

Aus der Poliklinik für Rheumatologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Schneider

Expression von humanem Alpha s1-Casein in Leukozyten und  
leukozytären Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Paul Robert Roenick

2016

„Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Schneider

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Tim Lögters

*„Für meine Familie“*

## Zusammenfassung

Caseine sind als bedeutender Proteinbestandteil der Milch ein wichtiger Lieferant von Aminosäuren und unterstützen die Calcium-Aufnahme. Neben der nutritiven Funktion wurden eine Reihe immunmodulatorischer Eigenschaften beschrieben. Aufgrund der Aminosäure-Struktur und des elektrophoretischen Verhaltens werden verschiedene Caseine unterschieden. Humanes Casein Alpha S1 (CSN1S1) wurde in pathologisch veränderten Geweben und Sekreten nachgewiesen, ein immunregulatorischer Einfluss wurde belegt. Dies führte zu der Hypothese, dass neben der laktierenden Mamma, die lange Zeit als einziger Expressionsort galt, noch weitere Expressionsorte existieren. Ziel dieser Forschungsarbeit war es daher, zu ermitteln, ob humane Leukozyten und leukozytäre Zellen CSN1S1 exprimieren und sezernieren und welche Leukozyten für die Produktion verantwortlich sind.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden mononukleäre Zellen aus peripherem Blut mittels Polymorphprep-Gradient isoliert. Einzelne Leukozyten-Subpopulationen wurden anschließend durch MACS-Isolierung selektioniert. Zusätzlich wurden die humanen monozytären Tumor-Zelllinien HL60, MM6, THP1 und U937 mittels Zellkultur angezüchtet. Die RNA der verschiedenen Zell-Typen wurde extrahiert, revers transkribiert und anschließend eine *real-time* RT-PCR zur CSN1S1-mRNA-Quantifizierung durchgeführt. Im Anschluss wurde aus den Überständen der Zellkultur sowie der monozytären Zellen die Proteinsekretion mittels *Sandwich*-ELISA bestimmt. In einer weiteren Versuchsreihe wurde versucht, ein schnelles und spezifisches Flow-Fish-Verfahren, auf der Basis einer Kopplung von *in-situ*-Hybridisierung mit einer Casein-Gen-Sonde und Durchflusszytometrie zum CSN1S1-Nachweis in Vollblutproben zu etablieren.

Es gelang mittels *real-time* RT-PCR der CSN1S1-mRNA-Nachweis für Monozyten und T-Zellen. Die mRNA-Menge unterlag dabei interindividuellen Schwankungen. Potentielle Erklärungen für diese Varianz sind physiologische oder regulatorische Eigenschaften sowie eine Aktivierung der Zellen. Für alle leukozytären Zelllinien, außer MM6, konnte ebenfalls mRNA nachgewiesen werden. Mit dem durchgeführten CSN1S1-*Sandwich*-ELISA gelang es, für Monozyten und die leukozytären Zelllinien HL60 und U937 das Protein zu detektieren. Auffallend war, dass für T-Lymphozyten und THP1-Zellen kein Protein-Nachweis gelang, obwohl zuvor eine CSN1S1-mRNA-Expression mittels PCR gefunden werden konnte. Mögliche Erklärungen dafür sind, dass diese Zellen das Protein nicht sezernieren oder die Sensitivität des verwendeten ELISA nicht ausreichend sensitiv ist. Die Ergebnisse für den CSN1S1-Expressions-Nachweis anhand des neu etablierten Flow-Fish-Verfahrens waren unspezifisch. Die Sonden interagieren vermutlich unspezifisch mit bisher ungeklärten Strukturen wie beispielsweise RNA, DNA oder Proteinen, was zu falsch positiven Ergebnissen führte.

Der Nachweis, dass Leukozyten CSN1S1 exprimieren und sezernieren, wirft die Frage nach der Funktionalität dieses Proteins für das Immunsystem auf. Die weiterführende Identifizierung des Rezeptors und der Signalkaskade sind dafür von großer Bedeutung und ein Ziel weiterer Forschungen. Die in dieser Arbeit beschriebenen Verfahren können für die Identifizierung der CSN1S1-Expression in weiteren Geweben herangezogen werden.

## Verzeichnis der Abkürzungen

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ACE</b>	<i>Angiotensin-converting enzyme</i>
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>Aqua dest.</b>	Aqua destillata
<b>BPH</b>	benigne Prostatahyperplasie
<b>CD</b>	<i>cluster of differentiation</i>
<b>CMP</b>	<i>cow milk Protein</i>
<b>CPP</b>	Caseinophosphopeptid
<b>CSN1S1</b>	Casein $\alpha$ s1
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
<b>Fish</b>	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
<b>FITC</b>	Fluoreszeinisothiozyanat
<b>FL</b>	<i>fluorescence labels</i>
<b>FPLC</b>	<i>fast protein liquid chromatography</i>
<b>FSC</b>	<i>forward scatter</i>
<b>fw</b>	<i>forward</i>
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
<b>GM-CSF</b>	<i>granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor</i>
<b>G-CSF</b>	<i>granulocyte-colony-stimulating factor</i>
<b>HRP</b>	<i>horseradish-peroxidase</i>
<b>kb</b>	Kilo-Basenpaare (1000 Basenpaare)

<b>LADA</b>	<i>latent autoimmune diabetes in adults</i>
<b>LCA</b>	<i>leucocyte common antigen</i>
<b>PE</b>	Phycoerythrin
<b>PMNs</b>	polymorphnukleäre Zellen
<b>MNCs</b>	mononukleäre Zellen
<b>MACS</b>	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
<b>MS</b>	Multiple Sklerose
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>PGE2</b>	Prostaglandin E2
<b>rpm</b>	<i>rounds per minute</i>
<b>RT-PCR</b>	<i>real-time two-steps</i> Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
<b>rv</b>	<i>reverse</i>
<b>SDS-PAGE</b>	<i>polyacrylamide gradient gel electrophoresis</i>
<b>SLE</b>	Systemischer Lupus erythematoses
<b>SRBCs</b>	<i>sheep red blood cells</i>
<b>SSC</b>	<i>sideward scatter</i>
<b>SSC-Puffer</b>	<i>saline-sodium citrate buffer</i>
<b>Tubes</b>	Eppendorf <i>Safe-Lock Tubes</i>

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Einführung	1
1.2	Die verschiedenen Caseine	1
1.2.1	Übersicht	1
1.2.2	Zusammensetzung der bovinen Caseine	2
1.2.3	Zusammensetzung der humanen Caseine	3
1.3	Casein-Gene	4
1.4	Funktionen der tierischen Caseine	5
1.4.1	Bioaktive Peptide und ihre Wirkung	5
1.4.2	Einfluss auf das Immunsystem	6
1.5	Funktionen der humanen Caseine	7
1.6	Produktionsort der Caseine	7
1.6.1	CSN1S1-Expression und Wirkung	8
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>11</b>
3.1	Probanden	11
3.2	Herstellen von Zellpopulationen aus peripherem Blut	11
3.2.1	Übersicht	11
3.2.2	Separation von MNCs per Polymorphprep-Gradient	11
3.2.3	MACS - Isolation der mononukleären Zellen	12
3.2.4	Lagerung der MNCs	14
3.3	Zellkultur der Tumorzelllinien	14
3.3.1	Übersicht	14
3.4	RNA-Extraktion	16
3.4.1	Übersicht	16
3.4.2	Isolation der RNA	16
3.4.3	DNase Behandlung der Probe	16
3.4.4	Waschen und Eluierung der RNA	16
3.5	cDNA Synthese	17
3.5.1	Übersicht	17
3.5.2	Reverse Transkription	17

<b>3.6</b>	<b>Real-time RT-PCR</b> .....	<b>19</b>
3.6.1	Übersicht .....	19
3.6.2	Primer-Paare und Referenz-Gen .....	19
3.6.3	Herstellen des <i>Master Mixes</i> und Vorbereitung der PCR .....	20
3.6.4	Ablauf der PCR .....	21
3.6.5	Relative Quantifizierung .....	22
<b>3.7</b>	<b>ELISA</b> .....	<b>23</b>
3.7.1	Übersicht .....	23
3.7.2	Durchführung .....	23
<b>3.8</b>	<b>Flow-Fish</b> .....	<b>27</b>
3.8.1	Übersicht .....	27
3.8.2	Separation der CD14-positiven Monozyten .....	28
3.8.3	Fixierung der isolierten Zellen .....	28
3.8.4	RNase-Behandlung .....	29
3.8.5	<i>In-situ</i> -Hybridisierung .....	30
<b>3.9</b>	<b>Durchflusszytometrie</b> .....	<b>34</b>
3.9.1	Übersicht .....	34
3.9.2	Vorbereitung der Proben und Färbung fürs FACS .....	34
3.9.3	FACS-Messung .....	35
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>CSN1S1-mRNA-Expression</b> .....	<b>38</b>
4.1.1	CSN1S1 Detektion in Leukozyten .....	38
4.1.2	CSN1S1 Detektion in leukozytären Tumorzelllinien .....	40
<b>4.2</b>	<b>CSN1S1 Protein-Sekretion</b> .....	<b>41</b>
4.2.1	CSN1S1 Protein-Sekretion von Leukozyten .....	41
4.2.2	CSN1S1 Protein-Sekretion von leukozytären Tumorzelllinien .....	42
<b>4.3</b>	<b>Flow-Fish: Versuch der Etablierung eines CSN1S1-Nachweises</b> .....	<b>43</b>
4.3.1	Detektion der Reinheit der CD14-positiven Zellpopulation mittels FACS .....	43
4.3.2	Die Gen-Expression von CSN1S1 und GAPDH CD14-positiver Zellen nach <i>in-situ</i> -Hybridisierung .....	45
4.3.3	Die Gen-Expression von CSN1S1 und GAPDH in HL60-Zellen nach Hybridisierung .....	47
4.3.4	Die Gen-Expression von CSN1S1 und GAPDH in MM6-Zellen nach <i>in-situ</i> -Hybridisierung .....	49
4.3.5	Wechselwirkungen der CSN1S1 <i>anti-sense</i> -Sonde und der CSN1S1 Block-Sonde. ....	51

4.3.6	Interaktionen der GAPDH <i>anti-sense</i> -Sonde und der CSN1S1 Block-Sonde .....	53
4.3.6.1	RNase-Behandlung zur Überprüfung unspezifischer Bindungen der CSN1S1 Sonde .....	55
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>57</b>
5.1	Übersicht .....	57
5.2	CSN1S1-Nachweis in Leukozyten .....	57
5.3	CSN1S1-Protein-Nachweis in leukozytären Zellen .....	58
5.4	Isolierung der Zellpopulationen .....	59
5.5	CSN1S1-Nachweis mittels <i>real-time</i> RT-PCR .....	60
5.6	Protein-Nachweis mittels ELISA .....	61
5.7	Unspezifische Ergebnisse bei CSN1S1-Nachweis mittels Flow-Fish .....	64
<b>6</b>	<b>Schlussfolgerung</b> .....	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>80</b>

## Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Zellseparation mittels Polymorphprep-Gradient.....	12
Abb. 2: Flow-Fish-Versuchsablauf.....	28
Abb. 3: Emission und Absorption von ALEXA Fluor 488 und PE.....	36
Abb. 4: <i>Dotplot</i> -Diagramm SSC-Height vs. FSC-Height.....	36
Abb. 5: Histogramm CSN1S1 <i>anti-sense</i> (FL1-Height) vs. Counts.....	37
Abb. 6: CSN1S1-mRNA-Expression in Leukozyten.....	39
Abb. 7: CSN1S1-mRNA-Expression in leukozytären Zellen.....	40
Abb. 8: CSN1S1 Protein-Sekretion von Leukozyten.....	41
Abb. 9: CSN1S1 Protein-Sekretion von leukozytären Zellen.....	42
Abb. 10: Detektion der Reinheit der CD14-positiven Zellpopulation.....	44
Abb. 11: CSN1S1- und GAPDH-Gen-Expression CD14-positiver Zellen.....	46
Abb. 12: CSN1S1- und GAPDH-Gen-Expression von HL60-Zellen.....	48
Abb. 13: CSN1S1- und GAPDH-Gen-Expression von MM6-Zellen.....	50
Abb. 14: Interaktion der CSN1S1 <i>anti-sense</i> -Sonde und CSN1S1 Block-Sonde.....	52
Abb. 15: Interaktion der GAPDH <i>anti-sense</i> -Sonde und CSN1S1 Block-Sonde.....	54
Abb. 16: RNase-Behandlung zur Überprüfung unspezifischer Bindungen.....	56
Abb. 17: geplanter CSN1S1-mRNA-Nachweis.....	65
Abb. 18: Unspezifische Bindung der CSN1S1 <i>anti-sense</i> -Sonde.....	67

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung

Milchproteine machen einen wichtigen Bestandteil der menschlichen Ernährung aus [1]. Milch besteht generell aus mehreren hundert Proteinen [2], wobei die großen Fraktionen Casein- und Molke- (*whey*) Proteine unterschieden werden [2, 3]. Im schwach sauren Bereich ist das Casein der Milch unlöslich und flockt beim isoelektrischen Punkt von pH 4,6 und 20 °C aus [2, 4, 5], die restlichen Bestandteile werden Molke-Proteine genannt. Casein ist dabei der mengenmäßig größte Proteinbestandteil der Milch vieler Säugetiere und ein wichtiger Lieferant von Aminosäuren und Mineralien [4, 6-9]. Casein ist allerdings kein einheitlicher Stoff [5]. Aufgrund des elektrophoretischen Verhaltens und der Aminosäure-Struktur werden verschiedene Caseine mit mehreren Untergruppen unterschieden. Heutzutage wird den Caseinen neben der nutritiven Funktion auch zusätzlicher Einfluss auf das Immunsystem zugesprochen [10]. Im Folgenden werden die verschiedenen Caseine vorgestellt. Des Weiteren werden die genetische Abstammung, die unterschiedlichen Funktionen sowie die Forschungsarbeiten, die zu der Annahme führen, dass Casein  $\alpha$  s1 (CSN1S1) außer in den Zellen der laktierenden Mamma auch von Zellen des Immunsystems produziert wird, dargestellt.

