

Charité - Universitätsmedizin Berlin
Med. Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie

Die Bedeutung von Entzündung und Reaktiven Sauerstoffspezies in der Intimahyperplasie

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
“doctor rerum naturalium“
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin „Biochemie“

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Stefanie Kamann

Postdam, den 01.10.2012

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Weitergabe unter gleichen Bedingungen 3.0
Deutschland
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2013/6468/>
URN [urn:nbn:de:kobv:517-opus-64683](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-64683)
<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-64683>

Meiner Familie

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Ich versichere ebenfalls, dass die Arbeit an keiner anderen Hochschule als der Universität Potsdam eingereicht wurde.

Potsdam, den 01.10.2012

Stefanie Kamann

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	iii
Zusammenfassung	1
Summary	3
1 Einleitung	5
1.1 Arterien	5
1.2 Die Koronare Herzkrankheit	6
1.3 Intimahyperplasie und Restenose	7
1.4 Endotheliale und Hämatopoetische Vorläuferzellen in der Intimahyperplasie	8
1.5 Bedeutung der Entzündungsreaktion in der Intimahyperplasie	9
1.6 Oxidativer Stress und Apoptose in der Intimahyperplasie	10
1.6.1 Reaktive Sauerstoffspezies	10
1.6.2 ROS und Apoptose in der Intimahyperplasie	10
1.6.3 Mitochondriale Dysfunktion	11
1.7 Chemokine und ihre Bedeutung in der Intimahyperplasie	12
1.7.1 Bedeutung und Klassifizierung des Chemokinsystems	12
1.7.2 Das CXCR3-Chemokinsystem	14
1.8 Rapamycin	16
1.9 Zielstellung der Arbeit	17
2 Material	18
2.1 Chemikalien und Reagenzien	18
2.2 Antibiotika	18
2.3 Enzyme	18
2.4 Oligonukleotide	18
2.5 Vektoren	21
2.5.1 Verwendete Ausgangsvektoren	21
2.5.2 Generierte Vektoren	22
2.6 Antikörper	24
2.7 Bakterienstämme	25

2.8	Eukaryotische Zelllinien	25
2.9	Mausstämme	26
2.10	Häufig verwendete Lösungen und Medien	26
3	Methoden	28
3.1	Molekularbiologische Methoden	28
3.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	28
3.1.2	Transformation von <i>E. coli</i>	28
	Herstellung und Transformation von chemokompetenten <i>E. coli</i>	28
	Herstellung und Transformation von elektrokompetenten <i>E. coli</i>	29
3.1.3	Präparation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	29
3.1.4	Präparation genomischer DNA aus Geweben	30
3.1.5	Präparation genomischer DNA aus ES-Zellen	30
3.1.6	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	30
3.1.7	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
3.1.8	Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA	31
3.1.9	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	31
3.1.10	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	32
3.1.11	Herstellung eines DNA-Verbindungsstücks	32
3.1.12	Enzymatische Modifikation von Nucleinsäuren	32
	Restriktion von DNA und Dephosphorylierung	32
	Herstellung von glatten Enden an DNA-Fragmenten	32
	Ligation	33
	TA Klonierung	33
	Cre-vermittelte Rekombination in vitro	33
3.1.13	Klonierungen	33
	Klonierung der konditionellen CXCR3 Targeting-Konstrukte	33
	Klonierung der Southern Blot Sonden	34
	Klonierung von Expressionsplasmiden	35
3.1.14	Identifizierung rekombinanter Klone	35
	Blau-Weiß-Differenzierung	35
	Restriktionskontrolle	36
3.1.15	Sequenzierung	36
3.1.16	Southern Blot Analyse	36
	Membrantransfer	36
	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	37
	Hybridisierung und Autoradiographie	37
3.2	Zellbiologische Methoden	38
3.2.1	Kultur von Säugerzellen	38

3.2.2	Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen	38
3.3	Proteinbiochemische Methoden	38
3.3.1	Herstellung von Zelllysaten	38
3.3.2	Quantitative Proteinbestimmung	38
3.3.3	Co-Immunpräzipitation	38
3.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
3.3.5	Western-Blot-Analyse (Immunblot)	39
3.3.6	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)	40
	Bestimmung der FRET-Effizienz mit der „sensitized emission“ Methode . . .	41
	Qualitative Untersuchung der FRET-Effizienz	42
	Typ-1 Experiment	42
	Typ-2 Experiment	43
	Experimentelle Durchführung der FRET-Messung mit transfizierten HEK293T Zellen	43
3.4	Histologische Methoden	44
3.4.1	Anfertigung von Paraffinschnitten	44
	Einbetten von Gewebe in Paraffin	44
	Schneiden der Paraffinblöcke	44
	Entparaffinieren der Schnitte	44
3.4.2	Elastica-van-Gieson Färbung (EvG)	44
3.4.3	Immunfluoreszenzfärbungen	45
3.4.4	TUNEL Färbung	45
3.5	Haltung der Mäuse	46
3.6	Erzeugung genetisch veränderter Mäuse	46
3.6.1	Präparation und Kultur embryonaler Fibroblasten (Feederzellen)	46
3.6.2	Kultur und Transfektion embryonaler Stammzellen	47
3.6.3	Selektion und Isolation einzelner ES-Zellklone	47
	Primäres Targeting	47
	Sekundäres Targeting	48
3.6.4	Superovulation und Präparation von Blastozysten	48
3.6.5	Injektion embryonaler Stammzellen in Blastozysten und Uterustransfer . . .	48
3.7	Femoralisverletzungsmodell der Maus	49
3.7.1	Präoperative Versorgung	49
3.7.2	Anästhesie und Operationstechnik	49
3.7.3	Postoperative Versorgung	50
3.7.4	Euthanasie, Perfusion und Probengewinnung	51
3.8	Behandlung von Versuchsgruppen	51
	mitoTempo	51

N-Acetyl-Cystein (NAC)	51
RAD001	52
4 Ergebnisse	53
4.1 Reaktive Sauerstoffspezies und Inflammation beeinflussen die Neointimabildung nach Gefäßverletzung	53
4.1.1 Morphometrische Analyse der verletzten Gefäße	53
4.1.2 Untersuchung der Rekrutierung von Entzündungszellen zum Ort der Gefäßverletzung	54
4.1.3 Untersuchung der Apoptose glatter Muskelzellen am Ort der Gefäßverletzung	57
4.2 Das Chemokin CXCL10 beeinflusst maßgeblich die Entstehung der Intimahyperplasie	59
4.2.1 Genotypisierung von CXCL10 defizienten Mäusen	59
4.2.2 Morphometrische Analyse der Neointimabildung in CXCL10 defizienten Mäusen	60
4.2.3 CXCL10 Defizienz hemmt die Rekrutierung inflammatorischer Zellen zum Ort der Gefäßverletzung	61
4.2.4 CXCL10 Defizienz reduziert die Apoptose in verletzten Gefäßen	64
4.2.5 CXCL10 Defizienz vermindert die Proliferation in verletzten Gefäßen	65
4.2.6 CXCL10 Defizienz verbessert die Reendothelialisierung nach der Gefäßverletzung	66
4.3 Konditionelle CXCR3 Inaktivierung in Mäusen	68
4.3.1 Konstruktion des konditionellen Targeting-Vektors	68
4.3.2 Funktionsüberprüfung der loxP Sequenzen in vitro	68
4.3.3 Homologe Rekombination (Primäres Targeting)	69
4.4 Untersuchung von CXCR3-Rezeptor-Interaktionen	73
4.4.1 Konstruktion der Expressionsplasmide	73
4.4.2 Expression der rekombinanten Rezeptoren	73
4.4.3 Untersuchung von Rezeptor-Dimeren mittels CoIP	77
Homodimerisierung von CXCR3A und CXCR3B	77
Heterodimerisierung von CXCR3A und CXCR3B	78
Heterodimerisierung von CXCR3A und CXCR3B mit anderen GPCR	78
4.4.4 Etablierung der FRET Methode	81
5 Diskussion	85
5.1 Reaktive Sauerstoffspezies und Entzündung beeinflussen die Entstehung der Neointima	85
5.2 Bedeutung des Chemokins CXCL10 bei der Neointimabildung	88
5.3 Generierung einer konditionellen CXCR3 Knockout Maus	90
5.4 Interaktion von CXCR3 mit anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren	91
Literaturverzeichnis	96
Tabellenverzeichnis	111

Abbildungsverzeichnis	112
Danksagungen	114

Abkürzungsverzeichnis

.....	
(E)BFP	engl. (<i>Enhanced</i>) <i>Blue Fluorescent Protein</i>
(E)CFP	engl. (<i>Enhanced</i>) <i>Cyan Fluorescent Protein</i>
(E)FP	engl. (<i>Enhanced</i>) <i>Green Fluorescent Protein</i> aus <i>Aequoria victoria</i>
(E)YFP	engl. (<i>Enhanced</i>) <i>Yellow Fluorescent Protein</i>
<i>A.femoralis</i>	<i>Arteria femoralis</i> , Femoralarterie
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>i. p.</i>	<i>intraperitoneal</i>
<i>N.femoralis</i>	<i>Nervus femoralis</i> , Femoralnerv
<i>p. c.</i>	<i>post coitum</i>
<i>s. c.</i>	<i>subcutan</i>
<i>V.femoralis</i>	<i>Vena femoralis</i> , Femoralvene
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
BAC	engl. <i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CCR2	CC Chemokin Rezeptor 2
CCR3	CC Chemokin Rezeptor 3
CCR5	CC Chemokin Rezeptor 5
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Chl	Chloramphenicol
Cre	engl. <i>Cyclization Recombinase</i>
CRF2aR	Corticotropin Releasing Faktor 2 a Rezeptor
CXCR3	CXC Chemokin Rezeptor 3
CXCR4	CXC Chemokin Rezeptor 4
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DES	engl. <i>Drug Eluting Stents</i>
dest. H ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsRed	engl. <i>Red Fluorescent Protein</i> aus <i>Discosoma striata</i>
EF	Embryonale Fibroblasten
EPCs	Endotheliale Progenitorzellen
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FEM	Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin der Charité
FKS	Fötale Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
G3BP1	Ras-GTPase-aktivierendes Protein SH3-Domäne-Bindeprotein 1
Ganc	Ganciclovir
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
HCASMC	engl. <i>Human Coronary Artery Smooth Muscle Cell</i>
HEK	engl. <i>Human Embryonic Kidney</i>
HUVEC	engl. <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
INF γ	Interferon- γ
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
KOR	Opioidrezeptor κ 1
LIF	engl. <i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
loxP	engl. <i>locus of cross-over (x) in Bacteriophage P1</i>
mAK	monoklonaler Antikörper
MEF	Murine Embryonale Fibroblasten
min	Minute
MM6	Mono Mac 6
MOR	Opioidrezeptor μ 1
NAC	N-Acetyl-L-Cystein
Neo	Neomycin
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
PCR	engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
Pen	Penicillin
PTCA	Perkutane Transluminale Koronarangioplastie
RNA	Ribonukleinsäure

RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S.E.M.	<i>engl. Standard Error of the Mean</i>
Strep	Streptomycin
Tab.	Tabelle
TK	Thymin Kinase
upm	Umdrehungen pro Minute
X-Gal	Substrat der β -Galactosidase, 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-Galactopyranosid

Zusammenfassung

Die Restenose stellt ein zentrales Problem der interventionellen Kardiologie dar und ist häufigste Komplikation nach perkutanen Angioplastieverfahren. Hauptursache dieser Wiederverengung des Gefäßes ist die Entstehung einer Intimahyperplasie (Neointima) durch die Proliferation transdifferenzierter vaskulärer glatter Muskelzellen und deren Sekretion von extrazellulärer Matrix. Die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und die Entzündungsreaktion nach der Gefäßverletzung werden als frühe, die Neointimabildung induzierende Prozesse diskutiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Projekte bearbeitet, die Aufschluss über die während der Neointimabildung statt findenden Prozesse geben sollen.

Mit Hilfe eines Verletzungsmodells der murinen Femoralarterie wurde der Einfluss der Entzündung und der ROS-Bildung auf die Neointimabildung in der Maus untersucht. Die Behandlung mit dem mitochondrialen Superoxiddismutase-Mimetikum MitoTEMPO verminderte die Bildung der Neointima besser, als die Behandlung mit dem globalen ROS-Fänger N-Acetylcystein. Die stärkste Hemmung der Neointimabildung wurde jedoch durch die Immunsuppression mit Rapamycin erreicht.

Interferon- γ (INF γ) ist ein wichtiges Zytokin der Th1-Immunantwort, das in Folge der Gefäßverletzung freigesetzt wird und die proinflammatorischen Chemokine CXCL9 (MIG, *Monokine Induced by INF*), CXCL10 (IP-10, *INF inducible Protein of 10 kDa*) und CXCL11 (I-TAC, *Interferon inducible T cell-Chemoattractant*) induziert. CXCL9, CXCL10 und CXCL11 sind Liganden des CXCR3-Chemokinrezeptors 3 (CXCR3) und locken chemotaktisch CXCR3 positive Entzündungszellen zum Ort der Gefäßverletzung. Daher wurde die spezielle Bedeutung des Chemokins CXCL10 in der Restenose untersucht. Dazu wurden CXCL10-defiziente Mäuse dem Femoralisverletzungsmodell unterzogen und die Gefäße nach 14 Tagen morphometrisch und immunhistologisch untersucht. CXCL10-Defizienz führte in Mäusen zu einer verminderten Neointimabildung, die mit einer verringerten Entzündungsreaktion, Apoptose und Proliferation im verletzten Gefäß korrelierte. Neben der Entzündungsreaktion beeinflusst aber auch die Reendothelialisierung der verletzten Gefäßwand die Restenose. Interessanterweise war im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen in den CXCL10-Knockout-Mäusen auch die Reendothelialisierung erheblich verbessert. Offensichtlich ist das CXCR3-Chemokinsystem also in völlig unterschiedliche biologische Prozesse involviert und beeinflusst nicht nur die Bildung der Neointima durch die Förderung der Entzündung, sondern auch die Unterdrückung der Reendothelialisierung der verletzten Gefäßwand. Tatsächlich wird der CXCR3 nicht nur auf Entzündungszellen, sondern auch auf Endothelzellen exprimiert. Zur separaten Untersuchung der Rolle des CXCR3 in der Entzündung und der Reendothelialisierung wurde im Rahmen dieser Arbeit damit begonnen konditionelle CXCR3-Knockout-Mäuse zu generieren, in

denen der CXCR3 entweder in Entzündungszellen oder in Endothelzellen ausgeschaltet ist.

Zum besseren Verständnis der molekularen Mechanismen, mit denen der CXCR3 seine Funktionen vermittelt, wurde zudem untersucht ob dieser mit anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) interagiert. Die Analyse von Coimmunpräzipitaten deutet auf eine Homodimerisierung der beiden CXCR3 Splicevarianten CXCR3A und CXCR3B, sowie auf die Heterodimerbildung von CXCR3A und CXCR3B mit sich, sowie jeweils mit CCR2, CCR3, CCR5 und den Opioidrezeptoren MOR und KOR hin. Die getestete Methode des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET) erwies sich jedoch als ungeeignet zur Untersuchung von CXCR3, da dieser in HEK293T-Zellen nicht korrekt transient exprimiert wurde.

Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass das CXCR3-Chemokinsystem eine zentrale Rolle in unterschiedlichen, die Neointimabildung beeinflussenden Prozessen spielt. Damit könnten der CXCR3 und insbesondere das Chemokin CXCL10 interessante Zielmoleküle in der Entwicklung neuer verbesserter Therapien zur Verhinderung der Restenose darstellen.

Summary

Restenosis represents a central problem after coronary angioplasty procedures and is caused by intimal hyperplasia, also called neointima, as a result of transdifferentiation, proliferation of vascular smooth muscle cells and secretion of extracellular matrix. Formation of reactive oxygen species (ROS) and inflammation after vascular injury caused by angioplasty are discussed as early inducers of neointima formation. In several projects the processes causing the development of intimal hyperplasia were investigated.

First of all, the impact of inflammation and ROS in neointima formation was investigated using the mouse femoral injury model. The mitochondrial superoxide dismutase mimetic mitoTEMPO could reduce neointima formation better than the global ROS scavenger N-acetylcystein. However, the strongest reduction of neointima formation was achieved by the treatment with the immunosuppressant rapamycin.

Interferon- γ (INF γ) is a major cytokine of the Th1 immune response. It is released as a result of vessel injury and induces the proinflammatory chemokines CXCL9 (MIG, *Monokine Induced by INF*), CXCL10 (IP-10, *INF inducible Protein of 10 kDa*) and CXCL11 (I-TAC, *Interferon inducible T cell-Chemoattractant*), which are ligands of the CXC chemokine receptor 3 (CXCR3) and by this chemotactically recruit CXCR3 positive cells to the site of vessel injury. In this work the special role of CXCL10 in restenosis was investigated. Therefore, CXCL10 deficient mice underwent the mouse femoral injury model. The vessels were analysed morphometrically and immunohistologically 14 days after injury. CXCL10 deficiency lead to decreased neointima formation that correlated with a reduced recruitment of inflammatory cells as well as diminished numbers of apoptotic and proliferating cells at the site of vessel injury. In addition to inflammation the reconstitution of the endothelium has also impact on the development of restenosis. Interestingly reendothelialisation was strongly improved in CXCL10 deficient mice compared to wildtype mice. Obviously the CXCR3 chemokine system is involved in different biological processes and impairs neointima formation on one hand by the advancement of inflammation and on the other hand by the suppression of reendothelialisation. In fact the CXCR3 is not only expressed on inflammatory cells but also on endothelial cells. To investigate the role of CXCR3 in inflammation and reendothelialisation separately the generation of conditional CXCR3 knockout mice with a CXCR3 knockout in T-cells or endothelial cells was started in an additional project.

For a better understanding of the molecular mechanisms on which the CXCR3 mediates its biological functions the protein-protein interactions of the CXCR3 with other G-protein coupled receptors (GPCR) was analysed. Coimmunoprecipitation showed homodimerization of the CXCR3

splice variants CXCR3A and CXCR3B, as well as heterodimerization of CXCR3A and CXCR3B with each other and with the chemokine receptors CXCR4, CCR2, CCR3, CCR5 and the opioid receptors MOR and KOR. The additional tested fluorescence resonance energy transfer (FRET) method proved to be not suitable to measure interactions of CXCR3, since this receptor could not be expressed correctly on the cell surface after transient transfection.

To summarise, the results indicate that the CXCR3 chemokine system plays a central role in different processes that mediate neointima formation. Thus, the CXCR3 and especially the chemokine CXCL10 could be interesting therapeutic targets in the development of new or improved treatments to reduce the risk of restenosis.

1 Einleitung

1.1 Arterien

Arterien transportieren Blut vom Herzen zur Körperperipherie und gewährleisten die Versorgung mit Sauerstoff und Metaboliten. Je nach Lokalisation und spezieller Funktion unterscheidet man hauptsächlich zwei Bautypen großer Arterien: den elastischen Typ (*Arteriae elastotypicae*) und den muskulären Typ (*Arteriae myotypicae*). Die Arterien elastischen Bautyps befinden sich herznah und sind in der Lage durch ihre elastischen Dehnungseigenschaften, der sogenannten Windkessel-funktion, den vom Herzen erzeugten pulsatilen Blutfluss in eine quasi-kontinuierliche Strömung umzuwandeln. Das Auftreten von Atherosklerose beeinträchtigt diese Funktion und kann zu Bluthochdruck, erhöhter Herzarbeit und Aneurysmen führen. Zur Körperperipherie gehen die elastischen Arterien in muskuläre Arterien über. Diese kleineren Arterien sind durch ihre glatte Muskulatur maßgeblich an der Aufrechterhaltung des Blutdrucks und der Verteilung des Blutes zwischen den Geweben beteiligt. Grundsätzlich ist die Gefäßwand von Arterien aus drei Schichten aufgebaut (Abb. 1.1). Das Lumen wird von der *Tunica Intima* (Intima) ausgekleidet, die aus einem einschichtigen Endothel, einer Schicht aus lockerem Bindegewebe und der *Lamina elastica interna* (LEI) besteht. Daran schließt sich die *Tunica Media* (Media) an. Bei den muskulären Arterien besteht die Media aus mehreren Schichten vaskulärer glatter Muskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMC) und elastischen Fasern. Die Media elastischer Arterien besitzt hingegen mehr Kolla-

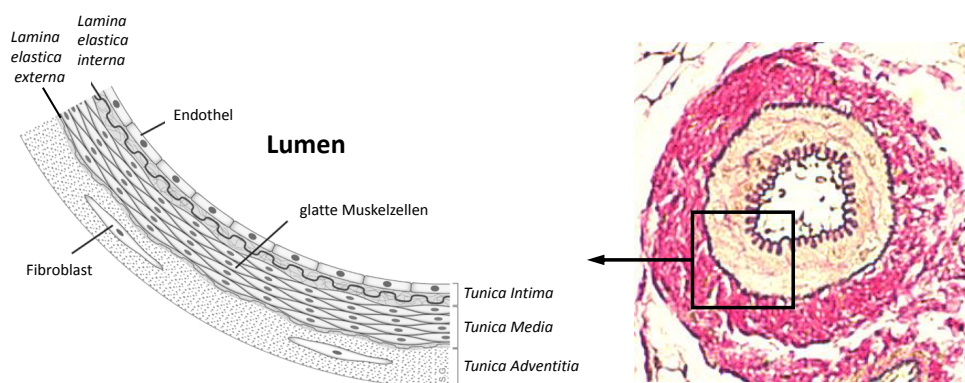


Abbildung 1.1: Anatomischer Aufbau von Arterien am Beispiel des muskulären Typs. Vom Lumen ausgehend besteht die Arterienwand aus den Schichten *Tunica Intima*, *Tunica Media* und *Tunica Adventitia*. Die *Tunica Media* wird von der *Tunica Intima* durch die *Lamina elastica interna* und von der *Tunica Adventitia* durch die *Lamina elastica externa* abgegrenzt.

gen und die *Lamina elastica externa* (LEE), die im Flachschnitt ein gefenstertes Erscheinungsbild besitzt und die Media von der *Tunica Adventitia* (Tunica) abgrenzt. Diese äußerste Schicht besteht hauptsächlich aus Fibroblasten, elastischem und kollagenem Bindegewebe, sowie bei größeren Arterien die *Vasa vasorum*, ein Netzwerk kleinster Arterien und Venen, und vegetativen Nerven. Koronararterien gehören zu den Arterien muskulären Typs.

1.2 Die Koronare Herzkrankheit

Kardiovaskuläre Erkrankungen, insbesondere die koronare Herzkrankheit (KHK) gehören zu den häufigsten Todesursachen in den Industrienationen [Roger *et al.*, 2011]. Den Boden für die Manifestierung der KHK bereiten atherosklerotische Veränderungen der Koronararterien, deren Entstehung ein multifaktorieller und progressiver Prozess ist. Als Risikofaktoren, die die Entstehung der Atherosklerose begünstigen können, gelten metabolische Faktoren, wie Hyperlipidämie, Hyperhomozysteinämie, Glukoseintoleranz und andere Risikofaktoren, wie arterielle Hypertonie, Rauchen, Alter und Geschlecht.

Zu Beginn des atherosklerotischen Prozesses steht eine Schädigung des Gefäßwandendothels. Gemäß der *Response-to-injury*-Hypothese nach Ross [1999] ergeben sich aus dieser endothelialen Dysfunktion zwei Konsequenzen: Einerseits die erhöhte Permeabilität des Endothels, andererseits dessen Aktivierung, die zur Bildung von Adhäsionsmolekülen und der Freisetzung von Zytokinen führt. Daraufhin tritt *Low-density*-Lipoprotein (LDL) aus der Blutbahn in das umliegende Gewebe über [Fan und Watanabe, 2003], wird dort oxidiert und vermittelt die Aktivierung der Proteinkinase C und NF- κ B [Gonzalez und Selwyn, 2003], die wiederum weitere proinflammatorische und proadhäsive Vorgänge steuern. Infolge der verstärkten Expression adhäsiv wirkender endothelialer Oberflächenproteine kommt es zur gesteigerten Diapedese von Monozyten, Makrophagen und T-Zellen in das umliegende Gewebe. Die Makrophagen nehmen große Mengen an subintimal gelegenen Lipiden in ihr Zellinneres auf und nehmen die Gestalt von sogenannten Schaumzellen (*foam cells* oder *fatty streaks*) an. Im Inneren der Makrophagen werden die Lipide zersetzt, an die Zelloberfläche transportiert und als Antigene präsentiert. Hierdurch angelockt greifen T-Zellen in das Geschehen ein und lagern sich an die Schaumzellen an. T-Zellen, Makrophagen und Endothelzellen setzen dann verschiedene Zytokine und Chemokine frei [Fan und Watanabe, 2003; Braunersreuther *et al.*, 2007], die die Transdifferenzierung von VSMC verursachen. Diese VSMC sind in der Lage zu proliferieren und migrieren aus der Media in die Intima des Gefäßes [Gimbrone, 1999]. Dort sezernieren diese transdifferenzierten VSMC große Mengen extrazellulärer Matrix (EZM) [Braunersreuther *et al.*, 2007] und tragen entscheidend zur Obstruktion des Gefäßes bei. Das Fortschreiten dieses Prozesses führt letztendlich zu flusslimitierenden Koronarstenosen und Sauerstoffunterversorgung der Herzmuskulatur. Die Folge sind akute Koronarsyndrome, wie die instabile Angina pectoris. Die Ruptur eines atherosklerotischen Plaques und die anschließende Anlagerung von Thrombozyten kann zum vollständigen Verschluss des Gefäßes und dem akuten Myokardinfarkt führen (Abb. 1.2).

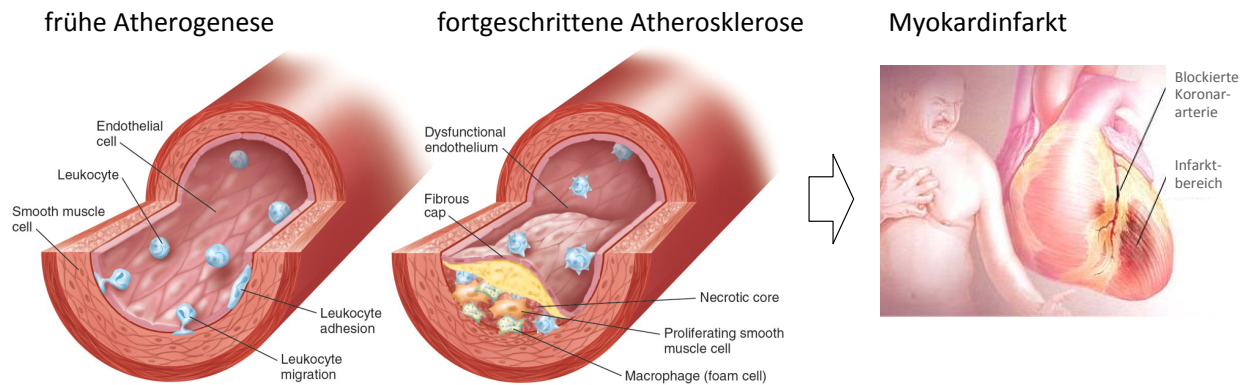


Abbildung 1.2: Atherosklerose als häufigste Ursache der koronaren Herzkrankheit (KHK). In der frühen Atherogenese begünstigt die endotheliale Dysfunktion die Infiltration von Leukozyten. Im weiteren Verlauf bildet sich u. a. durch die Proliferation glatter Muskelzellen ein atherosklerotischer Plaque, der zunehmend das Gefäßlumen verengt, den Blutfluss beeinträchtigt. Die Ruptur des atherosklerotischen Plaques mit Anhaftung von Blutplättchen führt zum akuten Myokardinfarkt (modifiziert nach Mendelsohn und Karas [2005]).

Im Jahre 1977 wurde weltweit die erste perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) durchgeführt, bei der mit Hilfe eines Ballonkatheters im Bereich der Stenose eine Dilatation verursacht und ein ungehinderter Blutfluss wiederhergestellt wird [Gruntzig *et al.*, 1979]. Diese nicht-chirurgische Methode revolutionierte die Behandlung symptomatischer Koronarstenosen und verdrängte in den folgenden Jahren zunehmend die weitaus invasivere Bypasschirurgie. Der langfristige Erfolg der PTCA wird jedoch durch das Auftreten der Restenose gemindert; einer Reaktion der Gefäßwand auf die durch die Intervention erfolgte Verletzung, die innerhalb von 6 Monaten nach primär erfolgreicher PTCA zu einer erneuten Verengung des Gefäßdurchmessers von 50 % führt. Anfänglich lag die Restenoserate bei bis zu 40 % [Horlitz *et al.*, 2002; Arjomand *et al.*, 2003]. Durch die Implantation intrakoronarer *Bare-Metal*-Stents konnte das Risiko der Restenose auf etwa 30 % reduziert werden [Fischman *et al.*, 1994; Serruys *et al.*, 1994]. Weiterhin brachte die Einführung Medikamente-freisetzender Stents (*drug eluting stents*, DES) eine Verbesserung. So konnte die Restenoserate durch den Einsatz von DES, die das Makrolidantibiotikum Rapamycin freisetzen, auf weniger als 10 % reduziert werden [Moses *et al.*, 2003; Kastrati *et al.*, 2005].

1.3 Intimahyperplasie und Restenose

Die Pathophysiologie der Restenose ist komplex und noch nicht vollständig verstanden. Es werden unter anderem der elastische Rückstoß (*Recoil*) des Gefäßes innerhalb einer Stunde nach der PTCA und die negativen vaskulären Gefäßwandveränderungen, die in den ersten sechs Monaten postinterventionell stattfinden (*negative Remodeling*), als Restenose-beeinflussende Mechanismen diskutiert. Diese Faktoren zur Wiederverengung des Gefäßlumens können durch den Einsatz von Stents jedoch ausgeschlossen werden. Über 90 % des Lumenverlustes nach PTCA mit Stentimplantation

sind daher auf die Bildung der Intimahyperplasie (Neointima) zurückzuführen [Mintz *et al.*, 1996]. Die Neointima besteht hauptsächlich aus proliferierenden glatten Muskelzellen und EZM [Komatsu *et al.*, 1998; Oesterle *et al.*, 1998].

Generell wird die Restenose als arterieller Heilungsprozess nach der durch die Intervention verursachten Verletzung verstanden [Schwartz und Henry, 2002]. Der zeitliche Verlauf dieses Remodellierungsprozesses kann in vier Phasen unterteilt werden [Komatsu *et al.*, 1998; Poon *et al.*, 2002]. In *Phase I* führt die durch die Stentimplantation hervorgerufene Denudation und Plaqueruptur des Gefäßwandendothels zur Freilegung subendothelialer Gefäßschichten. Der Verletzungsreiz aktiviert die Blutgerinnung und induziert die Thrombozytenablagerung, -aktivierung und Thrombusformation. Weiterhin werden mononukleäre Zellen chemotaktisch zum Ort der Verletzung rekrutiert (*Phase II*). Durch die Freisetzung chemotaktisch und proliferativ wirkender Botenstoffe wird die Transdifferenzierung, Proliferation und Emigration glatter Muskelzellen aus der Media in die Intima stimuliert (*Phase III*). Schließlich führt in *Phase IV* die übermäßige Produktion extrazellulärer Matrix (EZM) durch transdifferenzierte glatte Muskelzellen zur Intimahyperplasie und Restenose [Farb *et al.*, 1999; Virmani und Farb, 1999].

Das Ausmaß der Neointimabildung wird von einer Reihe weiterer Prozesse beeinflusst, wie der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies [Malik *et al.*, 1998], der Entzündungsreaktion [Rogers *et al.*, 1996], der verzögerten Wiederherstellung des Gefäßwandendothels [Joner *et al.*, 2006] und der Rekrutierung von aus dem Knochenmark stammenden Vorläuferzellen [Dimmeler und Zeiher, 2004]. Auf die Bedeutung dieser Prozesse wird in den nächsten Kapiteln im Einzelnen eingegangen.

1.4 Endotheliale und Hämatopoetische Vorläuferzellen in der Intimahyperplasie

Als Ursache für die Intimahyperplasie nach Koronarinterventionen wird unter anderem die verzögerte Reendothelialisierung der Gefäßwand diskutiert [Joner *et al.*, 2006]. Als entscheidender Mechanismus zur Wiederherstellung eines intakten Endothels nach der Gefäßverletzung gilt daher die Rekrutierung endothelialer Progenitorzellen (EPC) aus dem Knochenmark [Dimmeler und Zeiher, 2004]. Knochenmarkstransplantationsexperimente mit Mäusen belegen, dass zirkulierende EPC aus dem Knochenmark an den Ort der Gefäßverletzung rekrutiert werden und eine schnellere Reendothelialisierung unterstützen [Walter *et al.*, 2002; Werner *et al.*, 2002]. Weitere Studien belegen aber auch, dass hämatopoetische Progenitorzellen (HPC) am Ort der Gefäßverletzung zu VSMCs differenzieren und durch Proliferation und Sekretion von EZM erheblich zur Entstehung der Neointima beitragen können [Sata *et al.*, 2002; Yokote *et al.*, 2003; Zerneck *et al.*, 2005]. So besteht die Neointima verletzter muriner Gefäße bis zu 63 % und die Media bis zu 45 % aus Zellen, die aus Knochenmark stammen [Sata *et al.*, 2002]. Das CXC-Chemokin SDF-1 α , welches durch den Chemokinrezeptor CXCR4 gebunden wird, spielt eine wesentliche Rolle in der Mobilisierung und Rekrutierung zirkulierender Progenitorzellen aus dem Knochenmark [Kucia *et al.*, 2004]. In Genexpressionsanalysen

humaner Neointima wurden Marker für HPC wie CXCR4, Integrin beta 7 und CD13 identifiziert [Zohlhofer *et al.*, 2001b]. Tatsächlich führte die Hemmung von SDF-1 α im Tiermodell zur signifikanten Reduktion der Neointimabildung [Zernecke *et al.*, 2005]. Andererseits wurde in neueren Studien durch die Injektion CXCR4-überexprimierender EPC in Nacktmäusen eine verbesserte Reendothelialisierung von verletzten Carotisarterien beobachtet [Chen *et al.*, 2010]. Die genauen Mechanismen der Rekrutierung und Differenzierung zirkulierender Vorläuferzellen sind daher noch völlig unklar. Auch die Definition der Oberflächenmarker von EPC ist bisher noch nicht einheitlich, was Vergleiche zwischen den Ergebnissen einzelner Gruppen erschwert. Zudem exprimieren EPC und HPC, die beide vom Hämangioblasten abstammen [Choi, 2002], zum größten Teil die gleichen Oberflächenmarker, wie VEGFR2 (*Vascular Endothelial Growth Factor 2*), Tie-2, CD133, CD34, c-Kit und CD31, sodass sie praktisch kaum voneinander unterschieden werden können [Ribatti, 2007].

1.5 Bedeutung der Entzündungsreaktion in der Intimahyperplasie

Ergebnisse präklinischer Studien zeigten, dass die Infiltration von Monozyten und Makrophagen nach der Stentimplantation mit der Entstehung der Restenose assoziiert ist und mit deren Ausmaß korreliert [Rogers *et al.*, 1996; Kornowski *et al.*, 1998]. Im Rahmen der Leukozytenmigration (Leukodiapedese) vermitteln Integrine und Integrinrezeptoren auf der Zelloberfläche die Adhäsion der Leukozyten an das Endothel und deren transzelluläre Migration aus dem Gefäßlumen in das umliegende Gewebe. In verschiedenen tierexperimentellen Ansätzen konnte durch die Inhibition verschiedener leukozytärer und endothelialer Zelladhäsionsmoleküle, wie P-Selektin, ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) und LFA-1 (*Lymphocyte Function-Associated Antigen-1*) die Entzündungsreaktion unterdrückt werden und die Intimahyperplasie deutlich reduziert werden [Yasukawa *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 1997; Rogers *et al.*, 1998]. Die morphologische Untersuchung von 87 humanen Koronararterien nach einer Stentimplantation zeigte, dass die Stärke der Gefäßwandverletzung insbesondere der Media, mit der Stärke der dadurch induzierten Entzündungsreaktion und dem Ausmaß der daraus resultierenden Intimahyperplasie korreliert [Farb *et al.*, 2002].

Die Genexpressionsanalyse humaner Neointima aus In-Stent-Restenosen belegt die Aktivierung allgemein pro-inflammatorischer Faktoren wie Cyclooxygenase-1 und dem 70-kDa Heat Shock Protein B (HSP70B), sowie eine erhöhte Expression 37 Interferon- γ (INF γ) assoziierter Gene [Zohlhofer *et al.*, 2001a]. INF γ ist ein wichtiges Signalmolekül in der Th1 Immunantwort und wird hauptsächlich von natürlichen Killer Zellen (NK) und T-Zellen sezerniert [Luster *et al.*, 1985]. Die Bedeutung des INF γ -Signalwegs für die Entstehung der Neointima konnte im Mausmodell gezeigt werden. So wiesen INF γ -Rezeptor^{-/-} Mäuse nach Ligatur der *A. carotis* im Vergleich zu Wildtypmäusen eine signifikant verminderte Neointimaformation und Mediaproliferation auf [Zohlhofer *et al.*, 2001b].

1.6 Oxidativer Stress und Apoptose in der Intimahyperplasie

1.6.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *Reactive Oxygen Species*) spielen eine zentrale Rolle in der Physiologie und Pathophysiologie von Gefäßen [Griendling und FitzGerald, 2003]. In physiologischen Konzentrationen fungieren intrazellulär gebildete ROS als *Second messenger* in biochemischen Signalwegen wie beispielsweise Wachstum und Differenzierung von VSMCs [Finkel, 2003]. Höhere ROS-Konzentrationen unter pathophysiologischen Bedingungen sind jedoch toxisch und führen zu oxidativem Stress und Apoptose von ECs und SMCs [Niwa *et al.*, 2002; Deshpande *et al.*, 2002]. So ist das normalerweise durch die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) gebildete Stickstoffmonoxidradikal ($\text{NO}\cdot$) ein wichtiger Mediator der Vasodilatation. Während inflammatorischer Prozesse im Gefäß kann die NOS-Expression aber auch in Makrophagen und VSMCs induziert werden und zur erhöhten $\text{NO}\cdot$ Produktion beitragen. Neben $\text{NO}\cdot$ sind das Superoxidanionradikal (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Peroxynitritanionradikal (ONOO^-) die wichtigsten Sauerstoffintermediate. O_2^- entsteht durch Eielektronenübertragung auf Sauerstoff (O_2). Dieses kann, katalysiert durch die Nikotinamid-Adenindinukleotid-(Phosphat)-Oxidase (NAD(P)H-Oxidase), die Xanthin-Oxidase (XO) oder auch die Enkopplung der NOS erfolgen [Madamanchi *et al.*, 2005]. Unkatalysiert kann O_2^- durch die Reaktion mit redoxaktiven Komponenten der Atmungskette entstehen [Droge, 2002]. Zusammen mit $\text{NO}\cdot$ kann O_2^- das ONOO^- bilden, welches vor allen bei der Nitrierung von Proteinen und der Oxidation von Lipiden Bedeutung hat. Die Oxidation von LDL (*Low Density Lipoprotein*) etwa hat einen starken proatherogenen Effekt [Navab *et al.*, 1996]. Durch die Umsetzung von H_2O_2 und Chloridionen (Cl^-) durch die Myeloperoxidase (MPO) entsteht hypochlorige Säure (HOCl) [Foote *et al.*, 1983], die mit O_2^- zu Hydroxylradikalen ($\text{HO}\cdot$) reagieren kann [Herdener *et al.*, 2000]. Weiterhin können $\text{HO}\cdot$ durch verschiedene Metallionen-katalysierte Haber-Weiss-Reaktionen entstehen, wie z. B. der Reaktion von H_2O_2 mit Eisen-(II)-Ionen (Fe^{2+}) zu $\text{HO}\cdot$, HO^- und Fe^{3+} , der sogenannten Fenton Reaktion [Kehrer, 2000].

Unter normalen physiologischen Bedingungen katalysieren Superoxid-Dismutasen (SODs) die Umsetzung von zwei O_2^- zu O_2 und dem weniger schädlichen H_2O_2 [Fridovich, 1978]. Dieses wiederum wird durch die Katalase oder die Glutathion-Peroxidase zu O_2 und H_2O disproportioniert. Des Weiteren können ROS auch durch nichtenzymatische Antioxidantien wie Glutathion, Ascorbat und α -Tocopherol unschädlich gemacht werden.

1.6.2 ROS und Apoptose in der Intimahyperplasie

In der frühen Immunantwort des Gefäßes auf eine Verletzung wird eine übermäßige O_2^- -Bildung induziert, die mit einer drastischen Abnahme des Glutathionspiegels und einer gleichzeitig erhöhten Apoptoserate medialer VSMCs einhergeht [Li *et al.*, 1997; Souza *et al.*, 2000]. Durch die Verabreichung verschiedener Antioxidantien wie beispielsweise N-Acetylcystein (NAC) konnte dem Glutathionverlust und der Apoptose medialer SMCs entgegengewirkt werden [Pollman *et al.*, 1999]. Ein

erhöhte Apoptoserate wurde weiterhin mit einer erhöhten Neointimabildung assoziiert [Malik *et al.*, 1998]. So konnte auch die Neointimaformation durch Verabreichung von Antioxidantien im Rattenmodell signifikant reduziert werden [Hayashi *et al.*, 2001; Kappert *et al.*, 2006; de Graaf *et al.*, 2009]. Neben NAC führte auch die Verabreichung des SOD-Mimetikums TEMPOL (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) [Krishna *et al.*, 1996] zu einer reduzierten Neointimabildung im Rattenmodell [Jagadeesha *et al.*, 2005; Kappert *et al.*, 2006].

NAC reagiert hauptsächlich mit HOCl, (HO·) und H₂O₂ [Aruoma *et al.*, 1989]. Des Weiteren ist NAC eine L-Cysteinquelle und stimuliert als wichtige Vorstufe des Glutathions dessen Synthese [Ruffmann und Wendel, 1991; Marthaler und Keresztes, 2004]. TEMPOL hingegen reagiert stromaufwärts des H₂O₂ mit ·OOH, der protonierten Form des O₂⁻ zu H₂O₂ und Oxoammonium. Diese kationische Form des TEMPOL reagiert mit O₂⁻ wieder zu TEMPOL und O₂ [Krishna *et al.*, 1992] (Abb. 1.3).

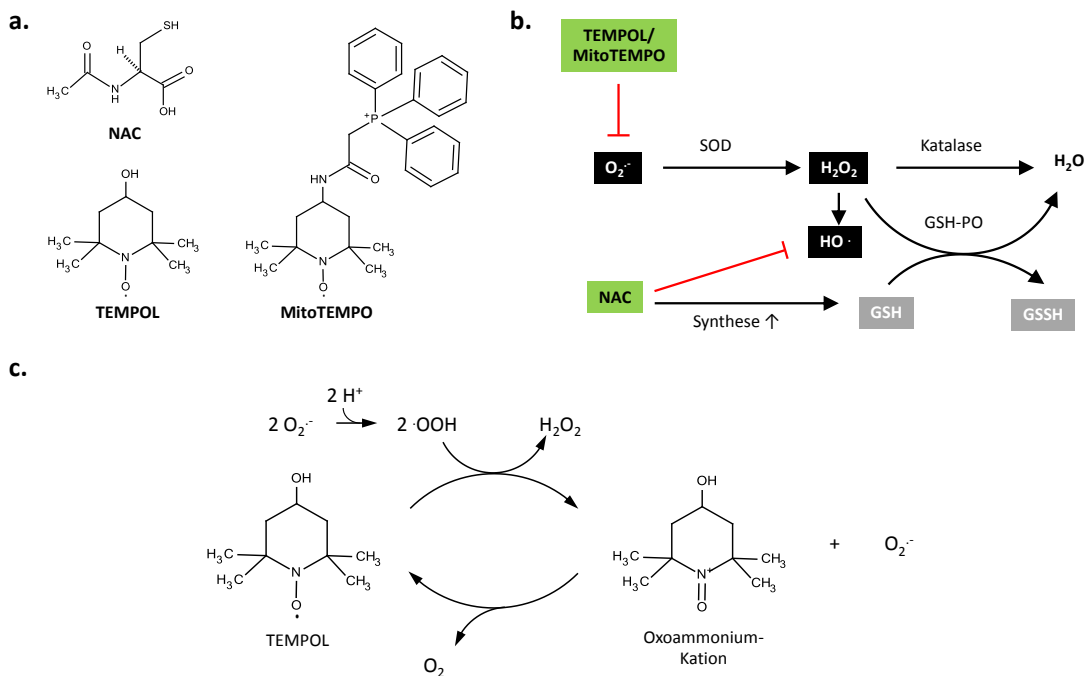


Abbildung 1.3: NAC, TEMPOL und MitoTEMPO. a. Chemische Strukturformeln von NAC, TEMPOL und MitoTEMPO; b. Angriffspunkte der Antioxidantien. NAC reagiert hauptsächlich mit H₂O₂ und dient als Präkursor der Glutathionsynthese. Das SOD-Mimetikum TEMPOL/MitoTEMPO reagiert mit O₂⁻; c. Reaktionszyklus von TEMPOL zur Umsetzung von O₂⁻ zu H₂O₂ und O₂, nach Chen *et al.* [2003].

1.6.3 Mitochondriale Dysfunktion

Der größte Teil der intrazellulären ROS wird im Mitochondrium generiert. Der ROS-Bildung im Mitochondrium wird eine zentrale Rolle in der Entstehung kardiovaskulärer Krankheiten zugesprochen. Dabei entsteht durch eine Dysfunktion in der Elektronentransportkette hauptsächlich O₂⁻. Die Manganhaltige-SOD (MnSOD) stellt den ersten Schritt in der Abwehr des O₂⁻ in der

mitochondrialen Matrix dar und setzt dieses zu H_2O_2 um [Chance *et al.*, 1979]. MnSOD defiziente Mäuse starben innerhalb der ersten 10 Lebensstage und zeigten eine ausgeprägte dilatative Kardiomyopathie [Li *et al.*, 1995]. Neben der Disproportionierung von O_2^- durch die MnSOD stellt die Umsetzung des H_2O_2 durch die GSH-Peroxidase oder die Katalase den nächsten wichtigen Abwehrmechanismus dar. Interessanterweise konnte im Mausmodell die Überexpression der Katalase die ROS induzierte kardiovaskuläre Mortalität und somit die Lebensspanne von Mäusen nur dann verlängern, wenn diese in Mitochondrien überexprimiert wurde [Schriner *et al.*, 2005]. Es wurde zudem gezeigt, dass die mitochondriale O_2^- -Bildung zur Entstehung der arteriellen Hypertonie beiträgt, und dass antioxidative Strategien, die die mitochondriale ROS-Bildung spezifisch hemmen, Hypertonie und andere kardiovaskuläre Risikofaktoren reduzieren können [O'Connor und Gutterman, 2010; Dikalova *et al.*, 2010]. Antioxidantien, die zielgerichtet mitochondriale ROS inhibieren, könnten daher von großem therapeutischen Nutzen sein [Griffiths, 2012]. Die Kopplung lipophiler Kationen wie Triphenylmethylphosphonium (TPMP) an Antioxidantien (Abb. 1.3a) führt selektiv zur Akkumulation in der inneren Mitochondrienmembran. Einerseits wird die positive Ladung des Kations vom negativen Membranpotential der inneren Mitochondrienmembran (-140 mV) angezogen, andererseits ermöglichen die lipophilen Eigenschaften des TPMP und seine geringe Größe das Passieren von Phospholipiddoppelschichten ohne die Hilfe von Ionophoren [Murphy und Smith, 2000; Ross *et al.*, 2005].

1.7 Chemokine und ihre Bedeutung in der Intimahyperplasie

1.7.1 Bedeutung und Klassifizierung des Chemokinsystems

Chemokine sind kleine Signalmoleküle, die an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt sind und die Entwicklung der Homöostase des Immunsystems, das hämatopoetische System und die unspezifischen Abwehr regulieren. Sie unterscheiden sich von anderen Zytokinen durch die Eigenschaft Zellen chemotaktisch anzulocken (*chemotaktische Zytokine*). Bis heute wurden rund 50 Chemokine und 20 Chemokin-Rezeptoren identifiziert. Chemokine bestehen aus 70-125 Aminosäuren (AS) und besitzen ein Molekulargewicht von sechs bis 14 kDa [Kim und Broxmeyer, 1999]. Die Sekundärstruktur der meisten Chemokine ist durch zwei Disulfidbrücken charakterisiert, die von vier Cysteinen ausgebildet werden. Man unterteilt die Chemokine in CC, CXC und CX3C-Chemokine abhängig von der Zahl (X) der AS, die sich zwischen den ersten beiden Cysteinen im N-terminalen Bereich befinden [Zlotnik und Yoshie, 2000]. Abhängig von der Anwesenheit des N-terminalen Tripeptids Glutamat-Leucin-Arginin (ELR-Motif) werden die CXC-Chemokine weiter unterteilt. ELR-positive CXC-Chemokine gelten als potente Promotoren der Angiogenese, während ELR-negative CXC-Chemokine zumeist eine antiangiogenetische Wirkung besitzen [Strieter *et al.*, 1995]. Die Wirkung der Chemokine wird durch die Interaktion mit Chemokinrezeptoren vermittelt, deren Klassifizierung analog zur Klasse der gebundenen Chemokine erfolgt [IUIS/WHO Subcommittee on Chemokine Nomenclature, 2003].

Chemokinrezeptoren sind heptahelikale Transmembranrezeptoren und gehören zur Familie der rhodopsinähnlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Sie bestehen meist aus 340-370 AS mit einer Homologie von 25-80 % [Olson und Ley, 2002]. Ursprünglich wurde angenommen das Chemokinsystem sei redundant und überlappend, da stets mehrere Chemokine einer Klasse vom selben Rezeptor gebunden werden und jedes Chemokin von mehr als einem Rezeptor gebunden werden kann [Allen *et al.*, 2007]. Einigen Chemokinen, darunter die CXCR3-Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11, konnte jedoch in jüngeren Arbeiten funktionelle Spezifität nachgewiesen werden, sodass man mittlerweile annimmt, dass die Redundanz des Chemokinsystems doch nicht so stark ausgeprägt ist, wie anfangs angenommen wurde [Kouroumalis *et al.*, 2005; Zidar, 2011]. Bereits von einer Vielzahl der Chemokinrezeptoren wurde gezeigt, dass diese Homomere und/oder Heteromere bilden. Es wird vermutet dass zwischen den Rezeptoren eine Dynamik herrscht, die das Potential der Feinregulationen im Chemokinsystem enorm erweitert [Scholten *et al.*, 2012].

Funktionell wird hauptsächlich zwischen inflammatorischen und homöostatischen Chemokinen und Chemokinrezeptoren unterschieden (Abb. 1.4). Inflammatorische Chemokine werden durch proinflammatorische Zytokine induziert und regulieren wichtige Prozesse in der Immunantwort. Diese Gruppe von Chemokinen bewirkt die Rekrutierung von Effektorzellen, wie z.B. neutrophilen Granulozyten, aktivierten T-Zellen oder NK-Zellen, an den Ort der Entzündung. Homöostatische Chemokine und Chemokinrezeptoren werden hingegen konstitutiv in den lymphatischen Organen exprimiert und sind am regulären Leukozytentransport beteiligt. Weiterhin gibt es atypische Chemokinrezeptoren die als negative Regulatoren des Chemokinsystems fungieren können und virale Chemokine und Chemokinrezeptoren, die es Pathogenen ermöglichen sich in eukaryotischen Zellen zu etablieren [Beisser *et al.*, 2002; Ulvmar *et al.*, 2011].

