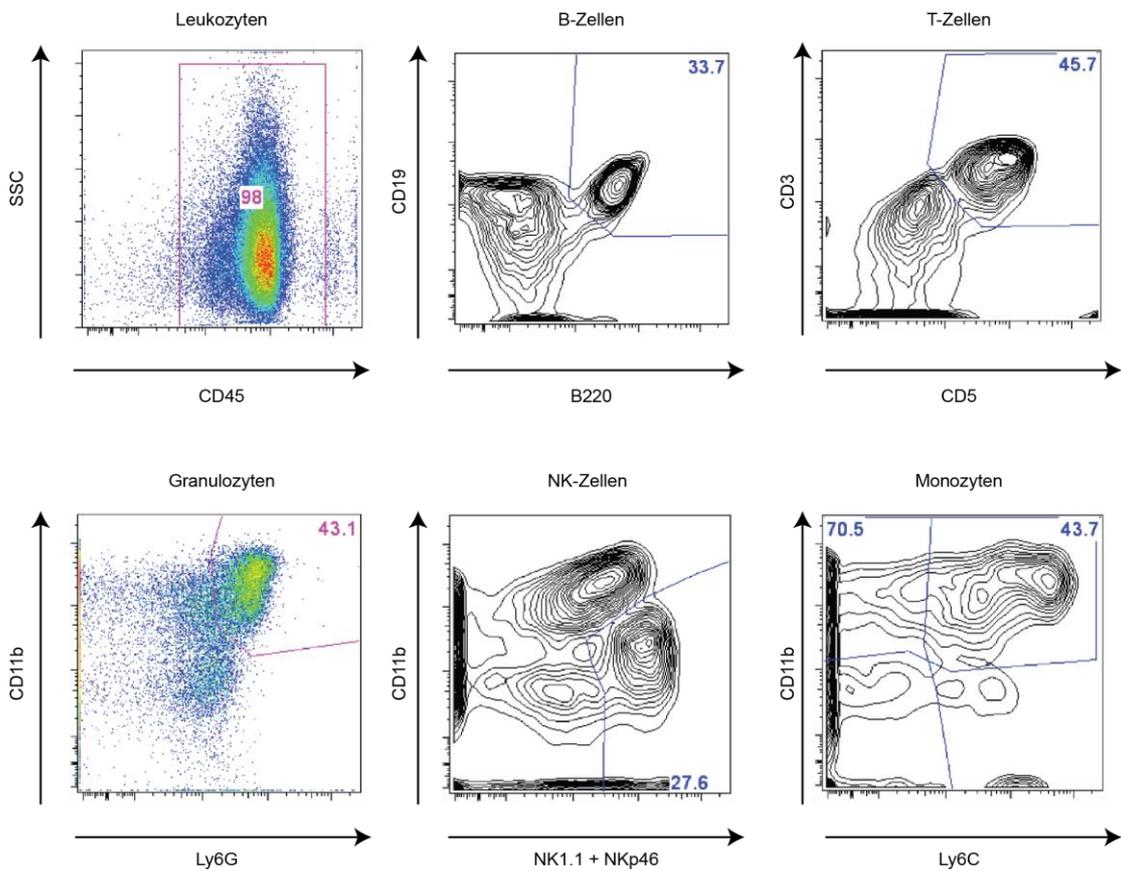
Ergebnisse

Ly6C⁺-Zellen) ließen sich nicht, oder nur partiell zur CD69-Hochregulation stimulieren, zeigten aber wie die vorher beschriebenen Gruppen keine Genotyp-spezifischen Auffälligkeiten. Zusätzlich zu den Stimulationsversuchen wurden auch die basalen Mengen der Antikörper-Spezies IgG und IgM im Plasma der untersuchten Mäuse mittels quantitativem ELISA bestimmt. Dabei zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede zwischen der *Pi16*^{+/+}- und der *Pi16*^{-/-}-Gruppe (**Abbildung 24b**).

Bezieht man all die Ergebnisse der immunologischen Phänotypisierung mit ein, so zeigte sich, dass die *Pi16*-defizienten Mäuse keine Auffälligkeiten bezüglich Anzahl und Aktivität der Leukozyten aufwiesen und somit die veränderte Einwanderung nach Myokardinfarkt nicht durch eine veränderte basale Anzahl an Immunzellen zu erklären war.

Ergebnisse

A



B

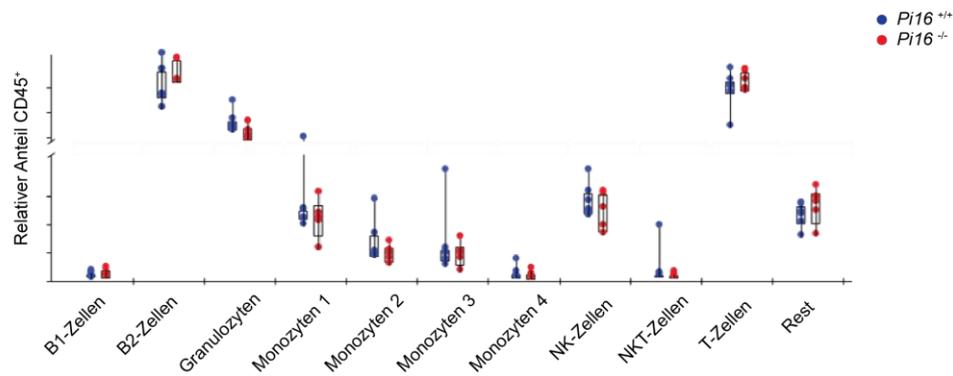
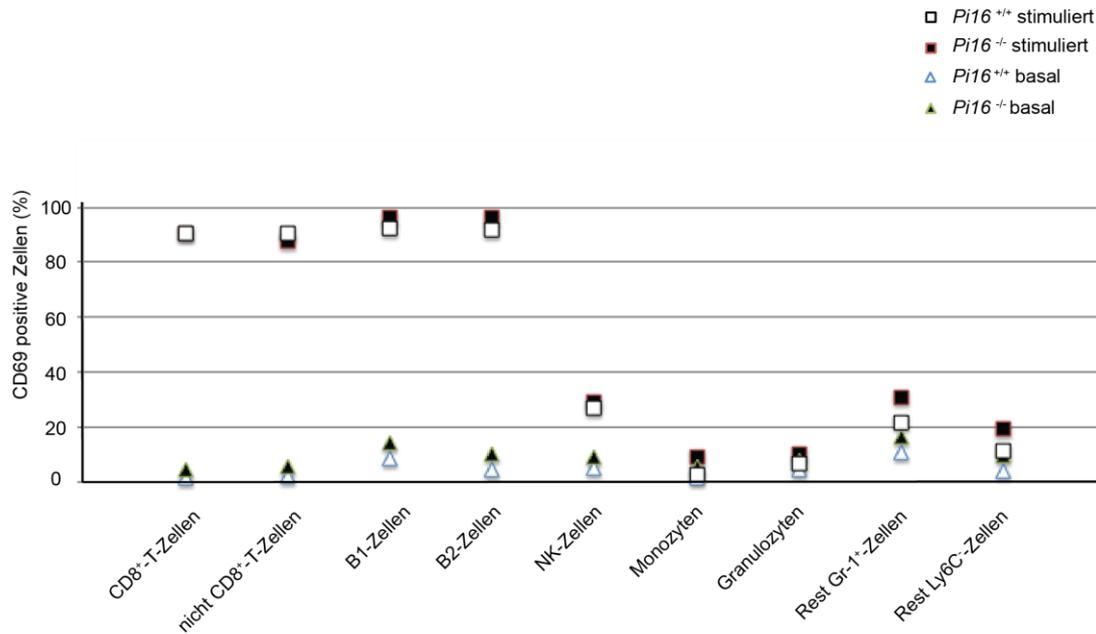


Abbildung 23: Keine Unterschiede in den Leukozyten Hauptpopulationen zwischen *Pi16*^{+/+}- und *Pi16*^{-/-}-Mäusen: (A) Gating-Strategie für die verschiedenen Populationen anhand der genannten Oberflächenmarker. (B) Quantifizierung der Leukozytenpopulationen als relativer Anteil an den CD45-positiven Zellen (n = 6/5). (Daten in Teilen in Masterarbeit Sonja Sichler veröffentlicht⁸⁷). (Die Analyse wurde in Kooperation mit der AG Immunology Screen an der German Mouse Clinic (GMC) Neuherberg durchgeführt).

Ergebnisse

A



B

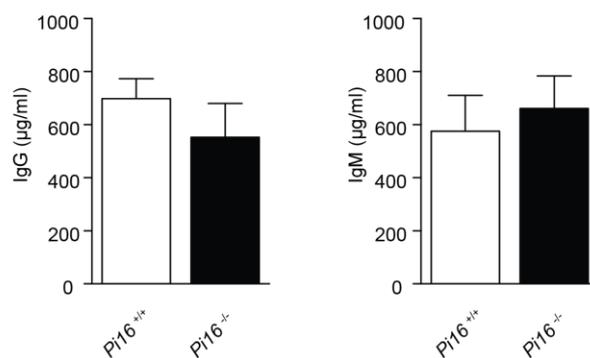


Abbildung 24: PMA / Ionomycin-Stimulation von Leukozyten und Antikörperkonzentrationen zeigen keine Unterschiede zwischen *Pi16*^{+/+}- und *Pi16*^{-/-}-Mäusen: (A) PMA / Ionomycin-Stimulation (50 / 500 ng/ml) für 20 Minuten mit anschließender Messung des Oberflächen-Aktivierungs-Antigens CD69 im FACS (n = 6/5). (B) Bestimmung der absoluten Mengen an IgG und IgM in Plasma der untersuchten Mäuse (n = 5/5). (Daten in Teilen in Masterarbeit Sonja Sichler veröffentlicht⁸⁷) (Die Analyse wurde in Kooperation mit der AG Immunology Screen an der German Mouse Clinic (GMC) Neuherberg durchgeführt).

4.11 Chemerin und PI16

4.11.1 Assoziation der Chemerinmenge in Plasma mit der genetischen Deletion von *Pi16*

Wie in der Einleitung beschrieben, war in einer im Blindverfahren durchgeführten Genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) eine Assoziation des Chemerin-Gehalts im Plasma von Patienten mit einem Polymorphismus (rs1405069) innerhalb des *Pi16*-Lokus beschrieben worden⁷⁰. Dieser Einzelbasenaustausch führt im humanen *Pi16* zu einem

Ergebnisse

Aminosäureaustausch der polaren Aminosäure Threonin an Position 50 des PI16-Proteins zu Prolin. Der Polymorphismus, der eine Allelfrequenz von 0,45 aufweist, liegt in der strukturierten CAP-Domäne des PI16-Proteins, die an dieser Stelle eine Häufung von α -helikalen Strukturen aufweist (PredictProtein) (**Abbildung 25**). Da Prolin als nicht vereinbar mit einer α -Helix-Proteinstruktur gilt, führt dieser Polymorphismus möglicherweise zu einer essentiellen Veränderung der Proteinstruktur innerhalb der CAP-Domäne, was in der Folge die Proteinfunktion entscheidend beeinflussen könnte.

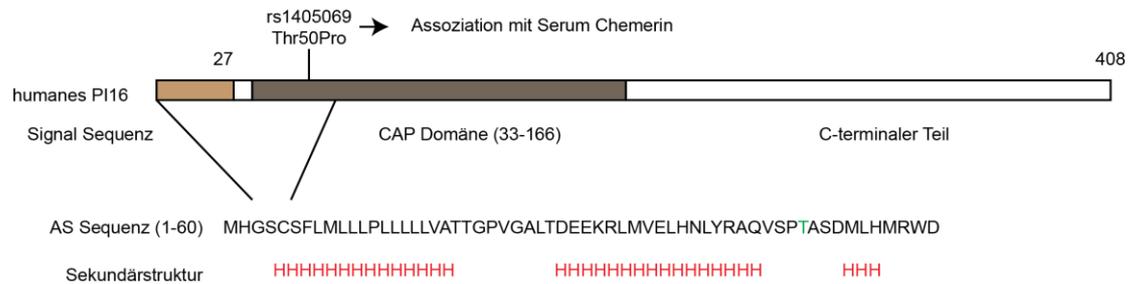


Abbildung 25: Schematische Darstellung des humanen PI16-Proteins mit seiner bekannten Domänenstruktur und vorhergesagter Sekundärstruktur: Zusätzlich ist der Polymorphismus rs1405069 markiert, der zu einem Aminosäureaustausch von Thr zu Pro an der Stelle 50 innerhalb der CAP-Domäne führt. Als Buchstabencodierung sind ebenfalls die ersten 60 Aminosäuren von PI16 dargestellt mit ihrer vorhergesagten Sekundärstruktur (PredictProtein), welche in diesem Bereich ausschließlich α -Helices enthält (farblich markiert Threonin 50) (H = α - Helix).

Da dieser Polymorphismus einen Zusammenhang zwischen PI16 und Chemerin vermuten ließ, wurde der Chemeringehalt im Plasma der *Pi16*-defizienten Tiere untersucht. Dabei zeigte sich in einem spezifischen ELISA, der nicht zwischen den Isoformen von Chemerin unterschied, dass die Deletion von *Pi16* zu einer signifikanten Verringerung der Chemerinmenge führte (**Abbildung 26a**). Da im Plasma allerdings Pro-Chemerin mit 163 Aminosäuren mehr als 95% der abundanten Chemerinmenge darstellt⁶⁵, ist die Frage nach der Komposition der Isoformen in dieser Betrachtung von Plasma sowieso von minderer Bedeutung. Weil Chemerin im Kontext des akuten Myokardinfarkts noch nicht untersucht war, wurde auch vier Tage nach Infarkt die Menge an Chemerin im Plasma gemessen. Dabei zeigte sich eine Erhöhung der Werte von ca. 100 ng/ml vor Infarkt auf 350 ng/ml nach Stimulus in den Wildtyp-Mäusen. Diese signifikante Erhöhung fand sich auch in den *Pi16*^{-/-}-Mäusen (ca. 73 ng/ml auf 390 ng/ml). Ein Unterschied zwischen den beiden Genotypen war nach Myokardinfarkt nicht mehr zu detektieren (**Abbildung 26b**).