## 1.2 Die verschiedenen Caseine

### 1.2.1 Übersicht

Bis Lindstrom-Lang et al. gezeigt haben, dass sich die Caseine bezüglich der Eigenschaft, in der Gegenwart von Calcium auszufällen, unterschieden, wurden Caseine für eine homogene Gruppe gehalten [11]. Fortan wurde zwischen Calcium-sensitiven Caseinen und -unsensitiven Caseinen unterschieden [11, 12].

Mellander wies 1939 weiterführend elektrophoretisch nach, dass bovines Casein aus drei Fraktionen besteht [4, 13]. Er bezeichnete sie als  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -Casein [5, 13]. Die schnellste Fraktion war dabei die  $\alpha$ -Fraktion, welche sich auch durch ein höheres Phosphor/Stickstoff-Verhältnis von den anderen unterschied [13]. Im Vergleich mit humaner Milch zeigten sich sehr ähnliche Eigenschaften [4]. Auch diese Fraktionen

wurden in Bezug auf ihre Eigenschaften, unter dem Einfluss von Calcium auszufallen, weiter unterteilt.

Die  $\alpha$  s1-,  $\alpha$  s2- und  $\beta$ -Caseine zählen heute zu den sensitiven, wobei das „s“ für Calcium-sensitiv steht [11, 14]. Die  $\alpha$  s1- und  $\alpha$  s2-Caseine fallen dabei bereits bei sehr geringen Calcium-Konzentrationen, die  $\beta$ -Caseine bei etwas höheren Konzentrationen aus [5]. Die  $\kappa$ -Caseine zählen zu den unsensitiven [5, 11], weil sie in der Gegenwart von Calcium nicht ausfallen.

In der Milch liegt Casein meist als Caseinkomplex oder zusammen mit Calciumphosphat in Form von Casein-Mizellen vor [4, 7, 11]. Die Calcium-sensitiven Caseine liegen dabei immer phosphoryliert vor [5], was sowohl für die Bildung der Mizellen als auch für die Bindung von Calciumionen (Calciumcaseinat), Phosphor- und Magnesiumionen von Bedeutung ist [4].

Die Calcium-unsensitiven  $\kappa$ -Caseine sind hauptsächlich für die Stabilität und Erhaltung der Mizellen verantwortlich [15]. Die Mizellen ermöglichen eine Übersättigung der Milch mit Calcium-Phosphat, um so die Mineralisierung der kalzifizierenden Gewebe zu gewährleisten [16].

Kunz et al. etablierten 1990 die Methode, mittels SDS-PAGGE (*polyacrylamide gradient gel electrophoresis*) und FPLC (*fast protein liquid anion-exchange chromatography*) die Casein-Bestandteile der humanen Milch quantitativ zu analysieren und zu separieren [17, 18].

Des Weiteren muss zwischen humanem und tierischem Casein unterschieden werden, da die Zusammensetzung zwischen den Spezies variiert [2, 19].

### **1.2.2 Zusammensetzung der bovinen Caseine**

Frische Kuhmilch besteht zu etwa 3% aus Proteinen [20]. Casein macht dabei etwa 80% des Milcheiweißes aus [8, 20] und ist somit ein wichtiger Aminosäure-Lieferant [3, 21]. Bovines Casein besteht aus verschiedenen Proteinen. Die Hauptfraktionen bilden mit ca. 45%  $\alpha$  s1 und s2-, 30%  $\beta$ - und 15%  $\kappa$ -Casein [5, 7, 8, 11, 19]. Die restlichen 10 % enthalten sonstige geringere Bestandteile wie beispielsweise  $\gamma$ -Casein und Casein-Glycomacropptide [7, 8]. 1984 schlug die *Dairy Science Association Committee on Nomenclature and Classification* vor, die Klassifikation in  $\alpha$  s1-,  $\alpha$  s2-,  $\beta$ - und  $\kappa$ -Casein auch für die Untersuchung der Milchproteine weiterer Spezies zu verwenden, um so eine bessere Vergleichbarkeit zu ermöglichen [11].

### 1.2.3 Zusammensetzung der humanen Caseine

Humanes Casein macht ca. 40% der Proteine der menschlichen Milch aus und hat eine andere Zusammensetzung als das tierische (siehe Übersicht der Casein-Zusammensetzung der bovinen und humanen Milch) [11, 22, 23]. Dabei ist zu beachten, dass die Konzentrationen interindividuellen und täglichen Schwankungen unterlegen sind [2].

#### Casein-Zusammensetzung der bovinen und humanen Milch

	bovine Milch (%)	humane Milch (%)	Quelle
<b><math>\alpha</math>-Casein (s1, s2)</b>	45	10	[4, 19]
<b><math>\beta</math>-Casein</b>	30	50	[4, 19]
<b><math>\kappa</math>-Casein</b>	15	20	[4, 19]
<b>weitere Bestandteile</b>	10	20	[4, 19]

Besonders die humane Milch verändert ihre Zusammensetzung im Laufe der Stillperiode [2, 18]. Bezüglich des Bedarfs des Säuglings steigt dabei der Casein-Anteil mit der Dauer der Laktation [17].

Früher war man der Auffassung, dass das humane Casein nur aus den  $\beta$ - und  $\kappa$ -Fraktionen bestehen würde [24]. 1994 konnte allerdings von Cavaletto et al. sowie Rasmussen et al. (1995) mit Hilfe der Ultrazentrifuge oder der Säure-Präzipitation humanes Casein  $\alpha$  s1 (CSN1S1) isoliert werden [15, 24]. Es zeichnete sich dabei durch höhere Mobilität in der SDS-PAGE und großer Ähnlichkeit zu CSN1S1 anderer Spezies aus [24].

CSN1S1 liegt in der humanen Milch als Heteropolymer vor, wobei es durch Disulfidbrücken mit  $\kappa$ -Casein verbunden ist [16]. Es gilt als sogenanntes *disordered* Protein [25, 26], was sich auf seine undefinierte Sekundär- und Tertiär-Struktur bezieht [14]. Ein Merkmal, das oft mit Multifunktionalität einhergeht [25]. Das hydrophobe Protein besitzt beispielsweise Chaperon-ähnliche Funktionen und verhindert und schützt vor der Bildung von unlöslichen Aggregaten [14].

### 1.3 Casein-Gene

Die Caseine bilden eine Gruppe von sich stark unterscheidenden Proteinen [16], die allerdings einen gemeinsamen Ursprung haben. Abhängig von der Spezies sind die Caseine die Produkte von drei bis vier gemeinsamen Genen [11, 12, 27]. Die Gene haben sich dabei aus einem gemeinsamen Ur-Gen entwickelt [11, 28]. Die prozentuale Zusammensetzung der Caseine aus den einzelnen Fraktionen zeigt dabei Unterschiede zwischen den verschiedenen Spezies auf [11, 28]. Die Primärsequenzen der Calciumsensitiven Caseine stammen von einem gemeinsamen Ur-Gen ab [5, 11, 29] und sind sehr wahrscheinlich durch Duplizierung und Veränderung mit Hilfe von Exon-*shuffling* entstanden [16, 30]. Dabei gibt es oft Unterschiede in der AS-Sequenz kodierender Regionen, wobei jedoch die Exon-/Intron-Abgrenzung weitestgehend erhalten blieb [12].  $\kappa$ -Casein soll aufgrund von folgenden Merkmale einen eigenständigen Ursprung haben [11]: Es unterscheidet sich von den anderen Caseinen durch die Größe des Signalpeptides, die Sequenz-Eigenschaften und die Verteilung der Phosphorylierungsstellen [11].

Trotz unterschiedlicher Herkunft sind alle Caseine zusammen in einem genomischen Cluster von 250-350 kb Länge kodiert [12, 27]. Die Primärstruktur der Caseine der meisten Spezies ist dabei bekannt [31]. Die humane CSN1S1-Gen-Sequenz enthält 16 Exons und hat eine Größe von 15,5 kb [12], welche für die Primärsequenz von CSN1S1 bestehend aus 170 Aminosäuren (AS) kodiert [16]. Mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (Fish) konnten die Casein-Gene auf humanen Chromosomen kartiert werden [9]. Der Arbeitsgruppe um Kim et al. gelang es 1997, rekombinantes humanes CSN1S1 aus *E. coli* Kulturen zu isolieren [32].

Die Ähnlichkeiten in der CSN1S1 mRNA-Sequenz (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>, 10.11.14) verschiedener Spezies lassen weitere Rückschlüsse auf eine entwicklungsgeschichtliche Verwandtschaft zu [12, 16]. Evolutionär haben sich dabei Veränderungen ergeben, wobei die generelle Gen-Struktur allerdings erhalten geblieben ist [29]. Besonders die N-terminalen Sequenzen sind dabei homolog [15]. Die Übereinstimmungen sind umso ausgeprägter, je enger die phylogenetische Verwandtschaft ist [15]. So stimmen beispielweise die AS-Sequenzen von humanem (accession code NM\_001890) und bovinem CSN1S1 (X00564) zu 57,6 % überein [5, 12]. Für die  $\beta$ -Caseine verschiedener Spezies wurde auch ein weitgehender Erhalt in der Exon-Anzahl mit Unterschieden in der Exon-Länge gezeigt [12].

Es wird vermutet, dass sich die Caseine aus Genen entwickelt haben, die in die native Immunantwort involviert sind [12]. Durch adaptive Veränderungen soll so die Doppelfunktion der nutritiven und immunmodulierenden Funktion entstanden sein [12]. Die Tatsache, dass Proteine neben ihrer eigentlich Funktion, im Laufe der Evolution, weitere Funktionen aufnehmen wird heutzutage als „*protein promiscuity*“ bezeichnet [33, 34]. Die Vermutung bezüglich der Doppelfunktion beruht auf der Grundlage, dass sowohl die Casein-Gene als auch die Gene, die in die native Immunantwort involviert sind, folgende Eigenschaften besitzen: eine antimikrobielle Funktion; die Exprimierung in Mamma- und Speicheldrüsen; die Funktion, Proteine zu sezernieren, die in den Mineralhaushalt und die Immunabwehr involviert sind [12]. Dafür spricht ebenfalls, dass die Gene der Histatin/Statherin - Familie, welche antimikrobielle Eigenschaften besitzen, Teil des Casein-Gen-*Clusters* sind [12].

Neben diesen Wirkungen haben die Caseine noch weitere Funktionen. Dabei muss aufgrund der teilweise unterschiedlichen Wirkungen zwischen tierischen und humanen Caseinen unterschieden werden [1].

## **1.4 Funktionen der tierischen Caseine**

### **1.4.1 Bioaktive Peptide und ihre Wirkung**

Durch enzymatischen Verdau mittels Proteasen [35], die in der Milch oder dem Verdauungstrakt vorkommen, wird Casein verhältnismäßig leicht in Peptide bzw. Aminosäuren aufgespalten [10, 21, 23]. Es kann allerdings auch in intakter Form aufgenommen werden [7, 10]. Verschiedene Casein-Peptide, wie z.B. die bovinen Caseinophosphopeptide, werden erst durch enzymatische Proteolyse aus Vorläufer-Proteinen aktiv [36, 37]. Die Peptide haben zum Teil funktionelle oder biologische Eigenschaften, den Gesundheitszustand des Körpers zu modulieren, dabei können sie sowohl verstärkende als auch hemmende Wirkung haben [1, 23]. Sie werden deshalb auch als bioaktive Peptide bezeichnet [7, 37], wobei die Milchproteine die wichtigste Quelle darstellen [7].