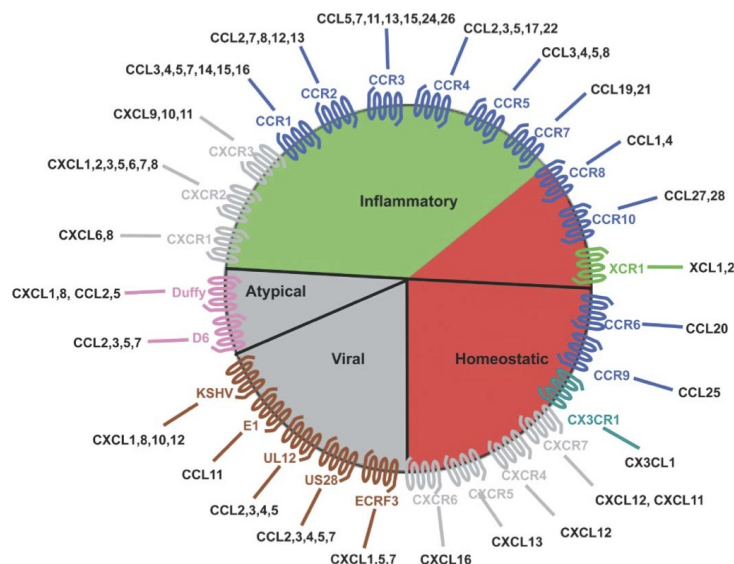


Abbildung 1.4: Chemokine und Chemokinrezeptoren. Dargestellt sind bisher bekannte Vertreter des Chemokinsystems. „Inflammatorisch“, inflammatorische; „homeostatisch“, homöostatische; „atypisch“, atypische; „viral“, virale; nach Balkwill [2012]

1.7.2 Das CXCR3-Chemokinsystem

Die Rekrutierung und Akkumulation von Leukozyten und anderen zirkulierenden Zellen spielt eine wesentliche Rolle in zahlreichen entzündlichen Erkrankungen und wird von Chemokinen vermittelt [Gerard und Rollins, 2001; Godessart, 2005]. In Folge einer Gefäßverletzung wird $INF\gamma$ freigesetzt und induziert die Expression der non-ELR Chemokine CXCL9 (MIG, *Monokine Induced by $INF\gamma$*), CXCL10 (IP-10, *$INF\gamma$ inducible Protein of 10 kDa*) und CXCL11 (I-TAC, *Interferon-inducible T cell α -Chemoattractant*) [Luster und Ravetch, 1987; Cole *et al.*, 1998; Kaplan, 2001]. Durch die Ausbildung eines chemotaktischen Konzentrationsgradienten vermitteln diese die Rekrutierung und Aktivierung CXCR3 positiver Monozyten und T-Lymphozyten, aber auch hämatopoetischer Progenitorzellen (HPC) zum Ort der Gefäßverletzung und stimulieren deren Adhäsion und Aggregation [Mach *et al.*, 1999; Jinqun *et al.*, 2001; Okamoto *et al.*, 2008]. In einer Reihe von Versuchen konnte CXCR3 in direkten Zusammenhang mit der Rekrutierung von T-Lymphozyten gebracht werden. So führte die Blockade des CXCR3-Signalwegs durch die Behandlung mit inhibierenden Antikörpern oder CXCR3 Antagonisten zur verminderten Rekrutierung von T-Lymphozyten [Xie *et al.*, 2003; Hyun *et al.*, 2005; van Wanrooij *et al.*, 2008].

Mittlerweile belegen zahlreiche Studien, dass eine erhöhte Expression des CXCR3 bzw. seiner Liganden mit der Entstehung atherosklerotischer Läsionen [Mach *et al.*, 1999], der Abstoßung von Transplantaten [Hancock *et al.*, 2000; Melter *et al.*, 2001] und der KHK assoziiert ist [Kawamura *et al.*, 2003]. In muriner Neointima wurde eine erhöhte CXCR3-Expression beobachtet [Frank, 2005]. Interessanterweise führte die lokale Suppression von CXCL10 durch RNA-Interferenz in der *A. carotis* von Kaninchen zu einer verminderten Neointimabildung [Zuojun *et al.*, 2012].

Bisher wurden zwei alternative Splicevarianten des CXCR3 gefunden. Neben der ursprünglich entdeckten Variante CXCR3A gibt es die Variante CXCR3B, die am N-Terminus zusätzliche 52 AS besitzt. CXCR3B wird überwiegend von Endothelzellen exprimiert und agiert überraschenderweise als funktioneller Rezeptor für CXCL4 (PF4, *Platelet Derived Factor 4*), der wie CXCL9, CXCL10 und CXCL11 auch angiostatische Eigenschaften besitzt und dessen Rezeptor zuvor unbekannt war [Lasagni *et al.*, 2003]. CXCR3B werden vor allem die antiangiogenetischen Eigenschaften des CXCR3-Chemokinsystems zugesprochen, während die proliferations- und migrationsfördernde Wirkung der Chemokine über CXCR3A vermittelt wird [Lasagni *et al.*, 2003]. In neueren *in vitro* Untersuchungen konnte aber auch die chemotaktische Wirkung von CXCL4 auf CXCR3A-positive Zellen gezeigt werden [Mueller *et al.*, 2008]. Weiterhin wurde die verkürzte 101-AS-große Variante CXCR3-alt entdeckt, die höchstwahrscheinlich nur 4-5 transmembrane Helices besitzt und ausschließlich CXCL11 bindet [Ehlert *et al.*, 2004]. CXCL11 konnte *in vitro* CXCR3-alt positive Zellen chemotaktisch anlocken [Ehlert *et al.*, 2004]. Über die genauen Funktionen von CXCR3-alt ist bisher jedoch nichts bekannt.

Neben aktivierten T-Helfer-Zellen, Monozyten und Fibroblasten exprimieren auch zirkulierende HPC aus dem Knochenmark sowie Endothelzellen den CXCR3 [Jinqun *et al.*, 2000, 2001]. Es ist auch bekannt, dass die CXCR3-Liganden potente Inhibitoren der Angiogenese sind und ei-

ner schnellen Reendothelialisierung entgegenstehen. Dabei führen sie im Rahmen der späteren Entzündungsreaktion zur Hemmung der durch VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) vermittelten Migration und Proliferation von Endothelzellen [Luster *et al.*, 1995; Strieter *et al.*, 2005]. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo*-Untersuchungen belegen, dass speziell CXCL10 frühe Stadien der Angiogenese inhibiert und zur Dissoziation neu entstandener Gefäße führt [Bodnar *et al.*, 2009; Yates-Binder *et al.*, 2012]. Dabei vermittelt CXCR3 die Abspaltung cytoplasmatischer Regionen des β 3-Integrins über μ -Calpain und beeinflusst so die Adhäsion, Motilität und Migration von Endothelzellen [Satish *et al.*, 2005; Bodnar *et al.*, 2006]. Campanella *et al.* [2010] zeigten kürzlich aber, dass CXCL10 die Proliferation von Endothelzellen auch über einen CXCR3-unabhängigen Signalweg durch die Bindung an Glykosaminoglykane hemmt.

Schließlich beeinflusst CXCR3 auch die Vermittlung der ROS-Bildung durch die Hemmung der SOD über EGR-1 (*Early Growth Response Gene 1*) [Bek *et al.*, 2003] und induziert die Apoptose von Tumorzellen über einen p53-abhängigen Signalweg [Zhang *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2007].

Das differentielle Expressionsprofil der beiden Splicingvarianten des CXCR3 wurde bisher noch nicht untersucht und auch die genauen Mechanismen, die die Rekrutierung und Differenzierung der einzelnen Vorläuferzellen regulieren sind bisher nicht verstanden. Die bisherigen Untersuchungen deuten jedoch an, dass die Aktivierung der CXCR3-Chemokin-Achse eine wichtige Schnittstelle zwischen der Entzündungsreaktion, der Rekrutierung zirkulierender Progenitorzellen, der Neointimabildung sowie der Hemmung der Reendothelialisierung darstellen könnte.

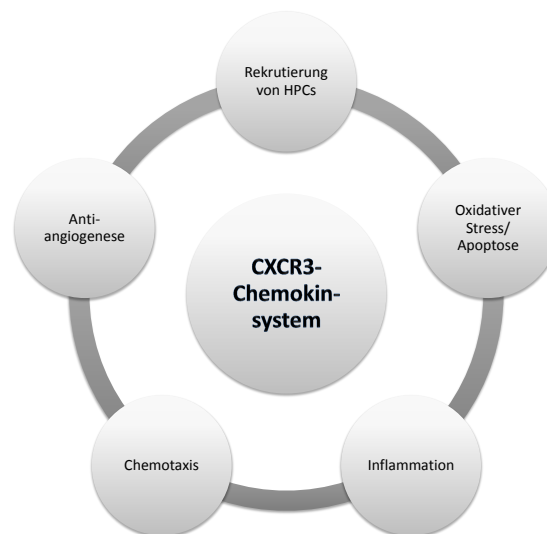


Abbildung 1.5: Das CXCR3-Chemokin-system und seine Bedeutung in biologischen Prozessen nach der Gefäßverletzung.

1.8 Rapamycin

Rapamycin ist ein makrozyklisches Lacton des *Streptomyces hygroscopicus*, der erstmals in einer Bodenprobe der Osterinseln (Rapa Nui-Inseln) identifiziert wurde und der Substanz ihren Namen gab [Vezina *et al.*, 1975]. Rapamycin hat vielversprechende immunsuppressive Wirkungen und steht seit einigen Jahren im Mittelpunkt der Restenose-therapie [Sehgal, 2003]. Rapamycin bildet in der Zelle einen Komplex mit dem FK506 Binde-Protein (FKBP-12), welcher die hochkonservierte Proteinkinase mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) inhibiert [Johnson *et al.*, 1994]. Die Serin-Threonin-Kinase mTOR ist Bestandteil eines Proteinkomplexes, der einer Vielzahl an Signalkaskaden übergeordnet ist und wichtige biologische Prozesse wie Zellwachstum, Zellzyklus, Differenzierung, Alterung und Angiogenese steuert [Zoncu *et al.*, 2011; Proud, 2011]. Rapamycin hemmt durch die Bindung an mTOR sowohl die Protein- als auch die DNA-Synthese der Zelle und arretiert den Zellzyklus in der späten G1-Phase [Terada *et al.*, 1993]. Dadurch hemmt Rapamycin die Proliferation, Motilität und Migration von SMCs [Marx *et al.*, 1995; Poon *et al.*, 1996]. In der Humanmedizin findet Rapamycin als Medikamentenbeschichtung von Stents Anwendung und reduziert die Restenoserate auf weniger als 10 % [Moses *et al.*, 2003; Kastrati *et al.*, 2005]. Allerdings geht die Behandlung mit dem erhöhten Risiko einer späten Stentthrombose einher [McFadden *et al.*, 2004; Iakovou *et al.*, 2005]. Mögliche Ursache könnte die antiangiogenetische Wirkung von Rapamycin sein, die die Migration und Proliferation von ECs hemmt und somit die Reendothelialisierung verzögert [Clever *et al.*, 2011; Huo *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2012]. Daher wird die Entwicklung neuer Theraphien angestrebt, die nicht nur das Restenoserisiko senken, sondern gleichzeitig auch die Reendothelialisierung der verletzten Gefäßwand beschleunigen.

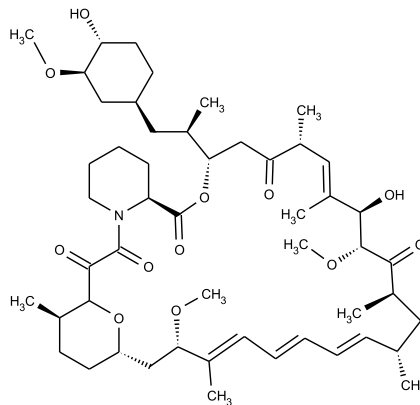


Abbildung 1.6: Strukturformel des Rapamycins.

1.9 Zielstellung der Arbeit

Die genauen Mechanismen der Neointimabildung sind noch immer nicht vollständig geklärt. Zur Entwicklung neuer effizienter Therapien ist jedoch ein besseres Verständnis der molekularen Abläufe notwendig. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher grundlegende pathophysiologische Mechanismen der Neointimabildung im Mausmodell zu untersuchen. Die Arbeit wurde dazu in vier Projekte untergliedert:

1. Zuerst sollte untersucht werden, welcher therapeutische Ansatz den größeren Effekt zur Reduktion der Neointimabildung nach der Gefäßverletzung hat, die Hemmung der ROS-Bildung oder aber die Immunsuppression mit Rapamycin.
2. Das Chemokin CXCL10 ist ein potenter Inhibitor der Angiogenese. Mit Hilfe des murinen Femoralisverletzungsmodells sollte der Einfluss von CXCL10 auf die Neointimabildung und Reendothelialisierung untersucht werden.
3. Der Chemokinrezeptor CXCR3 reguliert die Rekrutierung von T-Lymphozyten und HPC zum Ort der Gefäßverletzung, wird interessanterweise aber auch auf Endothelzellen exprimiert und vermittelt angiostatische Effekte. Um die Bedeutung von CXCR3 in der Inflammation und Reendothelialisierung separat analysieren zu können, sollten konditionelle CXCR3-*Knockout* Mauslinien hergestellt werden.
4. Zum besseren Verständnis der Regulation des CXCR3 auf molekularer Ebene sollte die Interaktion von CXCR3 mit anderen GPCR untersucht werden und eine dafür geeignete Methode etabliert werden.

2 Material

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden im analytischen Reinheitsgrad verwendet und, soweit in den Methoden nicht anders beschrieben, von den Firmen Fluka (Seelze, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

2.2 Antibiotika

<i>Name</i>	<i>Endkonzentration</i>	<i>Quelle</i>
Ampicillin	100 mg/ml	Sigma (St. Louis, USA)
Chloramphenicol	12,5 µg/ml	Sigma-Aldrich
Ganciclovir	2 µM	Sigma-Aldrich
Geneticin (G-418 Sulfat)	500 U/ml	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
Kanamycin	50 mg/µl	Sigma
Mitomycin C	10 µg/ml	Sigma
Tetracyclin Hydrochlorid	12 µg/ml	Fluka

2.3 Enzyme

Alle Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen New England Biolabs (Frankfurt/Main, Deutschland) bezogen. Weitere verwendete Enzyme werden in den einzelnen Methoden beschrieben.

2.4 Oligonukleotide

Zum Sequenzieren und Klonieren verwendete Oligonukleotide sind in Tabelle 2.1 aufgelistet. Alle Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Kursiv gestellte Basenabschnitte kennzeichnen Restriktionsschnittstellen, Fettgedrucktes zeigt Start/Stop-Codons bzw. Basen, die ursprünglich Teil eines Start/Stop-Codons waren, an.

Tabelle 2.1 Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')	Bemerkung
Sequenzierungsprimer		
CX_SouthBamH_fw1	ATT CTC CTG CCT CTG TCC TG	
CX_SouthBamH_rv1	AAG CTC TTA GCT GAG CCT GG	
CX_SouthBamH_fw2	AAT GGG CGC TTA GTT GAA GTC CTG	mCXCR3 Southern-
CX_SouthBamH_rv2	GGA AAG CAC TCT GTC CCT GC	Schnittstellen
CX_SouthXbaI_fw1	TAA GTA CCA CCT TCT CTG CCT GTA	
CX_SouthXbaI_rv1	TAC CAC TGC TGA ACA CAC CCA G	
CX_SouthXbaI_fw2	AAT GCC AGC AGG CTT CCT G	
CX_SouthXbaI_rv2	GTT TGA TCT AGG TGG GCA GCT TG	
CX_3Arm_seq_fw	GGG TAA GGG CTG ATG ATG AA	
CX_3Arm_seq_fw1	TGG GTC TTA TCT GAG GCT GC	
CX_3Arm_seq_fw2	TTG GGA GGC AGA AGC TAG AA	mCXCR3
CX_3Arm_seq_fw3	ACT CCC AAA AGT TGC CCT CT	3' Rekombinations-
CX_3Arm_seq_fw4	GGA GCT GGG AAA GAC AGA GAA C	arm
Screen_3Arm_rev	TTC AGC CTC TCT GCC TCT GC	
Screen_Ex2_fw1	ACA CCT TCC TGC TCC ACC TG	
Screen_Ex2_fw2	TAG TGG TAG TGG TGG TGG CAG	
Screen_Ex2_fw3	AGT TTG TCT CTC TGC CCT CCT G	
Screen_Ex2_rev1	CCT CCC CAG GTG CTT CCT TA	mCXCR3 Exon-
Screen_Ex2_rev2	CCT GCC TGG ATC AAC CAC TG	Rekombinationsarm
Screen_Ex2_rev3	TCT AGT CCC TGG CCC TCC TT	
CX_vorEx2_fw	TCA TCT GAG CCC AAG AG	
TK_fw	AAG GGC CAG CTC ATT CCT C	Thymidin-Kinase
Neo_rev	GAA TTG ACC TGC AGG GGC CCT	nptII
Screen_loxP_rv	GCT CTC GAG ATA ACT TCG TAT AGC	loxP
ITAC_fw	CCG AAA GTT CCC TAT ACC CT	
ITAC_rv	GAT ACT GCC TGA AGA TTG CTG	mCXCL11/ITAC
T7	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CG	
T3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA AC	
EGFP-N1-F	GAG GTC TAT ATA AGC AGA GC	Standardprimer
EGFP-N1-R	ACT TGT GGC CGT TTA CGT C	

Fortsetzung von Tab.2.1 Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')	Bemerkung
Klonierungsprimer für den CXCR3-Rekombinationsvektor		
CX_5Arm_NotI_fw2	AAG GAA AAA AGC GGC CGC AAT GAG GCT ATC TCA GAA AG	mCXCR3 5' Rekombinations- arm
CX_5Arm_BamHI_rv2	CCG GAT CCC ACT GAG CTT CCC ACC CAA G	
CX_Ex2_ClaI_fw2	CCA TCG ATA CTG CCT CTG GGT AG	mCXCR3
CX_Ex2_SalI_rv2	ACG CGT CGA CGA GCC CAG GAC TTA GC	Exon- Rekombinationsarm
CX_3Arm_XhoI_fw2	CCG CTC GAG AGC AAG ATG GCA AGA TC	mCXCR3
CX_3Arm_KpnI_rv	GGG GTA CCT CCA AGA TTG TAT TTG TAT ATT TC	3' Rekombinations- arm
CX_loxP_SalI_fw2	ACG CGT CGA CAT AAC TTC GTA TAA TGT ATG C	loxP Sequenz
CX_loxP_XhoI_rv2	CCG CTC GAG ATA ACT TCG TAT AGC ATA CAT	aus pBS KS+(*)
Klonierungsprimer für Southern Sonden		
5_Sonde2_fw	TGG TTG TAA ACA AGG GCA CA	mCXCR3
5_Sonde2_rv	CAA GGG AAG GAG CAC TCA AG	5' Sonde
CX_3Sonde_fw	ATG GCT GAT TCC TGT TGT CC	mCXCR3
CX_3Sonde_rv	AAT TTA GCA GGC CTG ACC CT	3' Sonde
Klonierungsprimer für Expressionsplasmide		
CX_EcoRI_fw	GGA ATT CAA GCA CCA AAG CAG AGG	hCXCR3
CX_BamHI_rv	GCG GAT CCA AGC CCG AGT AGG AG	
CX4_EcoRI_fw1	GGA ATT CCT GGG TTA ATG CTT GCT G	hCXCR4
CX4_EcoRI_fw2	GGA ATT CGA GAA CCA GCG GTT AC	
CX4_KpnI_rv	GGG GTA CCA AGC TGG AGT GAA AAC TTG	
CC2_KpnI_fw	GGG GTA CCC AAC ATG CTG TCC ACA TC	hCCR2
CC2_BamHI_rv1	GCG GAT CCA AGG CTC CTT CTT TGT CC	
CC2_BamHI_rv2	GCG GAT CCA ATA AAC CAG CCG AGA CTT C	
CC3_XhoI_fw1	CCG CTC GAG TGA AAT GAC AAC CTC AC	hCCR3
CC3_XhoI_fw2	CCG CTC GAG TTG GAT TAT GCC ATT TG	
CC3_EcoRI_rv2	GGA ATT CTA AAC ACA ATA GAG AGT TCC GG	
CC5_XhoI_fw	CCG CTC GAG CAA GAT GGA TTA TCA AGT G	hCCR5
CC5_BamHI_rv	GCG GAT CCC ACA AGC CCA CAG ATA TTT CC	

Fortsetzung von Tab.2.1 Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')	Bemerkung
MOR_HindIII_fw	CCC AAG CTT CAC CAT GGA CAG CAG CGC	hMOR
MOR_KpnI_rv	GGG GTA CCA AGG GCA ACG GAG CAG TTT C	
KOR_HindIII_fw	CCC AAG CTT CAC CAT GGA CTC CCC G	hKOR
KOR_KpnI_rv	GGG GTA CCC ATA CTG GTT TAT TCA TCC CAT CG	
GFP_fw	GGA ATT CAT GGT GAG CAA GGG C	eGFP
GFP_rv	GCG GAT CCT TGT ACA GCT CGT CCA TG	
Linker zur Klonierung der Flag-Sequenz		
3xFlag_fw	CGG GAT CCA GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG TAA GCG GCC GCA AAA GGA AAA	3 x Flag sense
3xFlag_rv	TTT TCC TTT TGC GGC CGC TTA CTT ATC GTC GTC ATC CTT GTA ATC CTT ATC GTC GTC ATC CTT GTA ATC CTT ATC GTC GTC ATC CTT GTA ATC TGG ATC CCG	3 x Flag antisense

2.5 Vektoren

2.5.1 Verwendete Ausgangsvektoren

Tabelle 2.2 Verwendete Vektoren

Vektor	Beschreibung	Referenz
BMQ 239H4	mCXCR3 BAC-Klon	BACPAC Resources ¹
IRATp970A06101D	hKOR cDNA-Klon	Source BioSciences ²
IRATp970B06113D	hMOR cDNA-Klon	Source BioSciences
pBluescriptII KS(+)	bakterieller Klonierungsvektor, Amp ^r	Stratagene ³
pBluescript	modifizierter pBS KS+ mit loxP, Neo ^r , TK	⁴
loxP-Neo/TK-loxP		
pCR-XL-TOPO	TA Sequenzierungsvektor	Invitrogen ⁵

¹Children's Hospital Oakland, USA²Berlin, Deutschland³Waldbronn, Deutschland⁴freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Thomas Nührenberg, Herzzentrum Bad Krozingen⁵Darmstadt, Deutschland

Tabelle 2.2 Verwendete Vektoren

Vektor	Beschreibung	Referenz
pEGFP-N1	eukaryotischer Expressionsvektor mit GFP-tag 3' der MCS, Kan ^r	Clontech ⁶
pECFP-N1	eukaryotischer Expressionsvektor mit CFP-tag 3' der MCS, Kan ^r	Clontech ⁶
pEYFP-N1	eukaryotischer Expressionsvektor mit YFP-tag 3' der MCS, Kan ^r	Clontech ⁶
pECFP-ER	eukaryotischer Expressionsvektor mit ER- spezifischer Calreticulin- <i>Targeting</i> -Sequenz 5' und KDEL-Sequenz 3' der CFP-Sequenz, Kan ^r	Clontech ⁷
CRF2a-CFP	CRF2aR in pECFP-N1	7
CRF2aR-YFP	CRF2aR in pEYFP-N1	7
pIC-Cre	Rekombinationsvektor mit Cre-Rekombinase	Gu <i>et al.</i> [1993]

2.5.2 Generierte Vektoren

Tabelle 2.3 Im Rahmen dieser Arbeit generierte Vektoren

Vektor	Beschreibung
5' Arm pBS	mCXCR3 5' Arm in pBluescript II KS(+)
3' Arm pBS	mCXCR3 3' Arm in pBluescript II KS(+)
Exon-Arm pBS	mCXCR3 Exon-Arm in pBluescript II KS(+)
loxP pBS	loxP in pBluescript II KS(+)
Exon-Arm_loxP pBS	Exon-Arm und loxP in pBluescript II KS(+)
CXCR3_Targeting- Vektor1	mCXCR3 Rekombinationskassette in pBluescript loxP-Neo/TK- loxP
CXCR3_Targeting- Vektor2	modifizierter CXCR3 Targeting Vektor 1, mCXCR3 Rekombina- tionskassette in pBS loxP-Neo/TK-loxP, TK 3'
CXCR3A-GFP	hCXCR3A in pEGFP-N1
CXCR3A-CFP	hCXCR3A in pECFP-N1
CXCR3A-YFP	hCXCR3A in pEYFP-N1
CXCR3A	hCXCR3A in pEGFP-N1 (-GFP), Negativkontrolle
CXCR3B-GFP	hCXCR3B in pEGFP-N1

⁶Saint-Germain-en-Laye, Frankreich, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Manfred Gossen, BCRT

⁷freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Anke Teichmann und Prof. Ralph Schüle, Leibniz Institut für Molekulare Pharmakologie

Fortsetzung von Tab.2.3 Generierte Vektoren

Vektor	Beschreibung
CXCR3B-CFP	hCXCR3B in pECFP-N1
CXCR3B-YFP	hCXCR3B in pEYFP-N1
CXCR3B	hCXCR3B in pEGFP-N1 (-GFP), Negativkontrolle
YFP-CFP	EYFP in pECFP-N1, FRET-Positivkontrolle
CXCR4B-CFP	hCXCR4B in pECFP-N1
CXCR4B-YFP	hCXCR4B in pEYCFP-N1
CCR2-CFP	hCCR2 in pECFP-N1
CCR2-YFP	hCCR2 in pEYFP-N1
CCR3-CFP	hCCR3 in pECFP-N1
CCR3-YFP	hCCR3 in pEYFP-N1
CCR5-CFP	hCCR5 in pECFP-N1
CCR5-YFP	hCCR5 in pEYFP-N1
MOR-CFP	hMOR in pECFP-N1
MOR-YFP	hMOR in pEYFP-N1
KOR-CFP	hKOR in pECFP-N1
KOR-YFP	hKOR in pEYFP-N1

2.6 Antikörper

Tabelle 2.4 Antikörper

Name/Klon (anti-)	Isotyp/Spezifität	Quelle/Referenz
Primärantikörper		
CD3(KT3)/Klon12	Ratte IG, mAK	Quartett ⁸
CD31/Klon sz31	Ratte monoklonal IgG _{2a} , anti-Maus	Dianova ⁹
CXCR-3 (H-95)	Kaninchen polyklonal IgG, anti-Maus/Ratte/ Human	Santa Cruz ¹⁰
Flag M2	Maus monoklonal IgG, anti-Flag	Sigma
GFP-Biotin	Ziege polyklonal, Biotin-gekoppelt	Vector Laboratories ¹¹
Ki-67/B56	Maus monoklonal IgG ₁ , κ , anti-Maus/Ratte/ Human/Schwein	BD Pharmingen ¹⁰
Mac-2/Klon M3/38	Ratte monoklonal IgG _{2a} , anti-Maus/Human	Cedarlane ¹²
Sekundärantikörper und Streptavidinkonjugate		
Anti-Kaninchen Alexa Fluor 488	Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L), Alexa Fluor 488-gekoppelt	Molecular Probes ¹³
Anti-Ratte Alexa Fluor 488	Ziege anti-Ratte IgG (H+L), Alexa Fluor 488- gekoppelt	Molecular Probes
Anti-Ratte Alexa Fluor 568	Ziege anti-Ratte IgG (H+L), Alexa Fluor 568- gekoppelt	Molecular Probes
Anti-Maus Alexa Fluor 488	Ziege anti-Maus IgG (H+L), Alexa Fluor 488- gekoppelt	Molecular Probes
Anti-Maus Alexa Fluor 680	Ziege anti-Maus IgG (H+L), Alexa Fluor 680- gekoppelt	Molecular Probes
Anti-Maus-HRP	Ziege anti-Maus IgG HRP-gekoppelt	Molecular Probes
Streptavidin Dylight(r)800	Dylight(r)800-gekoppelt	Biozol ¹⁴

⁸Berlin, Deutschland

⁹Hamburg, Deutschland

¹⁰Heidelberg, Deutschland

¹¹Burlingame, USA

¹²Burlington, USA

¹³Eugene, USA

¹⁴Eching, Deutschland

2.7 Bakterienstämme

E. coli XL1-Blue Stratagene
 Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac*
 [F' *proAB lacI^qZM15 Tn10(Tet^r)*]
 Temperaturoptimum 37 °C

E. coli EL350 Lee *et al.* [2001]
 Genotyp: DH10B[*lcl857(cro-bioA)*<>*araC-PBADcre*]
 Chl^r, Temperaturoptimum 30 °C

2.8 Eukaryotische Zelllinien

Tabelle 2.5 Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Quelle/Referenz
HEK293T	humane embryonale Nierenepithelzelllinie, modifiziert/zusätzliche Expression des <i>SV40 large T-Antigens</i>	DSMZ ¹⁵ , Graham und van der Eb [1973]
Jurkat	humane T Lymphozytenzelllinie	DSMZ, Schneider <i>et al.</i> [1977]
MM6	humane Monozytenzelllinie	DSMZ Ziegler-Heitbrock <i>et al.</i> [1988]

Primärzellkulturen

HCASMC	humane glatte Muskelzellen der Koronararterie	PromoCell (Heidelberg, Deutschland)
ECFC	humane endotheliale Koloniebildende Zellen	Lonza
HUVEC	humane Endothelzellen aus der Umbilicalvene	PromoCell
R1	murine embryonale Stammzelllinie	Nagy Lab, Mount Sinai Hospital, Nagy <i>et al.</i> [1993]

Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Primärzellkulturen

MEF (Feederzellen)	murine embryonale Fibroblasten, resistent gegen G418, 6-Thioguanin, Puromycin und Hygromycin	siehe Abschnitt 3.6.1, S.46
--------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------

¹⁵Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

2.9 Mausstämme

Stamm	Quelle
SV129/SvImJ	Jax Mice Service
C57Bl/6	FEM, Charité
Tg(DR4)1Jae/J	Jax Mice Service
B6.129S4-Cxcl10tm1Adl/J (IP-10/CXCL10 ^{-/-})	Jax Mice Service, Dufour <i>et al.</i> [2002]

2.10 Häufig verwendete Lösungen und Medien

Hier nicht aufgelistete Lösungen und Medien werden in den einzelnen Methoden beschrieben.

PBS(T)	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,2 (0,05% Tween-20)
TBS(T)	50 mM Tris/HCl pH 7,4 50 mM NaCl
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 7,4 1 mM EDTA
Tris-Puffer (10x)	0,5 M Tris Base pH 7,6 1,5 M NaCl
Citrat-Puffer (10x)	100 mM Tri-Natriumcitrat-Dihydrat pH 6,0
LB-Medium	0,5 % (w/v) Hefeextrakt (Duchefa, Haarlem, Niederlande) 1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Natriumchlorid
Zellkulturmedien	
DMEM Medium	DMEM-GlutaMax-I (Gibco) 10 % FKS (Biochrom) 1 % Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml; Gibco)

RPMI Medium	RPMI-1640 (Gibco) 10 % FKS (Biochrom) 1 % Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)
EF-Medium	DMEM-GlutaMax-I (Gibco) 15 % FKS (HyClone) 1 % Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml; PAA) 1 % 100 mM Natriumpyruvat(Biochrom) 1 % 100x nicht-essentielle Aminosäuren (Biochrom) 0.2 % 50 mM β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)
ES-Medium	EF-Medium LIF (ESGRO Supplement, <i>Millipore</i>)
Einfriermedium	90 % Zellkulturmedium 10 % DMSO (Fluka)
ES-Einfriermedium	40 % EF-Medium 50 % FKS 10 % DMSO
Trypsinlösung	0.05 % Trypsin/0.02 % EDTA (Gibco)

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

Alle im Rahmen dieser Arbeit ausgeführten molekularbiologischen Methoden sind ausführlich von Sambrook und Russel [2001] beschrieben.

3.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Für die Amplifikation von Plasmiden wurde der *E. coli* Stamm XL1-Blue verwendet und in flüssigem LB-Medium oder auf festen LB-Agarplatten über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Funktion der loxP-Seiten in den Targeting Vektoren wurde im *E. coli* Stamm EL350 durchgeführt, der nach Induktion mit Arabinose die Cre-Rekombinase exprimiert. Dieser Bakterienstamm wächst vorzugsweise bei 30 °C und ist Chloramphenicolresistent.

3.1.2 Transformation von *E. coli*

Herstellung und Transformation von chemokompetenten *E. coli*

Chemokompetente *E. coli* wurden mit Hilfe der TSS (Transformation-Storage-Solution) Methode hergestellt. *E. coli* wurden auf einer antibiotikahaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von einer einzelnen Kolonie wurde eine 7 ml Vorkultur angeimpft und bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag wurde mit 1 ml der Vorkultur eine 200 ml Hauptkultur (antibiotikafrei) angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 angezogen. Die Zellen wurden sofort abzentrifugiert (1000 g, 10 min, 4 °C) und anschließend in 5 ml TSS resuspendiert. Aliquots zu je 50 µl wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Hitzeschocktransformation nach [Cohen *et al.*, 1972] wurde ein Aliquot chemokompetenter *E. coli* auf Eis aufgetaut. Die zu transformierende DNA wurde vorsichtig dazu pipettiert (10 µl Ligationsansatz oder 20-50 ng Plasmid-DNA) und die Zellen weitere 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42 °C für 90 s. Anschließend wurden die Zellen nochmals 5 min auf Eis gestellt und dann mit 800 µl vorgewärmtem LB Medium versetzt, Nach 1 h Schütteln bei 37 °C wurden die Zellen auf antibiotikahaltigen LB-Agar Platten ausgestrichen und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

TSS-Puffer LB Medium, 10 % PEG (3350-8000), 5 % DMSO (v/v), 30 mM MgCl₂

Herstellung und Transformation von elektrokompetenten *E. coli*

Durch ein starkes elektrisches Feld kann die negativ geladene Plasmid DNA stark beschleunigt werden und die Barriere der bakteriellen Zellwand überwinden. Für die Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurde der gewünschte *E. coli* Stamm auf einer antibiotikahaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Von einer einzelnen Kolonie wurde eine 7 ml Vorkultur über Nacht angezogen und mit dieser die 500 ml Hauptkultur (ohne Antibiotikum) angeimpft. Die logarithmisch wachsenden Zellen ($OD_{600} = 0.5-0.7$) wurden 15 min auf Eis abgekühlt und dann abzentrifugiert (4000 g, 15 min, 4 °C). Anschließend wurden die Zellen erst mit kaltem H₂O und dann mit 10 % Glycerol gewaschen und in 1,5 ml 10 % Glycerol resuspendiert. Aliquots zu je 50 μ l wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurde ein 100 ml Aliquot elektrokompetenter *E. coli* auf Eis aufgetaut und mit 10 ng Plasmid-DNA (1-5 ml Ligationsansatz) versetzt. Die Elektroporation erfolgte in einer Elektroporationsküvette (2 mm Spaltenbreite, Bio-Rad, München, Deutschland) im GenePulser II (Bio-Rad). Der Puls wurde für 5 ms bei 2,5 kV, 125 mF und 200 W durchgeführt. Nach der Transformation wurde der Ansatz sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen und 1 h im Bakterienschüttler bei 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden anschließend auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

3.1.3 Präparation von Plasmid DNA aus *E. coli*

Die Plasmidpräparation aus *E. coli* erfolgte durch alkalische Lyse nach Birnboim und Doly [1979]. Von einer einzelnen Bakterienkolonie wurden 4 ml antibiotikahaltiges LB-Medium (2.10) angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 Upm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 ml der Übernachtskultur abzentrifugiert und in 100 μ l Lösung I resuspendiert. Die alkalische Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 150 μ l Lösung II und mehrmaligem Invertieren des Reaktionsgefäßes. Anschließend wurden zur Fällung der Proteine 200 μ l Lösung III zugegeben und mehrmals vorsichtig invertiert. Das Präzipitat wurde dann 10 min bei 13.200 Upm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid DNA wurde durch Zugabe von 0,7 Vol. Isopropanol und 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat gefällt und anschließend 15 min bei 13.200 Upm pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 μ l RNase-H₂O gelöst.

Lösung I	25 mM Tris-HCl; pH 8,0; 50 mM Glukose; 10 mM EDTA
Lösung II	0,2 M NaOH; 1% (w/v) SDS
Lösung III	3 M Kaliumacetat; pH 4,8
RNase-H ₂ O	10 mg/ml RNase A in Aqua dest.

Größere Mengen gereinigter Plasmid DNA wurden mit dem *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* aus *E. coli* präpariert. Die Präparation von DNA aus BAC-Klonen erfolgte mit Hilfe des *QIAGEN Large-Construct Kits*.

3.1.4 Präparattion genomischer DNA aus Geweben

Zur Genotypisierung von Mäusen wurde 0.5-1 cm Schwanzspitze in 500 μ l Gewebe-Lysepuffer über Nacht bei 55 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Ansatz zentrifugiert (13000 Upm, 10 min, RT) und die genomische DNA mit 500 μ l Isopropanol aus dem Überstand gefällt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 μ l TE-Puffer I gelöst. Die DNA wurde erneut durch Zugabe von 3 Vol. 100 % Ethanol und 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat gefällt und zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde dann luftgetrocknet und in 100 μ l TE-Puffer II für 2 h bei 55 °C gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Gewebe-Lysepuffer	100 mM Tris/HCl pH 8,5; 200 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,2 % SDS; 400 μ g/ml Proteinase K
TE-Puffer I	10 mM Tris/HCl pH 8,5; 1 mM EDTA
TE-PufferII	10 mM Tris/HCl pH 8,5; 0.1 mM EDTA

3.1.5 Präparation genomischer DNA aus ES-Zellen

ES-Zellen wurden auf 96-Loch-Platten in Selektionsmedium ohne LIF bis zur Konfluenz herangezogen und die gDNA nach der von Ramirez-Solis *et al.* [1992] beschriebenen Methode extrahiert. Die Zellen wurden zunächst 4 mal mit PBS gewaschen und in je 50 μ l ES-Zell-Lysepuffer über Nacht bei 60 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Am nächsten Tag wurde die genomische DNA direkt aus dem Lysat gefällt. Dazu wurden 100 μ l eiskalter 100 %iger Ethanol-Salz-Mix pro Loch zugegeben und mehrere Stunden bei RT inkubiert. Das DNA Präzipitat wurde 4 Mal mit eiskaltem 70 %igen Ethanol gewaschen und dabei vorsichtig dekantiert. Anschließend wurde die DNA an der Luft getrocknet und bei 4 °C gelagert oder direkt für die Southern Blot Analyse (3.1.16) mit Restriktionsendonukleasen verdaut.

In der Southern Blot Analyse positive ES-Zellklone wurden auf 10 cm Petrischalen hochgezogen. Die gDNA Extraktion erfolgte dann im 2 ml Reaktionsgefäß analog zur gDNA Extraktion im 96-Loch.

Ethanol-Salz-Mix	100 % Ethanol; 0,05 % 3 M Natriumacetat
ES-Zell-Lysepuffer	10 mM Tris; pH 7,5; 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5 % N-Laurylsarcosin; 200 μ g/ml Proteinase K

3.1.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Auftrennung und Analyse von Nukleinsäuren erfolgte standardmäßig durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese nach der Methode von Aaij und Borst [1972]. Abhängig von der Größe der zu untersuchenden DNA Fragmente wurden 0,7-2,5 % (w/v) Agarose (Roth) in 1x TAE durch kochen gelöst. Das in einer Gelgießvorrichtung ausgehärtete Gel wurde anschließend in einer Flachbett-Elektrophoresekammer (Biometra, Göttingen, Deutschland) mit 1x TAE überschichtet. Die DNA Proben wurden mit 1/6 Probenpuffer versetzt und bei 4-8 V/cm Laufstrecke elektrophoretisch

aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA wurden dem Gel $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Ethidiumbromid (Roth) zugesetzt, welches mit den Nukleinsäuren interkaliert. Unter UV Licht fluoresziert der Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplex. Durch Vergleich mit dem DNA-Größenstandard *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) kann die Größe und Menge der Fragmente bestimmt wurden. Die UV-Geldokumentation erfolgte am *NightHawk LB 984* (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland).

TAE (50x)	2 M Tris pH 8,0; 50 mM EDTA; 5,71% (v/v) Eisessig
DNA-Probenpuffer (6x)	0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylencyanol, 25 % (w/v) Ficoll; 55% (v/v) Glycerin

3.1.7 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Wird ein DNA-Gemisch präparativ über ein Agarosegel aufgereinigt, so kann nach erfolgter elektrophoretischer Trennung das gewünschte DNA-Fragment aus der Gelmatrix zurückgewonnen werden. Die DNA wurde über Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mit dem *QIAquick Gel Extraktion Kit* (QIAGEN) nach Herstellervorschrift.

3.1.8 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

Proteine können aus Nukleinsäurelösungen durch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI) im Verhältnis 25:24:1 entfernt werden [Chomczynski und Sacchi, 1987]. Dazu wurde die Probe mit 1 Vol des Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI) Gemischs versetzt und kräftig ausgeschüttelt. Zur Phasentrennung wurde anschließend kurz bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt und nochmals mit 1 Vol. Chloroform versetzt, ausgeschüttelt und zentrifugiert. Aus der wässrigen oberen Phase können die Nukleinsäuren dann durch Zugabe von 0,7 Vol. Isopropanol und 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat gefällt und 15 min bei 13.200 Upm pelletiert werden. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in dest. H_2O gelöst.

3.1.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte spektrophotometrisch am *Nanodrop ND-1000* (Thermo Fischer Scientific). Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm und ermöglichen eine photometrische Konzentrationsbestimmung auf der Grundlage des Lambert-Beerschen Gesetzes. Anhand empirischer Vergleichsdaten kann die Konzentration bestimmt werden. Eine OD von 1 entspricht 40 mg/ml RNA bzw. 50 mg/ml DNA. Zur Reinheitsbestimmung wurde zusätzlich die Absorption von Proteinen bei 280 nm und von organischen Lösungsmitteln bei 230 nm bestimmt. Optimal liegen die Werte für OD_{260}/OD_{280} zwischen 1,8-2 und für $OD_{260}/OD_{230} \geq 2$.

3.1.10 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Einführung von Restriktionsschnittstellen, die gerichtete Mutagenese und die Amplifikation definierter DNA-Abschnitte erfolgte mittels PCR [Saiki *et al.*, 1985]. Nach Herstellerangaben wurden wahlweise die *GoTaq Polymerase* (Promega, Mannheim, Deutschland) für Screening-PCRs bzw. für die Amplifikation kurzer DNA-Fragmente oder das *Expand Long Template PCR System* (Roche) mit 3'-5' *proof-reading*-Aktivität für die Amplifikation von langen DNA-Abschnitten zur Sequenzierung oder Klonierung verwendet.

3.1.11 Herstellung eines DNA-Verbindungsstücks

Neue Restriktionsschnittstellen oder kurze Sequenzabschnitte können mit Hilfe von DNA-Verbindungsstücken in Klonierungsvektoren eingeführt werden. Die benötigten Oligonukleotide wurden von MWG bezogen. Die Hybridisierung der einzelsträngigen Oligonukleotide zu einem doppelsträngigen DNA-Verbindungsstück erfolgte in *Annealing*-Puffer. Dazu wurden je 60 μg des *Sense* und *Antisense*-Strangs in 200 μl (0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) *Annealing*-Puffer für 10 min auf 95 °C erhitzt und langsam auf RT abgekühlt.

Annealing-Puffer 20 mM Tris; 100 mM NaCl; 2 mM MgCl_2

3.1.12 Enzymatische Modifikation von Nucleinsäuren

Restriktion von DNA und Dephosphorylierung

Restriktionsendonukleasen vom Typ II hydrolysieren DNA an spezifischen palindromischen Erkennungssequenzen. Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von NEB (*New England Biolabs*, Ipswich, USA) bezogen. Pro Mikrogramm DNA wurden 1-5 U Enzym mit entsprechend mitgelieferten Puffern und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA verwendet. Für den Verdau von gDNA wurde zusätzlich 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A zugesetzt. Der Ansatz wurde bei 37 °C mindestens 1 h inkubiert.

Zur Verhinderung der Religation eines linearisierten Vektors wurden die Phosphatgruppen am 5'-Ende des linearisierten Vektors entfernt. Dazu wurden 50 ng linearisierter Vektor und 1 U *Shrimp alkaline Phosphatase* (Roche) gemischt und bei 37 °C für 10 min bei überhängenden Enden (*sticky ends*) bzw. 60 min bei glatten Enden (*blunt-ends*) inkubiert. Durch Erhitzen auf 65 °C für 15 min wurde das Enzym inaktiviert. Der Ansatz kann sofort zur Ligation (3.1.12) verwendet werden.

Herstellung von glatten Enden an DNA-Fragmenten

Zu ligierende DNA Fragmente mit nicht komplementären Überhängen können mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase „geglättet“ werden, welche sowohl 5'→3'-Polymeraseaktivität als auch starke 3'→5'-Exonukleaseaktivität besitzt. So werden 5'Überhänge aufgefüllt und 3'Überhänge entfernt. Zu diesem Zweck wurde dem Restriktionsansatz 1 U T4-DNA-Polymerase (NEB) und 100 mM

dNTPs hinzugefügt und die Reaktion 15 min bei 12 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Zugabe von 10 mM EDTA und Erhitzen des Ansatzes für 20 min auf 75 °C.

Ligation

Zu ligierende lineare Vektoren und DNA-Fragmente wurden mit T4-DNA-Ligase (NEB) nach Herstellerangaben ligiert. Ein 20 μ l Ligationsansatz mit 50 ng Vektor und der 3-fach molaren Menge an Insert wurde mit 1 U T4-DNA-Ligase im zugehörigen Puffer bei 16 °C über Nacht inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne Insert inkubiert.

TA Klonierung

Die TA Klonierung dient der effizienten Ligation von DNA-Fragmenten, die mit Hilfe der Taq-Polymerase erzeugt wurden [Shuman, 1994]. Durch eine spezielle Aktivität der Taq-Polymerase werden einzelne Desoxyadenosinmonophosphate an das 3'-Ende der PCR-Produkte angefügt. Der linearisierte Vektor pCR-XL des TOPO TA Cloning Kits (Invitrogen) besitzt an seinen 5'-Enden einzelne Desoxythymidinreste, die kovalent mit einer DNA-Topoisomerase verknüpft sind. Es wurden 5 ng des aufgereinigten PCR-Produktes mit 0,5 μ l des linearisierten Vektors 5 min bei RT inkubiert, die Reaktion mit 1 μ l Stop Reagenz gestoppt und der Ansatz anschließend in *E. coli* transformiert (3.1.2).

Cre-vermittelte Rekombination in vitro

Zur Überprüfung der Funktionalität der loxP-Sequenzen im konditionellen Rekombinationsvektor wurde die Cre-vermittelte Rekombination *in vitro* durchgeführt. Dazu wurde der *Targeting*-Vektor in *E. coli* EL350 transformiert (3.1.2). Eine einzelne Kolonie wurde gepickt und in 30 ml LB-Medium mit 100 mg/ml Ampicillin (Sigma) angezogen. Durch Zugabe von 0,1 % L-Arabinose (Merck) zur logarithmisch wachsenden Kultur ($OD_{600} = 0,5$) wurde die Expression der Cre-Rekombinase induziert. Nach 5 min wurden die Zellen abzentrifugiert, auf einer Ampicillin haltigen LB-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Von einzelnen Kolonien wurden 5 ml Kulturen beimpft und bei 30 °C über Nacht geschüttelt. Anschließend wurden die Plasmide der Kulturen isoliert (3.1.3), mit geeigneten Restriktionsendonukleasen (3.1.12) verdaut und mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.1.6) analysiert. Die isolierten Plasmide der zunächst entstandenen Mischklone wurden zur Vereinzelung nochmals in *E. coli* XL1-Blue retransformiert und die Plasmide wie oben beschrieben präpariert und die Rekombinationsereignisse mittels Restriktionsanalyse bestimmt.

3.1.13 Klonierungen

Klonierung der konditionellen CXCR3 Targeting-Konstrukte

Für die Generierung des konditionellen CXCR3 *Targeting*-Vektors wurden zunächst per PCR (3.1.10) mit spezifischen Primern (2.1) einzelne Sequenzbereiche aus dem BAC-Klon BMQ 239H4

(2.2) amplifiziert. Dabei wurden an den Enden der Rekombinationsarme jeweils geeignete Restriktionsschnittstellen eingeführt bzw. vorhandene Schnittstellen mutiert, sodass eine anschließende Klonierung in den Zwischenvektor pBluescript II (KS+) und eine spätere Subklonierung in den Endvektor (Abb. 3.1) möglich war. Der Endvektor pBluescript_loxP_Neo/TK_loxP ist der modifizierte Vektor pBluescript II (KS+), in den eine Neo^r /TK-Selektionskassette, flankiert von zwei loxP Stellen, eingefügt wurde. Folgende Rekombinationsarme wurden aus dem Bac-Klon amplifiziert:

	Größe	Sequenzbereich	Restriktionsschnittstellen
5' Rekombinationsarm	1,5 kb	5' UTR, Exon 1	<i>NotI</i> , <i>BamHI</i>
Exon-Rekombinationsarm	2,5 kb	Exon 2	<i>ClaI</i> , <i>SalI</i>
3' Rekombinationsarm	3 kb	3' UTR	<i>XhoI</i> , <i>KpnI</i>

Zudem wurde die loxP Sequenz aus dem Endvektor amplifiziert und in den Zwischenvektor Exon-Rekombinationsarm_pBluescript II (KS+) über *SalI/XhoI* eingefügt. Die Klonierung der loxP Sequenz erfolgte blind, da aufgrund der geringen Basenzahl (53 bp) eine Aufreinigung und Analyse des Fragments schwierig war. Schließlich wurden der 5' Rekombinationsarm (*NotI*, *BamHI*), der Exon-Rekombinationsarm mit loxP (*ClaI*, *XhoI*) und der 3' Rekombinationsarm (*XhoI*, *KpnI*) aus den Zwischenvektoren geschnitten und nacheinander in den Endvektor pBluescript_loxP_Neo/TK_loxP kloniert.

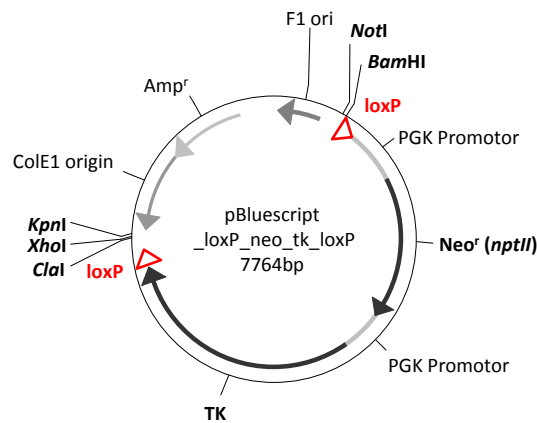


Abbildung 3.1: Vektorkarte des konditionellen Rekombinationsvektors loxP_Neo/TK_loxP. Dargestellt sind für die Klonierung relevante Restriktionsschnittstellen. Amp, Ampicillin-Resistenzgen; loxP, Erkennungssequenz für die Cre-Rekombinase; Neo (nptII), Neomycinresistenzgen (Neomycinphosphotransferase II); PGK-Promotor, Promotor der Phosphoglyceratkinase; TK, Thymidinkinase.

Klonierung der Southern Blot Sonden

Zur Identifizierung homolog rekombinierter ES-Zellklone wurden Sonden hergestellt, die stromaufwärts (3'Sonde) und stromabwärts (5'Sonde) der CXCR3 Sequenz liegen. Als Matritze diente

der BAC-Klon BMQ 239H, von dem ausgehend, die entsprechenden Sequenzen amplifiziert und nach Herstellerangaben in pCR-XL-TOPO kloniert wurden (3.1.12).

