

Die Rolle von Gremlin-1 und seiner Bindungspartner im kardiovaskulären System

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Diplom-Biologin Martina Constanze Schneider
aus Albstadt-Ebingen

Tübingen

2014

Tag der mündlichen Qualifikation:

02.03.15

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. Hans-Georg Rammensee

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Herz – der Motor unseres Kreislaufsystems	1
1.2 Die Koronare Herzkrankheit – von der Entstehung der Arteriosklerose und des Myokardinfarktes	1
1.2.1 MIF und seine Funktion in Arteriosklerose assoziierten Prozessen	5
1.3 Das Protein Gremlin-1 (Grem1)	8
1.3.1 Die Struktur und die Synthese von Grem1	8
1.3.2 Die TGF- β Superfamilie und ihre Signalwege	10
1.3.3 Die bekannten molekularen Interaktionspartner von Grem1 und ihre Wirkungen	12
1.3.4 Wirkungsweise und Expression von Grem1 in der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen	14
1.3.5 Wirkungsweise und Expression von Grem1 im Herzen	15
1.4 Ziel der Arbeit	16
2. Material und Methoden	18
2.1 Protein-biochemische Methoden	18
2.1.1 Herstellung von Zellysat für den Westernblot	18
2.1.2 SDS-Gelelektrophorese	18
2.1.3 Westernblot	20
2.1.4 Immundetektion	21
2.1.6 Proteinaufreinigung	24
2.1.7 Dialyse von aufgereinigtem Protein	24
2.1.8 IgG ELISA zur Bestimmung der Proteinkonzentration	25
2.2 Zellbiologische Methoden	25
2.2.1 Verwendete Zelllinien und Zellkulturmaterialien	25
2.2.1.1 Zellkulturmedien	25
2.2.1.2 Zelllinien	26
2.2.2 Isolierung von humanen Monozyten aus Vollblut	26
2.2.3 Isolierung von murinen Monozyten aus der Milz	27
2.2.4 Generierung einer humanen Makrophagen-/Schaumzellkultur	28
2.2.5 Isolierung von humanen Thrombozyten aus Vollblut	28
2.2.6 Flp-In TM -CHO Zellen und Flp-In TM CHO-mGrem1-Fc Zellen	29
2.2.7 Stabile Transfektion zur Herstellung der Zelllinie Flp-In TM CHO-mGremlin-1-Fc	30
2.2.8 Isolierung von RNA aus Zellen	31

2.3 Molekularbiologische Methoden	31
2.3.1 Plasmidherstellung und Klonierung	31
2.3.2 Isolation von RNA aus murinen Arterien und Herzen	33
2.3.4 Konzentrationsbestimmung der RNA	34
2.3.5 cDNA-Synthese	34
2.3.6 Polymerasekettenreaktion (PCR) von murinem Gewebe und humanen Monozyten	35
2.3.7 Nachweis des PCR-Produkts mittels Elektrophorese im Agarosegel	36
2.3.8 RT-PCR	36
2.4 Funktionale Assays	38
2.4.1 Dynamische Adhäsion unter Flussbedingungen (Flusskammer)	38
2.4.2 Migrationsassay von humanen Monozyten (Chemotaxis)	39
2.4.3 Aktivierungsabhängiges Sekretionsverhalten humaner Monozyten	41
2.4.4 Muriner Schaumzellbildungsassay	41
2.4.5 Humaner Schaumzellbildungsassay	42
2.4.6 In vitro Kollagenassay	42
2.4.7 Konfokale Immunzellmikroskopie	43
2.5 In vivo Versuche	45
2.5.1 Tiere	45
2.5.2 Mausmodell der Artherosklerose und Krankheitsprogression	46
2.5.2 Mausmodell der myokardialen Ischämie/Reperfusion	46
2.5.3 Behandlung mit mGremlin-1-Fc in der ApoE ^{-/-} Versuchsreihe	47
2.5.4 Behandlung mit mGremlin-1-Fc im myokardialen Ischämie/Reperfusionmodells	47
2.5.6 Echokardiographische Untersuchung des linken Ventrikels	48
2.5.7 Evansblue Färbung der Herzen und Auswertung der Infarktgröße	49
2.5.8 Histologische Untersuchungen	50
2.5.8.1 Vorbereitung der Gefäße und Herzen zur histologischen Untersuchung	50
2.5.8.2 Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung	51
2.5.8.3 Masson-Goldner (Trichrom) Färbung	51
2.5.8.4 Immunhistochemie	52
2.5.8.6 Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie von Aorten und Herzgewebe	56
2.6 Statistische Auswertung	57
3. Ergebnisse	58
3.1 Grem1 und MIF in der Atherogenese	58
3.1.1 Expression von Grem1 und MIF in mononukleären Zellen des kardiovaskulären Systems	58

3.1.2 <i>Grem1</i> ist verstärkt exprimiert in atherosklerotischem Plauegewebe von ApoE ^{-/-} Mäusen	59
3.1.3 Die molekulare Interaktion von <i>Grem1</i> und MIF	60
3.1.4 Aktivierungsabhängige Freisetzung von <i>Grem1</i> aus Monozyten	63
3.1.5 <i>Grem1</i> beeinflusst die Sekretion von MIF aus Monozyten	66
3.1.6 Funktionelle Charakterisierung der molekularen <i>Grem1</i> und MIF Interaktion im Flusskammermodell	67
3.1.7 Einfluss der molekularen Interaktion von <i>Grem1</i> und MIF auf die Chemotaxis humaner Monozyten	68
3.2 Herstellung und funktionelle Charakterisierung von m <i>Grem1</i> -Fc	69
3.2.1 Aufbau und Expression des rekombinanten Proteins m <i>Grem1</i> -Fc	69
3.2.2 Funktionelle <i>in vitro</i> Charakterisierung von m <i>Grem1</i> -Fc	71
3.2.2.1 m <i>Grem1</i> -Fc reduziert die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und Schaumzellen	71
3.2.3 Auswirkungen von m <i>Grem1</i> -Fc <i>in vivo</i> auf die Ausprägung der Atherosklerose	74
3.2.3.1 Einfluss von m <i>Grem1</i> -Fc auf die TNF- α Expression und leukozytäre Zellpopulation	76
3.3 Die Rolle von <i>Grem1</i> und seine Interaktion mit TGF β -1 im Myokardinfarkt	78
3.3.1 Myokardiale Expression von <i>Grem1</i>	78
3.3.2 Die molekulare Interaktion von <i>Grem1</i> und TGF β -1	80
3.3.3 Der Einfluss von m <i>Grem1</i> -Fc auf die TGF β -1 abhängigen „Remodeling“-Prozesse im <i>in vitro</i> Modell	84
3.3.4 Effekte von m <i>Grem1</i> -Fc nach akutem Myokardinfarkt	86
3.2.4.1 m <i>Grem1</i> -Fc verringert die Infarktgröße nach operativer Induktion einer myokardialen Ischämie	87
3.3.4.2 m <i>Grem1</i> -Fc verbessert die linksventrikuläre Pumpfunktion nach operativer Induktion einer myokardialen Ischämie	88
3.3.4.3 Einfluss von m <i>Grem1</i> -Fc auf die qualitative und quantitative Zellularität im 7d MI Modell	89
4. Diskussion	94
4.1 Die molekulare Interaktion von <i>Grem1</i> und MIF unter <i>in vitro</i> Bedingungen in mononukleären Zellen des kardiovaskulären System	95
4.2 Der Einfluss des Proteins m <i>Grem1</i> -Fc auf atherogene Prozesse	99
4.3 Die molekulare Interaktion von <i>Grem1</i> und TGF β -1 in Prozessen des myokardialen Infarkts	102
4.4 Der Einfluss von m <i>Grem1</i> -Fc auf myokardiale Prozesse post Infarkt	104

5 Zusammenfassung	108
6. Summary	109
7. Literaturverzeichnis	110
8. Anhang	123
8.1 Abkürzungsverzeichnis	123
8.2 Tabellenverzeichnis	126
8.3 Abbildungsverzeichnis	127
8.4 Erklärungen	130
8.5 Danksagungen	131
8.6 Lebenslauf	132
8.7 Publikationen	133

1. Einleitung

1.1 Das Herz – der Motor unseres Kreislaufsystems

Das menschliche Herz ist ein etwa faustgroßer Hohlmuskel der direkt unterhalb des Brustbeins (Sternum) liegt und der vom Herzbeutel (Perikard) umgeben wird. Das Herz ist aus vier Kammern aufgebaut: der linken und rechten Herzkammer (Ventrikel) und den Vorhöfen (Atrien). Das Blut wird in zwei getrennten Kreisläufen durch Kontraktions- und Entspannungsbewegungen des Herzens durch den gesamten Körper gepumpt. Der rechte Ventrikel treibt dabei den Lungenkreislauf an und es wird sauerstoffarmes Blut vom Herzen zur Lunge gepumpt, wo es mit Sauerstoff angereichert wird und wieder zum Herzen zurückgeführt wird. Der linke Ventrikel versorgt über Arterien und Kapillargefäße den großen Körperkreislauf, wobei die umliegenden Organe und Gewebe mit Sauerstoff versorgt werden. Das Blut nimmt aber auch Stoffwechselabbauprodukte auf, bevor es durch das venöse System wieder zurück in den rechten Ventrikel geleitet wird. Ein Herzzyklus setzt sich dabei aus den Kontraktionsphasen (Systole) und den Erschlaffungsphasen (Diastole) zusammen. Das Blutvolumen, was hierbei pro Zeiteinheit durch den linken Ventrikel gepumpt wird, hängt von zwei Faktoren ab. Zum einem von der Zahl der Schläge pro Minute (Herzschlagfrequenz), zum anderen von der Blutmenge, die vom linken Ventrikel bei Kontraktionen ausgeworfen wird (Herzschlagvolumen). Das durchschnittliche Schlagvolumen eines Menschen beträgt 75 ml ⁴⁸.

1.2 Die Koronare Herzkrankheit – von der Entstehung der Arteriosklerose und des Myokardinfarktes

Als eine der häufigsten Todesursachen weltweit gelten kardiovaskuläre Erkrankungen, wie die koronare Herzkrankheit (KHK). Allein in den Vereinigten Staaten war die Hälfte der Sterbefälle eine Folge der KHK (siehe Abbildung 1.1). Die Arteriosklerose ist hierbei in den meisten Fällen der primäre pathologische Prozess, welcher zur Entstehung einer KHK führt

⁵⁵.

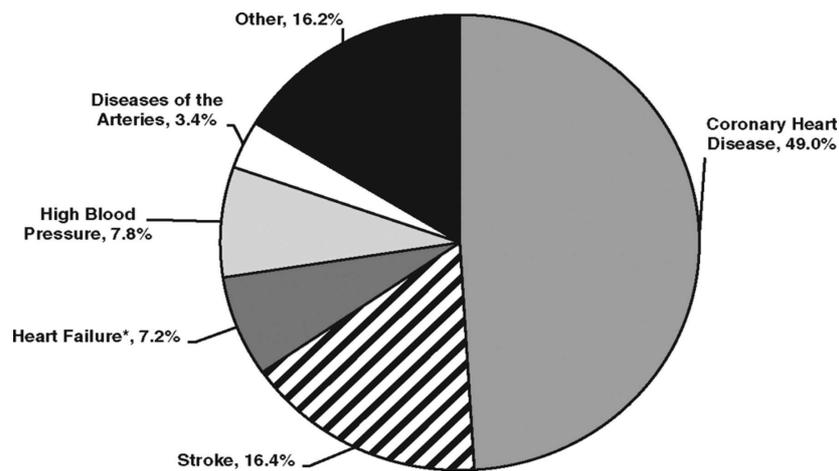


Abbildung 1.1: Statistische Auswertung der Sterbefälle bedingt durch KHK im Jahr 2009 in den USA (nach Go et al. 2013⁵⁹)

Die Arteriosklerose ist ein chronisch entzündlicher Prozess, in dessen Folge es zu Endothelläsionen bzw. endothelialer Dysfunktion kommt, welche durch Ablagerungen von Lipiden und kollagenreichem Bindegewebe (Plaques) in der Intima, Proliferation von glatten Muskelzellen, sowie in späteren Stadien auch durch die Ablagerung von Calciumsalzen in nekrotisierten Plaquanteilchen charakterisiert ist (siehe Abbildung 1.2). Zu den Risikofaktoren der Arterioskleroseentstehung gehören Hypertonie, Rauchen, Diabetes mellitus, genetische Dispositionen sowie Hyperlipoproteinämie⁴⁸.

Infolge der Endothelläsionen kommt es zu einer verstärkten Einwanderung von „Low Density Lipoprotein - (LDL)“ in die Intima. Dort wird das LDL durch Myeloperoxidasen, 15-Lipoxygenasen und/oder Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS) oxidiert⁵⁸. Durch die andauernde Oxidation der Lipoproteine und des oxidativen Stresses kommt es zur Ausschüttung von Cytokinen durch das Endothel, wodurch verstärkt Adhäsionsmoleküle wie Selektine und intrazelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM-1/2) sowie vaskuläre Adhäsionsmoleküle (VCAM-1) exprimiert werden, die ein Einwandern von Monozyten in die Intima begünstigen^{48, 185}. Zusätzlich wird die Migration von Monozyten durch das Cytokin Monozyten-Chemotaktisches-Protein 1 (MCP-1) angeregt¹⁸⁵. Das Cytokin „Macrophage Migration Inhibitory Factor - (MIF)“ spielt als Ligand der CXC Chemokinrezeptoren dabei ebenfalls eine Rolle bei Regulation der Monozyten Rekrutierung in Bereichen mit inflammatorischen arteriosklerotischen Vorgängen⁹. Unter dem Einfluss des Monozyten-Kolonie Stimulierungsfaktor (M-CSF) kommt es zur Differenzierung der Monozyten in Makrophagen im subendothelialen Bereich der Intima, sowie zur verstärkten Expression von Scavenger-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Die Makrophagen phagozytieren dann mittels Scavenger-Rezeptoren das oxidierte LDL (oxLDL) und wandeln sich im weiteren Verlauf in Schaumzellen um. Die Makrophagen können eine Vielzahl von Cytokinen/Chemokinen und Wachstumsfaktoren sekretieren, welche die verschiedenen Phasen der Arteriosklerose

beeinflussen können ¹⁸⁴. Zusammen mit extrazellulär abgelagertem Cholesterol und Lymphozyten bilden die Schaumzellen dann subintimale Lipidablagerungen aus (fatty streaks), aus denen im Verlauf der Zeit ein Plaque entsteht. Des Weiteren kommt es unter dem Einfluss von Thrombozyten, Endothelzellen und Makrophagen zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie „Platelet-Derived Growth Factor - (PDGF)“, wodurch die Migration und Proliferation glatter Muskelzellen angeregt wird. Die Muskelzellen sekretieren Proteoglykane und Bindegewebsfasern, wodurch der Plaque von einer fibrösen Kappe umschlossen wird ⁴⁸. Infolge der Progression der Arteriosklerose kommt es zum Absterben von Endothelzellen, Makrophagen und glatten Muskelzellen durch nekrotische sowie apoptotische Prozesse ⁵⁰. Als Folge einer solch vorliegenden Gefäßveränderung kann eine Plaqueruptur zur Thrombose und vollständigen Verschließung des Gefäßes führen, wodurch ein Herzinfarkt ausgelöst werden kann.

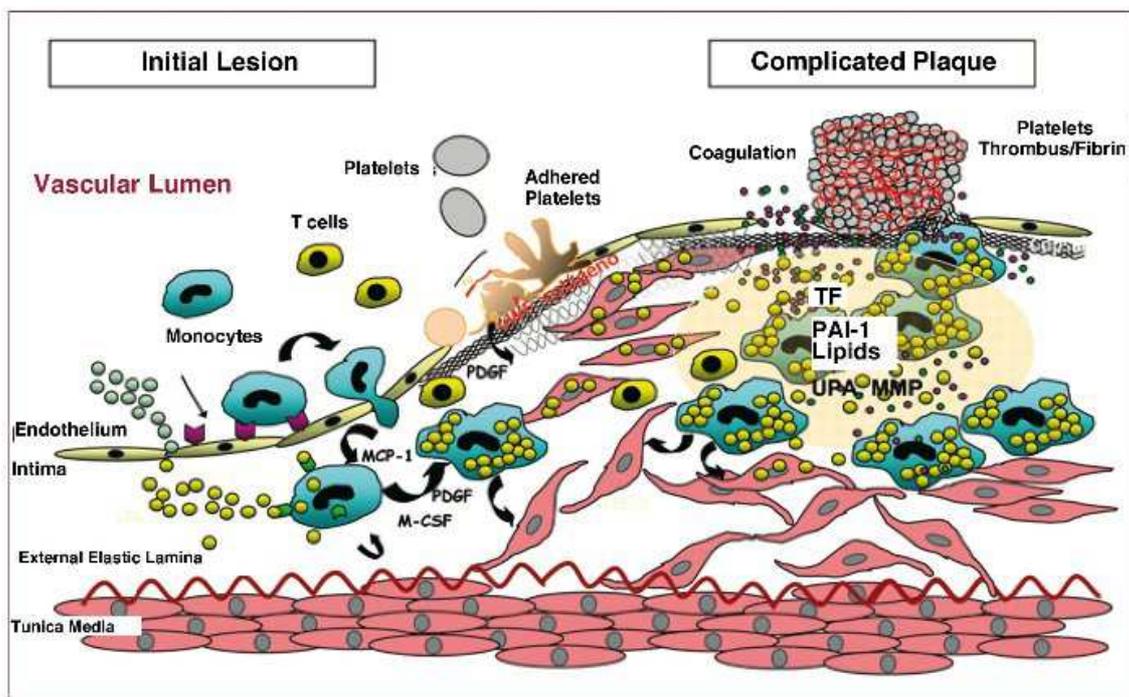


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der schrittweisen Entstehung eines arteriosklerotischen Plaques: 1.) **Initiale Läsion:** Akkumulation von Lipoproteinpartikeln in der Intima; Oxidativer Stress, einschließlich modifizierter LDL induzieren die lokale Cytokinproduktion durch das Endothel; Expression von Adhäsionsmolekülen des Endothels (CAMs); Einwanderung von Monozyten in die Intima; Ausdifferenzierung der Monozyten zu Makrophagen, welche über den Scavenger-Rezeptor oxLDL phagozytieren, Entstehung von Schaumzellen; Migration glatter Muskelzellen von der Media in die Intima unter verstärkter Proliferation; 2.) **Plaquemanifestation und Thrombusformation:** Ausbildung von Plaques aus Muskel-, Endothel- und Schaumzellen sowie Ansammlung extrazellulärer Matrixproteine im Plaque (7), Calcifizierung, weiterführende Fibrose und Zelltod durch Nekrose/Apoptose und Thrombusausbildung. M-CSF macrophage colony stimulating factor; MCP-1, monocyte chemotactic protein 1; MMP, metalloproteinases; PAI-1, plasminogen

activator inhibitor 1; PDGF, platelet-derived growth factor; TF, tissue factor; UPA, urokinase plasminogen activator. (nach Badimon et al. 2009⁷)

Der Verschluss eines Gefäßes führt zu einer Unterversorgung des myokardialen Gewebes an Blut (Ischämie) und Sauerstoff (Hypoxie) gefolgt von einer Wiederherstellung des Blutflusses (Reperfusion)⁴¹. Abhängig von der jeweiligen Dauer der Ischämie und Reperfusion (IR) wurde eine Klassifizierung der folgenden Auswirkungen der myokardialen Prozesse in drei verschiedene Phasen eingeteilt (siehe Abbildung 1.3). Wenn die ischämische Phase weniger als fünf Minuten andauert werden nur kardiale Arrhythmien sichtbar, es kommt dabei aber zu keiner ventrikulären Kontraktionsdysfunktion oder zum kardialen Zelltod. Das sekundäre Level, das als „Stunning“ (Betäubung des Myokards) bezeichnet wird, ist charakterisiert durch eine Dauer der Ischämie von fünf bis 20 Minuten, was zu einer reversiblen ventrikulären Kontraktionsdysfunktion ohne Zelltod von Kardiomyozyten führt^{12, 135}. Als Ursachen gelten hierbei eine systolische Überladung mit Calcium, eine verminderte Calciumsensitivität der Myofilamente während der Reperfusion und eine Schädigung durch Radikale, die freigesetzt wurden¹⁸¹. Die schwerwiegendste Form wird erreicht, wenn eine ischämische Phase über 20 Minuten andauert, wodurch es zur irreversiblen Schädigung von Kardiomyozyten kommt und dies zur Apoptose führt^{135, 161}. Die stärkste Auswirkung der Ischämie ist hierbei die Nekrose, welche zum Absterben von Myokardgewebe führt. Dabei werden zunächst endokardiale Bereiche von der Nekrose betroffen, weshalb sich das Narbengewebe immer beginnend vom Endokard (subendokardiale Ischämie) in Richtung Epikard (transmurale Ischämie) ausbreitet (¹³⁸, siehe Abbildung 1.4). Seine endgültige Größe hat das Infarktareal nach ca. sechs Stunden nach einem Infarkt erreicht. Erkennbar ist diese Phase auch serologisch nach Untergang der Kardiomyozyten durch einen Anstieg von Markern wie Troponin T und CK/CK-MB. Nach erfolgter Reperfusion kann es bei mäßiger, nicht transmuraler Ischämie noch zu einer langsamen Wiederherstellung der Kontraktilität des Myokards kommen. Diese davon betroffenen Gebiete des Myokards werden als „Hybernating Myokard“ (Myokard im Winterschlaf) bezeichnet¹⁸¹.

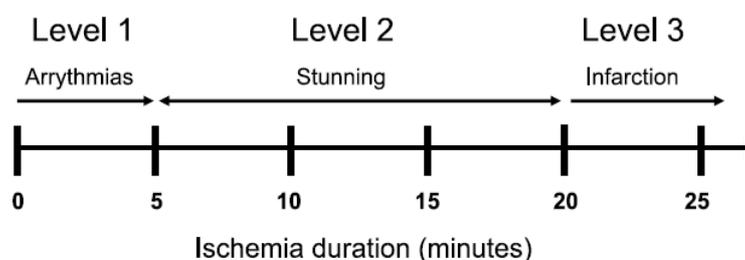


Abbildung 1.3: Darstellung der drei Stufen der myokardialen Ischämie/Reperfusion (nach Powers et al. 2007¹³⁵)

Somit ist der frische Infarkt nach 6-8 h erkennbar als nekrotischer Bereich. Nach dem Ablauf einer Woche ist im Infarktbereich rotes Granulationsgewebe erkennbar, welches kapillarreich

ist. Der Bereich der Nekrose baut sich im Verlauf von 6-8 Wochen ab und wird durch kollagenreiches Bindegewebe ersetzt und es bildet sich eine Myokardnarbe aus ¹⁷².

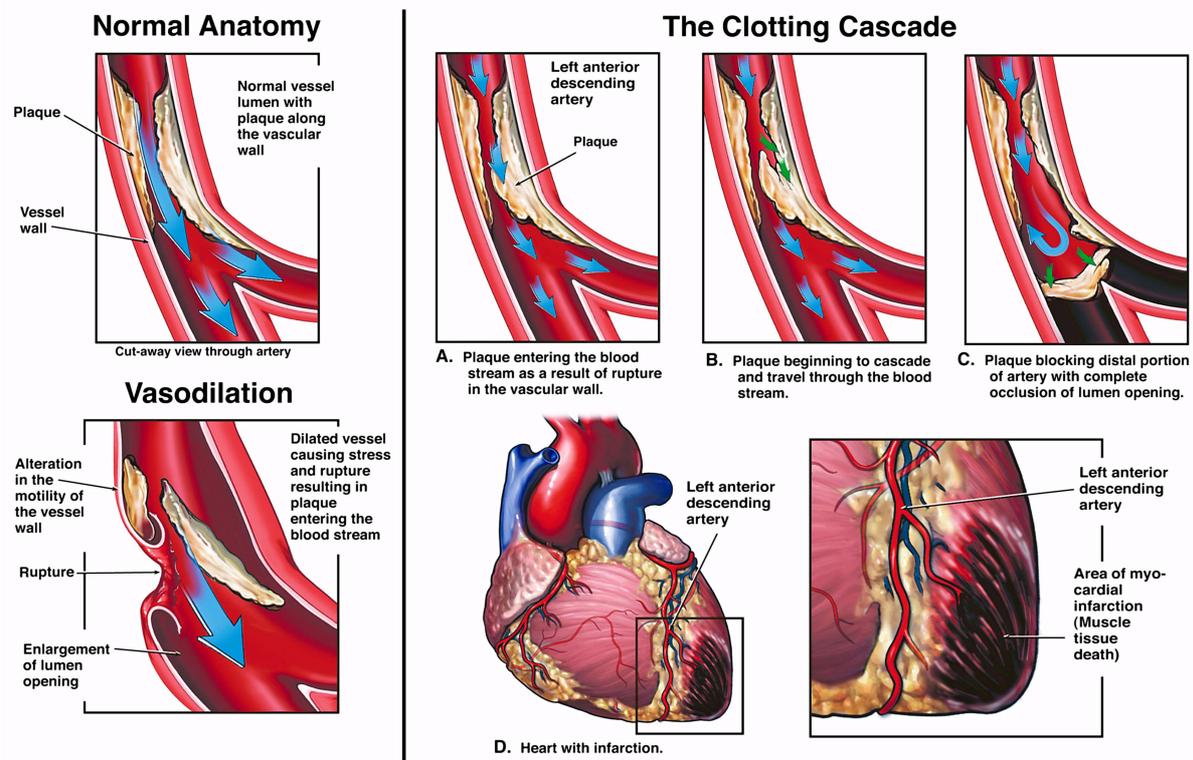


Abbildung 1.4: Auslösung eines myokardialen Infarkts aufgrund der Plaque Ruptur einer Koronararterie ¹

1.2.1 MIF und seine Funktion in Arteriosklerose assoziierten Prozessen

Das Protein MIF ist ein proinflammatorischer Faktor, der bei einer Reihe inflammatorischer und akuter und chronischer Erkrankungen eine Rolle spielt wie der Rheumatoiden Arthritis oder der Arteriosklerose ¹¹⁵. Alle Chemokine tragen von ihrer Struktur her eine N-terminale charakteristische Cysteinsequenz, sowie drei antiparallele β -Stränge (30s-, 40s-, und 50s-Schleifen) und eine C-terminale α -helikale Struktur ³¹. Man zählt MIF zur Klasse der CLFs („Chemokine-like function“) Chemokinen, da es in seiner Struktur nicht die charakteristischen N-terminalen Cysteine aufweist ¹⁷³. MIF wird verstärkt exprimiert in arteriosklerotischen Plaques, insbesondere in Makrophagen und Endothelzellen nach erfolgter Stimulierung dieser Zellen mit oxLDL, Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α), Angiotensin II (AT II) oder Interferon γ (INF- γ) ¹²⁷. Durch MIF selbst werden viele inflammatorische Faktoren und Adhäsionsmoleküle wie TNF- α , Interleukin-1- β (IL-1- β) ^{19, 20, 89}, ICAM-1 und VCAM-1 hochreguliert . MIF hat eine Chemokin-ähnliche Wirkung auf Monozyten über seinen

¹ <http://www.alamy.com/comp/ADW1XD/Mechanism-of-Myocardial-Infarction-Due-to-Ruptured-Coronary-Artery.jpg>

Rezeptor CXCR2 und auf T-Zellen über seinen Rezeptor CXCR4. Darüber vermittelt MIF die Rekrutierung von Monozyten und T-Zellen in den Bereich von arteriosklerotischen Prozessen¹⁵⁰. So wird durch MIF eine Aktivierung von Integrinen induziert, wo durch Bindung des funktionellen „Lymphocyte function-associated antigen 1“ 1(LFA-1) an dessen endothelialen Rezeptor ICAM-1 und des „Very Late Antigen 4 - (VLA-4) an dessen endothelialen Rezeptor VCAM-1²⁴, ein Arrest von Monozyten ausgelöst wird¹⁵⁰. Zusätzlich wird die Rekrutierung von Leukozyten durch MIF beeinflusst, da es eine Sekretion von CCL2 des Endothels bewirkt⁶¹. Im weiteren Verlauf der Atherogenese fördert MIF die Differenzierung von Makrophagen zu Schaumzellen durch eine vermehrte Aufnahme an oxLDL der Makrophagen⁵.

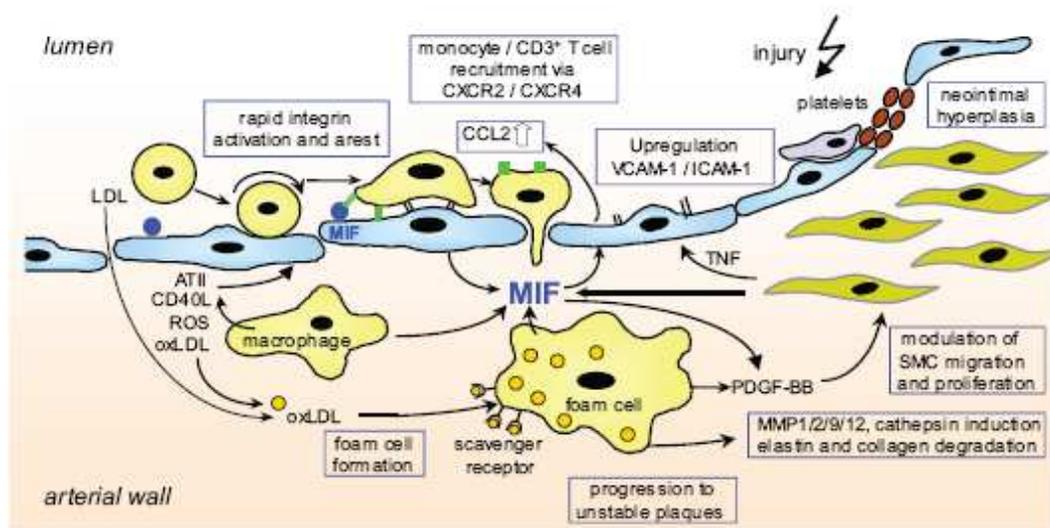


Abbildung 1.5: Zelluläre Wirkungsmechanismen von MIF in Verbindung mit arteriosklerotischen Vorgängen (nach Zerneck et al. 2008¹⁹⁴)

Die Stabilität des gebildeten Plauegewebes wird von MIF ebenfalls beeinflusst, da MIF die Aktivität der Matrixmetalloproteasen (MMPs) und Cathepsine reguliert, welche in der Lage sind extrazelluläre Matrixproteine zu spalten, wodurch es zum Abbau von Kollagen und Elastin kommen kann¹⁹⁴. Vor allem die verstärkte Expression von MMP1 und MMP9 in glatten Muskelzellen und Makrophagen ist MIF assoziiert^{86, 87}. Des Weiteren ist bekannt, dass MIF die PDGF-BB abhängige Migration von glatten Muskelzellen in den Bereich von Läsionen im Plauebereich blockiert, was ebenfalls zur Destabilisierung des Plauegewebes beitragen könnte¹⁵².

Die Signalwege, welche MIF in Monozyten reguliert, werden über die Bindung von MIF an den CXCR2- und den CXCR4 Rezeptor gesteuert. In diesem Rezeptorkomplex erfolgt die Aktivierung unter Beteiligung des Corezeptors CD74, welcher die Zellmembran-assoziierte Form der zur Klasse der „Major Histocompatibility Complex - (MHC)“ Klasse II Chaperone

gehörenden Invarianzketten ist ⁹². Da CD74 keine intrazelluläre Signaldomäne aufweist, erfolgt eine Aktivierung der CD44-abhängigen Src Kinasen, welche einen „Rezeptor-Tyrosin-Kinasen - (RTK)“ Komplex ausbilden können, für die intrazelluläre Signalweitergabe ¹⁵⁸. Sowohl CXCR2 als auch CXCR4 interagieren mit CD74 als Corezeptor zur funktionalen Signaltransduktion ¹⁵⁴. Durch die Aktivierung des RTK Komplexes kommt es zur Induktion von „Extracellular signal-regulated Kinases - (Erk-1/2)“ und „mitogenactivated protein kinases - (MAPK)“, welche in einer Weiterleitung des Signalwegs in „Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) – Akt und p53 abhängige Prozesse die Inhibierung der Apoptose und die Zellzyklusaktivität steuern ¹⁹⁴. Da CXCR2 und CXCR4 G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind, welche direkt über die PI3K ihre MIF abhängige Integrininduktion steuern können, ist CD74 in diesem Zusammenhang nicht für den Signalweg erforderlich, verstärkt aber den Arrest von Leukozyten ⁹. Des Weiteren steuert MIF über die CXCR2/CD74 Achse den Ca^{2+} Influx. Neben den extrazellulären Wirkungen hat MIF nach erfolgter Endozytose auch intrazelluläre Wirkungen. Intrazelluläres MIF interagiert mit dem „c-Jun activation domain-binding Protein- (JAB)-1“ ⁸⁴, wodurch zum einen die MAPK Aktivität inhibiert wird und die zelluläre Redox-Homöostase reguliert wird. Zum anderen reguliert MIF zusammen mit JAB-1 die AP-1 abhängige Proliferation von glatten Muskelzellen ¹²⁷.

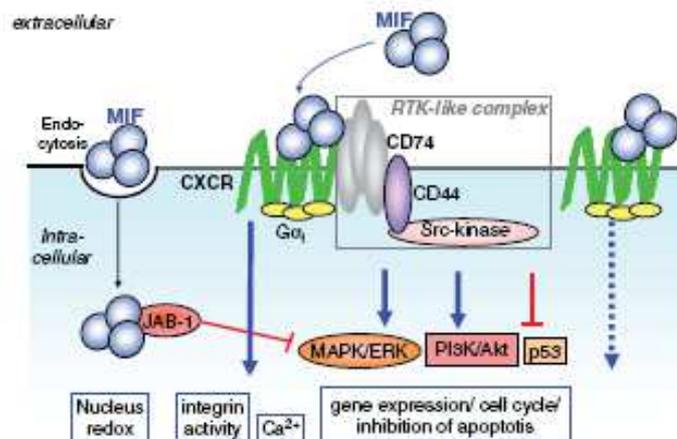


Abbildung 1.6: MIF/Rezeptorkomplex vermittelte Signalwege (nach Zerneck et al. 2008 ¹⁹⁴)

1.3 Das Protein Gremlin-1 (Grem1)

1.3.1 Die Struktur und die Synthese von Grem1

Grem1 ist ein hoch konserviertes Protein, das eine Länge von 184 Aminosäuren aufweist. Als erstes wurde das Gen beschrieben von Topol et al.¹⁷⁵ in Fibroblasten aus Ratten, die mit dem viralen Onkogen v-mos transformiert wurden und dann das Vermögen verloren das Gen zu exprimieren. Daher lautet der ursprüngliche Name für Grem1 „down – regulated durch mos“ (Drm). Das humane Gen von Grem1 (GREM1) ist lokalisiert auf dem Chromosom 15q13–q15¹⁸⁹. Strukturell besteht das Gen GREM1 aus 2 Exons. Durch Splicing der mRNA kommt es zur Bildung von 2 verschiedenen humanen Transkripten (GREM1-001: 4168 bp; Grem1-201: 3026 bp). GREM1 kodiert für zwei verschiedene Isoformen von Grem1, welche eine Größe von 23 kDa (148 Aminosäuren) und 28 kDa (184 Aminosäuren) aufweisen. Strukturell weist Grem1 einige Besonderheiten auf wie sein Signalpeptid (Aminosäuren 1-24), welches die über das raue endoplasmatische Retikulum gekoppelte Sekretion des Proteins steuert. Das Signalpeptid wird bei der posttranslationalen Modifikation abgespalten. Grem1 wird bei der posttranskriptionellen Modifikation sowohl phosphoryliert als auch glykolysiert (siehe Abbildung 1.5). Dabei wird Grem1 unter *in vitro* Bedingungen 30 min nach der Synthese in den extrazellulären Raum sekretiert. Ein Teil des sekretierten Proteins bleibt dabei nicht kovalent mit der äußeren Zelloberfläche verbunden und könnte eine Zwischenstufe darstellen, bevor das Protein in vollständig löslicher Form von der Zelle freigesetzt wird. Somit kommt Grem1 sowohl in löslicher, als auch in Zelloberflächen-assoziiierter Form vor¹⁷⁴.

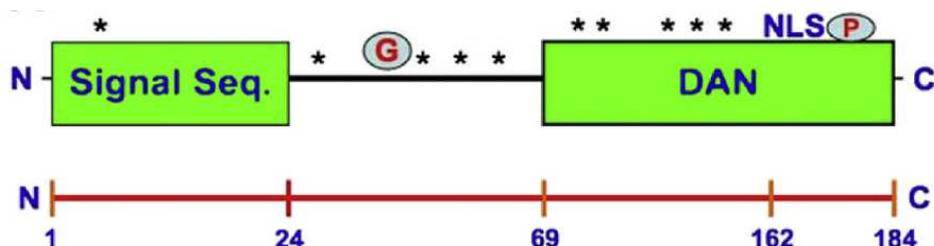


Abbildung 1.7: Struktureller Aufbau des Grem1 Proteins.

Strukturelle Einheiten sind im folgenden aufgeführt: (nach Wordinger et al. 2008¹⁸⁹)

Signalsequenz: Position 1–24

DAN Motiv: Sequenz welche für die DAN Familie charakteristisch ist (cysteinreich, Position 69–184)

Glykolysierung (G): Position 24

Phosphorylierung (*): Position 6, 29, 44, 47, 55, 66, 76, 77, 88, 102 und 151

PKC (P): spezifische Phosphorylierungsstelle bei Eukaryonten an Position 165

NLS: nukleäre Lokalisierungs-Signalsequenz an Position 145

Des Weiteren weist Grem1 eine hoch konservierte Struktur auf, welches das Protein in die Zugehörigkeit zur TGF- β („Tumor Growth Factor beta“) Superfamilie einordnet. Dabei kommt es durch sechs Cystein-Aminosäurereste zur Ausbildung einer ringförmigen Knotenstruktur über Disulfidbrücken, den sogenannten „Cystein-knot“, weshalb diese Protein-Superfamilie auch als „Cystein-knot“ Super-Familie bezeichnet wird. Aufgrund der drei Disulfidbrücken ist die Struktur dieser Proteine äußerst stabil (siehe Abbildung 1.6 A, ⁶). In der phylogenetischen Zuordnung wird Grem1 zur CAN/DAN (differential screening-selected gene aberrative in neuroblastoma) Protein-Familie gezählt (siehe Abbildung 1.6 B). Bei den einzelnen Vertretern der „Cystein-knot“ Super-Familie variiert die Anzahl der Cysteinreste zwischen 8-10 Aminosäuren ¹⁷⁹. Zu den bedeutendsten Vertretern der „Tumor Growth Factor - (TGF- β)“ Superfamilie zählen die drei Isoformen von TGF- β , die 10 Vertreter der „Bone morphogenic proteins - (BMPs)“ sowie 11 Vertreter der „Growth and differentiation factors - (GDFs)“ ¹⁴⁸ und die Klasse der BMP-Antagonisten, zu denen Grem1 zählt.

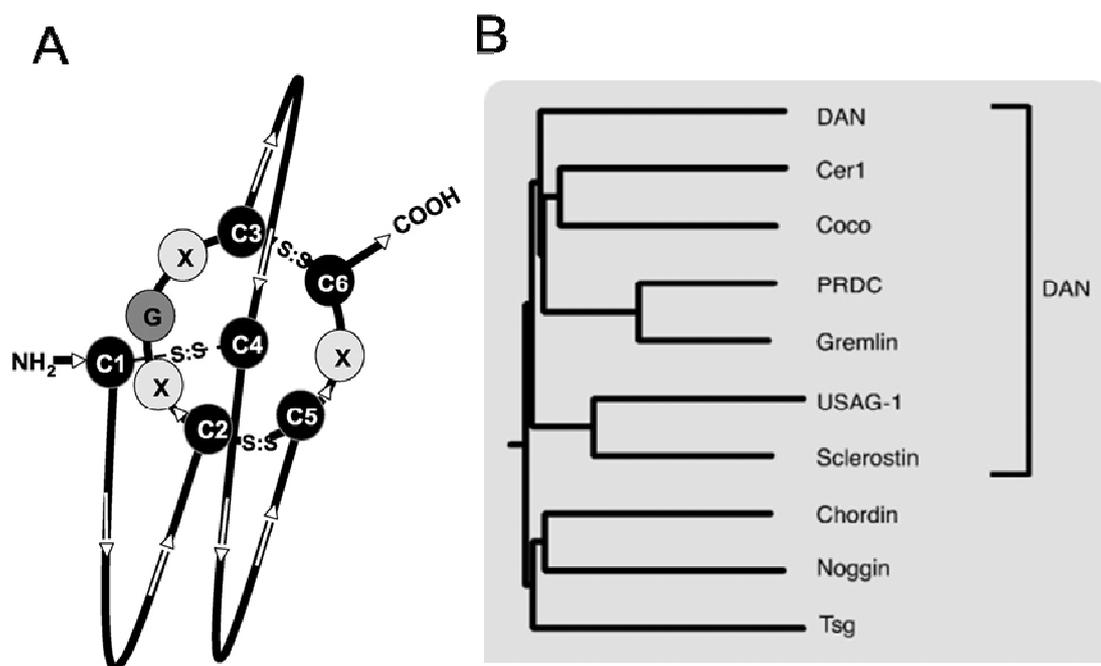


Abbildung 1.8: „Cystein-knot“ Struktur und phylogenetische Einordnung von Grem1.

A.) Darstellung der Struktur von Proteinen mit „Cystein-knot“ Domäne (modifiziert nach Avsian-Kretchmer et al. 2004 ⁶). C1-C6: sechs Cystein-Aminosäurereste, welche die charakteristische Knoten („knot“) Struktur ausbilden, G: Glycin-Aminosäurereste, X: Variable Aminosäurereste mit Ausnahme von Glycin und Cystein, S=S: Disulfidbrückenbindung, zusätzlich können weitere Cystein-Aminosäurereste in der Knotenstruktur enthalten sein, für die Grundstruktur der Domäne spielen sie aber keine Rolle. B.) Phylogenetische Einordnung von Grem1 in die Klasse der humanen BMP Antagonisten basierend auf der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen einzelner repräsentativer Vertreter. (modifiziert nach Yanagita et al. 2009 ¹⁹⁰)

1.3.2 Die TGF- β Superfamilie und ihre Signalwege

Alle Vertreter der TGF- β Superfamilie werden als Prä-Proproteine synthetisiert in einer Dimerform⁶⁰. Die BMPs werden dabei als große Vorläuferproteine synthetisiert, welche sich zusammensetzen aus einem N-terminalen Signalpeptid, einer Prodomäne für die Faltung und die Sekretion, und einem bioaktiven C-terminalen reifen Peptid. Die Produktion der Vorläuferproteine erfolgt im Cytoplasma, wo sie als dimere Prä-Proteine vorliegen und dann von Serinendoproteasen in N-terminale und C-terminale Fragmente geschnitten werden^{13, 18}. Bei den BMPs sind die C-terminalen Fragmente bioaktive Moleküle, welche in der Lage sind ihre zugehörigen Rezeptoren zu binden. TGF- β wird dagegen in einer inaktiven Form produziert und durch seinen N-terminalen Rest, der auch „Latency Associated Peptide, (LAP)“ genannt wird, von der Bindungsfähigkeit des C-terminalen bioaktiven Teils an seinen Rezeptor abgehalten. So ist dieser Komplex auch gebunden an das „latent TGF- β binding protein“, (LTBP), und die Sekretion des reifen bioaktiven Proteins erfolgt erst wenn bestimmte Aktivatoren die proteolytische Spaltung des Komplexes induzieren⁴.

Die Liganden der TGF β Superfamilie binden an 2 Klassen von Rezeptoren, welche vom Typ I oder Typ II sind. Vom Aufbau her haben die Rezeptoren dabei eine unterschiedliche Struktur der extrazellulären Domäne, welche reich an Cysteinen ist, eine Transmembran-Domäne, sowie eine hoch konservierte-intrazelluläre Serin-Threonin Kinase-Domäne¹⁵⁹. Durch die Bindung der Liganden kommt es zur Ausbildung von Heterotetramerkomplexen der Dimere der Rezeptorklassen vom Typ I und Typ II. Dadurch kommt es zur Bildung von aktiven Rezeptorkomplexen⁵². TGF β vermittelt seine Signaltransduktion über den TGF β -Rezeptor II (TGFB2) und TGFB1 (auch bekannt als ALK5; ein Typ I Rezeptor). Andere Vertreter der TGF- β Superfamilie vermitteln ihre Wirkung über verschiedene andere Kombinationen von Rezeptorkomplexen vom Typ I und Typ II, die miteinander interagieren. So signalisieren BMP Liganden über den BMP-Rezeptor II (BMP2) in Verbindung mit den Rezeptoren vom Typ I (ALK 1, -2, -3 oder -6)¹⁷¹. Die Typ II Rezeptorkinasen sind konstitutiv aktiv und können in einem Rezeptorkomplex die Typ I Rezeptoren an mehreren Serin- und Threonin-Resten in einer Domäne phosphorylieren, die reich an Glycinen und Serinen ist (GS-Domäne). Diese GS-Domäne stellt dabei eine hoch konservierte Struktur dar, die für alle Rezeptoren vom Typ I charakteristisch ist^{148, 171}. Zusätzlich gibt es in den Rezeptorkomplexen Corezeptoren wie Betaglycin oder Endoglin, die beteiligt sind. Die lösliche Form von Endoglin (Sol-Endo, „soluble Endoglin“) inhibiert dabei durch eine Vernetzung von Liganden die Bindung an die Rezeptoren¹⁷⁶. Durch die Phosphorylierung der GS-Domänen werden rezeptor-spezifische SMAD Proteine (R-SMADs) rekrutiert. Dabei phosphoryliert ALK 5 spezifisch die SMAD Proteine 2 und 3 und ALK 1, 2, 3 oder 6 die SMAD Proteine 1, 5 und 8. Aktivierte R-SMADs sind in der Lage mit SMAD 4 heteromere

Komplexe auszubilden, welche sich im Nukleus ansammeln und die Expression von Zielgenen direkt oder unter Beteiligung von Transkriptionsfaktoren, Corepressoren, Coaktivatoren oder Histon modifizierenden Enzymen steuern. Die SMADs haben dabei spezielle Proteindomänen (MH1 und MH2), welche die Interaktion mit den Zielstrukturen regulieren ^{148, 171}. So ist die MH1 Domäne der R-SMADs und SMAD4 für die Bindung an die DNA verantwortlich. Dagegen vermittelt die MH2 Domäne die SMAD-SMAD Interaktionen, die SMAD-Rezeptor Interaktionen und SMAD Interaktionen mit Co-Aktivatoren, Co-Repressoren und Transkriptionsfaktoren ¹⁴⁸. Der ganze Signalweg der TGF β Superfamilie wird über die Klasse der inhibitorischen SMADs (I-SMADs 6 und 7) gehemmt. Dabei reguliert SMAD7 alle TGF β -abhängigen Signalwege und SMAD6 alle BMP-abhängigen Signalwege, wodurch es zum Abbau der R-SMADs und Rezeptoren kommt. Die I-SMADs koordinieren außerdem die Rekrutierung der Ubiquitin-Ligasen Smurf1 und Smurf2, welche den proteasomalen Abbau der SMADs und Rezeptoren vermitteln ^{120, 128, 196}. Neben den Signalwegen, welche über die BMP Rezeptoren und SMADs gesteuert werden, gibt es auch SMAD unabhängige Signalwege. Dabei existieren in zahlreichen Zellen andere Signalwege, die über BMPs und TGF β s reguliert werden wie die MAP Kinasen (ERK, JNK und p38 MAPK), die Phosphoinositol-3-Kinase/Akt und die Proteinkinase C, sowie RHO GTP-ase Aktivitäten ¹⁹⁵. So sind diese Signalwege, welche nicht über die SMAD Proteine gesteuert werden, ebenfalls wichtig, da es eine große Vielfalt an Signalen gibt, die von der TGF β Superfamilie reguliert wird ^{106, 117}.