Den verschiedenen bioaktiven Peptiden werden gerinnungshemmende, antihypertensive, opioide, ACE-hemmende etc. Funktionen beigemessen [3, 5, 7, 8, 10, 37, 38]. Es entstanden die Begriffe des „*functional food*“ und der „*nutraceuticals*“ [38], die auf die

multifunktionellen und physiologischen Eigenschaften anspielten und besonders von der Milchindustrie gut vermarktet wurden [1, 7, 8, 20, 37].

#### 1.4.2 Einfluss auf das Immunsystem

Die bioaktiven Peptide der Muttermilch sind sowohl für humane als auch für tierische Nachkommen von Bedeutung, da zum Zeitpunkt der Geburt das heranreifende Immunsystem noch nicht voll ausgebildet ist und sich in den ersten Lebensmonaten bis hin zur Autonomie an die Umwelt adaptieren muss [1, 3, 19]. Während dieser Zeit haben einige bioaktive Peptide folgende immunregulatorische Effekte [22, 37]: Modulation des nativen und adaptiven Immunsystems [39-42], Modulation der Proliferation humaner Lymphozyten [1, 7, 42], Erhöhung der phagozytischen Aktivität von Makrophagen [5, 20], Induzierung der Makrophagen-Migration [40], Verminderung der Monozyten-Adhäsion [43], Chemotaxis [40, 44-48] und Verhinderung von Zelllinien-Wachstum [49, 50].

Zur Beeinflussung von Entzündungsreaktionen gibt es unterschiedliche Befunde. Einerseits soll Inflammation verhindert [51], andererseits induziert [44, 52] werden. Hatori et al. zeigten dabei im Maus-Modell, dass aus Kuhmilch hergestelltes Casein-Hydrolysat das Fortschreiten der adjuvanten Arthritis unterdrückt [51]. Dies wurde durch Verhinderung der akuten und chronischen Inflammation sowie der Verhinderung der Produktion der Entzündungsmediatoren Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandin E2 (PGE2) erklärt [51]. Das Hydrolysat bestand dabei aus Aminosäuren und mehr als 100 Peptiden, deren Wirkung nicht separat untersucht wurde [51].

Die Eigenschaft zur Induzierung einer Entzündungsreaktion im Tier-Modell wurde durch folgende Versuche belegt: Bicer et al. injizierten Casein im Maus-Modell in den Muskel des Hinterbeins [44]. Die darauffolgende Entzündungsreaktion wurde anhand der Makrophagen und neutrophilen Granulozyten Akkumulation im Musculus soleus beurteilt [44]. Schon eine einmalige subkutane Injektion von Casein im Maus-Modell löste innerhalb von 24 Stunden eine sterile Inflammation aus [52].

In verschiedenen Untersuchungen wurde Casein oder Natrium-Caseinat in die murine Peritonealhöhle injiziert. Bei der darauf folgenden Entzündungsreaktion wurde das Verhalten bestimmter myeloischer Wachstumsfaktoren untersucht [53, 54]. Metcalf et al. (2011) wiesen dabei die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten sowie eine Konzentrationserhöhung von *granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor* (GM-CSF) und *granulocyte-colony-stimulating factor* (G-CSF) nach [54]. Eine konträre

Wirkung wie diese ist auch für andere Teile des Immunsystems bekannt und ist vermutlich abhängig von der lokalen Situation und der Konzentration des jeweiligen Peptides [25].

## 1.5 Funktionen der humanen Caseine

Für humane Caseine konnten in verschiedenen Studien ebenfalls immunmodulatorische Eigenschaften nachgewiesen werden. Petermann et al. wiesen nach, dass bei gestillten Kindern eine Autoimmun-Reaktion gegen humanes CSN1S1, im Sinne einer IgG-Erhöhung bis ins Erwachsenenalter nachweisbar ist [6]. Außerdem wurde Peptiden, die durch Hydrolyse aus humanem  $\alpha$  s1- und  $\beta$ -Casein entstanden, zum einen ein stimulierender Effekt auf Maus-Makrophagen, die eine protektive Wirkung gegen Infektionen mit *Klebsiella pneumoniae* haben, nachgewiesen [19, 55]. Zum anderen erhöht ein Hexapeptid des humanen  $\beta$ -Casein die Phagozytose von *sheep red blood cells* (SRBCs) durch Makrophagen *in vitro* [8, 56].

Neben der Funktion im Immunsystem wurden den humanen ebenso wie den tierischen Caseinen opioide Eigenschaften und Einfluss auf die Calcium-Aufnahme und Mineralisierung zugesprochen [15, 18]. Bei der Untersuchung weiterer Funktionen des Caseins wurde der Fokus auch auf den Produktionsort der Caseine gelenkt.

## 1.6 Produktionsort der Caseine

Es wurde lange angenommen, dass der einzige Produktionsort von Milchproteinen wie den Caseinen und Lactalbuminen die Epithelzellen der laktierenden Mamma sind [2, 10, 16, 22]. Kanazawa et al. zeigten 2002, dass dabei nicht nur alveoläre Zellen, sondern auch luminale Zellen der Mamma Casein produzieren [57]. Die Produktion geschieht dabei unter multihormoneller Kontrolle [16].

Die im Folgenden erläuterten Forschungsergebnisse beschreiben Eigenschaften von CSN1S1, welche zu der Hypothese führen, dass neben der laktierenden Mamma noch weitere Expressionsorte existieren.

### 1.6.1 CSN1S1-Expression und Wirkung

Otaegui et al. (2007) haben die Transkripte verschiedener Milch-Proteine mit inflammatorischen Prozessen bei Autoimmunerkrankungen wie Enzephalomyelitis und Multiple Sklerose (MS) in Verbindung gebracht [25]. Im Rahmen dieser Versuchsreihe konnten eine erhöhte CSN1S1-Gen-Expression sowie eine erhöhte  $\beta$ -Casein Protein-Konzentration im Lymphknoten von Mäusen mit experimenteller Enzephalomyelitis nachgewiesen werden [25]. Dies führte zu der Idee, auch das Blut von MS-Patienten zu untersuchen. Im Vollblut einiger dieser Patienten wurde ebenfalls eine erhöhte Gen-Expression von CSN1S1 sowie weiteren Vertretern der Casein-Familie nachgewiesen, nicht jedoch in der gesunden Kontrollgruppe [25]. Zumal die CSN1S1-Gen-Expression besonders während der Erholungsphase hoch ist, wird vermutet, dass Casein nicht konstitutiv, sondern im Rahmen von immunregulatorischen Prozessen erhöht im Blut vorliegt [25]. Dies lässt den Autoren zufolge auf eine immunsuppressive Wirkung schließen [25].

Zuvor gab es schon bereits einige Studien, die den Verzehr von *cow milk* Protein (CMP) in Zusammenhang mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen stellten [12, 58]. Dabei wurde CMP, Casein und weiteren Bestandteilen der Milch eine Rolle als Antigen oder Cofaktor zugeschrieben [58-60]. Bei MS-Patienten wurde, im Vergleich zu Gesunden, eine untypische T-Zell-Reaktivität gegen Casein und weitere Milch-Proteine aufgezeigt [58]. Im Blut von systemischen Lupus erythematodes (SLE)-Patienten wurden erhöhte Antikörper-Level gegen bovine Caseine nachgewiesen [59]. Außerdem scheint Casein ein Cofaktor in der Auto-Antikörper-Reaktivität gegen das Peptid SmD183-119 zu sein, welches mit für die Auto-Immun-Antwort bei SLE verantwortlich ist [59].

Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 und *latent autoimmune diabetes in adults* (LADA) wurden signifikant erhöhte Antikörper-Level gegen bovines  $\beta$ -Casein nachgewiesen [61]. Zur Assoziation von Kuhmilch-Verzehr und einem erhöhten Risiko zur Entwicklung von Diabetes mellitus Typ 1 gibt es allerdings verschiedene Ansichten, da sich die unterschiedlichen Forschungsergebnisse sowohl aus Tier-Modellen als auch epidemiologischen Studien widersprechen [61-64]. Laut Wasmuth et al scheint eine diabetogene Wirkung von CMP, soweit vorhanden, in Zusammenhang mit einer unzureichenden Antwort des darmassoziierten Immunsystems (gut associated lymphoid tissue), einer genetischen Prädisposition sowie weiteren Faktoren zu stehen [65].

Des Weiteren konnte CSN1S1 im Prostatasekret von Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH) mittels *two-dimensional* Gel-Elektrophorese und *Western Blot*

nachgewiesen werden [22, 66]. Immunhistochemisch war dieser Nachweis außerdem möglich in Prostataepithelzellen bei Patienten mit BPH [22]. Bei Prostata-Karzinom-Patienten zeigten nur 10% erhöhte CSN1S1-Werte [22]. Durch das laktotrope Hormon Prolactin soll dabei die Sekretion hochreguliert werden [22]. Laut Xu et al. spielt CSN1S1 somit eine bedeutende Rolle in der Entstehung von BPH und ist ein potentieller Biomarker für die Früherkennung [22]. Von dieser Arbeitsgruppe wird momentan außerdem eine mögliche CSN1S1-Expressions-Messung im Blut zur Diagnose von BPH untersucht [22].

Kampa et al. (1997) haben die antiproliferativen Eigenschaften verschiedener Casomorphine, unter anderem Alpha-S1-Casomorphin (Tyr-Val-Pro-Phe-Pro), auf Prostatakrebs-Zell-Linien beschrieben [67]. Durch partielle Interaktion mit Opioid-Rezeptoren, Somatostatin-Rezeptoren und weitere unbekannte Wirkungsweisen konnten die Casomorphine die Zellproliferation verringern [67].

Ähnliche Ergebnisse konnten zuvor von Hatzoglou et al. (1996) beobachtet werden. Hier wurden die antiproliferativen Eigenschaften von bovinem Alpha- und Beta-Casein auf die humane Brustkrebs-Zelllinie T47D gezeigt [68].

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der Nachweise von Casein in Lymphknoten von Mäusen mit experimenteller Enzephalomyelitis [25], von erhöhtem Casein-Serumspiegel im Blut von MS-Patienten [25], der Assoziation von Casein und Auto-Immunkrankheiten wie Diabetes und SLE [59, 61, 65] sowie des Nachweises von CSN1S1 in Prostatasekret und Gewebe von Patienten mit benigner Prostatahyperplasie [22] und Prostata-Karzinom [67] scheinen neben der laktierenden Mamma, die lange als einziger Expressionsort von CSN1S1 galt [10], noch weitere Expressionsorte zu existieren. Die oben dargestellten immunmodulatorischen Eigenschaften führten zu der Hypothese, dass Leukozyten, Casein exprimieren.

Ziel dieser Forschungsarbeit ist daher die Ermittlung folgender Punkte:

1. Exprimieren und sezernieren humane Leukozyten und leukozytäre Zellen CSN1S1?
2. Welche Leukozyten sind für die Produktion verantwortlich?

Zur Bearbeitung der Fragestellung sollten die Verfahren *real-time* RT-PCR, ELISA und Flow-Fish Anwendung finden.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Probanden**

Im 1. Versuchsteil (Kapitel 3.2) wurde zum Herstellen von Zellpopulationen fünf gesunden erwachsenen Spendern Blut aus einer antekubitalen Vene entnommen. Ein Votum der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Analyse von peripheren Blutproben liegt vor (Stutiennummer 3723). Das periphere Blut wurde mit Hilfe des BD Vacutainer Blood Collection Set (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) unter Handhabung nach Angaben des Herstellers gewonnen.