Klonierung von Expressionsplasmiden

Generell erfolgte die Konstruktion von Expressionsplasmiden durch die Einführung geeigneter Restriktionsschnittstellen mit Hilfe von Primern. In einer PCR (3.1.10) wurden die offenen Lese-rahmen (ORF, *open reading frame*) der zu klonierenden cDNA Sequenzen amplifiziert und mit Restriktionsschnittstellen flankiert. Anschließend wurden sowohl die Fragmente als auch der Vektor mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten (3.1.12) und ligiert (3.1.12). Die Sequenzen des CXCR3A und CXCR3B konnten ausgehend von Jurkat cDNA amplifiziert werden. Als Matrize für die Klonierung der Chemokinrezeptoren CCR2, CCR3 und CCR5 diente aus Blut gewonnene cDNA von Myokarditis-Patienten¹. Für die Konstruktion von Opioidrezeptoren dienten als Matrize cDNA Klone (Source Biosciences). Folgende Restriktionsschnittstellen wurden vor und hinter den ORFs eingeführt:

<i>GPCR</i>	<i>5' des ORF</i>	<i>3' des ORF</i>
CXCR3A/B	<i>EcoRI</i>	<i>BamHI</i>
CXCR4	<i>EcoRI</i>	<i>KpnI</i>
CCR2	<i>KpnI</i>	<i>BamHI</i>
CCR3	<i>XhoI</i>	<i>EcoRI</i>
CCR5	<i>XhoI</i>	<i>BamHI</i>
MOR/KOR	<i>HindIII</i>	<i>KpnI</i>

Zur Koppelung einer Flag-Sequenz an CXCR3 wurden die fertigen CXCR3A/B-EGFP-Konstrukte verwendet. Das EGFP hinter der CXCR3 Sequenz wurde zunächst durch Restriktion mit *BamHI/NotI* entfernt und durch ein DNA-Verbindungsstück, das 3-mal hintereinander die Flag Sequenz besitzt und durch die Schnittstellen *BamHI/NotI* flankiert ist, ersetzt.

3.1.14 Identifizierung rekombinanter Klone

Blau-Weiß-Differenzierung

Zur Identifikation rekombinanter Klone wurde, wenn möglich, die Blau-Weiß-Selektion genutzt. Voraussetzung ist die Sequenz des *lacZ*-Gens auf dem inserierten Plasmid, welches für β -Galactosidase kodiert (pBluescript KS+). Plattiert man diese Zellen auf festem LB-Agar mit 20 $\mu\text{g/ml}$ X-Gal (Fermentas) und 100 μM IPTG (Fermentas) haltigen Medium aus, so kann die β -Galactosidase nach Induktion durch IPTG das chromogene Substrat X-Gal zu einem Indigofarbstoff umsetzen, wodurch die Kolonien blau werden. Wurde das gewünschte DNA-Fragment korrekt in die *lacZ*-Sequenz des Vektors ligiert (3.1.12), kann keine β -Galaktosidase exprimiert werden. Kolonien posi-

¹freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Nicole Langwieser

tiver rekombinanter Klone bleiben folglich weiß. Wurde lediglich der religierte Vektor transformiert, so werden die Kolonien blau.

Restriktionskontrolle

Es wurden entweder die durch Blau-Weiß-Selektion identifizierten positive Klone oder standardmäßig bis zu 24 einzelne Kolonien gepickt und 5 ml LB-Medium angeimpft. Die Flüssigkulturen wurden über Nacht bei 37 °C geschüttelt und die Plasmide am nächsten Tag präpariert (3.1.3). Etwa 1 µg Plasmid-DNA wurde mittels geeigneter Restriktionsendonukleasen geschnitten. Dabei erfolgte die Auswahl der Endonukleasen so, dass die Längen der entstehenden DNA Fragmente eindeutig Aufschluss über die Korrektheit des klonierten Plasmids geben. Der Restriktionsansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und die Fragmente auf einem Agarosegel separiert (3.1.6) und analysiert.

3.1.15 Sequenzierung

Um bei der PCR entstandene Fehler auszuschließen, wurde die korrekte Basenabfolge nach jedem Klonierungsschritt überprüft. Die Sequenzanalysen von PCR-Fragmenten und klonierten Plasmiden erfolgten nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* [1992] und wurden von der Firma LGC Genomics mit Standardsequenzierungsprimern durchgeführt. Für die Sequenzierung von ES-Zellklonen wurden die zu sequenzierenden DNA-Abschnitte zuvor in einer PCR (3.1.10) mit entsprechenden Primern amplifiziert und aufgereinigt (3.1.7). Das Fragment wurde dann zusammen mit vorpipettierten spezifischen Primern zum Sequenzieren zu LCG Genomics geschickt.

3.1.16 Southern Blot Analyse

DNA-Sequenzen in komplexen DNA Gemischen können mit Hilfe der Southern Blot Analyse detektiert werden [Southern, 1975].

Membrantransfer

Die zu analysierende DNA wurde zunächst durch geeignete Restriktionsendonukleasen geschnitten und die Fragmente anschließend in einem 0,7 % Agarosegel voneinander getrennt (3.1.6). Das Gel wurde 15 min in 0,4 M HCl depuriniert, anschließend 30 min in Denaturierungspuffer und nochmals 45 min in Neutralisierungspuffer geschwenkt. Der Transfer der einzelsträngigen DNA auf die Membran (Hybond-N+; GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) erfolgte über Nacht. Dabei liegt das Gel auf einem Whatman-Papier (Schleicher&Schuell, Dassel), welches ständig kontakt zu einem mit 10x SSC befüllten Behältnis hat. Auf dem Gel liegt die Membran, eine weitere Lage Whatman-Papier und ein Stapel saugfähige Tücher die mit einem Gewicht beschwert werden. Der Aufbau garantiert einen Flüssigkeitsstrom durch das Gel, der die DNA auf die Membran transferiert. Am folgenden Tag wurde die Membran zur kovalenten Bindung der DNA mit UV-Licht bestrahlt

(Stratalinker 2400, Stratagene, Strahlungsenergie 120 mJ/cm²) und anschließend 2 h bei 70 °C im Trockenschrank getrocknet.

Denaturierungslösung	0,5 M NaOH; 1 M NaCl
Neutralisierungslösung	0,5 M Tris/HCl pH 7,4; 3 M NaCl
SSC-Lösung (20x)	3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat

Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die zuvor in pCR-XL-TOPO einklonierten Matrizen für die Sonden wurden mit *EcoRI* wieder herausgeschnitten und mit dem *Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Die enzymatische Markierungsreaktion erfolgte mit Hilfe des Klenow-Fragments. Unter Verwendung des *Random Primed DNA Labelling Kit* (Roche) wurden 100 ng Sonde mit 50 μCi [α -32P]dCTP (3000 Ci/mmol; Hartmann Analytics, Braunschweig) nach Angaben des Herstellers markiert. Die Aufreinigung der markierten Sonde erfolgte über *illustra Nick Columns* nach Herstellerangaben. Dabei wurden die synthetisierten Sonden über das Prinzip der Größenausschluss-Chromatographie von den ungebundenen Nukleotiden getrennt.

Hybridisierung und Autoradiographie

Die Membranen wurden zunächst in Hybridisierungsröhrchen mit ca. 15 ml Church-Puffer 3-4 h bei 65 °C und gleichmäßiger Rotation im Hybridisierungsöfen prä-hybridisiert [Church und Gilbert, 1984]. Anschließend wurde die aufgereinigte markierte Sonde 10 min bei 95 °C denaturiert und dann in den Church-Puffer hinein gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65 °C im Hybridisierungsöfen. Überschüssige und unspezifisch gebundene Sondenmoleküle wurden am nächsten Tag durch folgende Waschstschritte von der Membran gewaschen:

- 1x kurz 0,4x SSC 60 °C
- 30 min 2x SSC / 0,1 % SDS 62 °C
- 30 min 0,4x SSC / 0,1 % SDS 68 °C
- 30 min 0,4x SSC / 0,1 % SDS 72 °C

Die Membran wurde in Frischhaltefolie eingeschlagen, in eine mit Calciumwolframat beschichtete Autoradiographiekassette (Kodak, New York, USA) gelegt und ein Strahlungsempfindlicher Film (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare) aufgelegt. Die Kassette wurde bei -80 °C gelagert und der Film nach 14 Tagen per Hand mit Entwicklungs- und Fixierlösungen (T-Matic, Adefo) entwickelt.

Church-Puffer 1 % BSA, 7 % SDS; 0,5 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,2;
 1 mM EDTA; ssDNA (vor Gebrauch 10 min 95 °C)

Der Natriumphosphat-Puffer wurde zuvor aus 1 M Na₂HPO₄ und 1 M NaH₂PO₄ hergestellt.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultur von Säugerzellen

Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Die einzelnen Medien wurden größtenteils mit 10 % FKS (inaktiviert, 30 min bei 60 °C) und 1 % Pen/Strep versetzt, ausgenommen ES-Zellen und Feederzellen (siehe 2.10). Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen 1:3 bis 1:10 passagiert, wobei adhärente Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend trypsiniert wurden. Zum Einfrieren der Zellen wurden ca. 5x10⁶ Zellen in Einfriermedium (2.10) resuspendiert, in einem Kryokonservierungsgefäß langsam bei -80 °C eingefroren und nach 24 h in flüssigen Stickstoff überführt.

3.2.2 Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen

Zur transienten Expression von Genen in HEK293T-Zellen wurden 5x10⁵ Zellen in einer 12-Loch-Platte bzw. 10⁶ Zellen in einer 6-Loch-Schale mit bis zu 8 µg Expressionsplasmid und der 4-fachen Menge *Metafectene Pro* (Biontex, Martinsried, Deutschland) nach Herstellerangaben transfiziert. Die Zellen wurden nach 16 - 24 h für Experimente verwendet.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Zellysaten

Die zu lysierenden Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen und in kalten Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen im Ultraschallbad *Sonoplus* (Bandelin electronic, Berlin, Deutschland) 30 s lysiert. Die Zelltrümmer wurden 10 min bei 13.000 Upm (4 °C) abzentrifugiert und der Überstand entweder sofort für Co-Immunpräzipitation (3.3.3) oder SDS-PAGE (3.3.4) verwendet oder bei -80 °C gelagert.

Lysepuffer 40mM Hepes pH 7,5; 120 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1 % Triton-X100
 Complete EDTA-free, Protease Inhibitor Cocktail tablets (Roche)

3.3.2 Quantitative Proteinbestimmung

Der Gesamtproteingehalt in Zellysaten wurde mit dem *BCA Protein Assay Kit* (Pierce, Rockford, Irland) bestimmt, der auf dem Prinzip der Biuret-Reaktion beruht. Die Proteinlysate wurden 1:10 verdünnt eingesetzt und auf eine BSA Standardreihe bezogen. Die Messung der Proben erfolgte im Mikropplattenlesegerät *Mithras LB940* (Berthold Technologies).

3.3.3 Co-Immunpräzipitation

Zur *in vitro* Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen diente die Co-Immunpräzipitation (Co-IP). Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern können Antigene aus Lösungen aufkonzentriert

werden. Dabei bindet der an einen Feststoff immobilisierte Antikörper an das Antigen, welches mitsamt seinen Interaktionspartnern aus der Lösung präzipitiert wurde (Co-Immunpräzipitation). Zunächst wurden HEK293T-Zellen co-transfiziert (3.2.2) und nach 24 h lysiert (3.3.1). Die Co-IP erfolgte mit *ANTI-FLAG M2 Magnetic Beads* (Sigma-Aldrich) welche mit Hilfe eines Magneten von der flüssigen Phase getrennt werden können. Pro Probenlysat wurden 20 μl *Beads*-Suspension verwendet. Die *Beads* wurden zunächst dreimal mit TBS gewaschen und anschließend mit 500 μl Zelllysat versetzt. Die Co-IP erfolgte über Nacht bei 4 °C auf dem Rotator. Am nächsten Tag wurden die *Beads* wieder vom LySAT getrennt und dreimal mit TBS gewaschen. Die Elution erfolgte 10 min mit 50 μl Elutionspuffer bei RT. Danach wurde das Eluat mit 5 μl Neutralisierungspuffer versetzt und direkt für die SDS-PAGE (3.3.4) verwendet. Benutzte *Beads* wurden dreimal mit TBS gewaschen, in 50 % Glycerol mit 1 % NaN_3 aufgenommen und bis zur Wiederverwendung bei -20 °C gelagert.

Elutionspuffer 0,1 M Glycin HCl pH 3,0
 Neutralisierungspuffer 0,5 M Tris HCl pH 7,4; 1,5 M NaCl

3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteinegemische wurden nach dem diskontinuierlichen Laemmli-System in SDS-Poly-acrylamid-Gelen der Größe nach aufgetrennt [Laemmli, 1970]. Die Proben wurden zuvor mit 4x Laemmli-Puffer versetzt und 5 min aufgekocht. Für SDS-PAGE von GPCRs wurden die Proben nicht aufgekocht, sondern lediglich 1 h bei RT mild reduziert. Als Größenstandard wurde der *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (Fermentas) mitgeführt. Die Proteintrennung erfolgte in 1x Laemmli-Laufpuffer bei 5-8V/cm in einer SDS-PAGE Apparatur (Bio-Rad).

4 Gele (1 mm dick)	<i>Sammelgel</i>	<i>10 % Trenngel</i>
H ₂ O	6,1 ml	8,2 ml
30 % Acrylamid/Bis 29:1 (Bio-Rad)	1,3 ml	6,8 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8, 0,4 % SDS	-	5 ml
0,5 M Tris/HCl pH 6,8, 0,4 % SDS	2,5 ml	-
10 % APS	25 μl	66,8 μl
TEMED	10 μl	13,2 μl
Laemmli-Probenpuffer (4x)	250 mM Tris pH 6,8, 4 % SDS, 40% Glycerol, 0,004% Bromphenolblau, 10 % β -Mercaptoethanol	
Laemmli-Laufpuffer (10x)	250 mM Tris, 2,5 M Glycin, 1 % SDS	

3.3.5 Western-Blot-Analyse (Immunblot)

Proteine, die mittels SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt wurden (3.3.4) können mit Hilfe des Western-Blots identifiziert und quantifiziert werden. Dazu wurden die Proteine zunächst im Nassverfahren in einer Western-Blot Apparatur (Bio-Rad) in Transferpuffer aus dem Polyacrylamidgel

auf eine Nitrozellulose-Membran (Amersham, Hybond ECL) transferiert. Die Membranen wurden danach erst kurz in PBS gewaschen und die freien Protein-Bindungsstellen dann 1 h in *Odyssey Blocking Buffer 927-40000* (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA) abgesättigt. Anschließend wurden die Membranen 1 h mit dem Primärantikörper (1:1000 in OBB mit 0,1 % Tween) hybridisiert und danach dreimal 5 min in PBST gewaschen. Es folgt die Hybridisierung mit einem geeigneten Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper (1:10000 in OBB mit 0,1 % Tween). Die Membranen wurden erst dreimal in PBST und ein weiteres Mal in PBS gewaschen und am *Odyssey Infrared Imaging System* (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska/USA) entwickelt. Bei einzelnen Western-Blots wurde ein HRP-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet und zur Detektion für einige Minuten ein Strahlungsempfindlicher Film (Amersham Hyperfilm ECL) aufgelegt. Der Film wurde anschließend per Hand mit Entwickler- und Fixierlösungen entwickelt.

Transfer-Puffer Laemmli-Laufpuffer (3.3.4), 20 % Methanol, 0,1 % Tween

3.3.6 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)

Der Effekt des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-transfers (FRET) beruht auf der abstandsabhängigen Übertragung der Energie eines angeregten Teilchens von einem Fluorophor auf ein zweites [Förster, 1948]. L. Stryer und R. Haugland zeigten später, dass FRET vom Kehrwert der sechsten Potenz des Abstandes der beiden Fluorophore abhängt und schlugen vor diesen quantenmechanischen Prozess als „optisches Nanometermaß“ zur Untersuchung von Abstandsverhältnissen und Abstandsänderungen von biologischen Molekülen einzusetzen [Stryer und Haugland, 1967; Stryer, 1978]. Abhängig vom Fluorophorenpaar findet FRET bei einem Abstand von 10-80 Å statt. Neben dem relativen Abstand der beiden Fluorophore zueinander ist die Energieübertragung ebenfalls von der spektralen Überlappung der beiden Fluorophore abhängig. Ein strahlungsfreier Energietransfer kann nur stattfinden, wenn das Emissionsspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen, d. h. die Übergangsdipole von Donor und Akzeptor koppeln. Diese Abhängigkeit wird durch den Korrekturfaktor κ ausgedrückt. Es wird dabei angenommen, dass die Dipole frei rotieren und alle Winkel statistisch gemittelt vorkommen, sodass $\kappa^2 = \frac{2}{3}$ annimmt [Dale *et al.*, 1979]. Spektrale Überlappung und Orientierung der Fluorophore werden bei der Berechnung des Förster-Radius R_0 berücksichtigt. Der Förster-Radius ist spezifisch für ein bestimmtes Fluorophoren-Paar und beschreibt den Abstand, bei dem die Effizienz der Energieübertragung 50 % beträgt [Förster, 1948; Lakowicz, 1983].

$$R_0^6 = 8,8 \times 10^{-23} \Phi_D \kappa^2 \eta^{-4} J(\lambda)$$

R_0^6	Förster-Radius
Φ_D	Fluoreszenzquantenausbeute
κ^2	Korrekturfaktor
η	Refraktionsindex (Er beschreibt wie das Medium in dem sich die Fluorophore befinden den Energietransfer beeinflusst. Wasser $\hat{=} 1,33$, Cytosol $\hat{=} 1,4$)
$J(\lambda)$	Überlappungsintegral zwischen der Emission des Donors und der Absorption des Akzeptors

Der wichtigste Parameter zur Quantifizierung des Energietransfers ist die FRET Effizienz E , die den Anteil der vom Donor aufgenommenen Energie beschreibt, die auf den Akzeptor übertragen wird [Stryer und Haugland, 1967; Stryer, 1978]. E kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen.

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

R_0^6 Förster-Radius
 r Abstand der Fluorophore zueinander

Der geringe Abstand und die starke Abstandsabhängigkeit machen FRET zu einem wichtigen Werkzeug in der Biochemie zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen (intermolekularer FRET) sowie Faltung bzw. Konformationsänderungen von Proteinen (intramolekularer FRET) [Clegg, 1995, 2002]. Dazu werden die zu untersuchenden Proteine direkt mit fluoreszierenden Proteinen fusioniert. Die Entdeckung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP, *green fluorescent protein*) aus der Qualle *Aequoria victoria* revolutionierte die Forschung hinsichtlich dieser Methodik [Shimomura *et al.*, 1962]. Bis heute wurden eine Reihe neuer Varianten entwickelt, die verbesserte Eigenschaften besitzen und ein breiteres Spektrum des sichtbaren Lichtes abdecken [Tsien, 1998]. Für die Entdeckung, Weiterentwicklung und Anwendung der fluoreszierenden Proteine wurde 2008 der Nobelpreis für Chemie an die drei Forscher O. Shimomura, M. Chalfie und R. Tsien verliehen. Eines der am häufigsten benutzten FRET-Paare ist (E)CFP (*enhanced cyan fluorescent protein*) und (E)YFP (*enhanced yellow fluorescent protein*).

Bestimmung der FRET-Effizienz mit der „sensitized emission“ Methode

Eine Möglichkeit zur Bestimmung der FRET Effizienz ist die „sensitized emission“ Methode, bei der die durch den Donor angeregte Emission des Akzeptors gemessen wird. Dazu wird die Fluoreszenzintensität des Donors, des Akzeptors und des Akzeptors nach Anregung des Donors gemessen [Gordon *et al.*, 1998; Wouters *et al.*, 2001]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die zu untersuchenden G-Protein gekoppelten Rezeptoren N-terminal mit ECFP bzw. EYFP gekoppelt (siehe Tab. 2.3) und spektrometrisch in den folgenden Kanälen gemessen:

		Exzitation	Emission
Donor-Kanal	(ECFP)	$\lambda_{ex} = 430nm$	$\lambda_{em} = 480nm$
Akzeptor-Kanal	(EYFP)	$\lambda_{ex} = 485nm$	$\lambda_{em} = 530nm$
FRET-Kanal	(ECFP-EYFP)	$\lambda_{ex} = 430nm$	$\lambda_{em} = 530nm$

Bei dieser Methode muss jedoch beachtet werden, dass sich die Fluoreszenz im FRET-Kanal zusammensetzt aus der durch den Donor angeregten Akzeptor-Emission (FRET), aber auch aus dem Anteil der Donor-Emission, die in den FRET-Kanal emittiert (Donor *spill-over*) und der Akzeptor-Emission nach direkter Anregung mit der Anregungswellenlänge des Donors (Akzeptor

spill-over). Zur Bestimmung der *spill-over*-Faktoren müssen daher Proben mit jeweils nur einem der beiden Fluorophore in allen drei Kanälen gemessen werden. Durchschnittlich ergaben sich folgende Werte:

Donor <i>spill-over</i>	0,35
Akzeptor <i>spill-over</i>	0,04

Nach Exzitation mit der Donor-Anregungswellenlänge (430 nm) beträgt die Emission von freiem ECFP in den FRET-Kanal 35 %. Zudem emittiert EYFP 4 % der Fluoreszenzintensität unspezifisch durch direkte Anregung bei der Anregungswellenlänge des Donors (430 nm) in den FRET-Kanal. Mit Hilfe der *spill-over*-Faktoren kann der gemessene FRET Wert folgendermaße korrigiert werden:

$$FRET^C = FRET - (0,35 \times ECFP) - (0,04 \times EYFP)$$

$FRET^C$	FRET korrigiert
$ECFP$	hintergrundkorrigierte Fluoreszenzintensität im Donor-Kanal
$EYFP$	hintergrundkorrigierte Fluoreszenzintensität im Akzeptor-Kanal

Die ermittelten Werte für das korrigierte FRET sind jedoch von der Fluoreszenzintensität der Probe abhängig. Um verschiedene Proben miteinander vergleichen zu können, werden aus den ermittelten $FRET^C$ Werten die FRET-Effizienz E nach folgender Formel berechnet:

$$E = 1 - \frac{ECFP}{ECFP + FRET^C \times \frac{Q_d}{Q_a}}$$

$FRET^C$	FRET korrigiert
$ECFP$	hintergrundkorrigierte Fluoreszenzintensität im Donor-Kanal
Q_d	Quantenausbeute des Donors (0,4)
Q_a	Quantenausbeute des Akzeptors (0,61)

Qualitative Untersuchung der FRET-Effizienz

Die zu untersuchenden Proteine werden i. d. R. in geeigneten Zellen stark überexprimiert. Dabei ist zu beachten, dass aufgrund hoher Dichte an Proteinen auch unspezifische Energieübertragungen zwischen Donor und Akzeptor stattfinden können. Es gilt also zu unterscheiden, ob eine gemessene FRET Effizienz auf tatsächliche Protein-Protein-Interaktion zurückzuführen ist.

Typ-1 Experiment Findet zwischen Proteinen eine spezifische Interaktion statt, steigt die FRET Effizienz in Abhängigkeit zum Akzeptor/Donor-Verhältnis hyperbolisch an und beschreibt eine Sättigungskurve [James *et al.*, 2006; Levoye *et al.*, 2009]. Dazu werden in den Zellen gleiche Mengen an Donor-Fusionsprotein mit steigender Konzentration an Akzeptor-Fusionsprotein gemessen. Ist das Akzeptor/Donor-Verhältnis gering, so kann bei echter Protein-Protein-Interaktion jeder Akzeptor mit einem Donor interagieren, sodass die FRET-Effizienz exponentiell ansteigt. Mit steigender Akzeptorkonzentration sinkt die Zahl der frei verfügbaren Donoren, sodass die FRET Effizienz

einen Sättigungswert erreicht. Das Akzeptor/Donor-Verhältnis, bei dem die halbmaximale FRET Effizienz (FRET₅₀) erreicht ist, gibt Auskunft über die Affinität der Interaktionspartner zueinander. Es gilt, je kleiner FRET₅₀, desto höher die Affinität der Bindungspartner. Unspezifische Interaktionen sollten sich in einem pseudo-linearen Verhältnis der FRET Effizienz zum Akzeptor/Donor-Verhältnis widerspiegeln. Die Messdaten wurden in SigmaPlot 9.0 ausgewertet und die Kurven mit Hilfe folgender Gleichung angepasst:

$$E = \frac{E_{max} \cdot (YFP/CFP)}{K_D + (YFP/CFP)}$$

E FRET Effizienz [%]
 E_{max} maximale FRET Effizienz [%]
 K_D Dissoziationskonstante

Typ-2 Experiment Eine weitere Möglichkeit die Qualität des Energietransfers zu untersuchen ist die Variation der Expressionsstärke der zu untersuchenden Proteine bei konstantem Akzeptor/Donor-Verhältnis. Spezifische Interaktionen zwischen Proteinen sollten unabhängig von der Konzentration der Bindungspartner sein [James *et al.*, 2006]. Demzufolge müsste die FRET Effizienz für tatsächliche Protein-Protein-Interaktionen stets konstant bleiben. Für unspezifische oder schwache Interaktionen sollte die FRET Effizienz jedoch pseudo-linear abhängig von der Expression sein, sodass diese bei geringer Expression gegen Null geht und mit steigender Expression ebenfalls steigt.

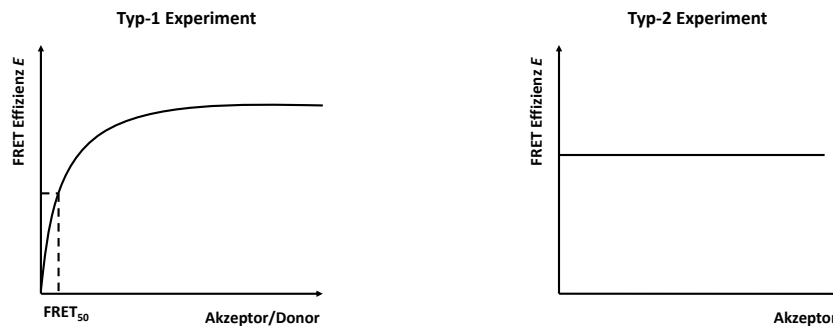


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der FRET-Messungen, Typ-1 Experiment: Die FRET Effizienz E von echten Protein-Protein-Interaktionen ist logarithmisch abhängig vom Akzeptor/Donor-Verhältnis; Typ-2 Experiment: Die FRET Effizienz E von echten Protein-Protein-Interaktionen ist bei gleich bleibendem Akzeptor/Donor-Verhältnis unabhängig von der Konzentration der Interaktionspartner

Experimentelle Durchführung der FRET-Messung mit transfizierten HEK293T Zellen

In einer 12-Loch-Platte wurden $2,5 \times 10^5$ HEK293T-Zellen pro Loch ausgesät und nach 24 h transfiziert (3.2.2). Nach weiteren 16-24 h wurden die Zellen einmal mit warmen PBS gewaschen, in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 1000 Upm pelletiert. Die Zellen wurden in $200 \mu\text{l}$ resuspendiert und je $2 \times 100 \mu\text{l}$ auf eine schwarze 96-Loch-Platte aufgetragen. Die Messung erfolgte

unverzögert im *Mithras LB940* (Berthold Technologies), wobei in jedem der 3 Messkanäle (FRET-, Donor- und Akzeptor-Kanal) je 10x10 Messpunkte pro Loch gescannt wurden. Bei jeder Messung wurden als Kontrolle nur mit CFP, YFP bzw. der CFP-YFP positiv Kontrolle transfizierte Zellen mitgeführt, sodass für jede Messung die CFP- und YFP-*spill-over*-Faktoren berechnet werden können (3.3.6). Zudem wurden untransfizierte Zellen gemessen und als Hintergrund abgezogen.

3.4 Histologische Methoden

3.4.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Einbetten von Gewebe in Paraffin Die frisch präparierten Organe bzw. Femoralarterien (3.7) wurden über Nacht bei 4 °C in 4 % Formaldehyd in PBS chemisch fixiert. Zum Einbetten wurden die Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 90 %, 100 % Ethanol, jeweils 1 h schüttelnd bei RT) schrittweise dehydriert, dann in Xylol überführt und ebenfalls 2x 1 h bei RT schüttelnd inkubiert. Schließlich wurden die Gewebe über Nacht bei 65 °C mit Paraffin (*Paraplast Plus*, McCormick Scientific, Saint Louis, USA) infiltriert und eingebettet. Zum Einbetten wurden die Gewebe in Metallformen mit flüssigem Paraffin (65 °C) übergossen und auf einer Kälteplatte ausgehärtet.

Schneiden der Paraffinblöcke Die Femoralarterien wurden am Mikrotom *HM355* (Microm) über 10 Ebenen geschnitten. Die erste Schnittebene liegt oberhalb der proximalen Ligatur des Seitenastes (3.7.2). Es wurden pro Ebene 15 mal 3 μm dicke Schnitte angefertigt und zwischen den Ebenen je 50 μm getrimmt. Die Schnitte wurden in einem 50 °C warmen Wasserbad auf silanisierte Objektträger (*Superfrost*) aufgezogen. Schnitte von anderen Organen als Kontrolle wurden ebenfalls 3 μm dick in beliebigen Schnittebenen angefertigt. Die Schnitte wurden bei 50 °C getrocknet und in Objektträgerkästen bei RT gelagert.

Entparaffinieren der Schnitte Vor dem Färben der Schnitte war ein gründliches Entparaffinieren der Schnitte notwendig, weil Paraffinreste unspezifische Färbefeffekte begünstigen. Dazu wurden die Schnitte über Nacht bei 65 °C inkubiert und anschließend 2x 5 min in Xylol getaucht. Es schließt sich die Rehydratisierung in einer absteigenden Alkoholreihe (je 5 min 100 %, 90 %, 80 %, 70 % Ethanol) an. Vor Beginn der Färbung können die Schnitte nun in dest. H₂O verbleiben.

3.4.2 Elastica-van-Gieson Färbung (EvG)

Die Elastica-van-Gieson Färbung dient der morphometrischen Beurteilung der *A. femoralis* Gefäßschnitte. Elastische Fasern stellen sich dunkelviolet bis schwarz dar, kollagene Fasern (Bindegewebe) rot und Muskulatur gelb. Dazu wurden die entparaffinierten Schnitte (3.4.1) in vorgewärmtes Resorcinfuchsin (60 °C) getaucht und 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit H₂O und kurz mit 90 %igem Alkohol gespült. Die Kernfärbung erfolgte für 6 min mit Eisenhämatoxylin nach Weigert. Nach Differenzierung in HCl-Alkohol wurden die Schnitte unter warmem

fließenden Leitungswasser 10 min gebläut und nach erneuten 5 min Spülen in Van-Gieson-Lösung belassen. Nach Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die gefärbten Präparate kurz in Xylol getaucht und mit Eukitt Quick Hardening Medium (Fluka) eingebettet.

Van-Gieson-Lösung (Pikrofuchsin) 100 ml 1,2 % Pikrinsäure
 10 ml 1 % Säurefuchsin

3.4.3 Immunfluoreszenzfärbungen

In der Immunhistochemie werden mit Hilfe spezifischer Antikörper bestimmte Epitope von Zellen und Zellbestandteilen dargestellt. Bei der in dieser Arbeit verwendeten indirekten Methode wurde nicht der Primärantikörper detektiert, sondern ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper. Die Schnitte wurden zunächst entparaffiniert (3.4.1) und zur Antigendemaskierung 30 min in Citratpuffer gekocht um durch das Formalin entstandene Aldehydvernetzungen zu lösen. Vorhandene endogene Enzyme wurden mit 3 % H₂O₂ für 15 Minuten bei Raumtemperatur geblockt, um falsch positive Ergebnisse und eine Hintergrundfärbung zu verhindern. Anschließend wurden die Schnitte dreimal mit Tris-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte in einer Feuchtkammer bei RT für 1 h oder über Nacht bei 4 °C. Soweit nicht gesondert beschrieben, wurden die unkonjugierten Primärantikörper 1:100 in *REAL Antibody Diluent* (Dako, Hamburg, Deutschland) verdünnt und mit einer Pipette ca. 5 µl pro Schnitt aufgetragen. Danach wurden die Schnitte dreimal mit Tris-Puffer gewaschen. Es schließt sich die Inkubation mit einem geeigneten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper für mind. 45 min in einer abgedunkelten Feuchtkammer bei RT an. Die Sekundärantikörper wurden i. d. R. 1:200 in *REAL Antibody Diluent* verdünnt eingesetzt. Die Schnitte wurden anschließend dreimal mit Tris-Puffer gewaschen und zur Darstellung der Kerne 30 s mit 0,4 µg/ml DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Sigma-Aldrich) in dest. H₂O gegengefärbt. DAPI lagert sich bevorzugt an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA an und erhöht dabei seine Fluoreszenzintensität um das 20-fache ($\lambda_{em} = 461\text{nm}$). Schließlich wurden die Schnitte mit *Fluorescence Mounting Medium* (Dako) eingedeckt und bis zur Analyse am Mikroskop bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

3.4.4 TUNEL Färbung

Die sogenannte TUNEL Färbung (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) dient der Detektion apoptotischer Zellen [Gavrieli *et al.*, 1992; Labat-Moleur *et al.*, 1998]. Bei dieser Methode werden die bei der Apoptose durch Endonukleasen frei werdende 3'-Hydroxylgruppen an DNA Bruchstellen durch das Enzym terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden versehen. Zur Färbung wurde das *In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red* (Roche) verwendet. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Objektträger jeweils 3Mal mit PBS gewaschen. Zunächst wurden die entparaffinierten Schnitte 30 min in Citratpuffer pH 6 gekocht und langsam auf RT abgekühlt. Es folgt eine Inkubation für 15 min in 3 % H₂O₂ zum

Blocken der endogenen Peroxidase. Dann erfolgte die TUNEL Färbung in einer Feuchtkammer bei 37 °C für 1 h nach Herstellerangaben. Schließlich wurden die Kerne 30 s mit 0,4 µg/ml DAPI in dest. H₂O gegengefärbt, die Schnitte mit *Fluorescence Mounting Medium* eingedeckt und bei 4 °C gelagert.

3.5 Haltung der Mäuse

Die Mäuse wurden wie in Kapitel 2.9 beschrieben bezogen und auf der Basis der für Versuchstiere vorgeschriebenen nationalen und europäischen rechtlichen Vorgaben im FEM der Charité Berlin gehalten. Die Tiere wurden in Mäusekäfigen Typ III (5 Tiere/Käfig) gehalten. Für die nach dem Tierschutzgesetz vorgeschriebene art- und verhaltensgerechte Unterbringung von Versuchstieren erhält jede Maus in Einzelhaltung mindestens 200 cm². In Gruppenhaltung erhalten Mäuse unter 30 g KG mind. 60 cm² und Mäuse über 30 g KG mind. 100 cm²/Maus. Autoklaviertes Mäusefutter und autoklaviertes Trinkwasser erhalten die Tiere *ad libitum*. Spezielles Holzgranulat dient als Einstreu und wurde einmal pro Woche gewechselt. Die Räume sind speziell als Tierhaltungsräume konzipiert (personenlimitierte Zutrittskontrolle, Pflege durch ausgebildete Versuchstierpfleger, konstante Temperatur von 22 °C ±2 °C, relative Luftfeuchte von 60 % ±15 %, Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden mit Dämmerungsphase). Das Hygienemanagement erfolgte gemäß den Empfehlungen der FELASA. Das Enrichment-Programm für die Mäuse beinhaltet den sozialen Kontakt durch Gruppenhaltung sowie die Möglichkeit zum Nestbau (Breitstellung von Nestbaumaterial und Häuschen).

Die Anträge auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes wurde von der zuständigen Behörde genehmigt.

3.6 Erzeugung genetisch veränderter Mäuse

3.6.1 Präparation und Kultur embryonaler Fibroblasten (Feederzellen)

Primäre embryonale Fibroblasten, sog. Feeder-Zellen, tragen zu optimalen Kulturbedingungen und Aufrechterhaltung der Omnipotenz der ES-Zellen bei und dienen als Matrix für deren Wachstum. Die Präparation der Feederzellen erfolgte am Tag 13,5 aus Embryonen. Da die Feederzellen später Selektionsmedium ausgesetzt sind, wurden C57Bl/6 Mäuse mit Tg(DR4)1Jae/J verpaart, die u. a. homozygot für *npt II* sind. Eine erfolgreiche Verpaarung wurde durch das Auftreten eines Vaginalpfropfs am nächsten Tag angezeigt und die positiven Weibchen auf den Tag 0,5 *post coitum* (*p. c.*) bestimmt. Am Tag 13,5 wurden die schwangeren Weibchen durch zervikale Dislokation getötet und in 70 % Ethanol getaucht. Die folgenden Schritte erfolgen unter der Sterilbank. Der Uterus wurde heraus präpariert und in eine Petrischale mit PBS überführt. Die Embryonen wurden entnommen und der Kopf sowie die blutführenden inneren Organe entnommen. Das übrige mesenchymale Gewebe wurde mit Pinzette und Skalpell zerkleinert, in vorgewärmtes Trypsin

(1ml/Embryo) überführt und mit einer 10 ml Pipette homogenisiert. Nach einer Inkubation von 8 min bei 37 °C wurde erneut mit einer 5 ml Pipette homogenisiert und nochmals 8 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf 15-cm-Petrischalen mit je 25 ml vorgelegten EF-Medium ausgesät (etwa 1,5 bis 2 Embryonen pro Petrischale). Nach etwa 24 h wurden die Zellen trypsiniert und in ES-Einfiermedium (2.10) kryokonserviert (3.2.1).

Die kryokonservierten Fibroblasten wurden bei Bedarf in einem 37 °C warmen Wasserbad schnell aufgetaut, mit warmem EF-Medium versetzt, 3 min bei 900 Upm zentrifugiert und anschließend in 20 ml Medium auf 15-cm-Petrischalen ausgesät. Konfluent gewachsene Fibroblasten wurden 1:3 oder 1:4 passagiert. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann für 5 min mit 5 ml Trypsinlösung bei 37 °C inkubiert. Das Trypsin wurde mit 10 ml EF-Medium abgestoppt und die Zellen direkt auf neue Kulturplatten ausgesät. Vor der Verwendung als Feeder für ES-Zellen (Passage 3-4) wurden die Fibroblasten mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Mitomycin C (Sigma) in EF-Medium behandelt, um deren Zellteilung irreversibel zu blockieren. Nach 1-3 h Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurden die wachstumsinaktivierten Zellen mit PBS gewaschen, erneut trypsiniert und kryokonserviert. Für die ES-Zellkultur (3.6.2) wurden die Feederzellen bei Bedarf aufgetaut und auf Gelatine-beschichtete Platten ausgesät.

3.6.2 Kultur und Transfektion embryonaler Stammzellen

Kryokonservierte ES-Zellen wurden in ES-Zellkulturmedium aufgenommen, sorgfältig vereinzelt und in 10-cm-Zellkulturplatten auf einem Monolayer inaktivierter Fibroblasten (3.6.1) ausgesät. Das Medium wurde jeden Tag gewechselt und die Zellen je nach Dichte alle ein bis zwei Tage passagiert (1:3 bis 1:6), um ein konfluentes Wachstum der ES-Zellen und die damit einhergehende Differenzierung zu verhindern. Für die Transfektion wurden 1×10^7 exponentiell wachsende ES-Zellen in 800 μl PBS aufgenommen und mit 20 μg linearisiertem Rekombinationsvektor in einer Elektroporationskuvette (Gene-Pulser Kuvette 0,4 cm, Bio-Rad) vereinigt. Nach Elektroporation bei 230 V, 500 μF (5-7 ms Impuls) wurden die Zellen auf vier mit Fibroblasten bewachsenen 10-cm-Zellkulturplatten ausgesät.

3.6.3 Selektion und Isolation einzelner ES-Zellklone

Primäres Targeting Die Positivselektion homolog rekombinierter ES-Zellklone erfolgte über die Neomycinresistenz des Rekombinationsvektors durch Zugabe von 400 $\mu\text{g/ml}$ Geneticin am Tag 2 nach der Elektroporation. Nach 7-10 Tagen erfolgte die Separation der resistenten Klone. Dazu wurden die ES-Zellklone vorsichtig mit PBS gewaschen und mit frischem PBS überschichtet. Die Klone wurden dann unter dem Lichtmikroskop mit einer 20 μl Pipette in eine 96-Loch-Platte überführt. Die Zellen wurden anschließend 5 min mit je 30 μl Trypsin/Loch bei 37 °C inkubiert, unter Zugabe von je 50 μl ES-Medium mit der Pipette sorgfältig vereinzelt und auf 96-Loch-Platten mit Feederzellen überführt. 2 Tage später wurden die Zellen passagiert und auf 2 neue 96-Loch-Platten aufgeteilt, eine davon mit Feederzellen, die andere nur mit Gelatine beschichtet. Die auf

Fibroblasten gewachsenen ES-Zellen wurden nach zwei bis drei Tagen bei Erreichen ausreichend großer Einzelkolonien eingefroren. Dazu wurden die Klone einmal mit PBS gewaschen, mit 25 μ l Trypsinlösung inkubiert (5 min, 37 °C) und nach Zugabe von 75 μ l ES-Einfriermedium (2.10) gut vereinzelt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Die für die DNA-Isolierung vorgesehene Gelatine-Platte wurde bis zur Konfluenz weiter kultiviert um eine ausreichende Zellzahl zu erreichen. Homolog rekombinierte ES-Zellklone wurden mittels Southern-Hybridisierung (3.1.16) ermittelt. Anschließend konnte auf die kryokonservierte 96-Loch-Platte zurückgegriffen werden, um korrekt rekombinierte Klone wieder in Kultur zu nehmen.

Sekundäres Targeting Ein positiver ES-Zellklon aus dem primären Targeting wurde aufgetaut und auf 10-cm-Zellkulturplatten expandiert. Es erfolgte die Transfektion der Zellen (3.6.2) mit dem pIC-Cre-Plasmid [Gu *et al.*, 1993], welches die Expression der Cre-Rekombinase in den Zellen ermöglicht. Dieses Enzym erkennt spezifische loxP-Sequenzen und entfernt Sequenzen, die zwischen zwei in gleicher Richtung orientierten loxP-Sequenzen liegen. Dadurch wurde die „gefloxte“ Neo-TK-Selektionskassette aus dem ES-Zell-Genom entfernt. Durch Zugabe des mutagenen Nukleosid-analogons Ganciclovir ab Tag 2 nach der Transfektion sterben alle Zellen, die das Thymidinkinase-Gen exprimieren, da diese das Analogon phosphorylieren und in ihre DNA einbauen [Thomas und Capecchi, 1987; Mansour *et al.*, 1988]. Folglich können nur die Zellen überleben, bei denen die Selektionskassette durch Cre-vermittelte Rekombination entfernt wurde (Negativselektion). Die Isolation und Analyse positiver ES-Zellklone erfolgte analog zum primären Targeting (3.6.3).

3.6.4 Superovulation und Präparation von Blastozysten

Die Superovulation und Präparation der Blastozysten werden freundlicherweise von Dr. Geert Michel (FEM, Charité) nach Nagy *et al.* [2003] durchgeführt. Dazu werden C57Bl/6-Weibchen durch je einmalige intraperitoneale Injektion von 5-10 IU *Pregnant Mare's Serum Gonadotropin* (PMSG) bzw. Humanes Choriongonadotropin (HCG) im Abstand von 48 h und anschließende Verpaarung mit C57Bl/6-Männchen zur Superovulation gebracht. Nach erfolgreicher Verpaarung (Vaginalpfropf am Tag 0,5) werden die Blastozysten am Tag 3,5 *p. c.* aus den zuvor präparierten Eileitern mit einer Transferpipette gespült und in geeignetem Medium im Brutschrank aufbewahrt.

3.6.5 Injektion embryonaler Stammzellen in Blastozysten und Uterustransfer

Blastozysteninjektion und Uterustransfer werden freundlicherweise von Dr. Geert Michel (FEM, Charité) modifiziert nach Bradley und Robertson [1986] und Nagy *et al.* [2003] durchgeführt. Homolog rekombinierte ES-Zellen werden mit Hilfe von Kapillaren in einer Mikroinjektionsanlage in präparierte Blastozysten (3.6.4) injiziert und in pseudoträchtige CB6F1-Weibchen transferiert, da der Hormonhaushalt dieser Tiere dem eines trächtigen Tieres entspricht. Diese erhält man durch die Kopulation mit vasektomierten Männchen. Die pseudoschwangeren Weibchen werden 2,5 Tage *p. c.* betäubt, die Eileiter freigelegt und sechs bis acht Blastozysten mit der Transferkapillare in

jede Eileiterseite transferiert. Nach dem Transfer wird das Peritoneum genäht und das Fell mit einer Wundklammer verschlossen.

3.7 Femoralisverletzungsmodell der Maus

Die Induktion der Intimahyperplasie in der Maus durch Dilatation der *A. femoralis* und Denudation des Endothels wurde mit dem Femoralisverletzungsmodell, wie in 3.7.2 beschrieben, modifiziert nach Sata *et al.* [2000], erreicht.

3.7.1 Präoperative Versorgung

Um eine ausreichende und kontinuierliche postoperative Analgesie zu erreichen, wurde dem Tier 30 min vor der Narkose 5,0 mg/kg Carprofen (Rimadyl, Pfizer) subkutan verabreicht.

3.7.2 Anästhesie und Operationstechnik

Die Mäuse wurden durch eine Isofluran-Inhalationsnarkose in den operationsfähigen Zustand gebracht (Stadium III/2, Chirurgische Toleranz). Die Mäuse wurden dazu in einer Ganzkörperkammer, die an ein Inhalationsgerät mit halbgeschlossenem System (Harvard Apparatus, England) angeschlossen ist, mit einer Konzentration von 4 % Isofluran (*Forene*, Abbott, Billingstadt, Schweden) und 1000 ml O₂/min narkotisiert. Nach Verlust des Stellreflexes werden die Mäuse aus der Ganzkörperkammer entnommen und an die Nasenmaske angeschlossen in der die Inhalationsanästhesie mit 1,8 bis bis 2,2 % Isofluran und 300 bis 400ml O₂/min durchgeführt wurde. Nach dem Verlust des Zwischenzehenreflexes wurde das Tier in Rückenlage auf einer Wärmematte mit den Hintergliedmaßen fixiert. Während der gesamten Dauer der Operation wurde durch eine rektale Temperatursonde die Körperkerntemperatur kontrolliert und in einem Bereich zwischen 36,5 -37,0 °C gehalten. Die Augen wurden mit Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Roche) vor dem Austrocknen geschützt. Für die Enthaarung an den beiden Innenseiten der Oberschenkel und am Bauch wurde Enthaarungscreme (Asid Bonz, Herrenberg, Deutschland) verwendet. Eine anschließende Desinfektion der Haut fand mit Cutasept-F (Bode, Hamburg, Deutschland) statt. Die gesamte Operation fand unter einem Mikroskop (Leica, Deutschland) mit mikrochirurgischen Instrumenten (FST, Heidelberg, Deutschland) statt.

Nachdem die chirurgische Toleranz durch Testen des Zwischenzehenreflexes an der Hintergliedmaße überprüft worden ist, wurde der Hautschnitt medial an der Innenseite des Oberschenkels durchgeführt. Dabei wurde die Haut auf einer Länge von ungefähr 0,5 cm zwischen Kniegelenk und Leiste eröffnet. Nach stumpfem Durchtrennen des Fettes lagen *Arteria*, *Vena*, und *Nervus femoralis* frei. Nun wurde der *N. femoralis* proximal isoliert und die beiden Gefäße zeitweilig mit einem Faden (USP 8/0 Prolene, Ethicon, Norderstedt) umschlungen. Dadurch wurde es später möglich eine temporäre Ischämie zu erzeugen, um Blutungen beim Ziehen des Drahtes zu vermeiden. Im Bereich des Kniegelenks wurde zwischen den *Mm. rectus femoris* und *vastus medialis* in die Tiefe

präpariert und ein Seitenast der *A. femoralis* freipräpariert. Die Arterie wurde anschließend distal permanent ligiert (USP 8/0 Prolene, Ethicon, Norderstedt, Deutschland). An der Bifurkation von Seitenast und *A. femoralis* wurde der Abgang mit einem Faden umschlungen (USP 8/0 Prolene, Ethicon, Norderstedt) und durch leichten Zug temporär ligiert. Nun wurde zwischen der permanenten und der temporären Ligatur der Seitenast mit einer Gefäßschere („Mini Vannas“, FST, Heidelberg) eröffnet und der Draht („standard-guidewire“ für Herzkatheter-Untersuchungen (Durchmesser: 0,014 inch, Epflex, Deutschland) über diesen Seitenast ca. 5 mm in die *A. femoralis* geschoben. Nach 60 s wurde der Draht vorsichtig zurückgezogen. Dabei wurde durch die proximale Umschlingung an der *A.* und *V. femoralis* temporär der Blutfluss unterbunden. Nachdem der Draht aus dem Seitenast gezogen wurde, wurde dieser proximal verschlossen (USP 8/0 Prolene, Ethicon, Norderstedt). Anschließend wurde der Blutfluss in der *A.* und *V. femoralis* wiederhergestellt. Der Wundverschluss erfolgte mit 3-4 U-Nähten (USP 6/0 Vicryl, Ethicon, Norderstedt). Freundlicherweise wurde die Operation der Mäuse von Dr. Nicole Langwieser und Dr. Tobias Haase durchgeführt.

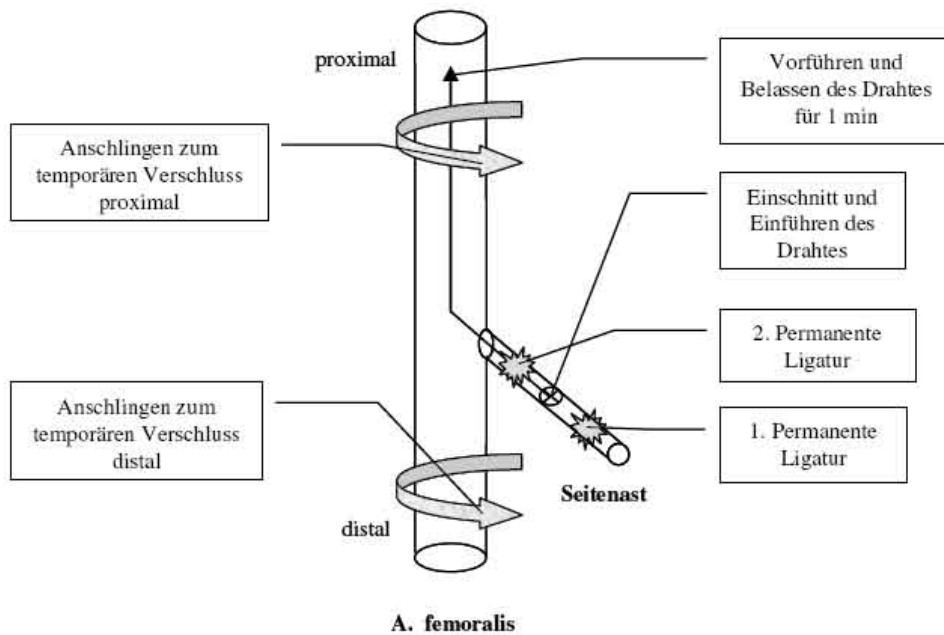


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des murinen Femoralisverletzungsmodells.

3.7.3 Postoperative Versorgung

Da die Schmerzen nach dem operativen Eingriff als gering bis mäßig eingeschätzt werden können, wurde postoperativ einmalig 5,0 mg/kg Carprofen *s. c.* (Rimadyl, Pfizer) verabreicht. Das Allgemeinbefinden der Tiere wurde täglich in regelmäßigen Abständen kontrolliert.

3.7.4 Euthanasie, Perfusion und Probengewinnung

Die Tötung der Mäuse erfolgte nach einem Beobachtungszeitraum von 7 bzw. 14 Tagen *post-Intervention*. Die Mäuse wurden zunächst durch Isofluran-Inhalationsnarkose wie unter 3.7.2 beschrieben bis zur Reflexlosigkeit tief anästhesiert und durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend erfolgte die Thorakotomie und Perfusion. Zur Reduktion postmortalen Reaktionen wurden die Tiere dabei auf Eis gelagert. Die Mäuse wurden dazu in Rückenlage gebracht und der Thorax in Höhe des Sternums entlang des Rippenbogens im Bereich der Knochen-Knorpel-Grenze eröffnet. Für die Perfusion wurde das rechte Herzohr eröffnet, mit einer Kanüle in den linken Ventrikel gestochen und bis zur Blutleere der Leber mit 15-20 ml eiskaltem PBS gespült.