Ergebnisse

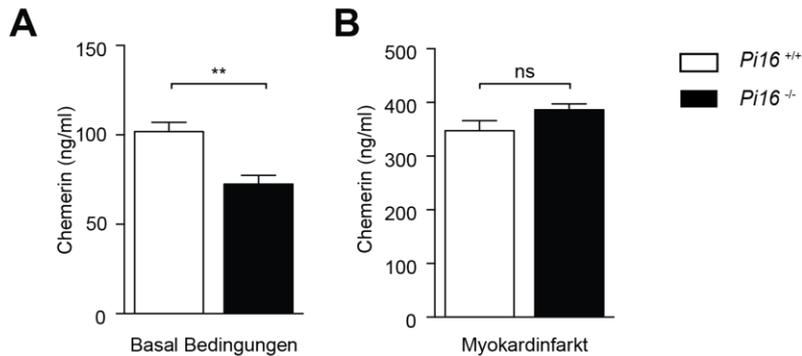


Abbildung 26: Chemerinmenge im Plasma ist in den *Pi16*-defizienten Tieren unter Basalbedingungen verringert: (A) ELISA für Chemerin in heparinisiertem Plasma unter basalen Bedingungen (n = 8/7). (B) ELISA für Chemerin in heparinisiertem Plasma vier Tage nach Myokardinfarkt (n = 5/2).

Zusammenfassend war Chemerin unter basalen Bedingungen in geringerer Menge im Plasma von *Pi16*^{-/-}-Tieren zu finden. Nach Myokardinfarkt wurde Chemerin verstärkt im Plasma detektiert, eine Differenz zwischen *Pi16*^{+/+} und *Pi16*^{-/-} war allerdings nicht mehr zu beobachten, was eine Veränderung der absoluten Menge von Chemerin im Plasma nach Myokardinfarkt als Ursache für den beobachteten Phänotyp in den *Pi16*^{-/-}-Tieren unwahrscheinlich erscheinen ließ.

4.11.2 Chemerin wird nach Myokardinfarkt im Myokard differentiell exprimiert

Wie in den vorherigen Ergebnissen illustriert, wurde Chemerin im Plasma der Mäuse nach Myokardinfarkt um den Faktor 3 – 4 hochreguliert. Um zu untersuchen, ob diese Hochregulation auch lokal im Myokard stattfand, wurde der mRNA-Gehalt von Chemerin (*RARRES2*) unter basalen Bedingungen und vier Tage nach Myokardinfarkt im Gesamtmyokard von *Pi16*^{+/+}-Tieren analysiert. Bei dieser Untersuchung zeigte sich, dass im Gesamtherzlysat die Expression von Chemerin im erkrankten Herzen um ungefähr den Faktor zwei erhöht war (**Abbildung 27** links). Neben der Expression im kranken Herzen wurde mittels qPCR auch untersucht, in welcher Zellfraktion innerhalb des Myokards Chemerin präferenziell exprimiert wurde. Dabei zeigte sich eine ca. 3-fach höhere Expression in der Nicht-Myozyten-Fraktion der isolierten Primärzellen aus dem Herzmuskel (**Abbildung 27**).

Es bleibt also aus diesen Versuchen zu lernen, dass Chemerin nach Myokardinfarkt nicht nur im Plasma verstärkt zu finden war, sondern auch im Gewebe verstärkt exprimiert wurde. Die Hauptproduzenten von Chemerin unter Basalbedingungen stellten dabei Nicht-Myozyten dar.

Ergebnisse

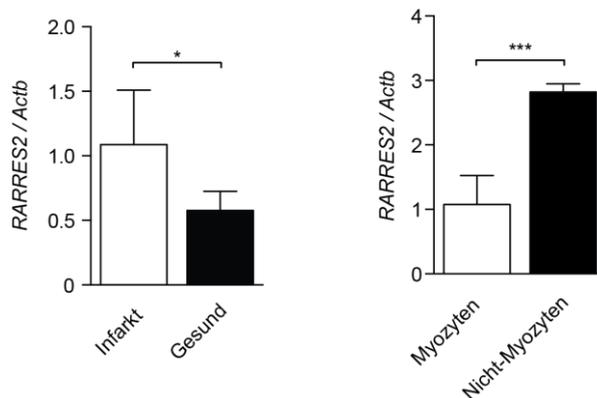


Abbildung 27: RARRES2 (Chemerin) wird verstärkt nach Myokardinfarkt und in Nicht-Myozyten exprimiert: Quantitative RT-PCR Analyse für Chemerin (*RARRES2*) in Gesamtherzlysaten vor und vier Tage nach Myokardinfarkt (n = 6 pro Gruppe). Analyse des mRNA-Gehalts in isolierten Myozyten und Nicht-Myozyten von *Pi16*^{+/+}-Mäusen unter basalen Bedingungen (n = 3/4).

4.11.3 Räumliche Verteilung von Chemerin im Herzen nach Myokardinfarkt in *Pi16*-defizienten Mäusen

Da Chemerin nach Myokardinfarkt im Gewebe und im Plasma von *Pi16*^{-/-}-Tieren unter Basalbedingungen differentiell reguliert war, wurde als nächster Schritt untersucht, ob die *RARRES2*-mRNA und das Chemerin-Protein 7 Tage nach Myokardinfarkt in unterschiedlichen Bereichen des infarzierten Herzens zu finden waren und ob es Unterschiede zwischen den beiden Genotypen gab. Dabei zeigte sich zum einen, dass die Menge an *RARRES2*-mRNA und Chemerin-Protein in den nicht direkt vom Infarkt betroffenen Gebieten des Herzens in den *Pi16*^{-/-}-Tieren signifikant verringert war (**Abbildung 28**). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass Chemerin bevorzugt im Nicht-Infarkt-Bereich als RNA exprimiert wurde und auch als Protein lokalisierte. Dieser Unterschied in der Chemerin-Menge zwischen Infarkt und Nicht-Infarkt in den *Pi16*^{+/+}-Tieren war bei einer Tierzahl von 6 statistisch signifikant (**Abbildung 28**). Der Befund war bei den *Pi16*-deletierten Tieren (*Pi16*^{-/-}) nicht festzustellen, da die Menge an *RARRES2*-mRNA und Chemerin-Protein im Nicht-Infarkt-Bereich deutlich geringer war als in den *Pi16*^{+/+}-Tieren. Auffällig bei dieser Betrachtung war ebenfalls, dass die Verteilung von Chemerin der Verteilung von PI16, mit einer Präferenz für den Nicht-Infarkt-Bereich nach Myokardinfarkt, stark ähnelte (vgl. **Abbildung 20c**).

Ergebnisse

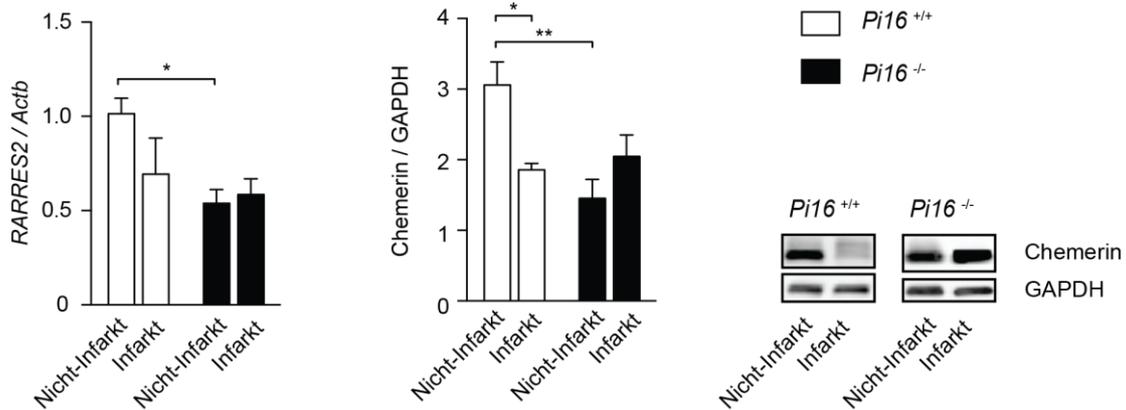


Abbildung 28: qRT-PCR und Immunoblot zeigen präferentielle Expression von Chemerin (*RARRES2*) im Nicht-Infarkt-Bereich: Quantitative RT-PCR (n = 5/6) und Immunoblot-Analyse (n = 6/7) der Chemerin-Menge im Infarkt und Nicht-Infarkt-Gewebe des gleichen Herzens, 7 Tage nach Ligation der Koronararterie.

4.11.4 Interaktion von PI16 und Chemerin

Da sowohl PI16 als auch Chemerin Proteine im Blutplasma darstellten und auch in allen bisher dargestellten Versuchen in ähnlichen Kompartimenten zu finden waren (Nicht-Infarkt-Bereich, Nicht-Myozyten), wurden Ko-Immünpräzipitationsversuche durchgeführt, um eine mögliche Interaktion zwischen den Proteinen aufzuklären. Dazu wurde heparinisiertes Plasma von *Pi16*^{+/+}-Mäusen verwendet, aus dem mit Hilfe eines Chemerin-spezifischen Antikörpers, Chemerin präzipitiert wurde. Der Immunoblot des Präzipitats zeigte, dass mit Chemerin auch PI16 aus Plasma gefällt werden konnte (**Abbildung 29a**). Diese Interaktion erwies sich als spezifisch, da PI16 nicht in der Kontrollpräzipitation zu sehen war, welche mit Sepharose-Beads ohne spezifischen Chemerin-Antikörper durchgeführt wurde. Um diese Interaktion zusätzlich in einem anderen System zu verifizieren, wurde ein Zellkultur-basiertes Modellsystem entwickelt. HEK293-Zellen, transfiziert mit einem PI16- und einem Chemerin-Plasmid, dienten dabei als Proteinlieferanten, die beide Proteine in den Extrazellulärraum, in diesem Fall das Zellkulturmedium, sezernierten. Aus dem Kulturüberstand wurde dann, reziprok zu dem im Plasma verfolgten Ansatz, PI16 mittels eines spezifischen Antikörpers präzipitiert und anschließend im Präzipitat Chemerin mittels Immunoblot detektiert. In diesem Assay konnte wie im Plasma eine Ko-Präzipitation von PI16 und Chemerin, die in der Kontroll-IP nicht zu sehen war, nachgewiesen werden (**Abbildung 29b**).

Zum Abschluss der Interaktionsversuche bleibt festzuhalten, dass sowohl in murinem Plasma, als auch in Zellkulturüberstand eine Interaktion zwischen PI16 und Chemerin nachgewiesen werden konnte, ob diese direkt oder über weitere Proteine vermittelt wurde bleibt dabei noch zu klären.

Ergebnisse

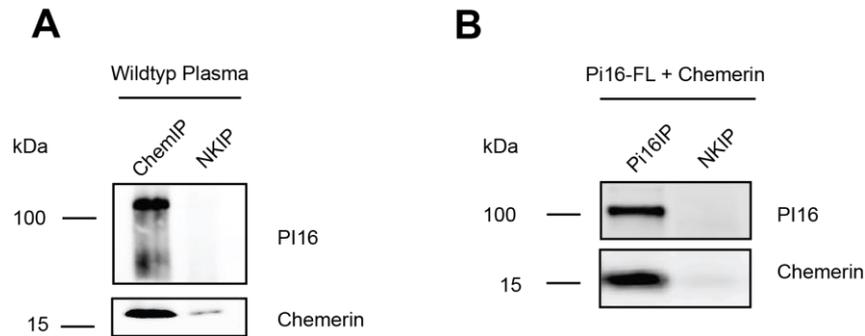


Abbildung 29: Interaktion zwischen Chemerin und PI16 in Plasma und Zellkulturüberstand: (A) Immunpräzipitation mit anti-Chemerin Antikörper bzw. Sepharose Beads allein (NKIP) aus heparinisierem Plasma von *Pi16*^{+/+}-Mäusen, Detektion mit anti-PI16 Exon 5 Antikörper und anti-Chemerin Antikörper. (B) Immunpräzipitation mit anti-PI16 Antikörper bzw. Sepharose Beads allein (NKIP) aus Zellkulturüberstand von PI16- und Chemerin-überexprimierenden HEK293-Zellen, Detektion mit anti-PI16 Exon 5 und anti-Chemerin Antikörper.

4.11.5 *Pi16*-Defizienz beeinflusst die Prozessierung von Chemerin *in vivo*

Neben der verringerten absoluten Menge an Chemerin Protein in den *Pi16*^{-/-}-Mäusen zeigten die Mäuse noch einen weiteren Phänotyp, der sich auf die Prozessierung von Chemerin bezog. Die Prozessierung ist essentiell für die Funktion von Chemerin, was bereits in vielen Publikationen gezeigt werden konnte (vgl. 1.4) und wird durch verschiedenste extrazelluläre Proteasen (Serin- und Cysteinproteasen) katalysiert (**Abbildung 4**). Konkret zeigte sich in den *Pi16*-defizienten Mäusen eine vermehrte Prozessierung von Chemerin, die sich in einer Verstärkung der niedermolekularen Bande im Vergleich zur höhermolekularen Bande im Immunoblot nach einer SDS-Gelelektrophorese auf 15% Polyacrylamid-Gelen manifestierte. Diese Beobachtung war sowohl im Myokardgewebe (**Abbildung 30a**), als auch im Fettgewebe (**Abbildung 30b**) zu machen. Beide Gewebe stellen dabei Gewebe mit hoher Abundanz von PI16 und Chemerin dar, was auf eine gegenseitige Beeinflussung der beiden Partner hindeuten könnte. Welche Prozessierungsvariante von Chemerin im SDS-Gel zu sehen war, konnte mit dieser Methode allerdings nicht abschließend geklärt werden und ist Gegenstand weiterer Nachforschungen.

Ergebnisse

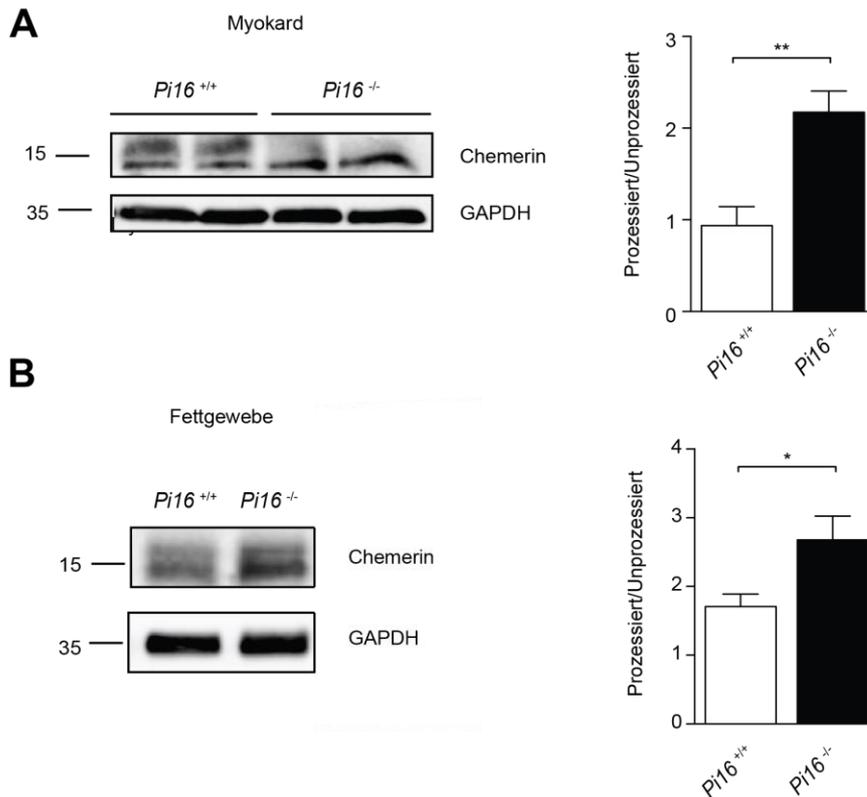


Abbildung 30: *Pi16*-Defizienz beeinflusst die Prozessierung von Chemerin im Myokard und Fettgewebe: (A) Immunoblot gegen Chemerin in basalem Myokard, Quantifizierung als Verhältnis der niedermolekularen Bande (Prozessiert) zur höhermolekularen Bande (Unprozessiert) (n = 6/7). (B) Immunoblot für Chemerin in Fettgewebe, Quantifizierung als Verhältnis der niedermolekularen Bande (Prozessiert) zur höhermolekularen Bande (Unprozessiert) (n = 6/9).