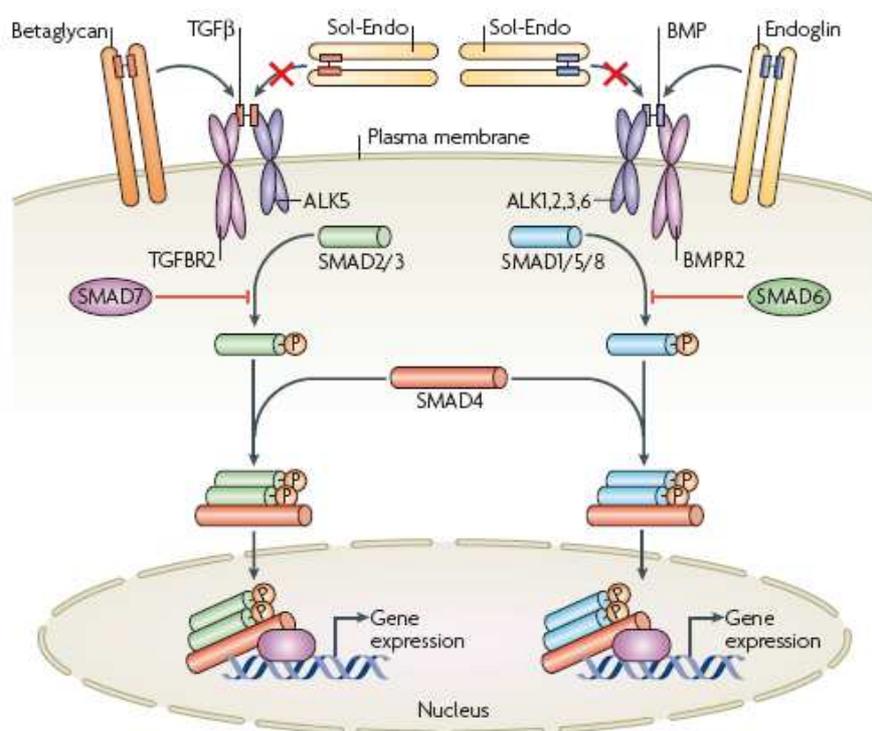


Abbildung 1.9: Signaltransduktion durch die Mitglieder der TGF β Superfamilie. (nach ten Dijke et al. 2007¹⁷¹, Erklärungen siehe Kapitel 1.3.1.1)

1.3.3 Die bekannten molekularen Interaktionspartner von Grem1 und ihre Wirkungen

Grem1 ist in seiner molekularen Wirkungsweise vordergründig als Modulator aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeiten mit seinen Bindungspartnern einzuordnen (siehe Kapitel 1.3.1). Die bekanntesten Bindungspartner von Grem1 sind die der BMP-Familie angehörenden Proteine BMP 2, BMP 4 und BMP 7. Grem1 ist ein extrazellulärer Inhibitor der genannten BMP-Proteine und durch die Einwirkung von Grem1 kommt es durch einen Wechselwirkungsmechanismus zwischen BMP-Aktivität und Inhibition, abhängig vom jeweiligen Gewebe, zu einer Regulation verschiedener Prozesse¹⁸⁹. Diese Interaktion ist von besonderer Wichtigkeit bei Prozessen wie beispielsweise der Knochen- und Knorpelentwicklung, Embryogenese, Organogenese, Apoptose sowie bei der Differenzierung und Proliferation von Zellen⁸. Durch die extrazelluläre Bindung von Grem1 an BMP 2, 4 und 7 kommt es zur Ausbildung eines Hetero-Dimers über Disulfidbrücken. Dies führt zu einer Inhibition der Signaltransduktion über die BMP Rezeptoren 1 und 2 (Klasse der Seronin/Threonin Rezeptoren) und Weiterleitung des Signals, da das entstandene Heterodimer nicht mehr die Signaltransduktionskaskade aktivieren kann^{8, 47, 108}. Grem1 ist außerdem in der Lage, intrazellulär an das Vorläuferprotein von BMP 4 zu binden, was zur Verhinderung der Reifung und Sekretion von BMP 4 führt¹⁶⁷. Grem1 besitzt auch das Vermögen, die Internalisierung von BMP 2 in HeLa Zellen über einen clathrin-abhängigen Endocytoseweg zu steigern². So kommt es zu vielfältigen Interaktionen zwischen Grem1 und BMPs.

Ein weiterer Bindungspartner von Grem1 ist der Vaskuläre Endotheliale Wachstumsrezeptor 2 (VEGFR2). Grem1 ist neben VEGF A („Vascular Endothelial Growth Factor A“) ein proangiogener Faktor, der den Thyrosinkinase-Rezeptor VEGFR2, der von Endothelzellen exprimiert wird, binden und aktivieren kann¹¹³. Durch eine Behandlung mit rekombinantem Grem1 konnte gezeigt werden, dass die endotheliale Zellmigration und Proliferation unter *in vitro* und *in vivo* Bedingungen angeregt werden kann und es zur Neuausbildung von Gefäßverzweigungen kommt¹⁶³. Dabei kommt es zwischen Grem1 und VEGF zu einer dosisabhängigen Agonisierung der vorhandenen Bindungsstellen des VEGFR2. Die Bindungsstärke ist dabei hoch affin¹⁰³. Der Prozess der Neovaskularisierung wird dabei von Grem1 über eine verstärkte Induktion der Expression von Angiopoetin 1 in Endothelzellen gesteuert¹¹². Zusätzlich sind die Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) Corezeptoren von Grem1, welche die Interaktion mit dem VEGFR2 unterstützen. Dadurch kommt es zu einer Thyrosin-Phosphorylierung intrazellulär der FAK („Focal Adhesion Kinase“), ERK 1/2 und Paxillin²⁷. Des Weiteren stimuliert Grem1 die Ausbildung von VEGFR2/ α (v) β (3) Integrin-

Komplexen, wodurch die Zellmotilität von Endothelzellen gefördert wird ¹³⁶. Durch Grem1 kommt es auch zur Induktion einer proinflammatorischen Antwort in Endothelzellen. Dies wird durch das zyklische Adenosinmonophosphat-Response Element bindende Protein (CREB) moduliert, welches ebenfalls zu einer verstärkten Zellmotilität und Permeabilität führt ³². Somit stellt Grem1 einen potenten proangiogenen Faktor dar, der ähnlich wie VEGF durch die Aktivierung des VEGFR2 sowohl die Phosphorylierung der Thyrosine des Rezeptors induziert als auch das Downstream-Signaling steuert, was zur Migration und Proliferation von Endothelzellen und Neovaskularisierung führt ¹⁶⁰.

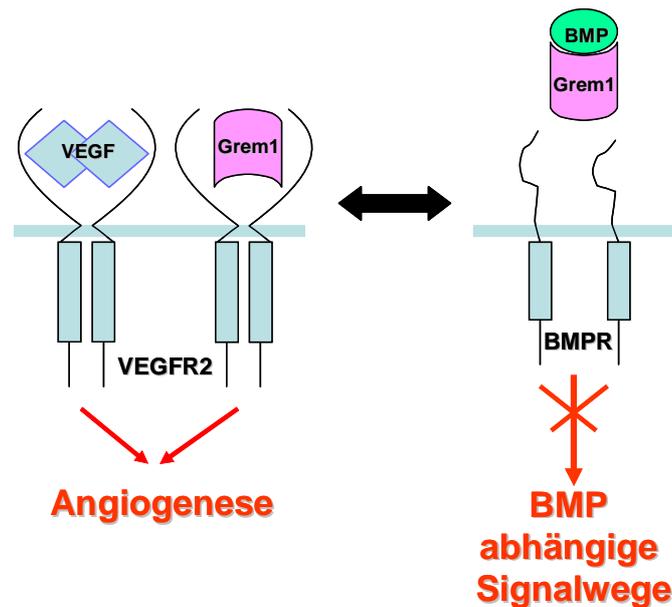


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung der dualen Rolle von Grem1. Links: Grem1 abhängige Förderung der VEGFR2 assoziierten Angiogenese. Rechts: Grem1 abhängige Inhibition der BMP assoziierter Signalwege. (modifiziert nach Claesson-Welsh et al. 2010 ²⁹)

Als weitere Bindungspartner von Grem1 sind zudem die am Aufbau der Elastinfasern beteiligten Proteine Fibrillin 1 und 2 bekannt. Fibrilline sind große extrazelluläre Glykoproteine, welche Mikrofibrillen ausbilden. Grem1 bindet unter *in vitro* Bedingungen sowohl Fibrillin 1 als auch 2, *in vivo* konnte eine entsprechende Interaktion im Tumorgewebe von Mesotheliomen dagegen nur mit Fibrillin 2 nachgewiesen werden ¹⁷⁰. Eine interessante Verbindung ergibt sich hierbei, da Grem1 als Inhibitor BMP 2, BMP 4 und BMP 7 binden kann, und von den genannten BMP Proteinen bekannt ist, dass sie ebenfalls mit den Fibrillinen assoziiert sind ¹⁵⁵. Insgesamt ergibt sich für Grem1 eine Assoziation mit Bindungspartnern, die in Verbindung stehen mit Prozessen wie der Angiogenese, Tumorgenese und Fibrose. Aus dem Feld der tumor-assoziierten Bindungspartner ist das humane Protein YWHAH, welches mit Grem1 assoziiert ist, beispielhaft zu nennen, da Grem1 in Karzinomen von Organen wie dem Uterus, der Lunge, den Eierstöcken, der Leber, der Brust, des Magens und des Pankreas hochreguliert ist ¹²⁵.

1.3.4 Wirkungsweise und Expression von Grem1 in der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen

Grem1 ist als Protein vor allem in der Embryonalentwicklung exprimiert und steuert in einer Antagonisierung zusammen mit den BMPs die Entwicklung von Organen wie der Lunge und Niere in der Maus. Ein Mangel von Grem1 führt bei Mäusen in der Embryonalentwicklung zu einem letalen pränatalen Verlauf aufgrund der gestörten Lungen- und Nierenentwicklung¹¹¹. Außerdem steuert Grem1 die Ausbildung der Extremitäten, der Netzhaut¹⁸⁹ sowie der Neuralleiste⁷⁰. Im adulten Gewebe der Maus und im humanen adulten Gewebe ist Grem1 dagegen nur im geringeren Maße exprimiert.

Grem1 weist bei einer Reihe von Erkrankungen eine verstärkte Expression auf. In der Lunge von Ratten konnte durch eine adenovirale Überexpression von Grem1 gezeigt werden, dass es zu einer Aktivierung alveolarer Epithelzellen kam, welche verstärkt proliferierten. Gleichzeitig trat vermehrt Apoptose auf. Außerdem war eine reversible Fibrose zu beobachten⁵¹. In einem Krankheitsmodell der Lungenfibrose in Mäusen konnte ebenfalls eine hochregulierte Expression von Grem1 nachgewiesen werden, bei der eine verminderte Aktivität BMP abhängiger Signalwege und eine Verstärkung TGF β abhängiger Signalwege auftrat. Diese Effekte waren durch eine Behandlung der Mäuse mit BMP 7 inhibierbar¹²⁴. Im humanen System wird Grem1 verstärkt exprimiert in der Lunge bei Patienten mit idiopatischer pulmonaler Fibrose⁸⁵. Die Beteiligung von Grem1 an fibrotischen Prozessen ergibt sich auch im Zusammenhang mit Erkrankungen der Niere. So zeigte sich, daß sowohl in murinen als auch humanen mesangialen Zellen unter Einwirkung von hohen Glucose-Spiegeln es zu einer verstärkten Induktion von Grem1 kommt^{46, 71}. Dabei konnte im humanen Nierengewebe bei Patienten mit diabetischer Nephropathie eine Coexpression von TGF β -1 und Grem1 nachgewiesen werden, und zwar im Bereich des tubulären Interstitiums. Dabei wurde Grem1 in renalen Zellen als Downstream Mediator von TGF β -1 nachgewiesen¹⁴³. Der Zusammenhang einer erhöhten Expression an Grem1 in ergab sich auch in der Behandlung von proximalen tubulären Endothelzellen mit TGF β -1¹⁸⁶. Ein weiteres Organ, welches eine Verbindung mit Fibrose und Grem1 aufweist, ist die Leber. So konnte Boers et al auch eine verstärkte Expression von Grem1 als möglichen Marker für die Leberfibrose *in vivo* in Mäusen nachweisen, wohingegen in der Kontrollgruppe der Mäuse ohne Leberfibrose nur eine geringe Expression an Grem1 vorhanden war¹¹. Die Interaktionen zwischen Grem1 und Vertretern der TGF β Superfamilie wie TGF β -2 steht auch in Assoziation mit der Ausbildung eines Glaukoms, wo es zur verstärkten Produktion von extrazellulären Matrixproteinen durch trabekuläre Maschenwerkszellen (TM) und zu weiteren biochemischen Prozessen kommt, wodurch der Sehnerv irreversibel geschädigt werden kann. Dabei wurde

eine Hochregulierung an TGF β -2 in TM Zellen unter *in vitro* Bedingungen beschrieben¹⁵⁷. Diese Prozesse werden durch Grem1, BMP4 sowie TGF β -2 gesteuert^{188, 198}.

1.3.5 Wirkungsweise und Expression von Grem1 im Herzen

Die Herzentwicklung ist ein fein regulierter Prozess, bei dem vor allem mesodermale Zellen durch ihre Ausdifferenzierung innerhalb der Kardiomyogenese sich zu unterschiedlichen kardialen Zelltypen entwickeln. Dabei kommt es zu einer Migration der mesodermalen Zellen während der späten Gastrulation in anterolaterale Bereiche des Embryos. Diese Prozesse werden durch ein Zusammenspiel von kardiomyogenen Faktoren gesteuert, zu denen die BMPs und FGFs zählen^{137, 153}. Grem1 besitzt das Vermögen als BMP Antagonist ebenfalls den Prozess der Kardiomyogenese zu beeinflussen. Dies wurde durch die Arbeit von Kami et al⁷⁸ bewiesen, in der Grem1 das *in vitro* Ausdifferenzierungsvermögen von embryonalen P19CL6 Karzinomzellen zu schlagenden differenzierten Kardiomyozyten in einem Modell der DMSO-induzierten Kardiomyogenese 10-35 fach erhöht. Grem1 reguliert mit BMP4 zusammen auch die Proliferation von fetalen Vorläuferzellen des humanen Skelettmuskels, was in einer Studie von Frank et al aufgezeigt werden konnte⁵⁴.

Die Entwicklung und Funktion des vaskulären Systems ist ebenfalls ein Prozess, in dem die BMPs eine tragende Rolle spielen. Durch Mutationen in für BMP Signalwege kodierenden humanen Genen konnte gezeigt werden, dass es in diesem Zusammenhang zu Erkrankungen kommen kann wie vaskulärer Dysfunktion oder pulmonaler arterieller Hypertonie⁹⁹. Als Modulator der BMP-abhängigen Signalwege wurde durch verschiedene Studien gezeigt, dass Grem1 unter verstärkter Hypoxie und in Patienten mit pulmonaler arterieller Hypertonie in der Lunge ebenfalls vermehrt exprimiert wird^{17, 33}. Des Weiteren wird Grem1 ebenfalls von Zellen des vaskulären Systems exprimiert. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass sowohl endotheliale Zellen der Aorta in Mäusen, als auch der humanen Koronararterien unter verstärkten Flussbedingungen Grem1 exprimieren. Dies könnte ein Hinweis sein auf die mögliche Beteiligung von Grem1 in Prozessen wie der Inflammation oder der Arteriosklerose²³. Eine weitere kardiovaskuläre Erkrankung, bei der eine Assoziation mit BMP-abhängigen Aktivitäten bekannt ist, stellt die Arteriosklerose dar. So steht eine vermehrte Aktivität der BMPs mit einer Vergrößerung von Läsionsbereichen in Plaques von ApoE^{-/-} (Apolipoprotein E) Mäusen in Verbindung¹⁹¹. Bei der Arteriosklerose kommt es zu zahlreichen Prozessen, bei denen es zum Umbau in den Gefäßstrukturen kommt und bei der viele unterschiedliche Zellklassen beteiligt sind (siehe Kapitel 1.2). Die glatten Muskelzellen sind dabei vor allem beteiligt am Aufbau der fibrotischen Plaquestrukturen. Als BMP-Modulator kann Grem1 diese Vorgänge beeinflussen. So

induziert Grem1 die Proliferation, sowie Migration von VSMC („Vascular Smooth Muscle Cells) unter *in vitro* Bedingungen. Durch eine Überexpression von Grem1 wird die Apoptose der VSMC gefördert^{101, 102}. Im Rahmen der Pathogenese der Arteriosklerose wandern primär verschiedene inflammatorische Zellen in die Gefäßwand ein. Dieser Mechanismus wird von zahlreichen Chemokinen und Cytokinen gesteuert. Die Arbeit von Chen et al.²⁵ zeigt, dass Grem1 als negativer Modulator die Chemotaxis von Monozyten unter Interaktion mit den Proteinen Slit 1 und Slit 2 regulieren kann.

Das deutet darauf hin, dass Grem1 auf die Herzentwicklung einen entscheidenden Einfluss hat. Andere Erkrankungen wie die pulmonale arterielle Hypertonie und fibrotische Umbildungsprozesse in Organen wie der Lunge, Leber, Niere und dem Auge werden ebenfalls in Verbindung gebracht mit einer Beteiligung von Grem1 an der Induktion und Regulation dieser Prozesse. Als Bindungspartner konnte Grem1 bisher vor allem in den Kontext der Angiogenese als Regulator von VEGFR2 abhängigen Signalwegen eingeordnet werden. Eine Überexpression in Karzinomen unterstreicht dies zudem. Des Weiteren ist Grem1 ein Modulator in der Arteriosklerose.

1.4 Ziel der Arbeit

Die KHK steht in den letzten Jahren immer mehr im Fokus der kardiovaskulären Grundlagenforschung. Dabei ist die Inzidenz der koronaren Interventionen in der Häufigkeit der auftretenden Sterbefälle ein Forschungsfeld mit zahlreichen Schwerpunkten. Ein Ansatzpunkt für die kardiovaskuläre Behandlung ist dabei eine nicht-invasive Therapieform der zielgeführten Behandlung auftretender myokardialer Prozesse. Grem1 stellt dabei ein vielschichtiges Protein dar, das als Antagonist BMP/TGF β -abhängige Signalwege reguliert. Für die Ansatzpunkte der arteriosklerotischen Progression stellt zum einen eine präventive Suppression von Migrations-, Ausdifferenzierung und Plaqueformation von mononukleären Zellen eine Rolle. Zum anderen können, die Einwanderung von verschiedenen Zellarten in der Infarktbereich und die Reperatur- und Umbildungsprozesse im geschädigten Myokard moduliert werden. Unsere Arbeitsgruppe konnte im Vorfeld neue direkte Bindungspartner von Grem1 *in vitro* identifizieren, nämlich MIF und TGF- β 1. In der vorliegenden Arbeit soll anhand von *in vitro* und *in vivo* Studien die funktionelle Relevanz der Interaktion von Grem1 mit diesen Proteinen näher analysiert werden. Dabei soll die Antagonisierung von Grem1 hinsichtlich MIF-abhängiger arteriosklerotischer Prozesse untersucht werden. Des Weiteren soll die molekulare Interaktion von Grem1 und TGF β -1 eingehend im Hinblick auf myokardiale Inflammations- und Fibrosevorgänge evaluiert werden. Eine *in vivo* Untersuchung im ApoE^{-/-}- und Ischämie/Reperfusionmodells für das murine Fusionsprotein mGrem1-Fc soll als Ansatzpunkt für eine mögliche Behandlungsalternative verifiziert werden.

Langfristig sollen die hier gewonnenen Daten dazu beitragen, neue therapeutische Strategien zur Behandlung der koronaren Herzerkrankung zu entwickeln.

2 Material und Methoden

2.1 Protein-biochemische Methoden

2.1.1 Herstellung von Zelllysate für den Westernblot

RIPA Puffer	150 mM NaCl (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 50 mM Tris, 0.1% Tris (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 0.5% Natriumdeoxycholat (Applichem, Darmstadt, Deutschland), 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Deutschland), Proteinase Inhibitor (1:25) (Roche, Mannheim, Deutschland), pH 8.0, Gelöst in 100 ml ddH ₂ O
Zellfilter (40 µm)	Cell strainer, (BD Falcon Biosciences, CA, USA)
Geräte:	
ELISA Reader	Biorad Model 550 (Biorad, München, Deutschland)

Zelllysate von verschiedenen frisch isolierten Zellen (bspw. Monozyten) oder Zelllinien, sowie den entnommenen Herzen (siehe Kapitel 2.5.4) wurde entsprechend folgenden Angaben hergestellt. Die Herzen wurden dabei mit einem sterilen Skalpell in kleine Stücke geschnitten und dann mittels der Verwendung einer Zellfilters unter Spülen mit dem RIPA Puffer noch weiter zerkleinert unter Zuhilfenahme eines Pistills. Die Zellen wurden abgelöst (siehe Kapitel 2.2.6) und abzentrifugiert (5 min, 1200 rpm). Die Suspension des Herzgewebes wurde ebenfalls abzentrifugiert. Das Pellet oder die Zellen in den Kulturplatten wurden mit kaltem RIPA-Puffer resuspendiert und für 1 h auf Eis lysiert. Das Lysat wurde dann um die Membranreste der Zellen zu entfernen zentrifugiert (10500 g, 15 min, 4°C) und die Überstände wurden abgenommen. Die Proteinkonzentration wurde mittels des BIORAD Proteinassays bestimmt unter Verwendung des ELISA Readers (Wellenlänge: 595 nm für die Konzentrationsbestimmung). Als Standard diente BSA (Sigma-Aldrich). Die Lysate wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

2.1.2 SDS-Gelelektrophorese

Isopropanol	(SAV LP, Flintsbach, Deutschland)
10x Laufpuffer:	25 mM Tris-Base (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) 192 mM Glycin (Applichem, Darmstadt, Deutschland) 0,1 % (w/v) SDS (Fluka, Taufkirchen, Deutschland) pH 8,5-8,7; Puffer wird zur Verwendung 1:10 mit ddH ₂ O verdünnt.
5x Lämmli-Lade-Puffer:	6,5 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, (nicht reduziert) Deutschland) 1 ml Glycerol (Applichem, Darmstadt,

	Deutschland) 2 ml 10 % SDS (Fluka, Taufkirchen, Deutschland) Krümel Bromphenolblau (Serva, Heidelberg, Deutschland)
BenchMark Pre-Stained Protein ladder	(Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)
Gelkassette	Novex Cassettes 1,0 mm/1,5 mm, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland)
30 % Acrylamid-Lösung	(Rothiphorese Gel 30, Roth, Karlsruhe, Deutschland)
1,5 M Trisaminomethan	(Tris-Base, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland); pH 8,8
1 M Trisaminomethan	(Tris-Base, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland); pH 6,9
2-Mercaptoethanol	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
10 % SDS	(Sodium-Dodecylsulfat, Fluka, Taufkirchen, Deutschland)
10 % APS	(Ammoniumperoxodisulfat, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
TEMED	(N,N,N',N'-Tetramethyldiamin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Geräte:	Vertikale SDS-Gelapparatur Novex Mini-Cell (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) Netzgerät (Gibco, Darmstadt, Deutschland)

15% Gel

Sammelgel

• H ₂ O	3,4 ml
• 1mM TRIS/ HCl pH 6,8	0,625 ml
• Acrylamide/ bis-acrylamide 30%	0,85 ml
• 10% SDS	50 µl
<hr/>	
• 10% APS	50 µl
• TEMED	5 µl

Trenngel

• H ₂ O	2,3 ml
• 1,5mM TRIS/ HCl pH 8,8	2,5 ml
• Acrylamide/ bis-acrylamide 30%	5 ml
• 10% SDS	100 µl
<hr/>	
• 10% APS	80 µl
• TEMED	10 µl

Durch die SDS-Gelelektrophorese werden die im elektrischen Feld negativ geladenen Proteine ihrer molekularen Größe nach aufgetrennt. Zunächst wird das Gel mit der entsprechenden Prozentzahl an Acrylamid vorbereitet und gegossen. Durch die Zugabe von APS und TEMED wird die Polymerisation des Gels bewirkt, wodurch die beiden Komponenten direkt vor dem Gießen der Gellösung zugefügt werden. Nach dem Mischen der Trenngellösung wurde sie in eine Gelkassette pipettiert und mit Isopropanol überschichtet und für 30 min zum Polymerisieren abgestellt. Danach wurde das Isopropanol abgegossen und die Sammelgellösung auf das Trenngel pipettiert. Den Kamm (10 Taschen, 1,5 mm Dicke) für die Geltaschen setzte man vorsichtig ein und das Gel polymerisierte 30 min. Die Proben wurden während dieses Vorgangs vorbereitet, indem sie mit 5x Lämmli-Lade-Puffer 5:1 verdünnt wurden. Die Proben konnten unter reduzierten oder nicht reduzierten Bedingungen aufgetrennt werden. Wurde die Probe unter reduzierten Bedingungen aufgetrennt, mischte man den 5x-Lämmli-Lade-Puffer zuvor mit 10 % 2-Mercaptoethanol. Unter nicht reduzierten Bedingungen wurde dem 5x-Lämmli-Lade-Puffer kein 2-Mercaptoethanol zugefügt. Dann wurden die Proben 10 min bei 95°C denaturiert. Das zuvor gegossene Gel wurde mit den Proben beladen und die Kammer mit 1x Laufpuffer aufgefüllt. Die Gelelektrophorese erfolgte beim Lauf der Proben durch das Sammelgel bei 80 V und 400 mA für ca. 30 min. Beim Übergang der Lauffront ins Trenngel wurde die Voltzahl auf 120 erhöht und für weitere 60 min das Gel aufgetrennt.

2.1.3 Westernblot

Filterpapier	Gel-Blotting-Filterpapier; 7,5 cm x 8,5 cm (Whatman, Dassel, Deutschland)
PVDF Transfermembran	7,5 cm x 8,5 cm (Millipore, Schwalbach, Deutschland)
Methanol	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
10x Blottingpuffer:	20 mM Tris-Base (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) 150 mM Glycin (Applichem, Darmstadt, Deutschland) Puffer wird zur Verwendung mit 20 % (v/v) Methanol versetzt und mit 70 % ddH ₂ O verdünnt.
Geräte:	SemiDry Transfer Cell System (PepLab, Erlangen, Deutschland) Netzgerät (Gibco, Darmstadt, Deutschland) Odyssey Infrarot Imaging Scanner (LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland)

Beim Westernblot werden die durch die SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine PVDF Membran transferiert. Der Transfer erfolgt hierbei durch ein SemiDry Transfer Cell System senkrecht zur vorherigen Richtung des Gellaufs. Anfänglich wurde dafür die

PVDF für 5 min in Methanol inkubiert. Das Gel und die Filterpapiere werden nach SDS-Page in kalten frischen Blottingpuffern vorinkubiert. Für den Transfer wird der Westernblot in dieser Reihenfolge ausgesehen von der Anode zusammengesetzt: Filterpapier, Membran, Gel und Filterpapier. Das Vermeiden von Luftblasen ist beim Blotting zu gewährleisten durch das Ausstreichen mit einer Pipette nach jeder aufgelegten Schicht. Das Blotting erfolgte bei 10 V und 110 mA für 1h und 15 min. Der Nachweis der Proteine auf der Membran erfolgte direkt darauf durch die anschließende Immundetektion (siehe Kapitel 2.1.4).

2.1.4 Immundetektion

Blockierungslösung	5 % (w/v) Milchpulver (Bio Milchpulver, fettarm, Heirler, Radolfzell, Deutschland), Lösung in PBST.
Antikörper:	Primäre Antikörper: Siehe Tabelle 2.1 Sekundäre Antikörper: Siehe Tabelle 2.2
PBS	(Phosphate-Buffered Saline, PAA, Pasching, Österreich), 2 Tabletten wurden in 1L ddH ₂ O gelöst.
PBST (Waschlösung):	Lösung von 0,1 % (v/v) Tween 20 (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 1x PBS.
Geräte:	Odyssey Infrarot Imaging Scanner (LI-COR, Bad Homburg, Deutschland)
Schüttler	IKA KS 260 basic, (IKA, Staufen, Deutschland)

Die auf die Membran geblotteten Proteine wurden mittels der Immundetektion nachgewiesen. Durch die Blockierung der Membran werden die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Dafür wurde die geblottete Membran in 5 %-Milchpulverlösung für 1 h unter Schütteln inkubiert. Nach dem Blockieren wurde die Membran bei 4°C über Nacht mit dem zugehörigen Primärantikörper auf einem Rollschüttler inkubiert. Nach erfolgter Primärantikörperinkubation wurde die Membran dreimal 10 min mit PBST gewaschen, um nicht festgebundene Primärantikörper zu entfernen. Darauf wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper für 1 h bei RT unter Schütteln im Dunkeln inkubiert. Der Sekundärantikörper ist gegen die Spezies des primären Antikörpers gerichtet und mit Fluoreszenzfarbstoff gelabelt. Im Anschluss an die Sekundärantikörperinkubation wurde die Membran dreimal 10 min mit PBST gewaschen und anschließend zwischen zwei Filterpapieren im Dunkeln getrocknet. Die trockene Membran wurde dann mit dem Odyssey Infrarot Imaging Scanner eingescannt.

Tabelle 2.1: Primärantikörper für den Westernblot

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller/Firma
Anti-Gremlin (C-term) (AP6133a)	1:100	Kaninchen, polyklonal	Abgent, San Diego, CA
Anti-MIF (AF-289-PB)	1:100	Ziege, polyklonal	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Anti-Actin (ab1801)	1:1000	Kaninchen, polyklonal	Abcam, Cambridge, UK
Anti-TGFβ-1 (V) (sc-146-G)	1:100	Ziege, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Collagen I (ab84956)	1:1000	Kaninchen, polyklonal	Abcam, Cambridge, UK
Anti-IgG (109035098)	1:5000	Ziege, monoklonal	Jackson Immuno Research, PA, USA
Anti-Gremlin (ab45292)	1:300	Kaninchen, polyklonal	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Collagen I (ab84956)	1:100	Kaninchen, polyklonal	Abcam, Cambridge, UK

Tabelle 2.2: Sekundärantikörper für den Westernblot

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller/Firma
Anti-Kaninchen	1:15000	Esel, IRDye 800CW konjugiert	Li-Cor, Bad Homburg, Deutschland
Anti-Ziege	1:100	Esel, IRDye 680LT konjugiert	Li-Cor, Bad Homburg, Deutschland

2.1.5 Immunpräzipitation (IP)

IP Puffer:	15mM Tris-Hydrochlorid (2,364g, Roth, Karlsruhe, Deutschland) 155mM NaCl (9,05g, AppliChem, Darmstadt, Deutschland) 1mM EDTA (Lösung, pH 8, 0,5M, 2ml, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 0,005% NaN ₃ (0,2ml von 25% Lösung, Roth, Karlsruhe, Deutschland) Auflösung unter Zugabe von 1L ddH ₂ O unter Rühren
Lysepuffer Stock:	IP-Puffer + 1% NP40 + 1x Protease Inhibitor
NP 40	Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
Sepharose	GE Health Care Protein-G-Sepharose 4 Fast Flow (#170618-01)
2x Lämmli-Lade-Puffer:	6,5 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, (nicht reduziert) Deutschland) 1 ml Glycerol (Applichem, Darmstadt, Deutschland) 2 ml 10 % SDS (Fluka, Taufkirchen, Deutschland) Krümel Bromphenolblau (Serva, Heidelberg, Deutschland)
2-Mercaptoethanol	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

1,0 mm Gelkassetten Novex 10-20% Tris-Glycine Gel (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland)

Für die Lysierung von HAEC (human arterial endothelial cells) wurden die pelletierten Zellen mit 1 ml IP-Puffer vermengt und für eine Stunde im 4°C Raum auf dem Eppi-Rotator lysiert. Der Überstand wurde nach zuvor erfolgter Zentrifugation (14000 rpm, 4°C, 15 min) abgenommen und in ein neues Eppi überführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels des BIORAD Proteinassays bestimmt unter Verwendung des ELISA Readers (Wellenlänge: 595 nm für die Konzentrationsbestimmung). Als Standard diente BSA (Sigma-Aldrich). Für jede IP-Probe wurden 500 µg-1 mg/ml Protein eingesetzt in gleichem Verhältnis mit der mitgeführten Isotyp Kontrolle des Antikörpers. Für die Immunpräzipitation wurde die jeweilige Probe mit 5 µg/ml Primärantikörper oder der entsprechenden IP Kontrolle für eine Stunde inkubiert (4°C unter Rotation). Dabei kommt es zur Bindung des Antikörpers an das nachzuweisende Protein im Lysat. Dann erfolgte eine Fällung des Antikörpers/Lysat mit Sepharose über Nacht (4°C unter Rotation). Hierbei wurde das nachzuweisende Protein mit seinen Interaktionspartnern (Copräzipitate) aus dem Zelllysat präzipitiert. Die Sepharose wurde vor der Fällung, da sie in 20 % Ethanol gelöst ist, mit IP-Puffer dreimal gewaschen. Das über Nacht gefällte Präzipitat wurde dann zentrifugiert (5 min, 14000 rpm) um den ungebundenen Antikörper aus dem Komplex zu entfernen, zusätzlich mit jeweils 1 ml IP-Puffer dreimal gewaschen (Zentrifugation: 1-2 min, 14000 rpm) und der Überstand wurde verworfen. Die Proben wurden mit zweifachen Probenpuffer (2x Lämmli + 5% Mercaptoethanol) verdünnt und 10 min bei 95 °C aufgekocht um die Sepharose von dem Proteinkomplex zu trennen. Die Proben wurden dann gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Westernblot auf MIF und Gremlin detektiert. Der Nachweis von MIF und TGFβ1 erfolgte mit einem 15% „SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)“ und der von Gremlin mit einem 10-20% Novex Gradientengel (Invitrogen). Der folgende Westernblot und die Immundetektion erfolgten wie in den Kapiteln (2.1.2 – 2.1.4) beschrieben.

Tabelle 2.3: Primärantikörper und Isotypkontrollen für die Immunpräzipitation

<i>Antikörper</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Spezies</i>	<i>Hersteller/Firma</i>
MIF (N-18) (sc-48241)	5 µg/ml	Ziege, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology
Gremlin (FL-184) (sc-28873)	5 µg/ml	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology
TGFβ-1 (V) (sc-146-G)	5 µg/ml	Ziege, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology
Normal goat IgG (sc-2028)	5 µg/ml	Ziege, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology
Normal rabbit IgG (sc-2027)	5 µg/ml	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology

2.1.6 Proteinaufreinigung

1 M Trisaminomethan	(Tris-Base, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland); pH 9,0
Protein-G-Agarose	(Thermo Scientific, Rockford, USA)
Protein-G-Bindepuffer	(Thermo Scientific, Rockford, USA)
Protein-G-Elutionspuffer	(Thermo Scientific, Rockford, USA)

Zur Aufreinigung der produzierten Proteine wurde die Protein-G-Agarose mit je 200 µl pro Ansatz abzentrifugiert (2700 g, 1 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Nach Gewinnung der Zellkulturüberstände bei der zuvor erfolgten Proteinproduktion (siehe Kapitel 2.2.6) wurden je 50 ml des Überstandes mit den pelletierten Protein-G-Agarose Beads vermengt und über Nacht bei 4°C auf dem Rotator mit den Agarose Beads inkubiert. Dadurch kam es zu einer Bindung des IgG-Teils der produzierten Proteine an die Beads. Am darauffolgenden Tag wurde die Zellkulturüberstand-Beadslösung zentrifugiert (450 g, 5 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dann einem dreimaligen Waschschrift mit jeweils 1 ml Protein-G-Bindepuffer unterzogen, dazwischen zentrifugiert (2700 g, 1 min, 4°C). Als nächster Schritt wurde das Pellet auf Eis mit 200 µl Protein-G-Elutionspuffer für 5 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand abzentrifugiert (2700 g, 1 min, 4°C) und mit 1 M Tris (1:20 Verdünnung) neutralisiert. Die Elution, bestehend aus Inkubation, Zentrifugation und Neutralisierung, wurde sechs Mal durchgeführt, wodurch insgesamt sieben verschiedene Fraktionen des Proteins erhalten wurden. Die Fraktionen wurden darauf bei -20°C aufbewahrt oder unverzüglich dialysiert (siehe nächstes Kapitel).

2.1.7 Dialyse von aufgereinigtem Protein

18-Gauge Needles	(Thermo Scientific, Rockford, USA)
Slide-A-Lyzer Buoy	(Thermo Scientific, Rockford, USA)
Slide-A-Lyzer Dialysis	(Thermo Scientific, Rockford USA),
10K MW Cassettes	
Slide-A-Lyzer Syringe	(Thermo Scientific, Rockford, USA)

Nach erfolgter Aufreinigung des Proteins wurde eine Dialyse durchgeführt. Dazu wurde die Proteinlösung mit einer Nadel nach Herstellerangaben in die Dialysierungskassette eingespritzt und mit einer Schwimmhilfe (Slide-A-Lyzer Buoy) seitlich arretiert. Die Kassette wurde in ein Becherglas (500 ml) gegeben und unter dauerhaftem Rühren in der PBS-Lösung über Nacht (4°C) inkubiert, um das Lösungsmittel des Proteins des Elutionspuffers gegen PBS auszutauschen. Das PBS wurde hierbei zweimalig ausgetauscht um keine Rückstände des Elutionspuffers als Lösungsmittel für das Protein zu gewährleisten. Für die

Anwendung des Proteins im Tierversuch war der Austausch des Lösungsmittels gegen PBS von physiologischer Wichtigkeit.

2.1.8 IgG ELISA zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Humaner IgG-ELISA (Helvetica Health Care, Geneva, Schweiz)

Die Konzentrationsbestimmung des aufgereinigten Proteins (mGremlin-1-Fc und FcIgG2) erfolgte über die strukturelle Komponente des IgG Anteils mit Hilfe des humanen IgG-ELISA. Des Weiteren wurde der ELISA zur Verifizierung der Pharmakokinetik von mGremlin-1-Fc verwendet. Der ELISA wurde entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Verwendete Zelllinien und Zellkulturmaterialien

2.2.1.1 Zellkulturmedien

Ham's F12-Medium	(Biochrom AG, Berlin, Deutschland) ohne L-Glutamin (L-Glut), mit 1,176 g/l NaHCO ₃ und 10 mg/l Phenolrot
RPMI 1640	(PAA, Pasching, Österreich)
EndoPrime Kit	EndoPrime Base Medium (500 ml), EndoPrime Supplement (100x, 5ml), EndoPrime EGF (2,5 ng/ml, 1ml), EndoPrime VEGF (250 ng/ml, 1ml), EndoPrime FBS (25 ml, 5%) EndoPrime HS (25 ml, 5%); (PAA, Pasching, Österreich), +1% Pen/Strep
Schaumzell-Medium	RPMI 1640 (500 ml), P/S (1%, 5ml), NEAA (1%, 5ml), Natrium Pyruvat (1%, 5ml), Humanes Serum (100 ml, 20%) und direkte Zugabe von 1% L-Glut bei Benutzung des Mediums
Monozytenmedium:	VLE RPMI 1640 Medium, (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) + 10 % FCS, +1 % Pen/Strep.
CHO (A) III Medium	Gibco (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland)
ECV-304 Medium	M-199 with Earles salts (500 ml, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), (+4% FCS, 2% P/S, 0,38% L-Glut)
MM6-Medium	RPMI 1640 (500 ml), 10% FCS, 1% P/S, 1% L-Glut, 1% Natrium-Pyruvat, 1% NEAA
HCF Medium	Fibroblast Growth Medium 3 (500 ml, PromoCell, Heidelberg, Deutschland), Supplemental Mix: 10% FCS (0,1 mg/ml), Basic FGF (1 ng/ml), Insulin (5 µg/ml)

PMEF Medium	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) high glucose (4,5 g/L) (500 ml, PAA, Pasching, Österreich), 1% L-Glut, 1% P/S, 10% FCS
Fetales Kälberserum (FCS)	Fetal Calf Serum, (PAA, Pasching, Österreich)
L-Glutamin	Gibco (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland)
Sodium-Pyruvat (100x)	Gibco (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland)
NEAA (100 x)	MEM Non Essential Amino Acids (Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland)
Trypsin	(PAA, Pasching, Österreich)
D-PBS-	(Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, PAA) ohne Calcium, Magnesium und Phenolrot
D (+)-Glucose	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Antibiotika	Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep; PAA, Pasching, Österreich) Zeozin (Invitrogen; Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) Hygromycin (Calbiochem; Merck, Darmstadt, Deutschland)

Alle verwendeten Medien und Lösungen für die Zellkultur wurden bei 4°C gelagert und unter sterilen Bedingungen verwendet. Die Arbeit erfolgte ebenfalls nur unter sterilen Bedingungen unter Verwendung einer Clean bench. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank (37°C, 5 % Kohlendioxid).

2.2.1.2 Zelllinien

HAEC	Human Aortic Endothelial Cells, (GIBCO Invitrogen cell culture, Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA)
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
ECV-304	human urinary bladder carcinoma cells, Morphologie: Epithel
MM-6	Mono Mac 6 Zelllinie, monozytäre leukämische Zelllinie
PMEF	Primary Mouse Embronary Cells, (Merck Millipore, Billacore, USA)
HCF	Human Cardiac Fibroblasts, (PromoCell, Heidelberg, Deutschland)

2.2.2 Isolierung von humanen Monozyten aus Vollblut (Buffy coats oder CPDA Monovetten)

Ficoll-Paque	(Ficoll-Paque™ PLUS, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden)
--------------	--

8,5 ml CPDA S-Monovetten	(Citrate Phosphate Dextrose Adenine, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland)
PBS	(Phosphat Buffered Saline, PAA, Pasching, Österreich)
Monozytenmedium	siehe Kapitel 2.2.1.1
Türkislösung	(Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland)

Die Isolierung von humanen Monozyten erfolgte unter Verwendung von buffy coats oder einer direkten Abnahme von Vollblut von gesunden Spendern in CPDA Monovetten. Die buffy coats wurden bei der Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen im Voraus bestellt. Nach Abnahme des Bluts in die CPDA Monovetten wurde das Blut 1:2 mit PBS verdünnt. Wenn buffy coats verwendet wurden, wurden die Beutel aufgeschnitten, das Blut in 75 cm² Zellkulturflächen transferiert und mit PBS auf 120 ml aufgefüllt. Darauf wurden 20 ml Ficoll-Paque vorgelegt und mit 30 ml Blut langsam überschichtet, wodurch zwei Schichten entstanden. Dann wurde das Blut zentrifugiert (900 g, 17 min, ohne Bremse, RT) und in drei Schichten aufgetrennt. Die untere Schicht enthält Erythrozyten, die weißliche Intermediärschicht besteht aus Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten und die obere Schicht enthält das Plasma. Die Intermediärschicht wurde vorsichtig abgenommen und mit PBS einem zweimaligen Waschschrift unterzogen (500 g, 10 min, RT). Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 20 ml Monozytenmedium resuspendiert und in einer Zellkulturflasche ausgesät. Die Inkubation erfolgte über Nacht, wodurch die Monozyten adhären konnten. Am darauf folgenden Tag wurden die Monozyten mit PBS gewaschen um die nicht adhären gewordenen Zellen zu entfernen. Dann wurden die Zellen trypsinisiert, in Monozytenmedium überführt und abzentrifugiert (400 g, 10 min, RT). Das Zellpellet wurde mit Monozytenmedium resuspendiert und die Zellzahl wurde bestimmt. Die Zellen wurden mit Türkislösung (1:10 Verdünnung) angefärbt und in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellzahl der Monozyten wurde für die einzelnen Versuchen gemäß eingestellt.

2.2.3 Isolierung von murinen Monozyten aus der Milz

PBS	(Phosphat Buffered Saline, PAA, Pasching, Österreich)
Zellfilter (40 µm)	Cell strainer, (BD Falcon Biosciences, CA, USA)
Ammoniumchloridlösung	(Stemcell Technologies SARL, Grenoble, Frankreich)

Mäuse wurden artgerecht laut Tierschutzgesetz geopfert und die Milz wurde steril extrahiert. Für die Zerkleinerung des Milzgewebes wurden Zellfilter (cell strainer) mit einer Porengröße von 40 µm verwendet. Diese wurden auf ein 50 ml Falcon Röhrchen aufgesetzt und mittels eines sterilen Pistills wurde das Milzgewebe durch den Filter gedrückt. Der Filter wurde dann mit 10 ml PBS gespült um das gesamte Gewebe durch den Filter spülen zu können. Darauf

folgte eine Zentrifugation (900 g, 15 min, RT) und der Überstand wurde verworfen. Um die Erythrozyten zu entfernen wurde das Pellet einer Erylyse unterzogen. Dabei wurde das Pellet in Ammoniumchloridlösung resuspendiert, fünf min bei 4°C inkubiert und abschließend zentrifugiert (500 g, 10 min, RT). Das Pellet wurde in Monozytenmedium resuspendiert und in einer 30 cm² Petrischale ausgesät. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen, die adhärenierten Zellen einmal mit PBS gewaschen und trypsiniert. Nach einer Zentrifugation (400 g, 10 min, RT) wurden die Monozyten in der Neubauer-Kammer (Anfärbung in Türkslösung in einer 1:10 Verdünnung) gezählt und dann 50000 Zellen pro Well in einer 96 Well Platte ausgesät. Je nach gewünschtem Assay wurden die Zellen einer Ausdifferenzierung zu Makrophagen oder Schaumzellen unterzogen. Dabei wurden die Zellen in Monozytenmedium ausgesät und für acht Tage bei 37°C inkubiert. Die Schaumzellbildung war in diesem Zeitraum abgeschlossen.

2.2.4 Generierung einer humanen Makrophagen-/Schaumzellkultur

acLDL	(Human acetylated Low Density Lipoprotein), (KALEN Biomedical, Montgomery Village, USA)
Schaumzellmedium	siehe Kapitel 2.2.1.1, frische Zugabe von 1% L-Glutamin zum Medium vor Gebrauch
96 well Platten	Corning, Costar cell culture plates, (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Monozyten wurden unter Verwendung des Ficoll-Paque isoliert (siehe Kapitel 2.2.2). Die Zellsuspension wurde auf eine Zellzahl von 50000 Zellen in 150 µl eingestellt und die Monozyten wurden in 96 well Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Monozytenmedium gegen Schaumzellmedium ausgewechselt. Am Tag vier nachdem die Zellen ausgesät wurden, gab man 80 µg/ml acLDL pro well zu den Zellen hinzu. Parallel konnten die Monozyten auch durch Zugabe von isolierten Thrombozyten angefütert werden. Durch das serumhaltige Medium, sowie den enthaltenen Zusätzen und dem acLDL kommt es zu einer Ausdifferenzierung der Monozyten in Makrophagen und abschließend in Schaumzellen. Der Entwicklungsprozess der Zellen zu Makrophagen oder Schaumzellen konnte hierbei mikroskopisch überwacht werden und der entsprechende funktionelle Assay dann durchgeführt werden.

2.2.5 Isolierung von humanen Thrombozyten aus Vollblut

20 ml Spritzen	(Braun, Melsungen, Deutschland)
Membranadapter für Spritzen	(Sarstedt, Nürnberg, Deutschland)
Kanülen	(Sarstedt, Nürnberg, Deutschland)

ACD-Puffer	12,5 g Na ₃ -Citrat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 6,82 g Citronensäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 10 g Glucose (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), Zugabe von 500ml ddH ₂ O, mit NaOH auf pH 4,69 einstellen, sterilfiltrieren, bei 4°C aufbewahren
Tyrodes 10x	80 g NaCl (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) 10,15 g NaHCO ₃ (Merck, Darmstadt, Deutschland) , 1,95 g KCl (Merck, Darmstadt, Deutschland), Zugabe von 1000ml ddH ₂ O, sterilfiltrieren, bei 4°C aufbewahren
Tyrodes pH 7,4 + 0,1% BSA/Glucose	0,2 g BSA (Bovine Serum Albumin, Applichem, Darmstadt, Deutschland), 0,2 g Glucose (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 20ml Tyrodes 10x, Zugabe von 180ml ddH ₂ O, mit HEPES (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) auf pH 7,4 einstellen, sterilfiltrieren
Tyrodes pH 6,5 + 0,1% BSA/Glucose	150ml Tyrodes pH 7,4, 0,1% BSA, 0,1% Glucose, mit 1N HCl auf pH 6,5 einstellen, sterilfiltrieren
Geräte:	
Sysmex	(Sysmex GmbH, Norderstedt, Deutschland)

Es wurden je 10 ml abgenommenes Blut direkt aus der Spritze in ein 15 ml Falcon langsam transferiert. Die Falcons wurden zentrifugiert (1000 U/min, 20 min, RT, ohne Bremse). Dabei setzte sich plättchenreiches Plasma ab, das mit einer Transferpipette abgenommen wurde und in ein 50 ml Falcon transferiert wurde. Das Plasma wurde dann mit Tyrodes pH 6,5 auf 35 ml aufgefüllt und zentrifugiert (2100 U/min, 10 min, RT, mit Bremse). Der Überstand wurde dann verworfen und das Pellet in 500 µl Tyrodes pH 6,5 aufgenommen und mit der gleichen Menge Tyrodes pH 7,4 neutralisiert. Die Zahl der Thrombozyten wurde am Sysmex bestimmt (1:10 Verdünnung mit Tyrodes pH 7,4).

2.2.6 Flp-InTM-CHO Zellen und Flp-InTM CHO-mGrem1-Fc Zellen

Für die Proteinproduktion wurde die Flp-InTM-CHO Zelllinie (*Chinese Hamster Ovary*, Invitrogen) benutzt. Die Flp-InTM-CHO Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen in 15 ml Ham's F12-Medium (+ 2 mM L-Glutamin, + 100 µg/ml Zeozin, +1% P/S, +10% FCS) kultiviert. Nachdem die Zellen konfluent waren, wurde für die Subkultivierung das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS- gewaschen und mit 5 ml 0,05% Trypsin für 3 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurde mit Medium neutralisiert und 5 min bei 300 g zentrifugiert. Der

Überstand wurde verworfen und das Pellet in Medium resuspendiert. Die Zellsuspension verteilte man dann auf neue Zellkulturflaschen und füllte diese auf 15 ml Medium auf.