Die Hintergliedmaßen wurden entlang der Operationswunde geöffnet und die *A. femoralis* freipräpariert. Ausgehend von der Einmündung des Seitenastes wurden etwa 5-10 mm des Gefäßes entnommen. Das Belassen der distalen und proximalen Ligatur des Seitenastes und etwas Bindegewebe im Bereich des Seitenastes schuf einen fixen Anfangspunkt für die histomorphometrische Untersuchung. Die Gefäße wurden zur Anfertigung von Paraffinschnitten wie unter 3.4.1 beschrieben in 4 % PFA fixiert. Um ein Abknicken durch Absinken des Gefäßes auf den Boden des Reagenzgefäßes zu verhindern, werden diese zuvor in ein Stück Filterpapier eingerollt und wie unter 3.4 beschrieben weiter behandelt.

3.8 Behandlung von Versuchsgruppen

Zur Untersuchung der Bedeutung von Entzündungsreaktion und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in der Neointimabildung wurden Mäuse einer Femoralisverletzung (3.7) unterzogen und in folgende Behandlungsgruppen eingeteilt:

mitoTempo MitoTEMPO, ein SOD-Mimetikum, das durch die Bindung an ein Triphenylkation die Eigenschaft besitzt biologische Membranen zu passieren und sich vom negativen Membranpotential angezogen in der inneren Mitochondrienmembran akkumuliert, inaktiviert überwiegend mitochondriale Superoxidradikale. Zur Hemmung mitochondrialer ROS wurde den Mäusen *s. c.* 0,7 mg/kg KG mitoTempo (Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland) injiziert. Die gebrauchsfertigen Aliquots wurden direkt vor der Behandlung frisch hergestellt. Die Behandlung begann 30 min nach der OP im 24 h Rhythmus.

N-Acetyl-Cystein (NAC) NAC besitzt durch seine Thiolgruppe antioxidative Eigenschaften und induziert als Gluthation-*Prodrug* dessen Synthese. Als globaler ROS-Fänger wurde Mäusen 1 mg/ml NAC (Sigma-Aldrich) über das Trinkwasser *ad libitum* verabreicht. Die Behandlung begann 30 min nach der OP. Da NAC in Lösung nicht lange stabil ist, wurde die Lösung täglich frisch angesetzt und die Trinkflasche mit Aluminiumpapier abgedunkelt.

RAD001 Als Immunsuppressivum wurde den Mäusen das Rapamycinanalogon *RAD001* (Novartis, Nürnberg, Deutschland) verabreicht. Die Behandlung begann bereits 3 Tage vor der OP mit einer Initialdosis von 10 mg/kg/d (in 100 μ l H₂O) per Schlundsonde. Ab dem Tag der OP erfolgte die weitere Behandlung mit einer täglichen Erhaltungsdosis von 5 mg/kg. Gregory *et al.* [1995] konnten im Rattenmodell zeigen, dass die Gabe des Medikaments vor der Gefäßverletzung die Ausbildung der Neointima stärker hemmt, als die Gabe ab dem Tag der OP.

Die Behandlungsdauer betrug in allen Gruppen 7 bzw. 14 Tage. Jeweils 7 oder 14 Tage nach dem Eingriff wurden die Tiere euthanasiert, die Femoralarterien entnommen und wie unter 3.4 beschrieben analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 Reaktive Sauerstoffspezies und Inflammation beeinflussen die Neointimabildung nach Gefäßverletzung

Die Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und der Inflammation für die Neointimaentstehung wurde im Mausmodell untersucht. Dazu wurden SV129/SvImJ Mäuse, in denen beidseitig in der *A. femoralis* eine Gefäßdilataion und Endothelverletzung gesetzt wurde (3.7), in 5 Behandlungsgruppen eingeteilt. Der Einfluss von ROS sollte durch die Verabreichung von NAC, einem globalen ROS-Fänger, bzw. MitoTEMPO, einem Katalysator der Dismutation mitochondrialer ROS, unterdrückt werden. Die Suppression inflammatorischer Prozesse sollte durch die Gabe des Rapamycin-Analogons RAD001 erreicht werden.

4.1.1 Morphometrische Analyse der verletzten Gefäße

Die Tiere wurden nach 7 bzw. 14 Tagen getötet, die Femoralarterien entnommen und Paraffinschnitte der Gefäße angefertigt (3.4.1). Die morphometrische Analyse der Gefäße erfolgte über 10 Schnittebenen beginnend oberhalb der proximalen Ligatur des Seitenastes (siehe Abb. 4.1). Pro Ebene wurde ein Schnitt mittels EvG-Färbung gefärbt und mit dem Bildanalyseprogramm ImageJ ausgewertet. Es wurden die Flächen des Lumens, der *Lamina elastica interna* (Lei), der *Lamina elastica externa* (Lee) und der Adventitia gemessen. Die Neointimabildung wurde anhand der reinen Neointimafläche und anhand des Intima-Media-Verhältnisses (I/M) quantifiziert. In unverletzten Gefäßen ist die Intima so dünn, dass das I/M-Verhältnis nahe Null ist. Je ausgeprägter die Neointima, desto größer der Wert. Generell besaßen alle 14-Tage-Gruppen signifikant mehr Intima (Neointima) und Adventitia als die 7-Tage-Gruppen. Die Media blieb hingegen nahezu konstant. Es ergab sich ein I/M für die Placebo-Gruppen von $0,47 \pm 0,1$ nach 7 Tagen und von $1,82 \pm 0,21$ nach 14 Tagen. (Abb. 4.2). Sofern keine anderen Angaben gemacht werden, bezieht sich der Vergleich und die statistische Bewertung der einzelnen Behandlungsgruppen im Folgenden stets auf die Placebo-Gruppe des gleichen Behandlungszeitraums. In der MitoTEMPO-Gruppe wurde nach 7 Tagen keine Veränderung, jedoch nach 14 Tagen eine signifikant kleinere Neointimafläche und ein tendenziell geringeres I/M ($1,29 \pm 0,09$; $p \leq 0,15$) ermittelt. In der NAC-Gruppe war die Neointima und das I/M nach 7 Tagen tendenziell kleiner als in der 7-Tage-Placebo-Gruppe. Vierzehn Tage *p. i.* erlosch dieser Effekt jedoch. Die Verabreichung von RAD001 führte nach 7 Tagen zunächst zu einer leichten und nach 14 Tagen zu einer signifikanten Reduktion der Neointima und des I/M

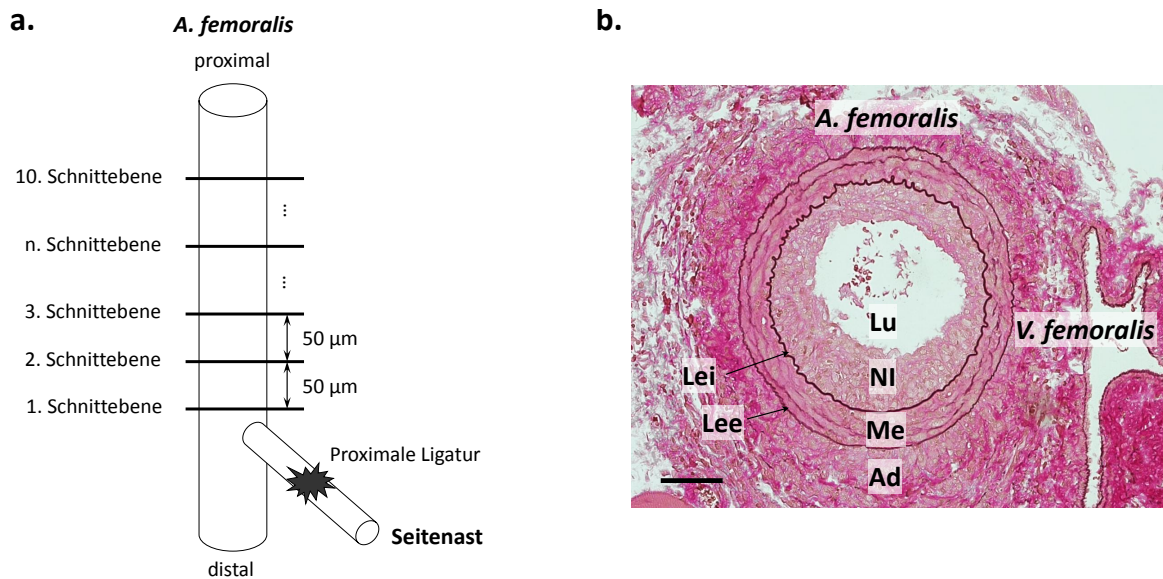


Abbildung 4.1: Morphometrische Analyse der Femoralarterien. a. Darstellung der histologischen Schnittebenen. Es wurden Schnitte über 10 Schnittebenen angefertigt, beginnend oberhalb der proximalen Ligatur. Pro Ebene wurden 15 Schnitte von je $3\ \mu\text{m}$ Dicke angefertigt und zwischen den Ebenen jeweils $50\ \mu\text{m}$ getrimmt; b. Histologischer Schnitt *A. femoralis* verletzt 14 Tage *p.i.*, EvG Färbung; Maßstab $\hat{=} 100\ \mu\text{m}$; Lu, Lumen; NI, Neointima; Me, Media; Ad, Adventitia; Lei, *Lamina elastica interna*; Lee, *Lamina elastica externa*.

($0,82 \pm 0,06$).

Zusammenfassend konnte die Behandlung mit MitoTEMPO die Neointimabildung besser hemmen, als die Behandlung mit NAC. Die Immunsuppression mit RAD001 war jedoch die effektivste Behandlung zur Verringerung der Neointimabildung.

4.1.2 Untersuchung der Rekrutierung von Entzündungszellen zum Ort der Gefäßverletzung

Zur Beurteilung der Inflammation im verletzten Gefäß wurden Mac-2 (*Macrophage-2 antigen*) als allgemeiner Inflammationsmarker und CD3 (T-Zellrezeptor) als spezieller Marker für T-Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbungen detektiert. Dazu wurden von jedem Gefäß Paraffinschnitte der Ebenen 3, 4 und 5 gefärbt und die positiv gefärbten Zellen in sogenannten *High Power Fields* (HPF) ausgezählt. Diese HPF entsprechen einer Größe von $100 \times 100\ \mu\text{m}$ und wurden nicht überlappend auf die jeweils interessanten Bereiche der Schnitte, d. h. Neointima, Media und Adventitia, gelegt. Pro Schnitt wurden je 3 HPFs ausgezählt und gemittelt.

Mac-2 positive Zellen wurden über den gesamten Schnitt verteilt beobachtet, die größte Dichte fand sich jedoch in der Adventitia (Abb. 4.3). In der Placebo-Gruppe wurden nach 7 Tagen $11,9 \pm 3,3\ \text{Zellen}/10^3\ \mu\text{m}^2$ und nach 14 Tagen $9,2 \pm 1,2\ \text{Zellen}/10^3\ \mu\text{m}^2$ gezählt. In allen Behandlungsgruppen wurden im Vergleich zur jeweiligen Placebo-Gruppe weniger Mac-2 positive Zellen

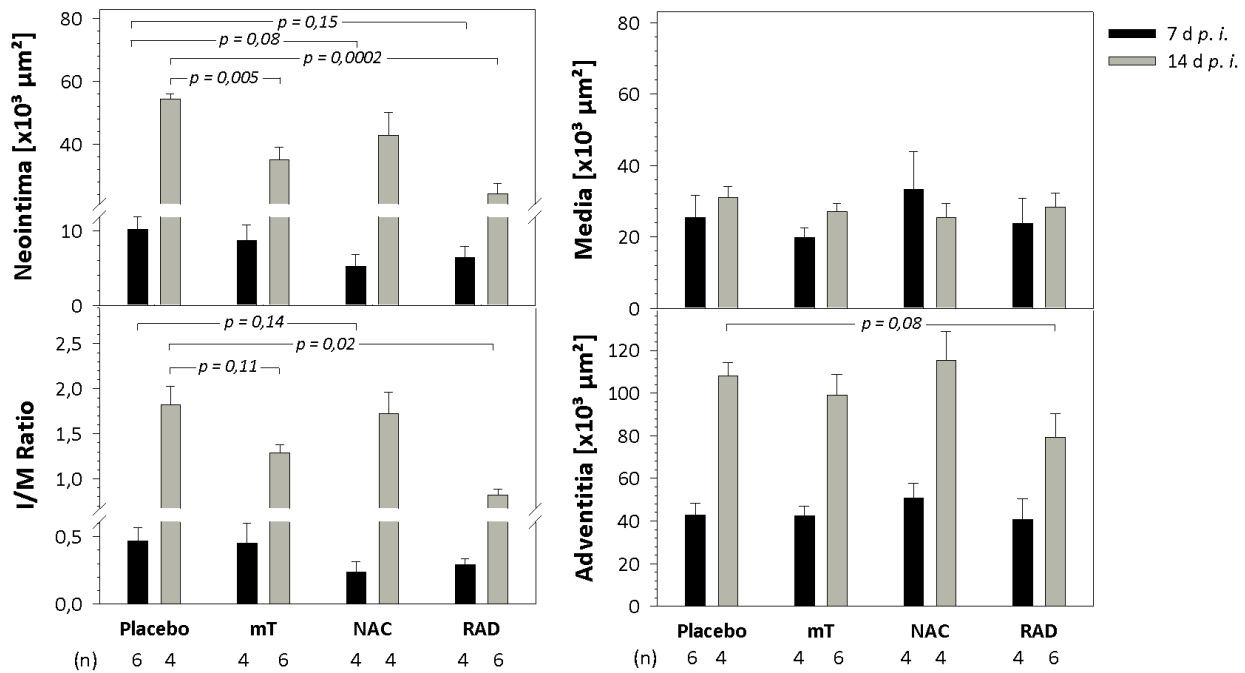


Abbildung 4.2: Morphometrische Analyse verletzter Gefäße unter Einfluss von MitoTEMPO, NAC bzw. RAD001 nach 7 und 14 Tagen. Dargestellt sind die Flächen der Neointima, Media, Adventitia und das Intima-Media-Verhältnis (I/M) \pm S.E.M.; mT, MitoTEMPO; NAC, N-Acetylcystein; RAD, RAD001 (Rapamycin); die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test und bezieht sich auf die Placebo-Gruppe des jeweils gleichen Behandlungszeitraums; $p \geq 0,05$ nicht signifikant; # $p \leq 0,15$ nicht signifikant, aber Trend erkennbar; $p \leq 0,05$ signifikant; $p \leq 0,01$ stark signifikant.

detektiert. Dabei war der Effekt nach 7 Tagen generell stärker ausgeprägt als nach 14 Tagen. Mäuse, die mit MitoTEMPO behandelt wurden, hatten sowohl nach 7 Tagen als auch nach 14 Tagen nur geringgradig weniger Mac-2 positive Zellen. Mit NAC behandelte Mäuse besaßen nach 7 Tagen 74 % weniger Mac-2 positive Zellen als die Placebo-Gruppe. Nach 14 Tagen wurden nur noch 32 % weniger Mac-2 positive Zellen gezählt. Mäuse, die mit RAD001 behandelt wurden, hatten nach 7 Tagen 91 % weniger Mac-2 positive Zellen und nach 14 Tagen 62 % weniger Mac-2 positive Zellen als die Placebo-Gruppe.

CD3 positive Zellen wurden hauptsächlich in der Adventitia, aber auch in der Media verletzter Gefäße beobachtet (Abb. 4.4). Insgesamt wurden weniger als 0,5 CD3 positive Zellen/ $10^3 \mu\text{m}^2$ gezählt, d. h. etwa 20 Mal weniger als Mac-2 positive Zellen. In den Placebo-Gruppen wurden nach 7 Tagen $0,38 \pm 0,14$ Zellen/ $10^3 \mu\text{m}^2$ und nach 14 Tagen $0,34 \pm 0,07$ Zellen/ $10^3 \mu\text{m}^2$ gezählt. Analog zur Auswertung der Mac-2 positiven Zellen zeigten alle Behandlungsgruppen tendenziell weniger CD3 positive Zellen als die Placebo-Gruppen, wobei der Effekt nach 7 Tagen stärker ausgeprägt war als nach 14 Tagen. Der schwächste Effekt wurde in der MitoTEMPO-Gruppe beobachtet. Mäuse, die 7 Tage lang mit NAC behandelt wurden, besaßen 84 % weniger CD3 positive Zellen. In der 14-Tage-NAC-Gruppe waren es lediglich 56 % weniger CD3 positive Zellen. Die Behandlung mit

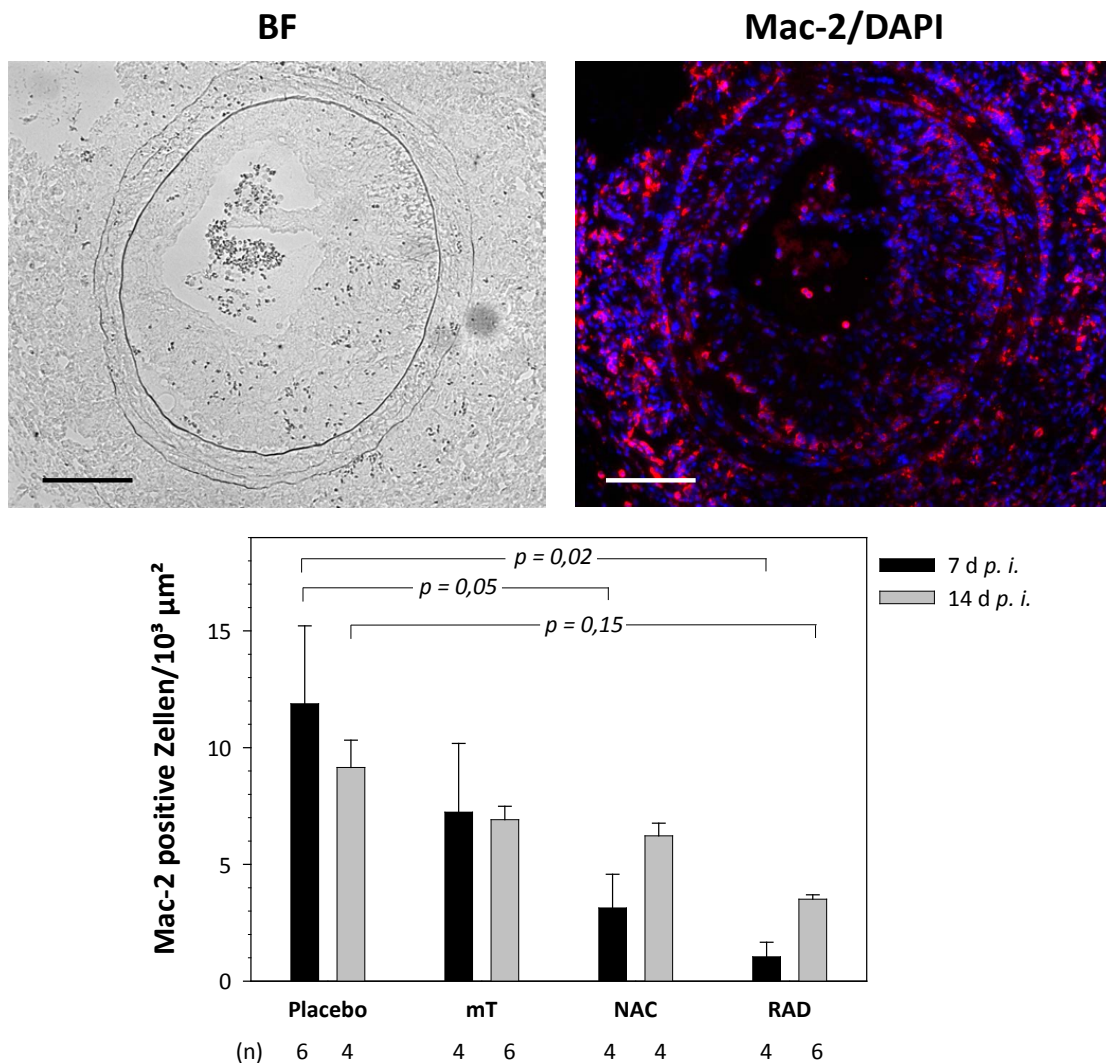


Abbildung 4.3: Einfluss von MitoTEMPO, NAC bzw. RAD001 auf die Rekrutierung Mac-2 positiver Zellen zum Ort der Gefäßverletzung Unter Verwendung von *High Power Fields* wurde die Zahl der positiven Zellen pro $10^3 \mu\text{m}^2 \pm \text{S.E.M.}$ bestimmt; Pro Gefäß wurden je 3 Schnitte aus 3 Ebenen gefärbt, ausgezählt und gemittelt; mT, MitoTEMPO; NAC, N-Acetylcystein; RAD, RAD001 (Rapamycin); Maßstabbalken $\hat{=} 100 \mu\text{m}$; die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test und bezieht sich auf die Placebo-Gruppe des jeweils gleichen Behandlungszeitraums; $p \geq 0,05$ nicht signifikant; # $p \leq 0,15$ nicht signifikant, aber Trend erkennbar; $p \leq 0,05$ signifikant; $p \leq 0,01$ stark signifikant.

RAD001 erzielte nach 7 Tagen 78 % bzw. nach 14 Tagen 63 % weniger CD3 positive Zellen in den verletzten Gefäßen. Im t-Test wurden jedoch keine Werte $p \leq 0,05$ ermittelt. Die geringe Zahl CD3 positiver T-Zellen führt zu entsprechend größeren Standardfehlern, sodass keine signifikanten Werte ermittelt wurden. Insgesamt zeigt sich jedoch der gleiche Trend, der auch bei der Mac-2 Färbung beobachtet werden konnte. Demnach hat die Behandlung mit RAD001 den größten Effekt und führt zu einer verminderten Rekrutierung CD3 positiver Zellen zum Ort der Gefäßverletzung.

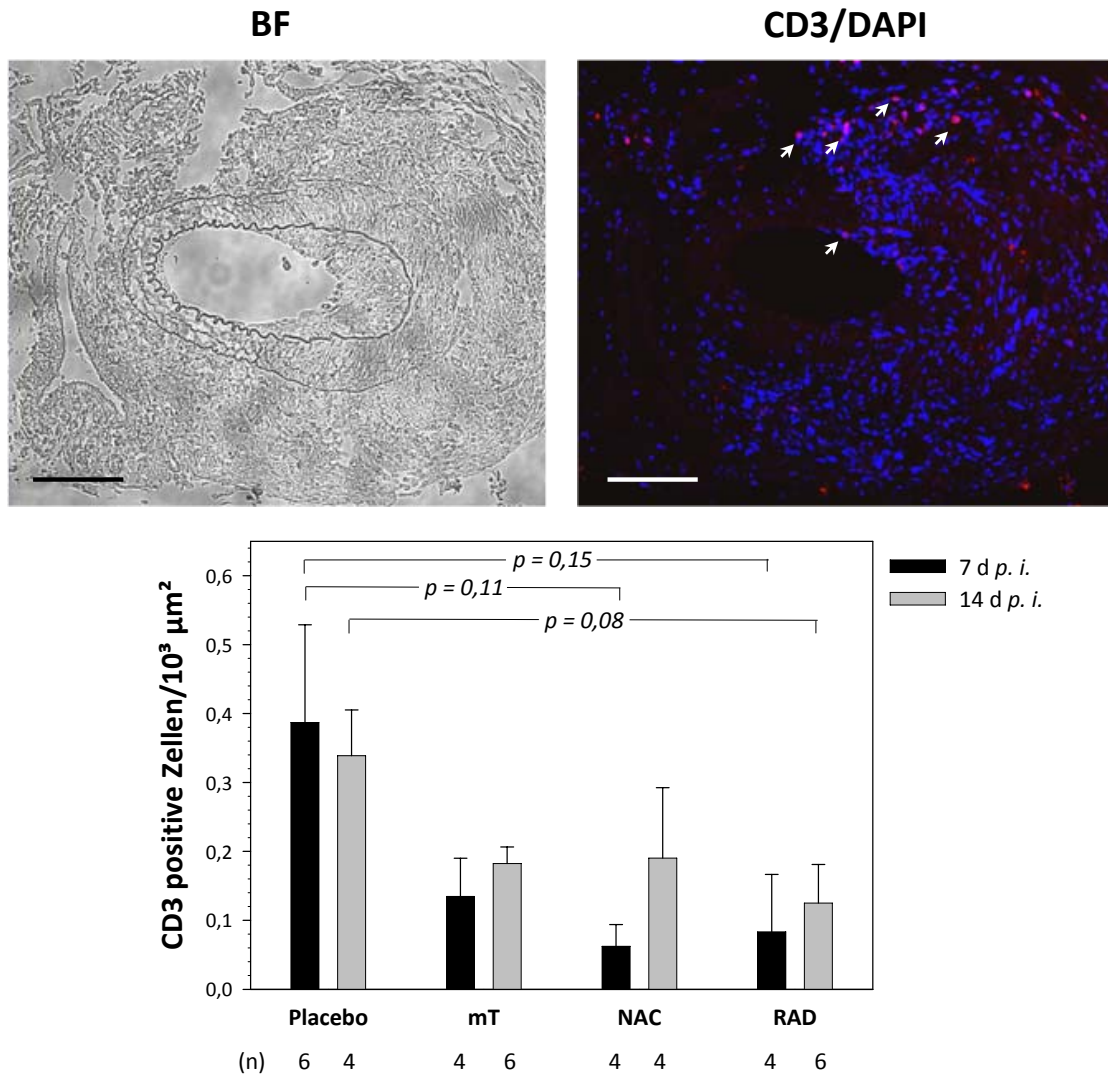


Abbildung 4.4: CD3 positive Zellen in verletzten Gefäßen unter Einfluss von MitoTEMPO, NAC bzw. RAD001 nach 7 und 14 Tagen. Unter Verwendung von *High Power Fields* wurde die Zahl der positiven Zellen pro $10^3 \mu\text{m}^2 \pm \text{S.E.M.}$ bestimmt; Pro Gefäß wurden je 3 Schnitte aus 3 Ebenen gefärbt, ausgezählt und gemittelt; mT, MitoTEMPO; NAC, N-Acetylcystein; RAD, RAD001 (Rapamycin); Maßstabbalken $\hat{=} 100 \mu\text{m}$; die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test und bezieht sich auf die Placebo-Gruppe des gleichen jeweils Behandlungszeitraums; $p \geq 0,05$ nicht signifikant; # $p \leq 0,15$ nicht signifikant, aber Trend erkennbar; $p \leq 0,05$ signifikant; $p \leq 0,01$ stark signifikant.

4.1.3 Untersuchung der Apoptose glatter Muskelzellen am Ort der Gefäßverletzung

Die Apoptose in den verletzten Gefäßen wurde mit Hilfe der TUNEL-Färbung untersucht. Dazu wurden von jedem Gefäß Paraffinschnitte der Ebenen 3, 4 und 5 gefärbt. Apoptotische Zellen wurden hauptsächlich im Bereich der Media und vereinzelt in der Adventitia detektiert. TUNEL-positive Zellen wurden unter Verwendung von HPFs ausgezählt, die zufallsgerichtet über den Bereich der Media verteilt wurden. Pro Schnitt wurden je 3 HPFs ausgezählt und gemittelt (Abb. 4.5).

In der Placebo-Gruppe wurden nach 7 Tagen $6,2 \pm 2,2$ und nach 14 Tagen $5,9 \pm 0,3$ apoptoti-

sche Zellen pro HPF ($10^3 \mu\text{m}^2$) gezählt. Nach 14 Tagen konnte in keiner Behandlungsguppe eine Veränderung gegenüber den Placebo-Gruppen beobachtet werden. Mäuse, die mit MitoTEMPO oder NAC behandelt wurden, zeigten auch nach 7 Tagen keine Veränderung. Mäuse, die nur mit RAD001 behandelt wurden, besaßen nach 7 Tagen 50 % ($p=0,08$) weniger apoptotische Zellen im verletzten Gefäß.

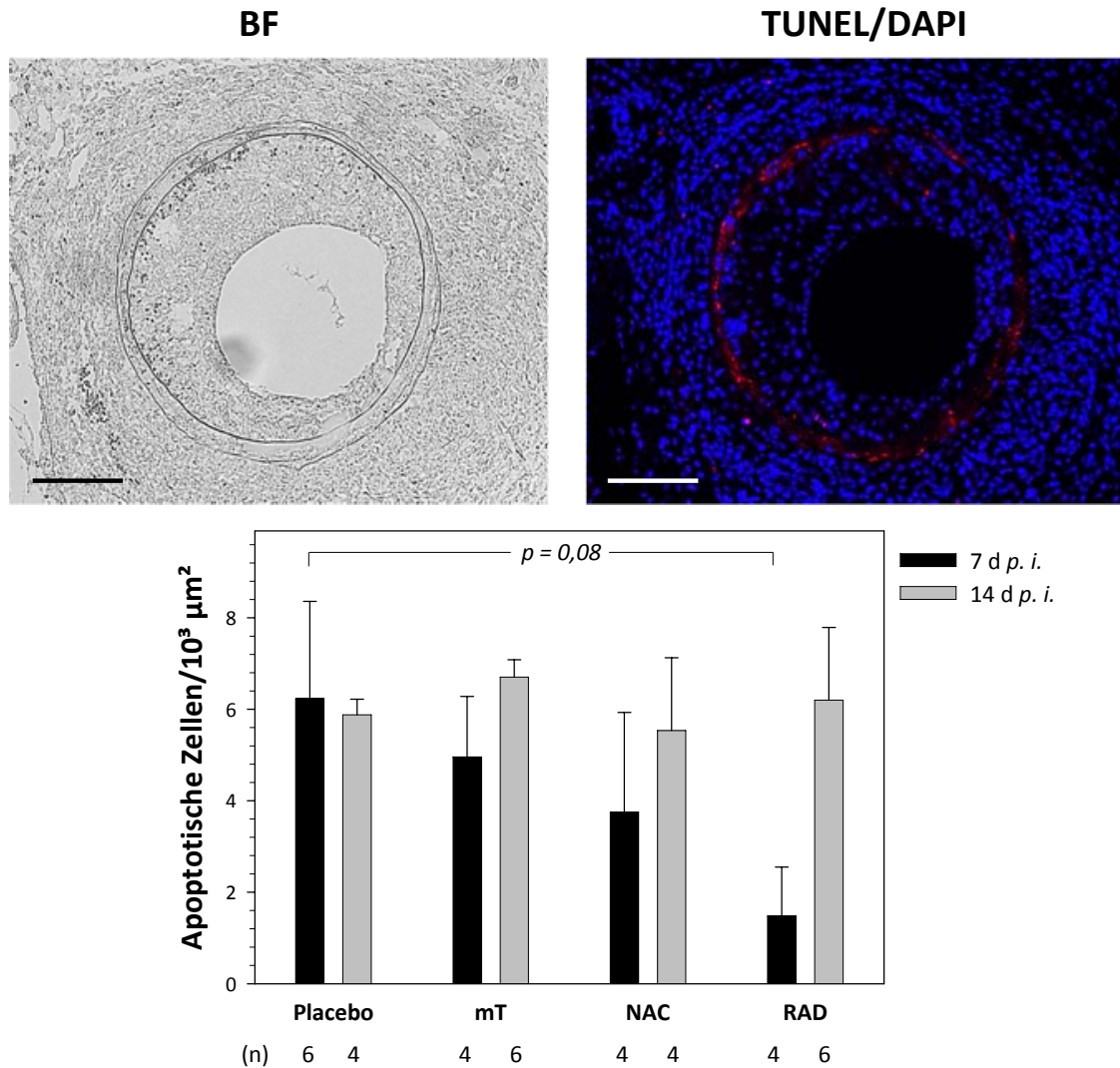


Abbildung 4.5: Einfluss von MitoTEMPO, NAC bzw. RAD001 auf die Apoptose verletzter Gefäße. Unter Verwendung von *High Power Fields* wurde die Zahl der apoptotischen Zellen pro $10^3 \mu\text{m}^2 \pm \text{S.E.M.}$ bestimmt; Pro Gefäß wurden je 3 Schnitte aus 3 Ebenen gefärbt, ausgezählt und gemittelt; mT, MitoTEMPO; NAC, N-Acetylcystein; RAD, RAD001 (Rapamycin); Maßstabbalken $\hat{=} 100 \mu\text{m}$; die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test und bezieht sich auf die Placebo-Gruppe des jeweils gleichen Behandlungszeitraums; $p \geq 0,05$ nicht signifikant; # $p \leq 0,15$ nicht signifikant, aber Trend erkennbar; $p \leq 0,05$ signifikant; $p \leq 0,01$ stark signifikant.

4.2 Das Chemokin CXCL10 beeinflusst maßgeblich die Entstehung der Intimahyperplasie

Im Kaninchenmodell konnte durch lokale Suppression von CXCL10 mit siRNA in der *A. carotis* eine verringerte Neointimabildung nach der Gefäßverletzung beobachtet werden [Zuojun *et al.*, 2012]. Es sollte nun der Effekt einer dauerhaften CXCL10 Defizienz auf die Entstehung der Intimahyperplasie im Mausmodell untersucht werden.

4.2.1 Genotypisierung von CXCL10 defizienten Mäusen

C57BL/6 WT Mäuse besitzen eine natürliche Deletion in der CXCL11 Sequenz, die zur Expression eines verkürzten nicht funktionellen Proteins führt. Die CXCL10^{-/-} Mäuse besitzen einen genetischen C57BL/6-Hintergrund. Für die Herstellung wurde jedoch eine 129Sv/J gDNA Phagenbibliothek sowie 129Sv/J-ES-Zellen (J1) verwendet [Dufour *et al.*, 2002]. Durch die große Nähe der CXCL10 und CXCL11 Sequenz im Genom ist es wahrscheinlich, dass die CXCL10^{-/-} Mäuse ein funktionelles CXCL11 besitzen. Daher sollten die Mäuse zunächst genotypisch charakterisiert werden. Genomische DNA der Mäuse wurde aus der Schwanzspitze isoliert und anschließend die CXCL11 Sequenz amplifiziert und sequenziert. Der Sequenzvergleich des PCR-Fragments mit der CXCL11 Sequenz von C57BL/6 WT Mäusen zeigt, dass die typische 1bp-Deletion der C57BL/6 CXCL11 Sequenz in den CXCL10^{-/-} Mäusen fehlt (Abb. 4.6). Die CXCL10^{-/-} Mäuse exprimieren folglich ein funktionelles CXCL11, was beim Vergleich mit den C57BL/6 Kontrollen unbedingt berücksichtigt werden muss.

```

AC127351.3 (I-TAC, B6 BAC-Klon) // GGTTCAGCCTTCCTGCCTGCCGTTGCTCTCTGCAAAGAGAGATCTCCAAAGCCAGGCAGAG 16083
|||||
B6.129S4-Cxcl10tm1Adl/J (I-TAC, PCR-Fragment) // GGTTCAGCCTTCCTGCCTGCTGTTGCTCTCTGCAAAGAGAGATCTCCAAAGCCAGGCAGAG 165
16082 AGCTGCAGCGGCTGCTGAGATGAACAGGAAGGTCACAGCCATAGCCCTGGCTGCAATATCTGGGCCACAGCTGCTCAAGGTATTTGGTGCCCGTAGCTT 15984
|||||
164 AGCTGCAGCGGCTGCTGAGATGAACAGGAAGGTCACAGCCATAGCCCTGGCTGCGATATCTGGGCCACAGCTGCTCAAGGTATTTGGTGCCCGTAGCTT 65
15983 CTGAGTCTGTCTGTTCTTGTGTTACTTTTCAAATATCTTTTCTCTAAAAATACAGTTTTAAAA 15850
|||||
64 CTGAGTCTGTCTGTTCTTGTGTTACTTTTCAAATATCTTTTCTCTAAAAATACAGTTTTAAAA 1

```

Abbildung 4.6: Genotypisierung der CXCL11 Sequenz in CXCL10^{-/-} Mäusen. Aus dem CXCL10^{-/-} Mausstamm B6.129S4-Cxcl10tm1Adl/J wurde die CXCL11 Sequenz amplifiziert und sequenziert. Dargestellt ist ein Ausschnitt des Basenvergleichs des PCR-Fragments mit der C57BL/6 CXCL11 Sequenz. Die Sequenzanalyse des PCR-Fragments zeigt nicht die typische 1bp-Deletion (rot).

4.2.2 Morphometrische Analyse der Neointimabildung in CXCL10 defizienten Mäusen

CXCL10^{-/-} Mäuse wurden beidseitig einer Gefäßdilataion und Endothelverletzung der Femoralarterie (3.7) unterzogen, nach 14 Tagen getötet und die Gefäße, wie unter 4.1.1 beschrieben, morphometrisch analysiert (Abb. 4.7).

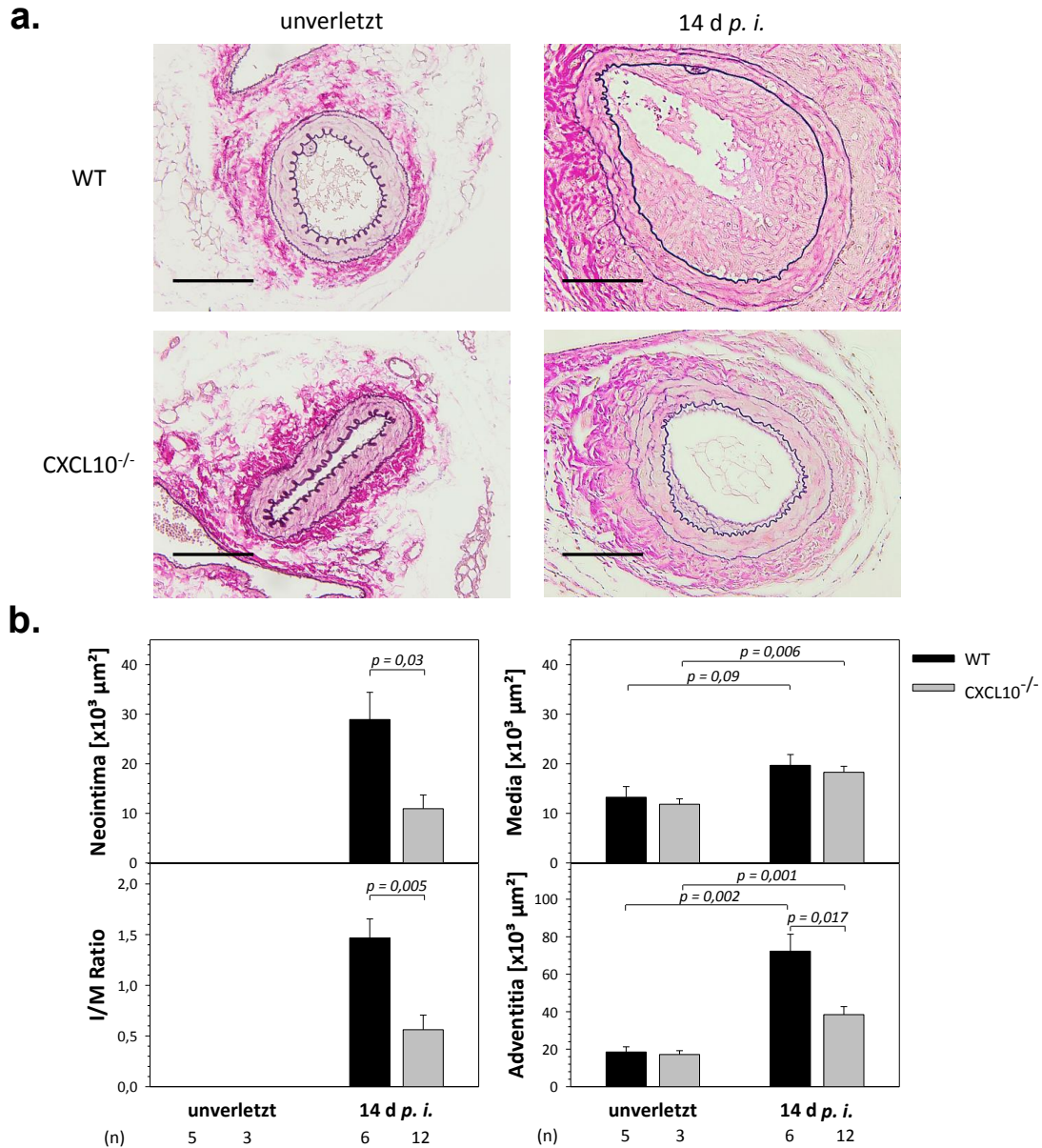


Abbildung 4.7: Morphometrische Analyse der Neointimabildung in CXCL10 defizienten Mäusen.
a. Repräsentative histologische Schnitte unverletzter und verletzter Femoralarterien von CXCL10^{-/-} und C57BL/6 WT Mäusen, gefärbt nach Elastica-van-Gieson; **b.** Morphometrische Analyse von Femoralarterien aus CXCL10^{-/-} und C57BL/6 WT Mäusen unverletzt und 14 Tage p. i.; dargestellt sind die Mittelwerte der Flächen der Neointima, Media, Adventitia und das Intima-Media-Verhältnis (I/M) \pm S.E.M.; Maßstabbalken $\hat{=}$ 100 μm ; die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test; $p \geq 0,05$ nicht signifikant; # $p \leq 0,15$ nicht signifikant, aber Trend erkennbar; $p \leq 0,05$ signifikant; $p \leq 0,01$ stark signifikant.

Verglichen mit C57BL/6 WT Mäusen bildeten CXCL10^{-/-} Mäuse 14 Tage nach der Gefäßverletzung 62 % weniger Neointima und besaßen ein um 62 % reduziertes I/M. Media und Adventitia waren im Vergleich zu den unverletzten Kontrollen sowohl in den C57BL/6 WT Mäusen als auch in den CXCL10^{-/-} Mäusen deutlich dicker. Dennoch war die Adventitia der CXCL10^{-/-} Mäuse 50 % kleiner als die der C57BL/6 WT Kontrollen.

Wie unter 4.2.1 beschrieben, muss bei der Auswertung stets berücksichtigt werden, dass die CXCL10^{-/-} Mäuse zwar einen genetischen C57BL/6 Hintergrund besitzen, jedoch im Gegensatz zu den C57BL/6 Kontrollen ein funktionelles CXCL11 exprimieren. Da CXCL10 und CXCL11 den selben Rezeptor (CXCR3) stimulieren, könnten Effekte die auf die CXCL10 Defizienz zurückzuführen sind beim Vergleich mit C57BL/6 Mäusen unterschätzt werden.

4.2.3 CXCL10 Defizienz hemmt die Rekrutierung inflammatorischer Zellen zum Ort der Gefäßverletzung

Zur Beurteilung der Inflammation in den verletzten Gefäßen wurden Mac-2 als allgemeiner Inflammationsmarker und CD3 als spezieller Marker für T-Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbungen detektiert und ausgezählt (siehe auch 4.1.2). Dazu wurden jeweils 3 Schnitte aus den Ebenen 3, 4 und 5 gefärbt und die positiven Zellen aus 3 HPFs pro Schnitt gezählt und gemittelt.

In den unverletzten Gefäßen wurden nur wenige Mac-2 positive Zellen gezählt. In den verletzten Gefäßen konnten Mac-2 positive Zellen über den gesamten Schnitt verteilt beobachtet werden, hauptsächlich aber in der Adventitia (Abb. 4.8). In den Gefäßen der CXCL10^{-/-} Mäuse wurden nach 14 Tagen 53 % weniger Mac-2 positive Zellen als in den Gefäßen der C57BL/6 Kontrollen gezählt. Dieser Effekt ist jedoch nicht signifikant und lediglich als Trend erkennbar.

CD3 positive Zellen wurden, wie auch die Mac-2 positiven Zellen, über den gesamten Schnitt verteilt beobachtet, jedoch überwiegend in der Media und Adventitia (Abb. 4.9). Auf Schnitten unverletzter Gefäße wurden nur sehr vereinzelt CD3 positive Zellen gezählt. Insgesamt ist die Zahl der CD3 positiven Zellen in den verletzten Gefäßen sehr gering, sodass weniger als 1,2 Zellen/10³µm² gezählt wurden. Die CXCL10^{-/-} Mäuse besaßen 73 % weniger CD3 positive Zellen nach 14 Tagen in den verletzten Gefäßen als die C57BL/6 Kontrollen.

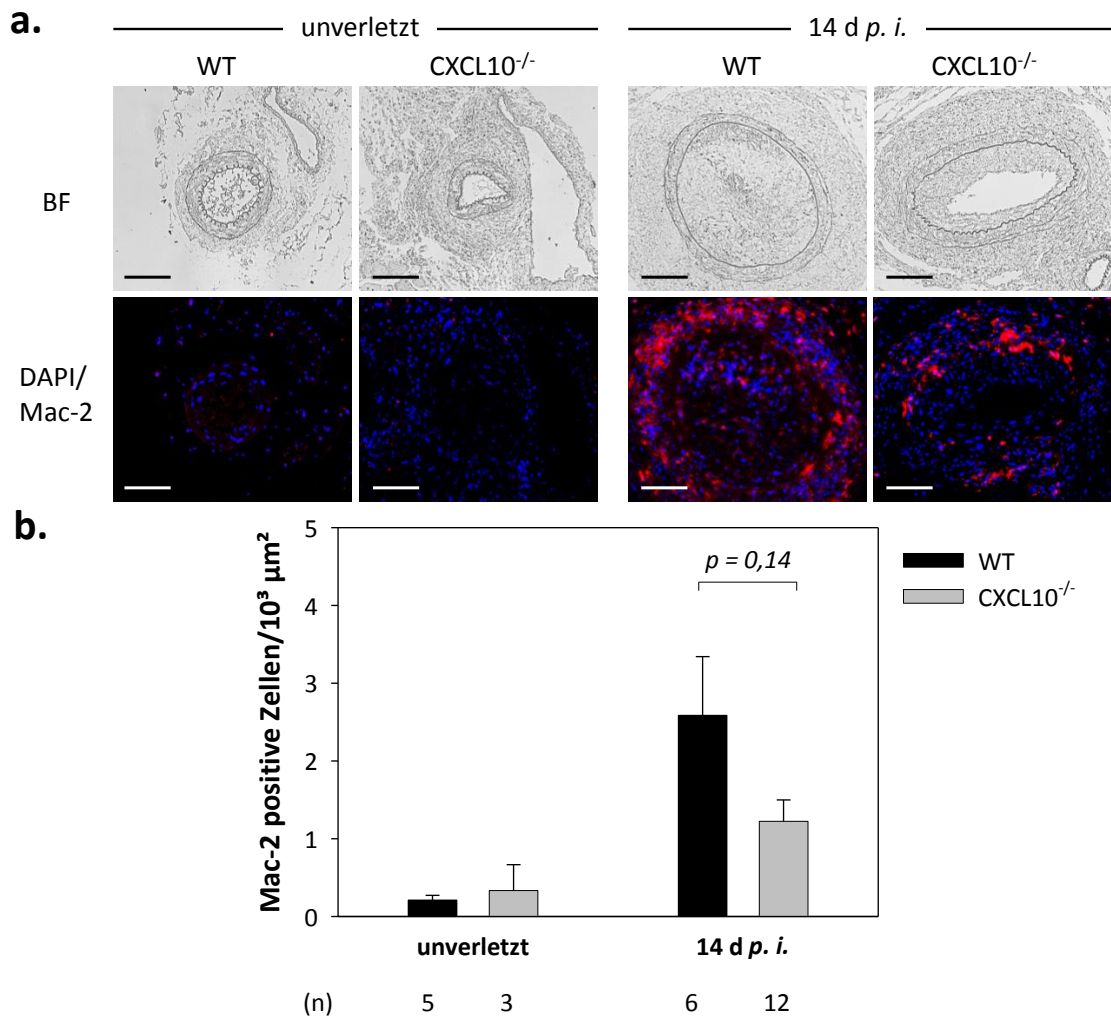


Abbildung 4.8: Einfluss der CXCL10 Defizienz auf die Rekrutierung Mac-2 positiver Zellen zum Ort der Gefäßverletzung **a.** Repräsentative Bilder der Mac-2 Färbung (rot) auf Paraffinschnitten der *A. femoralis* von CXCL10^{-/-} und C57BL/6 WT Mäusen unverletzt und 14 Tage *p. i.*; Dapi-Färbung der Zellkerne (blau); **b.** unter Verwendung von *High Power Fields* wurde die Zahl der Mac-2 positiven Zellen pro 10³ μm² ±S.E.M. bestimmt; pro Gefäß wurden je 3 Schnitte aus 3 Ebenen gefärbt, ausgezählt und gemittelt; Maßstab-balken ≙ 100 μm; die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test; $p \geq 0,05$ nicht signifikant; # $p \leq 0,15$ nicht signifikant, aber Trend erkennbar; $p \leq 0,05$ signifikant; $p \leq 0,01$ stark signifikant.

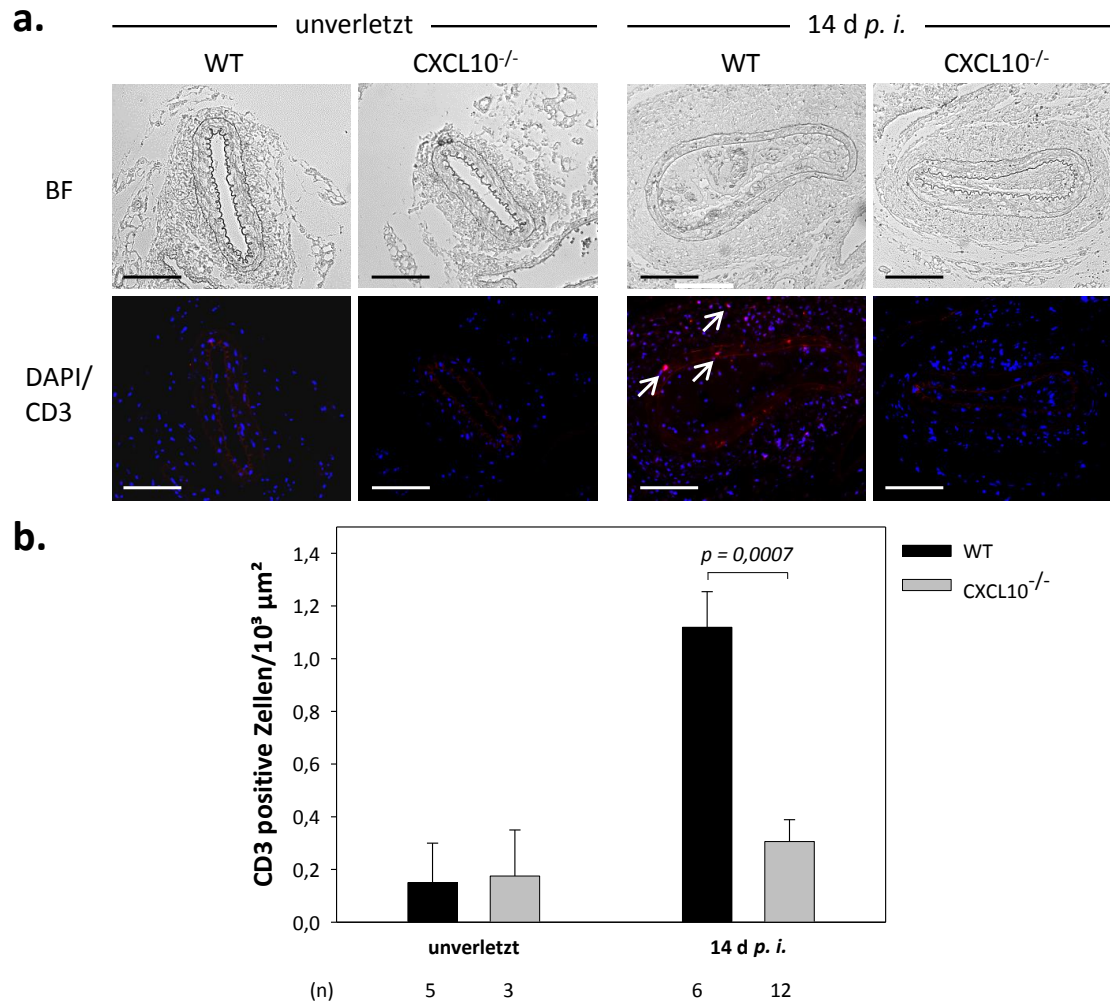


Abbildung 4.9: Einfluss der CXCL10 Defizienz auf die Rekrutierung CD3 positiver Zellen zum Ort der Gefäßverletzung a. Repräsentative Bilder der CD3 Färbung (rot) auf Paraffinschnitten der *A. femoralis* von CXCL10^{-/-} und C57BL/6 WT Mäusen unverletzt und 14 Tage *p. i.*; Dapi-Färbung der Zellkerne (blau); **b.** unter Verwendung von *High Power Fields* wurde die Zahl der CD3 positiven Zellen pro 10³μm² ±S.E.M. bestimmt; pro Gefäß wurden je 3 Schnitte aus 3 Ebenen gefärbt, ausgezählt und gemittelt; Maßstab balken ≙ 100μm; die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test; $p \geq 0,05$ nicht signifikant; # $p \leq 0,15$ nicht signifikant, aber Trend erkennbar; $p \leq 0,05$ signifikant; $p \leq 0,01$ stark signifikant.