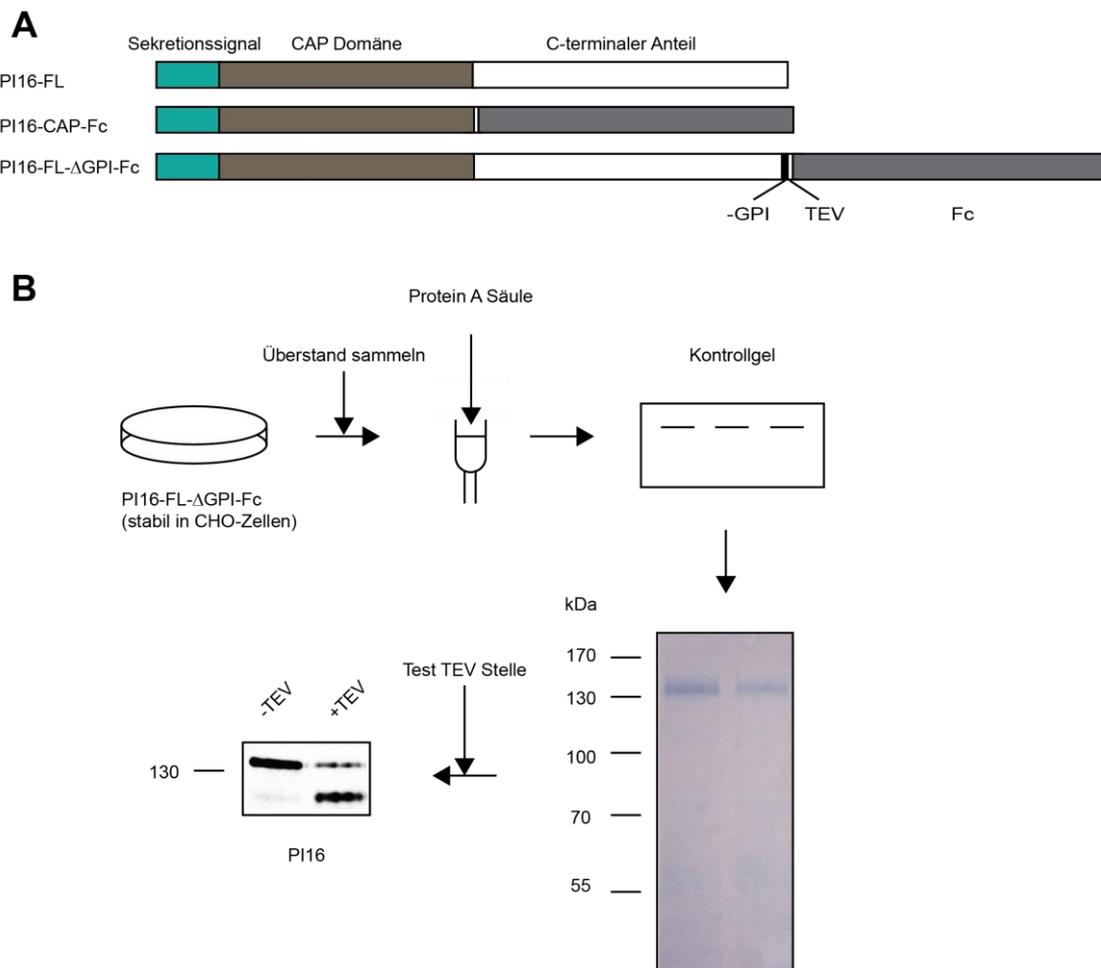
4.12 *PI16* inhibitiert die Chemerin-prozessierende Protease Cathepsin K

4.12.1 Aufreinigung von rekombinantem *PI16* aus eukaryotischer Zellkultur

In den bisherigen Ergebnissen zur Chemerinprozessierung konnte gezeigt werden, dass in den *Pi16*^{-/-}-Tieren eine Anreicherung der niedermolekularen Banden von Chemerin zu beobachten war. Dies könnte auf eine verstärkte proteolytische Prozessierung von Chemerin nach *Pi16*-Deletion hindeuten, da Chemerin posttranslational einer Aktivierung durch Proteasen bedarf um seine Funktion als Chemokin wahrzunehmen. Um einen möglichen Einfluss von *PI16* auf Chemerin-prozessierende Proteasen in einem kontrollierten Umfeld zu untersuchen musste *PI16*-Protein aus einem Zellkultursystem aufgereinigt werden. Da posttranslationale Modifikationen, wie Glykosylierungen oder die Anheftung eines GPI-Ankers, bei *PI16* eine große Rolle spielen, wurde als Produktionszelllinie eine eukaryotische Linie (CHO) gewählt. In dieser Zelllinie wurden mit einem Tag, einer spezifischen Erkennungssequenz, versehene *PI16*-Konstrukte, die entweder die CAP-Domäne von *PI16*

Ergebnisse

fusioniert an ein Fc-Tag (PI16-CAP-Fc) oder ein Volllängen-PI16 ohne die terminalen Aminosäuren 466-489 fusioniert an Fc (PI16-FL- Δ GPI-Fc) trugen, stabil in den Zellen überexprimiert. Die Konstrukte sind in **Abbildung 31a** schematisch dargestellt. Da PI16 ein sezerniertes Protein war, wurde ein Großteil der aufzureinigenden Proteine in das Zellkulturmedium sekretiert. Das Medium wurde über mehrere Passagen gesammelt und anschließend mit konstanter Flußgeschwindigkeit von 1 ml/min über eine Protein A HiTrap[®] Säule gepumpt. Das Protein A an der Säule band spezifisch den Fc-Tag des modifizierten PI16 und immobilisierte diesen an den der Sepharose. Nach Elution der an die Säule gebundenen Fraktion konnte eine definierte, saubere PI16-Bande in der Zink-Imidazol-Färbung gezeigt werden (hier exemplarisch dargestellt für PI16-FL- Δ GPI-Fc) (**Abbildung 31b**). Mit einer Probe des aufgereinigten Proteins wurde anschließend ein TEV-Verdau durchgeführt, um die Funktionalität der eingefügten Protease-Schnittstelle zu überprüfen. Dieser erbrachte ein positives Ergebnis für die Funktionalität der TEV-Schnittstelle und damit einen ersten Hinweis auf eine mögliche Funktionalität der gereinigten Konstrukte (**Abbildung 31b**).

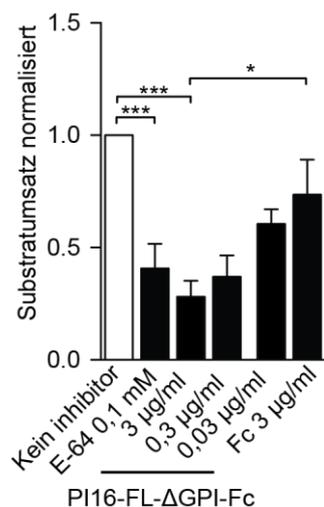


Ergebnisse

Abbildung 31: Darstellung und Aufreinigung der Fc-getaggtten PI16-Konstrukte aus CHO-Zellen: (A) Schematische Darstellung der getaggtten PI16-Konstrukte PI16-CAP-Fc, mit Deletion des C-terminalen Teils von PI16, und PI16-FL- Δ GPI-Fc, mit Deletion der GPI-Anker Erkennungssequenz, im Vergleich zu unverändertem PI16 (PI16-FL). Alle getaggtten Konstrukte enthalten eine TEV-Schnittstelle um bei Bedarf das Fc-Tag abzuspalten. (B) Darstellung der Aufreinigung aus stabil transfizierten CHO-Zellen am Beispiel von PI16-FL- Δ GPI-Fc, mit Kontrolle der Reinheit über eine Zink-Imidazol-Färbung und einem Funktionstest der TEV-Schnittstelle nach Aufreinigung mit anti-PI16-Protein Immunoblot.

4.12.2 *In vitro* Proteaseinhibition von Cathepsin K durch PI16

Die aufgereinigten PI16-Konstrukte wurden in einem *in vitro* Protease Assay getestet bei dem ein chromogenes Substrat (Z-Gly-Pro-Arg-AMC) durch die rekombinante Protease Cathepsin K umgesetzt, und dabei eine erhöhte Absorption bei 350 nm gemessen werden konnte. Bei diesem Versuch mit unterschiedlichen Konzentration des putativen Proteaseinhibitors PI16 zeigte sich, dass eine Konzentration von 3 μ g/ml rekombinantem PI16 eine ähnliche Kapazität zur Inhibition von Cathepsin K beinhaltet, wie 0,1 mM E-64, was eine Standardkonzentration für diesen small molecule-Inhibitor darstellte (**Abbildung 32**). Die Inhibition von Cathepsin K durch PI16 war dabei konzentrationsabhängig, da die Proteaseinhibition mit abnehmender Konzentration von PI16 (3 μ g/ml auf 0,03 μ g/ml) ebenfalls abnahm und wieder mehr chromogenes Substrat umgesetzt wurde. Ob dieser Befund spezifisch für das PI16-Protein und nicht durch den Fc-Anteil des Fusionskonstrukts bedingt war, wurde durch die Zugabe von aufgereinigtem Fc getestet. Hierbei konnte beobachtet werden, dass Fc allein in einer Konzentration von 3 μ g/ml, was einer ca. 4-fachen Stoffmenge im Vergleich zu PI16-FL- Δ GPI-Fc entsprach, keine vergleichbare Inhibition der Proteasefunktion von Cathepsin K zeigte (**Abbildung 32**, letzte Säule).



Ergebnisse

Abbildung 32: Cathepsin K-Inhibition durch PI16-FL- Δ GPI-Fc: Inhibition des Substratumsatzes eines chromogenes Substrats (Z-Gly-Pro-Arg-AMC) der Cysteinprotease Cathepsin K durch E-64 (0,1 mM), PI16-FL- Δ GPI-Fc (3 μ g/ml – 0,03 μ g/ml), Fc (3 μ g/ml) (n = 8).

4.12.3 Proteaseinhibition mit nativem PI16

Da PI16 nach dem harschen Aufreinigungsprozess (niedriger pH-Wert, hohe Salzkonzentration) möglicherweise nicht mehr in seiner nativen Konformation vorlag und um eine unspezifische Inhibition dadurch auszuschließen, wurde der bereits beschriebene Proteaseinhibitionsversuch noch einmal mit nativ präzipitierten PI16-Konstrukten durchgeführt. Dabei wurde auch getestet, ob die PI16-CAP-Domäne allein eine signifikante Inhibition der Proteasefunktion von Cathepsin K bedingen konnte. Als Kontrolle bei diesem Experiment diente eine Zelllinie, die nur den Fc-Teil der Fusionsproteine exprimierte (**Abbildung 33a**). Die Quantifizierung der Ergebnisse zeigte eine ca. 50%ige Reduktion des Substratumsatzes in den Gruppen mit PI16-FL- Δ GPI-Fc- und PI16-CAP-Fc-Überexpression (**Abbildung 33b**) im Vergleich zu nur Fc und auch zu keinem Inhibitor (gestrichelte Linie). Die Menge der präzipitierten PI16-Konstrukte wurde dabei mittels Zink-Imidazol-Färbung und Immunoblot für PI16 abgeschätzt und zeigte ähnliche Mengen für beide Varianten, was ein vergleichbares inhibitorisches Potential vermuten ließ (**Abbildung 33c**).

Zusammenfassend zeigte sich also in diesem Versuch, dass auch PI16-CAP-Fc eine Proteaseinhibitorfunktion ausüben konnte und diese ähnlich potent wie die von PI16-FL- Δ GPI-Fc war. Außerdem konnten die Ergebnisse aus den Versuchen mit aufgereinigtem PI16 bestätigt werden und somit eine PI16-spezifische Funktion nachgewiesen werden.

Ergebnisse

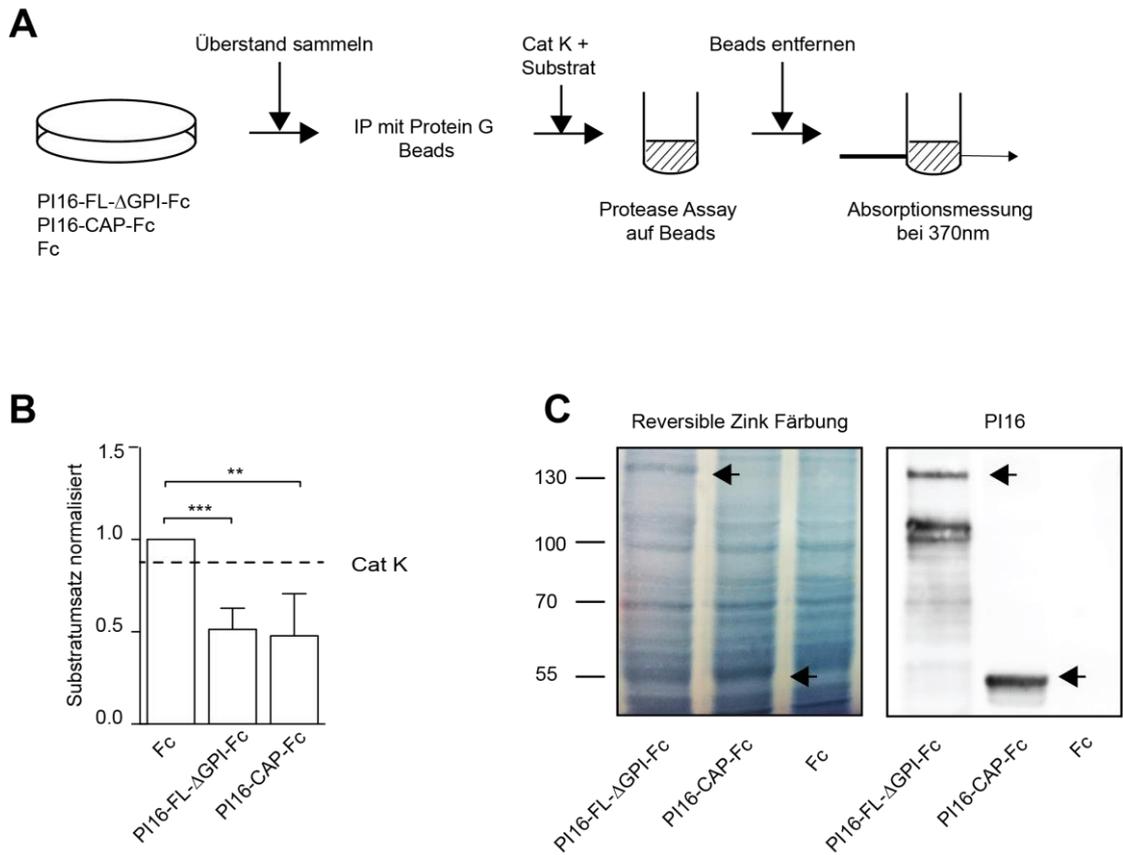


Abbildung 33: Nativ präzipitiertes PI16-FL- Δ GPI-Fc und PI16-CAP-Fc inhibieren Cathepsin K in einem *in vitro* Protease-Assay: (A) Versuchsaufbau zur Inhibition der Cathepsin K-Aktivität durch nativ aus Zellkulturüberstand präzipitiertes PI16. (B) Inhibition des Cathepsin K-Substratumsatzes durch die unterschiedlichen PI16- bzw. Fc-Konstrukte (PI16-FL- Δ GPI-Fc, PI16-CAP-Fc, Fc) (n = 8). (C) Kontrolle der Präzipitationseffizienz durch Zink-Imidazol-Färbung (Reversible Zink Färbung) und Immunoblot für PI16.