Die Flp-InTM-CHO Zellen wurden mit mGremlin-1-Fc stabil transfiziert. Diese Arbeit wurde von Herrn Dr. med. Marius Stang im Rahmen seiner Doktorarbeit durchgeführt. Die Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen mit je 15 ml Ham's F12-Medium mit Zusatz von 2 mM L-Glutamin, 500 µg/ml Hygromycin, 1% P/S und 10% FCS kultiviert. Die Subkultivierung wurde wie bei den Flp-InTM-CHO Zellen durchgeführt.

Für die Proteinproduktion (mGremlin-1-Fc) wurden 3x10⁶ Zellen in eine 175 cm² Zellkulturflasche in 20 ml Ham's F12-Medium ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen, um serumfreie Bedingungen für die Proteinproduktion gewährleisten zu können. Die Proteinproduktion erfolgte in serumfreiem CHO (A) III- Medium (+4 mM L-Glutamin, + 10 ml P/S, + 4,5 g Glucose) für sieben Tage bei 37 °C im Brutschrank. Dabei gaben die Zellen in den Überstand das produzierte Protein ab. Am Tag 8 wurden die Überstände mit dem darin enthaltenen Protein geerntet und hierfür 10 min bei 900 g zentrifugiert. Dann wurde der Überstand in ein neues Falcon pipettiert, das Protein aufgereinigt (siehe Kapitel 2.1.6) oder bei -20°C zur späteren Proteinaufreinigung eingefroren.

2.2.7 Stabile Transfektion zur Herstellung der Zelllinie Flp-InTM CHO-mGremlin-1-Fc

Ham's F12-Medium	(Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
DMEM	(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, PAA, Pasching, Österreich) mit stabilem Glutamin und 4500 mg/l D-Glucose
Lipofectamin 2000	(Invitrogen; Life Technologies, Darmstadt, Deutschland)

Diese Arbeit wurde von Herrn Dr. med. Marius Stang im Rahmen seiner Doktorarbeit durchgeführt. Es wurden für die stabile Transfektion 6x10⁵ Flp-InTM-CHO Zellen in einer 6-well Platte ausgesät und über Nacht in Medium ohne Antibiotikum kultiviert. Nach 24 h waren Zellen zu 70_% konfluent. Für die Transfektion wurden zwei unterschiedliche Ansätze vorbereitet. Dazu wurden erstens 4 µg Plasmid-DNA, welche sich aus 3,5 µg pOG44 und 0,5 µg der gewünschten DNA zusammensetzt, mit 250 µl DMEM Medium vermischt. Zweitens wurden 10 µl Lipofectamin 2000 mit 250 µl DMEM vermischt. Beide Ansätze wurden einzeln fünf min und dann vermischt und für 20 min bei RT inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde der Transfektionsansatz zu den Zellen in Tropfen zupipettiert und durch Schwenken der Platte gut mit den Zellen vermischt. Die Transfektion wurde für 6h bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde dann nach abgelaufener Zeit abgenommen und neues Medium (3 ml)

ohne Antibiotikum zugegeben. Am nächsten Tag wurden die Zellen trypsinisiert und in Medium mit Antibiotikum in 30 cm²-Petrischalen ausgesät. Nach 24 h wurden 500 µg/ml Hygromycin zum Medium hinzugegeben, um die Zellen aufgrund ihres Resistenzgens auf den integrierten Vektor hin zu selektieren. Die CHO-Zellen, welche die erforderliche DNA aufgenommen hatten, wurden positiv selektiert. Alle anderen Zellen starben ab, die negativ transfiziert wurden. Während des Selektionsprozesses wurde zweimal wöchentlich das Medium gewechselt. Durch die Verwendung des Flp-In-Systems wurden positive Klone erzeugt, die als stabile Zelllinie das mGremlin-1-Fc exprimieren. Vor Benutzung der Klone zur Proteinproduktion wurden diese auf die Akkumulation des gewünschten Genprodukts hin getestet.

2.2.8 Isolierung von RNA aus Zellen

RNA-Later Solution (Ambion, Texas, USA)
RNeasy Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande)
Cell-Scraper (Zellschaber), (Cole-Parmer, Illinois, USA)
18 mm Blattbreite

Es wurden Monozyten aus buffy coats isoliert (siehe Kapitel 2.2.2). Die Zellen wurden in 6-well Platten kultiviert. Innerhalb unterschiedlicher Zeitpunkte wurden die Zellen mit jeweils 3 ml PBS (pro Well) gewaschen und dann mit 1,5 ml „RNA-Later“ Lösung inkubiert, um die RNA zu stabilisieren. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Wells gelöst und dann in ein Eppi gegeben und zentrifugiert (fünf min, RT, 20 000 g). Abschließend wurde der Überstand verworfen. Die mRNA aus den Monozytenpellets wurde unter Nutzung des RNeasy Kits von Qiagen laut Herstellerprotokoll isoliert. Die mRNA-Konzentration wurde gemessen (siehe Kapitel 2.3.4) und dann bei -20°C aufbewahrt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Plasmidherstellung und Klonierung

Das Fusionsprotein mGremlin-1-Fc (mGrem1-Fc) wurde von Herrn Dr. rer. nat. Christoph Leder designed und von Herrn Dr. med. Marius Stang und der Firma Medigenomix (Ebersberg, Deutschland) kloniert. Als Vektor diente pCDNA5/FRT (Invitrogen). Die gesamte Plasmidherstellung sowie Klonierung des Fusionsproteins mGrem1-Fc sind in der Doktorarbeit von Herrn Dr. med. Marius Stang ausführlich beschrieben ¹⁶⁴. Die Aminosäuresequenz des Fusionsproteins ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

N-

VECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPMLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALTHNHYTQKLSLSLSPGKGGGGSGGGGSG
GGGSLVPRGSKKKGSGQAIPPPDKAQHNDSEQTQSPQPGSRTRGRGQGRGTAMPG
EEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGCNSFYIPRHI
RKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPQLPPTKKKRVTRVKQCRCISIDL

-C

Abbildung 2.1: Aminosäuresequenz des murinen Fusionsproteins mGremlin-1-Fc. (Blau: Sekretionssignal (Ilg-Leader), Rosa: IgG-Fc, Grün: Thrombin-Schnittstelle, Orange: mGremlin-1

Das Plasmid pCDNA5/FRT-mGrem1-Fc ist in Abbildung 2.2 gezeigt. Das Plasmid steht unter der Kontrolle des CMV Promotors.

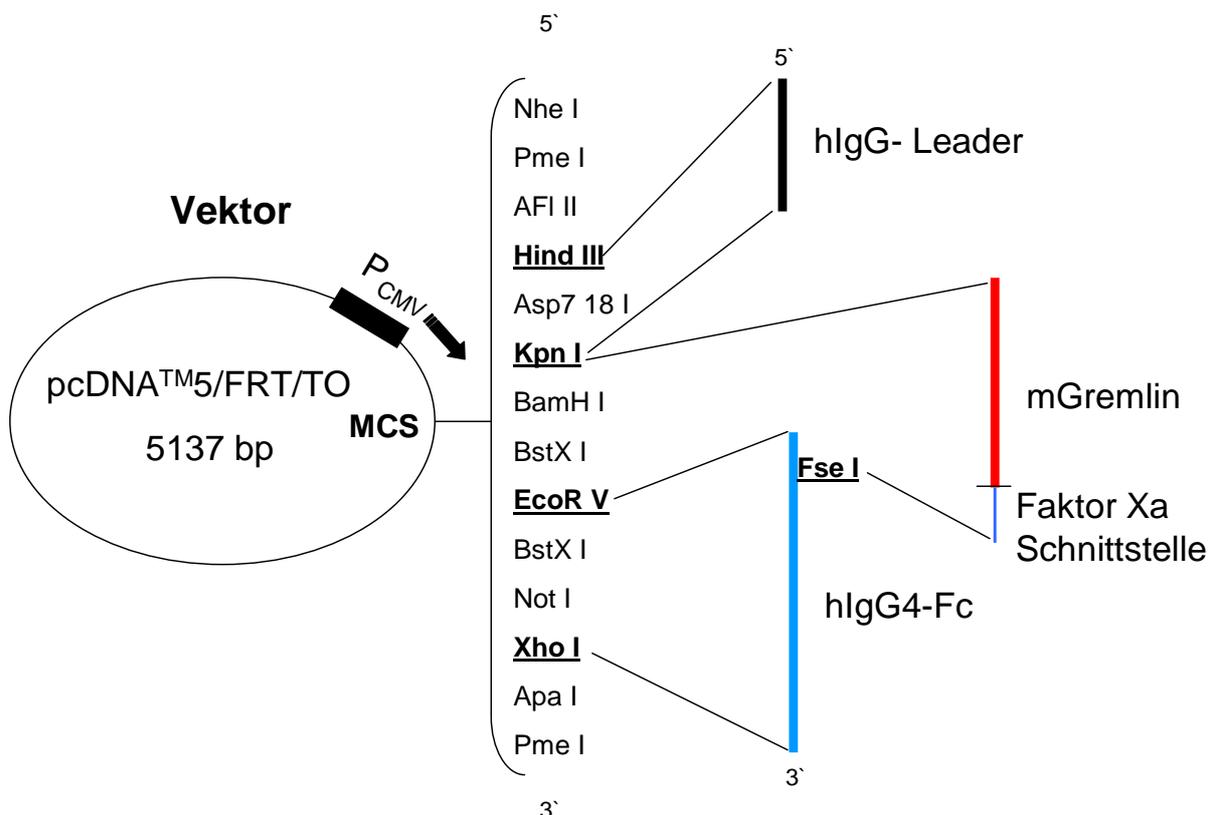


Abbildung 2.2: Aufbau des Plasmids pCDNA5/FRT-mGremlin-1-Fc (siehe Quelle: ¹⁶⁴)

Für die Amplifikation wurden kompetente *Escherichia coli* DH5 α (Stratagene) mit dem Expressionsvektor transformiert und anschließend das Plasmid mittels des Midi Prep Kit

(Qiagen) isoliert. Das produzierte Konstrukt wurde der Firma Eurofin MWG Operon (Deutschland) zur DNA Sequenzierung geschickt, um die sequentielle Richtigkeit des Konstrukts bei der erfolgten Klonierung sicherstellen zu können. Das hergestellte Plasmid wurde dann in CHO-Zellen stabil transfiziert und als Protein produziert (siehe Kapitel 2.2.7 und 2.2.6).

2.3.2 Isolation von RNA aus murinen Arterien und Herzen

Lysepuffer	1 Tablette Protease Inhibitor (Protease inhibitor cocktail tablets, complete EDTA-free, Roche, Mannheim, Deutschland), +12 ml IP-Puffer, + 132 µl Nonidet P40 Substitute (Fluka, Taufkirchen, Deutschland) Endkonzentration 1%, + 132 µl Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) Endkonzentration 1%. auf Eis stellen
Trizol Reagent	(Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland)
Chloroform	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Roti-Phenol/Chloroformlösung	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Nuclease-freies Wasser	(Promega, Reverse Transkriptase Kit, Mannheim, Deutschland)

Die RNA aus Herzen von Wildtyp- (C57BL/J6), 2d und 7d Tieren (Ischämiemodell) sowie kontrolloperierten Tieren (sham operated) wurden extrahiert. Die Herzen wurden von jeweils zehn und zwölf Wochen alten Mäusen verwendet. Die myokardiale Ischämie wurde induziert durch Ligatur der LAD (*left anterior descending artery*, siehe Kapitel 2.5.2). Dabei wurden die Herzen in sterilen Eppis mit Stickstoff kurz schockgefroren und darauf mit einem Pistill in kleine Stücke zerkleinert. Dann wurden die Herzen in jeweils 500 µl Lysepuffer 60 min bei 4°C auf dem Eppiröhrer inkubiert. Dann wurde 800 µl Trizol zugegeben und für 10 min bei RT unter vortexen inkubiert. Es wurden darauf 200 µl Chloroform dazugegeben und kurz gevortext und für 10 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation (10 min, 10000 rpm, 4°C) wurde der wässrige Überstand abpipettiert und in ein neues Eppi überführt mit anschließender Zugabe von 800 µl Roti-Phenol/Chloroformlösung. Die Eppis wurden wieder gevortext und 2 min bei RT inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (10 min, 10000 rpm, 4°C) wird der farblose Überstand abgenommen und im gleichen Volumen Isopropanol zugegeben mit einer 30 min Inkubation auf Eis. Eine Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, 4°C) und eine darauf folgende Abpipettierung des Isopropanols schliesst die RNA Isolierung ab. Das Pellet wird bei RT 30 min getrocknet und dann in 30 µl RNase-freien Wasser gelöst und bis zur Verwendung bei - 80°C gelagert.

2.3.4 Konzentrationsbestimmung der RNA

Geräte: nanodrop 2000c (Thermo Scientific, NanoDrop products, Wilmington, USA)

Durch die photometrische Messung mit Hilfe des nanodrops wurde die Konzentration der mRNA bestimmt. Das Extinktionsmaximum der RNA liegt bei 260, daher wird bei dieser bei einer optischen Dichte von 260 gemessen. Der Koeffizient aus OD260/OD280 spiegelt die Reinheit der RNA wieder. Wenn eine Verunreinigung der RNA mit Proteinen vorliegt, wird dies bei einer OD 280 aufgezeigt, da Proteine dort eine verstärkte Absorption aufweisen. Bei einer reinen Isolierung der RNA liegt der Koeffizientenwert zwischen 1,8 - 2,0. Bei der RNA Messung mit dem nanodrop kann diese direkt ohne vorherige Verdünnung der RNA erfolgen. Als Leerwert wird vor jeder Messung einmal als blank ddH₂O verwendet, welches vorher im letzten Schritt im Isolierungsprotokoll benutzt wurde. Dazu wurde im nanodrop auf die Messoberfläche 1 µl Lösung pipettiert und das Programm (Nanodrop 2000) maß die OD bei 260 nm und 280 nm. Danach wurden der Messkopf und die Messoberfläche mit einem Tuch gereinigt. Dann erfolgte die Messung der RNA, wobei ebenfalls 1 µl der RNA Lösung aufgetragen wurden und bei den bereits erwähnten Wellenlängen wurde die OD gemessen. Die Konzentration wurde im Gerät direkt bestimmt und bereits angezeigt unter Berücksichtigung des Abzugs des Leerwerts. Die Angabe der Konzentration erfolgte in [ng/ml].

$$c[\text{RNA}] = \text{OD}_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.3.5 cDNA-Synthese

(IMIIProm Reverse Transkriptase synthesis Kit, Promega, Mannheim, Deutschland).

DNase I (Roche, Mannheim, Deutschland)

Es wurde von der isolierten RNA 200 ng (Monozyten) oder 200 ng (RNA aus Herzen) in cDNA umgeschrieben. Zuvor wurde ein DNase Verdau durchgeführt. Dabei wurde 1 µl DNase I mit 9 µl RNA vermischt und dann im PCR-Cycler für 40 min inkubiert (30 min 37°C, 10 min 75°C). Die 10 µl aus dem DNase-Verdau wurden mit 100 ng Primer (Oligo(dT)) in ein Eppi pro Ansatz gegeben. Pro Ansatz wird die cDNA Synthese wie folgt zum Mastermix vermischt zusammen mit Primer und RNA:

RNA+ Primer	11 µl
ImPromII 5x Reaction Buffer	4 µl
MgCl ₂ (7 mM)	1 µl
dNTP Mix	1 µl
Recombinant RNasin Ribonuclease	0,5 µl
Inhibitor	
ImPromII Reverse Transkriptase	1 µl

20 µl gesamt pro Probe

Alle Proben werden auf Eis pipettiert. In Tabelle 2.4 ist ersichtlich welches Programm verwendet wurde für die cDNA Synthese.

Tabelle 2.4: Programm für die cDNA-Synthese

<i>Phase 1</i>	<i>Phase 2</i>	<i>Phase 3</i>
90 min	15 min	60 min
4°C	70°C	4°C

2.3.6 Polymerasekettenreaktion (PCR) von murinem Gewebe und humanen Monozyten

Die cDNA wurde verwendet in der semiquantitativen PCR Analyse für den Nachweis der MIF und Gremlin-1 Expression. Als interne Kontrolle wurde Aldolase benutzt. Die PCR wurde mit 20 ng der cDNA durchgeführt unter Benutzung der Taq DNA Polymerase (Promega) für ein Zyklusintervall von 24 bis 35 Zyklen (1 min bei 95°C, 1 min bei 60 bis zu 65°C, und 1 min bei 72°C). Die Primerpaare wurde so gewählt, dass sie Intron-/Exon- Grenzen flankierten um die Möglichkeit der Amplifikation von genomischer DNA auszuschließen. Die Primersequenzen der murinen und humanen Primerpaare sind in Tabelle 2.5 dargestellt.

Tabelle 2.5: Liste verwendeter Primer (human) für die PCR

<i>Primer</i>	<i>Sequenz</i>
hMIF forward	5'-CTCTCCGAGC TCACCCAGCAG-3'
hMIF reverse	5'-CGCGTTCATGTCGTAATAGTT-3'
hGremlin-1 forward	5'-GTATGAGCCGCACAGCCTACA-3'
hGremlin-1 reverse	5'-CTCGCTTCAGGTAT TTG CGCT-3'
hAldolase-b forward	5'-GCCACTTCTCAACCTCAATGC-3'
hAldolase-b reverse	5'-TCTCCTTCCCAACCTACCAC-3'.

2.3.7 Nachweis des PCR-Produkts mittels Elektrophorese im Agarosegel

10x TBE-Puffer: 108 g Tris-Base (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) 55 g Borsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) 4 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) werden mit ddH₂O auf 1 Liter aufgefüllt. Der Puffer wird für den Gebrauch 1:10 verdünnt.

Agarose (Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland)

10 mg/ml Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

100 bp, 1 kb benchtop (Promega, Madison, USA)

DNA ladder

Geräte:

horizontale Gelapparatur (Peqlab, Erlangen, Deutschland)

Stromquelle

Um Spuren von Verunreinigungen zu beseitigen, wurden die Apparaturen für die Gelelektrophorese im Vorfeld mit Ethanol gereinigt. Nach erfolgter PCR wurden die Proben bis zum Gellauf bei 4°C gelagert. Für die Auftrennung des PCR-Produkts wurde ein 2 % Agarosegel gegossen. Dazu wurden 2 g Agarose in 200 ml TBE-Puffer in der Mikrowelle (4 min; 700 Watt) erhitzt. Das flüssige Gel wurde in die Gelapparatur gegossen, wohin vorher die Gelkämme eingesetzt wurden. Das Gel war nach einer Zeit von 30 min vollständig polymerisiert. Als Laufpuffer wurde TBE-Puffer benutzt, der in die Gelapparatur eingefüllt wurde, sodass das Gel gut mit Puffer bedeckt war. Es wurden 20 µl des PCR-Produkts auf das Gel aufgetragen und bei einer Spannung von 80 V ca. 30 min aufgetrennt. Als Marker diente je nach Größe des Produkts entweder der 100 bp oder 1 kb Marker, von dem 5 µl aufgetragen wurden. Anschließend wurde das Agarosegel 15 min in einem Ethidiumbromidbad inkubiert und gefärbt. Das Resultat wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht und mittels des Quantum-capt Programms fotografiert und bearbeitet.

2.3.8 RT-PCR

Absolute Blue SYBR Green Kit (Thermo Scientific, Waltham, USA)

Geräte:

Light Cycler 480 System (Roche, Mannheim, Deutschland)

Bei der RTPCR wird wie bei der ursprünglichen Polymerasekettenreaktion Nukleinsäure vervielfältigt. Bestimmte DNA Farbstoffe wie SYBR Green werden während der RTPCR in

die Doppelstränge der DNA eingelagert, wobei die Zunahme des Emissionsspektrums der Farbstoffe proportional zur amplifizierten DNA Menge ist. Als interne Kontrollen werden in der RTPCR sogenannte Housekeepinggene eingesetzt, welche in allen Proben gleich stark exprimiert werden. Die in den vorherigen Kapiteln gewonnene cDNA wurde zur RT-PCR benutzt. Dazu wurden 5 µl cDNA (10 ng/µl) eingesetzt und mit 20 µl der folgenden Mischung (Tabelle 2.6) in eine 96-Well Platte pipettiert.

Tabelle 2.6: RT-PCR Ansatz der murinen Herzproben

Chemikalien	Menge
qPCR Mastermix plus	10 µl
Primer (forward)	x µl
Primer (reverse)	y µl
ddH ₂ O	10 µl – (x + y)

Tabelle 2.7: Liste verwendeter Primer (murin) für die RTPCR

Primer	Sequenz
m β-Aktin forward	5`ACCTCCAACACCCCAGCCATG-3`
m β-Aktin reverse	5`GCTCGGTCAGGATCTTCATGAGG-3`
mGrem1 forward	5`ACAGCGAAGAACCTGAGGAC-3`
mGrem1 reverse	5`CAGCTGTTGGCAGTAGGGTC-3`

Die Platte wurde zum Entfernen von Luftblasen zentrifugiert (5 min, 3000 g) und dann mittels des Light Cyclers amplifiziert. Um das Enzym zu Beginn der PCR zu aktivieren, wurden die Probe 2 min auf 50°C erhitzt und anschließend für 10 min bei 95°C inkubiert. Dann erfolgte die Amplifikation über 40 Zyklen nach dem in Tabelle 2.8 gezeigten Programm.

Tabelle 2.8: RTPCR Programm

Phase 1	Phase 2	Phase 3
15 s 95°C	30 s 60°C	10 s 72°C

2.4 Funktionale Assays

2.4.1 Dynamische Adhäsion unter Flussbedingungen (Flusskammer)

BSA	(Bovine Serum Albumin), Albumin solution from bovine serum, 30% in DPBS (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
70 % Ethanol	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
humanes Gremlin-1	rekombiantes Protein, (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)
humanes MIF	(Macrophage migration inhibitory factor), rekombiantes Protein, (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)
humanes TNF- α	(Tumor Nekrose Faktor alpha) rekombinantes Protein, (tebu-bio, Offenbach, Deutschland)
humanes IFN- γ	(Interferon gamma) rekombinantes Protein, (tebu-bio, Offenbach, Deutschland)
Gelatine	2% Gelatine solution, (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland)
Deckgläser	Ø 25 mm (Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland)
Discofix 3C3sc	(Braun, Melsungen, Deutschland)
Original Perfusor Syringe (50 ml)	(Braun, Melsungen, Deutschland)
Geräte:	
Perfusor® Fm	(Braun, Melsungen, Deutschland)
Flusskammersystem	Flow chamber system FCS 1c (pro vitro, Berlin, Deutschland)
Video Disk Reader	VDR 3000 (Data Video Technologies, Utrecht, Niederlande)

Es wurde die Adhäsion von humanen Monozyten der Zelllinie Mono Mac 6 (MM6) unter dynamischen Bedingungen im Flusskammersystem untersucht. Dabei erfolgte eine Perfusion der Zellen über Glasplättchen, die mit ECV-304 Zellen bewachsen waren. Dafür wurden die Glasplättchen zunächst mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet und in 6-Well Platte transferiert. Die Glasplättchen und die Wells wurden für das Experiment mit 0,2% Gelatine beschichtet, um ein besseres Anwachsen der ECV-304 Zellen zu gewährleisten. In jedes Well wurden $0,5 \times 10^6$ ECV-304 Zellen ausgesät über Nacht in

M-199 Medium mit Zusätzen (siehe Kapitel 2.2.1.1) kultiviert, sodass das gesamte Glasplättchen eine Konfluenz an Zellen aufwies. Die ECV-304 Zellen wurden dabei stimuliert oder blieben als Kontrolle vollkommen unbehandelt. Für eine Aktivierung der ECV-304 Zellen wurde eine alleinige Stimulierung mit 50 ng/ml TNF- α und 25 ng/ml INF- γ für 6h bei 37°C durchgeführt. Des Weiteren wurden die Zellen außerdem mit 50 ng/ml MIF für 4,5h stimuliert oder in einem Doppelansatz für 3,5h zusätzlich mit 2 μ g/ml Gremlin. Die ECV-304 Zellen waren dabei entweder unter aktivierten Bedingungen, wobei die Stimulierung immer mit TNF- α + INF- γ erfolgte und zusätzlich MIF oder MIF und Gremlin zugegeben wurde, oder die Zellen blieben unaktiviert und wurden nur einzeln mit MIF oder MIF und Gremlin zusammen behandelt. Die MM6 Zellen, welche über die mit ECV-304 beschichteten Glasplättchen perfundiert wurden, hatten ebenfalls eine Stimulierung in der Vorbereitung des Versuches. Dabei wurden die MM6 Zellen für 2h mit 5 μ g/ml Gremlin, als Kontrollprotein 50 ng/ml BSA oder unbehandelt im MM6-Medium vorbehandelt bei 37°C. Die Zellen waren dabei auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt und wurden nach 2h Inkubation in eine 50 ml Perfusionspritze überführt und in den Perfusor eingespannt. Die vorinkubierten Glasplättchen wurden in die Flusskammer eingesetzt und arretiert. Dann wurden die vorinkubierten MM6 Zellen über die Glasplättchen mit einer Geschwindigkeit von 15 ml/h und einer Scherrate von 2000 s^{-1} perfundiert. Pro Versuchsansatz wurde nach 10 min von vier verschiedenen Stellen des eingespannten Glasplättchens je eine 40-sekündige Aufnahme gemacht. Bei der Auswertung wurden die rollenden und die adhärenen Zellen ausgezählt. Eine Zelle wurde als positiv adhären bewertet, wenn sie 15 s an einer Stelle verharrte.

2.4.2 Migrationsassay von humanen Monozyten (Chemotaxis)

Migrationsmedium	RPMI 1640 (PAA, Pasching, Österreich), Zusätze (1% FCS, 1% P/S)
MCP-1	(Monocyte Chemotactic Protein-1), rekombinantes Protein (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
Migrationskammer (48-well)	(Neuro Probe Inc., Gaithersburg, USA)
5 μ m Polycarbonat Membran	(Neuro Probe Inc., Gaithersburg, USA)
Giemsas Färbelösung	Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung (Merck, Darmstadt, Deutschland), 1:10 Verdünnung mit ddH ₂ O.
May-Grünwald Färbelösung	May-Grünwald Eosin-Methylenblaulösung (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Objekträger	76x55 mm, (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland)
Deckgläser	24x40 mm, (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Eukit	Roti®-Histokitt, (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Geräte:

Mikroskop Axiovert 200 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)

FACSCalibur (BD Biosciences, CA, USA)

Durchflusszytometer

Es wurden humane Monozyten aus buffy coats oder aus Vollblut in CPDA-Monovetten mit Hilfe des Ficoll-Paque isoliert (siehe Kapitel 2.2.2). In einer anderen Versuchsreihe wurden für die Migration murine Monozyten verwendet. In die obere Kammer wurden pro Well 2×10^4 Monozyten in jeweils 50 μ l Migrationsmedium gegeben. Um das Migrationsverhalten der humanen Monozyten zu testen, wurden im Zweikammersystem verschiedene Ansätze verwendet. Es wurde in einer Versuchsreihe das zu testende Chemokin zum Medium in die untere Kammer gegeben. Als Positivkontrolle diente hMCP-1 (50 ng/ml) und Medium ohne Chemokinzugabe als Negativkontrolle. In der unteren Kammer wurden hMIF (10 ng/ml, 50 ng/ml) und hGrem1 (2 μ g/ml, 5 μ g/ml) im getrennten Ansatz getestet, oder beide Proteine wurden in einem Doppelansatz verwendet. Als Kontrollprotein wurde BSA im Versuch mitgeführt. Vom Aufbau des Kammersystems her, wurde in den Testreihen zunächst die untere Kammer befüllt mit jeweils 28 μ l Endvolumen pro Well, dann wurde der zuvor in PBS äquilibrierte Filter auf die untere Kammer luftblasenfrei aufgelegt. Dann wurde die Silikonmatte und abschließend der obere Kammeraufsatz aufgesetzt und befüllt mit jeweils 50 μ l Endvolumen pro Well. Das gesamte Kammersystem wurde mit Schrauben stabil fixiert und mit Parafilm umwickelt um eine Verdunstung der Flüssigkeit in der oberen Kammer zu verhindern. Die Migration erfolgte für 6h bei 37°C im Inkubator. Nach 6h wurde die Flüssigkeit aus der oberen Kammer entfernt. Die Kammer wurde dann auseinandgebaut und der Filter in 15 ml Methanol fixiert für 10 min. Die fixierten Zellen auf dem Filter konnten dann angefärbt werden durch die Benutzung der May-Grünwald Färbelösung (10 ml) mit einer Inkubationszeit von 10 min. Der Färbeschritt wurde abgestoppt durch einer Zugabe von 10 ml ddH₂O und einer Inkubation von 1 min. Zweitens wurde dann eine Filterfärbung mit 10 ml Giemsa für 25 min durchgeführt. Dann wurde Filter mit ddH₂O gespült und auf einen Objektträger aufgezogen und mit Eukit eingedeckt. Nachdem der Objektträger getrocknet war, wurde jedes Well des Filters unter dem Mikroskop in 20x Vergrößerung fotografiert und ausgezählt. Diese bestimmte Zahl entsprach den transmigrierten Zellen. Die Zellzahl der vollständig in die untere Kammer gewanderten Zellen konnte bestimmt werden durch einer Überführung der Zellen aus der unteren Kammer in ein FACS-Röhrchen und der Messung für 1 min mit dem FACS-Gerät.

2.4.3 Aktivierungsabhängiges Sekretionsverhalten humaner Monozyten

LPS (Lipopolysacharid), rekombinantes Protein (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Humaner MIF ELISA (RayBiotech, Norcross GA, USA)

Humaner Gremlin-1 (Uscn Life Science Inc., Wuhan, China)

ELISA

Es wurden humane Monozyten aus Vollblut mittels des Ficoll-Paques isoliert (siehe Kapitel 2.2.2). Die Monozyten wurden dann in 24-Well Platten ausgesät mit einer Zellzahl von 3×10^5 pro Well. In einer Zeitreihe von 2h, 4h, 6h, 8h, 24h und 48h wurden die Monozyten bei 37°C inkubiert. Es gab dabei die Versuchbedingungen der Zeitreihe mit der Stimulierung durch LPS (1 µg/ml) und als Kontrolle Medium. Nach den verschiedenen Zeitpunkten wurden die Überstände abgenommen und abzentrifugiert (4°C, 14000 rpm, 5 min) und eingefroren. Die Zellen wurden lysiert und ebenfalls abzentrifugiert und eingefroren. Die Sekretion von Gremlin-1 und MIF aus den humanen Monozyten wurde durch die Analyse der Überstände im ELISA untersucht. Die Überstände wurden dabei 1:10 verdünnt. Der Ablauf des ELISAs erfolgte laut Herstellerangaben in den einzelnen Kits. Die Lysate der Monozyten innerhalb der Zeitreihe wurden mittels Westernblot auf die Expression von MIF und Gremlin hin untersucht.

2.4.4 Muriner Schaumzellbildungsassay

Murines Gremlin-1 rekombinantes Protein, (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)

Murines MIF rekombinantes Protein (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)

Murines PRDC (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)

Blockierungsantikörper MIF monoklonaler Antikörper Klon IID9 (AG Bernhagen, RWTH Aachen, Deutschland)

Normal mouse IgG (Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Deutschland)

Muriner TNF-α ELISA (R&D Systems Inc., MN, USA)

Geräte:

Mikroskop Axiovert 200 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)

Nach der Opferung von Wildtyp- (C57BL/6J) und MIF Knockout Mäusen wurden die murinen Monozyten aus der Milz isoliert (siehe Kapitel 2.2.3). Die MIF Knockout Mäuse wurden von

der Arbeitsgemeinschaft Herr Prof. Bernhagen der RWTH Universität Aachen, Deutschland innerhalb einer Kooperation zur Verfügung gestellt. Die Monozyten wurden mit einer Zellzahl von 5×10^4 in 96-Well Platten in RPMI 1640 (+ 10 FCS, +1% L-Glut., 1% P/S) ausgesät. Die Dauer des Versuchs wurde für acht Tage angesetzt für die Differenzierung der Monozyten zu Schaumzellen. An den Tagen eins und vier wurde eine Stimulierung mit folgenden Reagenzien vorgenommen: Gremlin-1 (0,5 µg/ml), MIF (10 ng, 50 ng/ml), PRDC (1 µg/ml), mGrem1-Fc (1 µg/ml), Gremlin-1 (0,5 µg/ml) + MIF (10 ng/ml), mGrem1-Fc (1 µg/ml) + MIF (10 ng/ml), MIF Blockierungsantikörper (25 µg/ml), Normal mouse IgG (25 µg/ml) oder als Kontrolle Medium ohne Zusätze. Am Tag acht wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und die TNF-α Konzentration gemessen mit Hilfe der Nutzung des TNF-α ELISA Kits laut Protokoll des Herstellers. Die Zellen wurden an d3 und d7 in 20-facher Vergrößerung fotografiert und die Anzahl der gebildeten Schaumzellen pro Gesichtsfeld wurde mittels Auszählung generiert.

2.4.5 Humaner Schaumzellbildungsassay

Humaner TNF-α ELISA (R&D Systems Inc., MN, USA)

Humane Monozyten wurden isoliert aus Vollblut. Die isolierten Monozyten wurden mit einer Zellzahl von 5×10^4 pro Well in Schaumzellmedium (RPMI 1640, + 1% Natrium Pyruvate, +1% L-Glut., 1%P/S, 1%NEAA, 20% human serum) in 96-Well Platten ausgesät und zu Schaumzellen ausdifferenziert. An den Tagen eins, fünf und zehn wurden die Zellen mit folgenden Reagenzien stimuliert: mGremlin-1 (0,5 µg, 1 µg, 2 µg/ml), mMIF (10 ng, 50 ng/ml), mPRDC (1 µg/ml), mGrem1-Fc (1 µg/ml), mGremlin-1 (0,5 µg/ml) + mMIF (10 ng/ml), mGrem1-Fc (1 µg/ml) + 10 ng/ml mMIF (10 min vorinkubiert bei RT), MIF Blockierungsantikörper (25 µg/ml), Isotypkontrolle normal mouse IgG (25 µg/ml) oder als Kontrollmedium. Um die Ausdifferenzierung der Zellen zu erzeugen, wurde neben der Benutzung des nährstoffreichen Mediums, eine Zugabe von acLDL (80 µg/ml) am Tag vier vorgenommen. Die Zellkulturüberstände der Zellen wurden an den Tagen eins, vier, sieben, zehn und dreizehn abgenommen, abzentrifugiert und mittels des humanen TNF-α ELISA Kits auf die Konzentration an TNF-α hin untersucht. Von den gleichen Tagen in der Schaumzellentwicklung wurden Bilder in 20x Vergrößerung gemacht und die Anzahl der sich entwickelten Schaumzellen pro Gesichtsfeld der verschiedenen Ansätze bestimmt.

2.4.6 In vitro Kollagenassay

Murines TGFβ-1 (Transforming growth factor beta 1), rekombinantes Protein (CellSignalling, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland)

Murines PRDC	rekombinantes Protein, (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)
Murines Gremlin 1	rekombinantes Protein, (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)
mGrem1-Fc	(AG Gawaz, Experimentelle Kardiologie, Universitätsklinik Tübingen)
humanes Gremlin-1	rekombinantes Protein, (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)
humanes TGF β -1	rekombinantes Protein, (MilliPore, Tamecula, Kanada)
Murines Collagen I ELISA	(Uscn Life Science Inc., Wuhan, China)

Es wurden murine Fibroblasten (PMEFs) in DMEM high Glucose Medium (10% FCS, 1% Pen/Strep und 1% L-Glutamin) kultiviert und für die Durchführung des *in vitro* Tests in 24 Well Platten mit einer Zellzahl von 100000 Zellen ausgesät (Benutzung der Passagen 2-5). Die 24 Well Platten wurden dabei im Vorfeld mit 0,2% Gelatine-Lösung beschichtet für 10 min bei 37°C und die Gelatine-Lösung dann wieder entfernt. Die Stimulierung der PMEF erfolgte für 48h mit folgenden Cytokinen: mTGF β -1 (5 ng/ml), mGremlin (5 μ g/ml), mPRDC (5 μ g/ml), mGrem1-Fc (5 μ g/ml) und Mediumkontrolle. Die Zellen wurden entweder einzeln oder in einem Doppelansatz stimuliert (z.B. TGF β -1 alleine oder zusammen mit Gremlin1). Für die Doppelansätze wurden die rekombinanten Proteine zuvor für 10 min bei RT vorinkubiert. Nach 48h der Inkubation bei 37°C wurden die Überstände abgenommen und die Zellfragmente entfernt durch einen Zentrifugationsschritt (14000 rpm, 10 min, 4°C). Die Überstände wurden analysiert auf die Konzentration an murinem Kollagen I mittels der Benutzung des Murinen Collagen I ELISA Kits. Des Weiteren wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann mit Lysepuffer (RIPA-Lysepuffer) lysiert auf Eis und pelletiert durch Zentrifugation (14000 rpm, 10 min, 4°C). Die Zelllysate wurden dann mittels Westernblot und Immundetektion auf die Expressionslevel an Kollagen I hin untersucht (verwendete Proteinkonzentration 30 μ g/ml). Als interne Ladekontrolle diente dabei β -Aktin. Des Weiteren wurden humane Fibroblasten (HCF) für 48h mit hTGF β -1 (5 ng/ml, 10 ng/ml) und/ oder hGremlin1 (1 μ g/ml, 5 μ g/ml) stimuliert und dann fixiert und auf ihre Expression an Kollagen I hin mittels konfokaler Immunzellmikroskopie untersucht (siehe nächstes Kapitel).

2.4.7 Konfokale Immunzellmikroskopie

Draq 5	1,5-bis(2-(di-methylamino)ethylamino)-4,8-dihydroxyanthracene-9,10-dione (biostatus limited, Shepshed, UK), Verdünnung 1:2000 in PBS
--------	--

DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole, 500 ng/ml in PBS (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland)
TO-PRO-3 Iodide	(Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) Verdünnung 1:1000 in PBS
16-well chamber slides	(Thermo Scientific, Rockford, USA)
4% Formaldehyd-Lösung	(Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland)
Triton X 100	(Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland)
Protein free blocking solution	(Dako, Carpinteria, USA)
Mounting Medium	(Dako, Carpinteria, USA)
Primantikörper	Siehe Tabelle 2.9
Sekundärantikörper	Siehe Tabelle 2.10

Geräte:

Zeiss LSM5 EXCITER Confocal Laser Scanning Microscope	(Carl Zeiss Micro Imaging, Jena, Germany)
Leica TCSSP Confocal Laser Scanning Microscope,	(Leica Microsystems, Allendale, USA)

Tabelle 2.9: Liste verwendeter Primantikörper und Isotypkontrollen

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Gremlin-1	Kaninchen, polyklonal	1:10	Abnova, Deutschland
Gremlin-1	Kaninchen, polyklonal	1:10	Santa Cruz, Deutschland
MIF	Ziege, polyklonal	1:18	RD Systems, Deutschland
TGFβ-1	Ziege, polyklonal	1:25	Santa Cruz, Deutschland
Collagen I	Kaninchen, polyklonal	1:200	Abcam, UK
IgG Goat	Ziege	1:18/ 1:25	Vector, USA
IgG Rabbit	Kaninchen	1:10/ 1:200	Dako, USA

Tabelle 2.10: Liste verwendeter Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Alexa fluor 555 donkey anti-rabbit IgG (H+L)	Kaninchen	1:300	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Alexa fluor 488 donkey anti-goat IgG (H+L)	Ziege	1:300	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

Es wurden humane Monozyten aus Vollblut (buffy coat oder CPDA-Monovetten) isoliert und entsprechend des in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Protokolls zu Makrophagen oder Schaumzellen ausdifferenziert. Die isolierten Monozyten wurden auf eine Zellzahl von 5×10^4

eingestellt und in 16-well chamber slides ausgesät. Die Monozyten wurden direkt am nächsten Tag gefärbt, oder bis zur Ausdifferenzierung in Makrophagen oder Schaumzellen kultiviert und dann gefärbt. Die PMEF wurden für die Färbung 24h in 16 well chamber slides mit einer Zellzahl von 5×10^4 kultiviert. Die HCF wurden, wie im Kapitel 2.4.6 beschrieben, behandelt und der Färbung zugeführt. Für die Färbung wurde das Medium entfernt und es erfolgte ein zweimaliger Waschschrift der Zellen mit PBS. Die Zellen wurden dann mit 4% PFA 10 min fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Darauf folgte eine Permeabilisierung der Zellen mit 0,1% Triton X in PBS für 10 min und einmaligen Waschschrift mit PBS. Dann wurde ein Blockierungsschritt mit der Protein free blocking solution für 1h bei RT durchgeführt. Die Inkubation mit denen im Doppelansatz verwendeten Primärantikörpern erfolgte in einem Mischverhältnis von 1:1 1h bei RT (mit Ausnahme der Einzelfärbung mit dem Anti-Collagen I Antikörpers). Alle Antikörper wurden mit 1% BSA in PBS verdünnt. Die Färbung mit dem Sekundärantikörper wurde für 1h bei RT abgedunkelt durchgeführt, wobei für die Doppelfärbung beide Antikörper wieder 1:1 gemischt wurden, oder für die Einzelfärbung nicht gemischt wurden. Dann wurden die Zellkerne mit Draq 5 (1:2000 in PBS) oder TO-PRO-3 (1:1000 in PBS) für 15 min abgedunkelt gefärbt. Bei einer Kernfärbung mit DAPI wurde für 3 min eine Färbung durchgeführt. Nach beiden Antikörperfärbungen und der Kernfärbung wurde dazwischen dreimal 5 min mit PBS gewaschen. Die chamber slides wurden dann entfernt von dem Objektträger, die Zellen wurden mit Mounting Medium eingedeckelt und im Dunkeln bei 4°C gelagert. Dann erfolgte eine Auswertung der Färbung mittels konfokaler Mikroskopie.

2.5 In vivo Versuche

2.5.1 Tiere

Alle Maßnahmen und Eingriffe an Tieren (operative Techniken, Anästhesie-Verfahren, Schmerztherapie und Tötung der Tiere) wurden von Frau Dr. med. vet. Tanja Schönberger durchgeführt. Es wurden für die Tierversuche des ApoE^{-/-} Modells männliche ApoE^{-/-} Mäuse (B6.129P2-Apoe^{tmUnc1}) von Jackson Laboratories (Bar Harbor, USA) verwendet und als Kontrolle dienten C57/BL6J Wildtypmäuse von Charles River (Sulzfeld, Deutschland). Die Untersuchungen zum Modell ApoE^{-/-} wurde am 10. November 2009 vom Regierungspräsidium Tübingen gemäß §7 Tierschutzgesetz (Neufassung vom 9. Dezember 2010) unter der Versuchsnummer M2/09 genehmigt. Für alle Tierversuche wurden spezifisch pathogen freie C57BL/J6 Mäuse von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Untersuchungen zum Myokardinfarkt wurde am 10. November 2009 vom Regierungspräsidium Tübingen gemäß §8 Tierschutzgesetz (Neufassung vom 9. Dezember 2010) unter der Versuchsnummer M7/09 genehmigt. Als Kontrolle dienten C57BL/6J Wildtypmäuse von Charles River (Sulzfeld, Deutschland).

2.5.2 Mausmodell der Artherosklerose und Krankheitsprogression

Alle Versuche an Tieren und die begleitenden Maßnahmen wie Anästhesie-Verfahren, Schmerztherapie und Tötung der Tiere wurden von Frau Dr. med. vet. Tanja Schönberger durchgeführt. Die Proteinproduktion von mGrem1-Fc zu diesen Versuchen wurde von Herrn Florian Appenzeller und von mir durchgeführt. Die Herstellung von Gewebeschnitten und histologischen sowie immunhistochemischen Färbungen wurden von mir und von Herrn Florian Appenzeller im Rahmen seiner medizinischen Doktorarbeit durchgeführt.

Männliche ApoE^{-/-} Mäuse (B6.129P2-Apoe^{tmUnc1}) wurden für die Tierversuche im Artherosklerosemodell verwendet (Jackson Laboratories). Die Mäuse wurden während den Experimenten einer cholesterinreichen Diät (1,25% Cholesterin, 0,2% Cholat, Provimi Kliba AG, Kaiseraugst, Switzerland,) ausgesetzt. Als Kontrolle dienten gesunde C57BL/J6 Wildtypmäuse (Charles River Laboratories). Die Versuche im ApoE^{-/-} Modell wurden im Verlauf an 4-16 Wochen alten Mäusen durchgeführt, welche eine cholesterinreiche Diät bekamen. Die Expressionslevel an Gremlin-1 in atherosklerotischen Arterien wurden gemessen, indem 4 - 12 Wochen alte Mäuse angefüttert, am Ende die großen Arterien (Aortic arch, Aorta thoracica and Aorta abdominalis) entnommen wurden und für die spätere histologische und molekularbiologische Untersuchungen bei -80°C gelagert.

2.5.2 Mausmodell der myokardialen Ischämie/Reperfusion

Fentanyl	(CuraMed Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
Isofluran	(Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland)
Medetomidin	(Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland)
Midazolam	(Ratiopharm, Ulm, Deutschland)

Alle Versuche an Tieren und die begleitenden Maßnahmen wie Anästhesie-Verfahren, Schmerztherapie und Tötung der Tiere wurden von Frau Dr. med. vet. Tanja Schönberger und unter ihrer Leitung auch von Herrn Tobias Jürgens durchgeführt. Die Proteinproduktion von mGrem1-Fc zu diesen Versuchen wurde von mir durchgeführt. Die Herstellung von Gewebeschnitten und histologischen sowie immunhistochemischen Färbungen wurde von mir durchgeführt.

Es wurden 10 bis 12 Wochen alte, männliche Mäuse intraperitoneal anästhesiert mit einer dreifachen antagonisierbaren Kombinationsnarkose aus dem Benzodiazepin Midazolam (5 mg/kg Körpergewicht), dem α 2-Adrenozeptoragonisten Medetomidin (0,5 mg/kg Körpergewicht) und dem Opioid Fentanyl (0,05 mg/kg Körpergewicht). Durch eine permanente Isofluranzufuhr wurde die Narkose beibehalten. Durch eine Ligatur der LAD (*left anterior descending artery*) wurde die myokardiale Ischämie induziert. Die Ligation eines

Gefäßes erkennt man daran, dass die Arterie distal der Ligatur nicht mehr sichtbar ist. Nach 30 min wurde die Ligatur geöffnet.

2.5.3 Behandlung mit mGremlin-1-Fc in der ApoE^{-/-} Versuchsreihe



Abbildung 2.3: Schematischer Verlauf der ApoE Versuchsreihe mit mGremlin-1-Fc

Isofluran (Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland)

Um den Effekt von mGremlin-1-Fc im ApoE^{-/-} Modell zu untersuchen wurden 4 Wochen alte Mäuse einer cholesterinreichen Diät ausgesetzt. Im Alter von 10 Wochen wurden die Mäuse mit mGremlin-1-Fc (1 µg/g Körpergewicht, n = 8) oder Kontroll-Fc (äquimolar, n = 8) dreimal pro Woche intraperitoneal behandelt für die Dauer von 4 Wochen. Danach wurden die Mäuse mit Isofluran narkotisiert und geopfert.

Tabelle 2.11: Gruppeneinteilung für die Untersuchungen im ApoE^{-/-} Modell

Gruppe	Gruppengröße	Protein
Gruppe 1	n = 8	mGremlin-1-Fc
Gruppe 2	n = 8	Fc

2.5.4 Behandlung mit mGremlin-1-Fc im myokardialen Ischämie/Reperfusionmodells

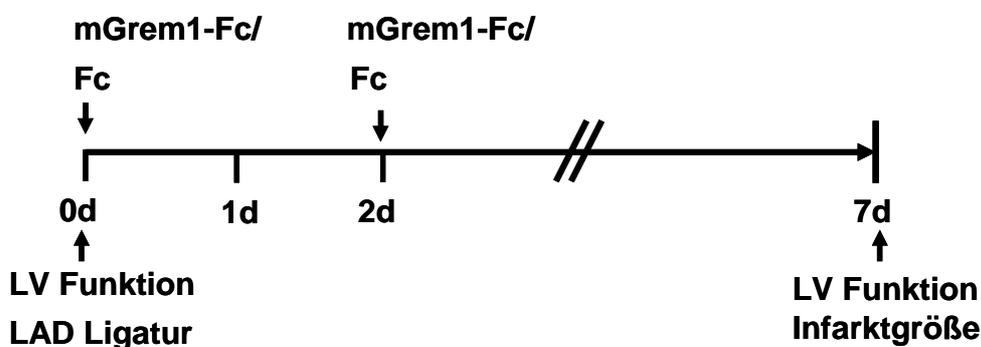


Abbildung 2.4 Schematischer Verlauf der myokardialen Ischämie/Reperfusionversuchsreihe (7d Versuch)

Es wurden den Mäusen direkt nach erfolgter LAD-Ligatur und 48h darauf mit mGrem1-Fc (1 µg/g KG, n = 5) oder Kontroll-Fc (äquimolar, n = 5) intra peritoneal- behandelt. Der 7d andauernde in *vivo* Versuch wurde von einer echokardiographischen Untersuchung der Versuchstiere begleitet zur Bestimmung der linkventrikulären (LV-) Funktion (direkt nach und 7d post LAD). Danach wurden die Mäuse geopfert und einer funktionalen und biologischen Untersuchung unterzogen.