4.2.4 CXCL10 Defizienz reduziert die Apoptose in verletzten Gefäßen

Die Zahl apoptotischer Zellen im verletzten Gefäß wurde mittels TUNEL-Färbung bestimmt. Es wurden Paraffinschnitte der Ebenen 3, 4 und 5 gefärbt und die TUNEL positiven Zellen unter Verwendung von HPF ausgezählt, die zufallsgerichtet auf den Bereich der Media gelegt wurden. Pro Schnitt wurden je 3 HPFs ausgezählt und gemittelt. Unverletzte Gefäße besaßen kaum apoptotische Zellen. In den verletzten Gefäßen der CXCL10^{-/-} Mäuse wurden 68 % weniger apoptotische Zellen gezählt als in den C57BL/6 Kontrollen (Abb. 4.10).

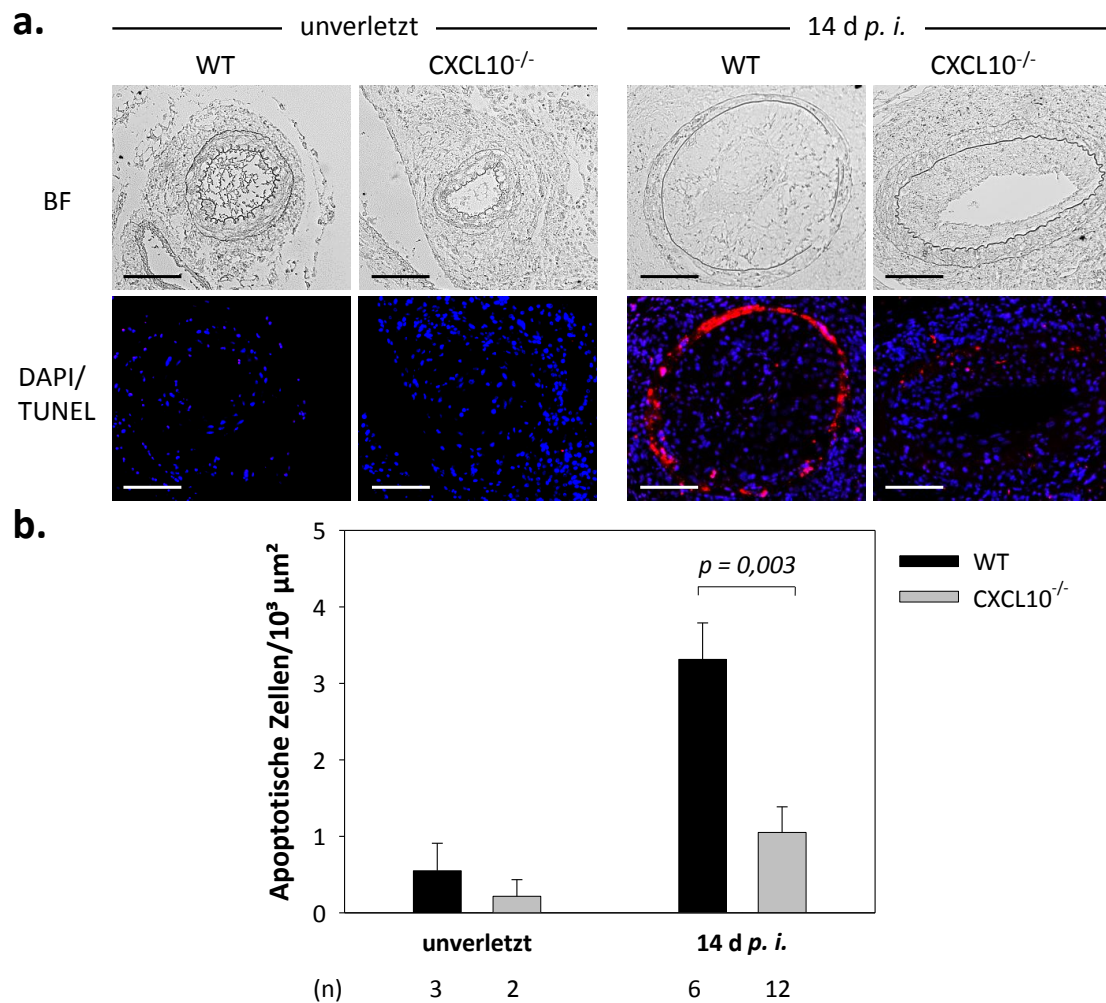


Abbildung 4.10: Einfluss der CXCL10 Defizienz auf die Apoptose in verletzten Gefäßen. a. Repräsentative Bilder der TUNEL Färbung (rot) auf Paraffinschnitten der *A. femoralis* von CXCL10^{-/-} und C57BL/6 WT Mäusen unverletzt und 14 Tage *p. i.*; Dapi-Färbung der Zellkerne (blau); **b.** unter Verwendung von *High Power Fields* wurde die Zahl der apoptotischen Zellen pro 10³μm² ±S.E.M. bestimmt; pro Gefäß wurden je 3 Schnitte aus 3 Ebenen gefärbt, ausgezählt und gemittelt; Maßstabalken $\hat{=}$ 100μm; die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test. $p \geq 0,05$ nicht signifikant; # $p \leq 0,15$ nicht signifikant, aber Trend erkennbar; $p \leq 0,05$ signifikant; $p \leq 0,01$ stark signifikant

4.2.5 CXCL10 Defizienz vermindert die Proliferation in verletzten Gefäßen

Die Proliferation in den verletzten Gefäßen wurde durch Immunfluoreszenzfärbung des Proliferationsmarkers Ki-67 untersucht. Es wurden Paraffinschnitte der Ebenen 3, 4 und 5 gefärbt und die Zahl positiv gefärbter Zellen unter Verwendung von HPF ausgezählt, die zufallsgerichtet über den Schnitt gelegt wurden. Pro Schnitt wurden je 3 HPFs ausgezählt und gemittelt. Ki-67 positive Zellen wurden gleichmäßig über den gesamten Schnitt verteilt beobachtet (Abb. 4.11). Unverletzte Gefäße besaßen nur vereinzelt Ki-67 positive Zellen. Die Zahl Ki-67 positiver Zellen 14 Tage nach der Verletzung war in den CXCL10^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den C57BL/6 Mäusen um 62 % reduziert.

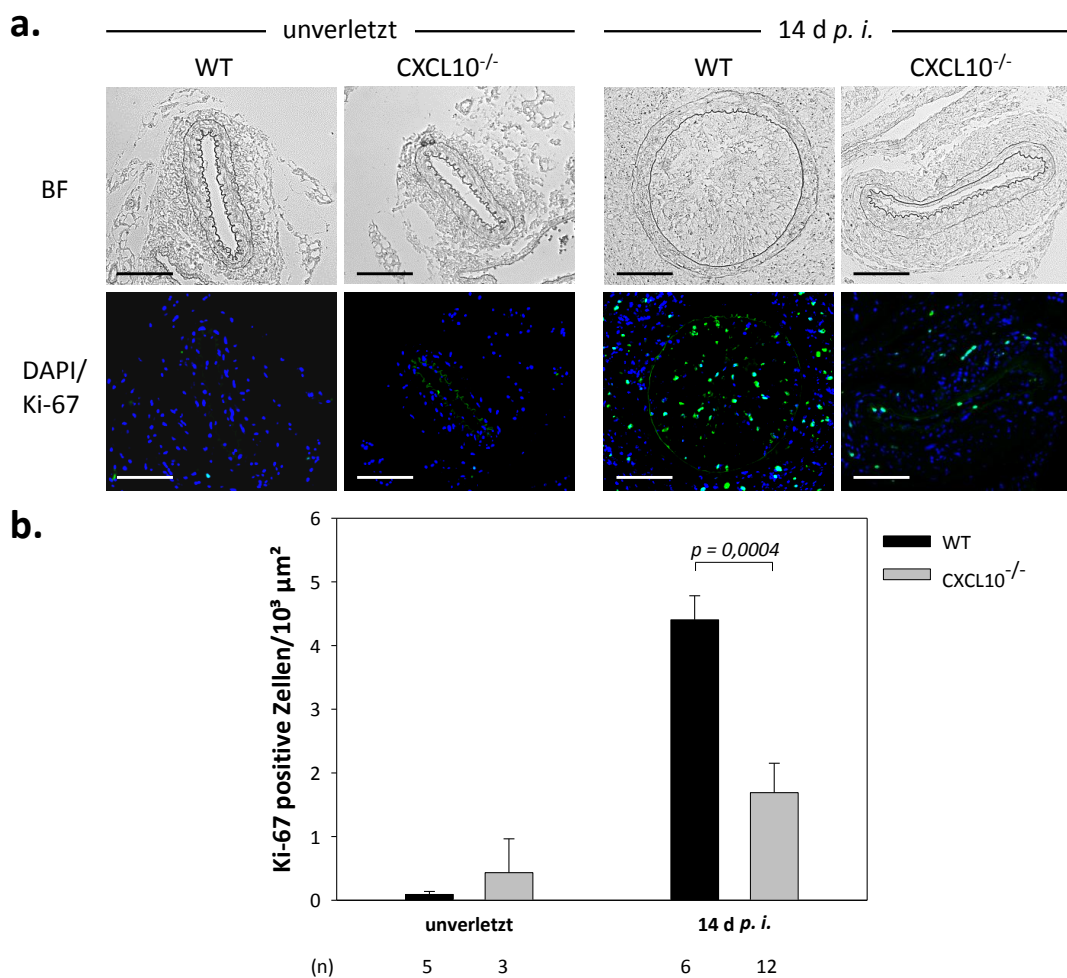


Abbildung 4.11: Einfluss der CXCL10 Defizienz auf die Proliferation am Ort der Gefäßverletzung
a. Repräsentative Bilder der Ki-67 Färbung (grün) auf Paraffinschnitten der *A. femoralis* von CXCL10^{-/-} und C57BL/6 WT Mäusen unverletzt und 14 Tage *p. i.*; Dapi-Färbung der Zellkerne (blau); **b.** unter Verwendung von *High Power Fields* wurde die Zahl der Ki-67 positiven Zellen pro 10³ μm² ±S.E.M. bestimmt; pro Gefäß wurden je 3 Schnitte aus 3 Ebenen gefärbt, ausgezählt und gemittelt; Maßstabalken $\hat{=}$ 100 μm; die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test; $p \geq 0,05$ nicht signifikant; # $p \leq 0,15$ nicht signifikant, aber Trend erkennbar; $p \leq 0,05$ signifikant; $p \leq 0,01$ stark signifikant.

4.2.6 CXCL10 Defizienz verbessert die Reendothelialisierung nach der Gefäßverletzung

Die Reendothelialisierung ist der wichtigste Prozess bei der Heilung verletzter Gefäßwände. Zur Beurteilung der Reendothelialisierung wurden Gefäße der Ebenen 3, 4 und 5 gegen den Endothelzellmarker CD31 (PECAM) gefärbt und die Zahl aller CD31 positiven Zellen im Lumen ausgezählt (Abb. 4.12). Unverletzte Gefäße besaßen $3,63 \pm 0,24$ (WT) bzw. $4,38 \pm 0,59$ (CXCL10^{-/-}) Endothelzellen pro 100 μm Lumenumfang eines Schnittes. Vierzehn Tage nach der vollständigen Denuation der Gefäße wurden in den Gefäßen der C57BL/6 Mäuse $1,92 \pm 0,7$ CD31 positive Zellen pro

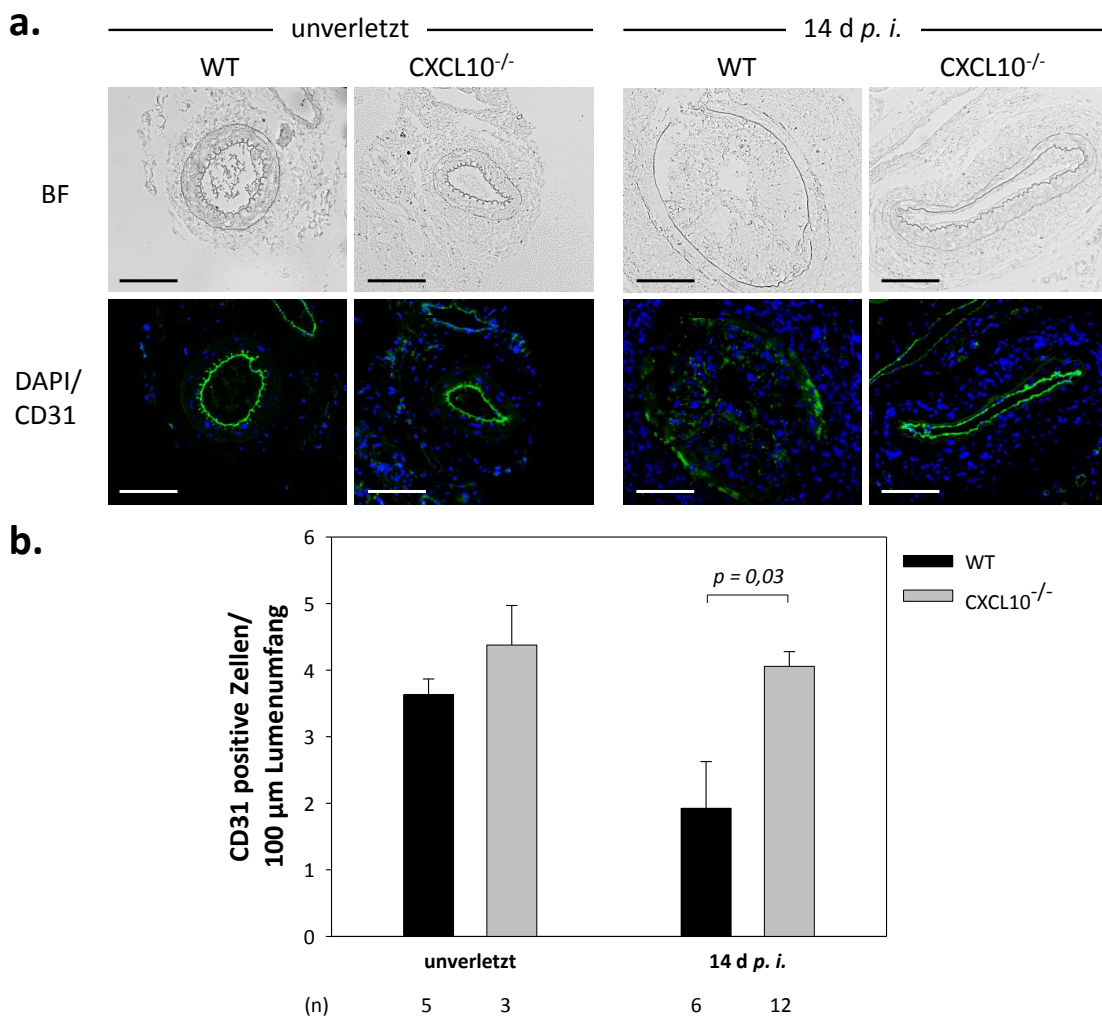


Abbildung 4.12: Einfluss der CXCL10 Defizienz auf die Reendothelialisierung der verletzten Gefäßwand **a.** Repräsentative Bilder der CD31 Färbung (grün) auf Paraffinschnitten der *A. femoralis* von CXCL10^{-/-} und C57BL/6 WT Mäusen unverletzt und 14 Tage *p. i.*; Dapi-Färbung der Zellkerne (blau); **b.** Zur Auswertung wurden alle CD31 positiven Zellen im Lumen gezählt und auf 100 μm Lumenumfang \pm S.E.M. des jeweiligen Schnittes bezogen; pro Gefäß wurden je 3 Schnitte aus 3 Ebenen gefärbt, ausgezählt und gemittelt; Maßstabalken $\hat{=}$ 100 μm ; die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test; $p \geq 0,05$ nicht signifikant; # $p \leq 0,15$ nicht signifikant, aber Trend erkennbar; $p \leq 0,05$ signifikant; $p \leq 0,01$ stark signifikant.

100 μm Lumenumfang gezählt, was einer Reendothelialisierung von 53 % entspricht. Die Gefäße der CXCL10^{-/-} Mäuse waren mit $4,06 \pm 0,22$ CD31 positiven Zellen/100 μm Lumenumfang im Vergleich zu den unverletzten Kontrollen bereits zu 92 % reendothelialisiert. Das entspricht einer 1,75-fach besseren Reendothelialisierung gegenüber den verletzten C57BL/6 WT Kontrollen.

4.3 Konditionelle CXCR3 Inaktivierung in Mäusen

Eine konditionelle Inaktivierung eines Genabschnittes kann mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinationssystems erreicht werden. Die Cre-Rekombinase deletiert den zwischen zwei in gleicher Richtung orientierten loxP-Sequenzen liegenden DNA -Abschnitt. Durch die kontrollierte Expression der Cre-Rekombinase in der Maus mit gewebespezifischen bzw. induzierbaren Promotoren, können sowohl der Ort als auch der Zeitpunkt der Deletion festgelegt werden.

Eine Übersicht der Klonierungs- und *Targeting*-Strategie ist in Abbildung 4.13 dargestellt.

4.3.1 Konstruktion des konditionellen Targeting-Vektors

Um eine CXCR3 Inaktivierung in einzelnen Zelltypen zu erreichen, sollte ein möglichst großer Genabschnitt deletiert werden. Das Exon 2, welches mit Ausnahme der ersten 4 Aminosäuren, den größten Teil des CXCR3 codiert, wurde von zwei in gleicher Richtung orientierten loxP-Sequenzen flankiert (gefloxt), sodass es später konditionell durch die Cre-Rekombinase entfernt werden kann. Die zum Mausgenom homologen 5'- und 3'-Rekombinationsarme erstrecken sich über die Bereiche stromaufwärts (5'-wärts) bzw. stromabwärts (3'-wärts) des Exons 2. Ein 1,5kb-*NotI/BamHI*-Fragment diente als 5'-Rekombinationsarm und wurde vor die Selektionskassette in den Vektor eingefügt. Der Exon-Rekombinationsarm, ein 2,5kb-*ClaI/SalI*-Fragment, das sich über den zu deletierenden Bereich des Exons 2 erstreckt, wurde am 3'-Ende mit einer loxP Sequenz versehen und stromabwärts der Selektionskassette in den Vektor ligiert. Schließlich wurde der 3'-Rekombinationsarm, ein 3kb-*XhoI/KpnI*-Fragment, stromabwärts des Exon-Rekombinationsarms in den Vektor eingefügt. Eine ausführliche Beschreibung der Klonierung des *Targeting*-Vektors befindet sich in Kapitel 3.1.13.

4.3.2 Funktionsüberprüfung der loxP Sequenzen in vitro

Um auszuschließen, dass die loxP-Sequenzen im *Targeting*-Vektor trotz Sequenzanalyse fehlerhaft sind, wurde die korrekte Funktion der Cre-vermittelten Rekombination *in vitro* getestet. Der *Targeting*-Vektor wurde in *E. coli* EL350 transformiert, in denen die Expression der Cre-Rekombinase durch L-Arabinose induziert werden kann. Die anschließende Präparation und Restriktionsanalyse der Plasmide gibt Aufschluss darüber, ob Rekombinationsereignisse stattgefunden haben. Da die Cre-vermittelte Rekombination eine Gleichgewichtsreaktion ist, sollten sich bei korrekter Funktion der loxP-Elemente stets alle möglichen Rekombinationsereignisse in einem bestimmten Verhältnis zeigen. Bei mehreren Möglichkeiten tritt das Rekombinationsereignis mit dem größten zu deletierenden Bereich am häufigsten auf. Die Plasmide der zunächst entstandenen Mischklone wurden zur Vereinzelung in *E. coli* XL1-Blue retransformiert und präpariert. Die Restriktionsanalyse erfolgte mit *NotI* und *KpnI*, den beiden äußersten Restriktionsschnittstellen der Rekombinationskassette, und lieferte alle 3 möglichen Rekombinationsereignisse (Abb. 4.14).

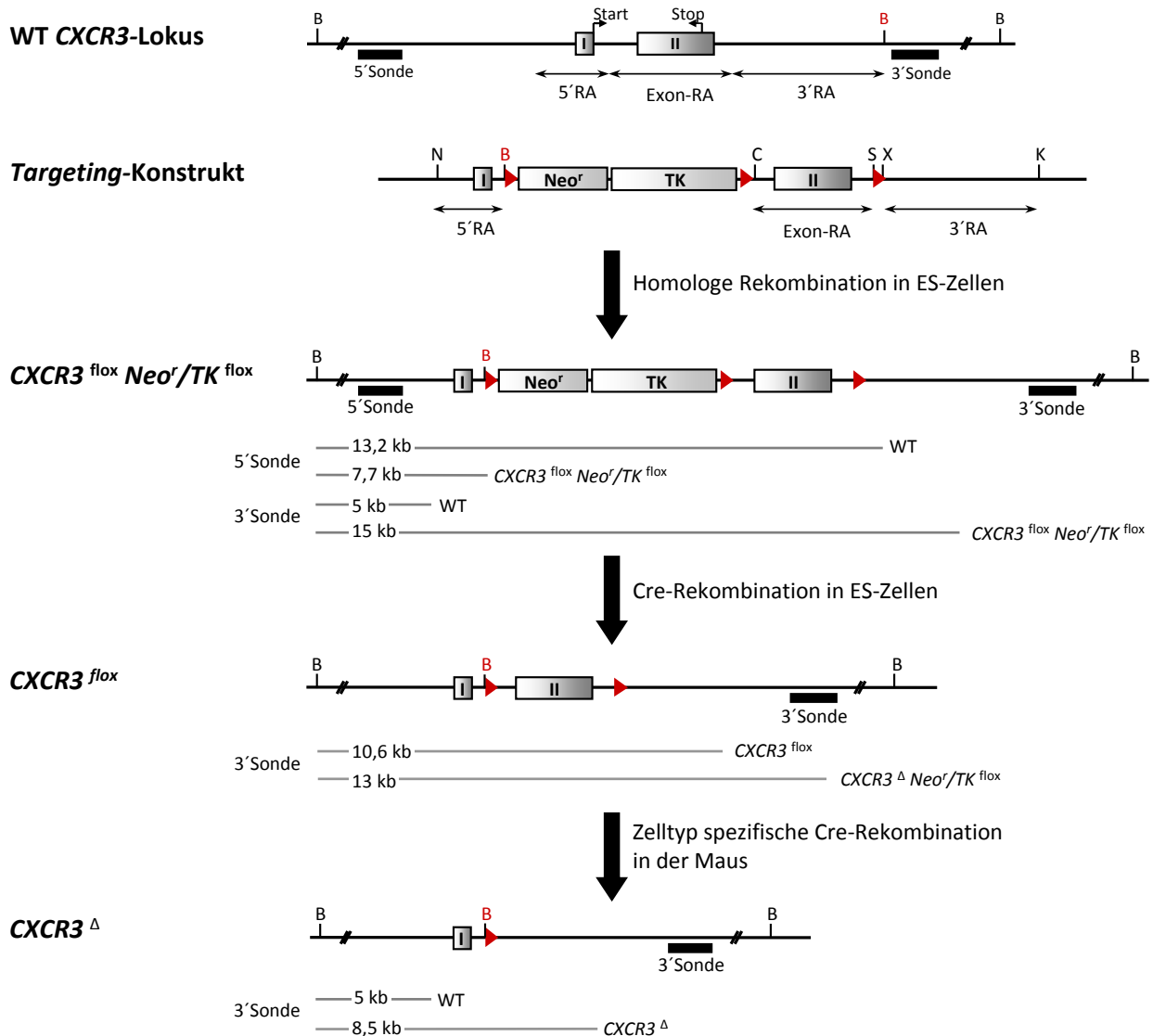


Abbildung 4.13: Strategie zur konditionellen *CXCR3* Deletion. Schematische Darstellung der Struktur des WT *CXCR3*-Lokus, des *Targeting*-Konstrukts und des mutierten *CXCR3*-Allels. Nach homologer Rekombination in ES-Zellen ist das Exon 2 von 2 loxP-Sequenzen (roter Pfeil) flankiert, zwischen Exon 1 und 2 befindet sich eine ebenfalls gefloxtete *Neo*^r-TK-Selektionskassette. Durch transiente Expression der Cre-Rekombinase wird die Selektionskassette deletiert. Verpaarung mit Cre-transgenen Mäusen führt schließlich zur Deletion des gefloxteten Genabschnitts. Die nach Restriktion mit *Bam*HI erwarteten Fragmente sind dargestellt. Exons sind durch Boxen, Introns durch schwarze Linien angegeben. Die durch den *Targeting*-Vektor eingeführte bzw. entfernte *Bam*HI-Schnittstelle ist rot markiert. I, Exon I; II, Exon II; RA, Rekombinationsarm; *Neo*^r, Neomycinresistenzgen; TK, Thymidinkinasegen; B, *Bam*HI; C, *Cla*I; K, *Kpn*I; N, *Not*I; X, *Xho*I.

4.3.3 Homologe Rekombination (Primäres Targeting)

Der *Targeting*-Vektor wurde mit *Not*I linearisiert und in ES-Zellen elektroporiert. In 5 *Targeting*-Runden wurden 5000 Neomycin-resistente Klone gepickt von denen 6 in der Southern-Blot-Analyse mit der 5'-Sonde als positiv identifiziert werden konnten (Abb. 4.15). Positive Klone wurden aufge-

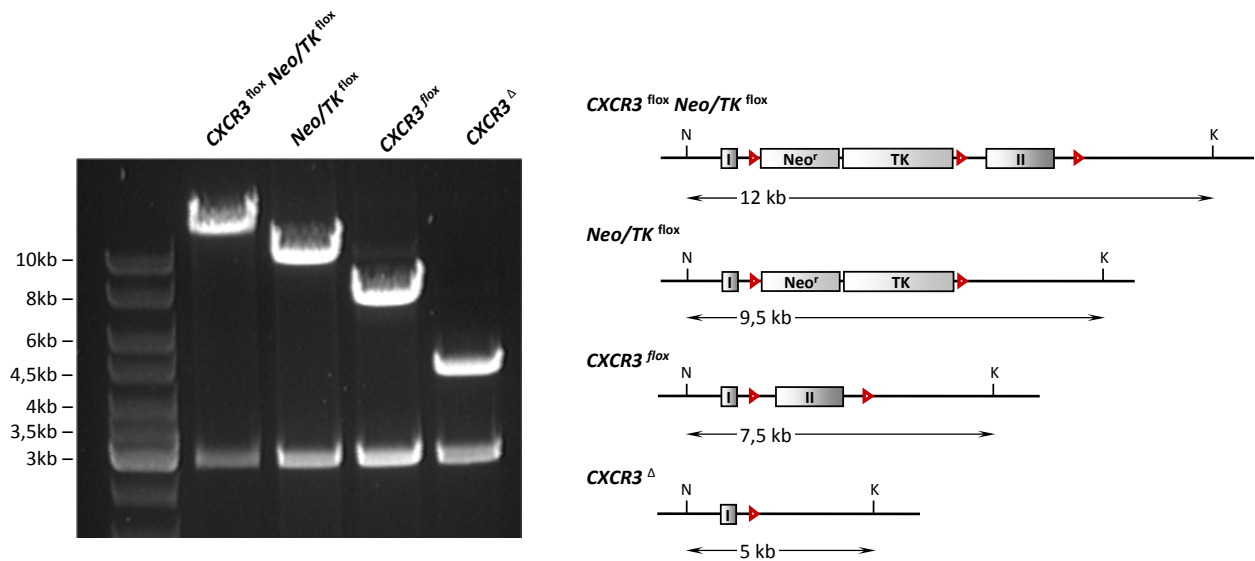


Abbildung 4.14: In vitro Cre-Rekombination des Targeting-Vektors. Der Targeting-Vektor wurde in *E. coli* EL350 transformiert. Die Expression der Cre-Rekombinase wurde durch 0,1 % L-Arabinose induziert. Restriktionsanalyse mit *NotI* und *KpnI* zeigten alle 3 möglichen Rekombinationsereignisse; loxP-Sequenzen sind als rote Pfeile angegeben; I, Exon I; II, Exon II; Neo^r, Neomycinresistenzgen; TK, Thymidinkinasegen; K, *KpnI*; N, *NotI*.

taut, expandiert und einer weiteren Southern-Blot-Analyse unterzogen. Damit sollte sichergestellt werden, dass die Targeting-Kassette korrekt ins ES-Zellgenom inseriert wurde. Nicht alle Klone waren jedoch nach dem Einfrier- und Auftauprozess vital. Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen der Zellzahl vor dem Einfrieren und der Vitalität der Klone nach dem Auftauen beobachtet werden, sodass Klone, die mit einer höheren Zelldichte eingefroren wurden, sich nach dem Auftauen schneller erholten. Klone mit geringer Zelldichte, konnten sich nach dem Auftauen weniger schnell erholen und wurden z. T. nekrotisch. Die Klone 1_10D, 1_10E und 2_4E aus den ersten beiden Targeting-Runden wurden im Southern-Blot mit der 3'-Sonde untersucht. Erstaunlicherweise konnte nicht wie erwartet ein 15kb-Fragment detektiert werden, sondern wie im CXCR3 WT Locus ein 5kb-Fragment (Abb. 4.15). Dass es sich um die korrekten aufgetauten Klone handelt, wurde zuvor durch erneute Southern-Blot-Analyse mit der 5'-Sonde abgesichert (Daten nicht gezeigt).

Da die kritische *Bam*HI-Schnittstelle, die bei der Konstruktion des Targeting-Vektors durch eine *Kpn*I-Schnittstelle ersetzt wurde, den äußersten Punkt des 3'-Rekombinationsarms ausmacht, ist nicht auszuschließen, dass die *Kpn*I-Schnittstelle bei der homologen Rekombination nicht inseriert wurde, sodass die ursprüngliche *Bam*HI-Schnittstelle erhalten blieb. Zur Untersuchung bis zu welcher Stelle genau die Rekombinationskassette ins ES-Zellgenom integriert worden ist, wurde eine Sequenzanalyse durchgeführt. Da *CXCR3* auf dem X-Chromosom lokalisiert ist und männliche ES-Zellen für das Targeting verwendet wurden, sind positive Klone für das Transgen hemizygot. Dadurch war es möglich einzelne Abschnitte des transgenen Allels zu amplifizieren und zu sequenzieren. Untersucht wurden die Bereiche der loxP-Sequenzen, sowie das Ende des 3'-Rekombinationsarms (Abb. 4.16 a.) Die Tatsache, dass die Fragmente 1 und 2 in der PCR amplifiziert werden konn-

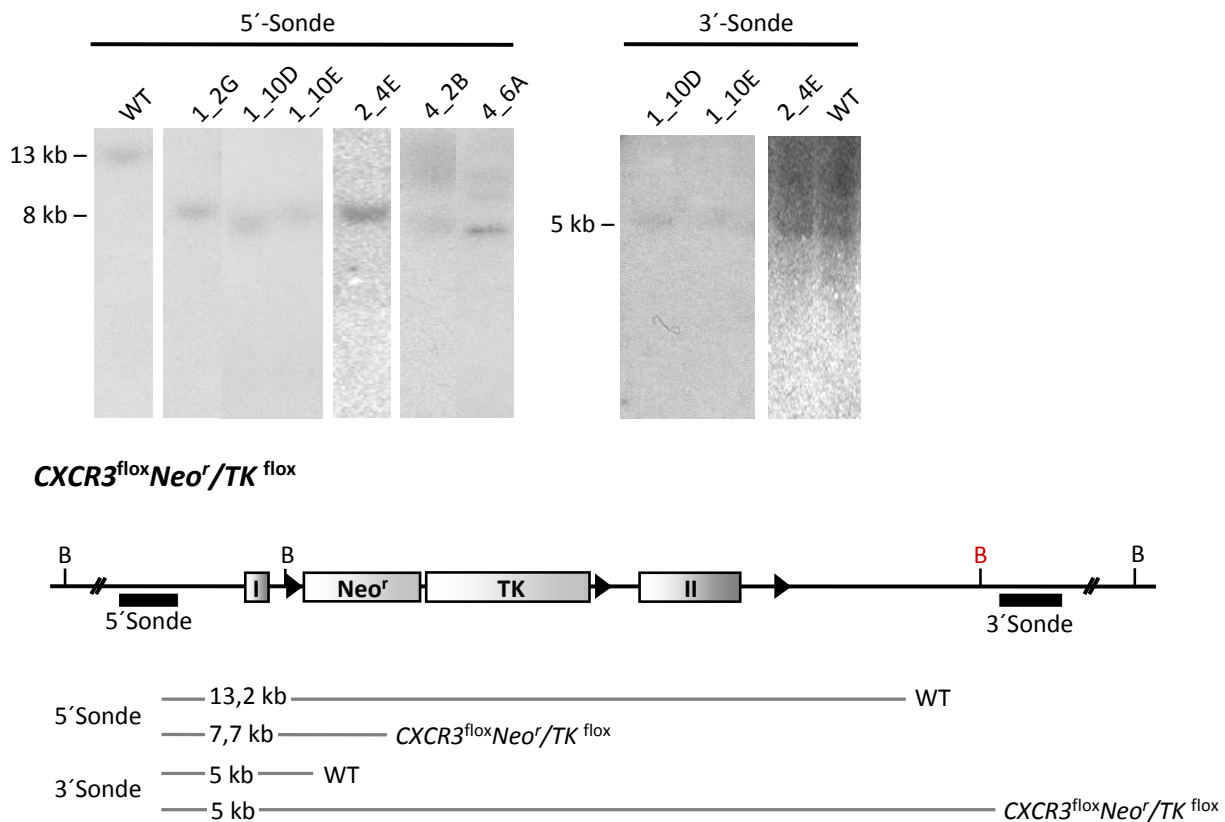


Abbildung 4.15: Southern-Blot-Analyse homolog rekombinierter ES-Zellklone. *Bam*HI geschnittene gDNA wurde hybridisiert mit der 5'-Sonde (Wildtypbande, 13,2 kb; *CXCR3*^{fllox}*Neo*^r/*TK*^{fllox}, 7,7 kb) und der 3'-Sonde (Wildtypbande, 5 kb; *CXCR3*^{fllox}*Neo*^r/*TK*^{fllox}, 15 kb); Im primären *Targeting* mit der 5'-Sonde identifizierte Klone zeigen in der Southern-Blot-Analyse mit der 3'-Sonde die Wildtyp-Bande (5 kb); die kritische *Bam*HI-Schnittstelle ist rot markiert; I, Exon I; II, Exon II; Neo^r, Neomycinresistenzgen; TK, Thymidinkinasegen; WT, Wildtyp; B, *Bam*HI.

ten, verweist auf das Vorhandensein der Selektionskassette. Der Restriktionsverdau des Fragments 3 mit *Bam*HI bestätigt neben der Southern-Blot-Analyse die intakte *Bam*HI-Schnittstelle hinter dem Rekombinationsbereich. Die Sequenzanalyse der PCR-Fragmente zeigte völlige Übereinstimmung mit der erwarteten Sequenz bis zur zweiten loxP-Sequenz, jedoch kein drittes loxP-Element hinter dem Exon-Rekombinationsarm (Abb. 4.16 b, c). Die Untersuchung der Klone 1_10E, 2_4E führten zum selben Ergebnis. In den *Targeting*-Runden 3 bis 5 wurden die Klone nur noch durch Southern-Blot-Analyse mit der 5'-Sonde und durch anschließende Sequenzanalyse verifiziert.

Weiterhin wurde auch der Klon 4_6A, der während des Einfrier- und Auftauprozesses starb, analysiert, da gDNA dieses Klons noch immer zur Verfügung stand. In diesem Klon wurde der Sequenzbereich korrekt über alle drei loxP-Elemente ins Genom inseriert (nicht gezeigt).

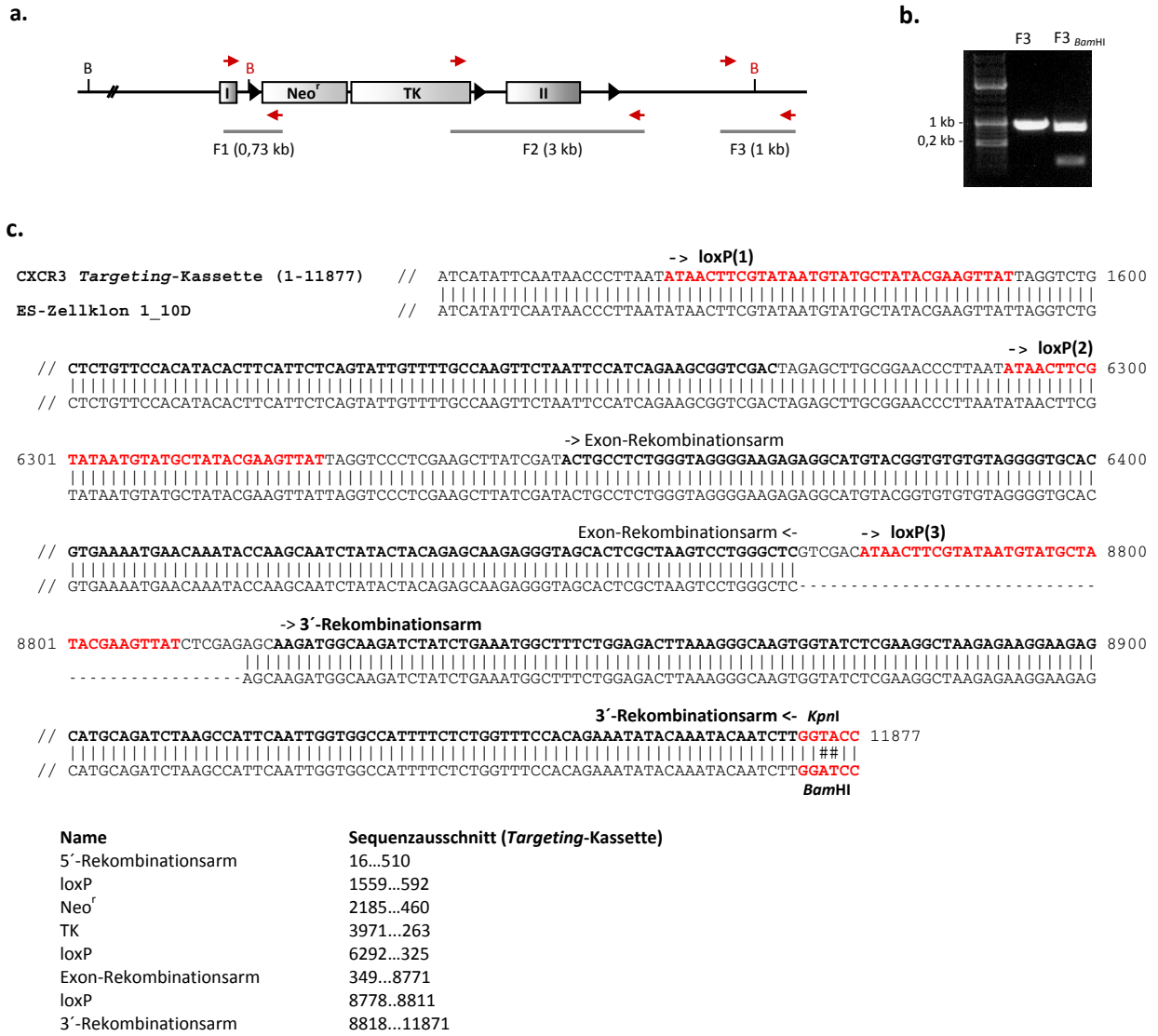


Abbildung 4.16: Sequenzanalyse der ES-Zellklone am Beispiel des Klons 1_10D. **a.** PCR-Strategie zur Amplifikation wichtiger Bereiche des rekombinanten CXCR3-Allels; **b.** Restriktionsverdau des PCR-Fragments 3 mit *Bam*HI zeigt die intakte Schnittstelle; **c.** Sequenzanalyse der PCR-Fragmente; loxP(1) und loxP(2) wurden korrekt inseriert, loxP(3) fehlt, die *Bam*HI-Schnittstelle stromabwärts des *CXCR3* ist intakt; I, Exon I; II, Exon II; Neo^r, Neomycinresistenzgen; TK, Thymidinkinasegen; B, *Bam*HI.

4.4 Untersuchung von CXCR3-Rezeptor-Interaktionen

Von den meisten Chemokinrezeptoren ist bekannt, dass diese homo- und heterodimerisieren bzw. Oligomere mit sich selbst und anderen GPCR bilden. Der CXCR3 gehört bisher zu denjenigen GPCR, deren Protein-Protein-Interaktionen weniger gut untersucht sind. Eines der Ziele dieser Arbeit war es daher, die Protein-Protein-Interaktionen der beiden Splicevarianten des CXCR3 zu untersuchen. Die Variante CXCR3B unterscheidet sich von der ursprünglichen Variante CXCR3A durch 52 zusätzliche AS am N-Terminus. Es wurden potentielle Interaktionspartner aus den Klassen der Chemokinrezeptoren und Opioidrezeptoren ausgesucht und die Homo- und Heterodimerisierung des CXCR3 mittels Co-IP und FRET untersucht.

4.4.1 Konstruktion der Expressionsplasmide

Die Funktionalität verschiedener getesteter CXCR3 Antikörper zeigte sich bisher nicht zufriedenstellend. So gab es große Schwankungen die Affinität und Spezifität betreffend, sowohl von Antikörpern verschiedener Firmen, als auch von unterschiedlichen Lotnummern ein und derselben Firma. Daher sollte ausschließlich mit Fluoreszenzprotein-gekoppeltem bzw. Flag-gekoppeltem GPCR gearbeitet werden. Die Konstruktion der Expressionsplasmide erfolgte durch Amplifikation der entsprechenden Rezeptor cDNA, bei der mit Hilfe der verwendeten Primern geeignete Restriktionsschnittstellen eingeführt wurden, die den offenen Leserahmen (ORF) flankieren. Es wurde darauf geachtet möglichst die Schnittstelle zu verwenden, die der Sequenz des Fluoreszenzproteins im Expressionsvektor am nächsten ist, sodass Rezeptor und Fluoreszenzprotein durch einen möglichst kleinen Linker verbunden sind. Es wurden Expressionsvektoren der Serie pEXFP-N1 verwendet, sodass das jeweilige Fluoreszenzprotein C-terminal an den gewünschten Rezeptor angefügt wurde (Abb. 4.17). Neben CXCR3A, CXCR3B und Rezeptoren, die als potentielle Interaktionspartner ausgesucht wurden, wurde als Positivkontrolle der CXCR4 (CXCR4) kloniert, dessen Eigenschaft Homodimere zu bilden mehrfach belegt wurde [Vila-Coro *et al.*, 1999; Levoye *et al.*, 2009]. Als Negativkontrolle wurde der *Corticotropin-Releasing Factor*-Rezeptor Typ 2a (CRF2aR) kloniert, dessen Eigenschaft keine Homodimere zu bilden kürzlich gezeigt wurde [Teichmann *et al.*, 2012]. Zur Markierung von CXCR3A und CXCR3B mit Flag wurde aus den Vektoren CXCR3-A/B-pECFP-N1 die Sequenz des Fluoreszenzproteins über *Bam*HI/*Not*I herausgeschnitten und durch 3 hintereinander liegende Flag-Sequenzen ersetzt. Für die Flag-Koppelung von CRF2aR und CXCR4 wurde aus den Vektoren CRF2aR-pECFP-N1 und CXCR4-pECFP-N1 die CFP-Sequenz über *Age*I/*Not*I entfernt und ebenfalls mit 3 Flag-Sequenzen ersetzt.

4.4.2 Expression der rekombinanten Rezeptoren

Die Expression transient transfizierter HEK293T-Zellen wurde zunächst im Western-Blot untersucht. Generell gilt für die Western-Blot-Analyse von Chemokinrezeptoren diese nicht im Probenpuffer aufzukochen, sondern mild zu reduzieren [Ehlert *et al.*, 2004]. Dazu wurden Lysate von

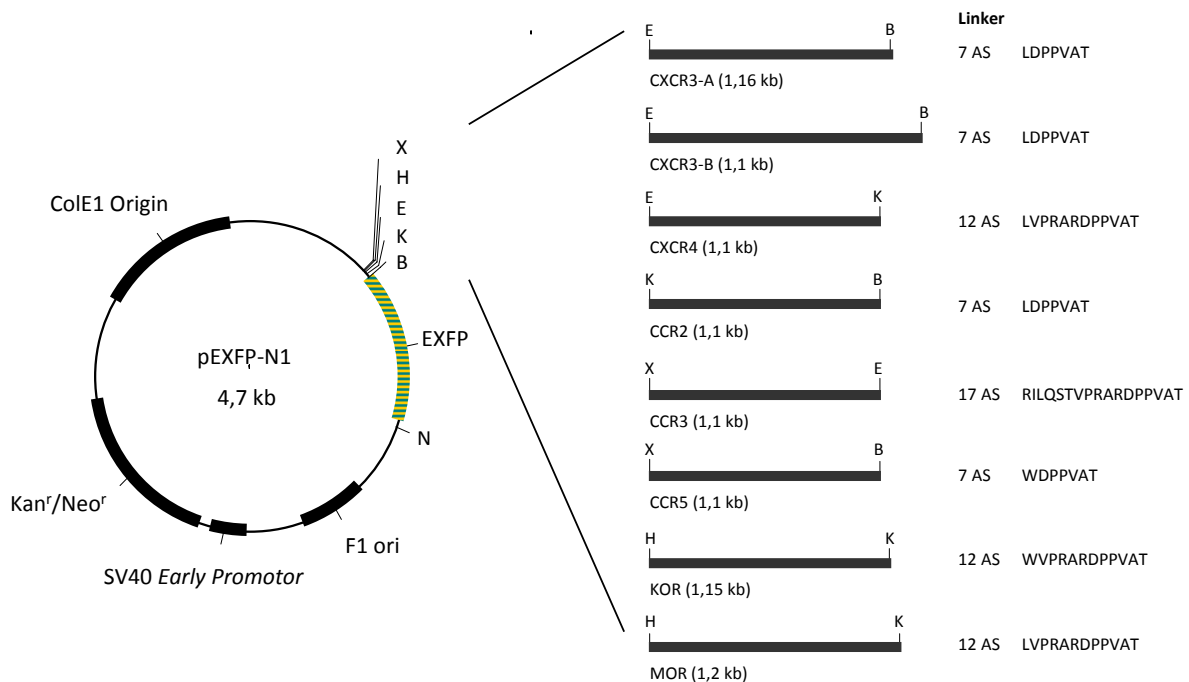


Abbildung 4.17: Schematische Darstellung der Klonierung von Expressionsvektoren. AS, Aminosäuren; EXFP, verschiedene Fluoreszenzproteine; B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; N, *Not*I; X, *Xho*I.

CXCR3A-GFP und CXCR3B-GFP transfizierten HEK293T-Zellen unter verschiedenen Bedingungen in Laemmli-Probenpuffer reduziert. Als Kontrollen wurden Lysate nicht-transfizierter und mit pEGFP-N1 transfizierten Zellen mitgeführt (Abb. 4.18 a). Wurden die Zellen 10 min gekocht, so konnte allein in den Lysaten der GFP-Kontrolle eine GFP 27 kDa-Bande detektiert werden. Wurden die Proben 1 Stunde mild bei 37 °C oder RT reduziert, so wurden auch CXCR3A-GFP und CXCR3B-GFP detektiert. Grundsätzlich wurde mit sinkender Inkubationstemperatur, die Bande des reinen GFPs schwächer und die Banden des GFP-gekoppelten CXCR3A und CXCR3B stärker. Die detektierten Banden der GFP-gekoppelten Rezeptoren waren etwas kleiner als die errechneten Bandengrößen. Da reines GFP 27 kDa, CXCR3A 41 kDa und CXCR3B 46 kDa groß ist, müssten CXCR3A-GFP folglich 68 kDa und CXCR3B-GFP 73 kDa groß sein. So wurde für den CXCR3A-GFP aber eine prominente scharfe Bande bei 52 kDa detektiert, die wahrscheinlich dem nicht glykosylierten Rezeptor entspricht. Die breite unscharfe Bande im Bereich von 65 bis 120 kDa entspräche demnach dem komplex glykosylierten Rezeptorprotein. Es erschien außerdem für CXCR3A generell eine unbekannte ca. 37 kDa große Bande. Für den CXCR3B-GFP wurde ebenfalls eine scharfe Bande bei ca. 70 kDa detektiert, die vermutlich den nicht glykosylierten Rezeptor entspricht. Die zweite scharfe Bande um etwa 80 kDa, von der aus ein Schmier bis etwa 130 kDa ausgeht, müsste dem komplex glykosylierten Rezeptor entsprechen.

Auch die Expression von Flag-gekoppeltem CXCR3-A und -B wurde im Western-Blot überprüft (Abb. 4.18 b). Als Kontrolle wurde G3BP1-2xFlag mitgeführt. Es hat sich als wichtig erwiesen, dass

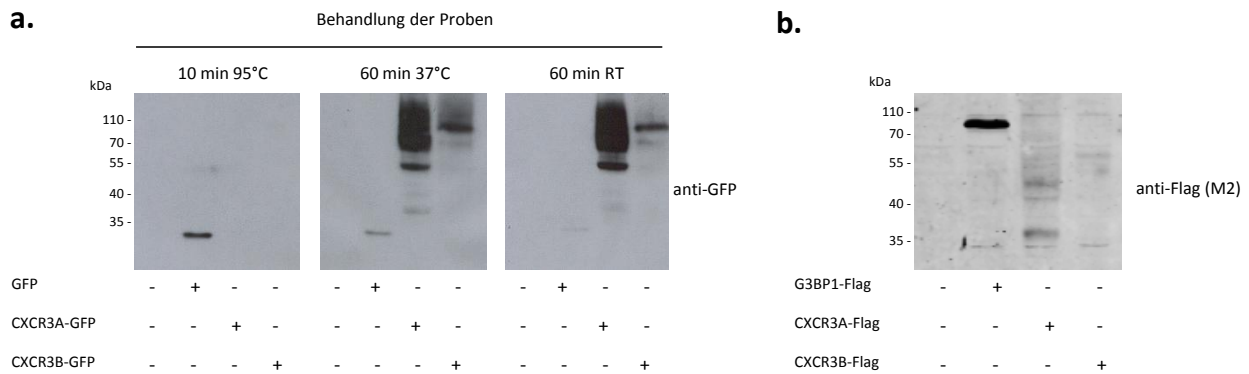


Abbildung 4.18: Western-Blot-Analyse des GFP- und Flag-gekoppelten CXCR3A und CXCR3B.
a. Proteinlysate untransfizierter und transient mit GFP, CXCR3A-GFP oder CXCR3B-GFP transfizierter HEK293T-Zellen wurden unter verschiedenen Bedingungen in Laemmli-Probenpuffer reduziert und das GFP im Western-Blot detektiert; **b.** Western-Blot von Proteinlysaten untransfizierter und transient mit G3BP1-Flag, CXCR3A-Flag bzw. CXCR3B-Flag transfizierter HEK293T-Zellen.

mindestens zwei Flag-Sequenzen hintereinander liegen müssen um von dem verwendeten antiFlag M2 Antikörper detektiert werden zu können. So konnten ursprünglich als Kontrollvektoren geplante Konstrukte mit nur einer Flag-Sequenz nicht im Western-Blot detektiert werden (nicht gezeigt). Die detektierten Banden entsprechen in etwa den für die unglykosylierten Flag-gekoppelten Rezeptoren errechneten Molekulargewichten von 43 kDa für CXCR3A-Flag bzw. 48 kDa für CXCR3B-Flag. Die darüberliegenden diffusen Banden entsprechen wahrscheinlich den komplex glykosylierten Rezeptoren. Für den Kontrollrezeptor G3BP1-2xFlag ergab sich eine etwa 70 kDa große Bande, die größer ist als der errechnete Wert von 55 kDa.