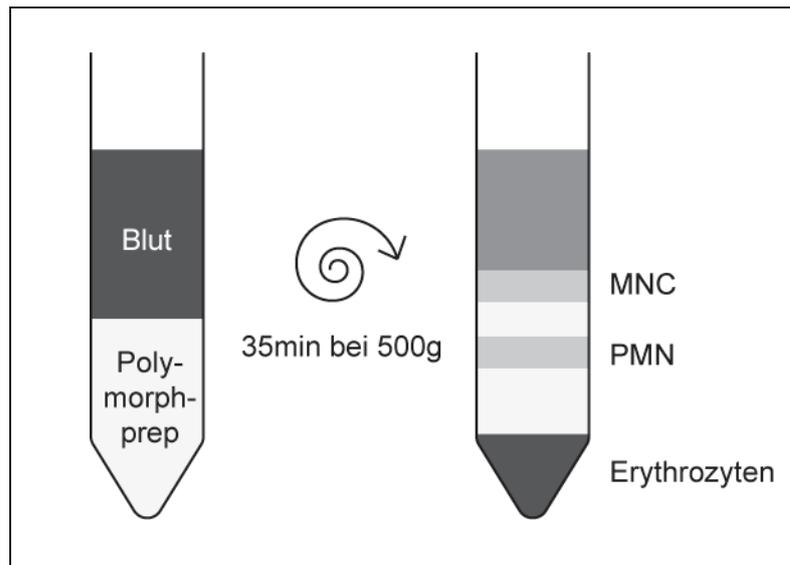
### **3.2 Herstellen von Zellpopulationen aus peripherem Blut**

#### **3.2.1 Übersicht**

Zur Isolation von mononukleären Zellen (MNCs) aus peripherem Blut wurde das Vollblut der Spender in EDTA beschichtete Vacutainer® (Becton Dickinson GmbH) überführt. Die Probe wurde bei Raumtemperatur innerhalb von höchstens zwei Stunden weiterverwendet. Die folgenden Arbeitsschritte wurden unter einer Sicherheitsbank (Heraeus Holding GmbH, Hanau) mit Pipetten (Eppendorf AG, Hamburg) und sterilen Pipettenspitzen (Eppendorf AG) durchgeführt (in folgenden Abschnitten immer unter gleichen Bedingungen).

#### **3.2.2 Separation von MNCs per Polymorphprep-Gradient**

Es wurden 5 ml des Zellisolutionsmediums Polymorphprep™ (Axis-Shield, Oslo, Norwegen) in ein 15 ml Falcon-Röhrchen (Becton Dickinson GmbH) gegeben. Es folgte eine Überschichtung mit 5 ml Blut eines Spenders. Im Anschluss wurde das Röhrchen 35 min bei 500 g zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode). Der Rotor lief dabei ungebremst aus, damit es nicht zu einer erneuten Durchmischung kam. Es zeigte sich eine deutliche Schichtung, und so konnte mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette die oberste Schicht, welche die MNCs enthält, abgenommen werden (siehe Abb. 1).



**Abb. 1: Zellseparation mittels Polymorphprep-Gradient**

Zentrifugieren 35 min bei 500 g, MNC = mononukleäre Zellen, PMN = polymorphnukleäre Zellen

Die Zellfraktionen wurden in ein separates 5 ml Falcon-Röhrchen mit 2 ml PBS-Puffer (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) gegeben. Nach Zentrifugation für 10 min bei 400 g konnte der Überstand abgesaugt werden. Bei eventueller Kontamination mit Erythrozyten wurden diese durch hypotone Lyse entfernt. Dazu wurden 500 µl NaCl-Lösung (0,2 %) (B.Braun Melsung AG, Melsung) auf das Pellet pipettiert. Nach 30 s wurden 500 µl NaCl-Lösung (1,6 %) (B.Braun Melsung AG) hinzugegeben, um wieder eine isotonische Umgebung herzustellen. Im Anschluss wurde erneut bei 400 g 10 min zentrifugiert. Es folgte eine Resuspendierung des gewaschenen Pellet in 2 ml PBS-Puffer.

### 3.2.3 MACS - Isolation der mononukleären Zellen

Mit Hilfe des Prinzips der magnetischen Zellseparation (MACS, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) wurden vier Fraktionen der mononukleären Zellen markiert und anschließend heraussortiert: CD14-positive Monozyten, CD4-positive und CD8-positive T-Lymphozyten sowie CD19-positive B-Lymphozyten. CD (*cluster of differentiation*) steht dabei für bestimmte charakteristische Oberflächenantigene der jeweiligen Zellpopulation. Die gewünschten Zellen werden dabei an Antikörper gebunden, die wiederum selber paramagnetische Partikel gebunden haben. Die mit Antikörpern inkubierte Zellsuspension wird dafür auf eine Säule gegeben, die sich in einem starken magnetischen Feld befindet. Die markierten Zellen werden durch die magnetische Kraft zurückgehalten, während die unmarkierten Zellen die Säule ungehindert passieren können.

Das Pellet mit den mononukleären Zellen wurde in 3 ml PBS-Puffer resuspendiert und auf vier Falcon-Röhrchen gleichmäßig verteilt. Es folgte eine Zentrifugation von 10 min bei 1500 rpm und 8°C. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet gelöst und jeweils resuspendiert in 80 µl MACS-Puffer (Miltenyi Biotech). Anschließend wurden jeweils 20 µl MicroBeads (Miltenyi Biotech) mit o.g. Spezifikation in jedes Falcon-Röhrchen dazugegeben: Nach dem Vortexen erfolgte eine Inkubation für 15 min bei 4°C. Anschließend wurden 2 ml PBS-Puffer dazugegeben und bei 1500 rpm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das gelöste Pellet in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert.

Nach der Markierung schloss sich nun die Separation an. Dazu wurden vier MS-Säulen (Miltenyi Biotech) in den Adapter des Octo-MACS (Miltenyi Biotech) eingesetzt. Nach einem Spülvorgang mit 500 µl MACS-Puffer wurden jeweils die 500 µl einer spezifischen Zellsuspension (CD14-, CD4-, CD8-, CD19-positiv) auf eine Säule gegeben und der Durchlauf aufgefangen. Die Säulen wurden jeweils dreimal mit 500 µl Puffer gespült, um zurückbleibende Verunreinigungen herauszuwaschen. Im Anschluss wurden die Säulen aus dem Octo-MACS entfernt und außerhalb des Einflussbereiches des magnetischen Feldes auf ein steriles Falcon-Röhrchen gesetzt. 1 ml MACS-Puffer wurde auf die Säule gegeben und mit dem dazugehörigen Stempel wurden die markierten Zellen aus der Säule eluiert.

Die aufgefangene Zellsuspension enthielt dann die spezifischen Zellen (CD14-positiv Monozyten, CD4-positiv T-Lymphozyten, CD8-positiv T-Lymphozyten oder CD19-positiv B-Lymphozyten).

### 3.2.4 Lagerung der MNCs

Die Zellen wurden jeweils in ein 1,5 ml Tube (Eppendorf AG) gegeben und 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und das Pellet in 350 µl RLT-Puffer (Qiagen GmbH, Hilden) lysiert. Zum Homogenisieren des Lysats und um eventuell vorhandenen Zelldebris herauszufiltern wurde anschließend der Inhalt mit einer Pipette (Eppendorf AG) auf einen Qia-Shredder (Qiagen GmbH) gegeben und 2 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Zum Einfrieren bei -40°C wurde der Durchlauf in ein 1,5 ml Tube überführt.

## 3.3 Zellkultur der Tumorzelllinien

### 3.3.1 Übersicht

Für die Zellkulturversuche wurden insgesamt vier humane Zelllinien verwendet:

1. Mono Mac 6 (MM6): humane Monozyten Zelllinie (DSMZ GmbH, Braunschweig), die ursprünglich aus einem Patienten mit akuter monoblastischer Leukämie isoliert wurde [69].
2. THP1: humane Monozyten Zelllinie (DSMZ GmbH), die aus dem Blut eines einjährigen Patienten mit akuter monozytischer Leukämie stammt [70].
3. HL60: humane myeloide Leukämie-Zelllinie (DSMZ GmbH), isoliert aus dem Blut einer 36 Jahre alten Patientin mit akuter promyelozytischer Leukämie [71, 72].
4. U937: humane histiozytische Lymphom-Zelllinie (DSMZ GmbH), abstammend von einem 37 Jahre alten, an einem generalisierten Lymphom erkrankten Patienten [73].

Alle Zelllinien wurden mit demselben Basismedium versorgt (siehe Basismedium für alle vier Tumor-Zelllinien). Die Zelllinien MM6 und HL60 erhielten noch weitere Zusätze (siehe Modifikation Medium für MM6-, bzw HL60-Zellen). Die Produkte für die Zellkultur stammen alle von dem Hersteller Invitrogen in Karlsruhe.

**Basismedium für alle vier Tumor-Zelllinien**

<b>Reagenz</b>	<b>Menge</b>
RPMI 1640 + Glutamax	500 ml
Fötales Kälberserum	10 %
Penicillin	50 IU/ml
Streptomycin	50 µg/ml

**Modifikation Medium für MM6-Zellen**

<b>Reagenz</b>	<b>Menge</b>
Human Insulin	10 µg/ml
Natrium-Pyruvat	1 mmol
Nichtessenzielle Aminosäuren	2 mmol

**Modifikation Medium für HL60-Zellen**

<b>Reagenz</b>	<b>Menge</b>
HEPES	25 mmol

Die Zellen wurden kultiviert im entsprechenden Zellkulturmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> - Atmosphäre im Brutkasten (Function line, Heraeus Holding GmbH).

## 3.4 RNA-Extraktion

### 3.4.1 Übersicht

Die Isolation der Ribonukleinsäure der verschiedenen Proben mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH) erfolgte gemäß der Anleitung des Handbuches und mit den enthaltenen Chemikalien und Tubes.

### 3.4.2 Isolation der RNA

Die in RLT-Puffer lysierten Proben (siehe Kapitel 3.2.3) wurden aufgetaut. Anschließend wurden 350 µl 70% Ethanol (Merck KGaA, Darmstadt) dazugegeben und mit der Pipette vermischt. Das homogene Gemisch wurde auf die Säule (RNeasy mini spin column, Qiagen GmbH) pipettiert. Durch Hilfe des Ethanols wurde eine Bindung zwischen der RNA und der Membran der Säule erzeugt. Es folgte eine Zentrifugation für 15 sec bei 10.500 Umdrehungen (Heraeus Sepatech GmbH). Die weiteren Zentrifugationen im Abschnitt wurden immer unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Bindung der RNA blieb bestehen und der Durchlauf mit den herausgewaschenen kontaminierenden Bestandteilen wurde verworfen. Im Anschluss wurde die Säule auf ein neues 2 ml Tube des Sets gesetzt und zur Pufferung folgte die Zugabe von 350 µl *RW1-Buffer* (Qiagen GmbH). Hinterher wurde erneut zentrifugiert, der Durchlauf verworfen und das 2 ml Tube weiterverwendet.

### 3.4.3 DNase Behandlung der Probe

Zur Entfernung bzw. Verdau von potentiellen Dekontaminationen durch genomische DNA wurde DNase (RNase-Free DNase Set, Qiagen GmbH) laut Beschreibung im Handbuch angesetzt. Die Lösung aus 10 µl DNase1 und 70 µl RDD Puffer (Qiagen GmbH) wurde direkt auf die Membran pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden 350 µl *RW1-Buffer* (Qiagen GmbH) zum Auswaschen der DNase auf die Säule gegeben und zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule auf ein neues 2 ml Tube gestellt.

### 3.4.4 Waschen und Eluierung der RNA

Zur Elution der RNA aus der Säule wurden die folgenden Arbeitsschritte durchgeführt: Auf die Zugabe von 500 µl *RPE-Buffer* (Qiagen GmbH) zum Waschen folgte eine

Zentrifugation. Es wurden erneut 500  $\mu$ l RPE-*Buffer* (Qiagen GmbH) hinzugegeben und 2 min zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml Tube gestellt und 30  $\mu$ l RNase-freies Wasser (Qiagen GmbH) direkt auf die Membran pipettiert. Die RNA konnte hierdurch aus ihrer Bindung gelöst werden und durch anschließendes Zentrifugieren für 1 Minute konnte die RNA eluiert werden. Zur quantitativen Bestimmung der RNA wurden die Proben mittels Spektrophotometer Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Lafayette, USA) gemessen. Die Proben wurden im Anschluss sofort gekühlt weiterverarbeitet oder gemäß des Benutzerhandbuches bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Innerhalb von sieben Tagen wurde die RNA in *complementary*-DNA (cDNA) umgeschrieben.

### 3.5 cDNA Synthese

#### 3.5.1 Übersicht

Es wurde das Arbeitskit (QuantiTect Reverse Transcription Kit) von Qiagen zur reversen Transkription und genomischen DNA Elimination verwendet. Die cDNA wurde für eine anschließende *real-time two-steps* Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) synthetisiert.

#### 3.5.2 Reverse Transkription

Die isolierte RNA der Proben und eine Referenz-RNA (Stratagene, Santa Clara, USA) wurden auf Eis aufgetaut. Die Reagenzien des Kits wurden aufgetaut, gemischt, abzentrifugiert und dann ebenfalls auf Eis gelagert. Als nächstes wurde ein *Master Mix* aus 1  $\mu$ l Quantiscript Reverse Transkriptase, 1  $\mu$ l RT Primer Mix und 5  $\mu$ l Quantiscript RT *Buffer* (5x) (Qiagen GmbH) pro Probe angesetzt und auf Eis gelagert. Für jede Probe wurde ein neues Tube (0,2 ml) in eine Kühlplatte gestellt. Von jeder Probe wurde 1  $\mu$ g RNA verwendet. Anschließend wurden 2  $\mu$ l gDNA *Wipeout Buffer* (7x) dazu pipettiert und die geschlossenen Gefäße abzentrifugiert. Es folgte eine zweiminütige Inkubation im *Thermocycler* (Biometra GmbH, Göttingen) zur Dekontamination eventuell vorhandener genomischer DNA. Die Proben wurden danach sofort abgekühlt und auf Eis oder bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert. Im Anschluss wurden jeweils 6  $\mu$ l des zuvor erstellten *Master Mixes* in die Probe hinzu pipettiert und dann das Tube abzentrifugiert.