Tabelle 2.12: Gruppeneinteilung für die Untersuchungen im myokardialen Ischämiemodell

Gruppe	Gruppengröße	Protein
Gruppe 1	n = 5	mGremlin-1-Fc
Gruppe 2	n = 5	Fc

2.5.6 Echokardiographische Untersuchung des linken Ventrikels

Isofluran (Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland)
 Ultraschallgel (Sonogel, VertriebsGmbH, Bad Camberg, Deutschland.
 Geräte: (Ultraschallgerät (Vevo 2001, Viscual Sconics, Toronto, Canada)

Es wurden direkt nach erfolgter und 7d post LAD die Mäuse mittels Echokardiographie auf ihre linksventrikuläre Herzfunktion hin untersucht. Die Untersuchung wurde mit freundlicher Unterstützung von Herrn Tobias Jürgens vorgenommen. Die Mäuse wurden während der Untersuchung mit einer Isofluran-Narkose anästhesiert. Auf die enthaarte Hautstelle und den Schallkopf wurde ein Ultraschallgel aufgetragen. Die Untersuchung wurde durch die Verwendung eines 30 MHz Schallkopf des Ultraschallgeräts durchgeführt. Dabei wurde der Schallkopf zunächst links parasternal angesetzt, um den linken Ventrikel im B-Mode in der Längsachse darzustellen. Es wurden pro Maus je drei Videos der Längsachse aufgenommen. Zusätzlich wurde eine Darstellung im M-Mode gewählt. Aus den Aufnahmen bestimmte man planimetrisch, mittels der Benutzung einer Software, die enddiastolischen Flächen (LVEDF) und die endsystolischen Flächen (LVESF) der Längsachse (NIS-Elements, Nikon GmbH, Deutschland). Diese Parameter wurden pro Aufnahme dreimal ermittelt und darauf der jeweilige Mittelwert berechnet. Aus diesen Werten wurde die „fractional area change“ (FAC), d. h. die linksventrikuläre fraktionelle Faserverkürzung ermittelt. Es ist ein Maß für die Kontraktionsfähigkeit des linken Ventrikels zur Bestimmung der Ventrikelfunktion.

Das FAC wird nach folgender Formel berechnet:

$$FAC \text{ in } \% = LVEDF - LVESFLVEDF \times 10$$

2.5.7 Evansblue Färbung der Herzen und Auswertung der Infarktgröße

Evans Blue	(Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
1M-Kaliumchlorid	(Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Medetomidin	(Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland)
Midazolam	(Ratiopharm, Ulm, Deutschland)
Fentanyl	(CuraMed Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
TTC-Lösung	2,3,5-Triphenyltetrazolium-Chlorid (Roth, Deutschland)
Tissue Tec®	(Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, NL)

Es wurden nach sieben Tagen die Herzen entnommen und der ischämische Bereich (*Area at Risk*) und die Infarktgröße nach Evans Blue und 2,3,5-Triphenyltetrazolium-Chlorid (TTC)-Färbung bestimmt. Die Anästhesie der Mäuse erfolgte intraperitoneal mit einer antagonisierbaren Kombinationsnarkose (siehe Kapitel 2.5.2). Im geöffneten Thorax wurden die Bereiche gewählt, welche aus Herzen ragenden Seidenfäden enthielten, die bei der LAD-Ligatur zurückgelassen wurden. Durch eine erneute Ligatur und eine darauf folgende Injektion von 0,5 ml einer 0,5 %igen Evans Blue Lösung am schlagenden Herzen in den linken Herzventrikel wurde das Herzgewebe angefärbt.

Evans Blue ist ein Farbstoff, der das Gewebe anfärbt, welches nicht von der Ischämie betroffen war, die sogenannte „*Area non at risk*“ (AnaR). Eine erfolgreiche Perfusion der Maus wird an der Blaufärbung der Kapillaren sowie anderer Organe erkennbar. Durch eine direkte Injektion von 0,3 ml 1 M-Kaliumchlorid-Lösung in den linken Ventrikel, wurde der Herzstillstand ausgelöst. Nach Entnahme des Herzens und Reinigung mit NaCl, wurde es mit Tissue Tec® bedeckt und für 30 min bei -20°C tiefgefroren. Das gefrorene Herz wurde dann senkrecht zur Längsachse in fünf ca. 1 mm dicke Querscheiben zerteilt. Diese wurden nach Reinigung mit NaCl für 10 min in 1 % TTC-Lösung im Dunkeln bei 37°C gefärbt. TTC wird durch oxidative Phosphorylierung mitochondrialer Dehydrogenasen zu dem roten Farbstoff 1,3,5-Triphenylformazan umgewandelt. Diese Umwandlung kann nur in vitalem

Gewebe stattfinden. Die entstehenden, rot angefärbten Anteile des Herzens stellen den ischämischen Bereich dar. Somit sind die von der Ischämie betroffenen und rot angefärbten Zellen deutlich von dem zugrunde gegangenen, hellen und blass erscheinendem Gewebe des Infarktareals abgrenzbar. Der rot gefärbte Bereich und das helle Infarktgewebe stellen die sogenannte „*Area at Risk*“ (AaR) dar. Die ersten vier Herzscheiben, ausgehend von der Herzspitze (Apex), wurden gewogen, fotografiert und mittels des Bildverarbeitungsprogramms NIS-Elements (Nikon GmbH, Deutschland) ausgewertet. Folgende Areale wurden dabei bestimmt:

Area at Risk (AaR): Die AaR setzt sich zusammen aus dem hellen (weißen) und dem rot gefärbten Gewebe. Weißes Infarktgewebe ging durch fehlende Sauerstoffzufuhr zugrunde und stellt den irreversibel geschädigten Anteil der AaR dar. Rot gefärbte Bereiche waren ebenfalls während der 45 minütigen LAD-Ligatur von der Ischämie betroffen. Dieser Bereich enthält jedoch vitale Zellen und stellt den reversiblen Schaden der AaR dar.

Infarktgröße: Der irreversibel geschädigte Anteil der AaR.

Fläche des linken Ventrikels: Es wurde zusätzlich die Gesamtfläche des linken Ventrikel bestimmt. Diese Fläche setzt sich aus blau, rot und weiß gefärbten Bereichen zusammen. Aus diesen Werten kann die Infarktfläche bezogen auf die AaR bzw. den linken Ventrikel bestimmt werden.

2.5.8 Histologische Untersuchungen

2.5.8.1 Vorbereitung der Gefäße und Herzen zur histologischen Untersuchung

4 % Formaldehyd (Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland)

Objektträger 25x75x1mm,

Super Frost®Plus (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland)

Geräte: Mikrotom (Jung Multicut 2045, Leica Instruments, Nussloch, Deutschland)

Nach der erfolgten Opferrung der Tiere wurden die Gefäße mit Kochsalzlösung und daran anschließend mit 4% PFA Lösung gespült. Ausgehend vom linken Ventrikel wurden die großen Arterien (Aortic arch, Aorta thoracica and Aorta abdominalis) in 4% PFA transferiert und fixiert. Die Herzen wurden nach Myokardinfarkt ebenfalls in 4 % PFA fixiert. Darauf wurden die fixierten Herzen und Gefäße durch eine Alkoholreihe entfärbt, entwässert und in Paraffin eingebettet. Dann wurden die eingebetteten Paraffinschnitten mit Hilfe des Mikrotoms in 5 µm große Schnitte geschnitten, im Wasserbad gestreckt und anschließend auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Dabei wurden auf jedem Objektträger drei

Schnitte nebeneinander aufgezogen, wodurch auf einem Objektträger die Antikörperfärbung, eine Isotyp- und PBS-Kontrolle gefärbt werden konnten. Darauf wurden die Objektträger getrocknet.

2.5.8.2 Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung

Hämalaunlösung	(Mayers hemalaun solution, Roth, Karlsruhe, Deutschland) sauer nach Mayer
Eosin	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Eisessig	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Roti-Hisotkitt®	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Deckgläschen 18x18 mm	(R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland)
Destilliertes Wasser	(Millipore Corporation, Billerica, USA)
Ethanol (99 %)	(SAV, Flintsbach, Deutschland)
Roti Histol	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Für die HE-Färbung wurden die Gefäßschnitte entparaffiniert. Dazu wurden die Objektträger zweimal für 10 min in Roti-Histol inkubiert. Es folgte eine absteigende Alkoholreihe aus 100 %, 95 % und 70 % Ethanol um die Schnitte zu rehydrieren. Darauf folgte eine Inkubation für 5 min in destilliertem Wasser. Für die Kernfärbung wurden die Schnitte für 5 min in Hämalaun gefärbt, wodurch insbesondere die DNA der Zellkerne angefärbt wird. Nach der Kernfärbung wurden die Objektträger unter Leitungswasser 10 min entfärbt, wobei der Farbton der Kernfärbung von rotbraun auf blau sich verändert aufgrund des Ansteigens des pH-Wertes. Dann erfolgt eine Färbung der Zytoplasmaproteine mit Eosin B. Dazu erfolgte eine Färbung für 3 min in 1 % Eosin, welchem ein Tropfen Eisessig zugefügt wurde. Dann wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70 %, 80 % und 90 % Ethanol 5 sec jeweils inkubiert und dann zweimal 5 min in 100 % Ethanol gegeben. Danach wurden die entwässerten Schnitte für 3 min in Roti-Histol inkubiert. Dann wurden die Objektträger mit Roti-Histokitt eingedeckelt. Die HE-Färbungen dienen der Darstellung der Herzgewebe in der Übersicht.

2.5.8.3 Masson-Goldner (Trichrom) Färbung

Eisenhämatoxylin nach Weigert	Lösung A und Lösung B zu gleichen Teilen mischen (100ml + 100ml), (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Ponceau-Säurefuchsin Lösung	0,2 g Ponceau S (Pulver) (Roth, Karlsruhe, Deutschland) 0,1g Säurefuchsin (Pulver) (Fluka, Taufkirchen, Deutschland), 0,6 ml Eisessig (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf 300ml ddH ₂ O auffüllen

Phosphorwolframsäure-Orange G-Gemisch	12 g Phosphorwolframsäure (Pulver) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 6 g Orange G (Pulver), (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) auf 300 ml ddH ₂ O auffüllen
Lichtgrün-Lösung	0,6 g Lichtgrün SF (Pulver) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 0,6 ml Eisessig (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf 300ml ddH ₂ O auffüllen
Ethanol (99 %)	(SAV, Flintsbach, Deutschland)
Roti-Histol	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Roti-Hisotkitt®	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Die Masson Goldner (Trichrom) Färbung stellt eine Färbemethode dar mit der verschiedene Gewebestrukturen differenziert dargestellt werden können. Dabei werden drei unterschiedliche Färbelösungen bei der Färbung verwendet. Dabei wurden die entparaffinisierten Herzschnitte aus 70% Ethanol überführt in ddH₂O und für 5 min inkubiert. Darauf folgte die erste Färbung der Schnitte in Weigerts Eisenhämatoxylin für 2 min, wodurch die Kerne angefärbt wurden. Danach wurde kurz in ddH₂O gespült und darauf ein Bläuen der Schnitte für 15 min in lauwarmen Wasservorgenommen. Durch die darauf folgende Färbung der Schnitte in Ponceau-Säurefuchsin für 5 min wurden die Muskelfasern und das Cytoplasma rötlich angefärbt. Nach einem kurzen Spülen in ddH₂O wurden die Schnitte in Phosphorwolframsäure-Orange G-Gemisch für 10 min inkubiert, was die Erythrozyten anfärbt. Nach einen weiteren kurzen Spülen der Schnitte in ddH₂O wurde eine Färbung für 10 min in der Lichtgrün-Lösung vorgenommen um das konnektive Bindegewebe und kollagenreiche Strukturen anzufärben, die dann grünlich erscheinen. Nach einem weiteren Spülen der Schnitte in ddH₂O, 10 s andauerndem Schwenken in Ethanol (70%, 80% und 95%), kurzer Inkubation (1 min jeweils) in 100% Ethanol und Roti-Histol wurde eine Fixierung mit Roti-Histokitt vorgenommen. Die Schnitte wurden dann in 20x Vergrößerung fotografiert, dann die kollagenhaltigen Bereiche ausgewertet und die Fläche ausgemessen.

2.5.8.4 Immunhistochemie

Antikörper	Primärantikörper (Tabelle 2.13), Sekundärantikörper (Tabelle 2.14), Isotypkontrollen (Tabelle 2.15)
Methanol	(Merck KG, Darmstadt, Deutschland)
Ethanol (99 %)	(SAV, Flintsbach, Deutschland)
Roti-Histol	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Serum free protein block Solution	(DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)
BSA (1 %)	Albumin bovine serum, Fraction V (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland)
DAB	1 Tropfen DAB-Chromogen pro 1 ml Substratpuffer (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)
Streptavidin-HRP	(DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)
Wasserstoffperoxid (30 %)	(Merck KG, Darmstadt, Deutschland)
PBS Waschpuffer	Phosphat buffered saline" 2 PBS Tabletten in 1L ddH2O auflösen
PBST Waschpuffer	(0,5 % Tween), Polyoxyethylenesorbitanmondaurat®, (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland)
Roti-Hisotkitt®	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Deckgläschen	18x18 mm (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland)
Liquid Blocker	(Science Services, Japan)
Hämalaunlösung sauer, nach Mayer	(Mayers hemalaun solution), Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Kaninchen, Ziegen und Ratten Serum	(DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)
Citratpuffer (pH 6,0)	+ 41 ml 0,1 M Natriumcitrat (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland), + 9 ml 0,1 M Zitronensäure (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) auf 500 ml mit ddH2O auffüllen (Millipore Corporation, Bill-er246, Deutschland) Mikrowelle (Bosch, Deutschland) pH-Meter (IKA-Labortechnik, Staufen i.Br., Deutschland)
Geräte:	Nikon-Mikroskop Digital Sight DS-U1 (NIKON GmbH, Deutschland) Mikrowelle (Bosch, Deutschland) pH-Meter (IKA-Labortechnik, Staufen i.Br., Deutschland)

Tabelle 2.13: Verwendete Primärantikörper in der Immunhistochemie

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller
Gremlin-1	1:20	Kaninchen, polyklonal (RB2060)	Abnova, Deutschland
MIF	1:18	Ziege, polyklonal	R&D Systems, Deutschland
PMN	1:200	Ratte, polyklonal	Abcam
TGFb1	1:50	Ziege, polyklonal	Santa Cruz Biotechnologies
CD-3	1:2	Kaninchen, polyklonal	Neomarkers
Mac-3	1:50	Ratte, monoklonal (M3/84)	BD Biosciences
CD-68	1:10	Kaninchen, polyklonal	Abbiotec
TNF- α	1:25	Ziege, polyklonal	R&D Systems
IgG	1:500	Ziege, monoklonal	Jackson Immuno Research

Tabelle 2.14: Verwendete Isotypkontrollen in der Immunhistochemie

Isotypkontrolle	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen IgG	Entsprechend wie Primärantikörper im Test	DakoCytomation, USA
Ratte IgG	Entsprechend wie Primärantikörper im Test	BioLegend, San Diego, USA
Ratte IgG	Entsprechend wie Primärantikörper im Test	Abcam, UK
Ziege IgG	Entsprechend wie Primärantikörper im Test	Vector Laboratories, Burlingham, USA

Tabelle 2.15: Verwendete Sekundärantikörper in der Immunhistochemie

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller
Anti-Ratte, biotyniliert	1:300	Kaninchen	DakoCytomation, USA
Anti-Ziege, biotyniliert	1:500	Kaninchen	DakoCytomation, USA
Anti-Kaninchen, biotyniliert	1:500	Ziege	DakoCytomation, USA

Die Gefäßschnitte wurden für die immunhistochemische Färbung vorbereitet (siehe Kapitel 2.5.8.1). Um die Bindung des Primärantikörpers an das Gewebe wieder zu reaktivieren nach erfolgter Einbettung in Paraffin, wurden die Gewebeschnitte 15 min in Citratpuffer (pH 6,0) gekocht. Nach erfolgter Abkühlung der Schnitte, wurde dreimal fünf min mit PBS gewaschen und zur Inhibition der Gewebeperoxidase eine 15 min Inkubation mit 3 % Wasserstoffperoxid vorgenommen. Darauf wurde der Waschschrift wiederholt und die einzelnen Gefäßschnitte mit Liquid Blocker umfahren und ein Blockierungsschritt gegen unspezifische Bindungen durchgeführt mit dem zugehörigen 10 % Serum oder der Protein free blocking Solution für 30 min. Die Wahl des Serums erfolgt aus dem Tier, in welchem die Sekundärantikörperproduktion durchgeführt wurde. Die Blockierungslösung oder das Serum wurde nach 30 min entfernt und als nächster Schritt wurde eine Färbung mit dem Primärantikörper oder der entsprechenden Isotypkontrolle für 1h ausgeführt. Die Primärantikörper, sowie die Isotypkontrollen wurden verdünnt mit 1% BSA Lösung (in ddH₂O gelöst). Im Anschluss wurde dreimal fünf min mit PBS gewaschen und der zugehörige biotinylierte Sekundärantikörper auf die Gefäßschnitte aufgetragen und für 30 min inkubiert. Die Objektträger wurden dann dreimal fünf min gewaschen und für 30 min mit der Streptavidin-HRP inkubiert. Für die Sichtbarmachung der positiven Färbung wurde nach erneutem dreimaligem Waschen eine Färbung mit dem Substrat Diaminobenzidin (DAB) durchgeführt, welches nach Herstellerangaben vorbereitet wurde. Für die jeweilig gewünschte Intensität der braunen Färbung wurde das Substrat nach 2-8 min entfernt und wieder dreimal für 3 min mit PBST gewaschen. Für die Kernfärbung wurden die Schnitte mit der Hämalaunlösung für 3 min inkubiert und anschließend für 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Zur abschließenden Dehydrierung wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe von 70%, 80%, 90% Ethanol für 10 sec und dann 100 % Ethanol für 3 min inkubiert. Als letzten Schritt wurden die Schnitte 3 min in Roti-Histol inkubiert und dann wurden die Schnitte mit Roti-Histokitt eingedeckelt. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurde mithilfe des Mikroskops und der Software NIS-Elements vorgenommen. Die einzelnen gefärbten Gefäße wurden in einer 10-fachen und 20-fachen Vergrößerung aufgenommen. Die Gewebeproben wurden ausgewertet hinsichtlich ihrer Anzahl an Schaumzellen (CD-68) bezogen auf die Plaquerfläche der Aortenbögen. Des Weiteren wurde die Anzahl an TNF- α positiven Zellen im Plaquerewebe ebenfalls analysiert. Zur Übersicht wurde außerdem die Gesamtzellzahl, durchschnittliche Makrophagen-/Schaumzellgröße und Gesamtplaquerfläche ermittelt. Des Weiteren wurde von den Herzschnitten eine Auswertung der PMN-, CD3-, MIF-, TGF β -1-, und Mac-3 positiven Zellen bestimmt und in einer Auszählung auf den ischämischen Infarktbereich bezogen der 20000 μm^2 groß war.

2.5.8.6 Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie von Aorten und Herzgewebe

Draq 5 (biostatus limited, Shepshed, UK)

TO-PRO-3 Iodide (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland)

Mounting Medium (Dako, Carpinteria, USA)

Tabelle 2.16 Liste verwendeter Primäantikörper und Isotypkontrollen

Primäantikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Gremlin-1	Kaninchen, polyklonal	1:10	Santa Cruz Biot., USA
TGFβ-1	Ziege, polyklonal	1:25	Santa Cruz Biot., USA
MIF	Ziege, polyklonal	1:18	RD Systems, Deutschland
IgG Goat	Ziege	1:18	Vector, USA
IgG Rabbit	Kaninchen	1:10	Dako, Dänemark

Tabelle 2.17 Liste verwendeter Sekundäantikörper

Sekundäantikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Alexa fluor 555 donkey anti-rabbit IgG (H+L)	Kaninchen	1:100	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Alexa fluor 647 goat anti-rabbit IgG (H+L)	Ziege	1:100	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Alexa fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	Kaninchen	1:100	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Alexa fluor 488 donkey anti-goat IgG (H+L)	Ziege	1:100	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

Geräte:

Zeiss LSM5 EXCITER Confocal Laser Scanning Microscope (Carl Zeiss Micro Imaging, Jena, Germany)

Die Behandlung der Präparate erfolgte wie in Kapitel 2.5.8.4 beschrieben bis zum Inkubationsschritt in Zitratpuffer. Nach einem dreimaligen Waschschrift mit PBST für 5 min wurden die Gefäße mit einem Lipidstift umrandet und ein Blockierungsschritt mit Serum free Proteinblock Solution für 30 min bei RT durchgeführt. Für die Doppelfärbung der Aortenbögen und des entsprechenden Plauegewebes wurden die einzelnen Färbungen nacheinander vorgenommen. Der erste Primäantikörper wurde über Nacht bei 4°C in einer mit feuchten Tüchern ausgelegten Färbungsbox inkubiert. Die Isotypkontrolle wurde entsprechend dem Primäantikörper nach verdünnt. Am nächsten Tag wurde dreimal 3 min mit PBST gewaschen und der erste Sekundäantikörper für 2h bei RT inkubiert. Die Präparate wurden darauf wieder gewaschen mit PBST und es folgte eine zweite Blockierung mit dem Serum free Proteinblock für 30 min. Dann folgte der gleiche Ablauf der Färbung mit dem zweiten Primär- und Sekundäantikörper. Am Schluss erfolgte eine Kernfärbung der Schnitte mit Draq 5 (1:2000 in PBS verdünnt) für 15 min. Nach einem letzten Waschschrift

für dreimal 3 min mit PBST wurden die Schnitte mit Mounting Medium eingedeckelt und im Dunkeln bei 4°C gelagert. Die konfokalen Aufnahmen der Präparate wurde mit dem Zeiss Laser Scanning Mikroskop mit dem A-Plan 40-fachen und 63-fachen Okular gemacht.

2.6 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden alle Versuche mindestens mit einer Endzahl von $n = 3$ durchgeführt. Die Angabe der Ergebnisse erfolgte dabei als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM). Die Statistik wurde durch die Verwendung der Computer Software SPSS (IBM SPSS Inc, Chicago, IL) und PRISM (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) erhoben. Die Erhebung der Statistik des Vergleichs von verschiedenen experimentellen Datenpunkten, wurde mittels des ungepaarten studentischen T-Test und des One-way ANOVA Test vorgenommen. Eine statistische Signifikanz liegt vor, wenn der Wert unterhalb von 0.05 liegt (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$).

3. Ergebnisse

3.1 Grem1 und MIF in der Atherogenese

3.1.1 Expression von Grem1 und MIF in mononukleären Zellen des kardiovaskulären Systems

Um zu veranschaulichen, welche Zellen des kardiovaskulären System Gremlin und MIF exprimieren, wurden Westernblot-Analysen sowie PCR Tests durchgeführt. In der Atherogenese sind Zelltypen wie Monozyten, Makrophagen, Schaumzellen, Plättchen und endothelialen Zellen wie HAEC von entscheidendem Interesse. Dabei ist die Expression der Cytokine in diesem Zusammenhang für Gremlin bekannt aus differenzierten Zellen wie arteriellen Endothelzellen und am Gefäßaufbau beteiligten Gewebsschichten wie der Media^{23, 77}. Die Expression von MIF ist bereits bekannt in Zellen wie Makrophagen, T-Lymphozyten und glatten Muskelzellen¹⁶.

Für die Gewinnung der Monozyten wurde eine Isolierung der Zellen aus buffy coats (siehe Kapitel 2.2.2) vorgenommen, um die Expression auf Proteinniveau und m-RNA Ebene zu untersuchen. Dabei sind Monozyten in der Lage unter bestimmten Kulturbedingungen zu Makrophagen und Schaumzellen auszudifferenzieren.

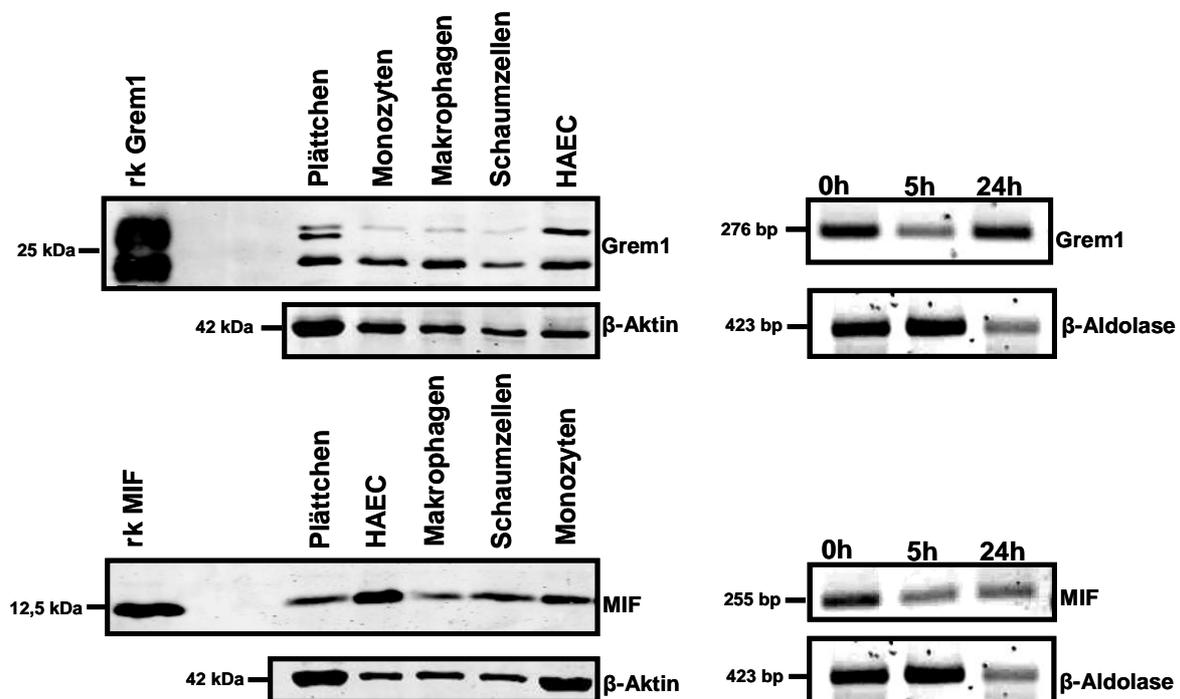


Abbildung 3.1: Expression von Grem1 und MIF. a1.) Westernblot von Zelllysaten (30 μ g Protein) unter reduzierten Bedingungen und Detektion auf Grem1, Positivkontrolle: rekombinantes Grem1 (1 μ g), interne Ladekontrolle des Blots: β -Aktin; a2.) qPCR von Grem1 und der internen Ladekontrolle β -Aldolase, dabei wurde die mRNA von Monozyten

gewonnen im zeitlichen Verlauf von Zeitpunkt 0, 5h und 24h; b1.) Westernblot von Zelllysaten (30 µg Protein) unter reduzierten Bedingungen und Detektion auf MIF, Positivkontrolle: rekombinantes MIF (50 ng), interne Ladekontrolle des Blots: β -Aktin; b2.) qPCR von MIF und der internen Ladekontrolle β -Aldolase..

Durch die Westernblotanalysen konnte gezeigt werden, dass Gremlin nicht nur in endothelialen Zellen exprimiert wird, sondern die Expression in Monozyten, Makrophagen sowie in Schaumzellen nachweisbar war (Abbildung 3.1 a1). Das Lysat von Plättchen konnte ebenfalls positiv auf eine Expression von Grem1 hin getestet werden. Dabei konnten zwei Isoformen von Grem1 nachgewiesen werden, welche eine Größe von 23 und 28 kDa aufwiesen. Im Lysat von Plättchen konnte eine dritte mögliche Isoform von Grem1 bei 25 kDa detektiert werden. Durch die qPCR Analysen konnte die Expression von Grem1 auf mRNA Ebene in Monozyten ebenfalls nachgewiesen werden. So scheint die Expression von Grem1 im zeitlichen Verlauf nach 5h kurzfristig sich zu verringern und dann wieder auf den Grundwert anzusteigen nach 24h, der am Zeitpunkt 0 ebenfalls zu sehen war (Abbildung 3.1 a2). Durch die Westernblotanalysen und qPCR Tests konnte MIF in allen untersuchten Zellarten nachgewiesen werden (Abbildung 3.1 b1+b2).

3.1.2 Grem1 ist verstärkt exprimiert in arteriosklerotischem Plauegewebe von ApoE^{-/-} Mäusen

Um im Folgenden darzustellen ob Grem1 als Cytokin im Krankheitsmodell der Arteriosklerose in dabei entstehenden Endothelläsionen verstärkt exprimiert wird, wurde das arterielle Gewebe von ApoE^{-/-} und Wildtypmäusen (C57BL/J6) mittels Immunhistochemie untersucht. Dabei wurden die ApoE^{-/-} Mäuse in einem Alter von vier Wochen einer cholesterinreichen Diät unterzogen und mit 16 Wochen geopfert und immunhistochemisch auf die Expression von CD 68 als Marker für Makrophagen und Schaumzellen, Grem1, MIF und TNF- α als ein von MIF-induzierter Faktor hin getestet. Als Kontrolle diente Gewebe von Wildtypmäusen (C57BL/J6), die im selben Alter geopfert worden waren.

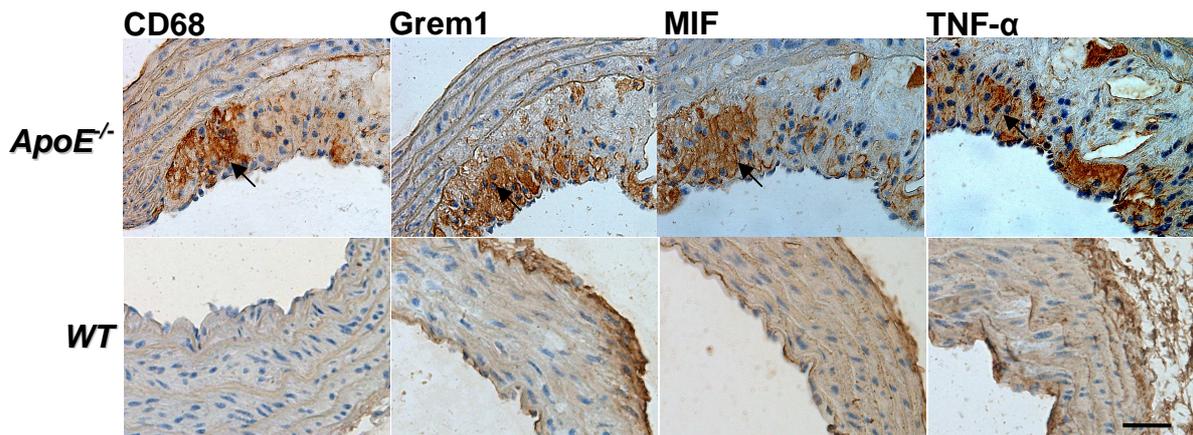


Abbildung 3.2: Immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten arteriellen Gewebes von ApoE^{-/-} (n=10) - und Wildtypmäusen (WT, C57BL/J6) (n=7): dargestellt sind repräsentative Bilder von 7 Färbungen. Es wurden dabei parallele Schnitte gegen CD 68, Grem1, MIF und TNF- α gefärbt. Die Schnitte wurden in 20x Vergrößerung fotografiert, (Maßstabsbalken entspricht 50 μ m).

Durch die immunhistochemische Untersuchung des arteriellen Gewebes der ApoE^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den WT Mäusen konnte gezeigt werden, dass es im Bereich der Läsionen im Plauegewebe zu einer verstärkten Expression von Grem1 kommt (Abb. 3.2 zweite Abbildung von links oben). Durch die serielle Färbung von parallelen Bereichen der Schnitte ergibt sich eine Überlagerung der Expressionsmuster für Grem1 und CD68. Als biologischer Marker dient CD68 für den Nachweis von Monozyten und Makrophagen. Dadurch lässt sich der Ursprung der zellulären Expression von Grem1 in Monozyten und Makrophagen vermuten, welche im Plauegewebe als inflammatorische Zellen vorliegen. Auch die Expressionsmuster von MIF und TNF- α im Bereich des Plauegewebes der ApoE^{-/-} Mäuse entsprechen weitestgehend dem Expressionsmuster von Grem1. Die Expression von MIF und TNF- α steht auf inflammatorischer Ebene miteinander in Zusammenhang²⁰. MIF, das von Monozyten und Makrophagen exprimiert und freigesetzt wird, stimuliert seinerseits die Freisetzung von TNF- α aus diesen Zellen. Im Vergleich zu den ApoE^{-/-} Mäusen zeigt der WT keine angestiegene Expression an CD68, Grem1, MIF sowie TNF- α .

3.1.3 Die molekulare Interaktion von Grem1 und MIF

Unsere Arbeitsgruppe konnte im Vorfeld zu dieser Doktorarbeit bereits eine molekulare Interaktion *in vitro* von Grem1 und MIF durch Bindungsstudien innerhalb eines Kooperationsprojekts mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Thomas Simmet (Universität Ulm, Ulm, Deutschland) nachweisen¹¹⁹. Die oben gezeigte Kolo-kalisation von Grem1 und MIF im atherosklerotischen Gewebe der Maus ergab einen weiteren Hinweis darauf, dass die Interaktion von Grem1 und MIF auch eine funktionelle Bedeutung für die Pathogenese

der Atherosklerose haben könnte. Es wurde deshalb von mir zunächst eine Immunpräzipitation durchgeführt, bei der durch die Bindung des spezifischen Antikörpers an ein Protein innerhalb einer Kopplung an Sepharose Beads alle Interaktionspartner des Proteins nachgewiesen werden können. Um die Interaktion zwischen Grem1 und MIF zu untersuchen, wurde das Lysat von HAECs verwendet. Dazu wurden gegenteilig das Lysat mit den Antikörpern gegen MIF oder Gremlin inkubiert und dann durch die Bindung an die Sepharosebeads und anschließende Westernblots die beiden Interaktionspartner sichtbar gemacht. Um auszuschließen, dass es sich um eine unspezifische Interaktion zwischen den beiden Proteinen handelt, wurde die entsprechende Isotypenkontrolle der Präzipitationsantikörper mitgeführt im Versuch. Des Weiteren wurde von den gleichen Paraffinschnitten (wie in 3.1.2) eine Ko-Immunfluoreszenzfärbung vorgenommen, um zu analysieren, ob eine tatsächliche Kolokalisierung von MIF und Grem1 im arteriosklerotischen Gewebe von ApoE^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Mäusen des C57BL/J6 Stammes zu beobachten ist.

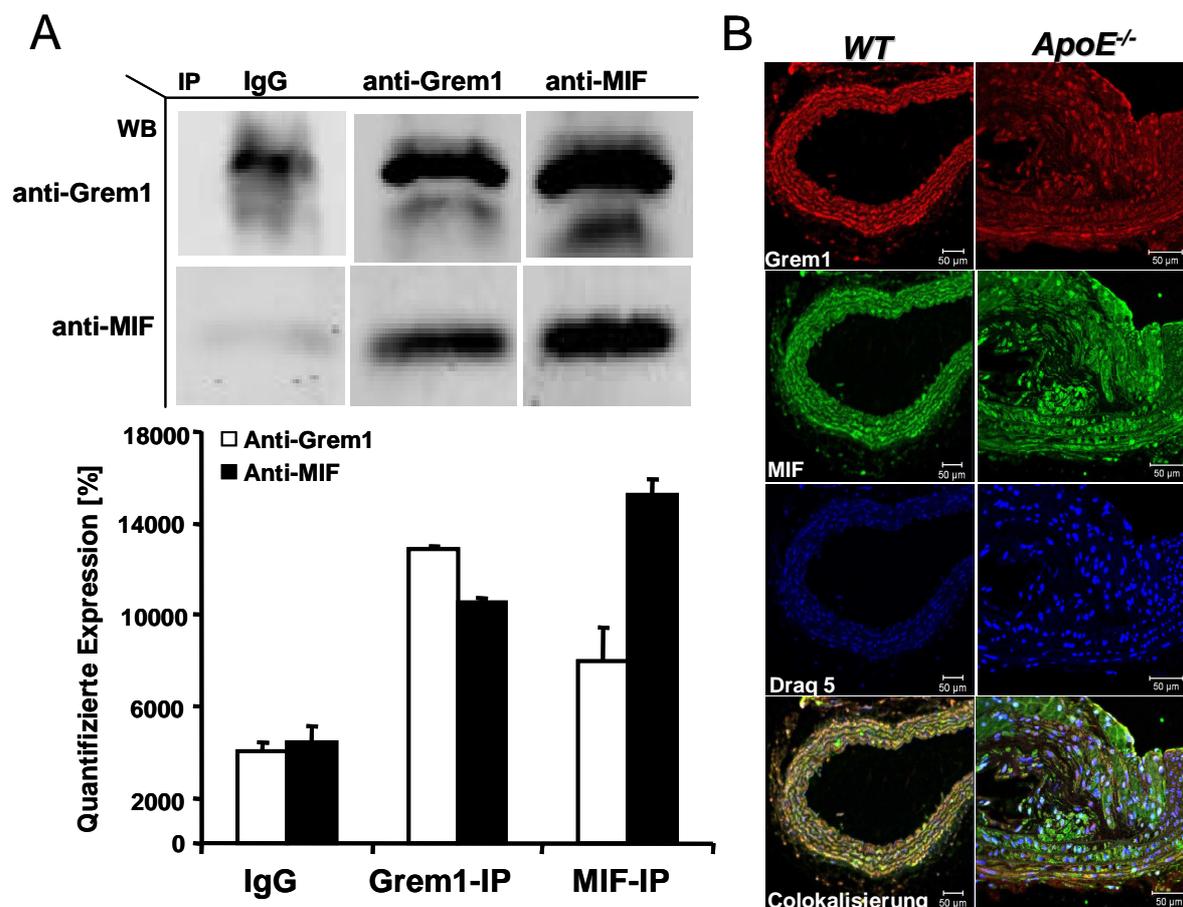


Abbildung 3.3: Grem1 bindet an MIF und beide Proteine weisen eine Kolokalisierung im arteriosklerotischen Plaquetgewebe auf. A.) Darstellung der Immunpräzipitation von anti-Grem1 und anti-MIF und anschließendem Nachweis der Bindungspartner im

Westernblot unter reduzierten Bedingungen. Oben: Nachweis von Grem1 (23 kDa), unten: Nachweis von MIF (12,3 kDa). Die Westernblots wurden mittels der Software „Image J“ quantitativ ausgewertet, gezeigt ist ein repräsentativer Westernblot von n=5. B.) Darstellung der konfokalen Immunfluoreszenzmikroskopie der ApoE^{-/-} (rechts) und C57BL/J6 (links) Schnitte von 16 Wochen alten Mäusen bezüglich der Expression von MIF (grüne Fluoreszenz) und Grem1 (rote Fluoreszenz): die Bilder wurden in einer 10x (links) und 20x (rechts) Vergrößerung aufgenommen, Maßstabsbalken entspricht 50 µm.

Durch die Immunpräzipitation (siehe Abbildung 3.3 A) konnte eine intrazelluläre Interaktion von Grem1 und MIF nachgewiesen werden. Die Bindungsfähigkeit beider Proteine konnte somit bestätigt werden. Die Analyse der Immunfluoreszenzfärbung für Grem1 und MIF zeigte außerdem, dass es vor allem im Bereich des arteriosklerotischen Plauegewebes zur Koexpression von Grem1 und MIF kommt und diese Bereiche eine Kolokalisierung von Grem1 und MIF aufweisen.

Aus den bereits erhobenen Daten stellte sich nun die Frage, ob diese kolokalisierte Expression von Grem1 und MIF im Plauegewebe tatsächlich von Zellpopulationen wie Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen ausging. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen wurden humane Monozyten aus buffy coats isoliert und durch die Zugabe von acetyliertem LDL (acLDL) zu Makrophagen und Schaumzellen ausdifferenziert. Durch eine Ko-Immunfluoreszenzfärbung sollten die Expressionsmuster von Grem1 und MIF durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden. Als fluoreszierender Farbstoff, welcher die DNA anfärbt wurde hierbei Draq5 verwendet.

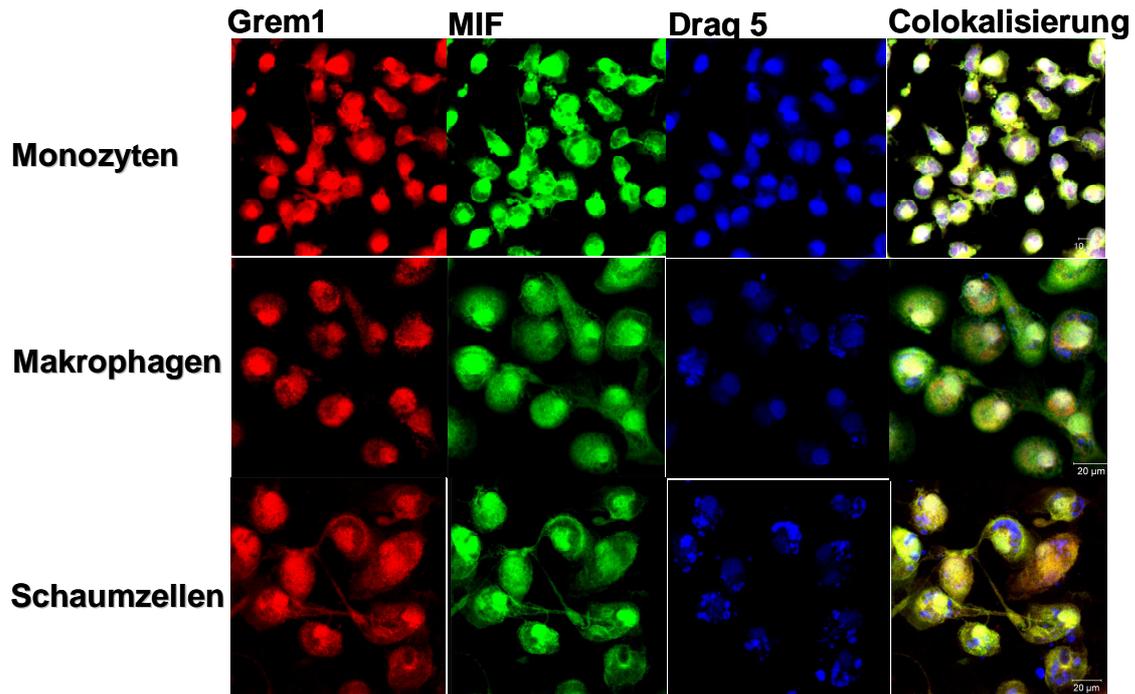


Abbildung 3.4: Grem1 und MIF werden in Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen koexprimiert. In Monozyten (oben), Makrophagen (Mitte) oder Schaumzellen (unten) wurde Grem1 (rote Fluoreszenz), MIF (grüne Fluoreszenz) und Draq5 (blaue Fluoreszenz) angefärbt ($n=3$). Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm (Monozyten) oder 20 μm (Makrophagen, Schaumzellen).

Anhand der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie konnte bestätigt werden, dass Monozyten, Makrophagen sowie Schaumzellen eine Kolokalisierung von Grem1 und MIF aufweisen. Dabei war der Grad an Kolokalisierung von Grem1 und MIF besonders stark ausgeprägt in Monozyten und Schaumzellen.

3.1.4 Aktivierungsabhängige Freisetzung von Grem1 aus Monozyten

Da die Arteriosklerose ein chronisch entzündlicher Prozess ist, bei der es zur Freisetzung von Cytokinen kommt sollte im folgendem getestet werden, ob die Freisetzung und Expression von Grem1 aus humanen Monozyten aktivierungsabhängigen Signalwegen unterliegt. Dazu wurden Monozyten mit Lipopolysaccharid (LPS) in einer Zeitreihe bis zu 48h stimuliert und die Grem1 Expression wurde darauf durch Westernblot analysiert. Die Sekretion von Grem1 im zeitlichen Verlauf wurde durch die Verwendung eines anti-Grem1 ELISA bestimmt.

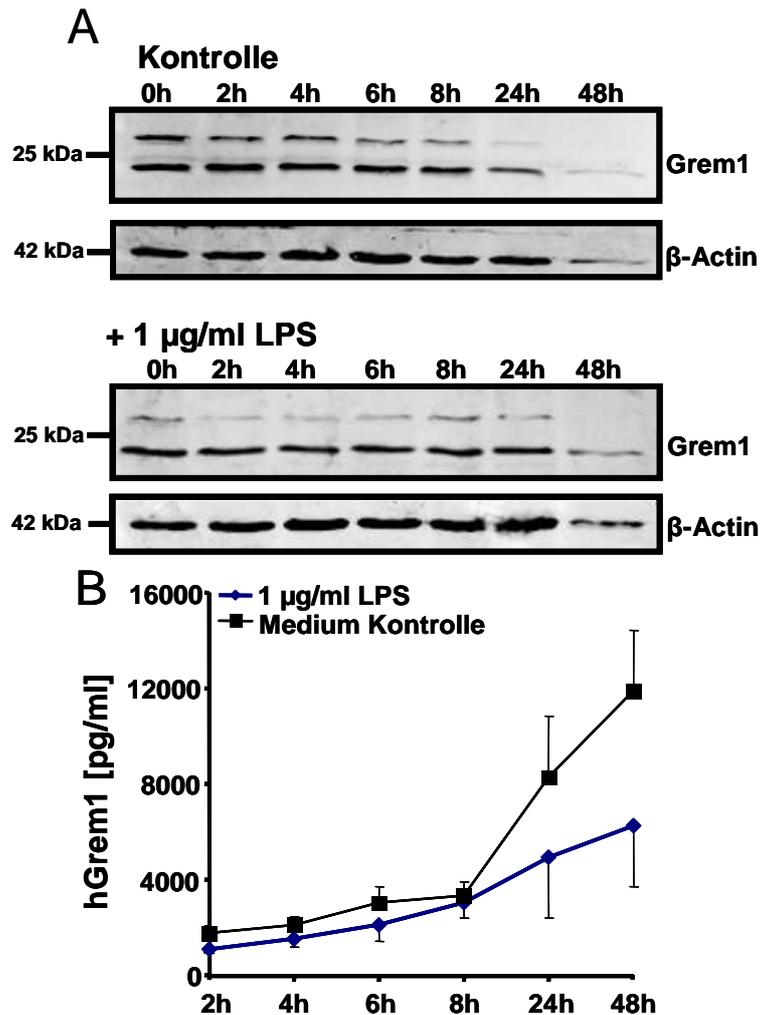


Abbildung 3.5: Zeitlicher Expression- und Sekretionslevel von Grem1 aus humanen Monozyten. A.) Anti-Grem1 Westerblots der Monozytenlysate 0h-48h (Proteinmenge 30 μ g/ml): oben: unbehandelte Proben, unten: mit 1 μ g/ml stimulierte Proben (n=5); als interne Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet. B.) Anti-Grem1 ELISA der Überstände der Kontroll- und stimulierten Proben (0h-48h; n=5).

Durch die Stimulierung der Monozyten im zeitlichen Verlauf zeigt sich, dass es zu keiner signifikanten Veränderung der intrazellulären Grem1 Proteinexpression durch eine Stimulierung mit LPS im Vergleich zur Kontrolle kommt. Im Gegensatz dazu steigt die Sekretion von Grem1 mit der Zeit deutlich an. Da die Level an Grem1 aber in der Kontrolle im Vergleich zu den mit LPS stimulierten Proben im Verlauf von 8-48h höher sind, scheint die Freisetzung nicht LPS abhängigen Signalwegen zu unterliegen.

Im Rahmen der Atherogenese sind Monozyten verschiedenen Stimuli ausgesetzt, wodurch die Freisetzung von Grem1 aus Monozyten von anderen Cytokinen abhängen könnte. Da die Sekretion von Grem1 zum Zeitpunkt 24h einen Anstieg aufwies, wurden anderen Cytokine

wie MCP-1, oxLDL, SDF-1, IL1- β , TNF- α oder INF- γ getestet, da sie einen Einfluss auf die inflammatorischen Abläufe innerhalb der Progression einer Atherosklerose haben.