Weiterhin wurde die Expression der Fluoreszenzprotein-gekoppelten GPCR mikroskopisch untersucht. Die Stärke der Expression variierte zwischen den einzelnen Rezeptoren. Am schwächsten wurde der CXCR3B und der CCR3 exprimiert (nicht gezeigt). Generell konnte neben der Expression der Rezeptoren in der Plasmamembran eine Akkumulation der GPCR in einem inneren Zellkompartiment beobachtet werden. Dieser Effekt schien umso ausgeprägter, je stärkerer die Expression insgesamt war. Zur Darstellung des ER im Mikroskop wurde in den HEK293T-Zellen CFP exprimiert, das am C-Terminus ein ER-spezifisches Signalpeptid und am N-Terminus die KDEL-Sequenz besitzt, die verhindert, dass das CFP aus dem ER heraus transportiert wird. So wurden HEK293T-Zellen mit gleichen Mengen dieses ER-Markers und CXCR3A-YFP, CXCR3B-YFP, CXCR4-YFP oder CRF2aR-YFP co-transfiziert und mikroskopisch untersucht (Abb. 4.19). Auf die Verwendung von Trypanblau als Plasmamembran-Marker wurde zur besseren Übersicht verzichtet. CXCR3A-YFP wurde sowohl an der Zelloberfläche als auch innerhalb der Zelle lokalisiert. CXCR3B-YFP fand sich fast ausschließlich innerhalb der Zelle. Die Überlagerung mit den Aufnahmen des ER-Markers (CFP) deutet auf die Akkumulation der von CXCR3A-YFP und CXCR3B-YFP im ER hin. In beiden Fällen wurde die Expression außerdem in kleineren vesikulären Strukturen beobachtet. CXCR4-YFP wurde hauptsächlich in der Plasmamembran detektiert und nur wenig im ER. CRF2aR-YFP wurde ebenfalls an der Zelloberfläche sowie im ER beobachtet.

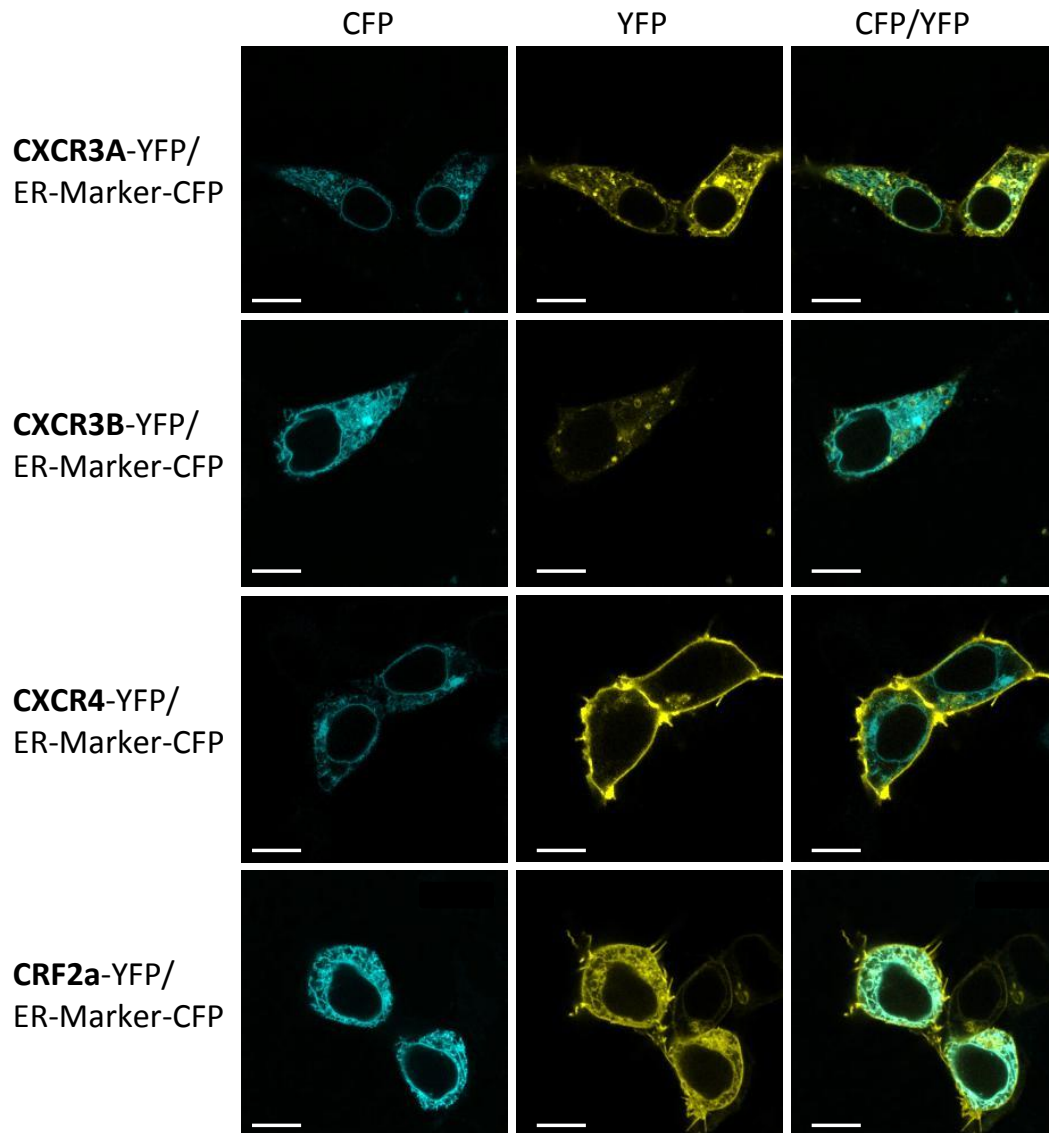


Abbildung 4.19: Transiente Co-Expression von CXCR3A-YFP, CXCR3B-YFP, CXCR4-YFP oder CRF2aR-YFP mit CFP-ER (ER-Marker) in HEK293T-Zellen HEK293T-Zellen wurden mit gleichen Mengen Plasmid-DNA transfiziert und nach 24h unter dem Mikroskop untersucht.

4.4.3 Untersuchung von Rezeptor-Dimeren mittels CoIP

Potentielle Homodimerbildung der CXCR3 Varianten A und B sollten durch CoIP untersucht werden. Dazu wurde in HEK293T-Zellen ein Flag-markierter Rezeptor und ein potentieller CFP- oder YFP-markierter Interaktionspartner exprimiert. Nach Immunpräzipitation von Flag folgte die Analyse der Zellysate und Immunpräzipitate im Western-Blot.

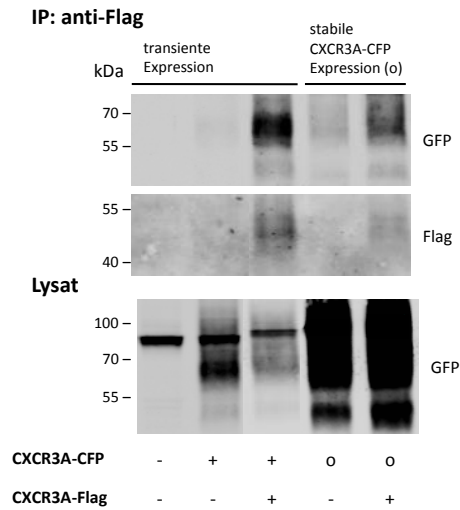
Homodimerisierung von CXCR3A und CXCR3B In HEK293T-Zellen, die stabil CXCR3A-CFP exprimieren, wurde zusätzlich transient CXCR3A-Flag exprimiert. Nach Präzipitation von CXCR3A-Flag mittels Anti-Flag-Antikörper aus dem Lysat folgte die Analyse des Lysates und des Präzipitates mit Anti-Flag-Antikörper und Anti-GFP-Antikörper im Immunblot. Die Detektion von GFP im Ausgangslysat dient als Kontrolle dafür, dass der potentielle CFP-gekoppelte Interaktionspartner tatsächlich in den Zellen exprimiert wurde und gibt außerdem Aufschluss über dessen Expressionsstärke in Zellen. Die Analyse von Flag im Präzipitat diente als Kontrolle dafür, dass die Präzipitation des Flag-gekoppelten Rezeptors aus dem Lysat auch tatsächlich funktioniert hat. Der eigentliche Nachweis einer Interaktion erfolgte durch die Detektion des CFP-gekoppelten Rezeptors im Präzipitat. Parallel dazu wurde der Versuch auch mit HEK293T-Zellen durchgeführt, in denen beide Interaktionspartner transient exprimiert wurden. In beiden Versuchen wurde im Präzipitat jeweils eine 68 kDa große Bande detektiert, die der errechneten Größe von CXCR3A-CFP entspricht. Die Analyse von Flag im Präzipitat zeigt eine etwa 50 kDa große Bande. Das Molekulargewicht von CXCR3A-Flag beträgt 43 kDa (Abb. 4.20 a). Als Kontrollen wurden Präzipitate untransfizierter Zellen sowie nur CXCR3A-CFP exprimierender Zellen mitgeführt. In allen Kontrollen wurde keine Interaktion gefunden. Weiterhin wurde mit dem verwendeten anti-GFP Antikörper in allen Proben einschließlich der untransfizierter Zellen eine ca. 85 kDa große Bande detektiert.

Weitere potentielle Dimere wurden ausschließlich durch transiente Co-Expression untersucht. Zur Untersuchung möglicher CXCR3B Homodimere wurden CXCR3B-CFP und CXCR3B-Flag in HEK293T-Zellen co-exprimiert. Nach Immunpräzipitation von Flag und Analyse im Western-Blot konnte ein deutliches Bandenmuster für CXCR3B-CFP mit Banden um 65 kDa, 73 kDa und 98 kDa detektiert werden, das auf eine Interaktion der beiden Rezeptoren hinweist (Abb. 4.20 b). Die errechnete Größe des nicht posttranslational modifizierten CXCR3B-CFP beträgt 73 kDa. Keine Banden wurden hingegen in den Proben der untransfizierten und nur mit CXCR3B-CFP transfizierten Zellen detektiert. Für CXCR3B-Flag wurden zwei Banden um 55 kDa detektiert. Die errechnete Größe von CXCR3B-Flag beträgt 48 kDa. Als zusätzliche Kontrolle wurden Lysate von Zellen, die nur einen der beiden Interaktionspartner exprimieren, vereint und Immunpräzipitation und -blot wie zuvor beschrieben durchgeführt (Abb. 4.20 c). Damit sollte ausgeschlossen werden, dass es sich um unspezifische Interaktion handelt, die im Lysat stattgefunden haben. Die Präzipitation der Lysate-Mix-Proben zeigte keinerlei Interaktion. Die mitgeführten Positivkontrollen co-transfizierter Zellen hingegen zeigten eine Interaktion.

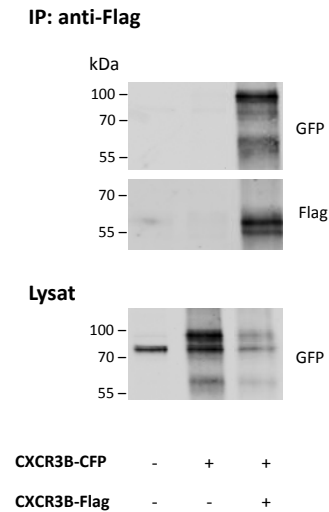
Zusammenfassend konnten bei Überexpression in HEK293T-Zellen sowohl CXCR3A als auch

CXCR3B Homodimere nachgewiesen werden.

a. CXCR3A Homodimer



b. CXCR3B Homodimer



c. Kontrolle CXCR3A und CXCR3B Homodimere

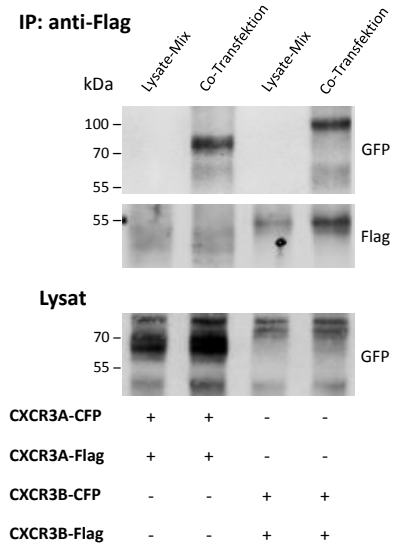


Abbildung 4.20: Co-Immunpräzipitation von CXCR3A-CFP und CXCR3B-CFP mit CXCR3A-Flag bzw. CXCR3B-Flag. Nach Immunpräzipitation von Flag aus Lysaten stabiler und transient transfizierter HEK293T-Zellen erfolgte die Analyse im Immunblot; **a.** HEK293T-Zellen bzw. stabil CXCR3A-CFP exprimierende HEK293T-Zellen transient mit CXCR3A-Flag und CXCR3A-CFP co-transfiziert bzw. nur mit CXCR3A-Flag transfiziert; **b.** transient mit CXCR3B-Flag und CXCR3B-CFP co-transfizierte HEK293T-Zellen; **c.** CoIP aus Lysaten transient co-transfizierter HEK293T-Zellen und aus Lysate-Mix von einzeln transfizierten Zellen zur Kontrolle; $n \geq 3$.

Heterodimerisierung von CXCR3A und CXCR3B Zur Untersuchung ob CXCR3A und CXCR3B auch miteinander heterodimerisieren wurden HEK293T-Zellen mit CXCR3A-Flag und CXCR3B-CFP transient co-transfiziert. Es folgte wie oben beschrieben die Präzipitation von CXCR3A-Flag aus den Lysaten. Die Analyse im Western-Blot zeigt eine deutliche CXCR3B-CFP Bande (Abb. 4.21 a). In den mitgeführten Kontrollen untransfizierter und nur mit CXCR3B-CFP transfizierter HEK293T-Zellen wurden keine Banden detektiert. Als weitere Kontrolle wurden Lysate von Zellen, die entweder CXCR3B-CFP oder CXCR3A-Flag exprimieren, vereint und eine CoIP durchgeführt. Die Western-Blot-Analyse zeigte keine unspezifischen Interaktionen der beiden Rezeptoren im Lysat. Die mitgeführten Positivkontrollen co-transfizierter Zellen hingegen zeigen die Interaktion. Die Untersuchung des CXCR3A/CXCR3B-Heterodimers wurde zusätzlich mit dem Rezeptorpaar CXCR3A-CFP und CXCR3B-Flag durchgeführt und lieferte dasselbe Ergebnis (nicht gezeigt).

Heterodimerisierung von CXCR3A und CXCR3B mit anderen GPCR Weiterhin wurde die Interaktion der CXCR3 Varianten A und B mit anderen Chemokinrezeptoren untersucht. Dazu wurde in HEK293T-Zellen entweder CXCR3A-Flag oder CXCR3B-Flag mit den jeweils YFP-gekoppelten

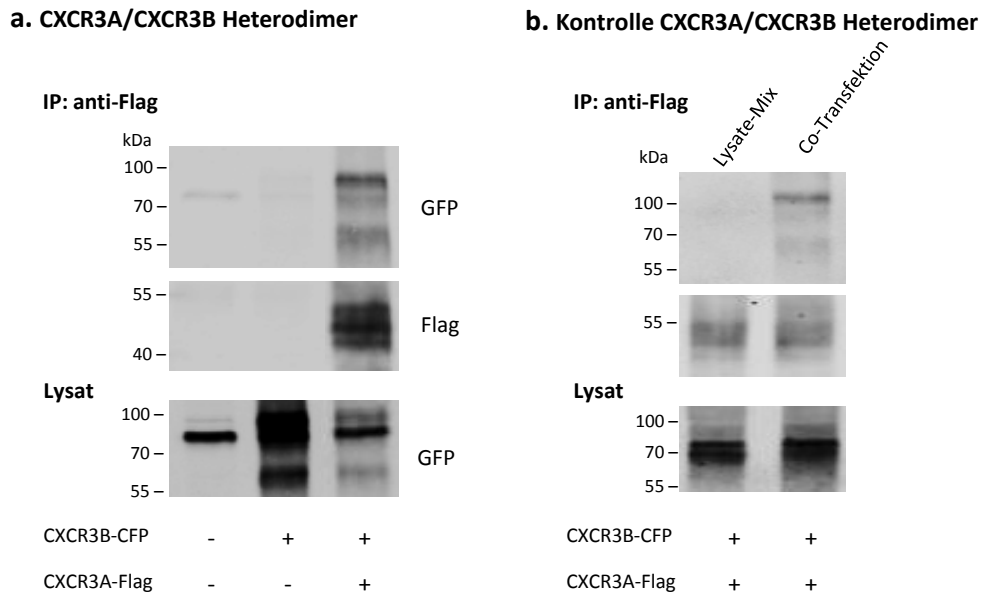


Abbildung 4.21: Co-Immunpräzipitation von CXCR3A-CFP und CXCR3B-CFP mit CXCR3A-Flag bzw. CXCR3B-Flag. Nach Immunpräzipitation von Flag aus Lysaten transient transfizierter HEK293T-Zellen erfolgte die Analyse im Immunblot; **a.** transient mit CXCR3A-Flag und CXCR3B-CFP co-transfizierte HEK293T-Zellen; **b.** CoIP aus Lysaten transient co-transfizierter HEK293T-Zellen und aus Lysate-Mix von einzeln transfizierten Zellen zur Kontrolle; $n \geq 3$.

potentiellen Interaktionspartnern exprimiert. Getestet wurden CXCR4, CCR2, CCR3 und CCR5 (Abb. 4.22). Die Präzipitation der Flag-gekoppelten Rezeptoren aus den Zelllysaten und die anschließende wie oben beschriebene Analyse im Immunblot zeigte für alle getesteten Rezeptorpaare eine Interaktion. Um auszuschließen, dass es sich um unspezifische Interaktionen im Lysat handelt, wurden wie zuvor beschrieben Lysat-Mischungen von mit nur einem Interaktionspartner exprimierenden Zellen mitgeführt und zeigten keine Interaktion (nicht gezeigt).

Die Interaktion von CXCR4 und CCR5 mit Opioidrezeptoren als Verknüpfung von Entzündung und Schmerz sind weitreichend bekannt. Es sollte daher auch untersucht werden, ob CXCR3A und CXCR3B mit MOR und KOR interagieren. Daher wurde in HEK293T Zellen entweder CXCR3A-Flag oder CXCR3B-Flag mit MOR-YFP oder KOR-YFP exprimiert. Die Western-Blot-Analyse der Immunpräzipitate zeigte, dass CXCR3A und CXCR3B sowohl mit MOR als auch mit KOR interagieren.

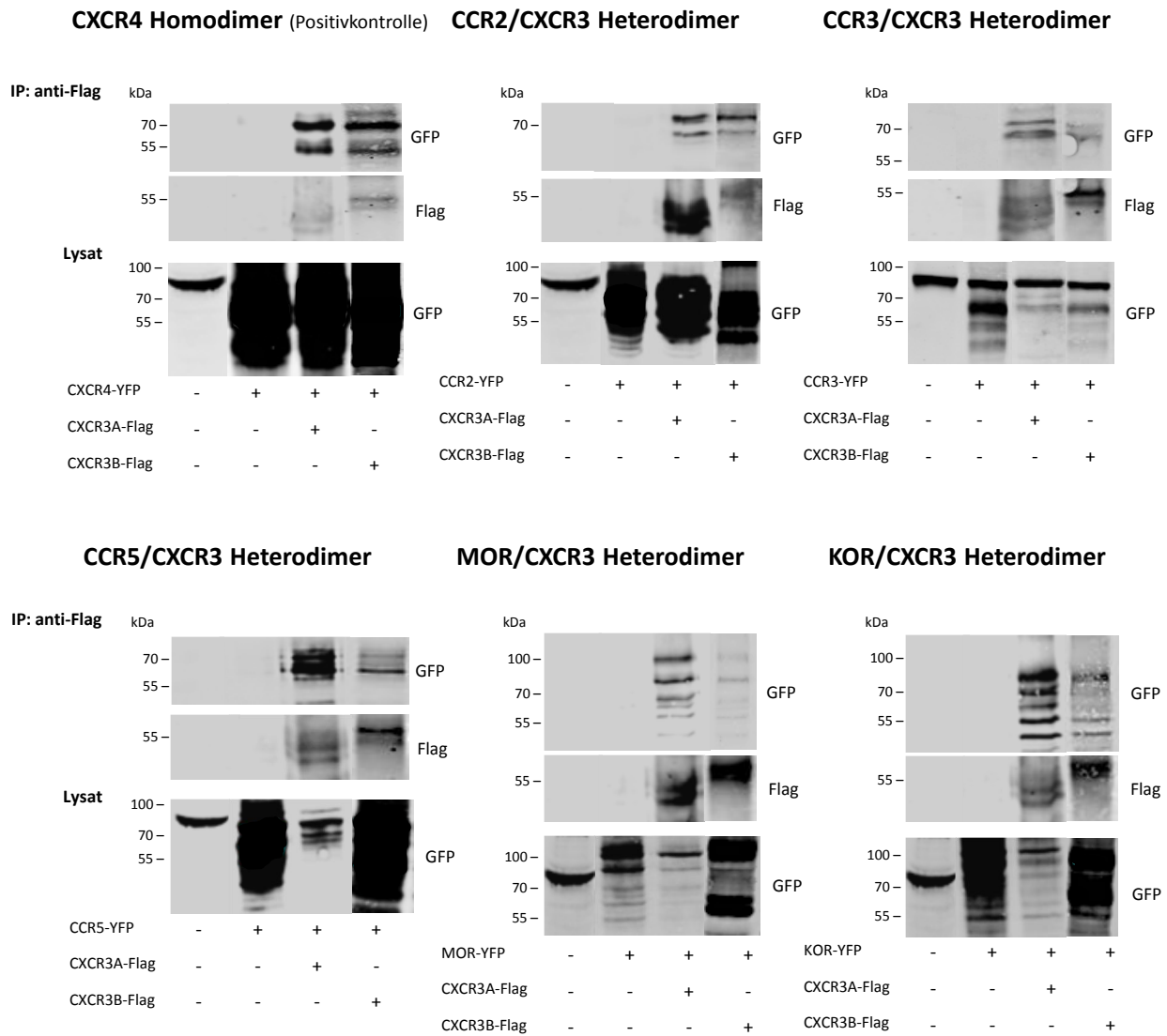


Abbildung 4.22: Co-Immünpräzipitation von CXCR3A-Flag und CXCR3B-Flag mit weiteren YFP-gekoppelten GPCR. Nach Immunpräzipitation von Flag aus Lysaten transient transfizierter HEK293T-Zellen erfolgte die Analyse im Immunblot; transient mit CXCR3A-Flag oder CXCR3B-Flag und CXCR4-YFP, CCR2-YFP, CCR3-YFP, CCR5-YFP, MOR-YFP oder KOR-YFP transfizierte HEK293T-Zellen; $n \geq 3$.

4.4.4 Etablierung der FRET Methode

Wie bereits in Kapitel 3.3.6 beschrieben, wurde die Qualität der Bindung zweier potentieller Interaktionspartner in sog. Typ-1 und Typ-2 Experimenten überprüft. Dabei geht man davon aus, dass bei spezifischen Interaktionen von fluoreszenzmarkierten Proteinen, die FRET Effizienz (E) in Abhängigkeit zum Akzeptor/Donor-Verhältnis hyperbolisch ansteigt und eine Sättigung erreicht. Dazu wurden konstante Mengen CFP-gekoppelten Rezeptors mit steigenden Mengen YFP-gekoppelten Rezeptors in HEK293T Zellen co-transfiziert und gemessen (Typ-1 Experiment). Weiterhin wird angenommen, dass spezifische Protein-Protein-Interaktionen unabhängig von der Konzentration der Bindungspartner sind [James *et al.*, 2006], sodass die FRET Effizienz bei variierender Expressionsstärke, aber konstantem Akzeptor/Donor-Verhältnis ebenfalls konstant bleiben sollte. Dazu wurden steigende Mengen desselben Verhältnisses von Interaktionspartnern in HEK293T Zellen co-transfiziert (Typ-2 Experiment).

Als Negativkontrollen für die FRET-Messung wurden freies CFP und YFP (CFP/YFP), sowie der CRF2aR (CRF2aR-CFP und CRF2a-YFP), der keine Homodimere ausbildet [Teichmann *et al.*, 2012] untersucht. Als Positivkontrollen wurden kovalent verknüpftes YFP und CFP (YFP-CFP), sowie CXCR4 (CXCR4-CFP und CXCR4-YFP), dessen Eigenschaft zu homodimerisieren hinreichend bekannt ist [Levoye *et al.*, 2009] eingesetzt. Die Kombination von CXCR4-CFP und freiem YFP diente außerdem als Negativkontrolle (Abb. 4.23). Die Negativkontrollen CXCR4-CFP/YFP und CFP/YFP erreichten in dem verwendeten System eine maximale FRET Effizienz (E_{max}) von

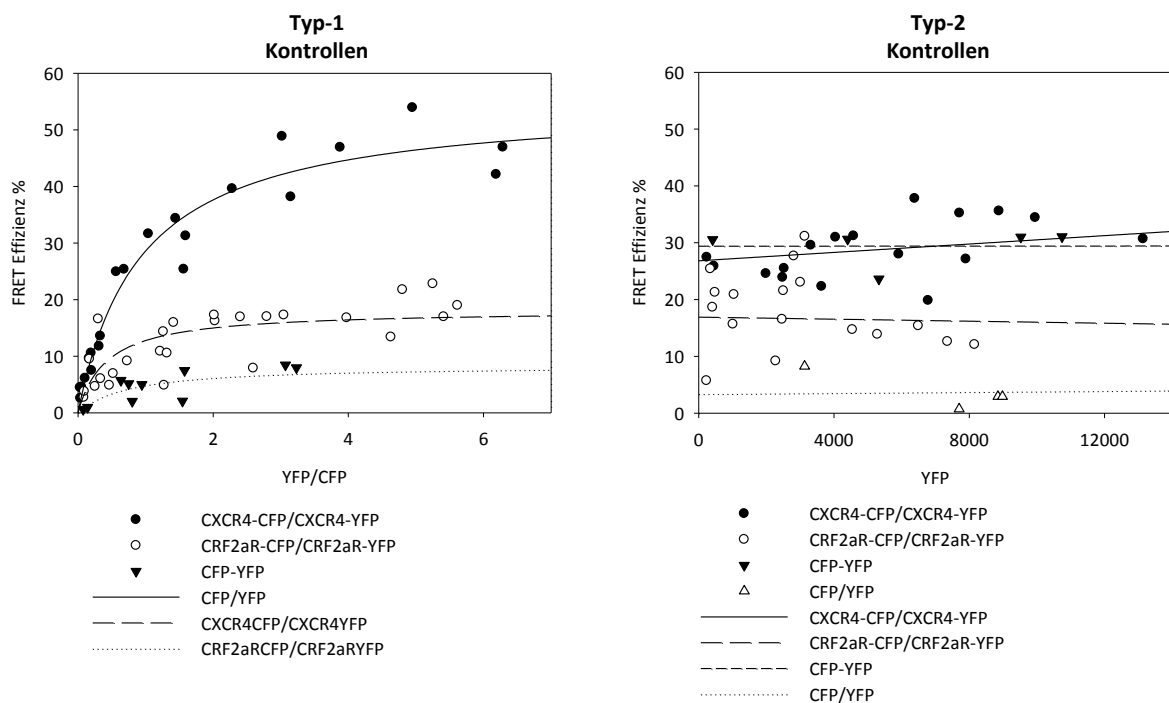


Abbildung 4.23: FRET Messungen der Positiv- und Negativkontrollen.

5-10 % und zeigten die untere Empfindlichkeitsgrenze des Messsystems. Die besser geeignete Negativkontrolle ist jedoch ein membranständiger Rezeptor, der nicht dimerisiert. Zu diesem Zweck wurde das FRET-Paar CRF2aR-YFP/CRF2a-CFP gemessen und ergab eine Sättigung bei 18,15 % mit einer halbmaximalen FRET Effizienz bzw. Dissoziationskonstante (K_D) bei einem YFP/CFP-Verhältnis von 0,42. Um sichere Aussagen treffen zu können müssen gemessene potentielle Interaktionspartner oberhalb dieser Kontrolle liegen. Die Positivkontrolle CXCR4-CFP/CXCR4-YFP erreichte im Typ-1 Experiment eine E_{max} von 55,03 % mit einer K_D von 0,93. Dieser Wert gibt Auskunft über die Affinität der Interaktionspartner zueinander bzw. über die Dynamik mit der die Interaktionspartner aneinander binden und wieder dissoziieren. Je größer der Wert wird, desto geringer die Affinität der Rezeptoren zueinander und desto instabiler der Komplex. Im Typ-2 Experiment zeigt sich mit steigender Konzentration desselben CXCR4-CFP/CXCR4-YFP Verhältnisses von etwa 1:3 eine nahezu konstante FRET Effizienz von ca. 30 %. Das Verhältnis der eingesetzten Rezeptoren befand sich also nicht im gesättigten Bereich, sodass die Werte stärker schwankten als es bei einem größeren YFP/CFP-Verhältnis der Fall gewesen wäre. Die mitgeführten Positivkontrollen YFP-CFP sowie CRF2aR-YFP/CRF2aR-CFP lagen konstant bei einer FRET Effizienz von 30 % bzw. 18 %.

Zunächst wurden potentielle CXCR3A- und CXCR3B-Homodimere bzw. CXCR3A-CXCR3B-Heterodimere gemessen (Abb. 4.24). Die maximale FRET Effizienz des FRET-Paares CXCR3A-CFP/CXCR3-YFP lag mit 23,35 % nur knapp über dem Wert der CRF2aR-Negativkontrolle. Die Messung von CXCR3A-CFP und CXCR3B-YFP ergab einen E_{max} -Wert von 57,55 %. Die Negativkontrolle CXCR3A-CFP/YFP lag bei etwa 5 %. Zum Vergleich wurde der Kurvenverlauf der CRF2aR-Negativkontrolle rot im Diagramm dargestellt. Es konnten keine Messungen mit CXCR3B-CFP durchgeführt werden, da dieses zu schwach exprimiert wurde um in dem verwendeten System gemessen zu werden. Die Messung des potentiellen CXCR3B-Homodimers konnte daher nicht durchgeführt werden. In anderen Messungen wurde stets der CFP-gekoppelte Interaktionspartner mit CXCR3B-YFP gemessen. Die ermittelten E_{max} -Werte wurden in der Auswertung um den Wert der CRF2aR-Kontrolle korrigiert. Die Daten wurden zur besseren Übersicht in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

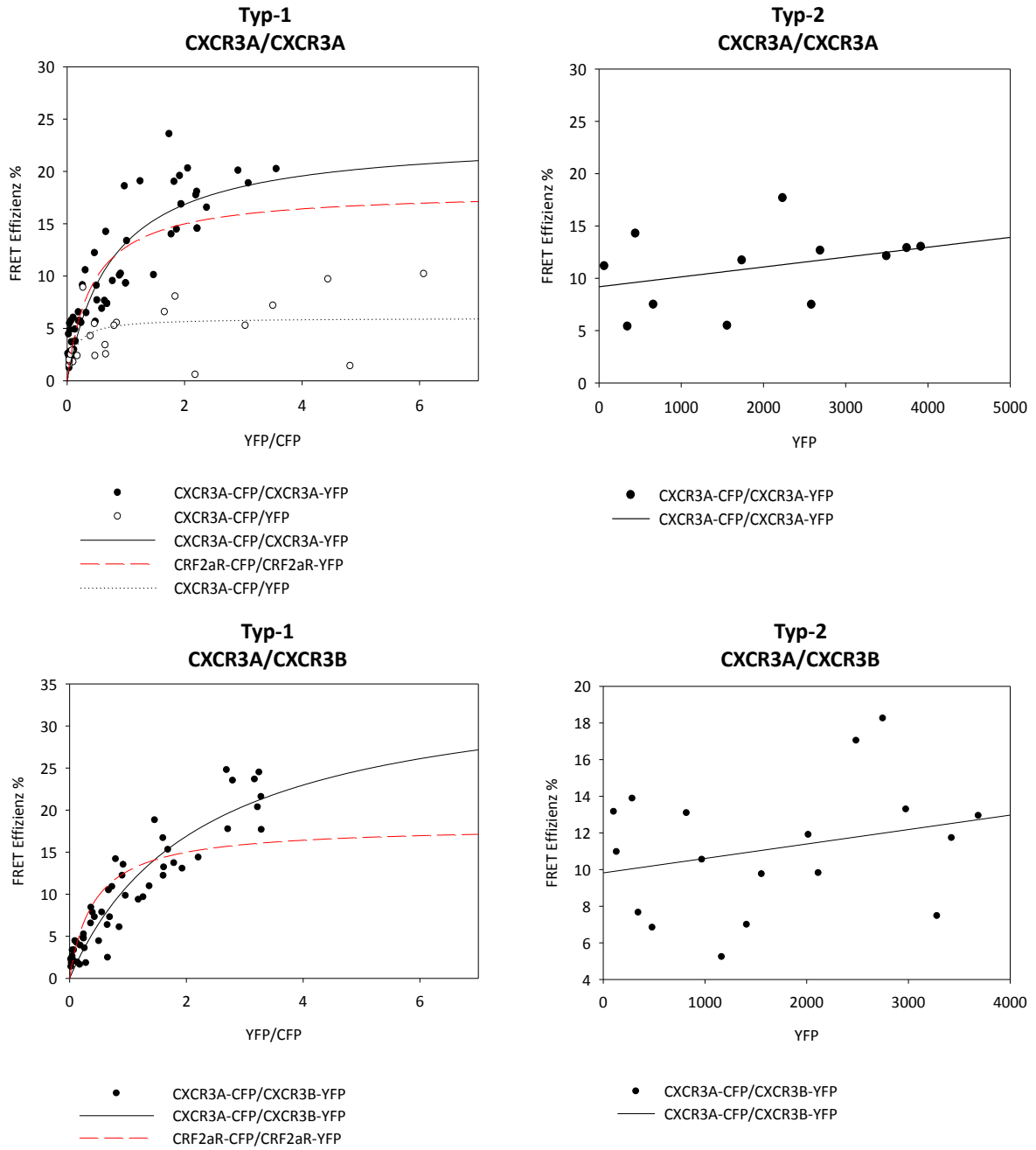


Abbildung 4.24: FRET Messung von CXCR3A-CFP/CXCR3A-YFP und CXCR3A-CFP/CXCR3B-YFP.

Tabelle 4.1 Zusammenfassung der FRET-Daten

Rezeptorpaar	$K_D \pm \text{SEM}$	$E_{max} \pm \text{SEM} [\%]$	$E_{korr.} [\%]$
CRF2aR-CFP/CRF2a-YFP	0,42 \pm 0,18	18,15 \pm 1,75	0,00
CXCR4-CFP/CXCR4-YFP	0,93 \pm 0,16	55,03 \pm 3,05	36,88
CXCR3A-CFP/CXCR3A-YFP	0,77 \pm 0,16	23,35 \pm 1,90	5,20
CXCR3B-CFP/CXCR3B-YFP	-	-	-
CXCR3A-CFP/CXCR3B-YFP	2,25 \pm 0,53	35,89 \pm 4,64	17,74
CXCR3A-CFP/CXCR4-YFP	1,18 \pm 0,32	26,67 \pm 2,36	8,52
CXCR4-CFP/CXCR3B-YFP	0,69 \pm 0,25	17,82 \pm 3,32	-
CXCR3A-CFP/CCR2-YFP	4,12 \pm 2,37	45,77 \pm 17,29	27,62
CCR2-CFP/CXCR3B-YFP	1,04 \pm 0,58	18,45 \pm 4,09	0,30
CCR3-CFP/CXCR3A-YFP	0,51 \pm 0,21	22,05 \pm 1,91	3,90
CCR3-CFP/CXCR3B-YFP	0,16 \pm 0,06	16,70 \pm 1,47	-
CXCR3A-CFP/CCR5-YFP	1,38 \pm 0,40	23,95 \pm 2,94	5,80
CCR5-CFP/CXCR3B-YFP	0,20 \pm 0,06	12,25 \pm 1,13	-
CXCR3A-CFP/MOR-YFP	0,87 \pm 0,15	19,79 \pm 1,55	1,64
CXCR3A-CFP/KOR-YFP	0,97 \pm 0,19	22,23 \pm 1,59	4,08
KOR-CFP/CXCR3B-YFP	0,57 \pm 0,17	18,94 \pm 1,95	0,79

Die meisten korrigierten Werte liegen unter 5 %. Die FRET-Paare CXCR4-CFP/CXCR3B-YFP, CCR3-CFP/CXCR3B-YFP und CCR5-CFP/CXCR3B-YFP haben Werte unterhalb der Negativkontrolle. Neben CXCR3A-CFP/CXCR3B-YFP hat lediglich CXCR3A-CFP/CCR2-YFP eine E_{max} , die deutlich über dem Wert der CRF2aR-Negativkontrolle liegt. Beide FRET-Paare haben jedoch eine relativ große K_D im Vergleich zu den anderen Rezeptorkombinationen, sodass diese Dimere einer großen Dynamik unterliegen und entsprechend instabil sind.

Zusammenfassend können mit Hilfe des verwendeten Messsystems keine konkreten Aussagen über stattgefundenere Interaktionen getroffen werden. Die verwendete Methode ist für die Messung des CXCR3 und der CRF2a-Kontrolle ungeeignet und setzt eine korrekte Expression der Rezeptoren an der Zelloberfläche voraus.

5 Diskussion

5.1 Reaktive Sauerstoffspezies und Entzündung beeinflussen die Entstehung der Neointima

Der langfristige Erfolg der PTCA wird hauptsächlich durch das Auftreten der Restenose limitiert [Horlitz *et al.*, 2002; Arjomand *et al.*, 2003]. Die Entwicklung Medikamente-freisetzender Stents konnte die Restenoserate zwar enorm reduzieren [Moses *et al.*, 2003; Kastrati *et al.*, 2005], geht jedoch mit dem erhöhten Risiko einer späten Stentthrombose einher [McFadden *et al.*, 2004; Iakovou *et al.*, 2005]. Die Entstehung der Neointima infolge der Gefäßverletzung ist Hauptursache für den Lumenverlust und ein noch nicht vollständig verstandener, multifaktorieller Prozess. Neointima entsteht letztendlich durch die Proliferation entdifferenzierter VSMC und durch die Sekretion von EZM [Komatsu *et al.*, 1998]. Im Mittelpunkt neuer therapeutischer Ansätze stehen jedoch Prozesse, die unmittelbar nach der Gefäßverletzung stattfinden und schließlich die Bildung der Neointima initiieren. Sowohl die Rekrutierung von Entzündungszellen [Yasukawa *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 1997; Rogers *et al.*, 1998] als auch die globale ROS-Bildung [Hayashi *et al.*, 2001; Kappert *et al.*, 2006; de Graaf *et al.*, 2009; Jagadeesha *et al.*, 2005; Kappert *et al.*, 2006] wurden im Tiermodell supprimiert und führten erfolgreich zur Reduktion der Neointimabildung.

Primäre Fragestellung dieser Arbeit war es, welche der beiden Prozesse - Die Entzündungsreaktion oder die ROS-Generierung - einzeln betrachtet den größeren Einfluss auf die Neointimabildung besitzt? Dazu wurde gezielt die Entzündung bzw. die ROS-Bildung gehemmt und die Neointimabildung im murinen Femoralisverletzungsmodell untersucht. Dabei wurde mit Hilfe eines Drahtes die Oberschenkelarterie vom Mäusen gedehnt und deren Endothel verletzt um die Neointimabildung zu induzieren. Neben der Placebo-Gruppe wurden Mäuse entweder mit dem Immunsuppressivum Rapamycin (RAD001), dem globalen ROS-Fänger NAC oder dem mitochondrialen SOD-Mimetikum MitoTEMPO behandelt.

Die Hemmung der globalen ROS durch NAC verlangsamte anfänglich zwar die Neointimabildung, resultierte letztendlich aber in keinem Unterschied gegenüber der Placebo-Gruppe. Der Verlauf der Neointimabildung ging mit einer ebenfalls nur anfangs reduzierten Rekrutierung von Entzündungszellen einher. Die erfolgreiche Reduktion der Neointimabildung durch NAC konnte bisher nur im Rattenmodell gezeigt werden [Hayashi *et al.*, 2001; Kappert *et al.*, 2006; de Graaf *et al.*,

2009]. Versuche mit Kaninchen konnten die Wirksamkeit nicht bestätigen [Jeremias *et al.*, 2004]. Diese Arbeit belegt, dass der Effekt von NAC auf die Neointimabildung im Mausmodell ebenfalls nur schwach und ohne langfristigen Erfolg ist. Hauptproblem bei der Behandlung mit NAC ist die geringe Halbwertszeit im Plasma von nur sechs bis 40 Minuten, sodass freies NAC fast gar nicht und oxidiertes NAC nur in sehr geringen Mengen im Blut nachweisbar ist [Moldeus und Cotgreave, 1994; Fishbane *et al.*, 2004]. Im Rattenmodell wurde gezeigt, dass intravenös verabreichtes NAC relativ schnell umliegende Proteine reduziert und Disulfide bildet [Harada *et al.*, 2001]. Eine Reihe klinischer Studien belegt zudem, dass NAC fast vollständig metabolisiert wird, bevor es den Blutkreislauf erreicht, sodass die biologische Verfügbarkeit freien reduzierten NACs höchstens 4-10 % beträgt [Borgstrom *et al.*, 1986; Olsson *et al.*, 1988; Burgunder *et al.*, 1989; Bridgeman *et al.*, 1991; Tsikas *et al.*, 1998]. Bisher gezeigte therapeutische Effekte von NAC sind daher vermutlich keine direkten Effekte, sondern hauptsächlich sekundäre Effekte und auf die Stimulation der Glutathion-Synthese zurückzuführen [Fishbane *et al.*, 2004]. Weiterhin reagiert Glutathion zwar mit H_2O_2 jedoch nicht mit dem wesentlich reaktiveren O_2^- . Dieses muss zunächst durch die SOD zu O_2 und H_2O_2 umgesetzt werden [Fridovich, 1978] bevor schließlich H_2O_2 durch Glutathion zu O_2 und H_2O disproportioniert werden kann. Oxidative Schäden durch verstärkt in den Mitochondrien entstehendes O_2^- können daher möglicherweise weniger effektiv durch NAC verhindert werden.

Die spezifische Hemmung des mitochondrialen O_2^- durch MitoTEMPO führte hingegen nach 14 Tagen *p. i.* zu einer signifikant kleineren Neointimafläche als in den Kontrolltieren. Da die Angabe der Neointima-Flächen aber nicht die Größe des Gefäßes und somit den durch die Neointima resultierende Lumenverengung berücksichtigt, wird in vielen Arbeiten nur das Verhältnis von Neointima zur Media (I/M) angegeben. Zum einen unterliegen die Gefäße unmittelbar nach der Dehnung dem elastischen Rückstoß der Gefäßwand [Kimura *et al.*, 1997]. Weiterhin können die Gefäße durch arterielle Gefäßwandveränderungen (*Remodeling*) auf die Dehnung und den veränderten Blutfluss reagieren. Arterielle *Remodeling* beschreibt die morphologische Veränderung eines Gefäßes innerhalb der *Lamina elastica externa* und unterscheidet das positive arterielle *Remodeling* (auch *outward remodeling*, *compensatory enlargement* oder *expansive remodeling*), welches in der Vergrößerung des Gefäßes resultiert, und das negative arterielle *Remodeling* (auch *inward remodeling*, *paradoxical shrinkage* oder *constrictive remodeling*), das in einer Reduktion der Gefäßgröße resultiert und zur vollständigen Okklusion führen kann [Ward *et al.*, 2000]. So kann ein Gefäß trotz stark reduzierter Neointimafläche durch negatives *Remodeling* enorm verengt sein. Tatsächlich war das I/M in der MitoTEMPO-Gruppe nach 14 Tagen nur tendenziell geringer als in der Placebogruppe. Der Vergleich der Gefäßgrößen bestätigte, dass die verletzten Arterien der mit MitoTEMPO behandelten Tiere signifikant kleiner waren (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich reagierten die mit MitoTEMPO behandelten Tiere mit einem stärkeren negativen *Remodeling* auf die Verletzung als die Mäuse der Placebogruppe. Da heutzutage allerdings bis zu 90 % Stents eingesetzt werden, die den elastischen Rückstoß und das negative *Remodeling* der Gefäße verhindern, hat die reine Neointimabildung die größte klinische Relevanz. Da die Behandlung mit MitoTEMPO also die Neointimabil-

dung signifikant verringern konnte, könnte es eine vielversprechende Therapiemöglichkeit darstellen um das Risiko der In-Stent-Restenose zu reduzieren.

Erstaunlicherweise war die Zahl der inflammatorischen Zellen sowie der apoptotischen Zellen in dieser Gruppe gegenüber den Kontrolltieren unverändert. Die Hemmung des mitochondrialen O_2^- in dieser Arbeit resultierte also in einer signifikant kleineren Neointima ohne dabei die Entzündung oder die Apoptose zu beeinflussen.

Um die Effizienz der NAC- und der MitoTEMPO-Behandlung auf die tatsächliche ROS-Produktion beurteilen zu können, ist zudem eine immunhistochemische Färbung von Nitrotyrosin geplant. Nitrotyrosin ist eine nicht-proteinogene Aminosäure, die durch Einwirkung der reaktiven Stickstoffspezies Peroxynitrit ($ONOO^-$) auf Tyrosin entsteht. $ONOO^-$ wird durch die Reaktion von $NO\cdot$ mit O_2^- gebildet, sodass Nitrotyrosin als Markermolekül für oxidativen Stress verwendet wird [Ceriello, 2002]. Da Peroxynitrit aber mit praktisch allen umliegenden Proteinen reagiert, werden durch die immunhistochemische Färbung des Nitrotyrosins nicht nur einzelne Zellen sondern ganze Gewebe angefärbt. Die Auswertung war mit den zur Verfügung stehenden Programmen im Rahmen dieser Arbeit bisher nicht möglich und wird noch etabliert.

Mäuse, die zur Immunsuppression mit Rapamycin behandelt wurden, hatten 14 Tage *p. i.* eine stark verringerte Neointimafläche und ein ebenfalls signifikant reduziertes I/M. Die Zahl der Entzündungszellen war nach 7 Tagen ebenfalls signifikant reduziert und nach 14 Tagen noch tendenziell verringert. Die Rekrutierung von Entzündungszellen spielt nach 14 Tagen vermutlich keine so große Rolle mehr wie in den ersten Tagen nach der Verletzung. Die Apoptose wurde durch die Rapamycin Behandlung nur tendenziell verringert. Die genaue Wirkung von Rapamycin auf die Apoptose durch die mTOR-Hemmung ist noch unklar. So wurde *in vitro* an karzinogenen Zelllinien zwar gezeigt, dass Rapamycin die ROS-abhängige Apoptose reduzieren kann [Suzuki *et al.*, 2011], jedoch scheint dieser Einfluss u. a. vom p53 Status der Zelle abhängig zu sein [Huang *et al.*, 2001]. Weiterhin wird Rapamycin zwar allgemein als Immunsuppressivum verwendet, unterdrückt jedoch nicht nur die Rekrutierung inflammatorischer Zellen [Terada *et al.*, 1993] sondern eine Reihe weiterer Prozesse. So könnte die verringerte Neointimabildung auch auf die Eigenschaft des Rapamycin zurückgeführt werden die Entdifferenzierung, Emigration und Proliferation VSMC zu unterdrücken [Marx *et al.*, 1995; Poon *et al.*, 1996]. Zudem hemmt Rapamycin die Migration und Differenzierung von Vorläuferzellen [Clever *et al.*, 2011; Huo *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2012], die pathophysiologisch ebenfalls zu proliferierenden SMC differenzieren und zur Neointimabildung beitragen können.

Zusammenfassend konnte sowohl durch die Behandlung mit MitoTEMPO als auch durch die Behandlung mit Rapamycin die Neointimabildung verringert werden. Betrachtet man die Prozesse Entzündung und oxidativen Stress gesondert, so hatte die Unterdrückung der Entzündung mit Rapamycin jedoch den größeren Einfluss auf die Neointimabildung. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass Rapamycin neben der Entzündungsreaktion auch weitere Prozesse hemmt, die die

Neointimabildung begünstigen.

5.2 Bedeutung des Chemokins CXCL10 bei der Neointimabildung

Die durch $\text{IFN}\gamma$ induzierbaren non-ELR Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 sind Liganden des CXCR3. Sie spielen eine bedeutende Rolle in der Th1-Immunantwort und vermitteln die Migration und Aktivierung CXCR3 positiver T-Lymphozyten [Mach *et al.*, 1999; Xie *et al.*, 2003; Hyun *et al.*, 2005; van Wanrooij *et al.*, 2008]. Des Weiteren gelten CXCL9, CXCL10 und CXCL11 als potente Inhibitoren der Angiogenese [Belperio *et al.*, 2000; Strieter *et al.*, 2005]. Untersuchungen belegen, dass speziell CXCL10 frühe Stadien der Angiogenese inhibiert und zur Dissoziation neu entstandener Gefäße führt [Bodnar *et al.*, 2009; Yates-Binder *et al.*, 2012]. Weiterhin konnte CXCL10 in zahlreichen *in vivo* Studien anti-Tumor-Effekte nachgewiesen werden [Luster und Leder, 1993; Angiolillo *et al.*, 1995; Strieter *et al.*, 1995; Feldman *et al.*, 2002; Persano *et al.*, 2007]. Der CXCR3 wird als wichtiger Schnittpunkt zwischen Entzündungsreaktion, Angiogenese und Proliferation von EC diskutiert [Romagnani *et al.*, 2001]. Man vermutet, dass die beiden Splicevarianten CXCR3A und CXCR3B eine wichtige Rolle bei der Modulation unterschiedlicher biologischer Prozesse spielen. CXCR3A wird mit Chemotaxis, Migration von T-Zellen, sowie Proliferation und Angiogenese von EC assoziiert. CXCR3B hingegen induziert keine Chemotaxis, sondern wirkt angiostatisch, antiproliferativ und proapoptotisch auf EC [Lasagni *et al.*, 2003; Feldman *et al.*, 2006]. Allerdings wurde nur für die humane CXCR3-Sequenz die Alternative Splicevariante B gefunden. Bei der Sequenzanalyse des murinen Genabschnittes gab es keine Anhaltspunkte für die Existenz einer solchen Splicevariante [Campanella *et al.*, 2010]. Trotzdem belegen Untersuchungen den angiostatischen und antitumor-Effekt von CXCL10 im Mausmodell [Luster und Leder, 1993; Angiolillo *et al.*, 1995; Strieter *et al.*, 1995]. Die genauen Mechanismen über die CXCL10 wirkt sind jedoch noch völlig unklar. Unter anderem wurde ein von CXCR3 unabhängiger Signalweg postuliert, über den CXCL10 seine angiostatischen Effekte durch die Bindung an Glycosaminoglykane (GAGs) vermittelt, wie es für CXCL4 bereits bekannt ist [Stringer und Gallagher, 1997; Kowalska *et al.*, 2010]. CXCL10 Mutanten, deren CXCR3-Bindestellen inhibiert wurden, nicht aber die GAG-Bindestellen, hemmten immer noch die Proliferation von EC, nicht aber Mutanten, deren GAG-Bindestellen ebenfalls modifiziert wurden [Campanella *et al.*, 2003, 2010]. Es wird angenommen, dass CXCL10 mit Wachstumsfaktoren insbesondere VEGF und bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) um deren Bindungsstellen konkurriert [Romagnani *et al.*, 2004; Campanella *et al.*, 2010] oder auch direkt durch die Bindung an GAG Signale transduziert, wie es bereits für CCL5 gezeigt wurde [Chang *et al.*, 2002].