5 Diskussion

5.1 Posttranslationale Modifikationen und subzelluläre Lokalisation von PI16

PI16 wurde primär in einem Screening für sezernierte, kardiale Proteine identifiziert und in der Folge im Interstitium des erkrankten Ventrikels nachgewiesen⁷¹. Besonders interessant in Bezug auf das PI16-Protein war, dass sich sowohl die Expression der mRNA als auch der Proteingehalt im erkrankten Herzen deutlich erhöhten. Dies ließ eine Funktion in der Pathologie von Herzerkrankungen vermuten. Charakteristisch für PI16 war dabei auch das spezifische Bandenmuster, bestehend aus drei Banden (vgl. **Abbildung 8**) im denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel gewesen, was auf eine starke posttranslationale Modifikation dieses Proteins schließen ließ. Hierzu war bereits gezeigt worden, dass das Protein N-glykosyliert wurde, eine Deglykosylierung mit Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F) allerdings zu keiner Abberation im Laufverhalten der drei PI16-Banden führte⁷¹. Folglich musste PI16 noch anderweitig modifiziert werden.

Sieht man sich die Struktur bzw. Sekundärstruktur von PI16 genauer an, so stellt man fest, dass sich am N-Terminus eine hydrophobe Sequenz befindet, welche für die Insertion von PI16 ins Endoplasmatische Retikulum bzw. in den sekretorischen Exportweg essentiell ist. Neben dieser Signalsequenz zeichnet sich allerdings noch ein zweiter hydrophober Sequenzteil am C-Terminus des Proteins ab. Dieser wurde in bioinformatischen Vorhersagemodellen als Erkennungssequenz für die Anheftung eines GPI-Ankers gedeutet (**Abbildung 7**). Durch enzymatischen Verdau mittels Phosphatidylinosit-Phospholipase C (PI-PLC) konnte auch experimentell im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass PI16 an der Außenseite der Membran von Zellen lokalisierte. PI16 liegt also nicht nur frei im Interzellulärraum, sondern auch membrangebunden auf Zellen vor.

GPI-verankerte Proteine können dabei vielfältige Funktionen haben, sie dienen beispielsweise zur richtigen Positionierung von Proteinkomplexen auf der Zelloberfläche. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die GPI-verankerten Proteine Lymphocyte Antigen 6 Komplex (LY6K) und testis expressed gene 101 (TEX101) von essentieller Bedeutung für die Spermienmigration sind. Nach genetischer Deletion von TEX101 konnte die ADAM3-Protease nicht richtig auf der Zelloberfläche von Spermien lokalisieren, was zu einer massiven Störung der Spermienmigration führte⁸⁸. Die Deletion von LY6K führte zu einem ähnlichen Phänotyp, der Mechanismus konnte hierbei allerdings noch nicht vollständig geklärt werden⁸⁸. Sehr interessant in diesem Kontext ist auch eine weitere Arbeit, die eine Funktion des Enzyms Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) in Spermien und in der Wanderung von Spermien anzeigte. Es wurde beschrieben, dass die Testis-spezifische Isoform der ACE neben einer Peptidasefunktion auch eine Funktion als GPI-Anker

Diskussion

schneidendes Enzym hatte, welche nicht in der Protease-assoziierten Proteindomäne lokalisierte, da die ACE auch mit mutierter Proteasedomäne noch GPI-schneidende Funktion zeigte⁸⁹. Die ACE stellt auch in Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen ein essentielles Enzym dar, da es eines der wichtigsten Zielproteine für pharmakologische Interventionen bei Patienten mit Herzerkrankungen ist. ACE-Hemmer bilden bei diesem Krankheitsbild die Standardtherapie vieler Patienten und könnten somit auch die Menge des GPI-verankerten PI16 und anderer GPI-Proteine im Myokard beeinflussen. Dieser Befund könnte die Grundlage für eine tiefer gehende Untersuchung von PI16 bei Patienten unter ACE-Hemmer-Therapie sein. Bei dieser Diskussion ist allerdings zu beachten, dass die GPIase-Funktion der ACE noch kontrovers diskutiert wird und von anderen Arbeitsgruppen bisher nicht reproduziert werden konnte⁹⁰.

Neben der Funktion in der Wanderung von Spermien konnte für GPI-verankerte Proteine auch gezeigt werden, dass sie essentiell für die Entwicklung eines lebensfähigen Embryos sind⁹¹. Außerdem ist auch eine Zelltyp-spezifische Defizienz der GPI-Protein-Synthese im humanen System beschrieben. So führt der begrenzte Ausfall der GPI-Synthese in hämatopoetischen Stammzellen zum seltenen Krankheitsbild der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie⁹²⁻⁹⁵.

Auch im Gehirn sind GPI-verankerte Proteine von großer Bedeutung. So sind beispielsweise Prionenerkrankungen wie Creutzfeldt-Jakob oder BSE in Rindern durch Veränderungen bei GPI-verankerten Proteinen bedingt^{96,97}. Dabei kommt es durch Fehllokalisierung von Proteinen auf der Membran zur Ausbildung der Erkrankungssymptomatik. Ein mögliches Therapieprinzip hier stellen Medikamente dar, welche die Lokalisation verschiedener Proteine in bestimmten Membranarealen, den sogenannten „lipid-rafts“, verbessern.

In dieser Zusammenschau verschiedener GPI-Anker-assoziiierter Veränderungen zeigt sich, dass GPI-verankerte Proteine wie PI16 in einer Reihe von schweren Erkrankungen eine entscheidende Rolle spielen können und es deshalb sinnvoll sein kann die global *Pi16*-deletierten Tiere auch in anderen Krankheitskontexten, wie im Fortpflanzungssystem, wo bereits die Expression von PI16 gezeigt werden konnte, zu untersuchen^{79,80}. Zusätzlich konnte auch eine Assoziation mit PSP94 und eine mögliche Funktion als Biomarker für ein Rezidiv eines Prostatakarzinoms beschrieben werden^{79,80}, was eine Untersuchung von PI16 in diesem Kontext implizieren könnte.

Biochemisch erklärt die Identifikation des angefügten GPI-Ankers am C-Terminus von PI16 allerdings nur die Bande mit dem höchsten Molekulargewicht im SDS-Gel (**Abbildung 8**). Die Identität der Bande mit dem niedrigsten Molekulargewicht bleibt auch nach dieser Arbeit noch spekulativ. Eine mögliche Erklärung für diese PI16-Form könnten verkürzte Splicevarianten

Diskussion

der *Pi16*-mRNA sein. Denn neben der bekannten und auch nachgewiesenen Form des PI16-Proteins (NP_076223.3 (NCBI)) werden als Produkte dieser mRNAs für PI16 auch noch zwei kürzere Proteinvarianten XP_006525077.1 und XP_006525078.1 annotiert. Diese beiden Proteine haben Molekulargewichte von ca. 26 bzw. 23 kDa und könnten möglicherweise die kleineren Proteinvarianten im Gel erklären.

Neben der Identifikation des GPI-Ankers in dieser Arbeit konnte in früheren Arbeiten ja bereits gezeigt werden, dass PI16 an Asparagin-Resten glykosyliert war. Die enzymatische Abspaltung mittels PNGase F veränderte allerdings nichts am charakteristischen Drei-Banden-Muster von PI16⁷¹. Neben der Glykosylierung von Asparaginresten können auch Serin- und Threoninreste glykosyliert werden. Diese Glykosylierung wird O-Glykosylierung genannt⁹⁸. Zusätzlich zu diesen Aminosäuren können auch Tyrosin und Hydroxylysin als Ausgangspunkte für die O-Glykosylierung benutzt werden⁹⁹⁻¹⁰¹. Es bleibt also in der Folge zu klären, welche dieser möglichen Modifikationen für das Bandenmuster von PI16 (mit-)verantwortlich zeichnet und ob O-Glykosylierung für das abberante Laufverhalten von PI16 von Bedeutung ist.

Abschließend ist bezüglich der neuen Erkenntnisse zur Struktur von PI16 festzuhalten, dass der Nachweis der Membranverankerung von PI16 die Untersuchung der *Pi16*-defizienten Mäuse auch für weitere Forschungsgebiete abseits des kardiovaskulären Bereichs interessant macht. Die Expression von PI16 in den Fortpflanzungsorganen und dem Fettgewebe ist dabei ein erster Hinweis auf eine Rolle in diesen Organsystemen. Zusätzlich gilt es auch noch die Identität der kleinsten PI16-Bande im SDS-Gel aufzuklären und ob diese möglicherweise durch differentielle O-Glykosylierung entsteht, oder eine verkürzte Splicevariante der *Pi16*-mRNA darstellt.

5.2 PI16 als Fibroblasten-sezerniertes Protein

Wie in den Ergebnissen der Immunohistochemie dieser Arbeit gezeigt, lokalisierte PI16 im linken Ventrikel in Zellen, die von ihrer Morphologie her an Fibroblasten erinnerten (**Abbildung 11, Abbildung 12**). Auch durch eine weitere Methode, Sortierung einzelner Zellpopulationen mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS), mit den Markern PDGFR α (CD140a) für Fibroblasten, Leucocyte common antigen (CD45) für Leukozyten und Endoglin (CD105) für Endothelzellen, konnte eine präferentielle Expression von PI16 in der Fibroblasten-Fraktion des Herzens gezeigt werden (**Abbildung 12b**).

Problem bei der zweifelsfreien Isolation des *Pi16*-exprimierenden Zelltyps ist, dass für kardiale Fibroblasten kein einheitlicher, Zelltyp-spezifischer Marker existiert. Es gibt hierzu zahlreiche Studien in denen verschiedene Marker für diese Zellpopulation untersucht wurden, doch weder Fibroblast Specific Protein 1 (FSP-1)¹⁰²⁻¹⁰⁴ noch Kollagen-1 alpha-1 (Col1a1)

Diskussion

waren absolut gewebs- und Zelltyp-spezifisch^{105,106}. Sie zeigten neben dem Myokard auch Signale in der Leber¹⁰⁴ oder in Glattmuskelzellen¹⁰⁶. Auch Tcf21, welches für die embryonale Einwanderung von Fibroblastenvorläufern in das Myokard unerlässlich ist, wurde in diesem Zusammenhang untersucht. Globale Defizienz dieses Transkriptionsfaktors ist embryonal letal, da keine Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) der Fibroblastenvorläufer aus dem Epikard stattfinden kann und damit die Herzentwicklung stark beeinträchtigt ist¹⁰⁷. Dieser Faktor wird allerdings in adulten Fibroblasten nur in sehr geringer Menge exprimiert und eignet sich deshalb auch nur bedingt für die nicht genetische Markierung von adulten kardialen Fibroblasten.

Zur Funktion konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass Fibroblasten im Myokard untereinander und mit anderen Zelltypen mittels parakriner Botenstoffe kommunizieren, was die Bedeutung von sezernierten Proteinen, wie PI16, im Myokard unterstreicht. So stellte eine Studie dar, dass das Epikard durch sezernierte Faktoren die Narbenbildung und Fibroblastenfunktion nach ischämischer Verletzung regulierte¹⁰⁸. Dies konnten im Einzelnen pro-angiogene Faktoren der VEGF- (vascular endothelial growth factor), FGF- (fibroblast growth factor) oder der PDGF- (platelet derived growth factor)-Familie sein¹⁰⁸. Zusätzlich werden Fibroblasten im Herzen nicht nur passiv durch parakrine Faktoren beeinflusst, sondern beeinflussen auch aktiv durch Sekretion von Mediatoren andere Zelltypen¹⁰⁹. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass TGF- β (transforming growth factor β) aus kardialen Fibroblasten zu einer Hypertrophiereaktion in Kardiomyozyten und zur Synthese von Extrazellulärmatrix-Proteinen in Fibroblasten führte^{109,110}. Darüber hinaus konnten auch Funktionen von aus Fibroblasten sezerniertem FGF-2, CTGF und ANP, autokrin wirkend auf Fibroblasten und auf andere Zelltypen gezeigt werden¹¹¹. Diese Befunde illustrierten die Bedeutung von sezernierten Faktoren in der Pathologie und Kommunikation im Myokard. In diesem Kontext konnten auch schon erste Erkenntnisse für Peptidase Inhibitor 16 gewonnen werden. Es konnte von Frost et al bereits gezeigt werden, dass die Überexpression in Kardiomyozyten anti-hypertrophe Wirkung hatte⁷¹. Da die vorliegende Arbeit deutlich zeigen konnte, dass PI16 nativ hauptsächlich in Fibroblasten produziert wurde, muss in weiterführenden Experimenten untersucht werden, ob dies möglicherweise in einer bestimmten Subpopulation von Fibroblasten (z.B. Myofibroblasten) passiert, die spezifische Zelltypmarker trägt. Ob durch die Sekretion von PI16 zelluläre Signalwege auf anderen Zelltypen (Kardiomyozyten) oder auch autokrin auf Fibroblasten moduliert werden, wie es für andere sezernierte Faktoren wie TGF- β bereits gezeigt wurde, und PI16 dadurch seine Wirkung im Myokard entfaltet, bleibt in weiterführenden Experimenten zu klären.