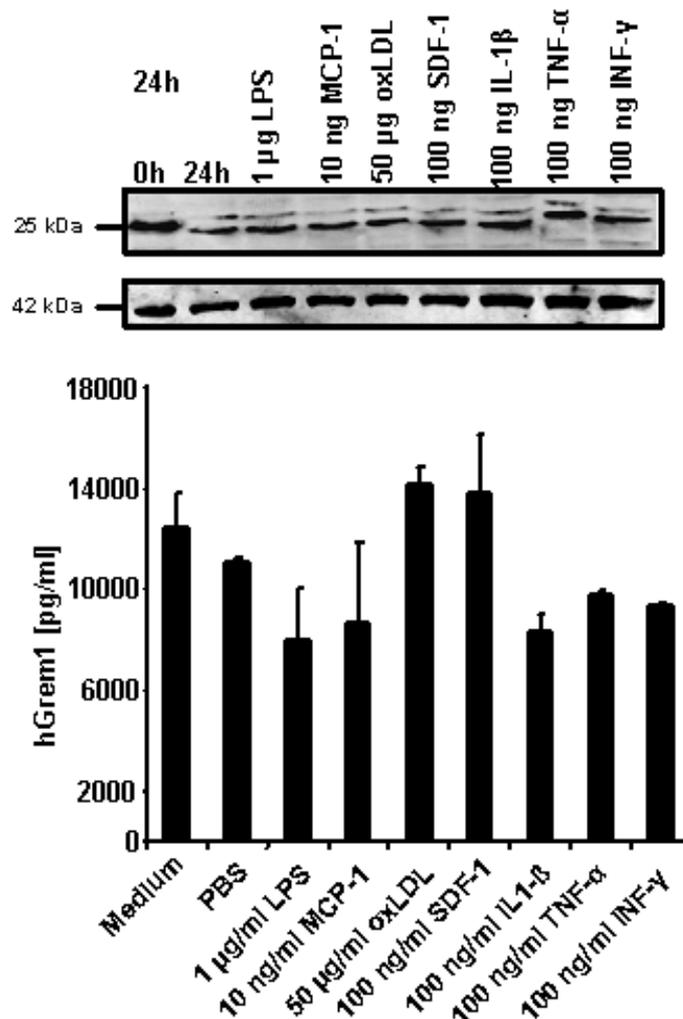


Abbildung 3.6: Die Sekretion von Grem1 aus Monozyten wird durch oxLDL und SDF-1 beeinflusst. Obere Abbildung: Anti-Grem1 Westerblots (Proteinmenge 30 μ g/ml, Detektion von Grem1 bei 23 und 28 kDa) der 24h kultivierten Monozyten, als interne Ladekontrolle wurde β -Aktin (42 kDa) verwendet (n=3). Untere Abbildung: Anti-Grem1 ELISA der Überstände der Kontroll- und stimulierten Proben (n=3).

Durch die Stimulierung der Monozyten für 24h mit Cytokinen wie MCP-1 oder SDF-1 wurde die intrazelluläre Proteinexpression von Grem1 nicht verändert. Die Analyse der Überstände ergab dagegen eine Veränderung des Sekretionsvermögens der Monozyten durch die Stimulierung mit oxLDL und SDF-1. Dieser positive Effekt war tendenziell, aber nicht von statistischer Signifikanz. Die Cytokine LPS, MCP-1, IL1- β , TNF- α oder INF- γ scheinen im Gegensatz dazu keinen Einfluss auf das Freisetzungsvermögen an Grem1 der Monozyten zu haben.

3.1.5 Grem1 beeinflusst die Sekretion von MIF aus Monozyten

Die LPS induzierte Freisetzung von MIF aus unterschiedlichen Zellen wie Fibroblasten oder endothelialen Zellen wurde bereits charakterisiert^{35, 145}. In diesem Zusammenhang sollte nun geklärt werden, ob es zu einer LPS-abhängigen Freisetzung von MIF aus humanen Monozyten kommt. In einem zweiten Ansatz sollte des Weiteren verifiziert werden, ob Grem1 die Expression und Freisetzung von MIF in humanen Monozyten beeinflusst. Da Grem1 ein Bindungspartner von MIF im arteriosklerotischen sowie inflammatorischen Kontext ist (siehe Kapitel 3.1.2-3.1.4), wurde hier die mögliche Induktion der MIF Sekretion durch Grem1 in Monozyten untersucht. Dabei wurde die Menge an MIF intrazellulär und im Zellkulturüberstand in einer Zeitreihe (1-10h) analysiert.

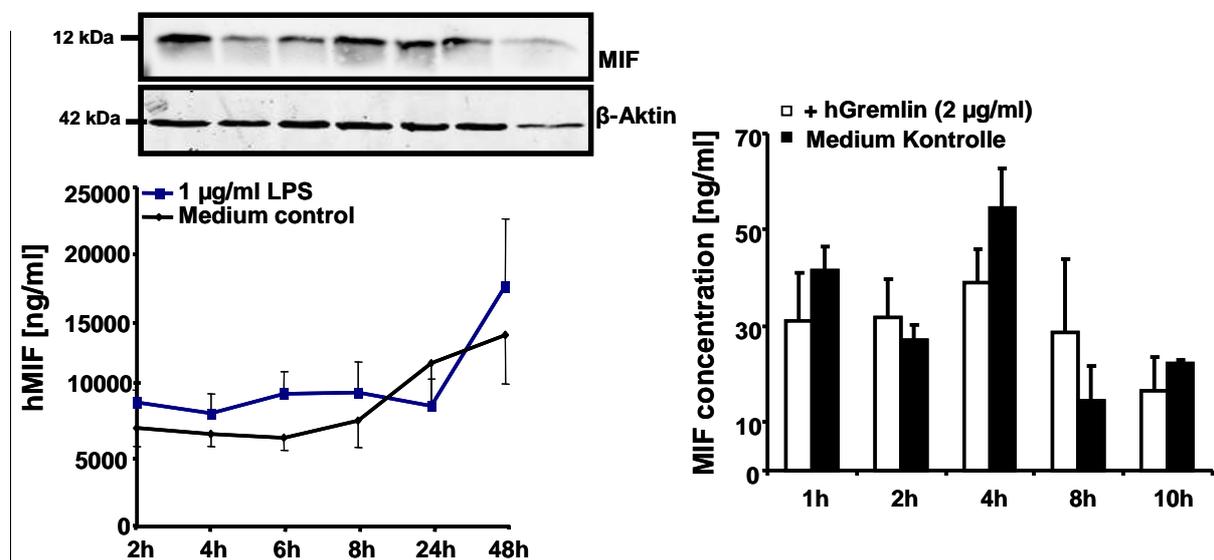


Abbildung 3.7: MIF Expression und Freisetzung unter dem Einfluß von LPS und Grem1. A.) oben: Anti-MIF Westernblot der mit 1 µg/ml LPS behandelten Proben und mitgeführter Kontrolle (Proteinmenge 30 µg/ml) im zeitlichen Verlauf (2h-48h, n=5), als interne Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet; unten: Anti-MIF ELISA der mit 1 µg/ml LPS und unbehandelten Proben im zeitlichen Verlauf (2h-48h, n=5). B.) Anti-MIF ELISA der mit 2 µg/ml Grem1 behandelten Proben und Kontrolle in einer Zeitreihe (1h-10h, n=5, *=p<0.05).

Durch die Stimulierung der Monozyten mit LPS kommt es zu keiner sichtbaren Veränderung der intrazellulären Proteinexpression von MIF (siehe Abb. 3.7 A oben). Die Spiegel an sekretierten MIF verändern sich durch die Stimulierung mit LPS im Vergleich zur Kontrolle deutlich. Dabei sind im zeitlichen Verlauf zwischen 2h und 8h die Spiegel an MIF durch die Stimulierung mit LPS erhöht, sinken dann nach 24h kurzfristig unterhalb des Kontrollwerts und steigen nach 48h wieder an über den Wert der Kontrolle hinaus (siehe Abb. 3.7 A unten). Eine Stimulierung der Monozyten mit Grem1 hatte keinen eindeutigen Einfluß auf die

MIF-Freisetzung, zu den Zeitpunkten 1h und 4h waren jedoch tendenzielle Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten (siehe Abb. 3.7 B).

3.1.6 Funktionelle Charakterisierung der molekularen Grem1 und MIF Interaktion im Flusskammermodell

In der Arteriosklerose werden durch die Aktivierung des Endothels und einer Induktion von verschiedenen Chemokinen Leukozyten rekrutiert. Dies ist gekennzeichnet durch eine verstärkte Interaktion zwischen Leukozyten und aktiviertem Endothel¹²⁷. Durch die Perfusion der monozytären Zelllinie MM6 über mit Endothelzellen (ECV-304) beschichteten Deckgläsern kann unter *in vitro* Bedingungen im Flusskammersystem nachgebildet werden, wie bestimmte Cytokine die Adhäsion der Monozyten an das Endothel beeinflussen. Um dies zu untersuchen, wurden MM6 Zellen mit oder ohne Grem1 2h vorinkubiert und dann über Endothel perfundiert, welches vorher aktiviert wurde für 4h mit TNF- α und INF- γ . Nicht aktivierte Endothelzellen dienten als Kontrolle. Um die Wirkung von Grem1 und MIF weiter zu untersuchen, wurde das Endothel zusätzlich entweder mit Grem1 oder mit MIF stimuliert. Dabei wurde das Endothel entweder nur mit MIF für 2,5 h inkubiert oder aber für 1,5 h mit Grem1, bevor die Perfusion der Endothelzellen mit den Monozyten begonnen wurde.

Bei der Perfusion der mit Grem1 vorinkubierten MM6 Zellen über das Endothel kam es durch die Stimulierung der Endothelzellen mit MIF zu einem Anstieg der Adhäsion. Durch die zusätzliche Stimulierung des Endothels mit Grem1 unter vorheriger Behandlung mit MIF nahm die Anzahl der adhärenenten und semiadhärenenten (Roller) Zellen signifikant ab (siehe Abb. 3.8 A). Diese Unterschiede waren bei dem zuvor nicht mit TNF- α und INF- γ behandelten Endothel größer als bei zuvor erfolgter Behandlung. Die vorher nicht mit Grem1 vorinkubierten MM6 Zellen zeigten eine ebenfalls erkennbare Tendenz zur verstärkten Adhäsion nach Stimulierung des Endothels mit TNF- α und INF- γ . Die inhibierende Wirkung von Grem1 auf die mit MIF vorbehandelten Endothelzellen war in der Perfusion der MM6 Zellen aber nur im Falle der semiadhärenenten Monozyten nachweisbar (siehe Abb 3.8 B). Somit inhibiert Grem1 signifikant das Adhäsionsverhalten von MM6 Zellen im Falle einer Vorbehandlung des Endothels mit MIF.

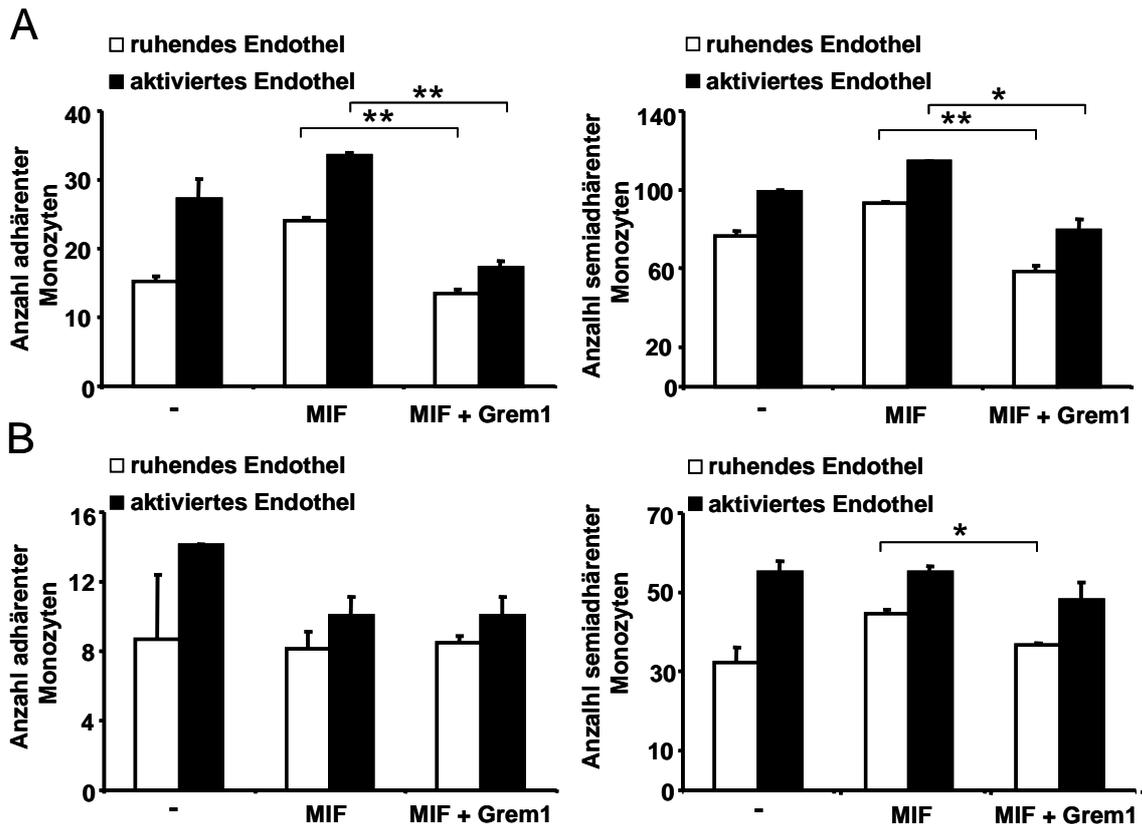


Abbildung 3.8: Grem1 inhibiert die MIF abhängige Adhäsion von MM6 Zellen an das Endothel. A.) Darstellung der mit 5 µg/ml Grem1 vorbehandelten perfundierten MM6 Zellen, links: Anzahl der adhärenenten Monozyten, rechts: Anzahl der semiadhärenenten Monozyten, Perfusion über aktiviertes (Zugabe von 50ng/ml TNF-α + 25 ng/ml INF-γ; 50 ng/ml MIF; 2 µg/ml Grem1 + 50 ng/ml MIF) oder nicht behandeltes Endothel (Pergungsgeschwindigkeit: 15 ml/h). B.) Darstellung der unbehandelten perfundierten MM6 Zellen, links: Anzahl der adhärenenten Monozyten, rechts: Anzahl der semiadhärenenten Monozyten, die Perfusion erfolgte äquivalent zu A, (n=3, *=p<0,05, **=p<0.01).

3.1.7 Einfluss der molekularen Interaktion von Grem1 und MIF auf die Chemotaxis humaner Monozyten

Bei der Arteriosklerose kommt es zur Aktivierung des Endothels und einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen und Cytokinen, welche die Adhäsion und Migration von Leukozyten in Bereich des Endothels fördern. Die Migration von Leukozyten wird vor allem von MCP-1 angeregt¹⁸⁵. Dies wurde in den folgenden Migrationsassays als Positivkontrolle verwendet. Um zu verifizieren, wie sich die molekulare Interaktion von Grem1 und MIF auf das chemotaktische Migrationsverhalten von Monozyten auswirkt, wurden Migrationsstudien mittels des 48-well Neuroprobe Chamber Migrationssystems durchgeführt. Dabei wurden im Kammersystem die frisch isolierten humanen Monozyten immer in die obere Kammer

gegeben. Die Zugabe der Cytokine erfolgte innerhalb einer Versuchreihe zur Austestung der möglichen chemotaktischen Potentiale sowohl in die in die untere Kammer des 48-well Neuroprobe Migrationssystems. Die Migration hatte eine Dauer von 6h und die Auszählung der angefärbten Monozyten erfolgte mikroskopisch in 20x Vergrößerung (siehe Kapitel 2.4.2).

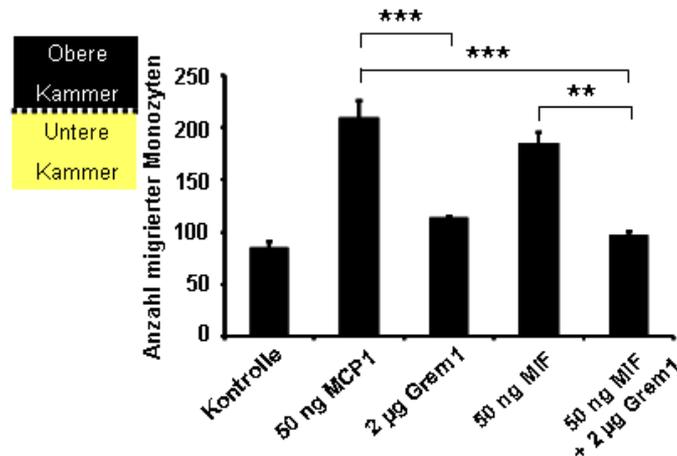


Abbildung 3.9 Grem1 hemmt die MIF induzierte Migration von Monozyten. Zugabe der Cytokine in die untere Kammer (MIF und Grem1 wurden 10 min bei RT miteinander vorinkubiert) und der Zellen in die obere Kammer. (n=5, *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$).

Durch die Zugabe von MCP-1 in die untere Kammer konnte die Migration der Monozyten erfolgreich angeregt werden (Positivkontrolle). Eine Stimulierung der Zellen mit MIF in der unteren, förderte die Migration der Zellen ebenfalls fast in gleichem Maße wie MCP-1. Grem1 hatte sowohl in getrennter Zugabe als auch in seiner kostimulierenden Zugabe mit MIF eine hoch signifikant inhibierende Wirkung auf die Migration der Monozyten.

3.2 Herstellung und funktionelle Charakterisierung von mGrem1-Fc

3.2.1 Aufbau und Expression des bifunktionellen rekombinanten Proteins mGrem1-Fc

Als Grundlage für die in vitro und in vivo Charakterisierung des Proteins mGrem1-Fc diene, dass im Rahmen der Doktorarbeit von Herr Dr. med. Marius Stang¹⁶⁴ klonierte Protein mGrem1-Fc (Vektor pcDNA5/FRT/T0, mit Unterstützung der Firma Medigenomix (Ebersberg, Deutschland). In der Abbildung 3.10 ist der Aufbau des Proteins dargestellt, beginnend mit dem N-Terminus des Proteins. Für die Ausschleusung des Proteins ist das Sekretionssignal Immunglobulin κ (Ig κ) von Bedeutung, da diese Domäne für die Sekretion des produzierten Proteins aus der Zelle in den Überstand verantwortlich ist. Als zweite funktionelle Domäne weist das Protein eine FcIgG2 Domäne auf, die dazu dient, nach Sekretion des Proteins in den Überstand eine Aufreinigung über Protein-G Beads zu ermöglichen. Außerdem gewinnt

das Protein dadurch an Stabilität. Eine Linkersequenz wurde in das Protein integriert, um zu gewährleisten, dass die Domänen voneinander ausreichend getrennt sind, falls eine funktionelle Faltung des Proteins andernfalls nicht möglich sein sollte. Des Weiteren ist in der Sequenz eine Thrombinschnittstelle eingebaut, sodass Grem1 und der Fc-Anteil bei Bedarf voneinander getrennt werden können. Als funktionelle Domäne weist das Protein die Aminosäuresequenz des murinen Gremlin-1 auf. Zur Kontrolle wurde ein Protein generiert, welches keine funktionelle Domäne hat und zusätzlich die FcIgG2 Domäne aufweist.

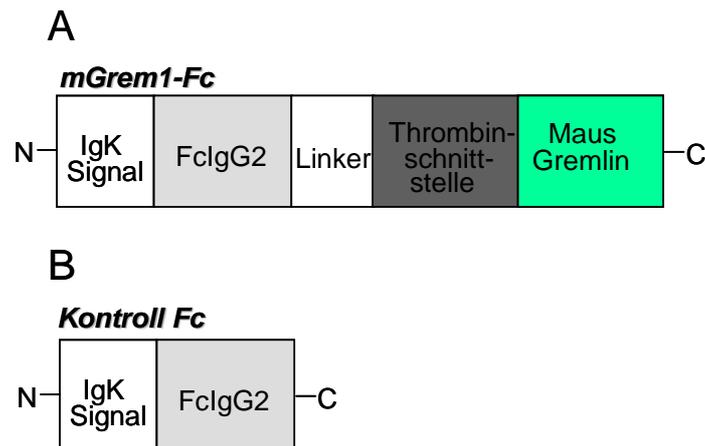


Abbildung 3.10: Schematischer sequentieller Aufbau des Fusionsproteins mGrem1-Fc und des Kontrollproteins FcIgG2. A.) Aufbau von mGrem1-Fc. B.) Aufbau von FcIgG2

Für eine Produktion des Fusionsproteins wurde die Zelllinie Flp-In™-CHO stabil unter Hygromycin Selektion mit dem Plasmid pcDNA5/mGrem1-Fc/FRT und pcDNA5/Fc/FRT transfiziert (siehe Dr-Arbeit: Dr. med. Marius Stang). Nach erfolgter Transfektion wurden die mGrem1-Fc - und Fc - CHO Zelllinien kultiviert und ihre Überstände aufgereinigt mittels der Verwendung von Protein G Beads. Die produzierten Proteinmengen wurden im Anti-human IgG Elisa bestimmt. Die Qualität der einzelnen Proteinchargen wurde zusätzlich durch Immunoblots verifiziert (Abb. 3.10)

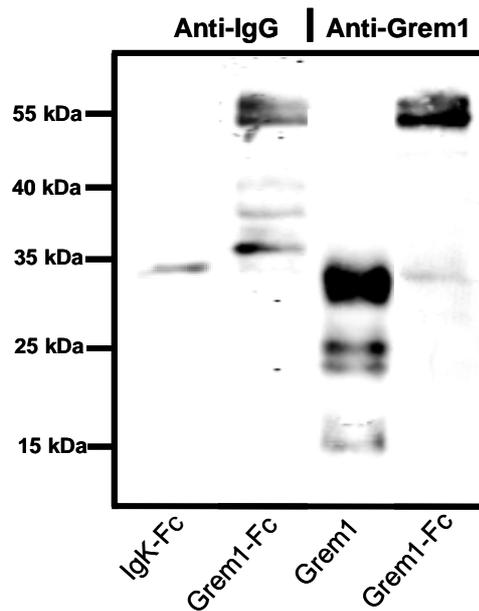


Abbildung 3.11: Expression von mGrem1-Fc. Darstellung der Anti-IgG Immunoblots (Spalte 1: Positivkontrolle 50 ng/ml hlgK, Spalte 2: 1 µg/ml mGrem1-Fc) und der Anti-Grem1 Immunoblots (Spalte 3: Positivkontrolle 1 µg/ml mGrem1, Spalte 4: 1 µg/ml mGrem1-Fc).

Im Westernblot wurde das Fusionsprotein mGrem1-Fc unter reduzierten Bedingungen sowohl durch die Detektion mit dem Anti-IgG Antikörper als auch dem Anti-Grem1 Antikörper nachgewiesen mit mehreren Banden oberhalb von 55 kDa bei ungefähr 60 kDa. Als Positivkontrolle wurde im Westernblot für die Detektion des humanen Fc Teils des Fusionsproteins das rekombinante Protein hlgGK benutzt, welches eine Molekulargewicht von 35 kDa aufweist. Im Westernblot für den Nachweis von mGrem1-Fc durch den Anti-Grem1 Antikörper wurde als Positivkontrolle das rekombinate mGrem1 verwendet, das im Westernblot als Doppelbande bei 25 kDa detektiert wurde. So wurde eine dauerhafte Produktionsmöglichkeit des Fusionsproteins mGrem1-Fc erreicht kombiniert mit einem hohen Reinheitsgrad des produzierten Proteins.

3.2.2 Funktionelle *in vitro* Charakterisierung von mGrem1-Fc

3.2.2.1 mGrem1-Fc reduziert die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und Schaumzellen

Nach erfolgter Produktion von mehreren Chargen des rekombinanten Fusionsproteins mGrem1-Fc sollte nun die Funktionalität in einem zellbasierten Assay getestet werden. Monozyten wandern aus dem zirkulierenden Blutkreislauf in die subendothelialen Schichten der arteriellen Gefäßwände im Verlauf einer Arteriosklerose ein. Unter dem Einfluss des Monozyten-Kolonie Stimulierungsfaktors (M-CSF) kommt es zur Differenzierung der

Monozyten zu Makrophagen im subendothelialen Bereich der Intima. Diese exprimieren verstärkt Scavenger-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Mit ihrer Hilfe phagozytieren sie oxLDL und wandeln sich in Schaumzellen um ⁴⁸. Dieses Modell der Ausbildung von Makrophagen und Schaumzellen aus Monozyten lässt sich unter *in vitro* Bedingungen nachbilden, indem die Monozyten mit acLDL über zwei Wochen inkubiert werden. So differenzieren die Monozyten zu Makrophagen/Schaumzellen. Dieses Modell wurde bei murinen als auch bei humanen Monozyten angewandt. Die Auswirkungen von Grem1 und von mGrem1-Fc auf die Ausdifferenzierung von Monozyten wurden in diesem Schaumzell-Assay getestet.

Bereits an Tag 7 zeigten sich deutliche Unterschiede in der Ausdifferenzierungsfähigkeit der Monozyten zu Makrophagen und Schaumzellen (siehe Abb 3.12 A d7). Dabei war die Differenzierung der Zellen durch die Stimulierung mit MIF am stärksten ausgeprägt sowohl an Tag 7, als auch an Tag 13. Um die Wirkung von MIF intern kontrollieren zu können wurde ein monoklonaler Neutralisierungsantikörper gegen MIF im Schaumzell-Assay mitgeführt. Wie in der Abb. 3.12 gezeigt, unterblieb die Ausdifferenzierung der Monozyten durch die Behandlung mit dem Neutralisierungsantikörper im Vergleich zur Isotyp Kontrolle fast völlig. Es zeigte sich außerdem, dass durch die Zugabe von rekombinantem Grem1 als auch von Fusionsprotein mGrem1-Fc eine Verminderung der Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen und Schaumzellen zu erreichen war. Dadurch wurde die Anzahl der ausgebildeten Schaumzellen im Versuchverlauf an Tag 13 im Vergleich zur Positivkontrolle (Behandlung mit MIF) signifikant reduziert ($p < 0.001$). Die MIF induzierte Differenzierung der Monozyten zu Schaumzellen wurde durch eine Prä-Inkubation von Grem1 und MIF als auch von mGrem1-Fc und MIF vor Zugabe der Proteine in den Zellkultur-Überstand signifikant unterdrückt ($p < 0.01$).

Die Überstände der Schaumzellen wurden an Tag 13 gewonnen und ihre TNF- α -Spiegel von untersucht, da MIF die Sekretion von TNF- α aus Makrophagen stimuliert. Dabei zeigte es sich, dass MIF die Sekretion von TNF- α signifikant anregte im Vergleich zur Kontrolle. Unter Zugabe des MIF-neutralisierenden Antikörpers kam es dagegen zu keiner relevanten Steigerung der TNF- α -Spiegel. Grem1 und noch effektiver mGrem1-Fc führten zu einer Hemmung der MIF-induzierten TNF- α -Freisetzung aus den Makrophagen/Schaumzellen ($p < 0.01$) (siehe Abb. 3.12 B).

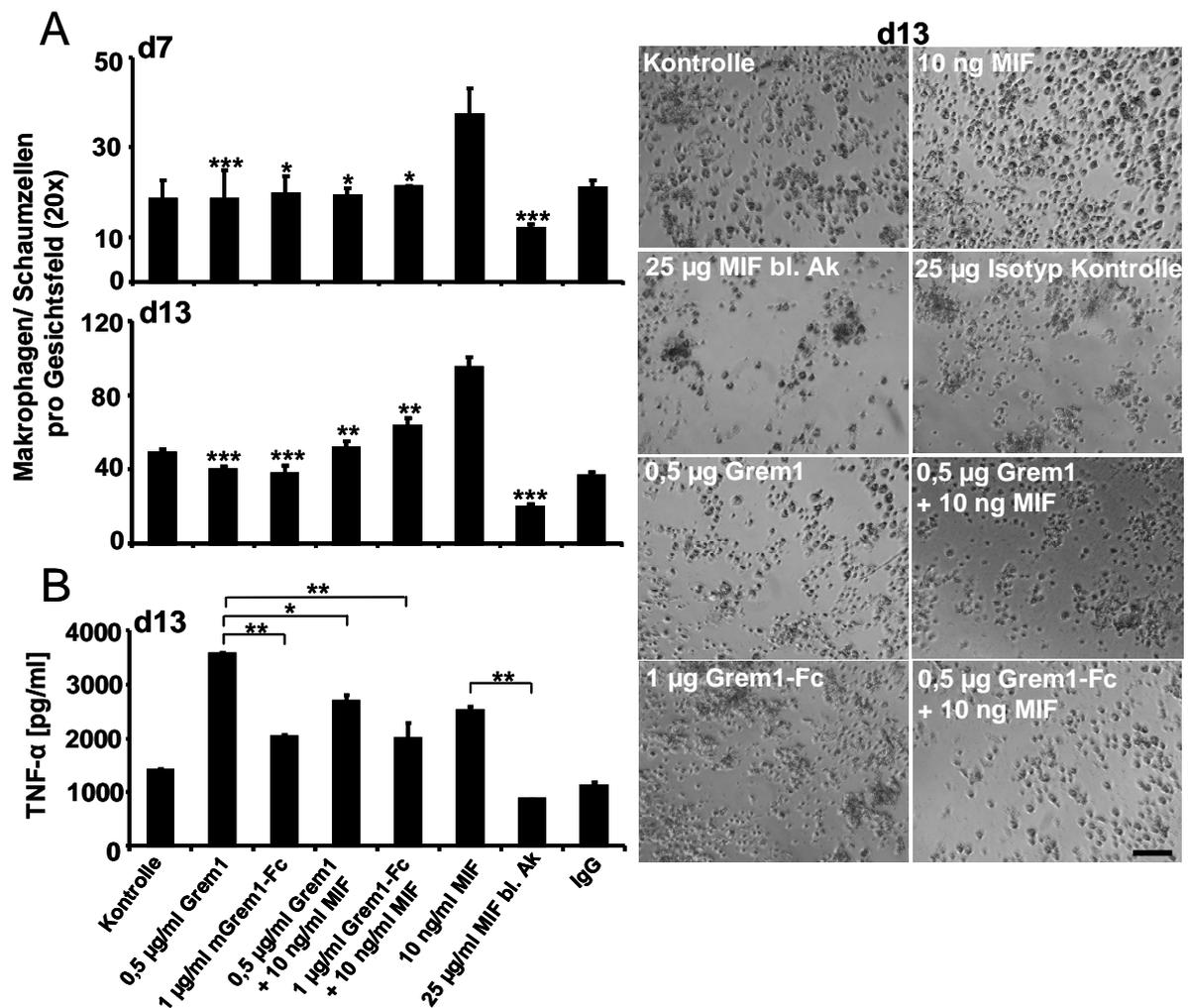


Abbildung 3.12: mGrem1-Fc inhibiert die humane Schaumzellbildung *in vitro*. Durch den Schaumzell-Assay wurde die Ausdifferenzierungsfähigkeit der Monozyten im Verlauf von 14d charakterisiert. A.) Die quantitative Auswertung der gebildeten Makrophagen und Schaumzellen, zeigt im zeitlichen Verlauf eine stark signifikante Inhibierung der Ausdifferenzierungsfähigkeit durch die Behandlung mit dem Fusionsprotein mGrem1-Fc ($n=3$, $p<0,001$) im Vergleich zur Positivkontrolle (+ 10 ng/ml MIF). Die Bilder von d13 zeigen repräsentativ den ausdifferenzierten Zustand der Schaumzellen nach erfolgter Behandlung (20x Vergrößerung, Maßstab: 50 µm). B.) Anti-TNF-α ELISA der unterschiedlich behandelten Proben und der Kontrolle nach erfolgter Schaumzellbildung ($n=3$, $*=<0,05$, $**=<0,01$).

Die Schaumzellbildung als Parameter für die *in vitro* Funktionalität des Fusionsproteins mGrem1-Fc wurde im murinen Zellsystem zusätzlich anhand von isolierten Monozyten aus C57BL/J6 (MIF^{+/+}) und MIF^{-/-} Mäusen untersucht. Dabei war die Differenzierung zu Schaumzellen bei den murinen Monozyten aus den C57BL/J6 Mäusen im Vergleich zur Differenzierung der humanen Monozyten schneller und dauerte nur 7d. Durch die Behandlung der Monozyten (MIF^{+/+}) mit dem rekombinanten Grem1 als auch mit dem

Fusionsprotein mGrem1-Fc konnte die Differenzierung der Zellen zu Makrophagen und Schaumzellen signifikant inhibiert werden ($p < 0.05$). Eine Stimulierung der Zellen mit MIF förderte die Differenzierung in hohem Maße (siehe Abb. 3.13 obere Spalte rechtes Bild). Die durch MIF induzierte Differenzierung der Monozyten wurde durch eine gleichzeitige Behandlung der Zellen mit Grem1 oder mGrem1-Fc signifikant unterdrückt ($p < 0.05$). Eine Ausbildung von Makrophagen oder Schaumzellen wurde durch die Verwendung eines neutralisierenden Anti-MIF Antikörpers fast gänzlich unterbunden. Dagegen waren die aus MIF defizienten Mäusen isolierten Monozyten nicht zur Differenzierung zu Makrophagen und Schaumzellen fähig (siehe Abb. 3.13 d7: MIF^{-/-}).

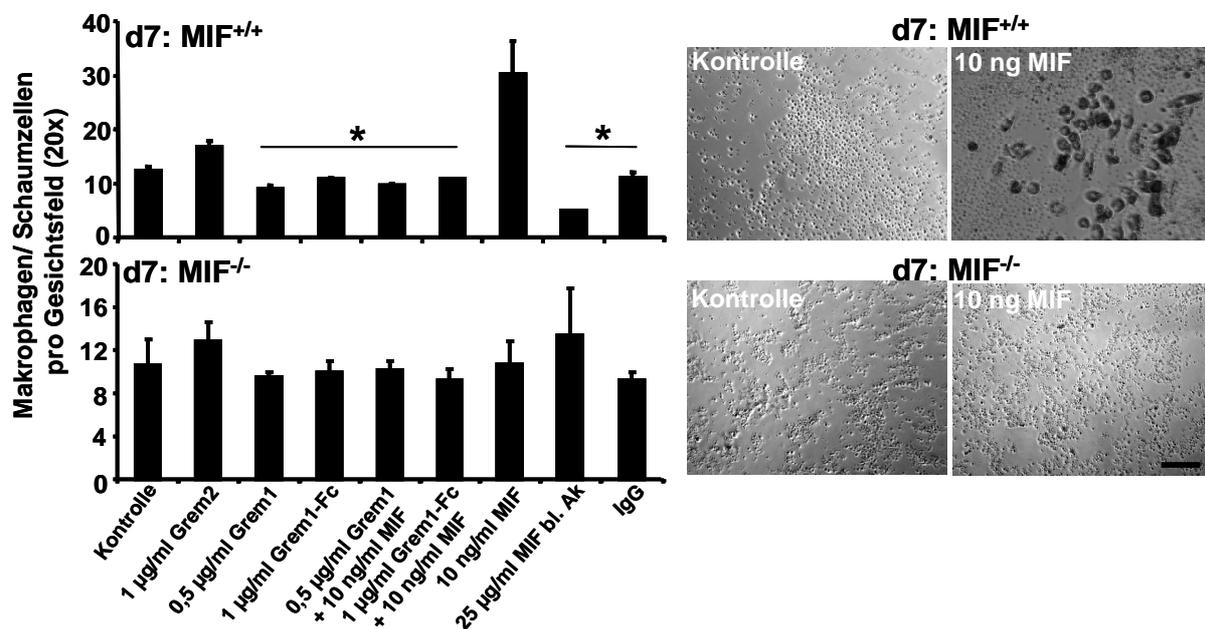


Abbildung 3.13: Grem1 und mGrem1-Fc inhibieren die murine Schaumzellbildung *in vitro*. Dargestellt sind die an d7 gebildeten Schaumzellen der aus C57BL/J6 (MIF^{+/+}, links oben) und MIF^{-/-} (links unten) Mäusen isolierten Zellen. Dabei konnten Grem1 und mGrem1-Fc nur die Schaumzellbildung aus Monozyten von C57BL/J6 Mäusen beeinflussen, nicht aber von MIF^{-/-} Mäusen ($n=3, * = < 0,05$). Dargestellt sind repräsentative Bilder für den Differenzierungsgrad der Zellen an d7 von C57BL/J6 (MIF^{+/+}) und MIF^{-/-} Mäusen (20x Vergrößerung, Maßstab: 50 µm).

3.2.3 Auswirkungen von mGrem1-Fc *in vivo* auf die Ausprägung der Atherosklerose

Die Effekte von Grem1 im Rahmen der Schaumzellbildung und eine vergleichbare Funktionalität des Fusionsproteins mGrem1-Fc konnten *in vitro* nachgewiesen werden (siehe oben). Um zu klären, ob Grem1 auch *in vivo* die Pathogenese der Atherosklerose beeinflusst, wurden *in vivo* Experimente im Krankheitsmodell der Arteriosklerose in ApoE^{-/-}

Mäusen geplant. Da Grem1 aber ein Protein mit geringer Stabilität ist, wurde an seiner Stelle für die *in vivo* Applikation mGrem1-Fc und als Kontrollprotein hlgK-Fc gewählt, um eine stabile Pharmakokinetik und längere Halbwertszeit zu gewährleisten. Die *in vivo* Experimente an ApoE^{-/-} Mäusen mit mGrem1-Fc wurden von Frau Dr. med. vet. Tanja Schönberger durchgeführt. Die Produktion von mGrem1-Fc zu diesen Experimenten wurde von Herrn Florian Appenzeller im Rahmen seiner medizinischen Doktorarbeit durchgeführt. Die anschließende feingewebliche Aufarbeitung der atherosklerotisch veränderten Gefäße aus den Mäusen wurden von mir und Herrn Appenzeller gemeinsam durchgeführt.

Um den Effekt von mGrem1-Fc im ApoE^{-/-} Modell zu untersuchen, wurden 4 Wochen alte männliche Mäuse (B6.129P2-Apoe^{tmUnc1}) mit einer Cholesterin-reichen Diät versorgt. Im Alter von 10 Wochen wurden die Mäuse mit mGrem1-Fc (1 µg/g Körpergewicht, n = 8) oder Kontroll-Fc (äquimolar, n = 8) dreimal pro Woche intraperitoneal (i.p.) behandelt für die Dauer von 4 Wochen. Danach wurden die Mäuse mit Isofluran narkotisiert, getötet und die großen Gefäße (Aorta und Carotiden) entnommen. Abbildung 3.15 zeigt den zeitlichen Verlauf des Experiments.



Abbildung 3.14: Behandlungsschema von mGrem1-Fc im ApoE^{-/-} Mausmodell.
Durchführung des Experiments: Dr. vet. med. Tanja Schönberger

Nach Beendigung des Behandlungszeitraums wurden die Arterien entnommen, in Paraffin eingebettet und für die darauf folgende immunhistochemische Analyse geschnitten. Es erfolgte dabei eine Charakterisierung des Plauegewebes hinsichtlich der Expression von TNF- α und der Anzahl und Zellgröße von CD68-positiven Zellen. Eine weitergehende Analyse unterschiedlicher Parameter wurde in der medizinischen Doktorarbeit von Herrn Florian Appenzeller vorgenommen.

3.2.3.1 Einfluss von mGrem1-Fc auf die TNF- α Expression und leukozytäre Zellpopulation

Bereits in der funktionellen Charakterisierung von mGrem1-Fc unter *in vitro* Bedingungen hatte sich eine Beeinflussung der MIF-induzierten TNF- α Sekretion aus Schaumzellen ergeben (siehe Abb. 3.12 B). Um weitere Schlüsse ziehen zu können, wurden nach erfolgter *in vivo* Applikation die entnommenen Arterien immunhistochemisch untersucht. Dabei konnte durch die Anti-TNF- α Färbung der mGrem1-Fc- und der Kontrollgruppe festgestellt werden, dass eine signifikante Senkung der TNF- α Expression im Plaquegewebe der mit mGrem1-Fc behandelten Tiere im Vergleich zur Fc-Kontrollgruppe erzielt werden konnte (mGrem-Fc Gruppe: $235,08 \pm 55,04$ TNF- α -positive Zellen], Fc-Gruppe: $431,97 \pm 77,92$ TNF- α -positive Zellen ; $p < 0.05$). Die TNF- α Expression ist anhand von repräsentativen Abbildungen in Abbildung 3.15 dargestellt.

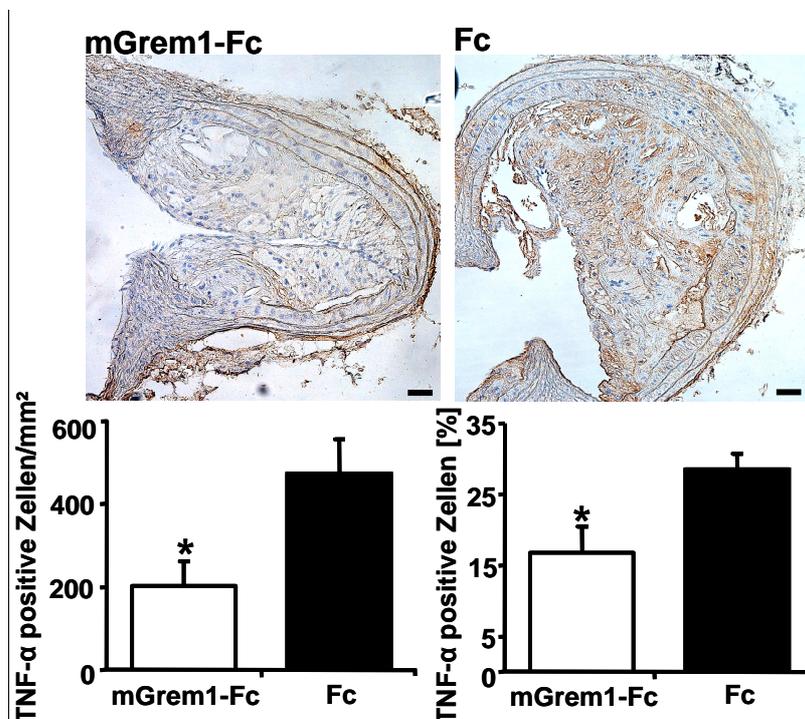


Abbildung 3.15: Darstellung der TNF- α positiven Zellen im Plaquegewebe nach erfolgter Behandlung mit mGrem1-Fc oder Kontroll-Fc. Oben in der Abbildung sind repräsentative Aufnahmen der Anti-TNF- α Färbung gezeigt (10x Vergrößerung, Maßstab 25 μ m). Eine quantitative Auswertung der TNF- α positiven Zellen (untere Abbildungen) ergibt eine signifikante Reduzierung der TNF- α Expression der mGrem1-Fc behandelten Gruppe im Vergleich zur Fc-Kontrollgruppe ($p < 0.05$).

Bereits in Kapitel 3.2.2.1 konnte veranschaulicht werden, dass das Fusionsprotein mGrem1-Fc einen Einfluss auf die Schaumzellbildung unter *in vitro* Bedingungen hat (siehe Abb.

3.13). Um einen möglichen Einfluss von mGrem1-Fc auf die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und Schaumzellen *in vivo* zu untersuchen, wurde eine immunhistochemische Färbung mit anti-CD68 als Marker von Makrophagen/Schaumzellen durchgeführt. Schon durch den optischen Eindruck ergab sich eine verstärkte Ansammlung von CD-68 positiven Zellen in der Kontrollgruppe (siehe Abb. 3.17). Dagegen wurde die Anzahl der CD-68 positiven Zellen nach erfolgter Behandlung mit mGrem1-Fc signifikant reduziert (mGrem1-Fc Gruppe: $16,02 \pm 1,80$ CD68-positive Zellen], Fc-Gruppe: $19,89 \pm 1,52$ CD68-positive Zellen; $p < 0.05$). Durch eine Quantifizierung der Zellgröße der CD68-positiven Zellen konnte zusätzlich zwischen Makrophagen und Schaumzellen unterschieden werden (siehe Abb. 3.16 linkes Säulendiagramm). So konnte eine Veränderung der Zusammensetzung des Plauegewebes festgestellt werden in der mit mGrem1-Fc behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der mit mGrem1-Fc behandelten Gruppe war nicht nur die Zahl der CD68 positiven Zellen reduziert, auch die Größe der Zellen war verringert. Es waren also weniger Schaumzellen nachweisbar. Damit wurde durch die Behandlung der ApoE^{-/-} Mäuse mit mGrem1-Fc sowohl die Anzahl als auch die Zellgröße der Makrophagen und Schaumzellen im Vergleich zur Fc-behandelten Gruppe signifikant reduziert ($p < 0.05$).

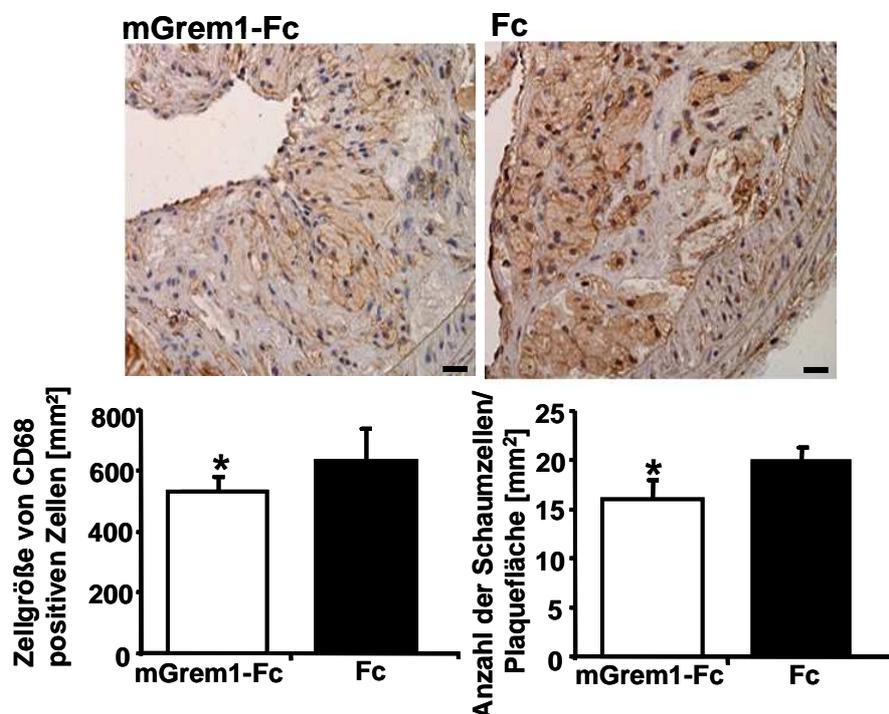


Abbildung 3.16 Darstellung der CD68-positiven Zellen im Plauegewebe nach erfolgter Behandlung mit mGrem1-Fc oder Kontroll-Fc. Oben in der Abbildung sind repräsentative Aufnahmen der Anti-CD68 Färbung gezeigt (20x Vergrößerung, Maßstab 25 µm). Durch eine quantitative Auswertung der CD68-positiven Zellen hinsichtlich ihrer Zellgröße [mm²] und

ihrer Anzahl pro Plaquefläche ergibt eine signifikante Reduzierung der CD68 positiven Zellen in der mGrem1-Fc behandelten Gruppe im Vergleich zur Fc-Kontrollgruppe ($p < 0.05$).

3.2 Die Rolle von Grem1 und seine Interaktion mit TGF β -1 im Myokardinfarkt

Um die Expression von Grem1 im akuten Myokardinfarkt und die Rolle seiner Interaktion mit TGF β -1 unter *in vivo* Bedingungen eingehend charakterisieren zu können, wurde das Modell der Reperfusion/ Ischämie in der Maus gewählt.

3.3.1 Myokardiale Expression von Grem1

In der Atherogenese konnte aufgezeigt werden, dass es zur verstärkten Expression und Freisetzung von Grem1 aus mononukleären Zellen kommt (siehe Kapitel 3.1.1). Verschiedene inflammatorische Prozesse sind in der Progression der Arteriosklerose verantwortlich für die Ausprägung einer Plaqueruptur oder Thrombose, die durch den kompletten Verschluss eines Gefäßes zu einem akuten Myokardinfarkt führen kann. Um zu analysieren, ob Grem1 im akuten Myokardinfarkt eine Rolle spielt, wurde zunächst seine Expression im akuten Myokardinfarkt untersucht. Dazu wurde ein Myokardinfarkt in männlichen C57BL/J6 Mäusen ($n = 8$) induziert durch eine 30 min andauernde Ligatur der „left anterior descending artery“ (LAD). Für die Analyse der Expressionslevel wurden die Zeitpunkte 2d und 7d nach Infarkt gewählt für die qRTPCR Analyse. Als Kontrolle wurden im Versuch C57BL/J6 Mäuse mitgeführt ($n = 8$), bei denen keine Ligatur der LAD durchgeführt worden war, sondern bei denen nur der Thorax geöffnet und wieder verschlossen worden war (sop = sham operated). Außerdem dienten nicht operierte Wildtyp Mäuse (C57BL/J6) als Kontrollen. Nach der Opferung der Tiere wurde aus den Herzen die mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Durch die qRTPCR wurde die relative Expression von Grem1 ermittelt. Als internes Housekeeping-Gen wurde β -Aktin verwendet. Von den „sham operated“ Tieren wurde ebenfalls mRNA isoliert und die relative Expression von Grem1 auf 1 gesetzt, um die x-fachen Expressionslevels von Grem1 im akuten Myokardinfarkt im Vergleich zur Kontrolle darstellen zu können. Die Expression von Grem1 ist nach 2d und 7d in den Mäusen mit induziertem Infarkt im Vergleich zur Kontrollgruppe C57BL/J6 tendenziell erhöht (siehe Abb 3.17). Es kommt zu einer hoch signifikanten Erhöhung der Expression von Grem1 nach 2d ($p < 0.001$) und 7d ($p < 0.01$) im Vergleich zur Kontrollgruppe sop.