Hypothese dieser Arbeit war, dass die Blockierung der CXCL10 Expression zu einer verringerten Neointima nach der Gefäßverletzung führt, aber auch zur verbesserten Reendothelialisierung beiträgt. Ein Hauptprojekt dieser Arbeit war daher die Bedeutung von CXCL10 nach der

Gefäßverletzung im Mausmodell zu untersuchen. Die Femoralarterien von C57Bl/6 Mäusen und CXCL10^{-/-} Mäusen wurden dazu mit Hilfe eines Drahtes intraluminal verletzt und nach 14 Tagen analysiert. CXCL10^{-/-} Defizienz führte zu einer signifikant kleineren Neointima im verletzten Gefäß, die mit einer reduzierten Entzündungsreaktion, Proliferation und Apoptose korrelierte. Darüber hinaus hatten die CXCL10^{-/-} Mäuse ein zu 92 % wiederhergestelltes Endothel, während die Gefäße der Wildtyp-Mäuse nur zu 53 % reendothelialisierten.

Es gilt jedoch zu beachten, dass C57BL/6 Mäuse eine 1bp-Deletion in ihrer CXCL11 Sequenz besitzen, die zu einem verkürzten und nicht funktionellen Protein führt. Von CXCL9^{-/-} Mäusen ist bereits bekannt, dass diese trotz des genetischen C57BL/6 Hintergrunds ein funktionelles CXCL11 exprimieren [Eliasson *et al.*, 2010]. Zur Herstellung der CXCL10^{-/-} Mäuse wurde eine 129Sv/J gDNA Phagenbibliothek sowie 129Sv/J-ES-Zellen (J1) verwendet [Dufour *et al.*, 2002]. Da CXCL9, CXCL10 und CXCL11 im Mausgenom auf dem Chromosom fünf sehr nah beieinander liegen, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass auch in dieser Mauslinie versehentlich die CXCL11 Sequenz verändert wurde. Die Sequenzanalyse der verwendeten CXCL10^{-/-} Mäuse zeigte tatsächlich, dass die für C57BL/6 typische Deletion fehlte. Beim Vergleich der beiden Mauslinien muss daher unbedingt berücksichtigt werden, dass die CXCL10^{-/-} Mäuse im Gegensatz zu den C57BL/6 Kontrollen ein funktionelles CXCL11 exprimieren. Beiden CXCR3-Liganden werden ähnliche Funktionen zugeschrieben, sodass mögliche Effekte der CXCL10 Defizienz unterschätzt werden könnten. Weiterhin könnte angenommen werden, dass die gefundenen Effekte in den CXCL10^{-/-} Mäusen nicht auf den Verlust der CXCL10 Expression zurückzuführen sind, sondern auf das nun vorhandene funktionelle CXCL11. CXCL11 wird jedoch ebenso wie CXCL10 mit antiproliferativen Effekten auf EC assoziiert [Proost *et al.*, 2001; Romagnani *et al.*, 2001; Strieter *et al.*, 2002]. Langwieser *et al.* [2009] zeigten auch, dass C57BL/6 Mäuse weniger Neointima bilden als 129X1/SvJ Mäuse.

Weiterhin führte die lokale CXCL10-Suppression mittels RNA-Interferenz auch im Kaninchenmodell zu einer signifikant verringerten Neointima nach der Gefäßverletzung in der *A. carotis* [Zuojun *et al.*, 2012]. Die Autoren führen diesen Effekt allerdings auf die antiproliferative Wirkung des CXCL10 auf SMC zurück [Zhao *et al.*, 2002] und belegen ihre Hypothese mit *in vitro* Versuchen, in denen VSMC eine geringere Proliferationsrate besaßen, wenn deren CXCL10-Expression durch siRNA unterdrückt wurde [Zuojun *et al.*, 2012]. Tatsächlich wird in einigen Arbeiten davon berichtet, dass auch SMC CXCR3 exprimieren [Zhao *et al.*, 2002; Le *et al.*, 2004]. Ob die Wirkung des CXCL10 jedoch tatsächlich über die Bindung durch den CXCR3 vermittelt wird, oder CXCR3 unabhängig erfolgt, ist immer noch nicht ganz klar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Offensichtlich sind die Funktionen und Mechanismen, in die CXCL10 involviert ist, komplexer als bisher angenommen. CXCL10 begünstigt einerseits die Neointimabildung durch die initiale Rekrutierung von Entzündungszellen und die Förderung der Proliferation glatter Muskelzellen und hemmt andererseits die Reendothelialisierung durch antiproliferative und proapoptische Effekte

auf EC während des vaskulären Heilungsprozesses. Die Blockade von CXCL10 reduziert die Neointimabildung und verbessert die Reendothelialisierung. Dabei scheint die Blockade von CXCL10 effektiver zu sein als die Blockade von CXCL11. Die Redundanz und die überlappenden Funktionen des Chemokinsystems machen es in vielen Fällen robust gegenüber Ausfällen, sodass in einer Reihe von *Knockout*-Mäusen kaum Effekte beobachtet werden konnten [Mantovani, 1999]. Umso wichtiger und spezifischer scheint die Rolle des CXCL10 zu sein und macht es zu einem vielversprechenden therapeutischen Zielmolekül zur Verbesserung der Gefäßheilung nach koronaren Angioplastieverfahren.

5.3 Generierung einer konditionellen CXCR3 Knockout Maus

Die Reendothelialisierung nach einer Gefäßverletzung trägt entscheidend zur Heilung der Gefäßwand bei und wirkt der Neointimaformation und dem Risiko der Restenose entgegen [Versari *et al.*, 2007]. Das CXCR3-Chemokinsystem vermittelt einerseits die Rekrutierung von T-Zellen im Rahmen der Th1-Immunantwort nach der Gefäßverletzung [Mach *et al.*, 1999; Xie *et al.*, 2003; Hyun *et al.*, 2005; van Wanrooij *et al.*, 2008], andererseits aber auch antiangiogenetische Effekte, die die Reendothelialisierung verhindern [Luster *et al.*, 1995; Strieter *et al.*, 2005; Bodnar *et al.*, 2009; Yates-Binder *et al.*, 2012]. Die genauen Mechanismen über die das CXCR3-Chemokinsystem die Eigenschaften der EC beeinflusst sind aber bisher ungeklärt.

Um die scheinbar unterschiedlichen biologischen Funktionen des CXCR3-Chemokin-systems separat zu untersuchen, sollten im Rahmen dieser Arbeit erstmals konditionelle CXCR3 Knockout Mäuse generiert werden. Für die Herstellung sollte das Cre-loxP-Rekombinationssystem genutzt werden und zunächst eine Mauslinie hergestellt werden, in der das Exon 2 des CXCR3 von loxP-Sequenzen flankiert ist. Anschließend sollten diese „geflochten“ Mäuse mit Cre-Mäusen gekreuzt werden, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des endothelialen VE-Cadherin-Promotors [Alva *et al.*, 2006] bzw. des T-Zell-spezifischen Lck-Promotors [Takahama *et al.*, 1998] exprimieren. Die Cre-Rekombinase in diesen Tieren wäre dann ausschließlich in EC bzw. T-Zellen aktiv und würde die CXCR3 Expression durch das Entfernen des Exons 2 blockieren. Gleichzeitig blieben andere Zelltypen unbeeinflusst.

Im primären *Targeting* wurden etwa 5000 neomycinresistente ES-Zellklone gepickt, von denen in sechs die Targetingsequenz an der korrekten Stelle im Genom inseriert wurden. Die Effizienz mit der die homologe Rekombination stattgefunden hat, betrug folglich 0,12 %. Drei der Klone waren nach dem Einfrier- und Auftauprozess nicht mehr vital. Durch die stark abweichende Dichte an Zellen in den einzelnen Löchern der Zellkulturplatten wurde der Zeitpunkt des Einfrierens so gewählt, dass möglichst viele Klone eine optimale Zelldichte besaßen. Einzelne Klone hatten jedoch noch eine zu geringe bzw. bereits eine zu große Dichte an Zellen und konnten daher nicht weiter kultiviert werden.

Weitere Southern-Blot-Analysen der vitalen Klone und die Sequenzierung des CXCR3 Loci zeigten, dass die Targetingkassette unvollständig inseriert wurde. In allen Fällen fehlte das loxP-Element hinter dem Exon 2. Mögliche Ursache könnte ein Strangbruch aufgrund komplizierter Sekundärstrukturen im Bereich des Exons 2 sein, da bereits die Klonierung dieses Bereichs schwierig war. Weiterhin wurde parallel zu dieser Arbeit in einem gemeinsamen Projekts des IKMC (*International Knockout Mouse Consortium*) und EUCOMM (*European Conditional Mouse Mutagenesis Program*) an der Herstellung einer „geflochten“ CXCR3 Maus gearbeitet, in der ebenfalls das Exon 2 von loxP-Elementen flankiert werden sollte (Projekt-ID: 118955). Auch dieses Projekt generierte bisher nur ES-Zellklone, in denen das loxP hinter dem Exon 2 nicht mit inseriert wurde [Collins *et al.*, 2007].

Die Sequenzanalyse des nicht weiter kultivierbaren Klons 4_6A zeigte eine vollständig inserierte *Targeting*-Kassette. Es scheint also generell möglich zu sein die bisher verwendete *Targeting*-Kassette vollständig ins ES-Zellgenom zu inserieren. Vorherige Modifikationen des Vektors resultierten ausschließlich in falsch-positiven Klonen.

Durch die geringe Effizienz der homologen Rekombination und der fehlerhaften Insertion ins ES-Zellgenom konnten die konditionellen Mauslinien nicht innerhalb dieser Arbeit fertiggestellt werden.

5.4 Interaktion von CXCR3 mit anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren

Chemokinrezeptoren sind heptahelikale Transmembranrezeptoren und gehören der Klasse der rhodopsinähnlichen GPCR an. In den letzten Jahren wurde ausreichend belegt, dass GPCR nicht nur als Monomere, sondern auch als Multimere agieren und durch allosterische Mechanismen reguliert werden [Smith und Milligan, 2010]. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass Chemokinrezeptoren Homomere oder Heteromere mit anderen Chemokinrezeptoren, Opioidrezeptoren und anderen Rezeptoren an der Zelloberfläche bilden. Anfangs wurde angenommen, dass die Dimerisierung von Chemokinrezeptoren durch die Bindung der Liganden induziert wird. Mittlerweile geht man jedoch davon aus, dass die Dimerisierung konstitutiv stattfindet und die Bindung der Liganden die bereits vorhandenen Komplexe stabilisiert oder reorganisiert [Wang und Norcross, 2008; Salanga *et al.*, 2009; Thelen *et al.*, 2010]. Weiterhin befähigt die Bildung von Heteromeren die Rezeptoren zur Kooperativität (auch *Cross-Talk*), sodass einige Rezeptoren auch auf Stimuli von Chemokinen reagieren können, die sie nicht direkt binden können [Terrillon und Bouvier, 2004]. Die hauptsächlich angewandten Methoden zur Untersuchung der Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen in Zellen waren hauptsächlich CoIP und FRET oder BRET (Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer).

Während einige Chemokinrezeptoren bereits intensiv untersucht wurden und zahlreiche molekulare Interaktionen mit anderen membranständigen Rezeptoren und deren Auswirkung auf Chemotaxis und Signaltransduktion bekannt sind [Bennett *et al.*, 2011; Kramp *et al.*, 2011], ist über

die Interaktionen und die Regulation des CXCR3 bisher wenig bekannt. Kürzlich wurde erstmals die Interaktion von CXCR3 mit anderen CXC-Chemokinrezeptoren untersucht [Munoz *et al.*, 2011]. Dazu wurden zwei unterschiedliche FRET-Methoden angewandt. Die ermittelten FRET-Effizienzen waren allerdings nur sehr schwach und lagen mit teilweise weniger als 5 % nur knapp über dem Detektionsminimum. Die Autoren können daher nicht genau bestätigen, ob es sich um tatsächliche Interaktionen handelt und schlagen vor eine weitere Methode, wie beispielsweise die Coimmunpräzipitation, anzuwenden. Es wurde zudem nicht zwischen CXCR3A und CXCR3B unterschieden.

Als Teilprojekt dieser Arbeit sollten daher potentielle Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen der beiden CXCR3 Varianten A und B untersucht werden. Dazu wurden zunächst potentielle Interaktionspartner durch CoIP identifiziert. Anschließend sollte eine FRET-Methode etabliert werden, in der mögliche Konformationsänderungen der Rezeptorkomplexe in Gegenwart der CXCR3-Liganden untersucht werden können. Als potentielle Interaktionspartner wurden die Chemokinrezeptoren CXCR4, CCR2, CCR3, CCR5 und die Opioidrezeptoren MOR und KOR ausgewählt.

Die CoIP zeigte für alle getesteten Rezeptorpaare eine Interaktion. CXCR3A und CXCR3B bilden demnach also jeweils Homodimere, CXCR3A/CXCR3B-Heterodimere, sowie Heterodimere mit CCR2, CCR3, CCR5, MOR und KOR. Einige Rezeptoren, insbesondere die Opioidrezeptoren, hatten auf dem Western Blot auffällig viele und scharfe Banden. Anhand der Banden lassen sich einzelne Stadien des Rezeptors im sekretorischen Weg abschätzen. Die unteren Banden zeigen Stadien des unreifen noch nicht posttranslational modifizierten Rezeptors (unterste Bande) oder des bereits im Endoplasmatischen Reticulum (ER) N-glykosylierten Rezeptors (*High-Mannose-Form*). Hat der Rezeptor den sekretorischen Weg vollständig durchlaufen, so ist das reife Protein als oberste Bande oder auch als Schmier im Western Blot zu sehen. Das relative Verhältnis der Bandenintensität gibt daher Auskunft über die Qualität der Expression des GPCR in den Zellen [Rutz *et al.*, 2006; Schulz *et al.*, 2010]. N-Glykosylierungen beeinflussen die Faltung, die Stabilität, den Transport und die Sekretion von Proteinen [Helenius und Aebi, 2001]. Die korrekte N-Glykosylierung im Endoplasmatischen Retikulum (ER) ist nicht zwangsläufig relevant für die Funktion des Rezeptors, aber essentiell für den Transport und die korrekte Insertion einiger Rezeptoren in die Plasmamembran, wie beispielsweise für β 2-adrenerge Rezeptoren [Rands *et al.*, 1990].

Auch für den Prostaglandin E₂ Rezeptor EP3 β wurde gezeigt, dass die korrekte Glykosylierung wichtig für den korrekten Einbau des Rezeptors in die Plasmamembran ist [Boer *et al.*, 2000]. So wurden fehlerhaft *core*-glykosylierte Rezeptoren im ER akkumuliert. Auch die transiente Expression des EP3 β resultierte nur in einer schwachen Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche, während große Mengen des Rezeptors im ER lokalisiert werden konnten. Es wird angenommen, dass durch die Überexpression der Rezeptoren nach transienter Transfektion die Kohlenhydrat-Ressourcen der Zelle erschöpft werden, sodass die Rezeptoren im ER nicht korrekt *core*-glykosyliert werden können, dort zurückgehalten werden und in der Folge nicht in den Golgi-Apparat transportiert und weiter

prozessiert werden können [Hooker *et al.*, 1999; Boer *et al.*, 2000].

Für die Funktion und Expression des M2 Muskarinischen Rezeptors und des H2 Histamin Rezeptors hingegen ist die korrekte N-Glykosylierung nicht relevant [van Koppen und Nathanson, 1990; Fukushima *et al.*, 1995]. Andererseits konnte aber auch die vollständige Prozessierung transient exprimierter GPCR abhängig vom Signalpeptid gezeigt werden [Rutz *et al.*, 2006; Schulz *et al.*, 2010]. Über die Auswirkung transients Expression auf die posttranslationale Modifikation von Chemokinrezeptoren und deren Relevanz für die Funktion und Expression ist bisher kaum etwas bekannt. Für den korrekten Transport von Opioidrezeptoren zur Plasmamembran ist die N-Glykosylierung jedoch notwendig [Petaja-Repo *et al.*, 2000; Ge *et al.*, 2009]. Möglichkeiten und Anzahl posttranslationaler Modifikationen der in dieser Arbeit verwendeten GPCR wurden in Tab. 5.1 zusammengefasst [The UniProt Consortium, 2011]. Die Zahl der Glykosylierungsstellen wurde anhand der Aminosäuresequenz errechnet [R. Gupta und Brunak.; Julenius *et al.*, 2005].

Tabelle 5.1 Posttranslationale Modifikationen

Rezeptor	Glykosylierungsstellen		Palmitoylierung C-	Phosphorylierung S-	Sulfatierung Y-
	N-	O-			
CXCR3A	3	4	-	-	2
CXCR3B	3	4	-	-	2
CXCR4	2	1	-	8	3
CCR2	1	4	-	-	1
CCR3	-	5	-	-	-
CCR5	1	4	3	4	4
MOR	5	3	1	5	-
KOR	2	2	1	-	-
CRF2aR	6	2	-	-	-

Die getestete FRET-Methode zur Messung potentieller Dimere wurde an die BRET-Versuche von Levoe *et al.* [2009] angelehnt, die die Homo- und Heterodimere von CXCR4 und CXCR7 in transient transfizierten HEK293T-Zellen untersucht haben. Zunächst wurden in Typ-1-Experimenten Sättigungskurven der FRET-Effizienz gegenüber des Akzeptor/Donor-Verhältnisses erstellt. So diente das CXCR4-Homodimer in dieser Arbeit als Positivkontrolle. Die CRF2aR-Negativkontrolle führte im verwendeten System allerdings auch zu einem FRET-Signal, woraus geschlossen werden muss, dass es im verwendeten System zu unspezifischen Energieübertragungen kommt. Die mikroskopischen Bilder der Co-Expression der Kontrollen mit dem ER-Marker zeigen zwar dass der CXCR4 hauptsächlich an der Plasmamembran exprimiert wurde, der CRF2aR jedoch zu einem großen Teil im ER akkumuliert wurde. Die im Typ-1-Experiment gemessenen FRET-Signale zwischen CRF2aR-CFP und CRF2aR-YFP resultieren also höchstwahrscheinlich aus unspezifischen Energieübertragungen aufgrund zu großer Rezeptordichte im ER. Auch die mikroskopische Untersuchung der CXCR3A-Expression zeigte eine Akkumulation im ER und nur schwache Expression an der Plasmamembran. CXCR3B wurde sogar fast ausschließlich im ER lokalisiert. Es konnten also nur Rezeptorpaare beurteilt werden, deren FRET-Signal oberhalb des Bereichs der Negativkon-

trolle lag. Neben der CXCR4 Positivkontrolle hatten die Rezeptorpaare CXCR3A-CFP/CXCR3B-YFP und CXCR3A-CFP/CCR2-YFP deutlich höhere Sättigungswerte, diese gingen jedoch aus relativ hohen Dissoziationskonstanten hervor. Es ist also davon auszugehen, dass CXCR3A und CXCR3B, sowie CXCR3A und CCR2 mit einer geringen Affinität interagieren. Die anderen Rezeptorpaare hatten wesentlich geringe Dissoziationskonstanten und E_{max} -Werte. FRET-Effizienzen unterhalb des Bereichs der Negativkontrolle hatte die Rezeptorpaare CXCR4-CFP/CXCR3B-YFP, CCR3-CFP/CXCR3B-YFP und CCR5-CFP/CXCR3B-YFP. Ein fehlendes FRET-Signal schließt allerdings nicht aus, dass es zu einer Interaktion zwischen den Rezeptoren gekommen ist, sondern deutet auf einen zu großen Abstand von Donor und Akzeptor. Mit Hilfe der Typ-2-Experimente sollte angelehnt an die Arbeiten von [James *et al.*, 2006] die Qualität des FRET untersucht werden. Veränderte Konzentrationen desselben Akzeptor/Donor-Verhältnisses bei einer spezifischen Interaktion sollten eine konstante FRET-Effizienz haben. Unspezifische Energieübertragungen müssten folglich bei konstantem Akzeptor/Donor-Verhältnis mit steigender Konzentration zunehmen und mit sinkender Rezeptordichte gegen Null gehen. Für die transiente Transfektion wurden stets Akzeptor/Donor-Verhältnisse von etwa 1:5 eingesetzt. Durch schwankende Transfektionseffizienzen wich jedoch das letztendlich in der Zelle exprimierte Akzeptor/Donor-Verhältnis davon ab und führte zum Teil zu großen Abweichungen der Messpunkte. Trotzdem verweist die lineare Regression aller gemessenen Rezeptorpaare im Typ-2-Experiment auf eine Interaktion, einschließlich der CRF2aR-Negativkontrolle. Offensichtlich ist die Rezeptordichte in den Zellen enorm hoch, sodass es nicht möglich war deren Konzentration so weit abzusenken, dass diese wie theoretisch angenommen gegen Null gehen. Auf der anderen Seite ist die Empfindlichkeit des verwendeten Messsystems nicht hoch genug um entsprechend geringen Signale zu erkennen.

Das Messen der ganzen Zelle erscheint daher ungeeignet zur Untersuchung spezifischer Energieübertragungen. Es muss an dieser Stelle jedoch angemerkt werden, dass sowohl die BRET-Messungen von Levoye *et al.* [2009] als auch die FRET-Messungen mit der *Photo-bleaching*-Methode von [Munoz *et al.*, 2011] an ganzen Zellen durchgeführt wurden. Über dies verwendete Levoye *et al.* [2009] als Negativkontrolle lediglich den Renilla-Luciferase gekoppelten CXCR7 mit freiem cytosolischem YFP. Auch die Dimerisierung bestimmter Rezeptoren im ER als Voraussetzung für den Transport zur Zelloberfläche ist bereits bekannt [Terrillon und Bouvier, 2004], wie beispielsweise für die γ -Aminobuttersäure (GABA) Rezeptoren [Pagano *et al.*, 2001], den Oxytocin und Vassopressin Rezeptor V1a und V2 [Terrillon *et al.*, 2003] und den Rezeptor der Komplementkomponente C5 (C5AR1) [Floyd *et al.*, 2003]. Von denen in dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren ist die Homodimerisierung in frühen Biosynthesestadien bisher nur von CCR5 bekannt [Issafras *et al.*, 2002].

Weiterhin unterliegen GPCR nicht nur einer Liganden-abhängigen sondern auch einer konstitutiven Internalisierung zur Kontrolle der Rezeptordichte an der Zelloberfläche. Auch der CXCR3 wird konstitutiv internalisiert, anschließend degradiert und *de novo* synthetisiert [Meiser *et al.*, 2008]. CXCR3A wurde bei der mikroskopischen Untersuchung nicht nur im ER, sondern auch in

vesikulären Strukturen beobachtet. Die Akkumulation von CXCR3 in intrazellulären Kompartimenten muss also nicht ausschließlich auf fehlerhafte oder unvollständig glykosylierte Rezeptoren zurückgeführt werden, deren Transport zur Zelloberfläche zurückgehalten wird, sondern könnte auch die Folge von Regulationsmechanismen sein, die eine zu große Rezeptordichte an der Zelloberfläche unterbinden. Die Tatsache, dass CXCR4 ein konstitutiver Chemokinrezeptor ist, während der CXCR3 induzierbar ist, könnte ebenfalls ein Grund sein, dass der CXCR4 problemlos in HEK293T-Zellen exprimiert wird, während der CXCR3 nicht automatisch in die Plasmamembran eingebaut wird, sondern möglicherweise weitere Stimuli erfordert.

Boer *et al.* [2000] zeigten, dass die Herstellung stabiler Zelllinien zur korrekten Prozessierung und einer höheren Expression des EP3 β -Rezeptors an der Zellmembran führt, als dessen transiente Expression. Eine weitere Option ist die selektive Messung von FRET-Signalen an der Plasmamembran. So konnte für den CRF2aR gezeigt werden, dass dieser nicht in der Zellmembran homodimerisiert [Teichmann *et al.*, 2012], obwohl dieser wie hier gezeigt wurde ebenfalls im ER akkumuliert wird und dort tatsächlich unspezifische Energieübertragungen stattfinden.

Zusammenfassend ist die hier getestete FRET-Methode nicht geeignet zur Untersuchung von GPCR-Interaktionen. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die getesteten Rezeptor-Paare tatsächlich interagieren. Neben der CoIP müsste eine weitere Methode zur Klärung angewendet werden, wie beispielsweise die selektive Messung von FRET an der Plasmamembran mittels *Photobleaching* oder auch die Fluoreszenz Kreuz-Korrelationspektroskopie.

Literaturverzeichnis

- [Aaij und Borst 1972] AAIJ, C. ; BORST, P.: The gel electrophoresis of DNA. In: *Biochim. Biophys. Acta* 269 (1972), May, S. 192–200
- [Allen *et al.* 2007] ALLEN, S. J. ; CROWN, S. E. ; HANDEL, T. M.: Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. In: *Annu. Rev. Immunol.* 25 (2007), S. 787–820
- [Alva *et al.* 2006] ALVA, J. A. ; ZOVEIN, A. C. ; MONVOISIN, A. ; MURPHY, T. ; SALAZAR, A. ; HARVEY, N. L. ; CARMELIET, P. ; IRUELA-ARISPE, M. L.: VE-Cadherin-Cre-recombinase transgenic mouse: a tool for lineage analysis and gene deletion in endothelial cells. In: *Dev. Dyn.* 235 (2006), Mar, Nr. 3, S. 759–767
- [Angiolillo *et al.* 1995] ANGIOLILLO, A. L. ; SGADARI, C. ; TAUB, D. D. ; LIAO, F. ; FARBER, J. M. ; MAHESHWARI, S. ; KLEINMAN, H. K. ; REAMAN, G. H. ; TOSATO, G.: Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. In: *J. Exp. Med.* 182 (1995), Jul, Nr. 1, S. 155–162
- [Arjomand *et al.* 2003] ARJOMAND, H. ; TURI, Z. G. ; MCCORMICK, D. ; GOLDBERG, S.: Percutaneous coronary intervention: historical perspectives, current status, and future directions. In: *Am. Heart J.* 146 (2003), Nov, Nr. 5, S. 787–796
- [Aruoma *et al.* 1989] ARUOMA, O. I. ; HALLIWELL, B. ; HOEY, B. M. ; BUTLER, J.: The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. In: *Free Radic. Biol. Med.* 6 (1989), Nr. 6, S. 593–597
- [Balkwill 2012] BALKWILL, F. R.: The chemokine system and cancer. In: *J. Pathol.* 226 (2012), Jan, Nr. 2, S. 148–157
- [Beisser *et al.* 2002] BEISSER, P. S. ; GOH, C. S. ; COHEN, F. E. ; MICHELSON, S.: Viral chemokine receptors and chemokines in human cytomegalovirus trafficking and interaction with the immune system. CMV chemokine receptors. In: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 269 (2002), S. 203–234
- [Bek *et al.* 2003] BEK, M. J. ; REINHARDT, H. C. ; FISCHER, K. G. ; HIRSCH, J. R. ; HUPFER, C. ; DAYAL, E. ; PAVENSTADT, H.: Up-regulation of early growth response gene-1 via the CXCR3 receptor induces reactive oxygen species and inhibits Na⁺/K⁺-ATPase activity in an immortalized human proximal tubule cell line. In: *J. Immunol.* 170 (2003), Jan, Nr. 2, S. 931–940
- [Belperio *et al.* 2000] BELPERIO, J. A. ; KEANE, M. P. ; ARENBERG, D. A. ; ADDISON, C. L. ; EHLERT, J. E. ; BURDICK, M. D. ; STRIETER, R. M.: CXC chemokines in angiogenesis. In: *J. Leukoc. Biol.* 68 (2000), Jul, Nr. 1, S. 1–8
- [Bennett *et al.* 2011] BENNETT, L. D. ; FOX, J. M. ; SIGNORET, N.: Mechanisms regulating chemokine receptor activity. In: *Immunology* 134 (2011), Nov, Nr. 3, S. 246–256
- [Birboim und Doly 1979] BIRNBOIM, H. C. ; DOLY, J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. In: *Nucleic Acids Res.* 7 (1979), Nov, S. 1513–1523
- [Bodnar *et al.* 2009] BODNAR, R. J. ; YATES, C. C. ; RODGERS, M. E. ; DU, X. ; WELLS, A.: IP-10 induces dissociation of newly formed blood vessels. In: *J. Cell. Sci.* 122 (2009), Jun, Nr. Pt 12, S. 2064–2077
- [Bodnar *et al.* 2006] BODNAR, R. J. ; YATES, C. C. ; WELLS, A.: IP-10 blocks vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility and tube formation via inhibition of calpain. In: *Circ. Res.* 98 (2006), Mar, S. 617–625
- [Boer *et al.* 2000] BOER, U. ; NEUSCHAFER-RUBE, F. ; MOLLER, U. ; PUSCHEL, G. P.: Requirement of N-glycosylation of the prostaglandin E2 receptor EP3beta for correct sorting to the plasma membrane but not for correct folding. In: *Biochem. J.* 350 Pt 3 (2000), Sep, S. 839–847

- [Borgstrom *et al.* 1986] BORGSTROM, L. ; KAGEDAL, B. ; PAULSEN, O.: Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man. In: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 31 (1986), Nr. 2, S. 217–222
- [Bradley und Robertson 1986] BRADLEY, A. ; ROBERTSON, E.: Embryo-derived stem cells: a tool for elucidating the developmental genetics of the mouse. In: *Curr. Top. Dev. Biol.* 20 (1986), S. 357–371
- [Braunersreuther *et al.* 2007] BRAUNERSREUTHER, V. ; MACH, F. ; STEFFENS, S.: The specific role of chemokines in atherosclerosis. In: *Thromb. Haemost.* 97 (2007), May, Nr. 5, S. 714–721
- [Bridgeman *et al.* 1991] BRIDGEMAN, M. M. ; MARSDEN, M. ; MACNEE, W. ; FLENLEY, D. C. ; RYLE, A. P.: Cysteine and glutathione concentrations in plasma and bronchoalveolar lavage fluid after treatment with N-acetylcysteine. In: *Thorax* 46 (1991), Jan, Nr. 1, S. 39–42
- [Burgunder *et al.* 1989] BURGUNDER, J. M. ; VARRIALE, A. ; LAUTERBURG, B. H.: Effect of N-acetylcysteine on plasma cysteine and glutathione following paracetamol administration. In: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 36 (1989), Nr. 2, S. 127–131
- [Campanella *et al.* 2010] CAMPANELLA, G. S. ; COLVIN, R. A. ; LUSTER, A. D.: CXCL10 can inhibit endothelial cell proliferation independently of CXCR3. In: *PLoS ONE* 5 (2010), Nr. 9, S. e12700
- [Campanella *et al.* 2003] CAMPANELLA, G. S. ; LEE, E. M. ; SUN, J. ; LUSTER, A. D.: CXCR3 and heparin binding sites of the chemokine IP-10 (CXCL10). In: *J. Biol. Chem.* 278 (2003), May, Nr. 19, S. 17066–17074
- [Ceriello 2002] CERIELLO, A.: Nitrotyrosine: new findings as a marker of postprandial oxidative stress. In: *Int J Clin Pract Suppl* (2002), Jul, Nr. 129, S. 51–58
- [Chance *et al.* 1979] CHANCE, B. ; SIES, H. ; BOVERIS, A.: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. In: *Physiol. Rev.* 59 (1979), Jul, Nr. 3, S. 527–605
- [Chang *et al.* 2002] CHANG, T. L. ; GORDON, C. J. ; ROSCIC-MRKIC, B. ; POWER, C. ; PROUDFOOT, A. E. ; MOORE, J. P. ; TRKOLA, A.: Interaction of the CC-chemokine RANTES with glycosaminoglycans activates a p44/p42 mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathway and enhances human immunodeficiency virus type 1 infectivity. In: *J. Virol.* 76 (2002), Mar, Nr. 5, S. 2245–2254
- [Chen *et al.* 2010] CHEN, L. ; WU, F. ; XIA, W. H. ; ZHANG, Y. Y. ; XU, S. Y. ; CHENG, F. ; LIU, X. ; ZHANG, X. Y. ; WANG, S. M. ; TAO, J.: CXCR4 gene transfer contributes to in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells. In: *Cardiovasc. Res.* 88 (2010), Dec, Nr. 3, S. 462–470
- [Chen *et al.* 2003] CHEN, Y. F. ; COWLEY, A. W. ; ZOU, A. P.: Increased H(2)O(2) counteracts the vasodilator and natriuretic effects of superoxide dismutation by tempol in renal medulla. In: *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285 (2003), Oct, Nr. 4, S. R827–833
- [Choi 2002] CHOI, K.: The hemangioblast: a common progenitor of hematopoietic and endothelial cells. In: *J. Hematother. Stem Cell Res.* 11 (2002), Feb, Nr. 1, S. 91–101
- [Chomczynski und Sacchi 1987] CHOMCZYNSKI, P. ; SACCHI, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. In: *Anal. Biochem.* 162 (1987), Apr, S. 156–159
- [Church und Gilbert 1984] CHURCH, G. M. ; GILBERT, W.: Genomic sequencing. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81 (1984), Apr, S. 1991–1995
- [Clegg 1995] CLEGG, R. M.: Fluorescence resonance energy transfer. In: *Curr. Opin. Biotechnol.* 6 (1995), Feb, S. 103–110
- [Clegg 2002] CLEGG, R. M.: FRET tells us about proximities, distances, orientations and dynamic properties. In: *J. Biotechnol.* 82 (2002), Jan, S. 177–179
- [Clever *et al.* 2011] CLEVER, Y. P. ; CREMERS, B. ; KRAUSS, B. ; BOHM, M. ; SPECK, U. ; LAUFS, U. ; SCHELLER, B.: Paclitaxel and sirolimus differentially affect growth and motility of endothelial progenitor cells and coronary artery smooth muscle cells. In: *EuroIntervention* 7 Suppl K (2011), May, S. 32–42

- [Cohen *et al.* 1972] COHEN, S. N. ; CHANG, A. C. ; HSU, L.: Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69 (1972), Aug, S. 2110–2114
- [Cole *et al.* 1998] COLE, K. E. ; STRICK, C. A. ; PARADIS, T. J. ; OGBORNE, K. T. ; LOETSCHER, M. ; GLADUE, R. P. ; LIN, W. ; BOYD, J. G. ; MOSER, B. ; WOOD, D. E. ; SAHAGAN, B. G. ; NEOTE, K.: Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. In: *J. Exp. Med.* 187 (1998), Jun, Nr. 12, S. 2009–2021
- [Collins *et al.* 2007] COLLINS, F. S. ; ROSSANT, J. ; WURST, W.: A mouse for all reasons. In: *Cell* 128 (2007), Jan, Nr. 1, S. 9–13
- [Dale *et al.* 1979] DALE, R. E. ; EISINGER, J. ; BLUMBERG, W. E.: The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer. In: *Biophys. J.* 26 (1979), May, S. 161–193
- [Deshpande *et al.* 2002] DESHPANDE, N. N. ; SORESCU, D. ; SESHIAH, P. ; USHIO-FUKAI, M. ; AKERS, M. ; YIN, Q. ; GRIENDLING, K. K.: Mechanism of hydrogen peroxide-induced cell cycle arrest in vascular smooth muscle. In: *Antioxid. Redox Signal.* 4 (2002), Oct, Nr. 5, S. 845–854
- [Dikalova *et al.* 2010] DIKALOVA, A. E. ; BIKINEYEVA, A. T. ; BUDZYN, K. ; NAZAREWICZ, R. R. ; MCCANN, L. ; LEWIS, W. ; HARRISON, D. G. ; DIKALOV, S. I.: Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension. In: *Circ. Res.* 107 (2010), Jul, Nr. 1, S. 106–116
- [Dimmeler und Zeiher 2004] DIMMELER, S. ; ZEIHNER, A. M.: Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis? In: *J. Mol. Med.* 82 (2004), Oct, Nr. 10, S. 671–677
- [Droge 2002] DROGE, W.: Free radicals in the physiological control of cell function. In: *Physiol. Rev.* 82 (2002), Jan, Nr. 1, S. 47–95
- [Dufour *et al.* 2002] DUFOUR, J. H. ; DZIEJMAN, M. ; LIU, M. T. ; LEUNG, J. H. ; LANE, T. E. ; LUSTER, A. D.: IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. In: *J. Immunol.* 168 (2002), Apr, S. 3195–3204
- [Ehlert *et al.* 2004] EHLERT, J. E. ; ADDISON, C. A. ; BURDICK, M. D. ; KUNKEL, S. L. ; STRIETER, R. M.: Identification and partial characterization of a variant of human CXCR3 generated by posttranscriptional exon skipping. In: *J. Immunol.* 173 (2004), Nov, Nr. 10, S. 6234–6240
- [Eliasson *et al.* 2010] ELIASSON, M. ; MORGELIN, M. ; FARBER, J. M. ; EGESTEN, A. ; ALBIGER, B.: Streptococcus pneumoniae induces expression of the antibacterial CXC chemokine MIG/CXCL9 via MyD88-dependent signaling in a murine model of airway infection. In: *Microbes Infect.* 12 (2010), Jul, Nr. 7, S. 565–573
- [Fan und Watanabe 2003] FAN, J. ; WATANABE, T.: Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. In: *J. Atheroscler. Thromb.* 10 (2003), Nr. 2, S. 63–71
- [Farb *et al.* 1999] FARB, A. ; SANGIORGI, G. ; CARTER, A. J. ; WALLEY, V. M. ; EDWARDS, W. D. ; SCHWARTZ, R. S. ; VIRMANI, R.: Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. In: *Circulation* 99 (1999), Nr. 1, S. 44–52
- [Farb *et al.* 2002] FARB, A. ; WEBER, D. K. ; KOLODZIE, F. D. ; BURKE, A. P. ; VIRMANI, R.: Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans. In: *Circulation* 105 (2002), Jun, Nr. 25, S. 2974–2980
- [Feldman *et al.* 2002] FELDMAN, A. L. ; FRIEDL, J. ; LANS, T. E. ; LIBUTTI, S. K. ; LORANG, D. ; MILLER, M. S. ; TURNER, E. M. ; HEWITT, S. M. ; ALEXANDER, H. R.: Retroviral gene transfer of interferon-inducible protein 10 inhibits growth of human melanoma xenografts. In: *Int. J. Cancer* 99 (2002), May, Nr. 1, S. 149–153
- [Feldman *et al.* 2006] FELDMAN, E. D. ; WEINREICH, D. M. ; CARROLL, N. M. ; BURNES, M. L. ; FELDMAN, A. L. ; TURNER, E. ; XU, H. ; ALEXANDER, H. R.: Interferon gamma-inducible protein 10 selectively inhibits proliferation and induces apoptosis in endothelial cells. In: *Ann. Surg. Oncol.* 13 (2006), Jan, Nr. 1, S. 125–133
- [Finkel 2003] FINKEL, T.: Oxidant signals and oxidative stress. In: *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 (2003), Apr, Nr. 2, S. 247–254

- [Fischman *et al.* 1994] FISCHMAN, D. L. ; LEON, M. B. ; BAIM, D. S. ; SCHATZ, R. A. ; SAVAGE, M. P. ; PENN, I. ; DETRE, K. ; VELTRI, L. ; RICCI, D. ; NOBUYOSHI, M.: A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. In: *N. Engl. J. Med.* 331 (1994), Aug, Nr. 8, S. 496–501
- [Fishbane *et al.* 2004] FISHBANE, S. ; DURHAM, J. H. ; MARZO, K. ; RUDNICK, M.: N-acetylcysteine in the prevention of radiocontrast-induced nephropathy. In: *J. Am. Soc. Nephrol.* 15 (2004), Feb, Nr. 2, S. 251–260
- [Floyd *et al.* 2003] FLOYD, D. H. ; GEVA, A. ; BRUINSMA, S. P. ; OVERTON, M. C. ; BLUMER, K. J. ; BARANSKI, T. J.: C5a receptor oligomerization. II. Fluorescence resonance energy transfer studies of a human G protein-coupled receptor expressed in yeast. In: *J. Biol. Chem.* 278 (2003), Sep, Nr. 37, S. 35354–35361
- [Foote *et al.* 1983] FOOTE, C. S. ; GOYNE, T. E. ; LEHRER, R. I.: Assessment of chlorination by human neutrophils. In: *Nature* 301 (1983), Feb, Nr. 5902, S. 715–716
- [Frank 2005] FRANK, Pamela: *Molekulare Mechanismen der Neointimahyperplasie nach experimenteller Gefäßverletzung in der Maus – Analyse des Zeitverlaufs und des Einflusses des Rapamycinanalogons Everolimus*, Ludwig-Maximilians-Universität München, Diss., Feb 2005
- [Fridovich 1978] FRIDOVICH, I.: The biology of oxygen radicals. In: *Science* 201 (1978), Sep, Nr. 4359, S. 875–880
- [Förster 1948] FÖRSTER, T.: Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. In: *Annalen der Physik* 6(2) (1948), S. 55–75
- [Fukushima *et al.* 1995] FUKUSHIMA, Y. ; OKA, Y. ; SAITOH, T. ; KATAGIRI, H. ; ASANO, T. ; MATSUHASHI, N. ; TAKATA, K. ; BREDA, E. van ; YAZAKI, Y. ; SUGANO, K.: Structural and functional analysis of the canine histamine H2 receptor by site-directed mutagenesis: N-glycosylation is not vital for its action. In: *Biochem. J.* 310 (Pt 2) (1995), Sep, S. 553–558
- [Gavrieli *et al.* 1992] GAVRIELI, Y. ; SHERMAN, Y. ; BEN-SASSON, S. A.: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. In: *J. Cell Biol.* 119 (1992), Nov, S. 493–501
- [Ge *et al.* 2009] GE, X. ; LOH, H. H. ; LAW, P. Y.: mu-Opioid receptor cell surface expression is regulated by its direct interaction with Ribophorin I. In: *Mol. Pharmacol.* 75 (2009), Jun, Nr. 6, S. 1307–1316
- [Gerard und Rollins 2001] GERARD, C. ; ROLLINS, B. J.: Chemokines and disease. In: *Nat. Immunol.* 2 (2001), Feb, Nr. 2, S. 108–115
- [Gimbrone 1999] GIMBRONE, M. A.: Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis. In: *Thromb. Haemost.* 82 (1999), Aug, Nr. 2, S. 722–726
- [Godessart 2005] GODESSART, N.: Chemokine receptors: attractive targets for drug discovery. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1051 (2005), Jun, S. 647–657
- [Gonzalez und Selwyn 2003] GONZALEZ, M. A. ; SELWYN, A. P.: Endothelial function, inflammation, and prognosis in cardiovascular disease. In: *Am. J. Med.* 115 Suppl 8A (2003), Dec, S. 99S–106S
- [Gordon *et al.* 1998] GORDON, G. W. ; BERRY, G. ; LIANG, X. H. ; LEVINE, B. ; HERMAN, B.: Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. In: *Biophys. J.* 74 (1998), May, S. 2702–2713
- [de Graaf *et al.* 2009] GRAAF, R. de ; TINTU, A. ; STASSEN, F. ; KLOPPENBURG, G. ; BRUGGEMAN, C. ; ROUWET, E.: N-acetylcysteine prevents neointima formation in experimental venous bypass grafts. In: *Br J Surg* 96 (2009), Aug, Nr. 8, S. 941–950
- [Graham und van der Eb 1973] GRAHAM, F. L. ; EB, A. J. d.: A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. In: *Virology* 52 (1973), Apr, S. 456–467
- [Gregory *et al.* 1995] GREGORY, C. R. ; HUANG, X. ; PRATT, R. E. ; DZAU, V. J. ; SHORHOUSE, R. ; BILLINGHAM, M. E. ; MORRIS, R. E.: Treatment with rapamycin and mycophenolic acid reduces arterial intimal thickening produced by mechanical injury and allows endothelial replacement. In: *Transplantation* 59 (1995), Mar, Nr. 5, S. 655–661

- [Griendling und FitzGerald 2003] GRIENDLING, K. K. ; FITZGERALD, G. A.: Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. In: *Circulation* 108 (2003), Oct, Nr. 16, S. 1912–1916
- [Griffiths 2012] GRIFFITHS, E. J.: Mitochondria and heart disease. In: *Adv. Exp. Med. Biol.* 942 (2012), S. 249–267
- [Gruntzig *et al.* 1979] GRUNTZIG, A. R. ; SENNING, A. ; SIEGENTHALER, W. E.: Nonoperative dilatation of coronary-artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty. In: *N. Engl. J. Med.* 301 (1979), Jul, Nr. 2, S. 61–68
- [Gu *et al.* 1993] GU, H. ; ZOU, Y. R. ; RAJEWSKY, K.: Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. In: *Cell* 73 (1993), Jun, S. 1155–1164
- [Hancock *et al.* 2000] HANCOCK, W. W. ; LU, B. ; GAO, W. ; CSIZMADIA, V. ; FAIA, K. ; KING, J. A. ; SMILEY, S. T. ; LING, M. ; GERARD, N. P. ; GERARD, C.: Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection. In: *J. Exp. Med.* 192 (2000), Nov, Nr. 10, S. 1515–1520
- [Harada *et al.* 2001] HARADA, D. ; NAITO, S. ; KAWAUCHI, Y. ; ISHIKAWA, K. ; KOSHITANI, O. ; HIRAOKA, I. ; OTAGIRI, M.: Determination of reduced, protein-unbound, and total concentrations of N-acetyl-L-cysteine and L-cysteine in rat plasma by postcolumn ligand substitution high-performance liquid chromatography. In: *Anal. Biochem.* 290 (2001), Mar, Nr. 2, S. 251–259
- [Hayashi *et al.* 2001] HAYASHI, K. ; TAKAHATA, H. ; KITAGAWA, N. ; KITANGE, G. ; KAMINOGO, M. ; SHIBATA, S.: N-acetylcysteine inhibited nuclear factor-kappaB expression and the intimal hyperplasia in rat carotid arterial injury. In: *Neurol. Res.* 23 (2001), Oct, Nr. 7, S. 731–738
- [Helenius und Aebi 2001] HELENIUS, A. ; AEBI, M.: Intracellular functions of N-linked glycans. In: *Science* 291 (2001), Mar, Nr. 5512, S. 2364–2369
- [Herdener *et al.* 2000] HERDENER, M. ; HEIGOLD, S. ; SARAN, M. ; BAUER, G.: Target cell-derived superoxide anions cause efficiency and selectivity of intercellular induction of apoptosis. In: *Free Radic. Biol. Med.* 29 (2000), Dec, Nr. 12, S. 1260–1271
- [Hooker *et al.* 1999] HOOKER, A. D. ; GREEN, N. H. ; BAINES, A. J. ; BULL, A. T. ; JENKINS, N. ; STRANGE, P. G. ; JAMES, D. C.: Constraints on the transport and glycosylation of recombinant IFN-gamma in Chinese hamster ovary and insect cells. In: *Biotechnol. Bioeng.* 63 (1999), Jun, Nr. 5, S. 559–572
- [Horlitz *et al.* 2002] HORLITZ, M. ; SIGWART, U. ; NIEBAUER, J.: Fighting restenosis after coronary angioplasty: contemporary and future treatment options. In: *Int. J. Cardiol.* 83 (2002), Jun, Nr. 3, S. 199–205
- [Huang *et al.* 2001] HUANG, S. ; LIU, L. N. ; HOSOI, H. ; DILLING, M. B. ; SHIKATA, T. ; HOUGHTON, P. J.: p53/p21(CIP1) cooperate in enforcing rapamycin-induced G(1) arrest and determine the cellular response to rapamycin. In: *Cancer Res.* 61 (2001), Apr, Nr. 8, S. 3373–3381
- [Huo *et al.* 2011] HUO, Y. ; IADEVAIA, V. ; PROUD, C. G.: Differing effects of rapamycin and mTOR kinase inhibitors on protein synthesis. In: *Biochem. Soc. Trans.* 39 (2011), Apr, Nr. 2, S. 446–450
- [Hyun *et al.* 2005] HYUN, J. G. ; LEE, G. ; BROWN, J. B. ; GRIMM, G. R. ; TANG, Y. ; MITTAL, N. ; DIRISINA, R. ; ZHANG, Z. ; FRYER, J. P. ; WEINSTOCK, J. V. ; LUSTER, A. D. ; BARRETT, T. A.: Anti-interferon-inducible chemokine, CXCL10, reduces colitis by impairing T helper-1 induction and recruitment in mice. In: *Inflamm. Bowel Dis.* 11 (2005), Sep, Nr. 9, S. 799–805
- [Iakovou *et al.* 2005] IAKOVOU, I. ; SCHMIDT, T. ; BONIZZONI, E. ; GE, L. ; SANGIORGI, G. M. ; STANKOVIC, G. ; AIROLDI, F. ; CHIEFFO, A. ; MONTORFANO, M. ; CARLINO, M. ; MICHEV, I. ; CORVAJA, N. ; BRIGUORI, C. ; GERCKENS, U. ; GRUBE, E. ; COLOMBO, A.: Incidence, predictors, and outcome of thrombosis after successful implantation of drug-eluting stents. In: *JAMA* 293 (2005), May, Nr. 17, S. 2126–2130
- [Issafras *et al.* 2002] ISSAFRAS, H. ; ANGERS, S. ; BULENGER, S. ; BLANPAIN, C. ; PARMENTIER, M. ; LABBE-JULLIE, C. ; BOUVIER, M. ; MARULLO, S.: Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors. In: *J. Biol. Chem.* 277 (2002), Sep, Nr. 38, S. 34666–34673