Es folgt die reverse Transkription durch eine 15-minütige Inkubation bei 42°C im *Thermocycler*. Dabei wirkte das multifunktionale Enzym (Quantiscript Reverse Transcriptase) zum einen als RNA-abhängige DNA-Polymerase, welche aus der RNA-Vorlage die entsprechende cDNA erzeugt. Zum anderen hat es eine RNase-H-Aktivität, die an cDNA hybridisierte RNA abbaut. Ungebundene RNA ist davon nicht betroffen. Direkt im Anschluss wurden die Proben im *Thermocycler* für 3 Minuten auf 95°C zur Inaktivierung der reversen Transkriptase erhitzt. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt und erneut abzentrifugiert. Anschließend wurden 20 µl RNase-freies Wasser (Qiagen GmbH) hinzugegeben und erneut abzentrifugiert. Die Proben wurden bei -20°C eingefroren, bis sie für die Durchführung der *real-time* RT-PCR (siehe Kapitel 3.6) benötigt wurden.

## 3.6 Real-time RT-PCR

### 3.6.1 Übersicht

In der RT-PCR wird im Unterschied zur DNA-Polymerase-Kettenreaktion (DNA-PCR) zunächst die isolierte RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase (Qiagen GmbH) in cDNA umgeschrieben. Sequenzspezifische *Primer* binden eine Sequenz der Ziel-cDNA auf dem Matrizen-Strang. Eine DNA-abhängige DNA-Polymerase kann dann einen komplementären Strang erzeugen. Während der Amplifikation wird die Quantifizierung der DNA durch Messung der Fluoreszenzintensität durchgeführt. Dafür wird der Farbstoff SYBR Green 1 (Qiagen GmbH) benutzt, der nur eine geringe Eigenfluoreszenz in Lösung hat. Wenn er allerdings in die doppelsträngige DNA interkaliert, kommt es zu einer starken Fluoreszenzerhöhung. Die Fluoreszenzintensität ist bei Erreichen eines exponentiellen Anstiegs proportional zur Ausgangskonzentration an eingebrachter cDNA. Am Ende der Elongation jedes Zyklus kann so durch eine Fluoreszenzmessung eine Quantifizierung vorgenommen werden. Nach Ablauf der PCR kann durch eine Schmelzkurvenanalyse die Fragmentlänge der Amplifikate bestimmt werden. Dabei wird durch kontinuierliche Temperaturerhöhung (1°C pro Minute) bis 95°C der Doppelstrang denaturiert. Jedes Fragment hat einen spezifischen Schmelzpunkt, bei der die Doppelstränge sich trennen und sich der fluoreszierende Farbstoff SYBR Green 1 aus der Bindung löst. Der Schmelzpunkt liegt bei spezifischen DNA-Produkten mit doppelsträngiger DNA höher als bei unspezifischen. Dabei ist der Peak der Schmelzkurve abhängig von der Nukleotidzusammensetzung und der Länge des Amplifikates. Die PCR wurde durchgeführt mit dem Gerät StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems GmbH, Darmstadt) und der Software StepOne software v2.0 (Applied Biosystems GmbH).

### 3.6.2 *Primer*-Paare und Referenz-Gen

Insgesamt wurden cDNA-Proben der vier Tumorzelllinien HL60, MM6, THP1 und U937 (siehe Kapitel 3.3.1) sowie von fünf Probanden, nach Auftrennung der Zellfraktionen in polymorphnukleäre, CD14-, CD4-, CD8-, und CD19-positive Zellen (siehe Kapitel 3.2.3), gemessen. Als *Primer* wurden sequenzspezifische, komplementäre und gegenläufige Oligonukleotide zweier verschiedener Exons von Glycerinaldehyd-3-

phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (Tib Molbiol, Berlin) und CSN1S1 (Tib Molbiol) verwendet.

### **Primer für PCR**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>
<b>GAPDH forward</b>	CCAGCCGAGCCACATCGCTC
<b>GAPDH reverse</b>	ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT
<b>CSN1S1 forward</b>	TCCAGCATCAGTTCATCGAG
<b>CSN1S1 reverse</b>	CTGGAAAGGCACTTGGACAT

Das *housekeeping*-Gen GAPDH wurde mitbestimmt, um als endogene Amplifikationskontrolle für die relative Quantifizierung benutzt zu werden. Zusätzlich wurde auch eine Referenz-RNA (Stratagene) zusammen mit allen *Primern* gemessen, um als exogene Amplifikationskontrolle verwendet zu werden. Die *no template control* (NTC) wurde jeweils mitbestimmt, um Kontaminationen oder *Primer dimer* auszuschließen.

### **3.6.3 Herstellen des *Master Mixes* und Vorbereitung der PCR**

Für jede Probe wurden 23 µl Stammlösung zusammengestellt. Für die Stammlösung wurden Reagenzien des QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen GmbH) benutzt. Der fertige QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen GmbH) besteht aus HotStarTaq DNA Polymerase, QuantiTect SYBR Green PCR *Buffer*, dNTP mix (including dUTP), SYBR Green 1, ROX passive reference dye und 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Der QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix und das RNase-freie Wasser wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, gemischt und abzentrifugiert (Centrifuge 5415 C, Eppendorf AG). Die *Primer*-Paare wurden auf Eis aufgetaut und ebenfalls gemischt und abzentrifugiert. Die Zusammensetzung der Stammlösung für eine Probe zeigt die folgende Übersicht.

### Stammlösung der real-time RT-PCR

Reagenz	Firma	Menge in $\mu\text{l}$
RNase-Free Water	Qiagen GmbH	10,35
QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	Qiagen GmbH	12,5
<i>Primer forward</i>	Tib Molbiol	0,075
<i>Primer reverse</i>	Tib Molbiol	0,075
<b>Gesamt</b>		<b>23</b>

Die Stammlösung wurde gemischt, ge“vortex“, abzentrifugiert und bei Raumtemperatur bis zum weiteren Gebrauch gelagert. Die PCR wurde in eine 96-*Well*-Platte (PCR-Platte MicroAmp Fast Optical, Qiagen GmbH) pipettiert. Zuerst wurden 23  $\mu\text{l}$  der fertigen Stammlösung in die *Wells* pipettiert und anschließend die cDNA aus den Arbeitsschritten aus Kapitel 3.5.2 oder gegebenenfalls RNase-freies Wasser (Qiagen GmbH) in die entsprechenden *Wells* hinzupipettiert. Nach Beendigung des Pipettierens wurde die PCR-Platte mit einer Klebefolie verschlossen (MicroAmp Optical Adhesive Film, Qiagen GmbH). Bei 500 Umdrehungen für 2 Minuten wurde die pipettierte Platte abzentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Heraeus Sepatech). Im Anschluss wurde die 96-*Well*-Platte in das PCR-Gerät eingesetzt.

#### 3.6.4 Ablauf der PCR

Initial wurde die Polymerase durch Erhitzen für 15 Minuten bei 95°C aktiviert und die Doppelstränge wurden voneinander getrennt (siehe Protokoll PCR Ablauf). Die folgenden drei Schritte wurden in 45 Zyklen wiederholt. Zuerst erfolgte die Denaturierung der Doppelstränge für 15 s bei 94°C, gefolgt von der Primerhybridisierung (*primer annealing*) an den Matrizenstrang für 30 sec bei 55°C. Zuletzt wurde die Elongation des neuen Strangs für 30 sec bei 72°C durchgeführt, wobei die Polymerase ausgehend vom *Primer* den komplementären Strang synthetisiert. Am Ende des dritten Schrittes erfolgte jeweils eine Fluoreszenzmessung. Nach Abschluss der 45 Zyklen wurde eine Schmelzkurve erstellt, indem von 60°C auf 95°C in 1°C/min Schritten die Temperatur erhöht wurde.

**Protokoll PCR Ablauf**

<b>Abschnitt</b>	<b>Schritt</b>	<b>Temperatur °C</b>	<b>Dauer</b>
<b>Initialer</b>	Polymerase	95	15 min
<b>Aktivierungsschritt</b>	Aktivierung und Denaturierung		
<b>Amplifikation 45</b>	Denaturierung	94	15 sec
<b>Zyklen</b>	Annealing	55	30 sec
	Elongation	72	30 sec
<b>Schmelzkurve</b>	Denaturierung	95	15 sec
	Renaturierung	60	1 min
	Erwärmen	1°C/min bis 95°C für 15 sec	

**3.6.5 Relative Quantifizierung**

Zur Quantifizierung wurde kontinuierlich bei jedem PCR-Zyklus das Fluoreszenzsignal des SYBR Green 1 gemessen. Als Maß für die Quantifizierung der Startmenge wurde der sogenannte *cycle threshold* (CT) verwendet. Dies ist die Anzahl der PCR-Zyklen, die nötig sind, damit das emittierte Fluoreszenzsignal ein definiertes Fluoreszenzniveau überschreitet. Der CT ist umgekehrt proportional zur Menge der in die PCR-Reaktion eingesetzten cDNA. Bei der relativen Quantifizierung wurde die Expression der Zielgene mit der Expression des *housekeeping*-Gens GAPDH verglichen.

Dabei wurde zuerst für jede untersuchte Probe der CT-Wert des Referenzgens vom CT-Wert des untersuchten Gens subtrahiert ( $\Delta\text{CT} = \text{CT Zielgen} - \text{CT GAPDH}$ ). Nach dieser Normierung wird vom  $\Delta\text{CT}$  Proben der  $\Delta\text{CT}$  Kontrollprobe abgezogen. Dadurch erhält man den sogenannten  $\Delta\Delta\text{CT}$  Wert, welcher der initial enthaltenen Menge an cDNA proportional ist [74].

## 3.7 ELISA

### 3.7.1 Übersicht

*Enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA) ist ein Testverfahren, welches die Quantifikation von Stoffen mittels Antigen-Antikörper-Bindung ermöglicht. Es wurde die *Sandwich*-ELISA-Technik verwendet. Dabei bindet zuerst der *coating*-Antikörper an den Boden der Microtiterplatte. Anschließend wird eine das Antigen enthaltende Lösung hinzupipettiert, so dass sich Antikörper-Antigen-Komplexe ausbilden. Es folgt die Zugabe des *detection*-Antikörpers, der eine Verbindung mit dem zuvor genannten Komplex eingeht. Zum Nachweis einer Farbreaktion wird ein weiterer Antikörper hinzugegeben, der an das Enzym *horseradish-peroxidase* (HRP) gekoppelt ist. Auf die Zugabe des Substrats folgt eine enzymatische Farbreaktion, die photometrisch gemessen wird. Anhand der Stärke des Signals kann die Antigenkonzentration berechnet werden.

### 3.7.2 Durchführung

Der *coating*-Antikörper bindet an den Boden einer spezifischen 96-*Well*-Microtiterplatte (MaxiSorp flat-bottom 96 *well* plate, Nunc, Dänemark). Dafür wird zunächst der sogenannte *coating*-Puffer angesetzt dessen pH-Wert auf 9,6 bei 4 °C eingestellt wird.

#### *coating*-Puffer

Reagenz	Menge	Hersteller
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10,6 mg/ml	Merck KGaA
NaHCO <sub>3</sub>	8,4 mg/ml	Merck KGaA
Aqua dest.	auf insgesamt 100 ml	B.Braun Melsung AG

Der *coating*-Antikörper RB13 (ModiQuest, Nijmegen, Niederlande) wurde im Verhältnis 1:10<sup>4</sup> zur Puffer-Lösung hinzugegeben. Hierbei handelt es sich um einen im Kaninchen hergestellten polyklonalen *anti-human-CSN1S1-IgG*-Antikörper. Von dieser Mischung wurden im Anschluss jeweils 100 µl in die *Wells* der Mikrotiterplatte hinzupipettiert und so die *Wells* mit 0,3 µg/ml des Antikörpers *gecoated*. Es folgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht. Die Lösung wurde abgeschüttet, und drei Waschschrte mit PBS-Puffer wurden vorgenommen, um nicht gebundene Agenzien zu entfernen. Die *Wells* wurden

erneut geleert, dann folgte die Zugabe des *blocking*-Puffers, um die nicht gebundenen Bindungsstellen zu blocken. Der Puffer bestand aus PBS (Dulbecco's PBS without Ca & Mg, PAA Laboratories GmbH), Tween20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und 2% BSA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Von dem Gemisch wurden in jedes *Well* jeweils 100 µl hinzupipettiert und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe mit PBS&Tween.