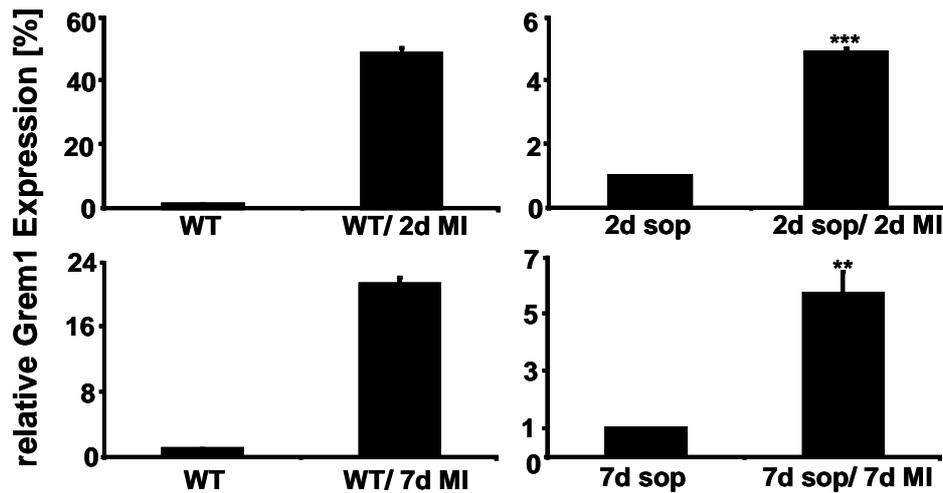


Abbildung 3.17: Die Expression von Grem1 ist im Infarkt erhöht. Darstellung der relativen Expressionswerte [%] der qRT-PCR von Grem1 nach induziertem Myokardinfarkt (MI) im Vergleich zu den Kontrollgruppen C57BL/J6 oder sham operated (sop) nach 2d und 7d ($n = 8$, $** = p < 0.01$, $*** = p < 0.001$). Als Housekeeping-Gen diente β -Aktin.

Außerdem wurden die Expression von Grem1 und TGF β -1, der ein weiterer Interaktionspartner von Grem1 *in vitro* ist, nach induziertem Myokardinfarkt nach 1d und 7d im Vergleich zu einer C57BL/J6 Kontrollgruppe im Westernblot untersucht.

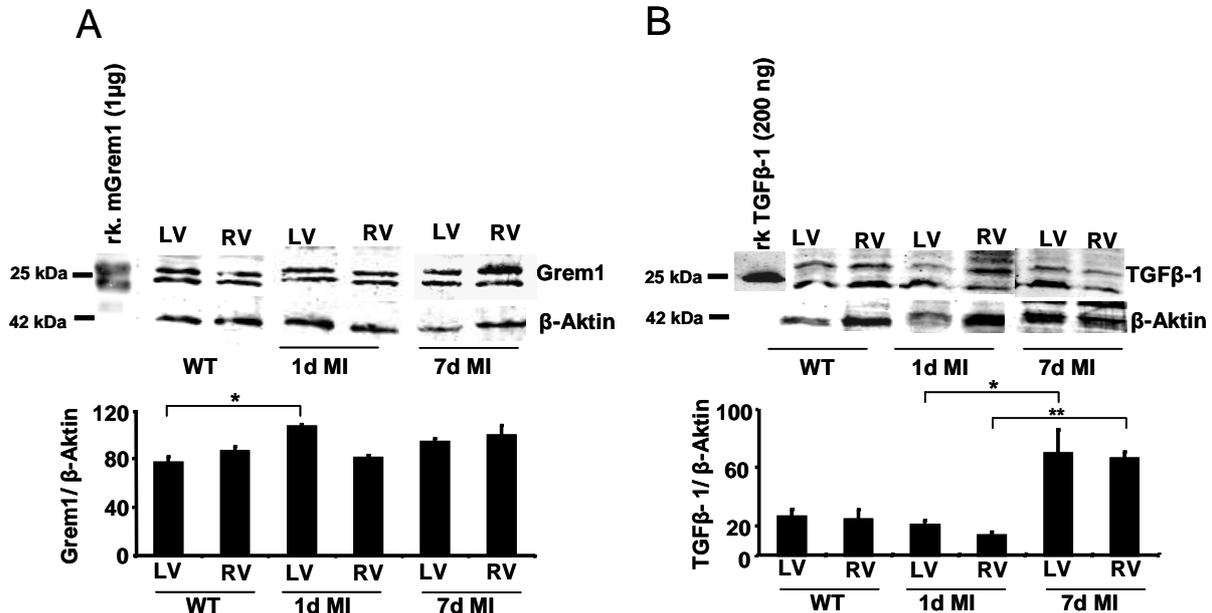


Abbildung 3.18: Expressionslevel von Grem1 und TGF β -1. A.) Westernblot von murinen Herzlysaten (Proteinkonzentration 30 μ g/ml) getrennt nach rechtem und linkem Ventrikel des Herzens (LV oder RV) und Detektion von Grem1 (25 kDa, reduzierte Bedingungen), Positivkontrolle rekombinantes mGrem1 (1 μ g/ml), interne Ladekontrolle: β -Aktin, Reihenfolge: WT (Wildtyp: C57BL/J6), 1d MI (Myokardinfarkt), 7d MI. Quantifizierung der Banden mittels der „Image J“ Software, dargestellt als Grem1/ β -Aktin Verhältnis [%] ($n = 3$, *

= $p < 0.05$). B.) Westernblot von murinen Herzlysaten getrennt nach RV und LV des Herzens und Detektion von TGF β -1 (25 kDa, nicht reduzierte Bedingungen), Positivkontrolle rekombinantes mTGF β -1 (200 ng/ml), interne Ladekontrolle: β -Aktin, Reihenfolge: WT, 1d MI, 7d MI. Quantifizierung der Banden mittels der Image J Software dargestellt als TGF β -1/ β -Aktin Verhältnis [%] ($n = 3$, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$).

Im Westernblot der murinen Herzlysate konnte für Grem1 ein verstärktes Expressionsniveau für den Zeitpunkt 1d MI im linken Ventrikel im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe C57BL/J6 nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.18 A, $p < 0.05$). Die operative Induktion des MI durch Ligatur der LAD hat dabei Auswirkungen auf Prozesse, die im linken Ventrikel ihre Auswirkungen zeigen. Das Expressionsniveau von Grem1 im linken Ventrikel war nach 7d MI noch erhöht im Vergleich zu den Expressionsleveln der C57BL/J6, hatte aber zum Zeitpunkt 1d MI seinen maximalen Expressionswert erreicht. Die Expressionslevel im rechten Ventrikel waren nach 1d MI mit Bezug auf die C57BL/J6 Kontrolle nicht verändert. Die Expressionslevel von TGF β -1 waren nach 1d MI im Vergleich zur C57BL/J6 Kontrolle nicht verändert (siehe Abb. 3.18 B). Nach 7d MI konnte ein Anstieg der Expression von TGF β -1 nachgewiesen werden im Vergleich zum Zeitpunkt 1d MI ($p < 0.05$).

3.3.2 Die molekulare Interaktion von Grem1 und TGF β -1

Um die von unserer Arbeitsgruppe im Vorfeld bereits festgestellte Interaktion von TGF β -1 mit Grem1 genauer zu verifizieren, wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Dabei wurde das Lysat von HAECs mit den Antikörpern gegen Grem1 und TGF β -1 inkubiert, durch eine Bindung an Sepharosebeads gefällt, und durch anschließenden Westernblot mit anti-Grem1- und anti-TGF β -1-Antikörpern nachgewiesen. Um zu gewährleisten, dass es sich um eine spezifische Interaktion zwischen den beiden Proteinen handelte, wurde die entsprechende Isotypenkontrolle der Präzipitationsantikörper im Versuch mitgeführt, in der nur geringe Banden von Grem1 bzw. TGF β -1 detektiert wurden.

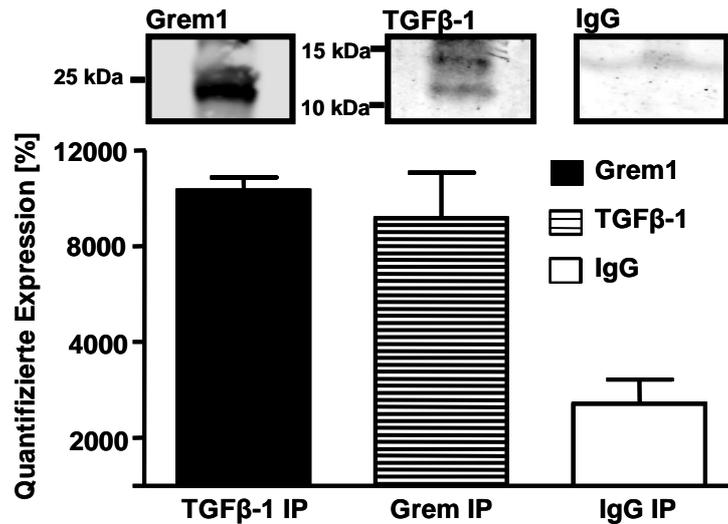


Abbildung 3.19: Grem1 zeigt eine molekulare Interaktion mit TGFβ-1 unter *in vitro* Bedingungen. Darstellung der Immunpräzipitation von anti-Grem1 und anti-TGFβ-1 und anschließendem Nachweis der Bindungspartner im Westernblot unter reduzierten Bedingungen. Links: Nachweis von Grem1 (23 kDa), rechts: Nachweis von TGFβ-1 (12,5 kDa). Die Westernblots wurden mittels „Image J“ Software quantitativ ausgewertet, gezeigt ist ein repräsentativer Westernblot von n=5.

Durch die Immunpräzipitation von Grem1 und TGFβ-1 konnte nachgewiesen werden, dass es zu einer Interaktion zwischen den beiden Proteinen unter *in vitro* Bedingungen kommt (siehe Abb 3.19). Da die erhobenen Daten zusammen mit den Bindungsstudien von Herrn Prof. Simmet (Universität Ulm, Ulm, Deutschland) auf eine spezifische molekulare Interaktion von Grem1 und TGFβ-1 schliessen lassen, wurde im nächsten Schritt eine Ko-Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt, um eine tatsächliche Kolokalisierung von beiden Proteinen nachzuweisen. Dabei wurde eine Zelllinie von Fibroblasten (PMEF, primary mouse embryony fibroblasts) gewählt, um ein hohes Expressionsniveau an TGFβ-1 als Basis für die Untersuchung zu gewährleisten. Für die Kernfärbung der Zellen wurde der Farbstoff DAPI verwendet.

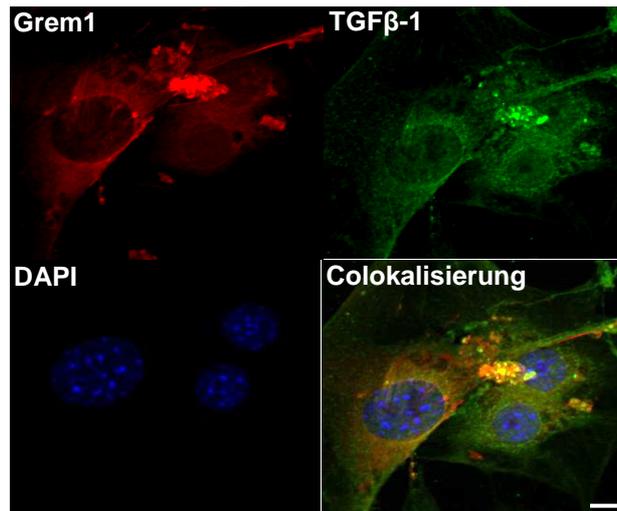


Abbildung 3.20: Grem1 und TGFβ-1 werden in Fibroblasten (PMEF) koexprimiert. *In Fibroblasten (PMEF) wurde Grem1 (rote Fluoreszenz), TGFβ-1 (grüne Fluoreszenz) und DAPI (blaue Fluoreszenz) angefärbt (n=3). Es wurden Aufnahmen in einer 40x Vergrößerung photographiert. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm.*

Durch die Fluoreszenzfärbung konnte eine Kokolorisierung von Grem1 und TGFβ-1 in den Fibroblasten (PMEF) unter *in vitro* Bedingungen nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.20).

Des Weiteren wurde untersucht, wie sich die Expressionsmuster von Grem1 und TGFβ-1 *in vivo* durch die operative Induktion eines Myokardinfarktes im Gewebe ändern. Dazu wurden in einer Versuchsreihe verschiedene Zeitpunkte des MI Modells miteinbezogen (1d MI, 7d MI und 28d MI). Als Kontrollgruppe dienten nicht operierte C57BL/J6 Mäuse. Nach Opferung der Mäuse wurden die Herzen in Paraffin eingebettet und für die weitere histologische und immunhistochemische Färbung mittels eines Mikrotoms in 5 µm dicke Schnitte geschnitten. Es wurde eine Koimmunfluoreszenzfärbung mit anti-Grem1 und anti-TGFβ-1 durchgeführt. Anschließend wurden die histologischen Schnitte mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Als Farbstoff für die Kernfärbung wurde TO-PRO-3 verwendet.

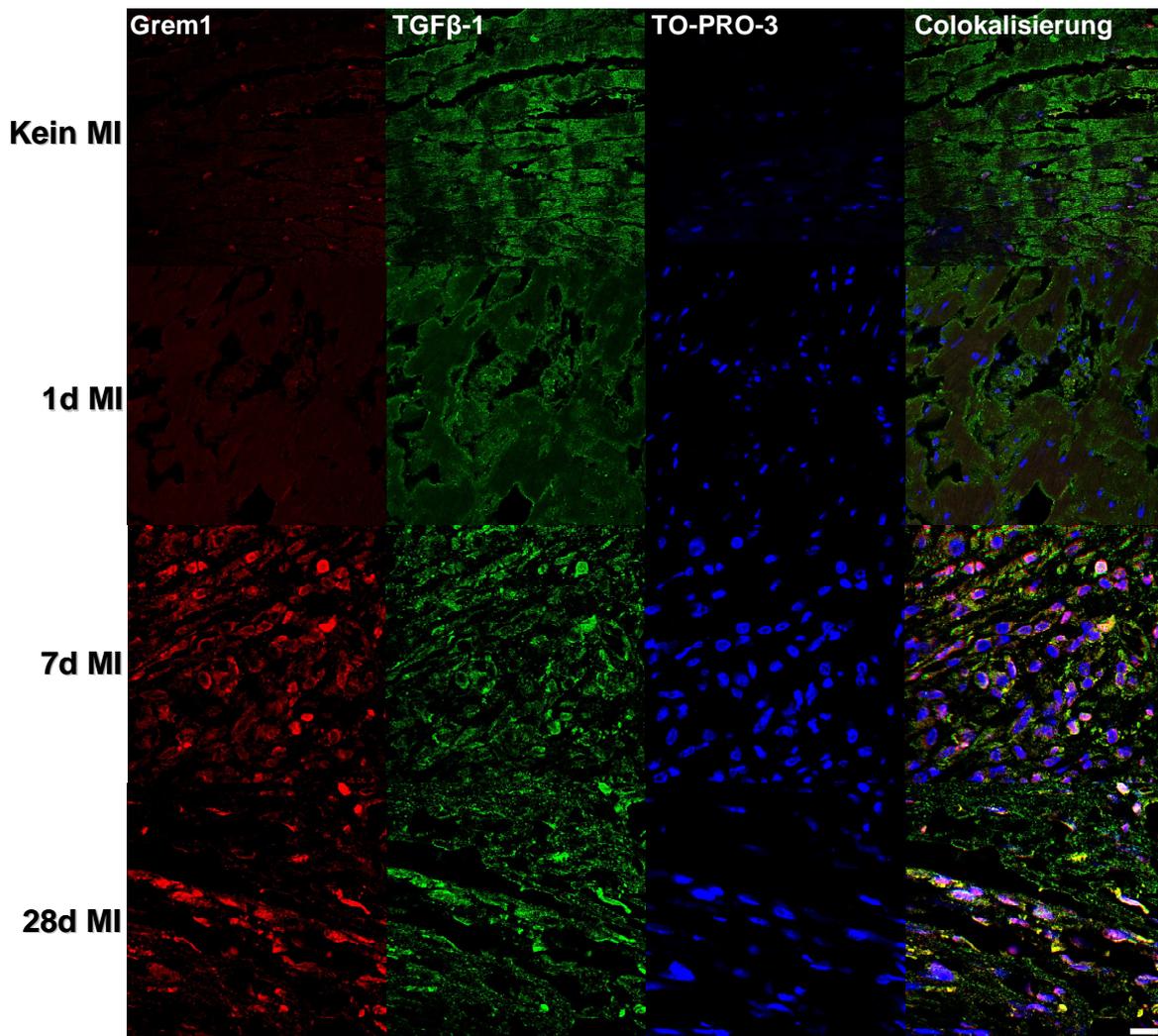


Abbildung 3.21: Expressionsmuster von Grem1 und TGFβ-1 im myokardialen Infarkt im zeitlichen Verlauf. Dargestellt sind repräsentative Bilder der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie in 40x Vergrößerung der verschiedenen Gruppen: 1. Kein MI (C57BL/J6), 2. 1d MI, 3. 7d MI und 4. 28d MI (n=3). Es wurde eine Doppelfärbung durchgeführt mit: anti-Grem1 (rote Fluoreszenz), anti-TGFβ-1 (grüne Fluoreszenz) und TO-PRO-3 (blaue Fluoreszenz). Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm. (konfokale Bildaufnahme: Dr. rer. nat. Madhumita Chatterjee).

Durch die konfokale Studie der Expressionsmuster von Grem1 und TGFβ-1 zeigte sich, dass es im Herzgewebe der C57/BL6J Mäuse zu keiner relevanten basalen Expression der beiden Proteine kommt. Zum Zeitpunkt 1d nach MI waren die Expressionslevel von Grem1 und TGFβ-1 ebenfalls noch nicht stark erhöht im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Zu den Zeitpunkten 7d und 28d nach MI konnte dagegen eine deutliche Hochregulierung der Expression von Grem1 und TGFβ-1 nachgewiesen werden. Außerdem war eine Kolokalisierung der beiden Proteine zu beobachten (siehe Abb. 3.21). Die Kolokalisierung manifestierte sich dabei vor allem in Bereichen infiltrierender Zellen, welche durch die

inflammatorischen Prozesse in die Herzinfarktregion eingewandert waren, bezogen auf die Zeitpunkte 7d nach MI und 28d nach MI. Auch in den Bereichen, wo sich die Myokardnarbe auszubilden begann, war eine vermehrte Expression von Grem1 und TGF β -1 zu erkennen, und auch hier waren beide Proteine kolokalisiert.

3.3.3 Der Einfluss von mGrem1-Fc auf die TGF β -1 abhängigen „Remodeling“-Prozesse im *in vitro* Modell

An einen akuten Myokardinfarkt schließen sich drei verschiedene Phasen an. Zunächst erfolgt eine inflammatorische Phase, welche durch Entzündungsprozesse charakterisiert ist. Darauf folgt eine Phase, in der proliferative Vorgänge dominieren. Und schliesslich folgt eine „Remodeling“-Phase, die mit Heilungs- und Umstrukturierungsprozessen des Gewebes verbunden ist. In der proliferativen Phase kommt es vor Allem zu einer TGF β -1 abhängigen Steigerung der Synthese von extrazellulären Matrixproteinen und zu einer vermehrten Kollagensynthese ausgehend von unterschiedlichen Zellpopulation, wie beispielsweise humanen kardialen Fibroblasten^{28, 133}. Um zu untersuchen, ob mGrem1-Fc in diesem Zusammenhang einen Einfluss auf die TGF β -1 abhängige Synthese von Kollagen I (Col I) hat, wurden PMEF unter *in vitro* Bedingungen für 48h kultiviert und ihre Col I Expression und Synthese mittels Westernblot und ELISA analysiert.

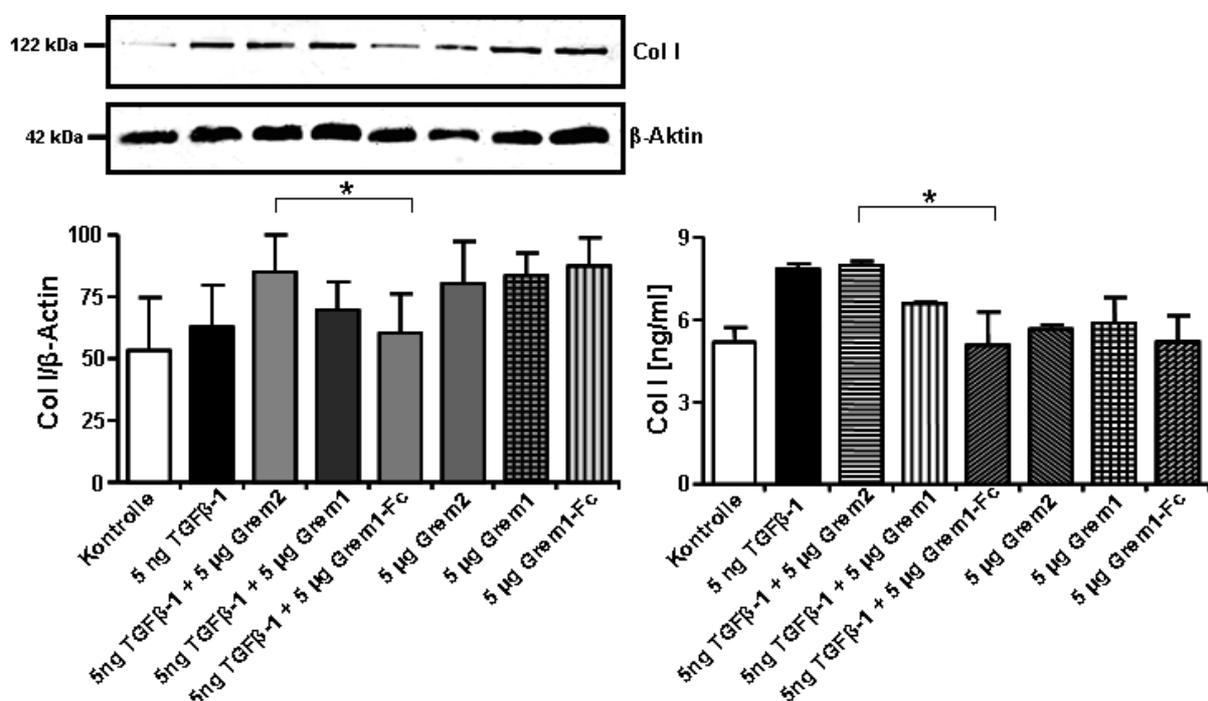


Abbildung 3.22: Einfluß von Grem1 und mGrem1-Fc auf die Expression und Sekretion von Col I in PMEF. Links.) Anti-Col I Westernblot der für 48h behandelten Proben der PMEF (Proteinmenge 30 μ g/ml, reduzierte Bedingungen); als interne Ladekontrolle wurde β -Aktin

(42 kDa) verwendet. Quantifizierung der Banden mittels der „Image J“ Software, dargestellt als Col I/ β -Aktin Verhältnis [%] ($n = 5$, $* = p < 0.05$). Rechts.) Anti-mCol I ELISA der für 48h behandelten Überstände der PMEF ($n = 5$, $* = p < 0.05$).

Anhand der ELISA Daten zeigte sich, dass TGF β -1 die Sekretion von Col I aus PMEFs steigerte. Dieser Effekt konnte durch eine Kostimulation der Zellen mit TGF β -1 und mGrem1-Fc signifikant inhibiert werden (siehe Abb. 3.22 Rechts, $p < 0.05$). Durch eine Kostimulation der Zellen mit TGF β -1 und dem murinen rekombinanten Grem1 konnte dieser Effekt auch erreicht werden. Die Hemmung war aber nicht signifikant im Vergleich zu TGF β -1 alleine. Die Analyse der Proben im Westernblot zeigte einen ebenfalls vorhandenen Inhibierungseffekt von mGrem1-Fc auf die TGF β -1 abhängige Col I Expression der PMEF (siehe Abb. 3.22 Links, $p < 0.05$). Dieser Effekt konnte auch durch eine Kostimulation mit TGF β -1 und mGrem1 erreicht werden, wobei die Hemmung nicht signifikant war. Durch eine Kostimulation der Zellen mit TGF β -1 und Grem2 konnte dieser Effekt nicht erzielt werden.

i

Anschließend wurden die Effekte von humanem Grem1 auf die TGF β -1 abhängige humane Col I Expression in humanen kardialen Fibroblasten (HCFs) unter *in vitro* Bedingungen untersucht. Dazu wurden HCFs für 48h mit TGF β -1 und/ oder Grem1 behandelt und dann mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie auf die Expression von Col I hin analysiert. Als Farbstoff für die Kernfärbung wurde TO-PRO-3 verwendet.

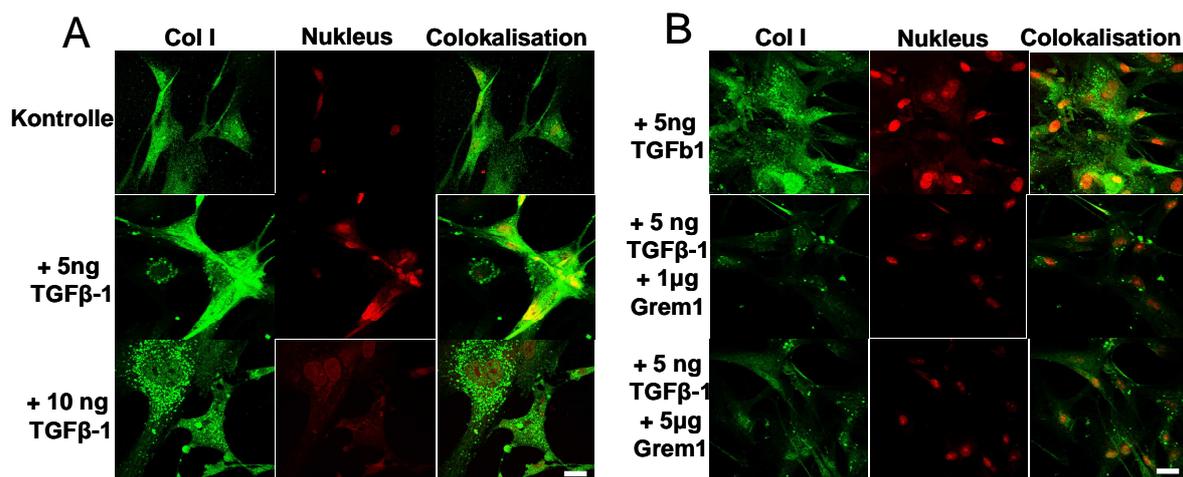


Abbildung 3.23: Grem1 hemmt die TGF β -1 abhängige Expression von Col I in HCFs.

A.) Darstellung von repräsentativen konfokalen Bildern (40x, Maßstabsbalken 10 μ m) der unbehandelten Kontrolle und der Positivkontrolle (+ 5 ng/ml TGF β -1). Anfärbt wurden die für 48h kultivierten Zellen mit anti-Col I (grüne Fluoreszenz) und TO-PRO-3 (rote Fluoreszenz). B.) Konfokale Bilder der Positivkontrolle (+ 5 ng/ml TGF β -1) und der

kostimulierten Ansätze (+ 5 ng/ml TGFβ-1, + 1 µg /ml Grem1/ + 5 µg/ml Grem1). (konfokale Bildaufnahme: Dr. rer. nat. Madhumita Chatterjee).

Durch die konfokale Fluoreszenzmikroskopie konnte dargestellt werden, dass es zu einer TGFβ-1 abhängigen Hochregulierung der Col I Expression kommt im Vergleich zur Kontrolle, die unbehandelt blieb. Eine gleichzeitige Behandlung der HCFs mit TGFβ-1 und Grem1 führte zu einer sichtbaren Reduzierung des Fluoreszenzsignals. Grem1 hatte dabei einen inhibitorischen Effekt auf die Col I Expression der Fibroblasten (siehe Abb. 3.23 B).

3.3.4 Effekte von mGrem1-Fc nach akutem Myokardinfarkt

Für die funktionelle Charakterisierung von mGrem1-Fc im *in vivo* Modell der Reperfusion-/Ischämiemodell der Maus wurde ein Myokardinfarkt in männlichen 10-12 Wochen alten C57BL/J6 Mäusen durch eine 30 min andauernde Ligatur der „*left anterior descending artery*“ (LAD) induziert. Dabei erfolgte eine Einteilung in zwei verschiedene Versuchsgruppen (siehe Tabelle 2.12). Die Versuchstiere erhielten eine i.p. Gabe des mGrem1-Fc (1 µg pro g KG) oder des entsprechenden Kontrollproteins Fc (äquimolar) direkt nach erfolgter Ligatur der LAD und 48h nach dem Eingriff. Es wurde eine echokardiographische Untersuchung der Versuchstiere bezüglich ihrer linksventrikulären Herzfunktion direkt nach und 7 Tage nach erfolgter Ischämie/Reperfusion vorgenommen. Kurz vor Opferung der Tiere und Entnahme der Herzen wurde in Isoflurannarkose die Infarktgröße und die Größe des ischämischen Bereichs (Area at Risk) durch die Durchführung einer Evan's Blue und Triphenyltetrazolium-Färbung bestimmt. Anschließend wurden die Tiere getötet und die Herzen entnommen. Nach Fixierung, Einbettung in Parafin und Anfertigung histologischer Schnitte erfolgte eine immunhistochemische Analyse der Herzen. Dabei wurde die Expression von PMA, CD3, Mac-3, TGFβ-1 und MIF im ischämischen Infarktbereich untersucht, sowie eine Trichromfärbung auf spezifische Kollagenexpression hin durchgeführt.

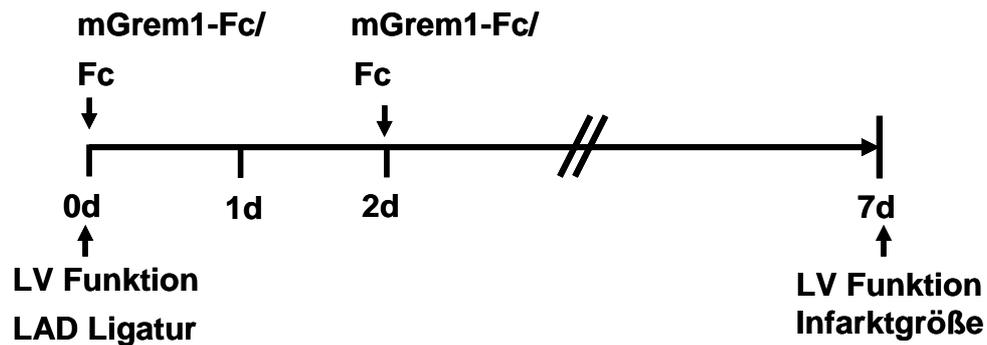


Abbildung 3.24: Behandlungsschema von mGrem1-Fc im 7d Ischämie/Reperfusion-Mausmodell. Um den Effekt von mGrem1-Fc im 7d MI Modell zu untersuchen, wurden 10-12 Wochen alte männliche Mäuse direkt nach Ligatur der LAD und 48h später mit mGrem1-Fc ($1 \mu\text{g/g KG}$, $n = 5$) oder Kontroll-Fc (äquimolar, $n = 5$) i.p. behandelt. Direkt nach Ligatur der LAD sowie 7d nach Ischämie/Reperfusion wurde eine echokardiographische Untersuchung der Versuchstiere durchgeführt zur Bestimmung der linkventrikulären (LV-) Funktion. Anschließend wurden die Mäuse geopfert und ihre Herzen für weitere histologische und immunhistochemische Analysen verwendet. (Die operativen Eingriffe, einschließlich der Anästhesie, der Schmerztherapie und der Tötung der Mäuse, sowie die Echokardiographie und die i.p. Applikation der Proteine wurden von Frau Dr. med. vet. Tanja Schönberger und von Herrn Dr. med. Tobias Jürgens durchgeführt).

3.3.4.1 mGrem1-Fc verringert die Infarktgröße nach operativer Induktion einer myokardialen Ischämie

Um Parameter wie die Infarktgröße oder die Größe des ischämischen Bereichs (Area at Risk) des Herzens erfassen zu können, wurde kurz vor der Entnahme der Herzen eine Evan's Blue und Triphenyltetrazolium-Färbung durchgeführt. Dabei zeigt sich eine spezifische Farbgebung der Herzen (siehe Abb. 3.25). Der helle bis weiße Bereich ist hierbei charakterisiert durch eine irreversible Schädigung des Herzgewebes durch Ligatur der LAD. Der rote Bereich weist eine myokardiale Ischämie auf, wobei in diesem Bereich das Gewebe noch nicht irreversibel geschädigt ist, sondern noch eine Vitalität inne hat. Das blau angefärbte Gewebe ist nicht von dem Infarkt betroffen und stellt das den Ischämiebereich umgebende gesunde Gewebe dar. Dabei wurde 7d nach MI eine quantitative Auswertung vorgenommen, wodurch zwei Parameter bestimmt wurden. Zum einen wurde die Infarktgröße als prozentualer Anteil der gesamten linksventrikulären Fläche (% LV) bestimmt, zum anderen wurde der prozentuale Anteil des ischämischen Bereichs (% I/AaR) gemessen.

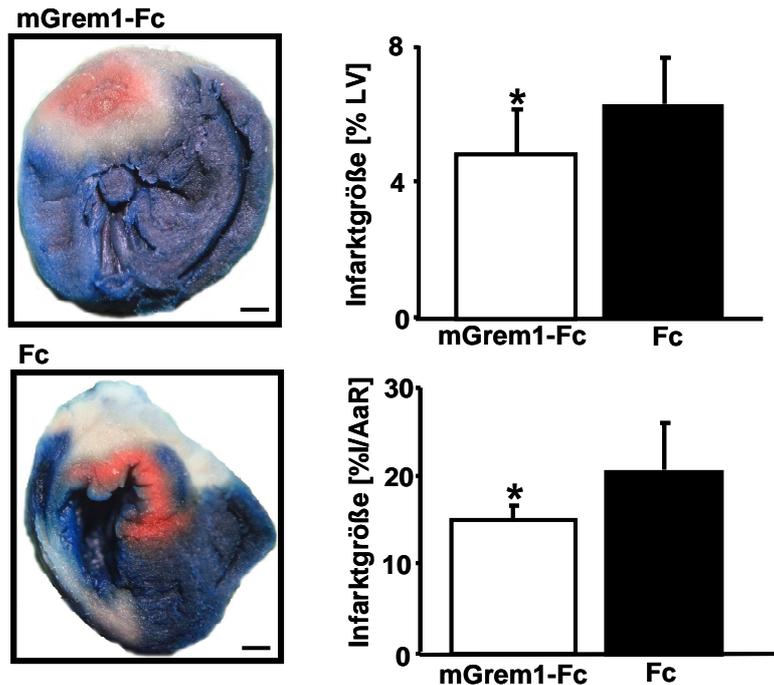


Abbildung 3.25: Effekt von mGrem1-Fc auf die Infarktgröße *in vivo* (7d MI). Links: Darstellung von repräsentativen myokardialen Scheiben 7 Tage nach erfolgter LAD und Behandlung der Versuchsgruppen (mGrem1-Fc oder Fc, der Maßstabsbalken entspricht 0,1 mm). Rechts: Diagramme der quantifizierten Auswertung der Infarktgröße als prozentualer Anteil von der gesamten linksventrikulären Fläche (% LV) oder als prozentualer Anteil des ischämischen Bereichs (% I/AaR).

Durch einer zweimalige-Behandlung der Versuchstiere mit mGrem1-Fc nach erfolgter Ligatur der LAD konnte im Vergleich zur Fc-Gruppe eine signifikante Reduzierung der Infarktgröße nach 7 Tagen (mGrem1-Fc Gruppe: $15,17 \pm 1,83$ % I/AaR, Fc-Gruppe: $20,77 \pm 5,16$ % I/AaR; $p < 0,05$) erreicht werden (siehe Abb. 3.26). Dabei ergab sich auch eine signifikante Reduzierung der Infarktgröße bezogen auf die gesamte Fläche des linken Ventrikels (mGrem1-Fc Gruppe: $4,76 \pm 1,28$ % LV, Fc-Gruppe: $6,12 \pm 1,33$ % LV; $p < 0,05$).

3.3.4.2 mGrem1-Fc verbessert die linksventrikuläre Pumpfunktion nach operativer Induktion einer myokardialen Ischämie

Das Fusionsprotein mGrem1-Fc zeigt also einen kardioprotektiven Effekt auf die Infarktgröße nach erfolgter Ligatur der LAD. Um auch eine Aussage über eine Beeinflussung der Herzfunktion, nämlich der linksventrikulären (LV-) Funktion durch die Behandlung mit mGrem1-Fc, treffen zu können, wurde eine echokardiographische Untersuchung der Herzen direkt nach Ligatur der LAD und 7d später durchgeführt. Die erhobenen Daten wurden quantitativ ausgewertet. Die LV-Funktion wurde als „Ejection fraction“ (EF) dargestellt. Dabei

wurde das Verhältnis der EF zwischen d0 und d7 angegeben. In Abbildung 3.26 ist dargestellt, dass die LV-Funktion durch eine Behandlung mit mGrem1-Fc im Vergleich zur Fc-Kontrolle signifikant um 20% verbessert wurde ($p < 0.05$).

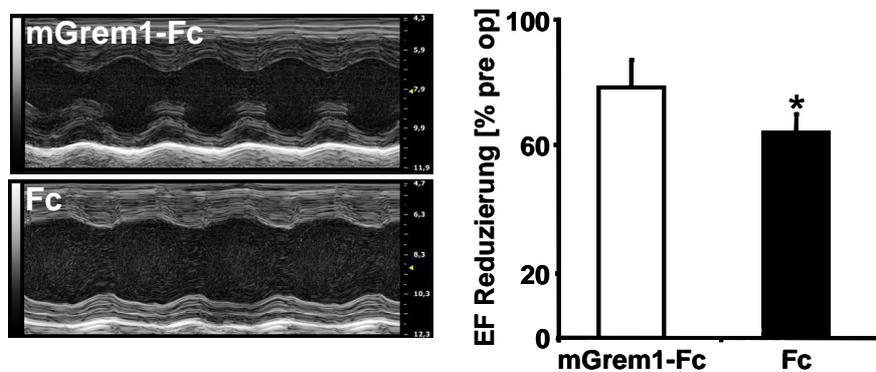


Abbildung 3.26 Effekt von mGrem1-Fc auf die Herzfunktion (LV) *in vivo* (7d MI). Links: Darstellung von repräsentativen echokardiographischen Aufnahmen im M-Mode der beiden Versuchsgruppen (mGrem1-Fc und Kontroll-Fc). Rechts: Diagramm der LV-Funktion als EF Verhältnis zwischen d0 und d7 [%] (* = $p < 0.05$).

3.3.4.3 Einfluss von mGrem1-Fc auf die qualitative und quantitative Zellularität im 7d MI Modell

Um zu verifizieren, ob mGrem1-Fc im Tiermodell des 7d MI auch eine Veränderung der qualitativen und quantitativen Zellularität im Herzgewebe, vor allem im ischämischen Infarktbereich, bewirkt, wurde eine HE (Hämatoxylin und Eosin) Färbung der Myokardschnitte 7 Tagen nach Ligatur der LAD vorgenommen. Zur Bestimmung der Zellquantität wurden die Zellen im Infarktbereich ausgezählt (siehe Abb. 3.28). Dabei ergaben sich keine Unterschiede in den beiden Versuchsgruppen (mGrem1-Fc Gruppe: $3989,9 \pm 135,73$ Zellkerne/mm², Fc-Gruppe: $3582,75 \pm 173,79$ Zellkerne/mm²; $p = 0.12$) bezüglich der Zellquantität im analysierten Bereich des MI nach 7 Tagen Behandlungsdauer.

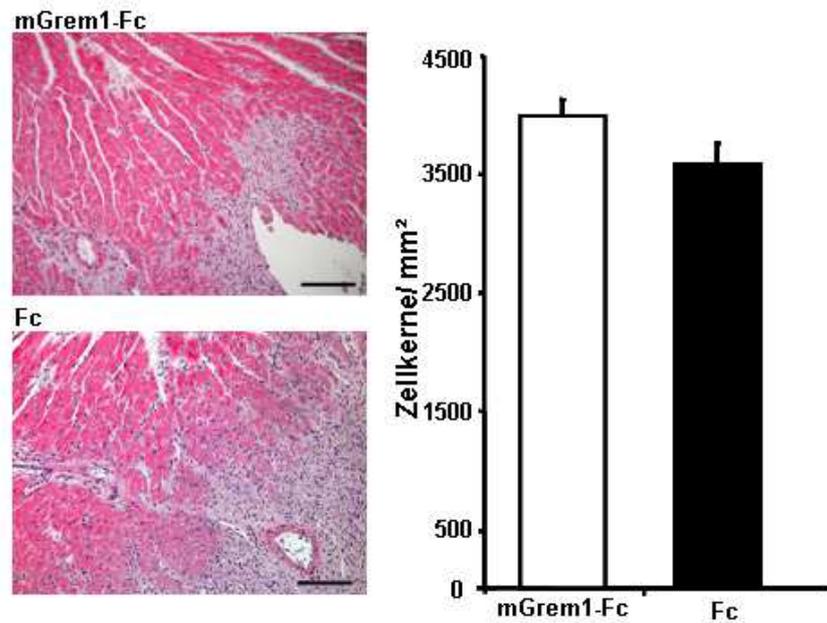


Abbildung 3.27: Darstellung der zellulären Quantität im myokardialen Ischämiegebiet.
 Links: Repräsentative Aufnahmen der HE-Färbung von myokardialen Schnitten nach 7d erfolgter Behandlung mit mGrem1-Fc oder Kontroll-Fc nach transienter Ligatur der LAD (10x Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 25 µm). Rechts: Quantitative Auswertung der Zellzahl im myokardialen Ischämiegebiet, dargestellt als Anzahl der Zellkerne/mm².

Zur Untersuchung der qualitativen Zellularität im Infarktgebiet der behandelten Versuchsgruppen (mGrem1-Fc vs Kontroll-Fc) wurde 7d nach MI eine immunhistochemische Färbung der Myokardschnitte auf Marker wie anti-PMN (neutrophile Zellen), anti-CD3 (T-Zellen) und anti-Mac3 (Makrophagen) durchgeführt (siehe Abb. 3.27).

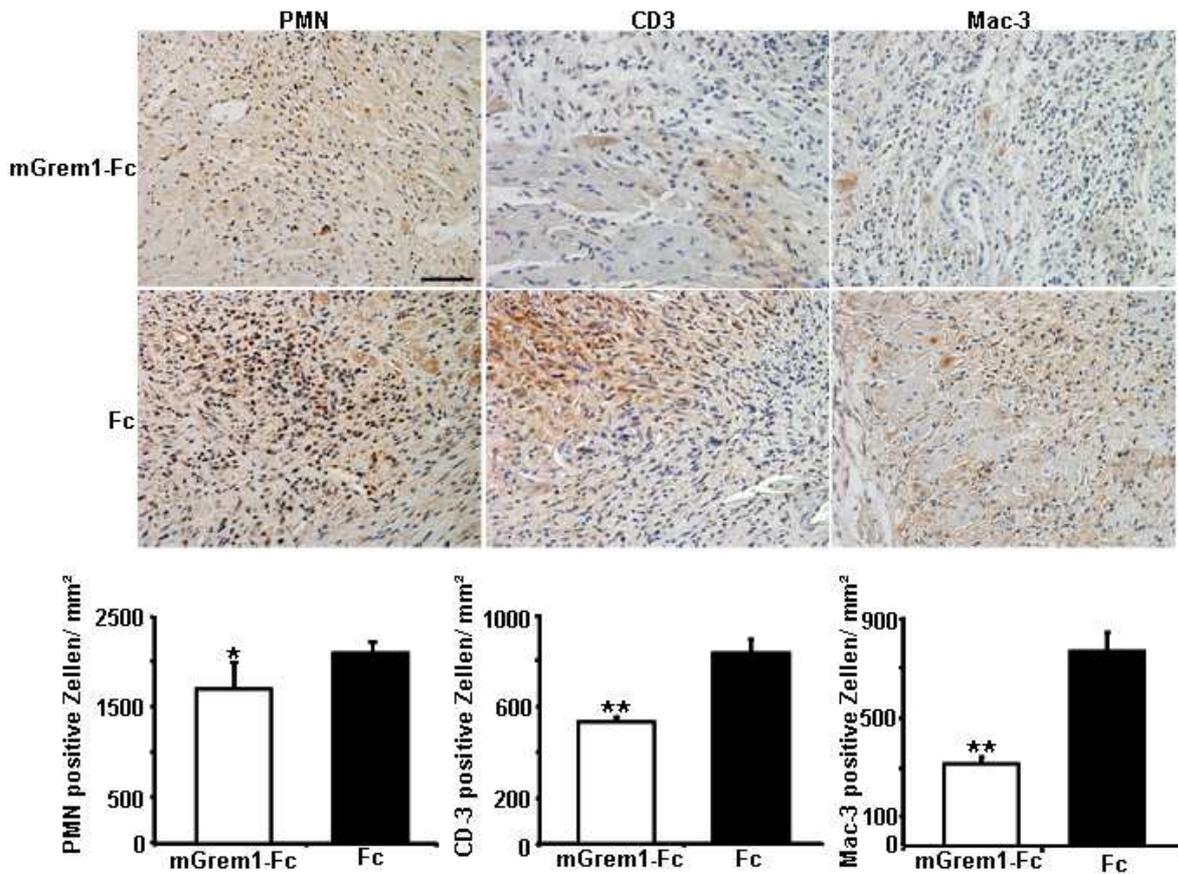


Abbildung 3.28: Darstellung der qualitativen Zellularität im myokardialen Ischämiegebiet 7 Tage nach LAD (anti-PMN, anti-CD3 und anti-Mac-3). Oben: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung auf die zellulären Marker PMN, CD3 und Mac-3 im ischämischen Gebiet (20x Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 25 μ m). Unten: Darstellung der quantitativen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen (anti-PMN, anti-CD3 und anti-Mac-3) als Anzahl der positiven Zellen/mm² (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$).

Als Marker färbt PMN alle neutrophilen Zellpopulationen an (siehe Abb 3.28 links). Dabei konnte durch die Behandlung der Versuchstiere mit mGrem1-Fc im Vergleich zur Kontrollgruppe 7 Tage nach Ligatur der LAD eine signifikante Reduzierung der PMN-positiven Zellen (neutrophile Zellen) im Infarktgebiet erzielt werden (mGrem1-Fc Gruppe: 1708,60 \pm 269,84 PMN-positive Zellen/mm² vs. Fc-Gruppe: 2088,17 \pm 133,90 PMN-positive Zellen/mm², $p < 0.05$). Des Weiteren konnte durch die Behandlung der Versuchstiere mit dem Fusionsprotein mGrem1-Fc die Anzahl der CD3-positiven Zellen (T-Zellen) ebenfalls hoch signifikant verringert werden im myokardialen Ischämiegebiet (siehe Abb. 3.28 Mitte, mGrem1-Fc Gruppe: 532,61 \pm 18,43 CD3-positive Zellen/mm² vs. Fc-Gruppe: 828,77 \pm 61,99 CD3-positive Zellen/mm², $p < 0.01$). Außerdem kam es bei der Analyse der anti-Mac-3 Färbung, welche spezifisch Makrophagen anfärbt, zu einer signifikanten Reduktion der Makrophagen in der mGrem1-Fc behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe

Abb 3.29 rechts, mGrem1-Fc Gruppe: $322,82 \pm 27,38$ Mac-3-positive Zellen/mm² vs. Fc-Gruppe: $762,19 \pm 78,45$ Mac-3-positive Zellen/mm², $p < 0.01$).

Für eine weiterführende Charakterisierung der Interaktion von Grem1 mit TGF- β 1 und MIF wurden die myokardialen Herzschnitte 7 Tage nach transientscher Ligatur der LAD und erfolgter Behandlung mit mGrem1-Fc oder des Kontroll-Fc mit anti-TGF β -1 und anti-MIF gefärbt. Die TGF β -1 abhängige Kollagenexpression und -Sekretion von Fibroblasten (murine und humane) wurde bereits *in vitro* untersucht (siehe Kapitel 3.2.3). Dabei konnte Grem1 bzw. mGrem1-Fc die TGF- β 1 induzierte Col I Synthese beeinflussen. Um diesen Effekt von Grem1 und mGrem1-Fc auch unter *in vivo* Bedingungen zu analysieren, wurde eine Trichromfärbung vorgenommen, um die kollagenreichen Bereiche im myokardialen Infarktareal anfärben zu können (grüne Areale).