5.3 Pathologie des Myokardinfarkts und PI16-Modulation

Wie bereits erwähnt, konnte in Lokalisationsstudien und auch durch quantitative RT-PCR gezeigt werden, dass PI16 in interstitiellen Zellen des Myokards lokalisiert und exprimiert wurde. Da die Expression in kardialen Fibroblasten nach längerer Kultivierung deutlich anstieg, weist dies darauf hin, dass PI16 möglicherweise in Myofibroblasten verstärkt gebildet wurde. Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass der Anstieg von PI16 im erkrankten Herzen hauptsächlich durch einen Anstieg der Expression in aktivierten Fibroblasten bedingt war. Diese aktivierten Fibroblasten sind essentiell für die Pathologie der kardialen Hypertrophie, wie bereits zuvor beschrieben, und auch in der Ausbildung und Heilung des Myokardinfarkts. Sie haben in diesen Krankheitsbildern wichtige Funktionen als inflammatorische Mediatoren und auch als Extrazellulärmatrix-Produzenten, sowohl im ischämischen Bereich des Myokardinfarkts, als auch im nicht direkt geschädigten Bereich des Myokards¹¹². Im Krankheitskontext lassen sich Fibroblastenfunktionen grob in drei Phasen während des Myokardinfarkts einteilen, die durch die Einwanderung und Funktion verschiedener spezifischer Zellpopulationen wie Monozyten, Makrophagen (M1 und M2 Makrophagen), T- und B-Zellen unterschieden werden können^{20,113,114}. Die Erste der drei Phasen wird als initiale inflammatorische Phase bezeichnet, gekennzeichnet durch eine starke Einwanderung von pro-inflammatorischen Leukozyten und starke Phagozytose von toten Zellen und Zelltrümmern im ischämischen Bereich. Als Zweites folgt eine Wachstumsphase, in welcher eingewanderte Fibroblasten und Endothelzellen proliferieren und den durch die Gewebszerstörung entstandenen Raum mit Extrazellulärmatrix ausfüllen. Zum Abschluss geht die Wachstumsphase in eine Reifungsphase der Infarkt Narbe über, welche absolut notwendig für die Ausbildung einer mechanisch stabilen Narbe ist, die den hohen mechanischen Beanspruchungen der Ventrikelwand standhält¹¹⁵.

Betrachtet man die Funktionen der Fibroblasten während der ersten, inflammatorischen Phase, so stellt man fest, dass sie dort eine Aufgabe in der Attraktion von Leukozyten, genauer von Neutrophilen und klassischen Ly6C^{high} Monozyten wahrnehmen. Diese Zellen werden durch die Sekretion verschiedener extrazellulärer Botenstoffe (Zytokine, Chemokine, Proteasen) zum Ort des Infarkts gelenkt¹¹⁶. Hier bleibt zu klären, ob PI16 aus Fibroblasten direkt oder indirekt diese Anlockung steuert, da ja gezeigt werden konnte, dass globale *Pi16*-Defizienz zu verminderter Einwanderung von Neutrophilen und Monozyten in der Akutphase des Myokardinfarkts führte.

Als Schlüsselfaktoren im Übergang zwischen der Inflammation- und Wachstumsphase bzw. Reifung der Narbe wurden die parakrinen Mediatoren TGF- β und IL-10 beschrieben, welche zum Teil auch aus Fibroblasten stammen. Sie steuern durch ihre anti-inflammatorischen Wirkungen auf Leukozyten und kardiale Zellen die Verminderung der akuten Entzündung und

Diskussion

leiten den Übergang zur Heilung ein¹¹⁶. Die Wachstums- und Heilungsphase nach einem akuten Myokardinfarkt ist nicht nur durch Veränderungen der Infarktnarbe, sondern auch durch kompensatorische Veränderungen im noch intakten Myokardgewebe gekennzeichnet. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass nach Infarkt in den nicht betroffenen Gebieten eine kompensatorische Hypertrophie der Kardiomyozyten auftrat, die den Verlust des ischämischen Bereichs kompensierte. Die Reduktion des Schlagvolumens, welches kurz nach Eintreten des Infarkts beobachtet werden konnte, wurde dabei durch eine Dilatation des Ventrikels und damit einhergehender Steigerung des Ventrikelvolumens ausgeglichen. Diese Kompensation ging allerdings mit einer verringerten Überlebensrate der Patienten einher, die durch kardiales Remodelling, bzw. Sauerstoffminderversorgung der Kardiomyozyten mit anschließender Hypertrophie¹¹⁷ und interstitieller Fibrose, und durch vermehrte Zytokin- und Aldosteronstimulation der kardialen Fibroblasten, hervorgerufen wurde^{118,119}. Hier könnte eine weitergehende Untersuchung von PI16 sinnvoll sein, da PI16 bereits eine anti-hypertrophe Wirkung auf Kardiomyozyten gezeigt hatte, welche möglicherweise das kompensatorische Remodelling beeinflussen könnte. Außerdem wurde es in dieser Arbeit auch als präferentiell exprimiert im Nicht-Infarkt-Bereich, dem Ort des kompensatorischen Remodellings, gezeigt.

Neben den beschriebenen histologischen und geometrischen Veränderungen des Ventrikels ist auch die Qualität der Veränderung, genauer die Qualität und Stabilität der Narbe nach Myokardinfarkt ein entscheidender Parameter, der die mittlere Überlebensrate von Patienten nach Myokardinfarkt beeinflusst. In der Phase der Narbenreifung ist eine verstärkte Proteaseaktivierung mit einem verstärkten kardialen Remodelling und überschießender Extrazellulärmatrix-(EZM)-produktion, d.h. mit einem steiferen Narbengewebe, assoziiert. Beides führte in Studien zu einer schlechteren Prognose für die betroffenen Patienten durch vermehrtes Auftreten von Rupturen bzw. Dilatationen des Ventrikels¹²⁰. Neben der Steuerung von Proteasen und EZM-Sekretion ist auch die Steuerung der Inflammation essentiell für die Qualität der Narbe, was beispielsweise durch die Deletion des Chemokinrezeptors CCR5 (CC Chemokin Rezeptor 5) gezeigt werden konnte. Die genetisch modifizierten Mäuse zeigten eine deutlich reduzierte Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 und ebenfalls weniger Einwanderung von regulatorischen T-Zellen in das geschädigte Gewebe. Dieser Phänotyp ging in den Mäusen mit einer verstärkten Dilatation des Ventrikels und einer schlechteren Herzfunktion einher¹²¹. Diese Funktion könnte auch für weitere Untersuchungen in Bezug auf PI16 von Bedeutung sein, da die Deletion von *Pi16* anti-inflammatorisch nach Myokardinfarkt wirkte und PI16 als Oberflächenprotein von regulatorischen T-Zellen beschrieben wurde, welches die Migration dieser beeinflusste^{81,83}. PI16 könnte hier folglich als Modulator der Narbenreifung auftreten, was allerdings noch weiterführender Untersuchungen bedarf. Auch die Funktion als Proteaseinhibitor könnte diesen Prozess

Diskussion

beeinflussen, da das Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Inhibition der einzelnen Proteasen sehr wichtig für die korrekte Ausbildung der Narbe ist¹²². Ein Proteaseinhibitor wie PI16 könnte hier die Gleichgewichtslage entscheidend verändern und dabei die Narbenreifung beeinflussen. Wichtig für diesen Prozess der Reifung sind vor allem membranverankerte Matrix-Metallo-Proteasen (MMP's), die das Geschehen nach Infarkt steuern¹²³. Hier wäre PI16 durch seine GPI-vermittelte Membranlokalisation in der idealen Position um in diese Prozesse der Zellmembran-nahen Prozessierung einzugreifen. Es bleibt zu testen, ob PI16 auf diese membranassoziierten Proteasen, wie auf Cathepsin K, inhibitorisch einwirken kann und dadurch der funktionsverbessernde Phänotyp in den *Pi16*^{-/-}-Mäusen erklärt werden könnte.

Zusammenfassend für die Funktion von PI16 nach Myokardinfarkt bleibt festzuhalten, dass der bei den *Pi16*-defizienten Mäusen beobachtete Phänotyp der besseren Performance nach Myokardinfarkt auf viele mögliche Einflussfaktoren (Proteasen, EZM-Sekretion, Inflammationsmodulation) zurückzuführen sein kann. Diese müssen im Rahmen einer Folgearbeit untersucht und weiter konkretisiert werden.

5.4 PI16 in Leukozyten und im Blutplasma

Neben der Expression von PI16 in Fibroblasten, die in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist PI16 auch als Protein auf regulatorischen T-Zellen beschrieben. Da, wie in den vorherigen Kapiteln beleuchtet, die sterile Entzündung nach Myokardinfarkt wichtig für die klinische Prognose ist, soll in diesem Abschnitt beleuchtet werden, ob neben der Funktion in Fibroblasten auch eine Funktion von PI16 in und auf Leukozyten bzw. im Blutplasma für den beobachteten Phänotyp nach MI in den genetisch modifizierten Mäusen verantwortlich sein könnte. Die Einwanderung von Leukozyten wird nach Myokardinfarkt durch die Freisetzung sogenannter DAMP's (danger associated molecular patterns) initiiert. Diese DAMP's umfassen hauptsächlich zytosolische oder nukleäre Proteine und DNA- oder RNA-Fragmente. Die Moleküle werden von gewebsständigen Makrophagen und dendritischen Zellen erkannt, welche dann über die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen (v.a. IL-1 β und TNF- α) die Einwanderung von Neutrophilen und Monozyten in die ischämische Region steuern und auch Fibroblasten zur Amplifikation dieser Signale rekrutieren¹²⁴⁻¹²⁶. Neben den bereits erwähnten Zytokinen spielt auch IL-6 (Interleukin 6) aus Leukozyten eine gewichtige Rolle in der Pathologie nach Myokardinfarkt. In Infarktpatienten zeigte sich dabei eine positive Korrelation zwischen IL-6-Plasmakonzentrationen und Remodelling-Prozessen im linken Ventrikel, nach erfolgreicher Reperfusion des ischämischen Bereichs. Außerdem zeigte sich sowohl im Infarkt-, als auch im Nicht-Infarkt Bereich des erkrankten Herzens eine deutlich erhöhte Expression der *IL6*-mRNA^{127,128}.

Diskussion

Medikamentöse Blockade des IL-6-Rezeptors durch einen anti-IL-6-Rezeptor (IL-6R) Antikörper (MR 16-1) verbesserte im experimentellen Modell des Myokardinfarkts in Mäusen signifikant die Kontraktilität und verringerte die Dilatation des Herzbeutels¹²⁹. Als Nebeneffekt konnte in dieser Studie auch eine verringerte Hypertrophie und interstitielle Fibrose im nicht-ischämischen Bereich des Ventrikels gezeigt werden¹²⁹. Da, wie in den Ergebnissen beschrieben, *Pi16*-Defizienz in den *Pi16*^{-/-}-Mäusen ebenfalls zu einer stark verringerten Expression von IL-6 im Myokard führte, könnte damit zumindest in Teilen der beobachtete, funktionsverbessernde Phänotyp nach Myokardinfarkt erklärt werden, da die IL-6R-Inhibition einen ähnlichen Phänotyp zeigte¹²⁹. Ob die Effekte auf die IL-6-Expression in den *Pi16*^{-/-}-Tieren allerdings direkt durch PI16 in Leukozyten oder indirekt über andere Mediatoren vermittelt wurden, bleibt noch in weiterführenden Experimenten zu untersuchen.

Neben der Einwanderung von Leukozyten ist auch deren Polarisierung eine wichtige Komponente, die in diesem Kontext betrachtet werden muss. So ist beschrieben, dass in der inflammatorischen Phase unterschiedliche Arten von Ly6C-positiven Monozyten einwandern (Ly6C^{high} und Ly6C^{low}). Die Ly6C^{low}-Monozyten tauchen dabei etwas später im Myokard auf und haben anti-inflammatorische Funktionen, wohingegen die Ly6C^{high}-Monozyten pro-inflammatorische Polarisierung zeigen und etwas früher im Infarktbereich nachzuweisen sind^{130,131}. Dabei ist noch nicht abschließend geklärt, ob die Monozyten bereits vor der Einwanderung ins Gewebe die Ly6C^{high} oder Ly6C^{low} Polarisierung aufweisen, oder ob eine Konversion im Gewebe zwischen den Subtypen stattfindet¹³². Was gezeigt werden konnte war, dass die verschiedenen Monozyten nicht von unterschiedlichen Vorläuferzellen im Knochenmark abstammen¹³²⁻¹³⁵. Da bisher für *Pi16*^{-/-}-Mäuse nur gezeigt werden konnte, dass die absolute Anzahl von Ly6G- und Ly6C-positiven Zellen nach Infarkt stark abnahm, stellt sich die Frage, ob neben der absoluten Anzahl auch die Polarisierung der Zellen im Gewebe der Tiere differentiell reguliert war. Dies kann in Versuchen, in denen auch die Quantität des Ly6C-Signals in den Zellen berücksichtigt wird, untersucht werden.

Da PI16, wie im Ergebnisteil gezeigt, nicht nur gewebsständig sondern auch im Plasma zu finden war, könnte es auch eine Funktion auf im Blut zirkulierende Faktoren haben, die den Phänotyp nach Myokardinfarkt beeinflussen. Was gezeigt werden konnte war, dass die Menge an PI16 im Plasma nach Infarkt nicht verändert war, im Unterschied zu der beobachteten starken Anreicherung im Myokardgewebe (**Abbildung 20b**). Für aus Leukozyten stammende, parakrin wirksame Faktoren im Plasma sind in der Literatur einige Beispiele zu finden. So wurde in klinischen Studien gezeigt, dass die lokale, intrakoronare Infusion von autologen Knochenmarkszellen die Herzfunktion moderat verbesserte. Diese Wirkung wurde dabei durch die Sekretion verschiedener Zytokine, Wachstumsfaktoren und Chemokine vermittelt¹³⁶⁻¹³⁹. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Gabe des

Diskussion

von Leukozyten sezernierten Protein MyDGF (myeloid derived growth factor) zu einer verbesserten Herzfunktion und einer verminderten Narbenbildung nach MI führte¹⁴⁰. Ein weiterer Faktor in diesem Kontext ist das anti-inflammatorische Protein TSG-6 (TNF- α induced gene 6), welches von in der Lunge lokalisierenden Stammzellen nach intravenöser Transfusion gebildet wurde, aber parakrin einen protektiven Effekt nach Infarkt im Herzen ausübte¹⁴¹.