- [IUIS/WHO Subcommittee on Chemokine Nomenclature 2003] IUIS/WHO SUBCOMMITTEE ON CHEMOKINE NOMENCLATURE: Chemokine/chemokine receptor nomenclature. In: *Cytokine* 21 (2003), Jan, Nr. 1, S. 48–49
- [Jagadeesha *et al.* 2005] JAGADEESHA, D. K. ; LINDLEY, T. E. ; DELEON, J. ; SHARMA, R. V. ; MILLER, F. ; BHALLA, R. C.: Tempol therapy attenuates medial smooth muscle cell apoptosis and neointima formation after balloon catheter injury in carotid artery of diabetic rats. In: *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289 (2005), Sep, Nr. 3, S. H1047–1053
- [James *et al.* 2006] JAMES, J. R. ; OLIVEIRA, M. I. ; CARMO, A. M. ; IABONI, A. ; DAVIS, S. J.: A rigorous experimental framework for detecting protein oligomerization using bioluminescence resonance energy transfer. In: *Nat. Methods* 3 (2006), Dec, S. 1001–1006
- [Jeremias *et al.* 2004] JEREMIAS, A. ; DUSA, C. ; FORUDI, F. ; JACOBSEN, D. W. ; VINCE, D. G. ; NISSEN, S. E. ; TUZCU, E. M.: N-acetyl-cysteine in the prevention of vascular restenosis after percutaneous balloon angioplasty. In: *Int. J. Cardiol.* 95 (2004), Jun, Nr. 2-3, S. 255–260
- [Jinquan *et al.* 2001] JINQUAN, T. ; ANTING, L. ; JACOBI, H. H. ; GLUE, C. ; JING, C. ; RYDER, L. P. ; MADSEN, H. O. ; SVEJGAARD, A. ; SKOV, P. S. ; MALLING, H. J. ; POULSEN, L. K.: CXCR3 expression on CD34(+) hemopoietic progenitors induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: II. Signaling pathways involved. In: *J. Immunol.* 167 (2001), Oct, Nr. 8, S. 4405–4413
- [Jinquan *et al.* 2000] JINQUAN, T. ; QUAN, S. ; JACOBI, H. H. ; JING, C. ; MILLNER, A. ; JENSEN, B. ; MADSEN, H. O. ; RYDER, L. P. ; SVEJGAARD, A. ; MALLING, H. J. ; SKOV, P. S. ; POULSEN, L. K.: CXCR3 chemokine receptor 3 expression on CD34(+) hematopoietic progenitors from human cord blood induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: chemotaxis and adhesion induced by its ligands, interferon gamma-inducible protein 10 and monokine induced by interferon gamma. In: *Blood* 96 (2000), Aug, Nr. 4, S. 1230–1238
- [Johnson *et al.* 1994] JOHNSON, D. G. ; OHTANI, K. ; NEVINS, J. R.: Autoregulatory control of E2F1 expression in response to positive and negative regulators of cell cycle progression. In: *Genes Dev.* 8 (1994), Jul, Nr. 13, S. 1514–1525
- [Joner *et al.* 2006] JONER, M. ; FINN, A. V. ; FARB, A. ; MONT, E. K. ; KOLODZIE, F. D. ; LADICH, E. ; KUTYS, R. ; SKORJIA, K. ; GOLD, H. K. ; VIRMANI, R.: Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. In: *J. Am. Coll. Cardiol.* 48 (2006), Jul, Nr. 1, S. 193–202
- [Julenius *et al.* 2005] JULENIUS, K. ; MØLGAARD, A. ; GUPTA, R. ; BRUNAK, S.: Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. In: *Glycobiology* 15 (2005), Feb, Nr. 2, S. 153–164
- [Kaplan 2001] KAPLAN, A. P.: Chemokines, chemokine receptors and allergy. In: *Int. Arch. Allergy Immunol.* 124 (2001), Apr, Nr. 4, S. 423–431
- [Kappert *et al.* 2006] KAPPERT, K. ; SPARWEL, J. ; SANDIN, A. ; SEILER, A. ; SIEBOLTS, U. ; LEPPANEN, O. ; ROSENKRANZ, S. ; OSTMAN, A.: Antioxidants relieve phosphatase inhibition and reduce PDGF signaling in cultured VSMCs and in restenosis. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26 (2006), Dec, Nr. 12, S. 2644–2651
- [Kastrati *et al.* 2005] KASTRATI, A. ; DIBRA, A. ; EBERLE, S. ; MEHILLI, J. ; LEZO, J. Suarez d. ; GOY, J. J. ; ULM, K. ; SCHOMIG, A.: Sirolimus-eluting stents vs paclitaxel-eluting stents in patients with coronary artery disease: meta-analysis of randomized trials. In: *JAMA* 294 (2005), Aug, Nr. 7, S. 819–825
- [Kawamura *et al.* 2003] KAWAMURA, A. ; MIURA, S. ; FUJINO, M. ; NISHIKAWA, H. ; MATSUO, Y. ; TANIGAWA, H. ; TOMITA, S. ; TSUCHIYA, Y. ; MATSUO, K. ; SAKU, K.: CXCR3 chemokine receptor-plasma IP10 interaction in patients with coronary artery disease. In: *Circ. J.* 67 (2003), Oct, Nr. 10, S. 851–854
- [Kehrer 2000] KEHRER, J. P.: The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. In: *Toxicology* 149 (2000), Aug, Nr. 1, S. 43–50
- [Kim und Broxmeyer 1999] KIM, C. H. ; BROXMEYER, H. E.: Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. In: *J. Leukoc. Biol.* 65 (1999), Jan, Nr. 1, S. 6–15

- [Kimura *et al.* 1997] KIMURA, T. ; KABURAGI, S. ; TAMURA, T. ; YOKOI, H. ; NAKAGAWA, Y. ; YOKOI, H. ; HAMASAKI, N. ; NOSAKA, H. ; NOBUYOSHI, M. ; MINTZ, G. S. ; POPMA, J. J. ; LEON, M. B.: Remodeling of human coronary arteries undergoing coronary angioplasty or atherectomy. In: *Circulation* 96 (1997), Jul, Nr. 2, S. 475–483
- [Komatsu *et al.* 1998] KOMATSU, R. ; UEDA, M. ; NARUKO, T. ; KOJIMA, A. ; BECKER, A. E.: Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans: macroscopic, histological, and immunohistochemical analyses. In: *Circulation* 98 (1998), Jul, Nr. 3, S. 224–233
- [van Koppen und Nathanson 1990] KOPPEN, C. J. ; NATHANSON, N. M.: Site-directed mutagenesis of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Analysis of the role of N-glycosylation in receptor expression and function. In: *J. Biol. Chem.* 265 (1990), Dec, Nr. 34, S. 20887–20892
- [Kornowski *et al.* 1998] KORNOWSKI, R. ; HONG, M. K. ; TIO, F. O. ; BRAMWELL, O. ; WU, H. ; LEON, M. B.: In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. In: *J. Am. Coll. Cardiol.* 31 (1998), Jan, Nr. 1, S. 224–230
- [Kouroumalis *et al.* 2005] KOUROUMALIS, A. ; NIBBS, R. J. ; APTEL, H. ; WRIGHT, K. L. ; KOLIOS, G. ; WARD, S. G.: The chemokines CXCL9, CXCL10, and CXCL11 differentially stimulate G alpha i-independent signaling and actin responses in human intestinal myofibroblasts. In: *J. Immunol.* 175 (2005), Oct, Nr. 8, S. 5403–5411
- [Kowalska *et al.* 2010] KOWALSKA, M. A. ; RAUOVA, L. ; PONCZ, M.: Role of the platelet chemokine platelet factor 4 (PF4) in hemostasis and thrombosis. In: *Thromb. Res.* 125 (2010), Apr, Nr. 4, S. 292–296
- [Kramp *et al.* 2011] KRAMP, B. K. ; SARABI, A. ; KOENEN, R. R. ; WEBER, C.: Heterophilic chemokine receptor interactions in chemokine signaling and biology. In: *Exp. Cell Res.* 317 (2011), Mar, Nr. 5, S. 655–663
- [Krishna *et al.* 1992] KRISHNA, M. C. ; GRAHAME, D. A. ; SAMUNI, A. ; MITCHELL, J. B. ; RUSSO, A.: Oxoammonium cation intermediate in the nitroxide-catalyzed dismutation of superoxide. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (1992), Jun, Nr. 12, S. 5537–5541
- [Krishna *et al.* 1996] KRISHNA, M. C. ; RUSSO, A. ; MITCHELL, J. B. ; GOLDSTEIN, S. ; DAFNI, H. ; SAMUNI, A.: Do nitroxide antioxidants act as scavengers of O₂⁻ or as SOD mimics? In: *J. Biol. Chem.* 271 (1996), Oct, Nr. 42, S. 26026–26031
- [Kucia *et al.* 2004] KUCIA, M. ; JANKOWSKI, K. ; RECA, R. ; WYSOCZYNSKI, M. ; BANDURA, L. ; ALLENDORF, D. J. ; ZHANG, J. ; RATAJCZAK, J. ; RATAJCZAK, M. Z.: CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. In: *J. Mol. Histol.* 35 (2004), Mar, Nr. 3, S. 233–245
- [Kumar *et al.* 1997] KUMAR, A. ; HOOVER, J. L. ; SIMMONS, C. A. ; LINDNER, V. ; SHEBUSKI, R. J.: Remodeling and neointimal formation in the carotid artery of normal and P-selectin-deficient mice. In: *Circulation* 96 (1997), Dec, Nr. 12, S. 4333–4342
- [Labat-Moleur *et al.* 1998] LABAT-MOLEUR, F. ; GUILLERMET, C. ; LORIMIER, P. ; ROBERT, C. ; LANTUEJOUL, S. ; BRAMBILLA, E. ; NEGOESCU, A.: TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. In: *J. Histochem. Cytochem.* 46 (1998), Mar, S. 327–334
- [Laemmli 1970] LAEMMLI, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), Aug, S. 680–685
- [Lakowicz 1983] LAKOWICZ, J. R.: Principles of fluorescence spectroscopy. In: *New York: Plenum Press* xiv (1983), S. 496
- [Langwieser *et al.* 2009] LANGWIESER, N. ; SCHWARZ, J. B. ; REICHENBACHER, C. ; STEMMER, B. ; MASSBERG, S. ; LANGWIESER, N. N. ; ZOHLNHOFFER, D.: Role of bone marrow-derived cells in the genetic control of restenosis. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29 (2009), Oct, Nr. 10, S. 1551–1557
- [Lasagni *et al.* 2003] LASAGNI, L. ; FRANCALANCI, M. ; ANNUNZIATO, F. ; LAZZERI, E. ; GIANNINI, S. ; COSMI, L. ; SAGRINATI, C. ; MAZZINGHI, B. ; ORLANDO, C. ; MAGGI, E. ; MARRA, F. ; ROMAGNANI, S. ; SERIO, M. ; ROMAGNANI, P.: An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. In: *J Exp Med* 197 (2003), Nr. 11, S. 1537–1549

- [Le *et al.* 2004] LE, Y. ; ZHOU, Y. ; IRIBARREN, P. ; WANG, J.: Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. In: *Cell. Mol. Immunol.* 1 (2004), Apr, Nr. 2, S. 95–104
- [Lee *et al.* 2001] LEE, E. C. ; YU, D. ; VELASCO, J. Martinez d. ; TESSAROLLO, L. ; SWING, D. A. ; COURT, D. L. ; JENKINS, N. A. ; COPELAND, N. G.: A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. In: *Genomics* 73 (2001), Nr. 1, S. 56–65
- [Levoye *et al.* 2009] LEVOYE, A. ; BALABANIAN, K. ; BALEUX, F. ; BACHELERIE, F. ; LAGANE, B.: CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. In: *Blood* 113 (2009), Jun, S. 6085–6093
- [Li *et al.* 1997] LI, P. F. ; DIETZ, R. ; HARSDFORF, R. von: Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. In: *Circulation* 96 (1997), Nov, Nr. 10, S. 3602–3609
- [Li *et al.* 1995] LI, Y. ; HUANG, T. T. ; CARLSON, E. J. ; MELOV, S. ; URSELL, P. C. ; OLSON, J. L. ; NOBLE, L. J. ; YOSHIMURA, M. P. ; BERGER, C. ; CHAN, P. H. ; WALLACE, D. C. ; EPSTEIN, C. J.: Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. In: *Nat. Genet.* 11 (1995), Dec, Nr. 4, S. 376–381
- [Luo *et al.* 2012] LUO, Y. ; LIU, L. ; ROGERS, D. ; SU, W. ; ODAKA, Y. ; ZHOU, H. ; CHEN, W. ; SHEN, T. ; ALEXANDER, J. S. ; HUANG, S.: Rapamycin inhibits lymphatic endothelial cell tube formation by downregulating vascular endothelial growth factor receptor 3 protein expression. In: *Neoplasia* 14 (2012), Mar, Nr. 3, S. 228–237
- [Luster *et al.* 1995] LUSTER, A. D. ; GREENBERG, S. M. ; LEDER, P.: The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. In: *J. Exp. Med.* 182 (1995), Jul, Nr. 1, S. 219–231
- [Luster und Leder 1993] LUSTER, A. D. ; LEDER, P.: IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo. In: *J. Exp. Med.* 178 (1993), Sep, Nr. 3, S. 1057–1065
- [Luster und Ravetch 1987] LUSTER, A. D. ; RAVETCH, J. V.: Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). In: *J. Exp. Med.* 166 (1987), Oct, Nr. 4, S. 1084–1097
- [Luster *et al.* 1985] LUSTER, A. D. ; UNKELESS, J. C. ; RAVETCH, J. V.: Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. In: *Nature* 315 (1985), Nr. 6021, S. 672–676
- [Mach *et al.* 1999] MACH, F. ; SAUTY, A. ; IAROSI, A. S. ; SUKHOVA, G. K. ; NEOTE, K. ; LIBBY, P. ; LUSTER, A. D.: Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. In: *J. Clin. Invest.* 104 (1999), Oct, Nr. 8, S. 1041–1050
- [Madamanchi *et al.* 2005] MADAMANCHI, N. R. ; VENDROV, A. ; RUNGE, M. S.: Oxidative stress and vascular disease. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (2005), Jan, Nr. 1, S. 29–38
- [Malik *et al.* 1998] MALIK, N. ; FRANCIS, S. E. ; HOLT, C. M. ; GUNN, J. ; THOMAS, G. L. ; SHEPHERD, L. ; CHAMBERLAIN, J. ; NEWMAN, C. M. ; CUMBERLAND, D. C. ; CROSSMAN, D. C.: Apoptosis and cell proliferation after porcine coronary angioplasty. In: *Circulation* 98 (1998), Oct, Nr. 16, S. 1657–1665
- [Mansour *et al.* 1988] MANSOUR, S. L. ; THOMAS, K. R. ; CAPECCHI, M. R.: Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. In: *Nature* 336 (1988), Nov, Nr. 6197, S. 348–352
- [Mantovani 1999] MANTOVANI, A.: The chemokine system: redundancy for robust outputs. In: *Immunol. Today* 20 (1999), Jun, Nr. 6, S. 254–257
- [Marthaler und Keresztes 2004] MARTHALER, M. T. ; KERESZTES, P. A.: Evidence-based practice for the use of N-acetylcysteine. In: *Dimens Crit Care Nurs* 23 (2004), Nr. 6, S. 270–273
- [Marx *et al.* 1995] MARX, S. O. ; JAYARAMAN, T. ; GO, L. O. ; MARKS, A. R.: Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. In: *Circ. Res.* 76 (1995), Mar, Nr. 3, S. 412–417

- [McFadden *et al.* 2004] MCFADDEN, E. P. ; STABILE, E. ; REGAR, E. ; CHENEAU, E. ; ONG, A. T. ; KINNAIRD, T. ; SUDDATH, W. O. ; WEISSMAN, N. J. ; TORGUSON, R. ; KENT, K. M. ; PICHARD, A. D. ; SATLER, L. F. ; WAKSMAN, R. ; SERRUYS, P. W.: Late thrombosis in drug-eluting coronary stents after discontinuation of antiplatelet therapy. In: *Lancet* 364 (2004), Nr. 9444, S. 1519–1521
- [Meiser *et al.* 2008] MEISER, A. ; MUELLER, A. ; WISE, E. L. ; MCDONAGH, E. M. ; PETIT, S. J. ; SARAN, N. ; CLARK, P. C. ; WILLIAMS, T. J. ; PEASE, J. E.: The chemokine receptor CXCR3 is degraded following internalization and is replenished at the cell surface by de novo synthesis of receptor. In: *J. Immunol.* 180 (2008), May, Nr. 10, S. 6713–6724
- [Melter *et al.* 2001] MELTER, M. ; EXENI, A. ; REINDERS, M. E. ; FANG, J. C. ; MCMAHON, G. ; GANZ, P. ; HANCOCK, W. W. ; BRISCOE, D. M.: Expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand IP-10 during human cardiac allograft rejection. In: *Circulation* 104 (2001), Nov, Nr. 21, S. 2558–2564
- [Mendelsohn und Karas 2005] MENDELSON, M. E. ; KARAS, R. H.: Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. In: *Science* 308 (2005), Jun, Nr. 5728, S. 1583–1587
- [Mintz *et al.* 1996] MINTZ, G. S. ; POPMA, J. J. ; HONG, M. K. ; PICHARD, A. D. ; KENT, K. M. ; SATLER, L. F. ; LEON, M. B.: Intravascular ultrasound to discern device-specific effects and mechanisms of restenosis. In: *Am. J. Cardiol.* 78 (1996), Aug, Nr. 3A, S. 18–22
- [Moldeus und Cotgreave 1994] MOLDEUS, P. ; COTGREAVE, I. A.: N-acetylcysteine. In: *Meth. Enzymol.* 234 (1994), S. 482–492
- [Moses *et al.* 2003] MOSES, J. W. ; LEON, M. B. ; POPMA, J. J. ; FITZGERALD, P. J. ; HOLMES, D. R. ; O'SHAUGHNESSY, C. ; CAPUTO, R. P. ; KEREIAKES, D. J. ; WILLIAMS, D. O. ; TEIRSTEIN, P. S. ; JAEGER, J. L. ; KUNTZ, R. E.: Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. In: *N. Engl. J. Med.* 349 (2003), Oct, Nr. 14, S. 1315–1323
- [Mueller *et al.* 2008] MUELLER, A. ; MEISER, A. ; MCDONAGH, E. M. ; FOX, J. M. ; PETIT, S. J. ; XANTHOU, G. ; WILLIAMS, T. J. ; PEASE, J. E.: CXCL4-induced migration of activated T lymphocytes is mediated by the chemokine receptor CXCR3. In: *J. Leukoc. Biol.* 83 (2008), Apr, Nr. 4, S. 875–882
- [Munoz *et al.* 2011] MUNOZ, L. M. ; LUCAS, P. ; HOLGADO, B. L. ; BARROSO, R. ; VEGA, B. ; RODRIGUEZ-FRADE, J. M. ; MELLADO, M.: Receptor oligomerization: a pivotal mechanism for regulating chemokine function. In: *Pharmacol. Ther.* 131 (2011), Sep, Nr. 3, S. 351–358
- [Murphy und Smith 2000] MURPHY, M. P. ; SMITH, R. A.: Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine. In: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 41 (2000), Mar, Nr. 2, S. 235–250
- [Nagy *et al.* 2003] NAGY, A. ; GERTSENSTEIN, M. ; VINTERSTEN, K. ; BEHRINGER, R.: *Manipulating the Mouse Embryo - A Laboratory Manual.* 3rd. 2003
- [Nagy *et al.* 1993] NAGY, A. ; ROSSANT, J. ; NAGY, R. ; ABRAMOW-NEWERLY, W. ; RODER, J. C.: Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993), Sep, S. 8424–8428
- [Navab *et al.* 1996] NAVAB, M. ; BERLINER, J. A. ; WATSON, A. D. ; HAMA, S. Y. ; TERRITO, M. C. ; LUSIS, A. J. ; SHIH, D. M. ; VAN LENTEN, B. J. ; FRANK, J. S. ; DEMER, L. L. ; EDWARDS, P. A. ; FOGELMAN, A. M.: The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16 (1996), Jul, Nr. 7, S. 831–842
- [Niwa *et al.* 2002] NIWA, K. ; INANAMI, O. ; YAMAMORI, T. ; OHTA, T. ; HAMASU, T. ; KARINO, T. ; KUWABARA, M.: Roles of protein kinase C delta in the accumulation of P53 and the induction of apoptosis in H₂O₂-treated bovine endothelial cells. In: *Free Radic. Res.* 36 (2002), Nov, Nr. 11, S. 1147–1153
- [O'Connor und Gutterman 2010] O'CONNOR, P. M. ; GUTTERMAN, D. D.: Resurrecting hope for antioxidant treatment of cardiovascular disease: focus on mitochondria. In: *Circ. Res.* 107 (2010), Jul, Nr. 1, S. 9–11
- [Oesterle *et al.* 1998] OESTERLE, S. N. ; WHITBOURN, R. ; FITZGERALD, P. J. ; YEUNG, A. C. ; STERTZER, S. H. ; DAKE, M. D. ; YOCK, P. G. ; VIRMANI, R.: The stent decade: 1987 to 1997. Stanford Stent Summit faculty. In: *Am. Heart J.* 136 (1998), Oct, Nr. 4 Pt 1, S. 578–599

- [Okamoto *et al.* 2008] OKAMOTO, Y. ; FOLCO, E. J. ; MINAMI, M. ; WARA, A. K. ; FEINBERG, M. W. ; SUKHOVA, G. K. ; COLVIN, R. A. ; KIHARA, S. ; FUNAHASHI, T. ; LUSTER, A. D. ; LIBBY, P.: Adiponectin inhibits the production of CXC receptor 3 chemokine ligands in macrophages and reduces T-lymphocyte recruitment in atherogenesis. In: *Circ. Res.* 102 (2008), Feb, Nr. 2, S. 218–225
- [Olson und Ley 2002] OLSON, T. S. ; LEY, K.: Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. In: *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283 (2002), Jul, Nr. 1, S. 7–28
- [Olsson *et al.* 1988] OLSSON, B. ; JOHANSSON, M. ; GABRIELSSON, J. ; BOLME, P.: Pharmacokinetics and bioavailability of reduced and oxidized N-acetylcysteine. In: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 34 (1988), Nr. 1, S. 77–82
- [Pagano *et al.* 2001] PAGANO, A. ; ROVELLI, G. ; MOSBACHER, J. ; LOHMANN, T. ; DUTHEY, B. ; STAUFFER, D. ; RISTIG, D. ; SCHULER, V. ; MEIGEL, I. ; LAMPERT, C. ; STEIN, T. ; PREZEAU, L. ; BLAHOS, J. ; PIN, J. ; FROESTL, W. ; KUHN, R. ; HEID, J. ; KAUPMANN, K. ; BETTLER, B.: C-terminal interaction is essential for surface trafficking but not for heteromeric assembly of GABA(b) receptors. In: *J. Neurosci.* 21 (2001), Feb, Nr. 4, S. 1189–1202
- [Persano *et al.* 2007] PERSANO, L. ; CRESCENZI, M. ; INDRACCOLO, S.: Anti-angiogenic gene therapy of cancer: current status and future prospects. In: *Mol. Aspects Med.* 28 (2007), Feb, Nr. 1, S. 87–114
- [Petaja-Repo *et al.* 2000] PETAJA-REPO, U. E. ; HOGUE, M. ; LAPERRIERE, A. ; WALKER, P. ; BOUVIER, M.: Export from the endoplasmic reticulum represents the limiting step in the maturation and cell surface expression of the human delta opioid receptor. In: *J. Biol. Chem.* 275 (2000), May, Nr. 18, S. 13727–13736
- [Pollman *et al.* 1999] POLLMAN, M. J. ; HALL, J. L. ; GIBBONS, G. H.: Determinants of vascular smooth muscle cell apoptosis after balloon angioplasty injury. Influence of redox state and cell phenotype. In: *Circ. Res.* 84 (1999), Nr. 1, S. 113–121
- [Poon *et al.* 2002] POON, M. ; BADIMON, J. J. ; FUSTER, V.: Overcoming restenosis with sirolimus: from alphabet soup to clinical reality. In: *Lancet* 359 (2002), Feb, Nr. 9306, S. 619–622
- [Poon *et al.* 1996] POON, M. ; MARX, S. O. ; GALLO, R. ; BADIMON, J. J. ; TAUBMAN, M. B. ; MARKS, A. R.: Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration. In: *J. Clin. Invest.* 98 (1996), Nov, Nr. 10, S. 2277–2283
- [Proost *et al.* 2001] PROOST, P. ; SCHUTYSER, E. ; MENTEN, P. ; STRUYF, S. ; WUYTS, A. ; OPDENAKKER, G. ; DETHEUX, M. ; PARMENIER, M. ; DURINX, C. ; LAMBEIR, A. M. ; NEYTS, J. ; LIEKENS, S. ; MAUDGAL, P. C. ; BILLIAU, A. ; VAN DAMME, J.: Amino-terminal truncation of CXCR3 agonists impairs receptor signaling and lymphocyte chemotaxis, while preserving antiangiogenic properties. In: *Blood* 98 (2001), Dec, Nr. 13, S. 3554–3561
- [Proud 2011] PROUD, C. G.: mTOR Signalling in Health and Disease. In: *Biochem. Soc. Trans.* 39 (2011), Apr, Nr. 2, S. 431–436
- [R. Gupta und Brunak.] R. GUPTA, E. J. ; BRUNAK, S.: *Prediction of N-glycosylation sites in human proteins.* – In preparation, 2004
- [Ramirez-Solis *et al.* 1992] RAMIREZ-SOLIS, R. ; RIVERA-PEREZ, J. ; WALLACE, J. D. ; WIMS, M. ; ZHENG, H. ; BRADLEY, A.: Genomic DNA microextraction: a method to screen numerous samples. In: *Anal. Biochem.* 201 (1992), Mar, S. 331–335
- [Rands *et al.* 1990] RANDE, E. ; CANDELORE, M. R. ; CHEUNG, A. H. ; HILL, W. S. ; STRADER, C. D. ; DIXON, R. A.: Mutational analysis of beta-adrenergic receptor glycosylation. In: *J. Biol. Chem.* 265 (1990), Jun, Nr. 18, S. 10759–10764
- [Ribatti 2007] RIBATTI, D.: The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review. In: *Leuk. Res.* 31 (2007), Apr, Nr. 4, S. 439–444
- [Roger *et al.* 2011] ROGER, V. L. ; GO, A. S. ; LLOYD-JONES, D. M. ; ADAMS, R. J. ; BERRY, J. D. ; BROWN, T. M. ; CARNETHON, M. R. ; DAI, S. ; SIMONE, G. de ; FORD, E. S. ; FOX, C. S. ; FULLERTON, H. J. ; GILLESPIE, C. ; GREENLUND, K. J. ; HAILPERN, S. M. ; HEIT, J. A. ; HO, P. M. ; HOWARD, V. J. ; KISSELA, B. M. ; KITNER, S. J. ; LACKLAND, D. T. ; LICHTMAN, J. H. ; LISABETH, L. D. ; MAKUC, D. M. ; MARCUS, G. M. ; MARELLI, A. ; MATCHAR, D. B. ; McDERMOTT, M. M. ; MEIGS, J. B. ; MOY, C. S. ; MOZAFFARIAN, D. ; MUSSOLINO, M. E. ; NICHOL, G. ; PAYNTER, N. P. ; ROSAMOND, W. D. ; SORLIE, P. D. ; STAFFORD, R. S. ; TURAN, T. N. ; TURNER, M. B. ; WONG, N. D. ; WYLIE-ROSETT, J.: Heart disease and stroke statistics–2011 update: a report from the American Heart Association. In: *Circulation* 123 (2011), Feb, Nr. 4, S. e18–e209

- [Rogers *et al.* 1998] ROGERS, C. ; EDELMAN, E. R. ; SIMON, D. I.: A mAb to the beta2-leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) reduces intimal thickening after angioplasty or stent implantation in rabbits. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998), Aug, Nr. 17, S. 10134–10139
- [Rogers *et al.* 1996] ROGERS, C. ; WELT, F. G. ; KARNOVSKY, M. J. ; EDELMAN, E. R.: Monocyte recruitment and neointimal hyperplasia in rabbits. Coupled inhibitory effects of heparin. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16 (1996), Oct, Nr. 10, S. 1312–1318
- [Romagnani *et al.* 2001] ROMAGNANI, P. ; ANNUNZIATO, F. ; LASAGNI, L. ; LAZZERI, E. ; BELTRAME, C. ; FRANCALANCI, M. ; UGUCCIONI, M. ; GALLI, G. ; COSMI, L. ; MAURENZIG, L. ; BAGGIOLINI, M. ; MAGGI, E. ; ROMAGNANI, S. ; SERIO, M.: Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. In: *J. Clin. Invest.* 107 (2001), Jan, Nr. 1, S. 53–63
- [Romagnani *et al.* 2004] ROMAGNANI, P. ; LASAGNI, L. ; ANNUNZIATO, F. ; SERIO, M. ; ROMAGNANI, S.: CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. In: *Trends Immunol.* 25 (2004), Apr, Nr. 4, S. 201–209
- [Ross *et al.* 2005] ROSS, M. F. ; KELSO, G. F. ; BLAIKIE, F. H. ; JAMES, A. M. ; COCHEME, H. M. ; FILIPOVSKA, A. ; DA ROS, T. ; HURD, T. R. ; SMITH, R. A. ; MURPHY, M. P.: Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology. In: *Biochemistry Mosc.* 70 (2005), Feb, Nr. 2, S. 222–230
- [Ross 1999] ROSS, R.: Atherosclerosis—an inflammatory disease. In: *N. Engl. J. Med.* 340 (1999), Jan, Nr. 2, S. 115–126
- [Ruffmann und Wendel 1991] RUFFMANN, R. ; WENDEL, A.: GSH rescue by N-acetylcysteine. In: *Klin. Wochenschr.* 69 (1991), Nov, Nr. 18, S. 857–862
- [Rutz *et al.* 2006] RUTZ, C. ; RENNER, A. ; ALKEN, M. ; SCHULZ, K. ; BEYERMANN, M. ; WIESNER, B. ; ROSENTHAL, W. ; SCHULEIN, R.: The corticotropin-releasing factor receptor type 2a contains an N-terminal pseudo signal peptide. In: *J. Biol. Chem.* 281 (2006), Aug, Nr. 34, S. 24910–24921
- [Saiki *et al.* 1985] SAIKI, R. K. ; SCHARF, S. ; FALOONA, F. ; MULLIS, K. B. ; HORN, G. T. ; ERLICH, H. A. ; ARNHEIM, N.: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. In: *Science* 230 (1985), Dec, S. 1350–1354
- [Salanga *et al.* 2009] SALANGA, C. L. ; O'HAYRE, M. ; HANDEL, T.: Modulation of chemokine receptor activity through dimerization and crosstalk. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (2009), Apr, Nr. 8, S. 1370–1386
- [Sambrook und Russel 2001] SAMBROOK, J. ; RUSSEL, D. W.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd. 2001
- [Sanger *et al.* 1992] SANGER, F. ; NICKLEN, S. ; COULSON, A. R. ; SANGER, F. ; NICKLEN, S. ; COULSON, A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. In: *Biotechnology* 24 (1992), S. 104–108
- [Sata *et al.* 2000] SATA, M. ; MAEJIMA, Y. ; ADACHI, F. ; FUKINO, K. ; SAIURA, A. ; SUGIURA, S. ; AOYAGI, T. ; IMAI, Y. ; KURIHARA, H. ; KIMURA, K. ; OMATA, M. ; MAKUUCHI, M. ; HIRATA, Y. ; NAGAI, R.: A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia. In: *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32 (2000), Nov, S. 2097–2104
- [Sata *et al.* 2002] SATA, M. ; SAIURA, A. ; KUNISATO, A. ; TOJO, A. ; OKADA, S. ; TOKUHISA, T. ; HIRAI, H. ; MAKUUCHI, M. ; HIRATA, Y. ; NAGAI, R.: Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. In: *Nat. Med.* 8 (2002), Apr, Nr. 4, S. 403–409
- [Satish *et al.* 2005] SATISH, L. ; BLAIR, H. C. ; GLADING, A. ; WELLS, A.: Interferon-inducible protein 9 (CXCL11)-induced cell motility in keratinocytes requires calcium flux-dependent activation of mu-calpain. In: *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005), Mar, Nr. 5, S. 1922–1941
- [Schneider *et al.* 1977] SCHNEIDER, U. ; SCHWENK, H. U. ; BORNKAMM, G.: cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. In: *Int. J. Cancer* 19 (1977), May, S. 621–626
- [Scholten *et al.* 2012] SCHOLTEN, D. J. ; CANALS, M. ; MAUSSANG, D. ; ROUMEN, L. ; SMIT, M. J. ; WIJTMANS, M. ; GRAAF, C. de ; VISCHER, H. F. ; LEURS, R.: Pharmacological modulation of chemokine receptor function. In: *Br. J. Pharmacol.* 165 (2012), Mar, Nr. 6, S. 1617–1643

- [Schriner *et al.* 2005] SCHRINER, S. E. ; LINFORD, N. J. ; MARTIN, G. M. ; TREUTING, P. ; OGBURN, C. E. ; EMOND, M. ; COSKUN, P. E. ; LADIGES, W. ; WOLF, N. ; VAN REMMEN, H. ; WALLACE, D. C. ; RABINOVITCH, P. S.: Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. In: *Science* 308 (2005), Jun, Nr. 5730, S. 1909–1911
- [Schulz *et al.* 2010] SCHULZ, K. ; RUTZ, C. ; WESTENDORF, C. ; RIDELIS, I. ; VOGELBEIN, S. ; FURKERT, J. ; SCHMIDT, A. ; WIESNER, B. ; SCHULEIN, R.: The pseudo signal peptide of the corticotropin-releasing factor receptor type 2a decreases receptor expression and prevents Gi-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity. In: *J. Biol. Chem.* 285 (2010), Oct, Nr. 43, S. 32878–32887
- [Schwartz und Henry 2002] SCHWARTZ, R. S. ; HENRY, T. D.: Pathophysiology of coronary artery restenosis. In: *Rev Cardiovasc Med* 3 Suppl 5 (2002), S. 4–9
- [Sehgal 2003] SEHGAL, S. N.: Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. In: *Transplant. Proc.* 35 (2003), May, Nr. 3 Suppl, S. 7S–14S
- [Serruys *et al.* 1994] SERRUYS, P. W. ; JAEGERE, P. de ; KIEMENEIJ, F. ; MACAYA, C. ; RUTSCH, W. ; HEYNDRIKX, G. ; EMANUELSSON, H. ; MARCO, J. ; LEGRAND, V. ; MATERNE, P.: A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. In: *N. Engl. J. Med.* 331 (1994), Aug, Nr. 8, S. 489–495
- [Shimomura *et al.* 1962] SHIMOMURA, O. ; JOHNSON, F. H. ; SAIGA, Y.: Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. In: *J Cell Comp Physiol* 59 (1962), Jun, S. 223–239
- [Shuman 1994] SHUMAN, S.: Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. In: *J. Biol. Chem.* 269 (1994), Dec, S. 32678–32684
- [Smith und Milligan 2010] SMITH, N. J. ; MILLIGAN, G.: Allostery at G protein-coupled receptor homo- and heteromers: uncharted pharmacological landscapes. In: *Pharmacol. Rev.* 62 (2010), Dec, Nr. 4, S. 701–725
- [Southern 1975] SOUTHERN, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. In: *J. Mol. Biol.* 98 (1975), Nov, S. 503–517
- [Souza *et al.* 2000] SOUZA, H. P. ; SOUZA, L. C. ; ANASTACIO, V. M. ; PEREIRA, A. C. ; JUNQUEIRA, M. L. ; KRIEGER, J. E. ; LUZ, P. L. ; AUGUSTO, O. ; LAURINDO, F. R.: Vascular oxidant stress early after balloon injury: evidence for increased NAD(P)H oxidoreductase activity. In: *Free Radic. Biol. Med.* 28 (2000), Apr, Nr. 8, S. 1232–1242
- [Strieter *et al.* 2002] STRIETER, R. M. ; BELPERIO, J. A. ; KEANE, M. P.: CXC chemokines in angiogenesis related to pulmonary fibrosis. In: *Chest* 122 (2002), Dec, Nr. 6 Suppl, S. 298S–301S
- [Strieter *et al.* 2005] STRIETER, R. M. ; BURDICK, M. D. ; GOMPERS, B. N. ; BELPERIO, J. A. ; KEANE, M. P.: CXC chemokines in angiogenesis. In: *Cytokine Growth Factor Rev.* 16 (2005), Dec, Nr. 6, S. 593–609
- [Strieter *et al.* 1995] STRIETER, R. M. ; POLVERINI, P. J. ; KUNKEL, S. L. ; ARENBERG, D. A. ; BURDICK, M. D. ; KASPER, J. ; DZUIBA, J. ; VAN DAMME, J. ; WALZ, A. ; MARRIOTT, D.: The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. In: *J. Biol. Chem.* 270 (1995), Nov, Nr. 45, S. 27348–27357
- [Stringer und Gallagher 1997] STRINGER, S. E. ; GALLAGHER, J. T.: Specific binding of the chemokine platelet factor 4 to heparan sulfate. In: *J. Biol. Chem.* 272 (1997), Aug, Nr. 33, S. 20508–20514
- [Stryer 1978] STRYER, L.: Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. In: *Annu. Rev. Biochem.* 47 (1978), S. 819–846
- [Stryer und Haugland 1967] STRYER, L. ; HAUGLAND, R. P.: Energy transfer: a spectroscopic ruler. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 58 (1967), Aug, S. 719–726
- [Suzuki *et al.* 2007] SUZUKI, K. ; KAWAUCHI, Y. ; PALANIYANDI, S. S. ; VEERAVEEDU, P. T. ; FUJII, M. ; YAMAGIWA, S. ; YONEYAMA, H. ; HAN, G. D. ; KAWACHI, H. ; OKADA, Y. ; AJIOKA, Y. ; WATANABE, K. ; HOSONO, M. ; ASAKURA, H. ; AOYAGI, Y. ; NARUMI, S.: Blockade of interferon-gamma-inducible protein-10 attenuates chronic experimental colitis by blocking cellular trafficking and protecting intestinal epithelial cells. In: *Pathol. Int.* 57 (2007), Jul, Nr. 7, S. 413–420

- [Suzuki *et al.* 2011] SUZUKI, M. ; ENDO, M. ; SHINOHARA, F. ; ECHIGO, S. ; RIKIISHI, H.: Rapamycin suppresses ROS-dependent apoptosis caused by selenomethionine in A549 lung carcinoma cells. In: *Cancer Chemother. Pharmacol.* 67 (2011), May, Nr. 5, S. 1129–1136
- [Takahama *et al.* 1998] TAKAHAMA, Y. ; OHISHI, K. ; TOKORO, Y. ; SUGAWARA, T. ; YOSHIMURA, Y. ; OKABE, M. ; KINOSHITA, T. ; TAKEDA, J.: Functional competence of T cells in the absence of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins caused by T cell-specific disruption of the *Pig-a* gene. In: *Eur. J. Immunol.* 28 (1998), Jul, Nr. 7, S. 2159–2166
- [Teichmann *et al.* 2012] TEICHMANN, A. ; RUTZ, C. ; KREUCHWIG, A. ; KRAUSE, G. ; WIESNER, B. ; SCHULEIN, R.: The pseudo signal peptide of the corticotropin-releasing factor receptor type 2A prevents receptor oligomerization. In: *J Biol Chem* (2012), Jun
- [Terada *et al.* 1993] TERADA, N. ; LUCAS, J. J. ; SZEPESI, A. ; FRANKLIN, R. A. ; DOMENICO, J. ; GELFAND, E. W.: Rapamycin blocks cell cycle progression of activated T cells prior to events characteristic of the middle to late G1 phase of the cycle. In: *J. Cell. Physiol.* 154 (1993), Jan, Nr. 1, S. 7–15
- [Terrillon und Bouvier 2004] TERRILLON, S. ; BOUVIER, M.: Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. In: *EMBO Rep.* 5 (2004), Jan, Nr. 1, S. 30–34
- [Terrillon *et al.* 2003] TERRILLON, S. ; DURROUX, T. ; MOUILLAC, B. ; BREIT, A. ; AYOUB, M. A. ; TAULAN, M. ; JOCKERS, R. ; BARBERIS, C. ; BOUVIER, M.: Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. In: *Mol. Endocrinol.* 17 (2003), Apr, Nr. 4, S. 677–691
- [The UniProt Consortium 2011] THE UNIPROT CONSORTIUM: Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). In: *Nucl. Acids Res.* 40 (2011), Oct, Nr. D1, S. D71–D75
- [Thelen *et al.* 2010] THELEN, M. ; MUNOZ, L. M. ; RODRIGUEZ-FRADE, J. M. ; MELLADO, M.: Chemokine receptor oligomerization: functional considerations. In: *Curr Opin Pharmacol* 10 (2010), Feb, Nr. 1, S. 38–43
- [Thomas und Capecchi 1987] THOMAS, K. R. ; CAPECCHI, M. R.: Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. In: *Cell* 51 (1987), Nov, Nr. 3, S. 503–512
- [Tsien 1998] TSIEN, R. Y.: The green fluorescent protein. In: *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998), S. 509–544
- [Tsikas *et al.* 1998] TSIKAS, D. ; SANDMANN, J. ; IKIC, M. ; FAULER, J. ; STICHTENOTH, D. O. ; FROLICH, J. C.: Analysis of cysteine and N-acetylcysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography at the basal state and after oral administration of N-acetylcysteine. In: *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 708 (1998), Apr, Nr. 1-2, S. 55–60
- [Ulvmar *et al.* 2011] ULVMAR, M. H. ; HUB, E. ; ROT, A.: Atypical chemokine receptors. In: *Exp. Cell Res.* 317 (2011), Mar, Nr. 5, S. 556–568
- [Versari *et al.* 2007] VERSARI, D. ; LERMAN, L. O. ; LERMAN, A.: The importance of reendothelialization after arterial injury. In: *Curr. Pharm. Des.* 13 (2007), Nr. 17, S. 1811–1824
- [Vezina *et al.* 1975] VEZINA, C. ; KUDELSKI, A. ; SEHGAL, S. N.: Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. In: *J. Antibiot.* 28 (1975), Oct, Nr. 10, S. 721–726
- [Vila-Coro *et al.* 1999] VILA-CORO, A. J. ; RODRIGUEZ-FRADE, J. M. ; MARTIN DE ANA, A. ; MORENO-ORTIZ, M. C. ; MARTINEZ-A, C. ; MELLADO, M.: The chemokine SDF-1 α triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. In: *FASEB J.* 13 (1999), Oct, Nr. 13, S. 1699–1710
- [Virmani und Farb 1999] VIRMANI, R. ; FARB, A.: Pathology of in-stent restenosis. In: *Curr. Opin. Lipidol.* 10 (1999), Dec, Nr. 6, S. 499–506
- [Walter *et al.* 2002] WALTER, D. H. ; RITTIG, K. ; BAHLMANN, F. H. ; KIRCHMAIR, R. ; SILVER, M. ; MURAYAMA, T. ; NISHIMURA, H. ; LOSORDO, D. W. ; ASAHARA, T. ; ISNER, J. M.: Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. In: *Circulation* 105 (2002), Jun, Nr. 25, S. 3017–3024

- [Wang und Norcross 2008] WANG, J. ; NORCROSS, M.: Dimerization of chemokine receptors in living cells: key to receptor function and novel targets for therapy. In: *Drug Discov. Today* 13 (2008), Jul, Nr. 13-14, S. 625–632
- [van Wanrooij *et al.* 2008] WANROOIJ, E. J. ; JAGER, S. C. ; ES, T. van ; VOS, P. de ; BIRCH, H. L. ; OWEN, D. A. ; WATSON, R. J. ; BIESSEN, E. A. ; CHAPMAN, G. A. ; BERKEL, T. J. ; KUIPER, J.: CXCR3 antagonist NBI-74330 attenuates atherosclerotic plaque formation in LDL receptor-deficient mice. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28 (2008), Feb, Nr. 2, S. 251–257
- [Ward *et al.* 2000] WARD, M. R. ; PASTERKAMP, G. ; YEUNG, A. C. ; BORST, C.: Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications. In: *Circulation* 102 (2000), Sep, Nr. 10, S. 1186–1191
- [Werner *et al.* 2002] WERNER, N. ; PRILLER, J. ; LAUFS, U. ; ENDRES, M. ; BOHM, M. ; DIRNAGL, U. ; NICKENIG, G.: Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22 (2002), Oct, Nr. 10, S. 1567–1572
- [Wouters *et al.* 2001] WOUTERS, F. S. ; VERVEER, P. J. ; BASTIAENS, P. I.: Imaging biochemistry inside cells. In: *Trends Cell Biol.* 11 (2001), May, S. 203–211
- [Xie *et al.* 2003] XIE, J. H. ; NOMURA, N. ; LU, M. ; CHEN, S. L. ; KOCH, G. E. ; WENG, Y. ; ROSA, R. ; DI SALVO, J. ; MUDGETT, J. ; PETERSON, L. B. ; WICKER, L. S. ; DEMARTINO, J. A.: Antibody-mediated blockade of the CXCR3 chemokine receptor results in diminished recruitment of T helper 1 cells into sites of inflammation. In: *J. Leukoc. Biol.* 73 (2003), Jun, Nr. 6, S. 771–780
- [Yasukawa *et al.* 1997] YASUKAWA, H. ; IMAIZUMI, T. ; MATSUOKA, H. ; NAKASHIMA, A. ; MORIMATSU, M.: Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury by antibodies to intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1. In: *Circulation* 95 (1997), Mar, Nr. 6, S. 1515–1522
- [Yates-Binder *et al.* 2012] YATES-BINDER, C. C. ; RODGERS, M. ; JAYNES, J. ; WELLS, A. ; BODNAR, R. J. ; TURNER, T.: An IP-10 (CXCL10)-Derived Peptide Inhibits Angiogenesis. In: *PLoS ONE* 7 (2012), Nr. 7, S. e40812
- [Yokote *et al.* 2003] YOKOTE, K. ; TAKE, A. ; NAKASEKO, C. ; KOBAYASHI, K. ; FUJIMOTO, M. ; KAWAMURA, H. ; MAEZAWA, Y. ; NISHIMURA, M. ; MORI, S. ; SAITO, Y.: Bone marrow-derived vascular cells in response to injury. In: *J. Atheroscler. Thromb.* 10 (2003), Nr. 4, S. 205–210
- [Zernecke *et al.* 2005] ZERNECKE, A. ; SCHOBER, A. ; BOT, I. ; HUNDELSHAUSEN, P. von ; LIEHN, E. A. ; MOPPS, B. ; MERICKSKAY, M. ; GIERSCHIK, P. ; BIESSEN, E. A. ; WEBER, C.: SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. In: *Circ. Res.* 96 (2005), Apr, Nr. 7, S. 784–791
- [Zhang *et al.* 2005] ZHANG, H. M. ; YUAN, J. ; CHEUNG, P. ; CHAU, D. ; WONG, B. W. ; MCMANUS, B. M. ; YANG, D.: Gamma interferon-inducible protein 10 induces HeLa cell apoptosis through a p53-dependent pathway initiated by suppression of human papillomavirus type 18 E6 and E7 expression. In: *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005), Jul, Nr. 14, S. 6247–6258
- [Zhao *et al.* 2002] ZHAO, D. X. ; HU, Y. ; MILLER, G. G. ; LUSTER, A. D. ; MITCHELL, R. N. ; LIBBY, P.: Differential expression of the IFN-gamma-inducible CXCR3-binding chemokines, IFN-inducible protein 10, monokine induced by IFN, and IFN-inducible T cell alpha chemoattractant in human cardiac allografts: association with cardiac allograft vasculopathy and acute rejection. In: *J. Immunol.* 169 (2002), Aug, Nr. 3, S. 1556–1560
- [Zidar 2011] ZIDAR, D. A.: Endogenous ligand bias by chemokines: implications at the front lines of infection and leukocyte trafficking. In: *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 11 (2011), Jun, Nr. 2, S. 120–131
- [Ziegler-Heitbrock *et al.* 1988] ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. ; THIEL, E. ; FUTTERER, A. ; HERZOG, V. ; WIRTZ, A. ; RIETHMULLER, G.: Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. In: *Int. J. Cancer* 41 (1988), Mar, S. 456–461
- [Zlotnik und Yoshie 2000] ZLOTNIK, A. ; YOSHIE, O.: Chemokines: a new classification system and their role in immunity. In: *Immunity* 12 (2000), Feb, Nr. 2, S. 121–127
- [Zohlhofer *et al.* 2001a] ZOHLHOFER, D. ; KLEIN, C. A. ; RICHTER, T. ; BRANDL, R. ; MURR, A. ; NUHRENBURG, T. ; SCHOMIG, A. ; BAEUERLE, P. A. ; NEUMANN, F. J.: Gene expression profiling of human stent-induced neointima by cDNA array analysis of microscopic specimens retrieved by helix cutter atherectomy: Detection of FK506-binding protein 12 upregulation. In: *Circulation* 103 (2001), Mar, Nr. 10, S. 1396–1402

- [Zohlhofer *et al.* 2001b] ZOHLNHOFER, D. ; RICHTER, T. ; NEUMANN, F. ; NUHRENBURG, T. ; WESSELY, R. ; BRANDL, R. ; MURR, A. ; KLEIN, C. A. ; BAEUERLE, P. A.: Transcriptome analysis reveals a role of interferon-gamma in human neointima formation. In: *Mol. Cell* 7 (2001), May, Nr. 5, S. 1059–1069
- [Zoncu *et al.* 2011] ZONCU, R. ; EFEYAN, A. ; SABATINI, D. M.: mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12 (2011), Jan, Nr. 1, S. 21–35
- [Zuojun *et al.* 2012] ZUOJUN, H. ; LINGYU, H. ; WEI, H. ; HENGHUI, Y. ; CHONGGANG, Z. ; JINGSONG, W. ; MIAN, W. ; YONG, L. ; SHENMING, W.: Interference of IP-10 expression inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and intimal hyperplasia in carotid artery: a new insight in the prevention of restenosis. In: *Cell Biochem. Biophys.* 62 (2012), Jan, Nr. 1, S. 125–135

Tabellenverzeichnis

2.1	Oligonukleotide	19
2.2	Verwendete Vektoren	21
2.2	Verwendete Vektoren	22
2.3	Generierte Vektoren	22
2.4	Antikörper	24
2.5	Eukaryotische Zelllinien	25
4.1	Zusammenfassung der FRET-Daten	84
5.1	Posttranslationale Modifikationen	93

Abbildungsverzeichnis

1.1	Aufbau von Arterien	5
1.2	Atherosklerose und Herzinfarkt	7
1.3	NAC, TEMPOL und MitoTEMPO	11
1.4	Chemokine und Chemokinrezeptoren	13
1.5	CXCR3-Chemokinsystem	15
1.6	Rapamycin	16
3.1	Vektorkarte pBluescript loxP_Neo/TK_loxP	34
3.2	Schematische Darstellung der FRET-Messungen	43
3.3	Schematische Darstellung des murinen Femoralisverletzungsmodells	50
4.1	Morphometrische Analyse der Femoralarterien	54
4.2	Morphometrische Analyse verletzter Gefäße unter Einfluss von MitoTEMPO, NAC bzw. RAD001	55
4.3	Einfluss von MitoTEMPO, NAC bzw. RAD001 auf die Rekrutierung Mac-2 positiver Zellen zum Ort der Gefäßverletzung	56
4.4	CD3 positive Zellen in verletzten Gefäßen unter Einfluss von MitoTEMPO, NAC bzw. RAD001	57
4.5	Einfluss von MitoTEMPO, NAC bzw. RAD001 auf die Apoptose verletzter Gefäße	58
4.6	Genotypisierung der CXCL11 Sequenz in CXCL10 ^{-/-} Mäusen	59
4.7	Morphometrische Analyse der Neointimabildung in CXCL10 defizienten Mäusen	60
4.8	Einfluss der CXCL10 Defizienz auf die Rekrutierung Mac-2 positiver Zellen zum Ort der Gefäßverletzung	62
4.9	Einfluss der CXCL10 Defizienz auf die Rekrutierung CD positiver Zellen zum Ort der Gefäßverletzung	63
4.10	Einfluss der CXCL10 Defizienz auf die Apoptose in verletzten Gefäßen	64
4.11	Einfluss der CXCL10 Defizienz auf die Proliferation am Ort der Gefäßverletzung	65
4.12	Einfluss der CXCL10 Defizienz auf die Reendothelialisierung	66
4.13	Strategie zur konditionellen CXCR3 Deletion	69
4.14	<i>In vitro</i> Cre-Rekombination	70
4.15	Southern-Blot-Analyse homolog rekombinierter ES-Zellklone	71
4.16	Sequenzanalyse der ES-Zellklone	72

4.17 Schematische Darstellung der Klonierung von Expressionsvektoren	74
4.18 Western-Blot-Analyse des GFP- und Flag-gekoppelten CXCR3A und -B	75
4.19 Transiente Co-Expression von CXCR3A, CXCR3B, CXCR4 oder CRF2aR mit ER- Marker in HEK293T-Zellen	76
4.20 Co-Immunpräzipitation von CXCR3A- und CXCR3B-Homodimeren	78
4.21 Co-Immunpräzipitation von CXCR3A- und CXCR3B-Heterodimeren	79
4.22 Co-Immunpräzipitation von CXCR3A- bzw. CXCR3B-Heterodimeren mit anderen GPCR	80
4.23 FRET Messung der Kontrollen	81
4.24 FRET Messung von CXCR3A-CFP/CXCR3A-YFP und CXCR3A-CFP/CXCR3B- YFP	83

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dietlind Zohlhöfer-Momm für die Bereitstellung des Themas und die herzliche Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Gerhard Püschel danke ich sehr für die freundliche und stets hilfsbereite Betreuung und die Übernahme der Arbeit an die Mathematisch- Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Potsdam.

Ich danke Constatntin Rüder und Tobias Haase für die intensive Betreuung meiner Arbeit, die mir zu jeder Zeit beratend zu Seite standen.

Für die Hilfe bei den tierexperimentellen Arbeiten danke ich ebenfalls Tobias Haase, sowie Nicole Langwieser.

Den Tierpflegern des FEM danke ich für die Versorgung und Pflege der Mäuse.

Jan Peter und Robert Henze-Kersten danke ich für die technische Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Für die Aufnahmen am Laser-Scanning-Mikroskop danke ich ganz herzlich Anke Teichmann und Ralph Schülein.

Meiner Familie und besonders meinen Eltern danke ich für die selbstlose Unterstützung und den Rückhalt auf all meinen Wegen.

Ganz besonders danke ich Rico dafür, dass er mich liebt und immer für mich da ist.