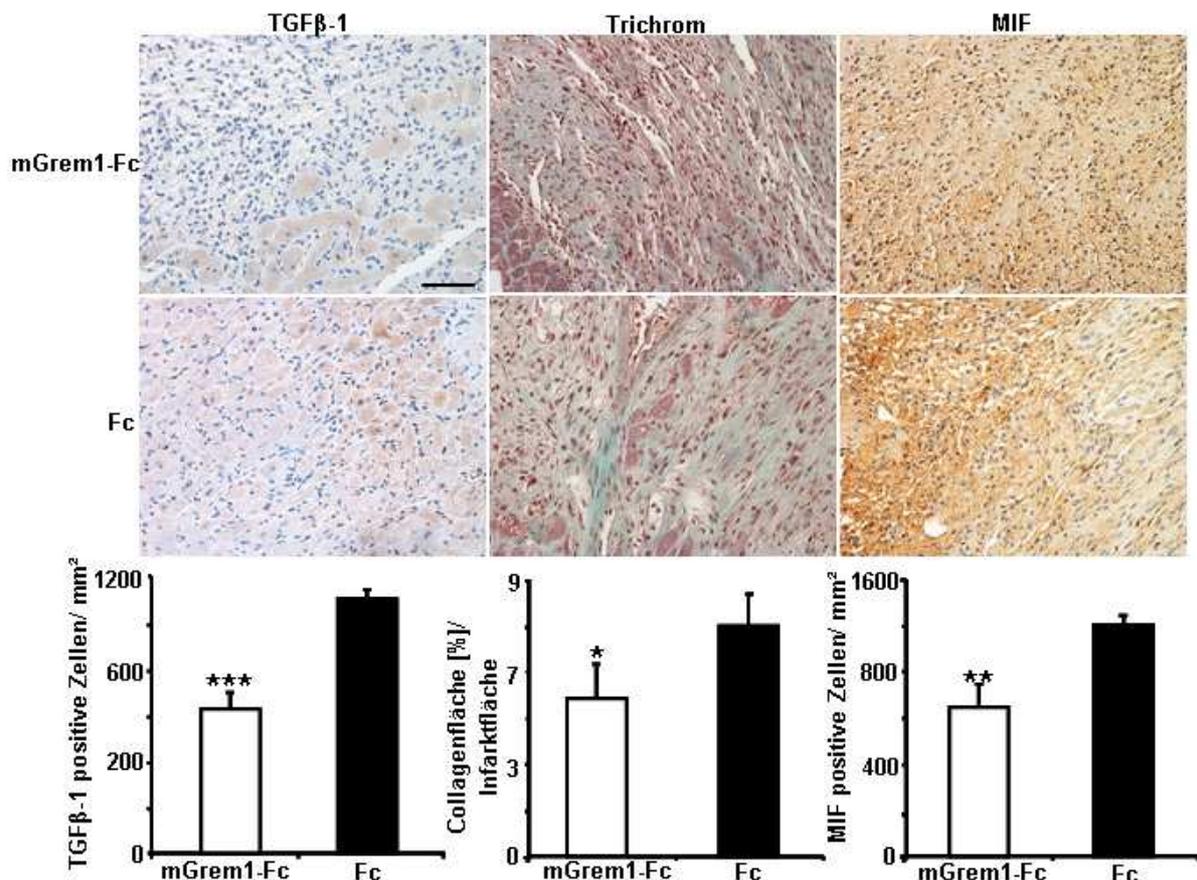


Abbildung 3.29: Darstellung der qualitativen Zellularität im myokardialen Ischämiegebiet 7 Tage nach Ligatur der LAD (anti-TGF β -1, Trichrom und anti-MIF). Oben: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbungen der zellulären Marker TGF β 1 und MIF und der Trichrom-Färbung im ischämischen Gebiet (20x Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 25 μ m). Unten: Darstellung der quantitativen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen (anti-TGF β -1 und anti-MIF) als Anzahl der positiven

Zellen/mm² und ausgemessene Kollagenfläche [%]/Infarktfläche (Trichrom); (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$).

Durch die Behandlung mit mGrem1-Fc zeigte sich, dass es zu einer tendentiellen Veränderung der Expression der molekularen Bindungspartner von Grem1 unter *in vivo* Bedingungen kommt (siehe Abb. 3.29 links und rechts). Dabei kam es zu einer Reduzierung der Expression von TGF β -1 bei den mit mGrem1-Fc behandelten Versuchstiere im Vergleich zur Kontrollgruppe in den quantifizierten Bereichen der myokardialen Ischämie 7 Tage nach transienter Ligatur der LAD (Abb. 3.29 Links, mGrem1-Fc Gruppe: $620,19 \pm 68,21$ TGF β -1-positive Zellen/mm² vs. Fc-Gruppe: $1098,31 \pm 32,1$ TGF β -1-positive Zellen/mm², $p < 0.001$). Eine Quantifizierung der durch die Trichromfärbung angefärbten grünen kollagenreichen Areale im Infarktgebiet ergab eine Verminderung der Expression von Kollagen durch eine Behandlung mit mGrem1-Fc im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 3.29 Mitte, mGrem1-Fc Gruppe: $5,10 \pm 1,04$ Kollagenfläche [%]/Infarktfläche vs. Fc-Gruppe: $7,49 \pm 0,96$ Kollagenfläche [%]/Infarktfläche, $p < 0.05$). Bei der Quantifizierung der MIF-positiven Zellen/mm² konnte ebenfalls eine Reduzierung der Expression von MIF im Infarktbereich der mGrem1-Fc behandelten Versuchstiere im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Abb. 3.30 Rechts, mGrem1-Fc Gruppe: $858,17 \pm 133,96$ MIF-positive Zellen/mm² vs. Fc-Gruppe: $1338,97 \pm 42,91$ MIF-positive Zellen/mm², $p < 0.01$).

4. Diskussion

Die Arteriosklerose stellt eine chronisch entzündliche Erkrankung dar, die in den letzten Jahrzehnten Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte war. Arteriosklerotische Prozesse sind die häufigste Ursache einer ischämischen Herzerkrankung. Die Hyperlipidämie stellt einen wesentlichen begünstigenden Faktor der Arteriosklerose dar, der zu vermehrten Oxidationsprozessen und Lipidablagerungen in der Gefäßwand führt. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung von Endothelzellen, einhergehend mit einer endothelialen Dysfunktion. Diese endothelialen Zelldefekte fördern die Adhäsion von Leukozyten an das geschädigte Endothel und von aktivierten Plättchen. Zusätzlich fördert die endotheliale Dysfunktion die Permeabilität der Blutgefäße für Lipidbestandteile des Plasmas, wie das „Low-density Lipoprotein - (LDL)“⁶⁴. In der fortschreitenden Atherogenese werden Monozyten in die Intima und Subintima rekrutiert, wo sich Lipide ablagern und über Scavenger-Rezeptoren in die mononukleären Zellen aufgenommen werden und so die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen und Schaumzellen fördern. Daraus bilden sich fettreiche Ablagerungen aus („fatty streaks“) und es kommt zur Rekrutierung von glatten Muskelzellen. Daraus bilden sich Plaques, welche im weiteren Verlauf aus apoptotischen Makrophagen, Matrixproteinen und einer Schicht aus glatten Muskelzellen bestehen. Durch nekrotische Prozesse, ausgehend vom Kern der fibrösen Plaquestrukturen, sowie Abbau der Matrixproteine durch Proteasen, kommt es zu einer Erosion und zum Ausdünnen der stabilen Kappe. Dies resultiert schließlich in einer Ruptur des Plaques, einer Aktivierung des Gerinnungssystems und einer Thrombose der betroffenen Arterie, wodurch es zum Verschluss des Gefäßes kommt. Die Folge ist ein akuter Myokardinfarkt^{34, 184}.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von Grem1 und seine Interaktion mit MIF und TGFβ-1 im kardiovaskulären System untersucht. Im ersten Teil wurde dabei der Fokus auf arteriosklerotische Prozesse gelegt, die durch die Wechselwirkung der Proteine Grem1 und MIF beeinflusst werden. Im zweiten Teil lag der Schwerpunkt auf der Interaktion von Grem1 und TGFβ-1 im akuten Myokardinfarkt. Die Charakterisierung erfolgte dabei sowohl unter *in vitro* Bedingungen, als auch unter Verwendung von murinen *in vivo* Tiermodellen (Arteriosklerose-Modell (ApoE^{-/-}), Infarktmodell (transiente LAD-Ligatur)). Die Wirkung von Grem1 wurde *in vitro* mit Hilfe von rekombinantem Grem1 untersucht. Da Grem1 aber eine geringe Stabilität aufweist, wurde zur Analyse der Grem1-Funktion *in vivo* ein stabileres Fusionsprotein verwendet, das von unserer Arbeitsgruppe im Vorfeld entworfen, kloniert und produziert worden war, nämlich mGrem1-Fc. Dabei konnten wir für mGrem1-Fc *in vitro* eine ähnliche Funktionalität wie für Grem1 nachweisen.

4.1 Die molekulare Interaktion von Grem1 und MIF unter *in vitro* Bedingungen in mononukleären Zellen des kardiovaskulären Systems

Grem1 ist ein zur „Cystein Knot“- Superfamilie gehörendes Protein, welches im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen bisher kaum untersucht wurde. Im Rahmen arteriosklerotischen Prozesse wurde Grem1 bisher nachgewiesen ,in murinen und humanen Gefäßen des arteriellen Systems, die erhöhten Flussbedingungen ausgesetzt waren²³. Des Weiteren wird Grem1 von Tumor- und aktivierten Endothelzellen exprimiert und sekretiert^{125, 162}. Innerhalb der *in vitro* Charakterisierung konnte Grem1 in allen mononukleären humanen Zellen sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.1 a1+a2), die in Zusammenhang mit der Atherogenese stehen^{125, 184}. Interessanterweise war Grem1 dabei in allen Formen der monozytären Transformation, beginnend von den Monozyten, über die Makrophagen und in Schaumzellen nachweisbar. In Endothelzellen, sowie den monozytären Zellformen war Grem1 in zwei Isoformen zu beobachten, die bereits von Topol et al.¹⁷⁴ mit einer Größe von 23 und 28 kDa beschrieben wurden. Eine Expression von Grem1 in Plättchen war bisher nicht bekannt, zudem war im Westernblot eine dritte Bande bei einer Höhe von 25 kDa detektierbar. Dabei könnte es sich um eine bisher nicht beschriebene Isoform von Grem1 handeln, welche möglicherweise durch posttranslationale Modifikationsprozesse gebildet wird. Auch für andere Proteine wie den „Stromal cell derived factor-1 α – (SDF-1 α)“ konnte eine durch Thrombin induzierte *de novo* Synthese in humanen Plättchen nachgewiesen werden⁷², was zeigt, dass Plättchen das Vermögen für posttranslationale Modifikationen auch ohne das Vorhandensein eines Zellkerns inne haben. Der Nachweis einer Expression von MIF war auch in allen untersuchten Zellklassen auf Proteinebene möglich (siehe Abb. 3.1 b1). Dabei ist die Expression von MIF im Kontext von Monozyten und Makrophagen bereits eingehend beschrieben^{16, 147}. Von Endothelzellen und Plättchen ist die diesbezügliche Eigenschaft MIF exprimieren zu können ebenfalls bekannt^{149, 166}.

Auch unter *in vivo* Bedingungen im Plauegewebe von ApoE^{-/-} Mäusen konnte durch die immunhistochemische Untersuchung nachgewiesen werden, dass es zu einer vermehrten Expression von Grem1 kommt (siehe Abb. 3.2). Dabei war durch die parallele Färbung der gleichen Areale innerhalb des Plauegewebes eine nähere Zuweisung der vorangigen Expressionsquelle durch die Verwendung des Monozyten und Makrophagen Markers CD68 möglich. Dies ergänzt die bereits in den *in vitro* Daten erhobene These, dass Grem1 vermehrt von Monozyten und Makrophagen exprimiert werden kann in endothelialen Läsionsbereichen innerhalb des Plauegewebes (siehe Abb 3.1 a1+a2). Dies lässt sich auch durch die Arbeit von Chang et al.²³ belegen, in der beobachtet werden konnte, dass

auch benachbarte Gewebestrukturen wie Arterien Quelle einer gesteigerten Grem1 Expression sind. Durch die Immunhistochemie wurden auch die MIF und TNF- α in den gleichen Plaque-Arealen nachgewiesen. Die MIF-induzierte Aktivierung von Makrophagen zur Produktion von Cytokinen wie TNF- α ist bereits in Verbindung mit MIF als proinflammatorischen Faktor bekannt^{10, 19, 20}. Die Theorie einer mit arteriosklerotischen bzw. inflammatorischen Prozessen zusammenhängende Expression von Grem1, CD68, MIF und TNF- α wird auch bestärkt durch die Tatsache, dass es im Gewebe von C57BL/6J-Mäusen zu keiner relevant erhöhten Expression dieser Proteine kam (siehe Abb. 3.2 WT).

Um zu verifizieren, ob Grem1 auf molekularer Ebene in der Lage ist MIF zu binden, wurde eine Koimmunpräzipitation in HAECs durchgeführt, da bereits auf Proteinebene beide Proteine in diesem Zelltyp nachgewiesen werden konnten. Damit konnte gezeigt werden, das Grem1 das Vermögen besitzt MIF zu binden (siehe Abb 3.3 B). Die molekulare Interaktion zwischen Grem1 und MIF wird zudem gestützt durch die innerhalb einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Simmet erhobenen Bindungsstudien, welche eine hohe Bindungsaffinität von Grem1 an MIF ($K_D=54$ nM) aufzeigt haben¹¹⁹. In diesem Zusammenhang ist von Grem1 bereits bekannt, dass es eine Reihe von Proteinen mit hoher Affinität binden und ihre Signalwege beeinflussen kann. Dazu gehört beispielsweise die Bindung von sekretiertem Grem1 an BMPs, wodurch deren Ligand-Rezeptorinteraktion inhibiert wird und nachfolgende Signalwege antagonisiert werden¹¹⁰. Des Weiteren ist Grem1 auch als proangiogener Faktor charakterisiert, der an den VEGFR2 bindet^{103, 113, 163}. Für die molekulare Interaktion von Grem1 und seiner Bindungsfähigkeit an MIF war der Nachweis einer Interaktion beider Proteine darüber hinaus auch im atherosklerotischen Plauegewebe durch eine Kolokalisierung möglich (siehe Abb. 3.3 B). Als Quelle der verstärkten kolokalisierten Expressionsmuster von Grem1 und MIF konnten dabei Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen ausgemacht werden (siehe Abb. 3.4).

Da vor allem Monozyten eine in der Arteriosklerose bedeutende Rolle für das Fortschreiten der unterschiedlichen Stufen der Plaquebildung spielen, wurde getestet, ob es zu einer Induktion der Grem1 Produktion und Sekretion aus Monozyten kommen würde. Da es während des gesamten progressiven Verlaufs der Arteriosklerose zum Einwandern von Monozyten in die unterschiedlichen Stufen der Plaques kommt¹⁶⁹ und die Kolokalisierung der Expression von Grem1 und MIF in Monozyten nachweisbar war, war die Interaktion von Grem1 und MIF in diesen Zellen eine entscheidende Fragestellung in der hier vorliegenden Arbeit.

Bisher war die Induktion der Hochregulation von Grem1 unter anderem bekannt aus renalen Perizyten, welche erhöhten Konzentrationen an Glucose ausgesetzt waren ^{79, 95}. Außerdem konnte eine Induktion der transkriptionellen und Proteinexpression von Grem1 durch TGFβ nachgewiesen werden ⁴⁵ und Grem1 konnte reversibel die Expression von TGFβ-2 in trabekulären Maschenwerkszellen induzieren ¹⁵⁷. Um im arteriosklerotischen Kontext das Cytokin bzw. Chemokin Milieu nachzubilden, in dem inflammatorische Prozesse unter *in vitro* Bedingungen ablaufen können, wurden für die Monozytenstimulierung Proteine gewählt wie LPS, MCP-1, oxLDL, SDF-1, IL1-β, TNF-α oder INF-γ ^{65, 97}, welche möglicherweise einen Einfluss auf die Induktion der Grem1 Sekretion und Expression haben könnten. Dabei zeigte sich in einer ersten Testreihe, dass die Freisetzung und Expression von Grem1 durch eine Stimulierung der Monozyten mit LPS nicht induzierbar war (siehe Abb. 3.5). Da es sich bei arteriosklerotischen Prozessen um ein Wechselspiel zwischen verschiedenen Signalwegen handelt und LPS als Stimulator eher das inflammatorische Milieu nachbildet, indem Monozyten in einer bakteriellen Infektion an einer Abwehr durch das Immunsystem über die TLR-4 (Toll-Like Rezeptor-4) und das Komplementsystem (Komplementprotein C5a und Komplementrezeptor C5aR) teilhaben ¹⁵⁶, wurden Stimulatoren wie MCP-1, oxLDL, SDF-1, IL1-β, TNF-α oder INF-γ in diesem Zusammenhang als mögliche Induktoren einer Grem1 Freisetzung und Expression aus Monozyten evaluiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass oxLDL sowie SDF-1 einen Einfluss auf die Grem1 Freisetzung nach 24h haben. Die intrazelluläre Expression von Grem1 blieb aber unverändert (siehe Abb. 3.6). SDF-1 steuert zahlreiche Prozesse wie die Chemotaxis von mononukleären Zellen während der Gewebemöostase und Inflammation ¹⁰⁰. Zudem wird SDF-1 in atherosklerotischen Gefäßabschnitten und in Makrophagen sowie glatten Muskelzellen vermehrt produziert ^{1, 57}. Für Grem1 ist die Beeinflussung der Inhibition einer SDF-1 induzierten Migration von Monozyten bereits von Chen et al. ²⁵ publiziert. Da auch eine verstärkte Freisetzung an Grem1 durch oxLDL zu beobachten war, ist insbesondere interessant im Kontext der Differenzierung von Makrophagen zu Schaumzellen über die Aufnahme von oxLDL über Scv-Rezeptoren ¹⁹², da Grem1 auch in anderen Zellarten wie Tumorzellen oder glatten Muskelzellen die Proliferation dieser Zellen beeinflussen kann ^{83, 102, 162}. Ob Grem1 einen Einfluss auf die Differenzierungsfähigkeit von Monozyten über Makrophagen zu Schaumzellen hat, wird später Thema dieser Diskussion sein. Bei der Interaktion von Grem1 mit MIF sollte auch eine mögliche Beeinflussung der Freisetzung von MIF aus Monozyten durch Grem1 geklärt werden. Monozyten und Makrophagen weisen ein natürliches Vermögen auf, MIF zu exprimieren und sekretieren ¹⁷³. Die Sekretion und Expression in diesen Zellen wird hochreguliert durch den Einfluss von LPS, TNF-α, INF-γ, ATII, oxLDL, Hypoxie oder Glukocortikoiden ^{16, 19-21, 147}. Dabei entsprach in unseren Experimenten zeitlichen Verlauf die Beeinflussung der Sekretion an MIF durch LPS aus Monozyten den

etablierten Literaturangaben (siehe Abb 3.7 A). Ein entsprechendes Vermögen von Grem1, eine Freisetzung von MIF aus Monozyten regulieren zu können, war dabei nicht nachweisbar (siehe Abb. 3.7 B). Da die molekulare Interaktion von Grem1 mit MIF, keinen Einfluss auf das Sekretionsvermögen der Monozyten zu haben scheint, wurden verschiedene Assays ausgewählt, um die Interaktionsebene der beiden Proteine besser charakterisieren zu können.

Daher wurde anhand einer *in vitro* Testreihe im Flusskammermodell und im Migrationsmodells (Neuroprobe Chamber) anhand einer für MIF klassischen Rolle in der Beeinflussung der Rekrutierung und der Adhärenzverhaltens von Monozyten als CLF Chemokin ¹⁷³ diese molekulare Interaktion mit Grem1 studiert. MIF kann den Arrest von Monozyten, neutrophilen Granulozyten sowie T-Zellen auf einer endothelialen Oberfläche induzieren, durch eine Aktivierung der leukozytären Integrine LFA-1 und VLA-4 ⁹. Die zugehörigen Bindungspartner der Integrine, die endothelialen Rezeptoren ICAM-1 und VCAM-1, werden hierbei ebenfalls über eine MIF-abhängige Induktion hochreguliert ³. An diesen Signalwegen ist ein Rezeptorkomplex aus CXCR2, CXCR4 und dem Corezeptor CD74 beteiligt ⁹. Alle drei Rezeptoren werden dabei sowohl von Monozyten ^{75, 105, 122, 168}, als auch von Endothelzellen exprimiert ^{63, 121}, wobei die endotheliale CD74 Expression nur unter inflammatorischen Bedingungen induziert wird ¹⁶⁵. Von Grem1 wurde bisher in einer Arbeit ²⁵ gezeigt, dass es als negativer Regulator der SDF-1 α induzierten Migration von Monozyten auftritt. Dabei ist diese Wirkung zurückzuführen auf eine Interaktion von Grem1 mit den Proteinen Slit 1 und Slit 2, welche als sekretierte Glycoproteine an die „ROBO - (Roundabout)“-Rezeptoren binden ⁶⁹. Das Slit-Robo Signalling ist in diesem Zusammenhang vor allem aus dem Nervensystem bekannt, aus der Beeinflussung der Axonlenkung ⁴³. Es spielt aber auch eine Rolle bei dynamischen Prozessen im Zytoskellet, sowie bei der Synthese von Proteinen ^{56, 62}. Im dynamischen Flusskammermodell konnte aufgezeigt werden, dass durch eine Vorbehandlung des Endothels mit MIF eine Steigerung der Anzahl der semi-adhärenten und adhärennten MM6 Zellen besteht (siehe Abb. 3.8). Dies korreliert mit den Daten von Weber et al. ¹⁸³, in dessen Arbeit durch das gezielte Einfügen einer Doppelmutation in die N-terminale Sequenz von MIF sein Vermögen gezielt herabgesetzt wird, eine Rekrutierung von Leukozyten auszulösen. Des Weiteren konnte durch die zusätzliche Vorbehandlung des Endothels mit Grem1 und MIF die Zahl der adhärennten sowie semiadhärennten MM6 Zellen signifikant (**=p<0.01) im Vergleich zu einer Vorbehandlung mit MIF herabgesetzt werden. Der zugrunde liegende Mechanismus für den durch MIF ausgelösten Arrest von Monozyten auf einer endothelialen Oberfläche steht in Verbindung mit dem bereits beschriebenen Vermögen von MIF, Integrine in Leukozyten zu induzieren. In der Arbeit von Bernhagen et al. ⁹ konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt

von MIF auf der Oberfläche von arteriellen endothelialen Zellen ebenfalls einen Arrest der monozytären MM6 Zellen bewirkt. Die Induktion der Integrine über die G-Protein gekoppelten Rezeptoren CXCR2 und CXCR4 bewirkt 3 Hauptsignalwege in der Aktivierung¹⁷³. Über die Phospholipase C kommt es zu einem Calciuminflux, des Weiteren sind an der Integrinaktivierung kleine GTP-asen beteiligt, sowie die Aktin-bindenden Proteine wie Talin-1 und Kindlin-3^{91, 94, 114}. Der zugehörige endotheliale Arrest erklärt sich in diesem Zusammenhang auch durch eine MIF abhängige Verstärkung der Oberflächenexpression von VCAM-1 und ICAM-1 auf den Endothelzellen¹⁹⁴. Die Untersuchung der chemotaktischen Potentiale von Grem1 und MIF in Migrationsstudien ergab, dass MIF in der unteren Kammer einen starken promigratorischen Effekt auf humane Monozyten hat im Modell der 48-well Neuroprobe Chamber (siehe Abb. 3.9). Dieser Effekt wurde auch von Bernhagen et al.⁹ beobachtet, in dessen Studie MIF in der unteren Kammer die Transmigration von humanen Monozyten im Transwell-System induzierte. Der gleiche Effekt der MIF-induzierten Transmigration konnte in der Studie durch die Verwendung eines MIF neutralisierenden Antikörpers aufgehoben werden. Wie schon im Flusskammermodell gezeigt, konnte Grem1 der durch MIF-induzierten Chemotaxis der Monozyten entgegenwirken, da die Anzahl der migrierten Zellen signifikant (*=p<0.05) im Vergleich zur alleinigen Stimulierung der Zellen mit MIF inhibiert werden konnte. Die inhibitorische Wirkung von Grem1 auf die Migration von Monozyten wird auch durch die Studie von Chen et al.²⁵ gestützt, in der Grem1 die SDF-1 abhängige Migration von Monozyten im Zusammenspiel mit den Proteinen Slit 1 und Slit 2 inhibiert.

4.2 Der Einfluss des Proteins mGrem1-Fc auf atherogene Prozesse

Die Produktion des Fusionsproteins mGrem1-Fc mit Hilfe des CHO flip in Systems stellt eine Möglichkeit dar, ein biopharmazeutisch wirksames Protein zu generieren das innerhalb einer Säugetierzelllinie adequat gefaltet wird, das es im humanen und murinen System unter *in vitro* und *in vivo* Bedingungen auf seine Funktionalität hin getestet werden kann. Nur unter diesen Bedingungen ist eine Biokompatibilität der produzierten Fusionsproteine für die Anwendung in murinen Tiermodellen gewährleistet. Die Qualität der produzierten Chargen des Proteins wurden dabei durch den Nachweis im Westernblot getestet anhand ihrer molekularen Größe, um auszuschließen dass eine Anwendung des Proteins in einer möglicherweise bereits abgebauten Form vorgenommen werden könnte (siehe Abb. 3.11). In der wirkstoffbasierten Arzneimitteltherapie wird dabei seit den 1980er Jahren die Wirkstoffklasse der „Biologicals“ angewendet. Zur Klasse dieser angewendeten Biopharmazeutika zählen eine Reihe von unterschiedlichen Substanzen wie therapeutische Antikörper und deren Derivate, Hormone, Nukleinsäuren, Wachstumsfaktoren sowie Rezeptoren¹⁸⁰. Ein Beispiel für diese Wirkstoffklasse stellt z.B ein Antikörper dar der an ein

Cytokin gekoppelt ist, welches gegen das im Mammakarzinom auftretende Onkogen HER2/neu gerichtet ist⁶⁷. Auch in der Studie von Reiners et al.¹³⁹ zeigt sich, dass durch die gezielte Therapie mit einem Toxin welches gegen das entsprechende Autoantigen gerichtet ist spezifisch B-Zell Hybridome angegriffen können. So lässt sich durch den Einsatz von Biologicals eine zielgerichtete Therapie gegen bestimmte molekulare Strukturen richten. Auch im kardiovaskulären Bereich konnte durch die Arbeit von Ziegler et al.¹⁹⁷ gezeigt werden, dass durch die Anwendung eines Fusionsproteins im myokardialen murinen Infarktmodell sich die kardiale Funktion bewahren lässt und gezielt Reperaturmechanismen anregen lassen. Das dabei verwendete Fusionsprotein bestand aus den Komponenten SDF-1 und dem Glykoprotein VI. SDF-1 bindet dabei an seine Zielstruktur den Rezeptor CXCR4, und das Glykoprotein VI bindet an extrazelluläre Matrixkomponenten wie Kollagen. Durch den im Konstrukt ebenfalls enthaltenen Fc-Immunglobulin-Anteil, konnte das Protein über die an Protein-G gekoppelte Aufreinigung mittels der Agarose aus dem Überstand aufgereinigt werden. Durch den Einsatz des SDF1-GPVI konnte gezielt die Chemotaxis von CXCR-4 positiven Zellen und die endotheliale Ausdifferenzierung von Vorläuferzellen unter *in vitro* Bedingungen angeregt werden. In der medizinischen Doktorarbeit von Stang et al.¹⁶⁴ wurde eine stabil das Konstrukt mGrem1-Fc produzierende CHO-Zelllinie generiert und für die hier vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Funktionell weist das mGrem1-Fc zwei wichtige sequentielle Strukturen auf. Zum einen das IgK Signalpeptid welches, die Sezernierung des produzierten Konstrukts in den Überstand steuert. Zum anderen den Fc-Immunglobulin-Anteil über welches das Fusionsprotein gekoppelt an Protein-G Agarose aufgereinigt werden kann. Die funktionelle Kopplung des Proteins an ein humanes Fc-Immunglobulin bringt einen entscheidenden Vorteil hinsichtlich der Stabilität des Konstrukts sowie des pharmakokinetischen Profils innerhalb der biologischen Verfügbarkeit bei einer *in vivo* Applikation in Mäusen¹⁵¹. Die Erhöhung der Serumhalbwertszeit durch die Kopplung an ein humanes Fc-Immunglobulin wurde auch für andere Fusionsproteine beschrieben^{36, 107, 193}.

Für eine Charakterisierung von inflammatorischen Vorgängen, die bei der Entstehung der Arteriosklerose eine Rolle spielen, sind Differenzierungsassays eine gute Möglichkeit, Aussagen darüber zu treffen, ob bestimmte Proteine die Makrophagen- und Schaumzellbildung beeinflussen. So wurde innerhalb einer *in vitro* Charakterisierung die Funktionalität des mGrem1-Fc getestet. Dabei wurde im experimentellen Versuchsdesign im Schaumzell-Assay das Vermögen von MIF, Grem1 und mGrem1-Fc untersucht, die murine und humane Schaumzellbildung zu verändern. Außerdem wurde die MIF-induzierte TNF- α -Sekretion aus Makrophagen im ELISA gemessen, da es als MIF induziertes Cytokin bereits aus der Literatur hinreichend beschrieben wurde¹³¹. Im humanen Schaumzell-Assay zeigt

sich, dass MIF die Makrophagen- und Schaumzellbildung signifikant steigert (siehe Abb. 3.12 A+B). Durch den Einsatz eines neutralisierenden MIF Antiköpers wird die Ausbildung von Schaumzellen stark inhibiert, was darauf hinweist, dass es sich um einen MIF-abhängiger Prozess handelt. Dies stützt sich auf die bereits bekannten Daten der Beeinflussung der Rekrutierung von Monozyten in den Bereich von arteriosklerotischen Läsionen und der verstärkten Ausdifferenzierung zu Makrophagen durch MIF ¹⁹⁴. Des Weiteren ist bekannt, dass MIF die Aufnahme von oxLDL in Makrophagen fördert, was ebenfalls zu einer verstärkten Schaumzellbildung führt ⁵. Auch von glatten Muskelzellen (vascular smooth muscle cells – (VSMC)) ist in der Arbeit von Chen et al. ²⁶ aufgezeigt worden, dass oxLDL die Expression von MIF induziert was, zur Pathogenese der Arteriosklerose beitragen könnte. Welche Auswirkungen dagegen Grem1 auf die Makrophagen und Schaumzellbildung hat, ist bisher unbekannt. Grem1 fördert die Migration, Proliferation und Apoptose von VSMC ^{101, 102}. Des Weiteren beeinflusst Grem1 die Proliferation von myogenen Vorläuferzellen ⁵⁴ und Tumorzellen ¹⁶². Durch eine Behandlung der Zellen im humanen Schaumzell-Assay mit Grem1 und dem Fusionsprotein mGrem1-Fc konnte die MIF angeregte Schaumzellbildung in einem Kostimulierungsansatz signifikant inhibiert werden. Durch eine Analyse der Überstände, konnte zudem gezeigt werden, dass mGrem1-Fc im Stande ist die MIF induzierte TNF- α Sekretion aus Schaumzellen signifikant zu inhibieren (siehe Abb. 3.12 B). Dies wird auch durch die Studie von Müller et al. ¹¹⁹ gestützt, in der die MIF induzierte Freisetzung von TNF- α aus humanen Makrohagen durch eine Interaktion von MIF mit Grem1 inhibiert wurde. Eine weitere Untersuchung der molekularen Interaktion von Grem1 und MIF im murinen System unter *in vitro* Bedingungen sollte analysieren, ob eine MIF Deletion (MIF^{-/-}) in Monozyten im Vergleich zu isolierten Monozyten einer C57BL/6J (MIF^{+/+}) Wildtypmaus eine veränderte Ausdifferenzierungsfähigkeit der Zellen zu Schaumzellen ergeben würde. Die MIF defizienten Monozyten waren nicht zur Ausdifferenzierung in Makrophagen oder in Schaumzellen fähig. Dagegen konnte durch eine Stimulierung der murinen Monozyten (MIF^{+/+}) mit MIF die Schaumzellbildung stark angeregt werden (siehe Abb. 3.13). Diese Feststellungen korrelieren mit bereits erhobenen *in vivo* Daten, die zeigen, dass es in MIF defizienten Mäusen zu reduzierten endothelialen Läsionsbereichen, geringerer Zellproliferation und vermindertem Anteil an Makrophagen im Plauegewebe kommt ^{132, 178}. Durch die Verwendung eines neutralisierenden Anti-MIF Antikörpers wurde die Schaumzellbildung ebenfalls fast komplett unterdrückt. Dies stützt sich auf die Studie von Schober et al. ¹⁴⁹, in der in ApoE defizienten Mäusen durch die Anwendung eines MIF blockierenden Antikörpers es zu einer Reduzierung des Makrophagenanteils kommt. Dabei konnte die durch MIF induzierte Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen und Schaumzellen durch eine gleichzeitige Behandlung der Zellen mit Grem1 oder mGrem1-Fc

signifikant unterdrückt ($p < 0.05$) werden. Durch eine weiterführende Charakterisierung der Anwendung des Fusionsproteins mGrem1-Fc und des Kontrollproteins IgK-Fc im Krankheitsmodell der Arteriosklerose in ApoE^{-/-} Mäusen konnte gezeigt werden, dass es durch die Behandlung mit dem mGrem1-Fc Fusionsproteins zu einer signifikanten Reduktion der TNF- α Expression im Plauegewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe kommt (siehe Abb 3.15). Damit scheint mGrem1-Fc auch *in vivo*, die MIF induzierte TNF- α Freisetzung aus Zellen im Plauegewebe zu inhibieren. In einer Studie von Burger-Kentischer et al.¹⁵ konnte ebenfalls in ApoE^{-/-} Mäusen durch die Behandlung mit einem MIF blockierenden Antikörper, die arterielle Expression von proinflammatorischen Markern wie TNF- α , Interleukin 12 oder ICAM-1 reduziert werden. Des Weiteren konnte durch eine Behandlung mit mGrem1-Fc der Anteil an Monozyten/Makrophagen im arteriosklerotischen Läsionsbereich im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert werden (siehe Abb. 3.16). Zusammenfassend konnte dargestellt werden, dass das Fusionsprotein mGrem1-Fc einen Einfluss hat auf das Ausdifferenzierungsvermögen von Monozyten zu Makrophagen und Schaumzellen und die Chemotaxis bzw. Migration von Monozyten ebenfalls beeinflusst unter *in vitro* Bedingungen. In einer *in vivo* Anwendung des Fusionsproteins mGrem1-Fc konnte der Anteil von Makrophagen im Plauegewebe und die Expression des inflammatorischen Cytokins TNF- α signifikant reduziert werden. Sowohl die *in vitro* als auch *in vivo* Wirkungen des Fusionsproteins mGrem1-Fc sind auf eine Antagonisierung MIF-abhängiger Prozesse zurückzuführen (siehe auch¹¹⁹).

4.3 Die molekulare Interaktion von Grem1 und TGF β -1 in Prozessen des myokardialen Infarkts

Der primäre Grund für ischämische kardiovaskuläre Ereignisse ist die Arteriosklerose. Dabei erreicht die Progression dieser Erkrankung ihren Endpunkt, wenn es durch eine Plaqueruptur zu einem Gefäßverschluss kommt, was einen Herzinfarktes nach sich zieht. Da die in dieser Arbeit bisher dargestellten Daten auf eine Interaktion von Grem1 mit MIF in arteriosklerotischen schliessen lassen¹¹⁹, sollte verifiziert werden, ob Grem1 im Myokardinfarkt einer Rolle spielt. Für die an eine Ischämie, akuten und chronischen Inflammation sich anschließenden Vorgänge ist dabei die Fibrose ein zentraler Prozess für die weitergehende myokardiale Funktion und Prognose⁹³. Die Beteiligung von Grem1 ist bereits für eine Reihe von chronisch fibrotischen Erkrankungen beschrieben, wie beispielsweise die diabetische Nephropathie⁴⁶ oder in Organen wie Herz¹¹⁶ und Lunge⁸⁵ beschrieben. In der hier vorliegenden Arbeit konnte ein Nachweis erbracht werden, dass Grem1 im Myokard 48h und 7d nach transienter Ischämie im murinen Modell der im Vergleich zu nicht ischämischen Kontrollgewebe signifikant hochreguliert wird (siehe Abb. 3.17 und 3.18 A). So ist aus der Literatur bisher eine Induktion der Expression von Grem1

bekannt durch ein extrazellulär erhöhtes Milieu an Glukose, mechanischen Druck und durch eine Einwirkung von TGF β ¹⁸⁹. Andere proinflammatorische Cytokine wie z.B TNF- α , IL-1 oder IL-6 sind nicht konstitutiv exprimiert im Herzen unter nicht ischämischen Bedingungen ^{80, 81}. Die Hochregulation und Produktion dieser Cytokine ist die Folge einer myokardialen Schädigung und tritt im Rahmen einer Stressantwort auf ¹⁰⁴. Für diese Cytokine konnte in Nagermodellen gezeigt werden, dass auf mRNA Ebene eine bis zu 50-fache Expression als im Vergleich zum Nicht-Infarktbereichs des Myokards, wo ein 15-facher Anstieg zu beobachten war ^{40, 76}. Für diese starke Hochregulierung dieser Cytokine ist im Verlauf der post Infarkt Phase zu sehen, dass sie wieder auf ihren Grundwert zurückgeht im Falle eines kleinen Infarkts. Dabei kann wenn die Stärke des Infarkts entsprechend groß war, eine verlängerte Hochregulation der Cytokine messbar sein oder es folgt eine zweite Phase des Anstiegs der Cytokine im Infarktbereich, auch abhängig von der entsprechenden Remodelling Prozessen. Ein zweiter Anstieg der Cytokine kann sich auf die angrenzenden Nicht-Infarktbereiche ausweiten, wodurch es auch zu Remodelling-Prozessen im nicht infizierten Myokard kommen kann ^{76, 126, 130}.

In der Literatur gibt es bezüglich einer Interaktion von Grem1 und TGF β -1 in verschiedenen Krankheitsmodellen bereits erste Hinweise. So konnte in der diabetischen Nephropathie bereits in Bereichen des Tubulus mit fibrotischen Prozessen eine Koexpression von TGF β und Grem1 nachgewiesen werden ⁴⁶. Des Weiteren reguliert Grem1 in trabukulären Maschenwerkszellen TGF β -abhängigen Signalwege über die eine Expression von verschiedenen Extrazellulären Matrixproteinen gesteuert wird ¹⁵⁷. Es konnte verifiziert werden, dass TGF β -1 auch im Myokard unter ischämischen Bedingungen verstärkt exprimiert wird, nämlich nach 48h und 7d im Modell der transienten Ligatur der LAD (siehe Abb 3.18 B). Dies korreliert mit bereits veröffentlichten Daten aus experimentellen Modellen des myokardialen Infarkts, in denen TGF β hochreguliert wird. Dabei zeigen die drei Isoformen von TGF β bestimmte Muster in ihrer Expression im Infarkt. So kommt es zu einer verstärkten Induktion von TGF β -1 und TGF β -2 in einer frühen Phase nach einem Infarkt, wohingegen TGF β -3 eine verzögerte und verlängerte Hochregulierung aufweist ^{39, 42}. Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl Grem1 als auch TGF β -1 im Myokard nach transienter Ligatur der LAD verstärkt exprimiert werden. Ob eine Bindung von Grem1 an TGF β -1 möglich ist, konnte in der vorliegenden Arbeit durch eine Koimmunpräzipitation nachgewiesen werden, da es unter *in vitro* Bedingungen zu einer molekularen Interaktion zwischen Grem1 und TGF β 1 in Endothelzellen (HAEC) kommt (siehe Abb. 3.19). Zusätzlich wird die Hypothese einer Bindungsfähigkeit von Grem1 an TGF β -1 gestützt durch die Kolokalisation beider Proteine in der konfokalen Koimmunfluoreszenzmikroskopie in Fibroblasten (PMEF) (siehe Abb. 3.20). Unter *in vivo* Bedingungen konnte diese

Überlappung der Expression von TGF β -1 und Grem1 im Infarktbereich beobachtet werden (7d und 28d nach Myokardinfarkt). Als Kontrollegruppe dienten C57BL/6J Mäuse (Kein Myokardinfarkt), wo beide Proteine nur sehr schwach exprimiert wurden (siehe Abb. 3.21).

4.4 Der Einfluss von mGrem1-Fc auf myokardiale Prozesse post Infarkt

An einem Myokardinfarkt schließen sich inflammatorische Prozesse an, welche in Heilungsprozesse zur Ausbildung einer Infarkt Narbe führen^{49, 142}. Dabei sind diese Remodelling-Prozesse in drei Phasen gegliedert. In der inflammatorischen ersten Phase, kommt es durch die Ischämie zum Absterben von Kardiomyozyten und durch die Hypoxie zu einer Freisetzung von freien Radikalen. Des Weiteren werden verschiedene Signalwege aktiviert (Komplementkaskade, NF- κ B, TLRs), welche zur Induktion von Chemokinen und Cytokinen führen, die wiederum die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen und Leukozyten fördern¹⁴. Dies fördert die Rekrutierung von inflammatorischen Zellen in den Bereich des myokardialen Infarkts¹³⁴. Zu den unterschiedlichen Zellen, die einwandern, zählen Monozyten, Lymphozyten sowie polymorphnukleäre Zellen. Daraufhin wird der Infarktbereich von neutrophilen Zellen und Makrophagen von toten Zellen und nekrotischen Zellresten gesäubert. In der darauf anschließenden proliferativen Phase kommt es zunächst zur Unterdrückung der Expression von inflammatorischen Chemokinen und Cytokinen und zur verstärkten Einwanderung von Fibroblasten und Endothelzellen in den Bereich des Infarkts^{14, 53}. In diesem Zusammenhang stellt TGF β -1 ein wichtiges Protein dar, dass die Entwicklung einer Fibrose im kardialen Gewebe steuert⁹⁸. Zum einem steuert TGF β -1 anfänglich die Migration von neutrophilen Zellen, Monozyten und Fibroblasten in den Infarktbereich, zum anderen fördert es die Expression von Extrazellulären Matrixproteinen (EZM)¹⁴¹. So hemmt TGF β die Aktivität von Proteasen welche EZM abbauen, durch die TGF β induzierte Inhibierung der Matrixmetalloproteasen Expression und Synthese von Proteaseinhibitoren, wie des „Plasminogen Activator Inhibitor-1 – (PAI-1)“ und des „Tissue Inhibitors of Metalloproteinases – (TIMP)“¹⁴⁶. Dabei stehen die profibrotischen Vorgänge, welche durch TGF β induziert werden zum Teil in Verbindung mit einer Hochregulierung des „Connective Tissue Growth Factor – (CTGF)“^{37, 90}. Die Induktion der Synthese der EZM und des TIMP sind dabei abhängig von der Aktivierung des Smad3 Signalwegs^{44, 177}. Dabei wird im Herzen TGF β -1 in der proliferativen Phase von kardialen Fibroblasten sekretiert⁸². Zusätzlich sind andere bekannte Quellen der Expression von TGF β -1 Makrophagen^{68, 88, 140} und Plättchen¹⁴. Die Lokalisierung der dominanten Expression von TGF β -1 findet sich vor allem in der Grenzfläche des Infarkts, wo Remodelling Prozesse verstärkt statt finden³⁷. Die Literatur gestützten Daten, welche eine Beteiligung von TGF β -1 an fibrotischen Abläufen aufzeigen, und die bereits dargestellten Feststellungen in der hier vorliegenden Arbeit gaben Anlass

dazu, eine mögliche Grem1/TGF β Interaktion für die kardiale Fibrose und Remodelling Prozesse in Betracht zu ziehen. Eine Interaktion beider Proteine konnte zudem nachgewiesen werden durch eine Oberflächenplasmonresonanz-Analyse, in der eine hohe Bindungsaffinität von Grem1 an TGF β -1 mit einem K_D Wert von 54 nm nachgewiesen werden konnte (siehe ¹¹⁸). In einer *in vitro* Studie konnte zusätzlich gezeigt werden, das murine Fusionsprotein mGrem1-Fc die TGF β -1 induzierte Sekretion und Expression an Col I in murinen Fibroblasten (PMEF) signifikant inhibiert (siehe Abb. 3.22). Dieser antifibrotische Effekt war auch im Zusammenhang mit humanen kardialen Fibroblasten (HCF) nachweisbar, da durch die Verwendung eines rekombinanten humanen Grem1 Proteins eine entsprechende TGF β -1 induzierte Col I Expression ebenfalls inhibiert werden konnte (siehe Abb 3.23). Dies stellt Grem1 in einem neuen Kontext dar, da die bisher publizierte Literatur für Grem1 eine eher profibrotische Wirkung nahelegt ^{11, 85, 109, 116, 144}. Dass TGF β -1 die Kollagenexpression steigert, ist bereits von humanen kardialen Fibroblasten ¹³³ und humanen dermalen Fibroblasten ³⁰ bekannt. Eine Inhibierung der Kollagenexpression auf mRNA Ebene konnte dagegen bisher in einem Tiermodell bei Ratten durch eine Antisense TGF β Behandlung erzielt werden ¹⁸⁷. Für die Induktion der TGF β -1 Expression ist eine Angiotensin II abhängige Aktivierung beschrieben ^{22, 66}, da durch eine Inhibierung dieser Signalwege durch ACE (Angiotensin Converting Enzym)-Hemmer wie Imidapril eine verminderte Kollagensynthese nachweisbar ist ¹⁸². Die Synthese von TGF β -1 erfolgt (siehe 1.3.2) zunächst in Form einen inaktiven Proteinkomplexes, wobei die TGF β Aktivität primär von der Freisetzung dieser inaktiven Form in ihre aktive Form abhängt, wodurch maximale zelluläre Antworten generiert werden können ^{4, 14}. Für eine Transformation dieser inaktiven Form von TGF β in seine aktive Form ist Thrombospondin (TSP)-1 verantwortlich, welches die nicht kovalente Verbindung zwischen TGF β und dem „Latency-associated Peptid – (LAP)“ spaltet ¹²³. Für eine Aktivierung von TGF β sind eine Reihe von Proteasen bekannt, wie Plasmin, Matrixmetalloprotease (MMP)-2 oder die MMP9, wodurch der Abbau der Matrixproteine mit der Aktivierung einer TGF β gesteuerten Aufrechterhaltung der Matrixsynthese einhergeht ⁷³. In der Arbeit von Tamminen et al. ¹⁷⁰ konnte ein möglicher Zusammenhang zwischen Grem1 und der Synthese der Vorläuferproteine von TGF β aufgezeigt werden, da Grem1 an die Fibrilline 1/2 binden kann. Die Fibrilline wiederum sind wichtige am Aufbau von elastischen Microfibrillen beteiligte Proteine, welche eine Rolle als Trägermoleküle bei der Synthese der Vorläuferproteine im Proteinaufbau von TGF β spielen ¹⁴⁸.

Für die im letzten Abschnitt beschriebenen Infiltrate konnte für Grem1 und TGF β -1 eine entsprechende Kolokalisierung vor Allem in den Infarktbereich eingewanderten Zellen beobachtet werden (siehe Abb 3.21). Dies korreliert auch mit den Daten (nicht gezeigt), die

in der Studie von Müller et al. ¹¹⁸ erhoben wurden und eine Kollokalisierung von TGF β -1 und Grem1 in inflammatorischen Zellinfiltraten aufzeigen. In einer *in vivo* Anwendung des rekombinanten mGrem1-Fc Fusionsproteins konnte verifiziert werden, dass es im 7d Modell der Ischämie/Reperfusion im Vergleich zur Kontrollgruppe die linksventrikuläre Herzfunktion verbessert (siehe Abb. 3.26). Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass die Infarktgröße ebenfalls durch die Behandlung mit dem Fusionsprotein mGrem1-Fc reduziert wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abb. 3.25). Dies bestätigt die bereits in den *in vitro* Studien erhobene Hypothese, dass Grem1 und auch das Fusionsprotein mGrem1-Fc eine antifibrotische Wirkung hat. Andere Fusionsproteine wie das SDF1-GPVI die in der Arbeitsgruppe von Prof. Gawaz entwickelt wurden konnten ebenfalls bereits im 28d andauernden Ischämie/Reperusionsmodell eine Verbesserung der linksventrikulären Herzfunktion und Reduktion der Infarktgröße bestätigen ¹⁹⁷. Zusätzlich konnte durch die Behandlung mit dem Fusionsprotein mGrem1-Fc eine im Vergleich zur Kontrollgruppe verminderte Anzahl an infiltrierten Zellen in den Bereich des Infarkts festgestellt werden (siehe Abb. 3.28). Außerdem war die durch die Masson-Goldner Färbung ermittelte Fläche der Kollagenexpression in der mit dem Fusionsprotein mGrem1-Fc behandelten Gruppe signifikant zur Kontrollgruppe geringer, was ebenfalls die antifibrotische Wirkung von mGrem1-Fc unter *in vivo* Bedingungen bei TGF β -1-abhängige Prozesse bestätigt (siehe Abb. 3.29 Mitte). Dies zeigt Grem1 als neuen Antagonisten von TGF β -1 und MIF, welcher in der Arteriosklerose und im Myokardinfarkt eine kardioprotektive Funktion aufweist. Es wurde bereits in anderen Studien die Inhibition von TGF β -1 nachgewiesen, wo ein löslicher TGF β Typ II Rezeptor produzierender Adenovirus verwendet wurde, der die Fibrose regulieren und nachweislich die linksventrikuläre Funktion in Mäusen aufrechterhalten konnte ^{74, 129}. In einem weiteren *in vivo* Modell konnte nachgewiesen werden, dass ein löslicher TGF β Typ II Rezeptor zusätzlich in der Lage war, die Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten zu inhibieren und die Proliferation von Fibroblasten zu unterdrücken ⁹⁶. Außerdem induziert TGF β die Transformation von Fibroblasten zu Myofibroblasten ³⁸. So scheint der antagonistische Effekt von Grem1 auf MIF und TGF β -1 eine kardioprotektive Wirkung zu haben. Grem1 stellt einen endogenen Antagonisten von MIF dar, der als protektiver Faktor die Plaquestabilität aufrecht erhält ¹¹⁹. So könnte Grem1 eine neue therapeutische Möglichkeit darstellen, um atherosklerotisch bedingte Plaqueinstabilitäten oder akute koronare oder cerevaskuläre Syndrome zu kontrollieren. Die Rolle von Grem1 als Antagonist von TGF β -1 bei der Regulation von myokardialer Fibrose und Remodelling-Prozessen im Zusammenhang des myokardialen Infarkts wurde ebenfalls evaluiert.