Da in den immunologischen Studien in dieser Arbeit keine Auffälligkeiten in den absoluten Mengen der Leukozytensubpopulation und im Aktivierungsverhalten der Leukozyten, sowie in den PI16-Plasmaspiegeln der Kontrollmäusen nach MI gefunden wurden, ist die Erklärung des beobachteten Myokardinfarktphänotyps wahrscheinlich nicht auf eine Veränderung im Leukozytenkompartiment zurückzuführen. Da PI16 allerdings als Oberflächenmarker von zirkulierenden, regulatorischen T-Zellen (Tregs) beschrieben wurde^{81,83} bleibt noch zu untersuchen, ob PI16 möglicherweise durch diese Zellpopulation Einfluss auf die Infarktheilung nahm. Diese Versuche waren allerdings bisher nicht von Erfolg begleitet, da der vorhandene PI16-Antikörper leider nicht für den Einsatz im Durchflusszytometer geeignet war und damit regulatorische T-Zellen nicht untersucht werden konnten. Um abschließend zu klären, ob der Phänotyp der *Pi16*^{-/-}-Mäuse nach MI durch im Myokard ständige Zellen oder durch einwandernde Leukozyten bedingt war, ist die Transplantation von wt-Knochenmark in *Pi16*^{-/-}-Mäuse und der reziproke Ansatz als Goldstandard notwendig.

Fasst man alle bisherigen Ergebnisse bezüglich der Funktion von PI16 nach Myokardinfarkt zusammen, so weisen diese auf eine wichtige Funktion der Sekretion von PI16 aus kardialen Fibroblasten hin, was durch die Expressionsstudien und auch die immunhistochemischen Färbungen gezeigt werden konnte, in denen PI16 stark angereichert und reguliert in diesem Zelltyp zu finden war. Die Sekretion aus diesen Zellen könnte dann weitere Effektoren, wie IL-6, beeinflussen. Die Expression in Leukozyten und das Vorkommen im Plasma scheinen eine untergeordnete Rolle zu spielen, da sich beispielsweise die Plasmakonzentration von PI16 nach Myokardinfarkt nicht veränderte. Allerdings muss diese Vermutung durch weitere Experimente abschließend geklärt werden, vor allem die Funktion von regulatorischen T-Zellen im Myokardinfarktmodell und Knochenmarkschimären der *Pi16*-defizienten Mäuse mit Wildtyp-Mäusen sollten hierbei absolute Klarheit bringen.

5.5 Effekte von PI16 auf das Adipokin Chemerin

Das Serumprotein PSP94 wurde in früheren Arbeiten als ein Bindungspartner von PI16 im Serum von Mäusen beschrieben⁷⁹. PSP94 (prostate specific protein 94) ist ein Protein, welches in der Samenflüssigkeit und im Serum anzutreffen ist. Durch spezifische Fällung von PSP94 konnte in einer Studie PI16 (PSPBP = prostate specific protein 94 binding protein) als

Diskussion

Bindungspartner nachgewiesen werden⁷⁹. Das Verhältnis von freiem zu an PI16 gebundenem PSP94, sowie die absoluten Mengen von PI16, konnten in einer weiteren Veröffentlichung auch als prognostischer Marker für ein erneutes Auftreten eines Prostatakarzinoms nach radikaler Prostektomie beschrieben werden⁸⁰. Über weitere Bindungspartner war bis zum Beginn dieser Arbeit nichts bekannt.

Im Verlauf dieser Dissertation konnte nun ein weiterer Interaktor von PI16 identifiziert werden. Die Interaktion mit dem Chemokin Chemerin konnte sowohl in heparinisiertem Plasma, als auch im Zellkulturüberstand von transfizierten HEK293-Zellen zweifelsfrei nachgewiesen werden. Chemerin wird als Prä-Pro-Protein synthetisiert und in der Folge nach Abspaltung der Signalsequenz extrazellulär durch verschiedene Proteasen in seine differentiell aktiven Formen gespalten⁶⁰. Chemerin konnte bisher mit einer Vielzahl entzündlicher Erkrankungen in Verbindung gesetzt werden. So zeigte sich eine Funktion in der Pathologie von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, d.h. entzündlichen Autoimmunerkrankungen des Darms¹⁴², sowie bei der chronischen Infektion der Leber mit dem Hepatitis C Virus¹⁴³. In beiden Fällen konnte übereinstimmend eine erhöhte Menge von Chemerin im Serum der untersuchten Patienten nachgewiesen werden. Da in dieser Arbeit die zirkulierende Menge an Chemerin in den *Pi16*-defizienten Tieren als signifikant verringert nachgewiesen werden konnte, könnte PI16 auch in der Pathologie von entzündlichen Darmerkrankungen oder bei chronischen Virusinfektionen von Bedeutung sein, was die Untersuchung der *Pi16*^{-/-}-Tiere in entsprechenden Krankheitsmodellen interessant machen würde.

Die Expression von Chemerin in Zellen und Geweben kann dabei durch verschiedene Zytokine beeinflusst werden. So konnte gezeigt werden, dass TNF- α und IL-1 β in 3T3-Adipozyten zu einer verstärkten Expression von Chemerin führten^{144,145}. Des Weiteren konnte auch eine Expression in synovialen Fibroblasten, einem ähnlichen Zelltyp in dem auch PI16 verstärkt exprimiert wird, nachgewiesen werden, die sich durch TNF- α und IFN- γ stimulieren ließ¹⁴⁶. In Bezug auf eine Funktion von Chemerin im kardialen System und bei Atherosklerose konnte bisher veröffentlicht werden, dass epikardiales Fettgewebe von Patienten mit koronarer Herzerkrankung signifikant mehr Chemerin produzierte, als Gewebe von gesunden Patienten und auch als subkutanes Fettgewebe derselben Patienten⁶⁹. Diese Assoziation und die beschriebene Proteinexpression von PI16 in Fettgewebe sollten in diesem Zusammenhang noch genauer untersucht werden, da im Rahmen dieser Dissertationsarbeit eine Assoziation von PI16- und Chemerin-Gehalt im Plasma von Mäusen gezeigt werden konnte. Möglicherweise könnte der Ursprung dieses Unterschieds das Fettgewebe sein, da dort die größten Mengen an Chemerin im Organismus produziert und freigesetzt werden und PI16 ebenfalls in signifikanten Mengen vorkommt.

Diskussion

Doch nicht nur die Bindung von Chemerin an PI16 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, sondern auch ein Einfluss der *Pi16*-Defizienz auf die posttranslationale Prozessierung von Chemerin durch Proteasen. Diese findet in den meisten Fällen direkt am Ort der Entzündung statt, was durch eine quantitative Analyse der Chemerin Prozessierungsvarianten mittels ELISA und Isoform-spezifischer Antikörper gezeigt werden konnte. Dabei markierte Pro-Chemerin die dominante Form im Plasma und die prozessierten Formen herrschten im entzündeten Gewebe vor⁶⁵. Da PI16 auch direkt am Ort der Entzündung, im untersuchten Fall des Infarkts, am stärksten reguliert war, ist eine räumliche Nähe von PI16 zu der Prozessierungsmaschinerie aus Proteasen und assoziierten Faktoren von Chemerin gegeben. In den *Pi16*^{-/-}-Tieren war dabei eine Anreicherung der niedermolekularen, prozessierten Variante im Myokard und auch im Fettgewebe zu beobachten, was auf eine verstärkte Prozessierung von Chemerin in diesen Geweben hinwies. Da der Größenunterschied zwischen den beobachteten Chemerinvarianten im SDS-Gel relativ prominent war, ist davon auszugehen, dass es sich bei der prozessierten Variante nicht um eine 5-8 Aminosäuren verkürzte, aktivierte Variante von Chemerin handelte, sondern eher um die inaktive Chemerin-R125-Isoform, dessen Bildung möglicherweise PI16-abhängig durch eine Cathepsin-Protease stattfand⁵⁰. Verschiedene Proteasen konnten in diesem Kontext bisher als Chemerin-spaltend beschrieben werden, darunter Serin-Proteasen wie Cathepsin G, Mastzell-Tryptase und Neutrophile Elastase^{147,148}, aber auch Cystein-Proteasen wie Cathepsin K und L⁵⁰. Die Chemerin R125-Isoform wird dabei von Cystein-Proteasen produziert. Die Proteaseaktivität von Cystein-Proteasen wurde in einer Studie als anti-inflammatorisch charakterisiert, wohingegen die Spaltung durch Serin-Proteasen eher aktivierenden Charakter hatte¹⁴⁹. Da in den *Pi16*^{-/-}-Mäusen, in denen eine verstärkte Prozessierung beobachtet werden konnte, ein anti-inflammatorischer Phänotyp mit weniger Einwanderung von Leukozyten nach Myokardinfarkt vorherrschte, ist davon auszugehen, dass PI16 im Myokard die Inaktivierung von Chemerin durch Cystein-Proteasen regulierte. In den *Pi16*^{-/-}-Mäusen könnte beispielsweise durch proteolytische Generierung eines anti-inflammatorisch wirksamen, 15 Aminosäuren langen Peptids (C15) durch Cystein-Proteasen, welches eine gegensätzliche Funktion zu aktiviertem Chemerin einnimmt¹⁵⁰, die Entzündung vermindert werden und so die Beobachtungen dieser Arbeit erklärt werden.

Da in abschließenden *in vitro* Experimenten gezeigt werden konnte, dass rekombinantes, gereinigtes PI16 die Aktivität von Cathepsin K, einer prototypischen Cystein-Protease, in ähnlichem Maß wie der etablierte Hemmstoff E-64 inhibieren konnte, ist dies ein weiteres Argument für die Richtigkeit der Hypothese, dass PI16 die Prozessierung von Chemerin im Myokard und Fettgewebe durch Hemmung von Cystein-Proteasen beeinflusste. Dies gilt es

Diskussion

allerdings noch in einer anschließenden *in vivo* Studie zu untermauern, bzw. mit schonender aufgereinigtem, rekombinantem PI16 mit höherer Reinheit, zu reproduzieren.

Ob die verstärkte Prozessierung von Chemerin in den *Pi16*^{-/-}-Mäusen der einzige Grund für die verminderte Einwanderung von Neutrophilen und Monozyten nach MI war muss ebenfalls noch in weiteren Versuchen abschließend geklärt werden. Zwar ist Chemerin als Attraktor für dendritische Zellen⁴⁸ und Makrophagen¹⁵¹ beschrieben, eine Funktion im Kontext des Myokardinfarkts wurde allerdings bisher nicht in der Literatur erwähnt. Außerdem spielen auch weitere Zytokine und Chemokine in der Rekrutierung von Leukozyten ins geschädigte Myokardgewebe eine prominente Rolle. Es wäre hierbei interessant Chemerin-defiziente Mäuse¹⁵² einer Koronararterienligation zu unterziehen und zu untersuchen, ob sich ein ähnlicher Phänotyp wie bei den *Pi16*^{-/-}-Tieren einstellen würde.

Abschließend kann also die Frage, ob Chemerin das Effektormolekül ist, welches für den Phänotyp nach Myokardinfarkt in den *Pi16*^{-/-}-Tieren verantwortlich zeichnet, nicht vollständig geklärt werden. Was gezeigt werden konnte ist, dass PI16 durch seine Proteaseinhibitorfunktion die posttranslationale Prozessierung von Chemokinen, hier am Beispiel von Chemerin, entscheidend beeinflussen konnte und dadurch modulierend auf die Inflammation im Myokard einwirken konnte.

6 Zusammenfassung

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems zählen zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Dabei wird durch pathologische Veränderungen der Gefäße oder des Myokards die Versorgung des Körpers vermindert. Hierbei ist das Endstadium der chronischen Herzerkrankung die chronische Herzinsuffizienz, welche durch verschiedene Grunderkrankungen wie beispielsweise Myokardhypertrophie oder Myokardinfarkt bedingt sein kann. Da die chronische Herzinsuffizienz bisher nur symptomatisch behandelbar ist, werden die Krankheitsmechanismen intensiv erforscht. In diesem Kontext war der sezernierte Faktor Peptidase Inhibitor 16 (PI16) als stark hochreguliert im erkrankten, hypertrophen Herzen beschrieben worden⁷¹. Es waren als Vorarbeit modifizierte Mäuse generiert worden, die einen genetischen Knock-out des PI16-Proteins erlaubten. Gegenstand der hier vorgelegten Arbeit war die Untersuchung dieser Mäuse im kardialen Krankheitsmodell und die Aufklärung der Lokalisation von PI16 *in vivo*. Bei der Untersuchung der Gewebs- und zellassozierten Lokalisation zeigte sich zum einen, dass PI16 nicht ausschließlich als sezerniertes Protein im Interstitium zu finden war, sondern auch membranassoziiert über einen GPI-Anker vorlag. Zum anderen konnte der PI16-exprimierende Zelltyp im Myokard mittels histologischer Methoden und Primärzellisolation via FACS, auf kardiale Fibroblasten eingegrenzt werden. Bei der kardialen Phänotypisierung der *Pi16*-defizienten Mäuse zeigte sich im Hypertrophiemodell (TAC) keine Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe, beim Krankheitsmodell des Myokardinfarkts war allerdings eine deutliche Verbesserung der Funktion und eine verringerte Größe der Infarkt Narbe zu beobachten. In Folgeuntersuchungen konnte zusätzlich eine signifikant verminderte Einwanderung von Neutrophilen und Monozyten in der Akutphase nach Infarkt gezeigt werden, die mit einer Abnahme pro-inflammatorischer Zytokine (IL-6, IL-1 β) einher ging. Des Weiteren konnte eine Interaktion zwischen PI16 und dem Chemokin Chemerin, das u.a. Chemotaxis von Leukozyten reguliert - gezeigt werden. *Pi16*-Defizienz beeinflusste zusätzlich die Prozessierung von Pro-Chemerin im Gewebe durch Inhibition von Cystein-Proteasen, hier am Beispiel von Cathepsin K.

Diese Erkenntnisse zeigten, dass PI16 in die Heilungsprozesse nach Myokardinfarkt eingebunden war und dabei Einfluss auf den Prozess der sterilen Entzündung im Infarktbereich nahm. Weitere Untersuchungen bezüglich der PI16-Funktion im kranken Myokard werden ein zukünftiges therapeutisches Potential für PI16 Modulation in kardialen Erkrankungen aufdecken.

7 Summary

Diseases of the cardiovascular system account for the most causes of death worldwide. In these diseases pathological changes in the vasculature and the myocardium diminish the oxygen supply of the body. The endpoint of the chronic heart diseases is called heart failure which can be triggered by initial diseases like myocardial hypertrophy or -infarction. As there is no causal treatment available until now, the mechanistic principles of the disease are of great interest to the scientific community.