In die leeren *Wells* wurden jeweils 100 µl der unverdünnten Überstände aus der Zellkultur der Tumorzelllinien (HL60, U937, THP1, MM6) sowie der CD14-positiven Monozyten, der CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten und CD19-positiven B-Zellen hinzugegeben. Die Leukozyten wurden am Tag zuvor per MACS aus *Buffy-Coats* (Univeritätsklinikum Düsseldorf, Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin) isoliert. *Buffy-Coats* bestehen aus Leukozyten und Thrombozyten. Wenn antikoaguliertes Blut zentrifugiert wird, bilden diese Zellen die Grenzschicht zwischen den Erythrozyten und dem Blutplasma. Pro Zellfraktion wurden jeweils drei *Wells* einer 24er-Platte (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) mit einer Dichte von  $6 \times 10^6$  Zellen/*Well* ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation bei 4°C konnten die Überstände für den ELISA abgenommen werden. Im Anschluss wurde zur späteren quantitativen Auswertung eine Casein-Standardreihe mit 1:20 verdünntem Casein-Aliquot (50 µg/ml) (Casein-Alpha, Calbiochem, Darmstadt) angesetzt. In dieser Verdünnungsreihe in 10 Schritten wurde das verdünnte Casein in absteigender Konzentration mit BSA gemischt (siehe Casein-Verdünnungsreihe). Von diesen Verdünnungen wurden jeweils 100 µl/*Well* pipettiert.

**Casein-Verdünnungsreihe**

<b>Casein-Menge: ng/ml</b>	<b>Konzentration</b>
2000	1:25
1000	1:50
500	1:100
250	1:200
125	1:400
62,5	1:800
3,25	1:1600
15,62	1:3200
7,8125	1:6400
3,906	1:12800

Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 4°C zum Ausbilden von Antikörper-Antigen-Verbindungen folgten sechs Waschvorgänge mit PBS&Tween. Es blieben so nur die an den *coating*-Antikörper gebundenen Antigene übrig.

Im Anschluss wurden in jedes *Well* 100 µl von dem zuvor mit 0,3 µg/ml in *blocking*-Puffer verdünntem *mouse-anti-CSN1S1 detection*-Antikörper (Abnova Corporation, Heidelberg) hinzugegeben. Zum Ausbilden von Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexen wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Um nicht gebundene Teile zu lösen, folgten sechs Waschschrte mit PBS&Tween.

Im Folgenden wurde Streptavidin/HRP (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) 1:5000 in *blocking*-Puffer verdünnt und im Anschluss in jedes *Well* 100 µl pipettiert. Während einer Stunde Inkubation bildeten sich Antikörper-Antikörper-Verbindungen aus. Es folgten sechs Waschschrte mit PBS&Tween, um ungebundene Antikörper zu beseitigen, und anschließend drei weitere Waschschrte mit reinem PBS-Puffer. Nach der Zugabe von 100 µl/*Well* des HRP-spezifischen Substrat 3,3',5'5-Tetramethylbenzidin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe des Substrats katalysierte die HRP eine Farbreaktion, deren Umfang proportional zur Menge des Enzyms und somit zur Menge des gebundenen Antigens war. Zum

Stoppen der Reaktion folgte die Zugabe von 100  $\mu$ l Schwefelsäure (Merck KGaA) pro *Well*, welches einen Farbumschlag des Produktes von gelb zu blau zur Folge hatte.

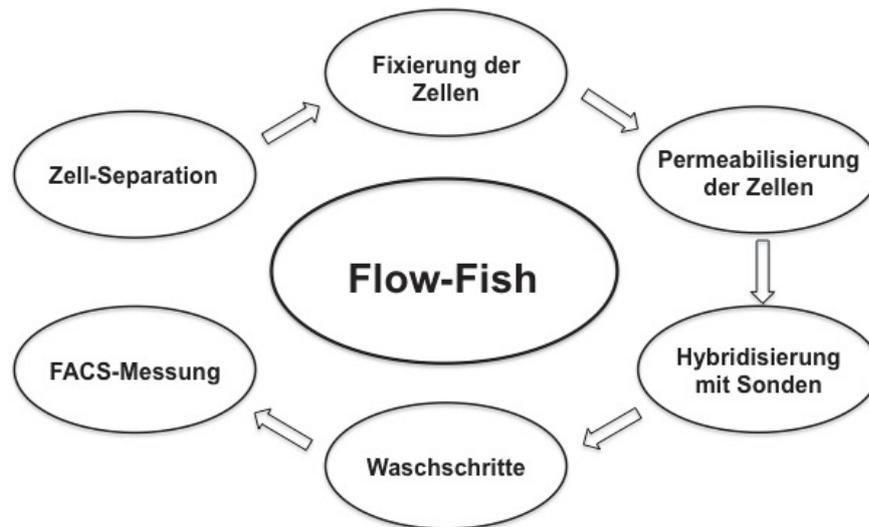
Im Anschluss wurde direkt photometrisch die Farbreaktion mit dem Anthos 2001 ELISA reader (Anthos Mikrosysteme, Krefeld), einem 450 nm Messfilter und einem 620 nm Referenzfilter gemessen und so die Menge des Antigens quantifiziert.

## 3.8 Flow-Fish

### 3.8.1 Übersicht

Im folgenden experimentellen Teil wurde versucht, ein schnelles und spezifisches Verfahren zum Nachweis der CSN1S1-Expression in Vollblutproben auf der Basis einer Kopplung von Durchflusszytometrie und Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (Flow-Fish) zu etablieren. Bisher wurde Flow-Fish weitestgehend zur quantitativen Messung der Telomerlänge benutzt [75, 76], unter anderem in humanen Granulozyten und Lymphozyten [77]. Gegenüber den herkömmlichen Verfahren *Southern Blot* und Q-Fish hat es die Vorteile, dass weniger Zellen benötigt werden und es weniger zeitaufwendig ist [78]. Ein Test mittels Flow-Fish kann innerhalb eines Tages durchgeführt werden. Nach der Etablierung eines funktionierenden Protokolls zur Telomerlängen-Bestimmung gilt das Verfahren als akkurat und reproduzierbar [77].

In einer Versuchsreihe wurden CD14-positive Zellen aus *Buffy-Coats* mittels Polymorphprep-Gradient und MACS-Isolierung separiert. Per Durchflusszytometrie wurde die Reinheit der Zellpopulationen überprüft. Im Anschluss wurden die CD14-positiven Monozyten sowie Zellen der humanen promyelozytischen Leukämie-Zelllinie HL60 und Zellen der humanen Monozyten Leukämie-Zelllinie MM6 mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten oder unmarkierten Gen-Sonden hybridisiert. Die Sequenz der Sonden war so gewählt, dass sie eine Grenze zwischen zwei Exons überspannten, damit eine Bindung an genomische DNA minimiert wurde und sie theoretisch nur an die entsprechende mRNA binden. Die Gen-Expression von CSN1S1 und des *housekeeping*-Gens GAPDH wurde anschließend per FACS gemessen. Mit dieser wenig zeitaufwendigen und reproduzierbaren Methode sollte so ein spezifischer und quantitativer Nachweis für CSN1S1 in Leukozyten und leukozytären Zellen geschaffen werden. Eine Skizzierung des Versuchsaufbaus zeigt Abb. 2.



**Abb. 2: Flow-Fish-Versuchsablauf**

Grafik modifiziert nach Baerlocher 2002 [78]

### 3.8.2 Separation der CD14-positiven Monozyten

Für die folgende Versuchsreihe wurden 60 ml Blut eines *Buffy-Coat* verwendet. Die Zellfraktionen wurden mittels Polymorphprep-Gradient, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, aufgetrennt. Die MNCs wurden in PBS-Puffer resuspendiert und die Zellzahl wurde bestimmt. Anschließend wurden mittels positiver Isolierung die CD14-positiven Zellen, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, durch MACS separiert.

Zur Detektion der Reinheit der Zellpopulation wurden 150 µl Zellsuspension für eine FACS-Messung vor der Fixierung abgenommen. Die 150 µl wurden auf drei Falcon-Röhrchen verteilt und die Zellen, wie in Kapitel 3.9.2 beschrieben, mit FACS-Antikörper markiert. Der Rest wurde erneut zentrifugiert und das Pellet gelöst. Ein Drittel der Zellsuspension wurde, wie in Kapitel 3.8.4 beschrieben, mit RNase behandelt und anschließend fixiert. Die übrigen Zellen wurden, wie in Kapitel 3.8.3 beschrieben, sofort in Paraformaldehyd-Lösung fixiert.

### 3.8.3 Fixierung der isolierten Zellen

Die in PBS-Puffer suspendierten Zellen wurden 10 min bei 1500 rpm und 16°C zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Heraeus Sepatech GmbH). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet gelöst. Im Anschluss wurden die Zellen 15 min bei Raumtemperatur in Paraformaldehyd-Lösung fixiert.

**Paraformaldehyd-Lösung zur Fixation**

<b>Reagenz</b>	<b>Firma</b>	<b>Menge</b>
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	4 g
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt	5 mol
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	0,04761 g
PBS-Puffer (10 fach)	PAA Laboratories GmbH	10 ml
Aqua dest.	Qiagen GmbH, Hilden	auf 100 ml auffüllen
<b>Gesamtvolumen</b>		<b>100 ml</b>

Zuerst wurden 4 Gramm Paraformaldehyd in 80 ml Aqua dest. (*Aqua destillata*) langsam auf 60°C erhitzt. Anschließend folgte die tropfenweise Zugabe einer 5-molaren NaOH-Lösung, bis das Gemisch klar wurde. Danach wurden 0,04761 g Magnesiumchlorid und 10 ml PBS-Puffer zugegeben. Die Lösung wurde auf 100 ml Gesamtvolumen mit Aqua dest. aufgefüllt und der PH-Wert auf 7,0 eingestellt.

Nach der Fixierung wurden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Zentrifugiert wurde jeweils 7 min bei 900 g und 16°C. Anschließend wurden die Zellen erneut in PBS-Puffer resuspendiert und bei 4°C maximal eine Woche gelagert.

**3.8.4 RNase-Behandlung**

Als Negativkontrolle wurde ein Teil der Zellen mit RNase behandelt (RNase A, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). So sollte überprüft werden, ob die benutzten Sonden die Zellmembran durchdringen und Interaktionen mit unspezifischer mRNA eingehen.

Dazu wurde jeweils ein Röhrchen mit ca.  $6 \times 10^6$  CD14-positiven Zellen sowie ein Röhrchen mit  $2 \times 10^6$  HL60-Zellen mit 2 µg/ml RNase behandelt. Zur Überprüfung, ob eventuell höhere RNase-Dosen zum kompletten Verdau der mRNA nötig sind, wurden zwei weitere Röhrchen mit CD14-positiven Zellen mit RNase in ansteigenden Konzentration behandelt.

Zu Beginn wurden die Röhrchen zentrifugiert und das Pellet in einer Proteinase K-Lösung resuspendiert. Die Lösung enthielt 497,5 µl 20 mmol Tris HCL-Lösung mit 2 mmol CaCl<sub>2</sub> (pH 7,5) (Sigma Chemical Co, USA) und 2,5µl Proteinase K (Proteinase K

recombinant, Roche Diagnostics GmbH). Die Proteinase K wurde zuvor 1:100 verdünnt mit 20 mmol Tris HCL-Lösung mit 2 mmol CaCl<sub>2</sub> (pH 7,5). Das Gemisch aus Zellen und Proteinase K-Lösung wurde 7,5 min bei 37°C im Thermoblock (Heizblock HBS-130, Unitek, Puchheim) erhitzt, um das Temperaturoptimum der Proteinasen herzustellen. Durch diesen Schritt wurden die Zellen für die Sonden permeabilisiert. Anschließend wurde die Proteinase durch zwei Waschschrte mittels HBSS (Hank's BSS, PAA Laboratories GmbH) und Zentrifugation herausgewaschen.

Zum Verdau der RNA wurde in die Falcon-Röhrchen mit den CD14-positiven Zellen RNase in drei verschiedenen Konzentrationen gegeben. Die Verdünnungen betragen 2 µg/ml, 20 µg/ml und 200 µg/ml. Die HL60-Zellen wurden mit einer Verdünnung der RNase von 2 µg/ml behandelt. Anschließend wurden die Proben 30 min bei 37°C erhitzt. Die RNase A spaltet einzelsträngige RNA, indem es die Phosphordiesterbindung, die sich an der 5'-Position der Ribose des jeweils in dem RNA-Strang auf U bzw. C folgenden Nukleotids befindet, trennt [79]. Durch zwei Waschvorgänge mit HBSS und anschließender Zentrifugation wurde das Enzym herausgewaschen. Danach wurden die Zellen, wie in Abschnitt 2.8.3 beschrieben, sofort in Paraformaldehyd-Lösung fixiert.