5 Zusammenfassung

In den letzten Jahren ist die kardiovaskuläre Grundlagenforschung immer mehr in den Fokus der medizinischen Forschung gerückt. Speziell die Arzneimittelklasse der „Biologicals“ zeigte bisher vielversprechende neue Behandlungsstrategien auf bei chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie der Rheumatoiden Arthritis oder Arteriosklerose. Für die *in vitro* und *in vivo* Anwendung sind hierbei die Klasse der Fusionsproteine eine neue innovative therapeutische Möglichkeit, eine gegen Zielstrukturen gerichtete Therapie im kardiovaskulären Bereich durchführen zu können. In der hier vorliegenden Arbeit konnte das bisher als BMP-Antagonist bekannte Protein Grem1 im Kontext der Arteriosklerose charakterisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass Grem1 von Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen speziell im Bereich von arteriosklerotischen Läsionsbereichen von ApoE^{-/-} Mäusen verstärkt exprimiert wird. Auch unter *in vitro* Bedingungen konnte eine Sekretion von Grem1 aus Monozyten nachgewiesen werden. Anhand der gezeigten Daten kann Grem1 als neuer endogener Antagonist von MIF beschrieben werden. So konnte nachgewiesen werden, dass es zu einer molekularen Interaktion zwischen MIF und Grem1 kommt. Diese Interaktion führte zu einer Inhibierung der Monozytendifferenzierung zu Schaumzellen, und reduzierte die MIF-induzierte TNF- α Sekretion aus Makrophagen. Das Fusionsprotein mGrem1-Fc konnte in einer *in vivo* Applikation den Anteil der Makrophagen im Plauegewebe von ApoE^{-/-} Mäusen signifikant reduzieren, sowie die TNF- α Expression in diesem Bereich als inflammatorischen Marker vermindern. Zusätzlich konnte Grem1 als Inhibitor von TGF β -1 identifiziert und eine neue Rolle der Grem1/TGF β -1 Interaktion in myokardialen Inflammations- und Reparaturprozessen beschrieben werden. Unter Verwendung des Ischämie/Reperusionsmodells in Mäusen konnte eine vermehrte Expression von Grem1 in Infiltraten im ischämischen Myokardgewebe nachgewiesen werden. So konnte verifiziert werden, dass mGrem1-Fc die TGF β -1 *in vitro* induzierte Expression und Sekretion an Col I von Fibroblasten und die *in vivo* Expression an EZM Proteinen nach transientser Ligatur reduzieren kann. Durch die *in vivo* Applikation von mGrem1-Fc konnte die linksventrikuläre Herzfunktion verbessert werden, sowie die Infarktgröße und die myokardiale Fibrose im Ischämie/Reperusionsmodell verringert werden. Dies beschreibt Grem1 als vielversprechendes neues Zielmolekül, um die Plauestabilität und Plaueprogression, aber auch myokardiale Fibrose und Remodelling Prozesse kontrollieren zu können.

6. Summary

The cardiovascular research has become a focus of medical research in the last years. Especially the „Biologicals“ have shown to be a very promising new therapeutic approach against chronic inflammatory diseases like rheumatoid arthritis or atherosclerosis. For the *in vitro* and the *in vivo* application the class of fusion proteins are a new innovative therapeutic possibility to conduct a therapy against directed target structures. In this work the BMP-antagonist Grem1 could be described in the context of atherosclerosis. Grem1 was found to be predominantly expressed in monocytes, macrophages and foam cells in the area of atherosclerotic lesions of ApoE^{-/-} mice. Under *in vitro* conditions monocytes secreted Grem1. Furthermore Grem1 was inhibiting the transformation of monocytes into foam cells and was reducing the MIF-induced TNF- α secretion out of macrophages. This is the first time that Grem1 could be described as a new endogen antagonist for MIF-induced processes. Through different settings of experiments a molecular interaction between Grem1 and MIF was evaluated. An *in vivo* application of the fusion protein mGrem1-Fc reduced significantly the content of macrophages in plaque tissue of ApoE^{-/-} mice and the TNF- α expression in this area. Moreover Grem1 could be described, playing a role through its interaction with TGF β -1 in myocardial inflammation and remodelling processes as a new antagonist of TGF β -1. By using the model of transient myocardial ischemia in mice Grem1 was highly expressed in infiltrating cells in the myocardium. mGrem1-Fc reduced the *in vitro* TGF β -1-induced Col I secretion and expression as well as the *in vivo* expression of extracellular matrix proteins after transient myocardial ischemia. Prolonged treatment with mGrem1-Fc, but not with equimolar control Fc, improved left ventricular heart function, reduced infarct size and myocardial fibrosis following myocardial ischemia. Taken together these data disclose Grem1 as a new promising target structure to control plaque stability and progression as well as myocardial fibrosis and remodelling processes.

7. Literaturverzeichnis

1. Abi-Younes S, Sauty A, Mach F, Sukhova GK, Libby P, Luster AD. The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques. *Circ Res* 2000 February 4;86(2):131-8.
2. Alborzinia H, Schmidt-Glenewinkel H, Ilkavets I et al. Quantitative kinetics analysis of BMP2 uptake into cells and its modulation by BMP antagonists. *J Cell Sci* 2013 January 1;126(Pt 1):117-27.
3. Amin MA, Haas CS, Zhu K et al. Migration inhibitory factor up-regulates vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 via Src, PI3 kinase, and NFkappaB. *Blood* 2006 March 15;107(6):2252-61.
4. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* 2003 January 15;116(Pt 2):217-24.
5. Atsumi T, Nishihira J, Makita Z, Koike T. Enhancement of oxidised low-density lipoprotein uptake by macrophages in response to macrophage migration inhibitory factor. *Cytokine* 2000 October;12(10):1553-6.
6. Avsian-Kretchmer O, Hsueh AJ. Comparative genomic analysis of the eight-membered ring cystine knot-containing bone morphogenetic protein antagonists. *Mol Endocrinol* 2004 January;18(1):1-12.
7. Badimon L, Vilahur G, Padro T. Lipoproteins, platelets and atherothrombosis. *Rev Esp Cardiol* 2009 October;62(10):1161-78.
8. Balemans W, Van HW. Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev Biol* 2002 October 15;250(2):231-50.
9. Bernhagen J, Krohn R, Lue H et al. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med* 2007 May;13(5):587-96.
10. Bernhagen J, Mitchell RA, Calandra T, Voelter W, Cerami A, Bucala R. Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse and human macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Biochemistry* 1994 November 29;33(47):14144-55.
11. Boers W, Aarrass S, Linthorst C, Pinzani M, Elferink RO, Bosma P. Transcriptional profiling reveals novel markers of liver fibrogenesis: gremlin and insulin-like growth factor-binding proteins. *J Biol Chem* 2006 June 16;281(24):16289-95.
12. Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 1999 April;79(2):609-34.
13. Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal* 2011 April;23(4):609-20.
14. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res* 2007 May 1;74(2):184-95.

15. Burger-Kentischer A, Gobel H, Kleemann R et al. Reduction of the aortic inflammatory response in spontaneous atherosclerosis by blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Atherosclerosis* 2006 January;184(1):28-38.
16. Burger-Kentischer A, Goebel H, Seiler R et al. Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis. *Circulation* 2002 April 2;105(13):1561-6.
17. Cahill E, Costello CM, Rowan SC et al. Gremlin plays a key role in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Circulation* 2012 February 21;125(7):920-30.
18. Cai J, Pardali E, Sanchez-Duffhues G, ten DP. BMP signaling in vascular diseases. *FEBS Lett* 2012 July 4;586(14):1993-2002.
19. Calandra T, Bernhagen J, Metz CN et al. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 1995 September 7;377(6544):68-71.
20. Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med* 1994 June 1;179(6):1895-902.
21. Calandra T, Spiegel LA, Metz CN, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 September 15;95(19):11383-8.
22. Campbell SE, Katwa LC. Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 1997 July;29(7):1947-58.
23. Chang K, Weiss D, Suo J et al. Bone morphogenetic protein antagonists are coexpressed with bone morphogenetic protein 4 in endothelial cells exposed to unstable flow in vitro in mouse aortas and in human coronary arteries: role of bone morphogenetic protein antagonists in inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2007 September 11;116(11):1258-66.
24. Charles A. Janeway PTMWS. Immunology. 7. 2008. New York and London, Garland Science Taylor & Francis Group.
25. Chen B, Blair DG, Plisov S et al. Cutting edge: bone morphogenetic protein antagonists Dm/Gremlin and Dan interact with Slits and act as negative regulators of monocyte chemotaxis. *J Immunol* 2004 November 15;173(10):5914-7.
26. Chen L, Yang G, Zhang X et al. Induction of MIF expression by oxidized LDL via activation of NF-kappaB in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2009 December;207(2):428-33.
27. Chiodelli P, Mitola S, Ravelli C, Oreste P, Rusnati M, Presta M. Heparan sulfate proteoglycans mediate the angiogenic activity of the vascular endothelial growth factor receptor-2 agonist gremlin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011 December;31(12):e116-e127.
28. Chua CC, Chua BH, Zhao ZY, Krebs C, Diglio C, Perrin E. Effect of growth factors on collagen metabolism in cultured human heart fibroblasts. *Connect Tissue Res* 1991;26(4):271-81.

29. Claesson-Welsh L. Gremlin: vexing VEGF receptor agonist. *Blood* 2010 November 4;116(18):3386-7.
30. Clark RA, Nielsen LD, Welch MP, McPherson JM. Collagen matrices attenuate the collagen-synthetic response of cultured fibroblasts to TGF-beta. *J Cell Sci* 1995 March;108 (Pt 3):1251-61.
31. Clark-Lewis I, Kim KS, Rajarathnam K et al. Structure-activity relationships of chemokines. *J Leukoc Biol* 1995 May;57(5):703-11.
32. Corsini M, Moroni E, Ravelli C et al. Cyclic adenosine monophosphate-response element-binding protein mediates the proangiogenic or proinflammatory activity of gremlin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014 January;34(1):136-45.
33. Costello CM, Howell K, Cahill E et al. Lung-selective gene responses to alveolar hypoxia: potential role for the bone morphogenetic antagonist gremlin in pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008 August;295(2):L272-L284.
34. Croce K, Libby P. Intertwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Hematol* 2007 January;14(1):55-61.
35. Damico RL, Chesley A, Johnston L et al. Macrophage migration inhibitory factor governs endothelial cell sensitivity to LPS-induced apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008 July;39(1):77-85.
36. Daub K, Siegel-Axel D, Schonberger T et al. Inhibition of foam cell formation using a soluble CD68-Fc fusion protein. *J Mol Med (Berl)* 2010 September;88(9):909-20.
37. Dean RG, Balding LC, Candido R et al. Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis after myocardial infarction. *J Histochem Cytochem* 2005 October;53(10):1245-56.
38. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993 July;122(1):103-11.
39. Deten A, Holzl A, Leicht M, Barth W, Zimmer HG. Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats. *J Mol Cell Cardiol* 2001 June;33(6):1191-207.
40. Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats. *Cardiovasc Res* 2002 August 1;55(2):329-40.
41. Detry JM. The pathophysiology of myocardial ischaemia. *Eur Heart J* 1996 December;17 Suppl G:48-52.
42. Dewald O, Ren G, Duerr GD et al. Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *Am J Pathol* 2004 February;164(2):665-77.
43. Dickson BJ, Gilestro GF. Regulation of commissural axon pathfinding by slit and its Robo receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;22:651-75.

44. Dobaczewski M, Bujak M, Li N et al. Smad3 signaling critically regulates fibroblast phenotype and function in healing myocardial infarction. *Circ Res* 2010 August 6;107(3):418-28.
45. Dolan V, Murphy M, Alarcon P, Brady HR, Hensey C. Gremlin - a putative pathogenic player in progressive renal disease. *Expert Opin Ther Targets* 2003 August;7(4):523-6.
46. Dolan V, Murphy M, Sadlier D et al. Expression of gremlin, a bone morphogenetic protein antagonist, in human diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2005 June;45(6):1034-9.
47. Eimon PM, Harland RM. In *Xenopus* embryos, BMP heterodimers are not required for mesoderm induction, but BMP activity is necessary for dorsal/ventral patterning. *Dev Biol* 1999 December 1;216(1):29-40.
48. Ernst Mutschler H-GSPVT-M-V. Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen. 6. 2007. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH. Ref Type: Generic
49. Ertl G, Frantz S. Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2005 April 1;66(1):22-32.
50. Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2006 April 18;47(8 Suppl):C7-12.
51. Farkas L, Farkas D, Gauldie J, Warburton D, Shi W, Kolb M. Transient overexpression of Gremlin results in epithelial activation and reversible fibrosis in rat lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011 June;44(6):870-8.
52. Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;21:659-93.
53. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002 January;53(1):31-47.
54. Frank NY, Kho AT, Schatton T et al. Regulation of myogenic progenitor proliferation in human fetal skeletal muscle by BMP4 and its antagonist Gremlin. *J Cell Biol* 2006 October 9;175(1):99-110.
55. Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annu Rev Immunol* 2009;27:165-97.
56. Garbe DS, Bashaw GJ. Axon guidance at the midline: from mutants to mechanisms. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2004 September;39(5-6):319-41.
57. Gear AR, Camerini D. Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation, and host defense. *Microcirculation* 2003 June;10(3-4):335-50.
58. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 2001 February 23;104(4):503-16.
59. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL et al. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2013 January 1;127(1):e6-e245.

60. Gray AM, Mason AJ. Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science* 1990 March 16;247(4948):1328-30.
61. Gregory JL, Morand EF, McKeown SJ et al. Macrophage migration inhibitory factor induces macrophage recruitment via CC chemokine ligand 2. *J Immunol* 2006 December 1;177(11):8072-9.
62. Guan KL, Rao Y. Signalling mechanisms mediating neuronal responses to guidance cues. *Nat Rev Neurosci* 2003 December;4(12):941-56.
63. Gupta SK, Lysko PG, Pillarisetti K, Ohlstein E, Stadel JM. Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 1998 February 13;273(7):4282-7.
64. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005 April 21;352(16):1685-95.
65. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2006 July;6(7):508-19.
66. Hao J, Wang B, Jones SC, Jassal DS, Dixon IM. Interaction between angiotensin II and Smad proteins in fibroblasts in failing heart and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000 December;279(6):H3020-H3030.
67. Helguera G, Rodriguez JA, Penichet ML. Cytokines fused to antibodies and their combinations as therapeutic agents against different peritoneal HER2/neu expressing tumors. *Mol Cancer Ther* 2006 April;5(4):1029-40.
68. Hinglais N, Heudes D, Nicoletti A et al. Colocalization of myocardial fibrosis and inflammatory cells in rats. *Lab Invest* 1994 February;70(2):286-94.
69. Hohenester E. Structural insight into Slit-Robo signalling. *Biochem Soc Trans* 2008 April;36(Pt 2):251-6.
70. Hsu DR, Economides AN, Wang X, Eimon PM, Harland RM. The Xenopus dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol Cell* 1998 April;1(5):673-83.
71. Huang H, Huang H, Li Y et al. Gremlin induces cell proliferation and extra cellular matrix accumulation in mouse mesangial cells exposed to high glucose via the ERK1/2 pathway. *BMC Nephrol* 2013;14:33.
72. Huang Z, Rahman MF, Jiang L et al. Thrombin induces de novo protein synthesis of stromal cell-derived factor-1alpha but not angiostatin in human platelets. *J Thromb Haemost* 2012 October;10(10):2202-5.
73. Ignatz RA, Massague J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 1986 March 25;261(9):4337-45.
74. Ikeuchi M, Tsutsui H, Shiomi T et al. Inhibition of TGF-beta signaling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction. *Cardiovasc Res* 2004 December 1;64(3):526-35.
75. Ingersoll MA, Spanbroek R, Lottaz C et al. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 2010 January 21;115(3):e10-e19.

76. Irwin MW, Mak S, Mann DL et al. Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation* 1999 March 23;99(11):1492-8.
77. Jara A, Chacon C, Burgos ME et al. Expression of gremlin, a bone morphogenetic protein antagonist, is associated with vascular calcification in uraemia. *Nephrol Dial Transplant* 2009 April;24(4):1121-9.
78. Kami D, Shiojima I, Makino H et al. Gremlin enhances the determined path to cardiomyogenesis. *PLoS One* 2008;3(6):e2407.
79. Kane R, Stevenson L, Godson C, Stitt AW, O'Brien C. Gremlin gene expression in bovine retinal pericytes exposed to elevated glucose. *Br J Ophthalmol* 2005 December;89(12):1638-42.
80. Kapadia S, Lee J, Torre-Amione G, Birdsall HH, Ma TS, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J Clin Invest* 1995 August;96(2):1042-52.
81. Kapadia SR, Oral H, Lee J, Nakano M, Taffet GE, Mann DL. Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium. *Circ Res* 1997 August;81(2):187-95.
82. Khan R, Sheppard R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology* 2006 May;118(1):10-24.
83. Kim M, Yoon S, Lee S et al. Gremlin-1 induces BMP-independent tumor cell proliferation, migration, and invasion. *PLoS One* 2012;7(4):e35100.
84. Kleemann R, Hausser A, Geiger G et al. Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature* 2000 November 9;408(6809):211-6.
85. Koli K, Myllarniemi M, Vuorinen K et al. Bone morphogenetic protein-4 inhibitor gremlin is overexpressed in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 2006 July;169(1):61-71.
86. Kong YZ, Huang XR, Ouyang X et al. Evidence for vascular macrophage migration inhibitory factor in destabilization of human atherosclerotic plaques. *Cardiovasc Res* 2005 January 1;65(1):272-82.
87. Kong YZ, Yu X, Tang JJ et al. Macrophage migration inhibitory factor induces MMP-9 expression: implications for destabilization of human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 2005 January;178(1):207-15.
88. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K et al. Hypertensive myocardial fibrosis and diastolic dysfunction: another model of inflammation? *Hypertension* 2004 April;43(4):739-45.
89. Lan HY, Bacher M, Yang N et al. The pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor in immunologically induced kidney disease in the rat. *J Exp Med* 1997 April 21;185(8):1455-65.
90. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J* 2004 May;18(7):816-27.
91. Lefort CT, Ley K. Neutrophil arrest by LFA-1 activation. *Front Immunol* 2012;3:157.

92. Leng L, Metz CN, Fang Y et al. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med* 2003 June 2;197(11):1467-76.
93. Leong DP, Madsen PL, Selvanayagam JB. Non-invasive evaluation of myocardial fibrosis: implications for the clinician. *Heart* 2010 December;96(24):2016-24.
94. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007 September;7(9):678-89.
95. Li G, Li Y, Liu S et al. Gremlin aggravates hyperglycemia-induced podocyte injury by a TGFbeta/smad dependent signaling pathway. *J Cell Biochem* 2013 September;114(9):2101-13.
96. Lian R, Chen Y, Xu Z, Zhang X. Soluble transforming growth factor-beta1 receptor II might inhibit transforming growth factor-beta-induced myofibroblast differentiation and improve ischemic cardiac function after myocardial infarction in rats. *Coron Artery Dis* 2010 September;21(6):369-77.
97. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002 December 19;420(6917):868-74.
98. Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1). *Mol Genet Metab* 2000 September;71(1-2):418-35.
99. Lowery JW, de Caestecker MP. BMP signaling in vascular development and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010 August;21(4):287-98.
100. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998 February 12;338(7):436-45.
101. Maciel TT, Melo RS, Campos AH. The bone morphogenetic protein antagonist gremlin promotes vascular smooth muscle cell apoptosis. *J Vasc Res* 2009;46(4):325-32.
102. Maciel TT, Melo RS, Schor N, Campos AH. Gremlin promotes vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *J Mol Cell Cardiol* 2008 February;44(2):370-9.
103. Maiolo D, Mitola S, Leali D et al. Role of nanomechanics in canonical and noncanonical pro-angiogenic ligand/VEGF receptor-2 activation. *J Am Chem Soc* 2012 September 5;134(35):14573-9.
104. Mann DL. Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. *Annu Rev Physiol* 2003;65:81-101.
105. Martin-Ventura JL, Madrigal-Matute J, Munoz-Garcia B et al. Increased CD74 expression in human atherosclerotic plaques: contribution to inflammatory responses in vascular cells. *Cardiovasc Res* 2009 August 1;83(3):586-94.
106. Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 2000 April 17;19(8):1745-54.
107. Massberg S, Konrad I, Bultmann A et al. Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo. *FASEB J* 2004 February;18(2):397-9.

108. Merino R, Rodriguez-Leon J, Macias D, Ganan Y, Economides AN, Hurlle JM. The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. *Development* 1999 December;126(23):5515-22.
109. Mezzano S, Droguett A, Burgos ME et al. Expression of gremlin, a bone morphogenetic protein antagonist, in glomerular crescents of pauci-immune glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2007 July;22(7):1882-90.
110. Michos O, Goncalves A, Lopez-Rios J et al. Reduction of BMP4 activity by gremlin 1 enables ureteric bud outgrowth and GDNF/WNT11 feedback signalling during kidney branching morphogenesis. *Development* 2007 July;134(13):2397-405.
111. Michos O, Panman L, Vintersten K, Beier K, Zeller R, Zuniga A. Gremlin-mediated BMP antagonism induces the epithelial-mesenchymal feedback signaling controlling metanephric kidney and limb organogenesis. *Development* 2004 July;131(14):3401-10.
112. Mitola S, Moroni E, Ravelli C, Andres G, Belleri M, Presta M. Angiopoietin-1 mediates the proangiogenic activity of the bone morphogenetic protein antagonist Dm. *Blood* 2008 August 15;112(4):1154-7.
113. Mitola S, Ravelli C, Moroni E et al. Gremlin is a novel agonist of the major proangiogenic receptor VEGFR2. *Blood* 2010 November 4;116(18):3677-80.
114. Montresor A, Toffali L, Constantin G, Laudanna C. Chemokines and the signaling modules regulating integrin affinity. *Front Immunol* 2012;3:127.
115. Morand EF, Leech M, Bernhagen J. MIF: a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Nat Rev Drug Discov* 2006 May;5(5):399-410.
116. Mueller KA, Tavlaki E, Schneider M et al. Gremlin-1 identifies fibrosis and predicts adverse outcome in patients with heart failure undergoing endomyocardial biopsy. *J Card Fail* 2013 October;19(10):678-84.
117. Mulder KM. Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000 March;11(1-2):23-35.
118. Müller I, Schneider M et al. Gremlin-1 binds to transforming growth factor- β and preserves myocardial function after transient ischemia in mice . 2014. Ref Type: Generic
119. Muller I, Schonberger T, Schneider M et al. Gremlin-1 is an inhibitor of macrophage migration inhibitory factor and attenuates atherosclerotic plaque growth in ApoE^{-/-} Mice. *J Biol Chem* 2013 November 1;288(44):31635-45.
120. Murakami G, Watabe T, Takaoka K, Miyazono K, Imamura T. Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol Biol Cell* 2003 July;14(7):2809-17.
121. Murdoch C, Monk PN, Finn A. Cxc chemokine receptor expression on human endothelial cells. *Cytokine* 1999 September;11(9):704-12.
122. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 2000 March;52(1):145-76.

123. Murphy-Ullrich JE, Poczatek M. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000 March;11(1-2):59-69.
124. Myllarniemi M, Lindholm P, Ryyanen MJ et al. Gremlin-mediated decrease in bone morphogenetic protein signaling promotes pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008 February 1;177(3):321-9.
125. Namkoong H, Shin SM, Kim HK et al. The bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is overexpressed in human cancers and interacts with YWHAH protein. *BMC Cancer* 2006;6:74.
126. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* 2004 June 25;94(12):1543-53.
127. Noels H, Bernhagen J, Weber C. Macrophage migration inhibitory factor: a noncanonical chemokine important in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2009 April;19(3):76-86.
128. Ogunjimi AA, Briant DJ, Pece-Barbara N et al. Regulation of Smurf2 ubiquitin ligase activity by anchoring the E2 to the HECT domain. *Mol Cell* 2005 August 5;19(3):297-308.
129. Okada H, Takemura G, Kosai K et al. Postinfarction gene therapy against transforming growth factor-beta signal modulates infarct tissue dynamics and attenuates left ventricular remodeling and heart failure. *Circulation* 2005 May 17;111(19):2430-7.
130. Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation* 1998 July 14;98(2):149-56.
131. Paiva CN, Arras RH, Magalhaes ES et al. Migration inhibitory factor (MIF) released by macrophages upon recognition of immune complexes is critical to inflammation in Arthus reaction. *J Leukoc Biol* 2009 May;85(5):855-61.
132. Pan JH, Sukhova GK, Yang JT et al. Macrophage migration inhibitory factor deficiency impairs atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 2004 June 29;109(25):3149-53.
133. Pan X, Chen Z, Huang R, Yao Y, Ma G. Transforming growth factor beta1 induces the expression of collagen type I by DNA methylation in cardiac fibroblasts. *PLoS One* 2013;8(4):e60335.
134. Paulus WJ. Cytokines and heart failure. *Heart Fail Monit* 2000;1(2):50-6.
135. Powers SK, Murlasits Z, Wu M, Kavazis AN. Ischemia-reperfusion-induced cardiac injury: a brief review. *Med Sci Sports Exerc* 2007 September;39(9):1529-36.
136. Ravelli C, Mitola S, Corsini M, Presta M. Involvement of alphavbeta3 integrin in gremlin-induced angiogenesis. *Angiogenesis* 2013 January;16(1):235-43.
137. Reifers F, Walsh EC, Leger S, Stainier DY, Brand M. Induction and differentiation of the zebrafish heart requires fibroblast growth factor 8 (fgf8/acerebellar). *Development* 2000 January;127(2):225-35.

138. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 1977 November;56(5):786-94.
139. Reiners KS, Hansen HP, Krussmann A et al. Selective killing of B-cell hybridomas targeting proteinase 3, Wegener's autoantigen. *Immunology* 2004 June;112(2):228-36.
140. Riemann D, Wollert HG, Menschikowski J, Mittenzwei S, Langner J. Immunophenotype of lymphocytes in pericardial fluid from patients with different forms of heart disease. *Int Arch Allergy Immunol* 1994 May;104(1):48-56.
141. Roberts AB SM. Handbook of Experimental Pharmacology. Peptide Growth Factors and Their Receptors .The transforming growth factors-b. 419-472. 1990. New York, Springer-Verlag.
Ref Type: Generic
142. Roberts AB, Roche NS, Winokur TS, Burmester JK, Sporn MB. Role of transforming growth factor-beta in maintenance of function of cultured neonatal cardiac myocytes. Autocrine action and reversal of damaging effects of interleukin-1. *J Clin Invest* 1992 November;90(5):2056-62.
143. Rodrigues-Diez R, Lavozy C, Carvajal G et al. Gremlin is a downstream profibrotic mediator of transforming growth factor-beta in cultured renal cells. *Nephron Exp Nephrol* 2012;122(1-2):62-74.
144. Roxburgh SA, Murphy M, Pollock CA, Brazil DP. Recapitulation of embryological programmes in renal fibrosis--the importance of epithelial cell plasticity and developmental genes. *Nephron Physiol* 2006;103(3):139-48.
145. Sakamoto W, Fujie K, Isomura S et al. Secretion of macrophage migration inhibitory factor differs from interleukin-6 in hydrogen peroxide- and LPS-stimulated human fibroblasts. *Int Immunopharmacol* 2002 July;2(8):1123-31.
146. Schiller M, Javelaud D, Mauviel A. TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J Dermatol Sci* 2004 August;35(2):83-92.
147. Schmeisser A, Marquetant R, Illmer T et al. The expression of macrophage migration inhibitory factor 1alpha (MIF 1alpha) in human atherosclerotic plaques is induced by different proatherogenic stimuli and associated with plaque instability. *Atherosclerosis* 2005 January;178(1):83-94.
148. Schmierer B, Hill CS. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007 December;8(12):970-82.
149. Schober A, Bernhagen J, Thiele M et al. Stabilization of atherosclerotic plaques by blockade of macrophage migration inhibitory factor after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2004 January 27;109(3):380-5.
150. Schober A, Bernhagen J, Weber C. Chemokine-like functions of MIF in atherosclerosis. *J Mol Med (Berl)* 2008 July;86(7):761-70.
151. Schonberger T, Siegel-Axel D, Bussl R et al. The immunoadhesin glycoprotein VI-Fc regulates arterial remodelling after mechanical injury in ApoE^{-/-} mice. *Cardiovasc Res* 2008 October 1;80(1):131-7.

152. Schrans-Stassen BH, Lue H, Sonnemans DG, Bernhagen J, Post MJ. Stimulation of vascular smooth muscle cell migration by macrophage migration inhibitory factor. *Antioxid Redox Signal* 2005 September;7(9-10):1211-6.
153. Schultheiss TM, Burch JB, Lassar AB. A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev* 1997 February 15;11(4):451-62.
154. Schwartz V, Lue H, Kraemer S et al. A functional heteromeric MIF receptor formed by CD74 and CXCR4. *FEBS Lett* 2009 September 3;583(17):2749-57.
155. Sengle G, Charbonneau NL, Ono RN et al. Targeting of bone morphogenetic protein growth factor complexes to fibrillin. *J Biol Chem* 2008 May 16;283(20):13874-88.
156. Seow V, Lim J, Iyer A et al. Inflammatory responses induced by lipopolysaccharide are amplified in primary human monocytes but suppressed in macrophages by complement protein C5a. *J Immunol* 2013 October 15;191(8):4308-16.
157. Sethi A, Jain A, Zode GS, Wordinger RJ, Clark AF. Role of TGFbeta/Smad signaling in gremlin induction of human trabecular meshwork extracellular matrix proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011 July;52(8):5251-9.
158. Shi X, Leng L, Wang T et al. CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity* 2006 October;25(4):595-606.
159. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003 June 13;113(6):685-700.
160. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 2006 March 10;312(5):549-60.
161. Skyschally A, Schulz R, Heusch G. Pathophysiology of myocardial infarction: protection by ischemic pre- and postconditioning. *Herz* 2008 March;33(2):88-100.
162. Sneddon JB, Zhen HH, Montgomery K et al. Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 October 3;103(40):14842-7.
163. Stabile H, Mitola S, Moroni E et al. Bone morphogenetic protein antagonist Drm/gremlin is a novel proangiogenic factor. *Blood* 2007 March 1;109(5):1834-40.
164. Stang M. Klonierung, Herstellung und erste Charakterisierung des murinen-humanen Fusionsproteins mGremlin- Fc. 1-68. 2012. Tübingen, Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.
165. Stein R, Mattes MJ, Cardillo TM et al. CD74: a new candidate target for the immunotherapy of B-cell neoplasms. *Clin Cancer Res* 2007 September 15;13(18 Pt 2):5556s-63s.

166. Strussmann T, Tillmann S, Wirtz T, Bucala R, von HP, Bernhagen J. Platelets are a previously unrecognised source of MIF. *Thromb Haemost* 2013 October 31;110(5):1004-13.
167. Sun J, Zhuang FF, Mullersman JE et al. BMP4 activation and secretion are negatively regulated by an intracellular gremlin-BMP4 interaction. *J Biol Chem* 2006 September 29;281(39):29349-56.
168. Sunderkotter C, Nikolic T, Dillon MJ et al. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* 2004 April 1;172(7):4410-7.
169. Swirski FK, Pittet MJ, Kircher MF et al. Monocyte accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 July 5;103(27):10340-5.
170. Tamminen JA, Parviainen V, Ronty M et al. Gremlin-1 associates with fibrillin microfibrils in vivo and regulates mesothelioma cell survival through transcription factor slug. *Oncogenesis* 2013;2:e66.
171. ten DP, Arthur HM. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007 November;8(11):857-69.
172. Thomas C, Gebert G. *Spezielle Pathologie*. 173. 1996. Stuttgart, Schattauer Verlag.
Ref Type: Generic
173. Tillmann S, Bernhagen J, Noels H. Arrest Functions of the MIF Ligand/Receptor Axes in Atherogenesis. *Front Immunol* 2013;4:115.
174. Topol LZ, Bardot B, Zhang Q et al. Biosynthesis, post-translation modification, and functional characterization of Drm/Gremlin. *J Biol Chem* 2000 March 24;275(12):8785-93.
175. Topol LZ, Marx M, Laugier D et al. Identification of drm, a novel gene whose expression is suppressed in transformed cells and which can inhibit growth of normal but not transformed cells in culture. *Mol Cell Biol* 1997 August;17(8):4801-10.
176. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 2006 June;12(6):642-9.
177. Verrecchia F, Chu ML, Mauviel A. Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J Biol Chem* 2001 May 18;276(20):17058-62.
178. Verschuren L, Kooistra T, Bernhagen J et al. MIF deficiency reduces chronic inflammation in white adipose tissue and impairs the development of insulin resistance, glucose intolerance, and associated atherosclerotic disease. *Circ Res* 2009 July 2;105(1):99-107.
179. Vitt UA, Hsu SY, Hsueh AJ. Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules. *Mol Endocrinol* 2001 May;15(5):681-94.
180. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat Biotechnol* 2010 September;28(9):917-24.

181. Walter Siegenthaler HEB. *Klinische Pathophysiologie*. 9, 627. 2006. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
182. Wang JM, Wang Y, Zhu ZS et al. Diverse effects of long-term treatment with imidapril and irbesartan on cell growth signal, apoptosis and collagen type I expression in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 2004 June 11;75(4):407-20.
183. Weber C, Kraemer S, Drechsler M et al. Structural determinants of MIF functions in CXCR2-mediated inflammatory and atherogenic leukocyte recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 October 21;105(42):16278-83.
184. Weber C, Zernecke A, Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol* 2008 October;8(10):802-15.
185. Wittchen ES. Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009;14:2522-45.
186. Wolf G, Ziyadeh FN. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int* 1999 August;56(2):393-405.
187. Wolff RA, Malinowski RL, Heaton NS, Hullett DA, Hoch JR. Transforming growth factor-beta1 antisense treatment of rat vein grafts reduces the accumulation of collagen and increases the accumulation of h-caldesmon. *J Vasc Surg* 2006 May;43(5):1028-36.
188. Wordinger RJ, Fleenor DL, Hellberg PE et al. Effects of TGF-beta2, BMP-4, and gremlin in the trabecular meshwork: implications for glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007 March;48(3):1191-200.
189. Wordinger RJ, Zode G, Clark AF. Focus on molecules: gremlin. *Exp Eye Res* 2008 August;87(2):78-9.
190. Yanagita M. BMP modulators regulate the function of BMP during body patterning and disease progression. *Biofactors* 2009 March;35(2):113-9.
191. Yao Y, Bennett BJ, Wang X et al. Inhibition of bone morphogenetic proteins protects against atherosclerosis and vascular calcification. *Circ Res* 2010 August 20;107(4):485-94.
192. Yu XH, Fu YC, Zhang DW, Yin K, Tang CK. Foam cells in atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2013 September 23;424:245-52.
193. Zeibig S, Li Z, Wagner S et al. Effect of the oxLDL binding protein Fc-CD68 on plaque extension and vulnerability in atherosclerosis. *Circ Res* 2011 March 18;108(6):695-703.
194. Zernecke A, Bernhagen J, Weber C. Macrophage migration inhibitory factor in cardiovascular disease. *Circulation* 2008 March 25;117(12):1594-602.
195. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* 2009 January;19(1):128-39.
196. Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana JL, Thomsen GH. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* 1999 August 12;400(6745):687-93.

197. Ziegler M, Elvers M, Baumer Y et al. The bispecific SDF1-GPVI fusion protein preserves myocardial function after transient ischemia in mice. *Circulation* 2012 February 7;125(5):685-96.
198. Zode GS, Clark AF, Wordinger RJ. Bone morphogenetic protein 4 inhibits TGF-beta2 stimulation of extracellular matrix proteins in optic nerve head cells: role of gremlin in ECM modulation. *Glia* 2009 May;57(7):755-66.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

AaR	Area at Risk
acLDL	Acetyliertes low density lipoprotein
Ak	Antikörper
ApoE ^{-/-}	Apolipoprotein E
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BMP	Bone morphogenic protein
BMPR	Bone morphogenic protein Rezeptor
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	complementary DNA, copy DNA
CHO	Chinese Hamster Ovary
Col I	Kollagen I
CTGF	Connective tissue growth factor
d	Day (Tag)
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
D-PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
Draq 5	1,5-bis(2-(di-methylamino)ethylamino)-4,8-dihydroxyanthracene-9,10-dione
ECV-304	Human urinary bladder carcinoma cells
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EF	Ejection Fraction
EGF	Endothelial growth factor
EZM	Extrazelluläre Matrixproteine
FAC	Fractional Area Change
FCS	Fetal bovine serum
g	Gramm
Grem-1	Gremlin 1
h	hour (Stunde)
HAEC	Human Arterial Endothelial Cells
HCF	Human Cardiac Fibroblasts
HCl	Salzsäure

HCl	Salzsäure
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
HE	Hematoxylin und Eosin
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenous
ICAM-1/-2	Intracellular adhesion molecule 1/2
Ig	Immunglobulin
IL-1- β	Interleukin 1 β
INF-γ	Interferon γ
IP	Immunpräzipitation
IR	Ischämie und Reperfusion
kDA	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
LAD	Left anterior descending artery
LDL	Low density lipoprotein
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
L-Glut	L-Glutamin
LPS	Lipopolysaccharid
LV	Linker Ventrikel, linksventrikulär
M	Molar
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
M-CSF	Platelet derived growth factor
Mg	Milligramm
MgCl ₂ ⁺	Magnesiumchlorid
mGrem1-Fc	murines Gremlin 1 Fc
MI	Myokardinfarkt
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm ²	Quadratmillimeter
MM-6	Mono Mac 6 Zelllinie
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	messenger RNA

NEAA	Non essential amino acids
oxLDL	Oxidiertes low density lipoprotein
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid-Gel
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor 1
PBS	phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PMEF	Primary Mouse Embrony Cells
qRT-PCR	quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
RV	Rechter Ventrikel, rechtsventrikulär
s	Sekunde
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardabweichung der Mittelwerte (standard error of the mean)
TEMED	Tissue factor
TGF β -1	Tumor growth factor beta 1
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
Tris	Tris(hydroxyethyl)aminomethan
UPA	Urokinase plasminogen activator
v/v	volume per volume
VCAM-1	Vascular adhesion molecule 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR2	Vascular endothelial growth factor Rezeptor 2
VLA-4	Very late antigen 4
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cells
w/v	weight per volume
°C	Grad Celsius
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Primärantikörper für den Westernblot	22
Tabelle 2.2: Sekundärantikörper für den Westernblot	22
Tabelle 2.3: Primärantikörper und Isotypkontrollen für die Immunpräzipitation	23
Tabelle 2.4: Programm für die cDNA-Synthese	35
Tabelle 2.5: Liste verwendeter Primer (human) für die PCR	35
Tabelle 2.6: RT-PCR Ansatz der murinen Herzproben	37
Tabelle 2.7: Liste verwendeter Primer (murin) für die RTPCR	37
Tabelle 2.8: RTPCR Programm	37
Tabelle 2.9: Liste verwendeter Primäantikörper und Isotypkontrollen	44
Tabelle 2.10: Liste verwendeter Sekundärantikörper	44
Tabelle 2.11: Gruppeneinteilung für die Untersuchungen im ApoE ^{-/-} Modell	47
Tabelle 2.12: Gruppeneinteilung für die Untersuchungen im myokardialen Ischämiemodell	48
Tabelle 2.13: Verwendete Primärantikörper in der Immunhistochemie	54
Tabelle 2.14: Verwendete Isotypkontrollen in der Immunhistochemie	54
Tabelle 2.15: Verwendete Sekundärantikörper in der Immunhistochemie	54
Tabelle 2.16 Liste verwendeter Primäantikörper und Isotypkontrollen	56
Tabelle 2.17 Liste verwendeter Sekundärantikörper	56

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Statistische Auswertung der Sterbefälle bedingt durch KHK im Jahr 2009 in den USA	2
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der schrittweisen Entstehung eines arteriosklerotischen Plaque	3
Abbildung 1.3: Darstellung der drei Stufen der myokardialen Ischämie/Reperfusion	4
Abbildung 1.4: Auslösung eines myokardialen Infarkts aufgrund der Plaque-Ruptur einer Koronararterie	5
Abbildung 1.5: Zelluläre Wirkungsmechanismen von MIF in Verbindung mit arteriosklerotischen Vorgängen	6
Abbildung 1.6: MIF/Rezeptorkomplex vermittelte Signalwege	7
Abbildung 1.7: Struktureller Aufbau des Grem1 Proteins	8
Abbildung 1.8: „Cysteine-knot“ Struktur und phylogenetische Einordnung von Grem1	9
Abbildung 1.9: Signaltransduktion durch die Mitglieder der TGF β Superfamilie	11
Abbildung 1.10: Schematische Darstellung der dualen Rolle von Grem1	13
Abbildung 2.1: Aminosäuresequenz des murinen Fusionsproteins mGremlin-1-Fc	31
Abbildung 2.2: Aufbau des Plasmids pCDNA5/FRT-mGremlin-1-Fc	32
Abbildung 2.3: Schematischer Verlauf der ApoE Versuchsreihe mit mGremlin-1-Fc	46
Abbildung 2.4 Schematischer Verlauf der myokardialen Ischämie/Reperfuionsversuchsreihe (7d Versuch)	47
Abbildung 3.1: Expression von Grem1 und MIF	58
Abbildung 3.2: Immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten arteriellen Gewebes von ApoE ^{-/-} (n=10) - und Wildtypmäusen (WT, C57/BL6J)	60
Abbildung 3.3: Grem1 bindet an MIF und beide Proteine weisen eine Kolokalisierung im arteriosklerotischen Plaquegewebe auf	61
Abbildung 3.4: Grem1 und MIF werden in Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen koexprimiert	63

Abbildung 3.5: Zeitlicher Expression- und Sekretionslevel von Grem1 aus humanen Monozyten	64
Abbildung 3.6: Die Sekretion von Grem1 aus Monozyten wird durch oxLDL und SDF-1 beeinflusst	65
Abbildung 3.7: MIF Expression und Freisetzung unter dem Einfluß von LPS und Grem1	66
Abbildung 3.8: Grem1 inhibiert die MIF abhängige Adhäsion von MM6 Zellen an das Endothel	68
Abbildung 3.9: Grem1 hemmt die MIF induzierte Migration von Monozyten	69
Abbildung 3.10: Schematischer sequentieller Aufbau des Fusionsproteins mGrem1-Fc und des Kontrollproteins FcIgG2	70
Abbildung 3.11: Expression von mGrem1-Fc	71
Abbildung 3.12: mGrem1-Fc beeinflusst die MIF induzierte Chemotaxis von Monozyten <i>in vitro</i>	73
Abbildung 3.13: mGrem1-Fc inhibiert die humane Schaumzellbildung <i>in vitro</i>	74
Abbildung 3.14: Behandlungsschema von mGrem1-Fc im ApoE ^{-/-} Mausmodell	75
Abbildung 3.15: Darstellung der TNF- α positiven Zellen im Plaquegewebe nach erfolgter Behandlung mit mGrem1-Fc oder Kontroll-Fc	76
Abbildung 3.16 Darstellung der CD68-positiven Zellen im Plaquegewebe nach erfolgter Behandlung mit mGrem1-Fc oder Kontroll-Fc	77
Abbildung 3.17: Die Expression von Grem1 ist im Infarkt erhöht	79
Abbildung 3.18: Expressionslevel von Grem1 und TGF β -1	79
Abbildung 3.19: Grem1 zeigt eine molekulare Interaktion mit TGF β -1 unter <i>in vitro</i> Bedingungen	81
Abbildung 3.20: Grem1 und TGF β -1 werden in Fibroblasten (PMEF) koexprimiert	82
Abbildung 3.21 Expressionsmuster von Grem1 und TGF β -1 im myokardialen Infarkt im zeitlichen Verlauf	83
Abbildung 3.22: Einfluß von Grem1 und mGrem1-Fc auf die Expression und Sekretion von Col I in PMEF	84

Abbildung 3.23 Grem1 hemmt die TGF β -1 abhängige Expression von Col I in HCFs	85
Abbildung 3.24: Behandlungsschema von mGrem1-Fc im 7d Ischämie/Reperfusion-Mausmodell	87
Abbildung 3.25: Effekt von mGrem1-Fc auf die Infarktgröße <i>in vivo</i> (7d MI)	88
Abbildung 3.26 Effekt von mGrem1-Fc auf die Herzfunktion (LV) <i>in vivo</i> (7d MI)	89
Abbildung 3.27: Darstellung der zellulären Quantität im myokardialen Ischämiegebiet	90
Abbildung 3.28: Darstellung der qualitativen Zellularität im myokardialen Ischämiegebiet 7 Tage nach LAD (anti-PMN, anti-CD3 und anti-Mac-3)	91
Abbildung 3.29: Darstellung der qualitativen Zellularität im myokardialen Ischämiegebiet 7 Tage nach Ligatur der LAD (anti-TGF β -1, Trichrom und anti-MIF)	93

8.4 Erklärungen

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit selbständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25.5.2000) beachtet wurden. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Tübingen, 01.10.2014

Martina Schneider

8.5 Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Meinrad Gawaz für die Möglichkeit zur Anfertigung meiner Dissertation im Labor der Experimentellen Kardiologie an der Universitätsklinik in Tübingen und die wissenschaftliche Betreuung durch Anregungen und Gespräche, welche entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee der Universität Tübingen für die Übernahme meiner Arbeit und die interessanten Anregungen.

Bedanken möchte ich mich bei Dr. Iris Müller für die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit im Labor und Vorschläge bei der Erschließung des Forschungsthemas, sowie der Korrektur der Arbeit.

Ein weiterer Dank geht an Dr. Tanja Schönberger und Tobias Jürgens für die operative Durchführung des transienten Ischämie/Reperfusionmodell und des ApoE^{-/-} an der Maus.

Ingrid Epple, Lydia Laptev, Jadwiga Kwiatkowska, Klaudia Posavec, Hanna Schnell und Christina Flaum danke ich für ihre kontinuierliche Unterstützung im Labor.

Ein weiterer großer Dank möchte ich an all meinen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Gawaz aussprechen, für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Für das Korrekturlesen meiner Dissertation und die Ratschläge möchte ich Birgit Schneider-Storz und Saskia von Ungern-Sternberg danken.

Meiner Familie und Freunden danke ich herzlich für die liebevolle Unterstützung während der gesamten Zeit.

8.6 Lebenslauf

8.7 Publikationen

Nolte A, Walker T, **Schneider M**, Kray O, Avci-Adali M, Ziemer G, Wendel HP. Small-interfering RNA-eluting surfaces as a novel concept for intravascular local gene silencing. *Mol Med*. 2011;17(11-12):1213-22. (PMID: 21792480)

Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials Edited by Daniel Eberli, ISBN 978-953-307-663-8, Hard cover, 588 pages, Publisher: InTech, Published: August 29, 2011 under CC BY-NC-SA 3.0 license, in subject Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Chapter 24 Gene-Silencing for Treatment of Cardiovascular Diseases by A. Nolte, **M. Schneider**, T. Walker and H. P. Wendel

Müller II, Müller KA, Schönleber H, Karathanos A, **Schneider M**, Jorbenadze R, Bigalke B, Gawaz M, Geisler T. Macrophage migration inhibitory factor is enhanced in acute coronary syndromes and is associated with the inflammatory response. *PLoS One*. 2012;7(6):e38376. (PMID: 22693633)

I. Müller, T. Schönberger, **M. Schneider** et al., Gremlin-1 is an inhibitor of macrophage-inhibitory factor and attenuates atherosclerotic plaque growth in ApoE^{-/-} mice. *J Biol Chem*. 2013 Nov 1;288(44):31635-45. (PMID: 24003215)

Mueller KA, Tavlaki E, **Schneider M** et al., Gremlin-1 identifies fibrosis and predicts adverse outcome in patients with heart failure undergoing endomyocardial biopsy. *J Card Fail*. 2013 Oct; 19(10):678-84. (PMID: 24125106)

Müller II, Chatterjee M, **Schneider M** et al., Gremlin-1 inhibits macrophage migration inhibitory factor-dependent monocyte function and survival. *Int J Cardiol*. 2014 Aug 15. pii: S0167-5273(14)01577-0. [Epub ahead of print]. (PMID: 25194861)