In this context the factor peptidase inhibitor 16 (PI16) had previously been reported by the host lab as highly upregulated in the diseased, hypertrophic heart. In a previous work floxed mice were developed that allowed directed global genetic deletion of the *Pi16*-allele *in vivo*. Genetically *Pi16*-deficient mice were phenotyped for cardiac disease alterations and localization studies of PI16 in the murine organism were performed. Regarding the studies on tissue and cellular localization it could be shown first, that PI16 is not solely secreted in the interstitium but also exists membrane associated via a GPI-anchor. Second, the cell type expressing PI16 in the myocardium could be narrowed to the cardiac fibroblast by histological studies and primary cell isolation via FACS. At the cardiac phenotyping of the *Pi16*-deficient mice no phenotype could be observed in the cardiac hypertrophy model of TAC compared to the control group, however in the disease model of myocardial infarction, the *Pi16*-deficient mice showed improved cardiac function and diminished scar size 4 weeks after MI. In further studies it could be shown that the number of invading neutrophils and monocytes in the acute phase after infarct was significantly decreased, accompanied by diminished expression of pro-inflammatory cytokines like IL-6 and IL-1 β . Furthermore an interaction between the chemokine chemerin, which regulates leukocyte chemotaxis, and PI16 was proven. *Pi16*-deficiency thereby influenced the processing of pro-chemerin in the tissue by the inhibition of a cysteine protease (cathepsin K).

In summary these results show that PI16 was involved in the healing phase after myocardial infarction and influenced the sterile inflammation process in the infarct area. Further investigations concerning PI16-function in the diseased myocardium will reveal the possible therapeutic potential of PI16-modulation in cardiac disease, especially in ischemic heart disease.

8 Literatur

1. WHO The top 10 causes of death. at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
2. Mendis, S., Puska, P. & Norrving, B. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. *World Heal. Organ.* 2–14 (2011).
3. Miller, G., Hughes-Cromwick, P. & Roehrig, C. National spending on cardiovascular disease, 1996–2008. *J. Am. Coll. Cardiol.* **58**, 2017–2019 (2011).
4. Heart failure statistics. *EMORY Healthc.* (2015). at <http://www.emoryhealthcare.org/heart-failure/learn-about-heart-failure/statistics.html>
5. Dickstein, K. *et al.* ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart. 933–989 (2008). doi:10.1016/j.ejheart.2008.08.005
6. McMurray, J. J. V *et al.* ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012. *Eur. J. Heart Fail.* **14**, 803–869 (2012).
7. Schultz, S. *et al.* Proteolytic activation of prochemerin by kallikrein 7 breaks an ionic linkage and results in C-terminal rearrangement. *Biochem. J.* **452**, 271–80 (2013).
8. Houser, S. R. *et al.* Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. *Circ. Res.* **111**, 131–150 (2012).
9. Krayenbuehl, H. P. *et al.* Left ventricular myocardial structure in aortic valve disease before, intermediate, and late after aortic valve replacement. *Circulation* **79**, 744–755 (1989).
10. Wakatsuki, T., Schlessinger, J. & Elson, E. L. The biochemical response of the heart to hypertension and exercise. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 609–617 (2004).
11. Whelan, R. S., Kaplinskiy, V. & Kitsis, R. N. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu. Rev. Physiol.* **72**, 19–44 (2010).
12. Song, Y. H. *et al.* Icariin attenuates cardiac remodelling through down-regulating myocardial apoptosis and matrix metalloproteinase activity in rats with congestive heart failure. *J. Pharm. Pharmacol.* **63**, 541–549 (2011).

Literatur

13. Jiang, F. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin 1–7: novel therapeutic targets. *Nat. Rev. Cardiol.* **11**, 413–426 (2014).
14. Wong, N. D. Epidemiological studies of CHD and the evolution of preventive cardiology. *Nat. Rev. Cardiol.* **11**, 276–89 (2014).
15. Saraste, A. *et al.* Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* **95**, 320–323 (1997).
16. Anzai, T. Post-Infarction Inflammation and Left Ventricular Remodeling. *Circ. J.* **77**, 580–587 (2012).
17. Naito, K. *et al.* Increased Body Temperature After Reperfused Acute Myocardial Infarction Is Associated With Adverse Left Ventricular Remodeling. *J. Card. Fail.* **13**, 25–33 (2007).
18. Choi, J.-H. *et al.* Identification of antigen-presenting dendritic cells in mouse aorta and cardiac valves. *J. Exp. Med.* **206**, 497–505 (2009).
19. Pinto, A. R. *et al.* An abundant tissue macrophage population in the adult murine heart with a distinct alternatively-activated macrophage profile. *PLoS One* **7**, (2012).
20. Nahrendorf, M. *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* **204**, 3037–3047 (2007).
21. Swirski, F. K. & Nahrendorf, M. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science* **339**, 161–6 (2013).
22. Hofmann, U. *et al.* Activation of CD4 + T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation* **125**, 1652–1663 (2012).
23. Anzai, A. *et al.* Regulatory role of dendritic cells in postinfarction healing and left ventricular remodeling. *Circulation* **125**, 1234–45 (2012).
24. Halade, G. V. Targeting Resolution of Inflammation Following Myocardial Infarction. **1**, 6–8 (2013).
25. Heinzl, S. Beta blockers in heart failure. *Med. Monatsschr. Pharm.* **19**, 37 (1996).

Literatur

26. Flather, M. D. *et al.* Long-term ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left-ventricular dysfunction: a systematic overview of data from individual patients. ACE-Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group. *Lancet* **355**, 1575–1581 (2000).
27. Hasselblad, V. *et al.* Relation between dose of loop diuretics and outcomes in a heart failure population: Results of the ESCAPE Trial. *Eur. J. Heart Fail.* **9**, 1064–1069 (2007).
28. Felker, G. M. *et al.* Diuretic strategies in patients with acute decompensated heart failure. *N. Engl. J. Med.* **364**, 797–805 (2011).
29. Ezekowitz, J. a. & McAlister, F. a. Aldosterone blockade and left ventricular dysfunction: A systematic review of randomized clinical trials. *Eur. Heart J.* **30**, 469–477 (2009).
30. Pitt, P. Numb Er 10 the Effect of Spironolactone on Morbidity and Mortality in Patients With Severe Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* **341**, 709–717 (1999).
31. Pasquié, J. *et al.* New England Journal. 2373–2383 (2010). doi:10.1056/NEJMoa1407764
32. Mudd, J. O. & Kass, D. a. Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature* **451**, 919–928 (2008).
33. Goldenberg, I. *et al.* Survival with Cardiac-Resynchronization Therapy in Mild Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* 1–8 (2014). doi:10.1056/NEJMoa1401426
34. Jaski, B. E. *et al.* Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID Trial), a First-in-Human Phase 1/2 Clinical Trial. *J. Card. Fail.* **15**, 171–181 (2009).
35. Jessup, M. *et al.* Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID): A phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in patients with advanced heart failure. *Circulation* **124**, 304–313 (2011).
36. Zsebo, K. *et al.* Long-term effects of AAV1/SERCA2a gene transfer in patients with severe heart failure: Analysis of recurrent cardiovascular events and mortality. *Circ. Res.* **114**, 101–108 (2014).
37. Greenberg, B. *et al.* Design of a Phase 2b Trial of Intracoronary Administration of

Literatur

- AAV1/SERCA2a in Patients With Advanced Heart Failure. The CUPID 2 Trial (Calcium Up-Regulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease Phase 2b). *JACC Hear. Fail.* **2**, 84–92 (2014).
38. Heart, A., Program, F. T. & Diego, S. Celladon Reports Negative Results for CUPID2 Trial of MYDICAR (R) in Advanced Heart Failure. **6053**, 30–31 (2015).
 39. Dobaczewski, M., Chen, W. & Frangogiannis, N. G. Transforming growth factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **51**, 600–606 (2011).
 40. Abbate, A. *et al.* Effects of interleukin-1 blockade with anakinra on adverse cardiac remodeling and heart failure after acute myocardial infarction [from the virginia commonwealth university-anakinra remodeling trial (2) (vcu-art2) pilot study]. *Am. J. Cardiol.* **111**, 1394–1400 (2013).
 41. Cohen, S. *et al.* Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, in combination with methotrexate: Results of a twenty-four-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* **46**, 614–624 (2002).
 42. de Lemos, J. A. *et al.* Serial Measurement of Monocyte Chemoattractant Protein-1 After Acute Coronary Syndromes. *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**, 2117–2124 (2007).
 43. Carrabba, N., Valenti, R., Parodi, G., Santoro, G. M. & Antoniucci, D. Left ventricular remodeling and heart failure in diabetic patients treated with primary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation* **110**, 1974–1979 (2004).
 44. Tang, T.-T. *et al.* Regulatory T cells ameliorate cardiac remodeling after myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.* **107**, 232 (2012).
 45. In, C., Path, T. H. E., To, D. & Practice, C. HHS Public Access. **159**, 197–204 (2015).
 46. López, B., González, A. & Díez, J. Circulating biomarkers of collagen metabolism in cardiac diseases. *Circulation* **121**, 1645–1654 (2010).
 47. Tazarotene-induced gene 1 (TIG1), a novel retinoic acid receptor-responsive gene in skin. at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8601727>>
 48. Wittamer, V. *et al.* Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J. Exp. Med.* **198**, 977–985 (2003).
 49. Wittamer, V. *et al.* Specific Recruitment of Antigen-presenting Cells by Chemerin , a

Literatur

- Novel Processed Ligand from Human Inflammatory Fluids. **198**, 977–986 (2003).
50. Kulig, P. *et al.* Regulation of chemerin chemoattractant and antibacterial activity by human cysteine cathepsins. *J. Immunol.* **187**, 1403–10 (2011).
 51. Kulig, P. *et al.* Staphylococcus aureus-derived staphopain B, a potent cysteine protease activator of plasma chemerin. *J. Immunol.* **178**, 3713–3720 (2007).
 52. Zabel, B. a, Silverio, A. M. & Butcher, E. C. Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood. *J. Immunol.* **174**, 244–251 (2005).
 53. Goralski, K. B. *et al.* Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J. Biol. Chem.* **282**, 28175–88 (2007).
 54. Muruganandan, S. *et al.* Chemerin, a Novel Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ) Target Gene That Promotes Mesenchymal Stem Cell Adipogenesis. *J. Biol. Chem.* **286**, 23982–23995 (2011).
 55. Bozaoglu, K. *et al.* Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology* **148**, 4687–4694 (2007).
 56. Kaur, J., Adya, R., Tan, B. K., Chen, J. & Randeve, H. S. Identification of chemerin receptor (ChemR23) in human endothelial cells: chemerin-induced endothelial angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 1762–8 (2010).
 57. Issa, M. E. *et al.* Chemokine-like receptor 1 regulates skeletal muscle cell myogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **302**, C1621–31 (2012).
 58. Ernst, M. C., Issa, M., Goralski, K. B. & Sinal, C. J. Chemerin exacerbates glucose intolerance in mouse models of obesity and diabetes. *Endocrinology* **151**, 1998–2007 (2010).
 59. Sell, H. *et al.* Chemerin is a novel adipocyte-derived factor inducing insulin resistance in primary human skeletal muscle cells. *Diabetes* **58**, 2731–2740 (2009).
 60. Mattern, A., Zellmann, T. & Beck-Sickinger, A. G. Processing, signaling, and physiological function of chemerin. *IUBMB Life* **66**, 19–26 (2014).
 61. Guillabert, A. *et al.* Role of neutrophil proteinase 3 and mast cell chymase in chemerin proteolytic regulation. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 1530–1538 (2008).

Literatur

62. Du, X.-Y. *et al.* Regulation of chemerin bioactivity by plasma carboxypeptidase N, carboxypeptidase B (activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor), and platelets. *J. Biol. Chem.* **284**, 751–8 (2009).
63. Meder, W. *et al.* Characterization of human circulating TIG2 as a ligand for the orphan receptor ChemR23. *FEBS Lett.* **555**, 495–499 (2003).
64. Ernst, M. C. & Sinal, C. J. Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity. *Trends Endocrinol. Metab.* **21**, 660–667 (2010).
65. Zhao, L. *et al.* Chemerin158K protein is the dominant chemerin isoform in synovial and cerebrospinal fluids but not in plasma. *J. Biol. Chem.* **286**, 39520–7 (2011).
66. Cash, J. L. *et al.* Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23. *J. Exp. Med.* **205**, 767–775 (2008).
67. Cash, J. L., Christian, A. R. & Greaves, D. R. Chemerin peptides promote phagocytosis in a ChemR23- and Syk-dependent manner. *J. Immunol.* **184**, 5315–24 (2010).
68. Cash, J., Bena, S. & Headland, S. Chemerin15 inhibits neutrophil-mediated vascular inflammation and myocardial ischemia-reperfusion injury through ChemR23. *EMBO Rep.* **00**, (2013).
69. Gao, X. *et al.* Association of chemerin mRNA expression in human epicardial adipose tissue with coronary atherosclerosis. *Cardiovasc. Diabetol.* **10**, 87 (2011).
70. Bozaoglu, K. *et al.* Chemerin, a novel adipokine in the regulation of angiogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **95**, 2476–85 (2010).
71. Frost, R. J. a & Engelhardt, S. A secretion trap screen in yeast identifies protease inhibitor 16 as a novel antihypertrophic protein secreted from the heart. *Circulation* **116**, 1768–75 (2007).
72. Yamakawa, T. *et al.* cDNA cloning of a novel trypsin inhibitor with similarity to pathogenesis-related proteins, and its frequent expression in human brain cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* **1395**, 202–208 (1998).
73. Koshikawa, N. *et al.* Purification and identification of a novel and four known serine proteinase inhibitors secreted by human glioblastoma cells. *J. Biochem.* **119**, 334–339 (1996).