### 3.8.5 *In-situ*-Hybridisierung

Ziel der *in-situ*-Hybridisierung war es, mittels spezifischer Sonden die mRNA von CSN1S1 und des *housekeeping*-Genes GAPDH (Positivkontrolle) nachzuweisen. Benutzt wurden dafür Gen-Sonden, die komplementär zur mRNA der Zielgene (CSN1S1 und GAPDH) sind. Zum einen die als *anti-sense*-Sonden bezeichneten Sonden, die mit dem fluoreszierenden Farbstoff ALEXA Fluor 488 (Invitrogen) am 5'-Ende markiert sind (Sequenzen siehe Übersicht: Sonden für CSN1S1 und GAPDH). Zum anderen die sogenannte CSN1S1 Block-Sonde, welche die gleiche Sequenz wie die CSN1S1 *anti-sense*-Sonde besitzt, allerdings nicht fluoreszenzmarkiert ist. Da sich diese beiden Sonden-Typen kompetitiv zueinander verhalten, wurden sie verwendet, um ein potentiell unspezifisches Binden der Sonden oder Wechselwirkungen zu erfassen.

## Sonden für CSN1S1 und GAPDH

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Markierung 5'
CSN1S1 <i>anti-sense</i>	5'-CTGGAAAGGCACTTGGACAT-3'	ALEXA 488
GAPDH <i>anti-sense</i>	5'-GCATGGACTGTGGTCATGAG-3'	ALEXA 488
CSN1S1 Block	5'-CTGGAAAGGCACTTGGACAT-3'	Keine

Die verschiedenen *anti-sense*-Sonden bzw. Block-Sonden wurden im Verhältnis 1:10 mit TE-Puffer (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) verdünnt. Anschließend wurden diese Sonden mit dem Hybridisierungspuffer vermischt und zwei Minuten bei 100°C im Thermoblock inkubiert und dadurch denaturiert. Dafür wurden mehrere *Master Mixes* angesetzt. Die Mischverhältnisse der verschiedenen Ansätze zeigen die folgenden beiden Übersichten.

Hybridisierungspuffer *Master Mix*

Reagenzien	Firma	Menge
SSC (5x Konzentration)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	2250 µl
Formamid deionisiert	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	2250 µl
Hefe-t-RNA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	500 µg
<i>Herring Sperm</i> DNA	Promega GmbH, Mannheim	50 µl
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate Solution)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	23 µl
<b>Gesamt</b>		<b>5073 µl</b>

Das Gemisch wurde aufgeschüttelt und bei 4°C gelagert.

**Mischverhältnisse Sonden und Hybridisierungspuffer**

<b>Master Mix</b>	<b><i>anti-sense</i>- Sonde</b>	<b>Block- Sonde</b>	<b>Hybridisierungs- puffer</b>
<b>a. GAPDH <i>anti-sense</i></b>	2,5 µl	-	22,5 µl
<b>b. CSN1S1 <i>anti-sense</i></b>	10 µl	-	90 µl
<b>c. keine Sonden</b>	-	-	22,5 µl
<b>d. CSN1S1 <i>anti-sense</i> + CSN1S1-Block</b>	1,25 µl	1,25 µl	22,5 µl
<b>e. GAPDH <i>anti-sense</i> + CSN1S1-Block</b>	1,25 µl	1,25 µl	22,5 µl

Anschließend wurden 10 µl Diethyl Pyrocarbonat (DEPC, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) mit 90 µl 70% Ethanol zu einer Lösung vermischt. Als nächstes wurde die Zellsuspension auf mehrere Falcon-Röhrchen aufgeteilt. Pro 100 µl Zellsuspension wurden jetzt 2 µl der DEPC-Lösung dazugegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das DEPC hatte die Funktion, durch unerwünschte Kontamination eingeschleuste RNasen zu inaktivieren. Danach wurde bei 900 g und 16°C für 7 min zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Heraeus Sepatech GmbH). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit Proteinase K (Proteinase K recombinant, Roche Diagnostics GmbH) behandelt. Dies wurde, wie in Teil 3.8.4 beschrieben, mit allen Röhrchen durchgeführt. Die Proteinase K sollte wieder bewirken, dass die Zellen für die Sonden permeabilisiert werden. Die Zellen, die zuvor die RNase-Behandlung erhalten hatten, wurden folglich zweimal mit Proteinase K behandelt. Mittels zweier Waschschriffe mit HBSS wurde die Proteinase herausgespült. Als nächstes wurde ein weiterer *Master Mix* angesetzt (siehe *Master Mix* für *in-situ*-Hybridisierung).

**Master Mix für *in-situ*-Hybridisierung**

Reagenz	Hersteller	Menge ( $\mu$ l)
Hank's BSS	PAA Laboratories GmbH	45
SSC-Buffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	45
Formamid Deionized	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	90
<b>Gesamt</b>		<b>180</b>

In jedes der Röhren wurden 15  $\mu$ l des *Master Mixes* für *in-situ*-Hybridisierung und 15  $\mu$ l der verschiedenen in Hybridisierungspuffer gelösten *anti-sense*- bzw. Block-Sonden (siehe Mischverhältnisse Sonden und Hybridisierungspuffer) pipettiert.

Anschließend wurden die fertig pipettierten Falcon-Röhren mit jeweils 30  $\mu$ l Inhalt 4 Stunden bei 60°C im Dunklen im Thermoblock inkubiert. Dann wurden 300  $\mu$ l Hybridisierungspuffer dazupipettiert und weitere 45 Minuten unter gleichen Bedingungen inkubiert.

Darauf folgten vier Waschschrte mit *saline-sodium citrate buffer* (SSC-Puffer) als Hybridisierungslösung in absinkender Konzentration. Zuerst wurde der Puffer in zweifacher Konzentration dazugegeben, um nicht gebundene Bestandteile und den Hybridisierungspuffer herauszuwaschen. Nach jeweils zehn Minuten Inkubation wurde zentrifugiert und dann der Puffer in einfacher, 0,5-facher bzw. 0,125-facher Konzentration hinzugefügt. Durch die Waschschrte mit absinkender Konzentration sollten unspezifische Hybridisierungs-Produkte herausgewaschen und somit die Stringenz (*strigency*) erhöht werden.

Abschließend wurden die Zellen in 0,5 ml HBSS aufgenommen. Die Proben wurden direkt durchflusszytometrisch gemessen (Kapitel 3.9.3) oder bei 4°C, maximal drei Tage, bis zur Messung aufbewahrt. Andere wurden, wie im folgenden Kapitel (3.9.2) erläutert, gesondert gefärbt.

## 3.9 Durchflusszytometrie

### 3.9.1 Übersicht

Die Messungen wurden mit einem FACSort-Zytometer (BD bioscience, San Jose, USA) durchgeführt. Verarbeitet wurden die Daten mit Hilfe der Software CELLquest Version 3.3 (BD bioscience).

Das Messgerät besteht aus einem Flüssigkeitssystem, einem Laserlicht-Generator, einem optischen System mit Messstrahl-Aufbereitung, Messkammer und Emissionsstrahl-Bearbeitung. Bei diesem Verfahren werden in einer Lösung befindliche Zellen durch eine Kapillare an einem Laser vorbeigeleitet. Die dabei entstehende Streuung des Lichtes wird gemessen und zur Berechnung verschiedener Parameter herangezogen. So ist zum Beispiel die Vorwärtslichtstreuung im Engwinkel (FSC= *forward scatter*) ein Maß für das Volumen der Zelle. Die Seitwärtslichtstreuung im rechten Winkel (SSC= *sidewards scatter*) korreliert mit der Granularität der Zelle [80]. Es kann ebenfalls die Fluoreszenzintensität gemessen werden. Dazu können mit Farbstoffen markierte Antikörper an spezifische Oberflächen Strukturen binden, wie zum Beispiel CD-Proteine.

### 3.9.2 Vorbereitung der Proben und Färbung fürs FACS

Von den CD14-positiven Zellen wurden, zur Detektion der Reinheit der Zellpopulation, drei Falcon-Röhrchen mit jeweils 50 µl Zellsuspension für eine FACS-Messung vor der Fixierung abgenommen. Es wurde jeweils 2 ml Cellwash (Becton Dickinson GmbH) hinzugefügt und anschließend bei 1.700 Umdrehungen für 5 min zentrifugiert (im folgenden Abschnitt immer unter gleichen Bedingungen). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen im Pellet wurden mit 500 µl Cytifix (BD bioscience) resuspendiert.

Die Fluoreszenzintensitätsmessung mittels Durchflusszytometrie ist eine relative Methode und bedarf somit eines Bezugswertes, der sogenannten Isotypkontrolle. Die Proben wurden mit einem nicht bindenden Antikörper gleichen Isotyps wie der spezifische Antikörper versetzt. In diesem Fall wurde dafür der PE-markierte *mouse* IgG1 Antikörper (BD bioscience) verwendet.

Zur Bestimmung der Reinheit wurden die Zellen mit dem *mouse* CD45-PE Antikörper (BD bioscience) gefärbt. Dieser wurde ausgewählt, da er unter anderem gut mit dem

LCA (*leucocyte common antigen*) auf Monozyten reagiert. Es ergab sich folgender Versuchsaufbau.

### FACS-Färbung vor Fixierung

	Röhrchen 1	Röhrchen 2	Röhrchen 3
<b>CD14-positive Zellen (vor Fixierung)</b>	Zellen (ohne Antikörper)	Zellen + 20µl IgG1-PE AK	Zellen + 20µl CD45-PE AK

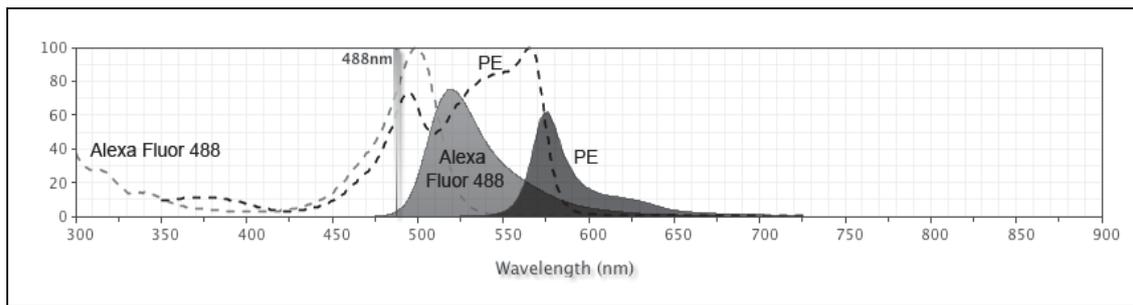
Die Röhrchen wurden ge“vortext“ und für 15-30 min im Dunklen inkubiert, um eine stabile Antikörperbindung zu erhalten, und anschließend wieder gevortext.

Um die nicht gebundenen Antikörper herauszuwaschen, folgten zwei Waschschrte, in denen jeweils 2 ml Cellwash dazugegeben, zentrifugiert und anschließend die Flüssigkeit abgeschüttet wurde. Danach folgte die Resuspendierung in 500 µl Cytotfix.

Im Anschluss wurden die Zellen nach Angaben des Herstellers bei 4°C im Dunklen gelagert oder, wie in Teil 3.9.3 beschrieben, direkt mit Hilfe des Durchflusszytometers FACSort gemessen. Die Daten wurden mit Hilfe der Software CELLquest Version 3.3 ausgewertet.

### 3.9.3 FACS-Messung

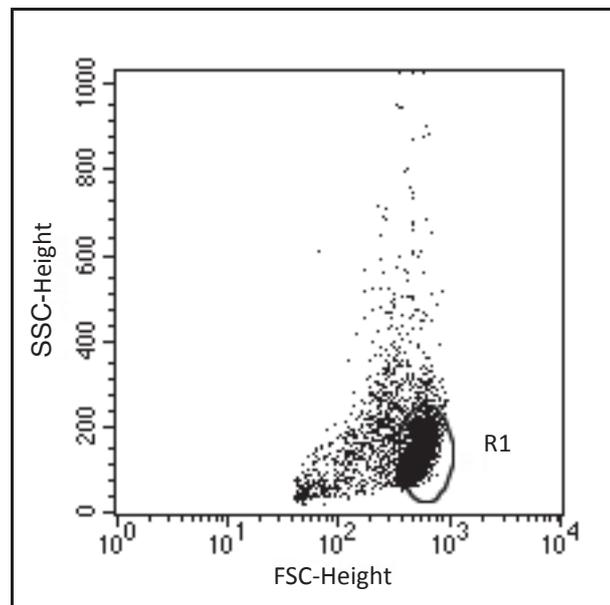
Bei den einzelnen Messungen wurden jeweils ca. 10.000 Zellen oder für eine Dauer von zwei Minuten gemessen. Gemessen wurden die Fluoreszenzen von ALEXA Fluor 488 (FL1-Height) und PE (Phycoerythrin) (FL2-Height). Diese sind gut geeignet, da sich ihre Emissionsspektren nur gering überschneiden und sie aufgrund ihrer relativ kleinen Molekülgröße die Zelle gut penetrieren können. ALEXA Fluor 488 leuchtet cyan-grün. Die Absorption liegt bei 495 nm und die Emission bei 519 nm. Laut Angaben des Herstellers BD Bioscience ist es außerdem pH-stabiler und lichtbeständiger als andere Fluorescine (z.B. FITC). PE hingegen leuchtet rot, die Emission liegt bei ca. 576 nm, und die Absorptionsmaxima liegen bei 495 nm und 566 nm (siehe Abb. 3).