Literatur

74. Gibbs, G. M., Roelants, K. & O'Bryan, M. K. The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins--roles in reproduction, cancer, and immune defense. *Endocr. Rev.* **29**, 865–97 (2008).
75. Choudhary, V. & Schneider, R. Pathogen-Related Yeast (PRY) proteins and members of the CAP superfamily are secreted sterol-binding proteins. *Proc. Natl. ...* (2012). doi:10.1073/pnas.1209086109/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1209086109
76. Gibbs, G. M. *et al.* The cysteine-rich secretory protein domain of Tpx-1 is related to ion channel toxins and regulates ryanodine receptor Ca²⁺ signaling. *J. Biol. Chem.* **281**, 4156–63 (2006).
77. Gibbs, G. M. *et al.* Cysteine-rich secretory protein 4 is an inhibitor of transient receptor potential M8 with a role in establishing sperm function. (2011). doi:10.1073/pnas.1015935108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1015935108
78. Schneider, R. & Di Pietro, A. The CAP protein superfamily: function in sterol export and fungal virulence. *Biomol. Concepts* **4**, 519–525 (2013).
79. Reeves, J. R. *et al.* Identification, purification and characterization of a novel human blood protein with binding affinity for prostate secretory protein of 94 amino acids. *Biochem. J.* **385**, 105–14 (2005).
80. Reeves, J. R., Dulude, H., Panchal, C., Daigneault, L. & Ramnani, D. M. Prognostic value of prostate secretory protein of 94 amino acids and its binding protein after radical prostatectomy. *Clin. Cancer Res.* **12**, 6018–6022 (2006).
81. Sadlon, T. J. *et al.* Genome-wide identification of human FOXP3 target genes in natural regulatory T cells. *J. Immunol.* **185**, 1071–81 (2010).
82. Hori, S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science (80-.)*. **1057**, (2007).
83. Nicholson, I. C. *et al.* PI16 is expressed by a subset of human memory Treg with enhanced migration to CCL17 and CCL20. *Cell. Immunol.* **275**, 12–8 (2012).
84. Jentzsch, C. Identifizierung und Charakterisierung funktionell relevanter kardialer Faktoren. (2011).
85. Kopp, J. & Schwede, T. The SWISS-MODEL Repository of annotated three-dimensional protein structure homology models. *Nucleic Acids Res.* **32**, D230–D234

Literatur

- (2004).
86. Kiefer, F., Arnold, K., Kunzli, M., Bordoli, L. & Schwede, T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res.* **37**, D387–D392 (2009).
 87. Sonja Sichler. Funktionelle Charakterisierung des Proteins Peptidase--- Inhibitor 16 im Myokardinfarktmodell. (2013).
 88. Fujihara, Y., Okabe, M. & Ikawa, M. GPI-Anchored Protein Complex, LY6K/TEX101, Is Required for Sperm Migration into the Oviduct and Male Fertility in Mice. *Biol. Reprod.* **90**, 60 (2014).
 89. Kondoh, G. *et al.* Angiotensin-converting enzyme is a GPI-anchored protein releasing factor crucial for fertilization. *Nat. Med.* **11**, 160–6 (2005).
 90. Leisle, L., Parkin, E. T., Turner, A. J. & Hooper, N. M. Angiotensin-converting enzyme as a GPIase: a critical reevaluation. *Nat. Med.* **11**, 1139–1140 (2005).
 91. Nozaki, M. *et al.* Developmental abnormalities of glycosylphosphatidylinositol-anchor-deficient embryos revealed by Cre/loxP system. *Lab. Invest.* **79**, 293–299 (1999).
 92. Ikezawa, H. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 409–417 (2002).
 93. Kinoshita, T., Ohishi, K. & Takeda, J. GPI-anchor synthesis in mammalian cells: genes, their products, and a deficiency. *J. Biochem.* **122**, 251–257 (1997).
 94. Brodsky, R. A. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* **124**, 2804–2811 (2014).
 95. Karadimitris, a & Luzzatto, L. The cellular pathogenesis of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K* **15**, 1148–1152 (2001).
 96. Marella, M., Lehmann, S., Grassi, J. & Chabry, J. Filipin prevents pathological prion protein accumulation by reducing endocytosis and inducing cellular PrP release. *J. Biol. Chem.* **277**, 25457–25464 (2002).
 97. Vincent, B. *et al.* Phorbol ester-regulated cleavage of normal prion protein in HEK293 human cells and murine neurons. *J. Biol. Chem.* **275**, 35612–35616 (2000).
 98. Stanley, P. Golgi glycosylation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, 1–13 (2011).

Literatur

99. Halim, A. *et al.* Site-specific characterization of threonine, serine, and tyrosine glycosylations of amyloid precursor protein/amyloid beta-peptides in human cerebrospinal fluid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 11848–53 (2011).
100. Steentoft, C. *et al.* Mining the O-glycoproteome using zinc-finger nuclease–glycoengineered SimpleCell lines. *Nat. Methods* **8**, 977–982 (2011).
101. Characterization and of Several Quantitative Carbohydrate Determination Units of the. *Analysis* **244**, (1960).
102. Kong, P., Christia, P., Saxena, A., Su, Y. & Frangogiannis, N. G. Lack of specificity of fibroblast-specific protein 1 in cardiac remodeling and fibrosis. *AJP Hear. Circ. Physiol.* **305**, H1363–H1372 (2013).
103. Zeisberg, E. M. *et al.* Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat. Med.* **13**, 952–961 (2007).
104. Österreicher, C. H., Penz-österreicher, M., Grivennikov, S. I. & Guma, M. Fibroblast-specific protein 1 identifies an inflammatory subpopulation of macrophages in the liver. (2010). doi:10.1073/pnas.1017547108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1017547108
105. Henderson, N. C. *et al.* Europe PMC Funders Group Selective α v integrin depletion identifies a core , targetable molecular pathway that regulates fibrosis across solid organs. **19**, 1–26 (2014).
106. Moore-morris, T. *et al.* Resident fibroblasts are principal contributors to cardiac fibrosis with pressure overload. **2013**, (2013).
107. Acharya, a. *et al.* The bHLH transcription factor Tcf21 is required for lineage-specific EMT of cardiac fibroblast progenitors. *Development* **139**, 2139–2149 (2012).
108. Zhou, B. *et al.* Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. *J. Clin. Invest.* **121**, 1894–1904 (2011).
109. Kamo, T., Akazawa, H. & Komuro, I. Cardiac Nonmyocytes in the Hub of Cardiac Hypertrophy. *Circ. Res.* **117**, 89–98 (2015).
110. Cartledge, J. E. *et al.* Functional crosstalk between cardiac fibroblasts and adult cardiomyocytes by soluble mediators. *Cardiovasc. Res.* **105**, 260–270 (2015).

Literatur

111. Schultz, J. E. J. *et al.* Fibroblast growth factor-2 mediates pressure-induced hypertrophic response. *J. Clin. Invest.* **104**, 709–719 (1999).
112. Shinde, A. V. & Frangogiannis, N. G. Fibroblasts in myocardial infarction: A role in inflammation and repair. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **70**, 74–82 (2014).
113. Yan, X. *et al.* Temporal Dynamics of Cardiac Immune Cell Accumulation Following Acute Myocardial Infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* (2013). doi:10.1016/j.yjmcc.2013.04.023
114. Dewald, O. *et al.* CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ. Res.* **96**, 881–889 (2005).
115. Frangogiannis, N. G. The Mechanistic Basis of Infarct Healing. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 1907–1939 (2006).
116. Frangogiannis, N. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ. Res.* **110**, 159–173 (2012).
117. Ertl, G., Gaudron, P. & Hu, K. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental and clinical studies. *Basic Res. Cardiol.* **88 Suppl 1**, 125–137 (1993).
118. Cohn, J. N., Ferrari, R. & Sharpe, N. Cardiac remodeling[mdash]concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.* **35**, 569–582 (2000).
119. Pfeffer, M. a & Braunwald, E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* **81**, 1161–1172 (1990).
120. Bujak, M. *et al.* Essential role of Smad3 in infarct healing and in the pathogenesis of cardiac remodeling. *Circulation* **116**, 2127–2138 (2007).
121. Dobaczewski, M., Xia, Y., Bujak, M., Gonzalez-Quesada, C. & Frangogiannis, N. G. CCR5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart, mediating recruitment of regulatory T cells. *Am. J. Pathol.* **176**, 2177–2187 (2010).
122. Ma, Y. *et al.* Myofibroblasts and the extracellular matrix network in post-myocardial infarction cardiac remodeling. *Pflugers Arch.* (2014). doi:10.1007/s00424-014-1463-9
123. Spinale, F. G., Janicki, J. S. & Zile, M. R. Membrane-associated matrix proteolysis and

Literatur

- heart failure. *Circ. Res.* **112**, 195–208 (2013).
124. Hao, K. *et al.* Free heme is a danger signal inducing expression of proinflammatory proteins in cultured cells derived from normal rat hearts. *Mol. Immunol.* **48**, 1191–202 (2011).
 125. van den Akker, F., Deddens, J. C., Doevendans, P. a & Sluijter, J. P. G. Cardiac stem cell therapy to modulate inflammation upon myocardial infarction. *Biochim. Biophys. Acta* **1830**, 2449–58 (2013).
 126. Swirski, F. K. & Nahrendorf, M. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science* **339**, 161–6 (2013).
 127. Deten, A., Volz, H. C., Briest, W. & Zimmer, H.-G. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats. *Cardiovasc. Res.* **55**, 329–340 (2002).
 128. Kaminski, K. a. *et al.* Coronary sinus concentrations of interleukin 6 and its soluble receptors are affected by reperfusion and may portend complications in patients with myocardial infarction. *Atherosclerosis* **206**, 581–587 (2009).
 129. Kobara, M. *et al.* Antibody against interleukin-6 receptor attenuates left ventricular remodelling after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc. Res.* **87**, 424–430 (2010).
 130. Geissmann, F. *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* **327**, 656–661 (2010).
 131. Carlin, L. M. *et al.* Nr4a1-dependent Ly6Clow monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell* **153**, 362–375 (2013).
 132. Nahrendorf, M. & Swirski, F. K. Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart. *Circ. Res.* **112**, 1624–33 (2013).
 133. Yona, S. *et al.* Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity* **38**, 79–91 (2013).
 134. Sunderkötter, C. *et al.* Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J. Immunol.* **172**, 4410–4417 (2004).
 135. Varol, C. *et al.* Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* **204**, 171–180 (2007).

Literatur

136. Gnecchi, M. *et al.* Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat. Med.* **11**, 367–368 (2005).
137. Gnecchi, M., Zhang, Z., Ni, A. & Dzau, V. J. Paracrine Mechanisms in Adult Stem Cell Signaling and Therapy. *Circ. Res.* **103**, 1204–1219 (2008).
138. Urbich, C. *et al.* Proteomic characterization of human early pro-angiogenic cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **50**, 333–336 (2011).
139. Ranganath, S. H., Levy, O., Inamdar, M. S. & Karp, J. M. Harnessing the Mesenchymal Stem Cell Secretome for the Treatment of Cardiovascular Disease. *Cell Stem Cell* **10**, 244–258 (2012).
140. Korf-Klingebiel, M. *et al.* Myeloid-derived growth factor (C19orf10) mediates cardiac repair following myocardial infarction. *Nat. Med.* **21**, 140–149 (2015).
141. Lee, R. H. *et al.* Intravenous hMSCs Improve Myocardial Infarction in Mice because Cells Embolized in Lung Are Activated to Secrete the Anti-inflammatory Protein TSG-6. *Cell Stem Cell* **5**, 54–63 (2009).
142. Weigert, J. *et al.* Circulating levels of chemerin and adiponectin are higher in ulcerative colitis and chemerin is elevated in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **16**, 630–637 (2010).
143. Kukla, M. *et al.* Chemerin, vaspin and insulin resistance in chronic hepatitis C. *J. Viral Hepat.* **17**, 661–667 (2010).
144. Parlee, S. D., Ernst, M. C., Muruganandan, S., Sinal, C. J. & Goralski, K. B. Serum chemerin levels vary with time of day and are modified by obesity and tumor necrosis factor- α . *Endocrinology* **151**, 2590–602 (2010).
145. Kralisch, S. *et al.* Interleukin-1 β induces the novel adipokine chemerin in adipocytes in vitro. *Regul. Pept.* **154**, 102–106 (2009).
146. Kaneko, K. *et al.* Chemerin activates fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **13**, R158 (2011).
147. Wittamer, V. *et al.* Neutrophil-mediated maturation of chemerin: a link between innate and adaptive immunity. *J. Immunol.* **175**, 487–493 (2005).
148. Zabel, B. a. *et al.* Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades. *J. Biol. Chem.* **280**, 34661–34666 (2005).

Literatur

149. Yoshimura, T. & Oppenheim, J. J. Chemerin reveals its chimeric nature. *J. Exp. Med.* **205**, 2187–2190 (2008).
150. Cash, J. L. *et al.* Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23. *J. Exp. Med.* **205**, 767–775 (2008).
151. Herova, M., Schmid, M., Gemperle, C. & Hersberger, M. ChemR23, the Receptor for Chemerin and Resolvin E1, Is Expressed and Functional on M1 but Not on M2 Macrophages. *J. Immunol.* (2015).
152. Takahashi, M. *et al.* Chemerin regulates β -cell function in mice. *Sci. Rep.* **1**, 123 (2011).

9 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan Engelhardt für das mir anvertraute Dissertationsthema und die Möglichkeit dieses am Institut für Pharmakologie und Toxikologie zu bearbeiten. In der mehrjährigen Zusammenarbeit gab er mir immer wieder neue Impulse und riss mich durch seinen unerschütterlichen wissenschaftlichen Enthusiasmus mit. Zusätzlich danke ich ihm dafür, dass er mir mehrere Teilnahmen an Kongressen und Symposien ermöglicht hat, durch die ich viele interessante Personen kennengelernt und auch viel wissenschaftlichen Input bekommen habe.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Küster danke ich für die Betreuung meiner Arbeit und die initialen massenspektrometrischen Analysen, die ich in Zusammenarbeit mit seiner Arbeitsgruppe, vor allem mit Dr. Zhixiang Wu, durchführen durfte.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Dirk Busch und seiner Arbeitsgruppe, dabei allen voran Dr. Thure Adler, für die sehr gute Zusammenarbeit bei der immunologischen Charakterisierung der Mäuse.

Der Pathologie am Helmholtz Zentrum Neuherberg möchte ich für die Hilfe bei der histologischen Analyse der Mäuse danken. Insbesondere Frau Dr. Julia Calzada-Wack danke ich für die Aufarbeitung der Proben und die Hilfe bei den mikroskopischen Aufnahmen.

Auch Herrn Prof. Dr. Christian Weber und dem Team des IPEK München danke ich für die fruchtbaren Diskussionen und Ideen bezüglich des Chemerinteilprojekts.

Ein besonderer Dank gilt auch allen Mitgliedern des Instituts für Pharmakologie. Der Zusammenhalt innerhalb der Gruppe und die große Hilfsbereitschaft haben mir über viele Probleme während meiner Doktorarbeitszeit geholfen. Speziell möchte ich Frau Dr. Claudia Jentsch für die Generierung der *Pi16*-defizienten Mäuse und die gute Einführung in das Projekt danken. Auch Dr. Deepak Ramanujam, Dr. Andrea Ahles sowie Laura Hinz möchte ich für ihre Hilfe bei multiplen methodischen und experimentellen Problemen danken. Eine besondere Erwähnung sollen hier auch Sabine Brummer, Lucia Koblitz, Astrid Vens und Urzula Kremser erhalten, die mir bei vielen Experimenten durch ihre langjährige Erfahrung sehr weitergeholfen haben.

Ich habe in meiner Zeit am IPT viele Freundschaften geschlossen, die sicher auch über meine Doktorarbeit hinaus Bestand haben werden.

Zu guter Letzt danke ich noch meinen Eltern und engen Freunden, die mich zu dem gemacht haben was und wer ich heute bin. Besonders die bedingungslose Unterstützung und Hilfe meiner Mutter auf meinem ganzen Lebensweg war immer mein Rückhalt. Vielen Dank!