**Abb. 3: Emission und Absorption von ALEXA Fluor 488 und PE**

Ausgefüllte Kurven repräsentieren die Emission in (%) in Abhängigkeit von der Wellenlänge, gestrichelte Linien stellen die Absorption da, die senkrechte graue Linie (488nm) stellt die Wellenlänge des Lasers da. (Mit freundlicher Genehmigung von BD Biosciences Deutschland. [http://www.bdbiosciences.com/research/multicolor/spectrum\\_viewer/index.jsp](http://www.bdbiosciences.com/research/multicolor/spectrum_viewer/index.jsp), 10.11.2014, als Grafik in Graustufen modifiziert)

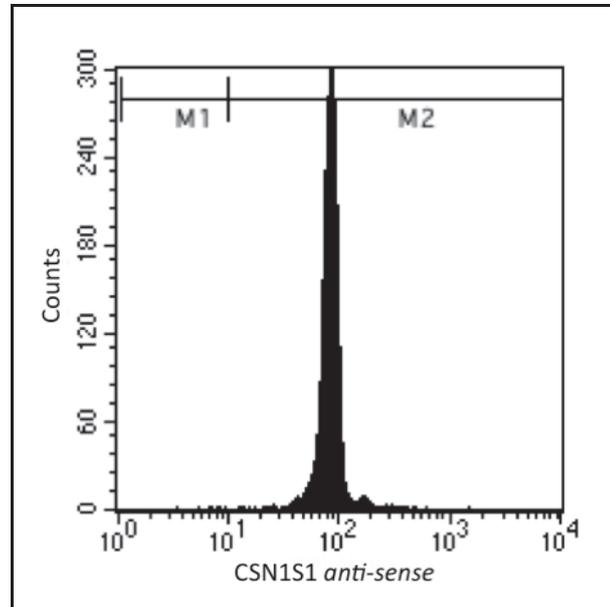
Die Proben einer Zellfraktion wurden mit Hilfe des FACSort-Zytometers gemessen. Im *Dotplot*-Diagramm wurden die ungefärbten Zellen dargestellt. Es wurde die SSC-Height als Maß für das Volumen der Zelle gegen die FSC-Height als Maß für die Granularität aufgetragen. Die Zellen, in der für den bestimmten Zelltyp spezifischen Region, in diesem Beispiel der HL60-Zellen, wurden *gated*, d.h. für weitere Auswertungen digital selektioniert (siehe Abb. 4).



**Abb. 4: Dotplot-Diagramm SSC-Height vs. FSC-Height**

SSC-Height = *forward scatter*; FSC-Height = *sideways scatter*, R1 = Die Zellen in der für HL60-Zellen spezifischen Region wurden *gated*.

Im Histogramm wurden dann jeweils die Zellzahl (*Counts*) auf der Ordinate gegen die Fluoreszenzintensität von ALEXA 488 oder die grüne Eigenfluoreszenz (FL1-Height) auf der Abszisse aufgetragen (siehe Abb. 5).



**Abb. 5: Histogramm CSN1S1 anti-sense (FL1-Height) vs. Counts**

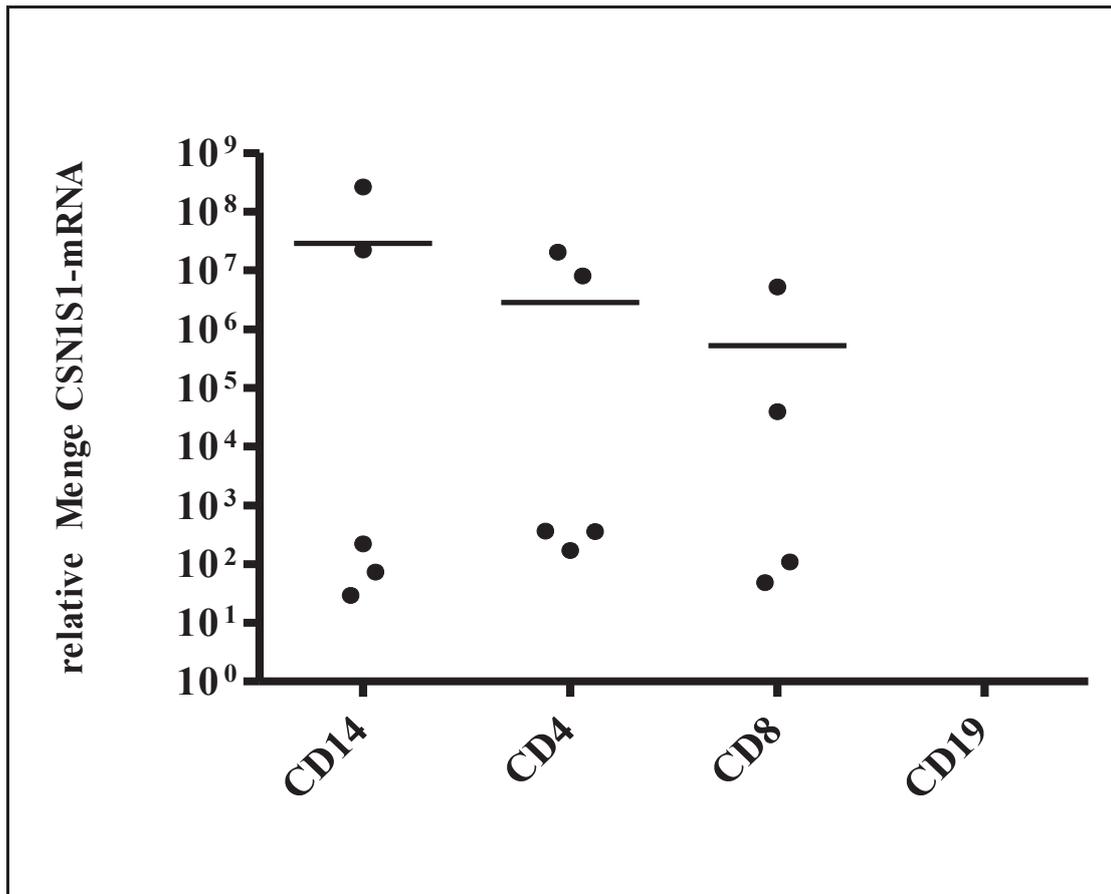
CSN1S1 *anti-sense* = ALEXA Fluor 488 mittels *anti-sense*-Sonden an CSN1S1 mRNA gebunden, Counts = Zellzahl, die Marker M1 und M2 wurden anhand der Isotypkontrolle festgelegt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 CSN1S1-mRNA-Expression

#### 4.1.1 CSN1S1 Detektion in Leukozyten

Zur Feststellung, ob humane Leukozyten CSN1S1 exprimieren, wurde fünf gesunden erwachsenen Spendern venöses Blut entnommen, um daraus anschließend CD14-positive Monozyten, CD4- und CD8-positive T-Lymphozyten und CD19-positive B-Lymphozyten mit Hilfe des MACS-Verfahrens zu separieren. Die RNA der verschiedenen Zellfraktionen wurde extrahiert und im Anschluss eine *real-time two-steps* RT-PCR durchgeführt. Hierdurch ließ sich CSN1S1-mRNA in Monozyten, CD4- und CD8-positiven Lymphozyten, nicht jedoch in B-Zellen nachweisen. Die mRNA-Menge unterlag dabei interindividuellen Schwankungen (siehe Abb. 6).



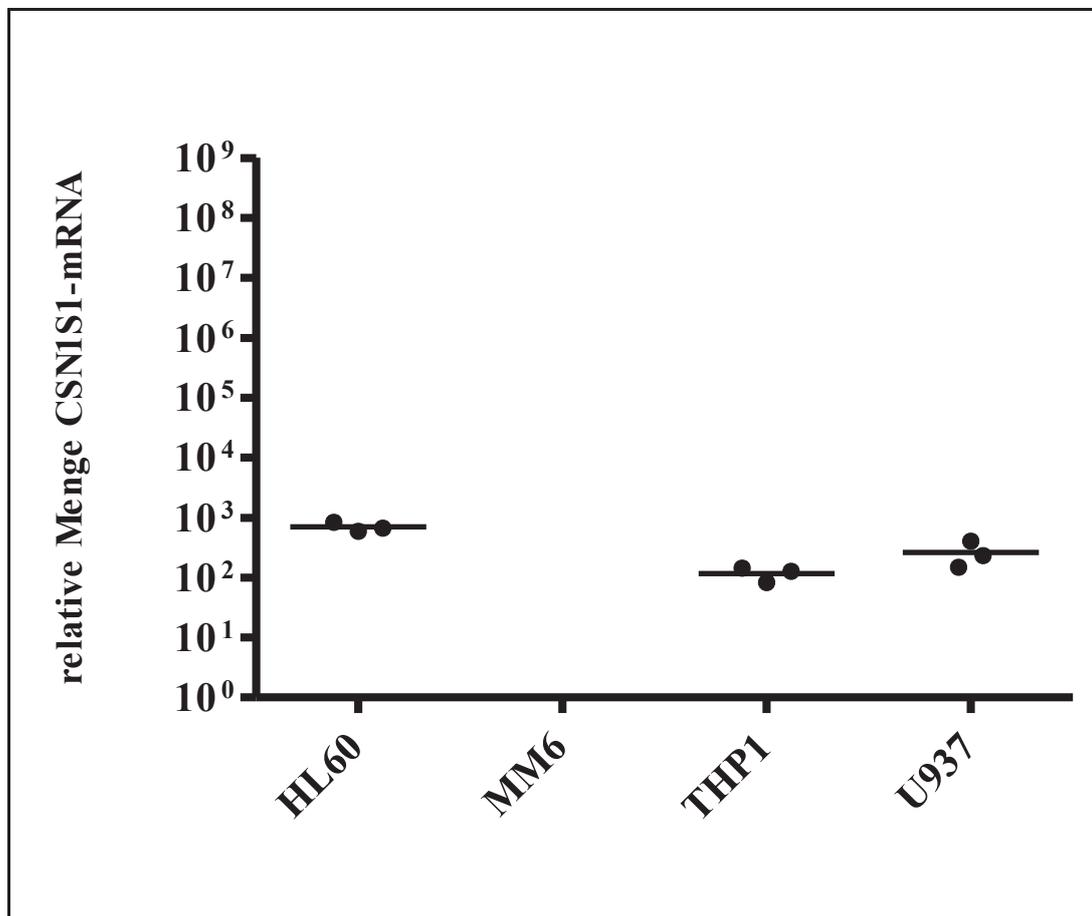
**Abb. 6: CSN1S1-mRNA-Expression in Leukozyten**

Messungen mittels RT-PCR in zuvor mittels magnetischer Zellseparation separierten CD14-, CD4-, CD8-, CD19- positiven Leukozyten fünf gesunder erwachsener Spender. Punkte repräsentieren den mittleren individuellen Messwert. Horizontale Balken stellen den Median der Gruppe da. [81]

#### 4.1.2 CSN1S1 Detektion in leukozytären Tumorzelllinien

Zur weiteren Untersuchung, ob auch leukozytäre Zellen CSN1S1 mRNA exprimieren, wurden folgende humane Zelllinien untersucht: Die promyelozytische Leukämie-Zelllinie HL60, die histiozytische Lymphom-Zelllinie U937, die akute monozytische Leukämie-Zelllinie THP1 und die Monozyten Leukämie-Zelllinie MM6. Unter gleichen Bedingungen wie bei den zuvor untersuchten humanen Leukozyten wurde die RNA isoliert und im Anschluss eine *real-time two-steps* RT-PCR durchgeführt.

CSN1S1 mRNA konnte dabei in den Zelllinien HL60, U937 und THP1 in vergleichbarem Ausmaß nachgewiesen werden, nicht jedoch in MM6 Zellen (siehe Abb. 7).



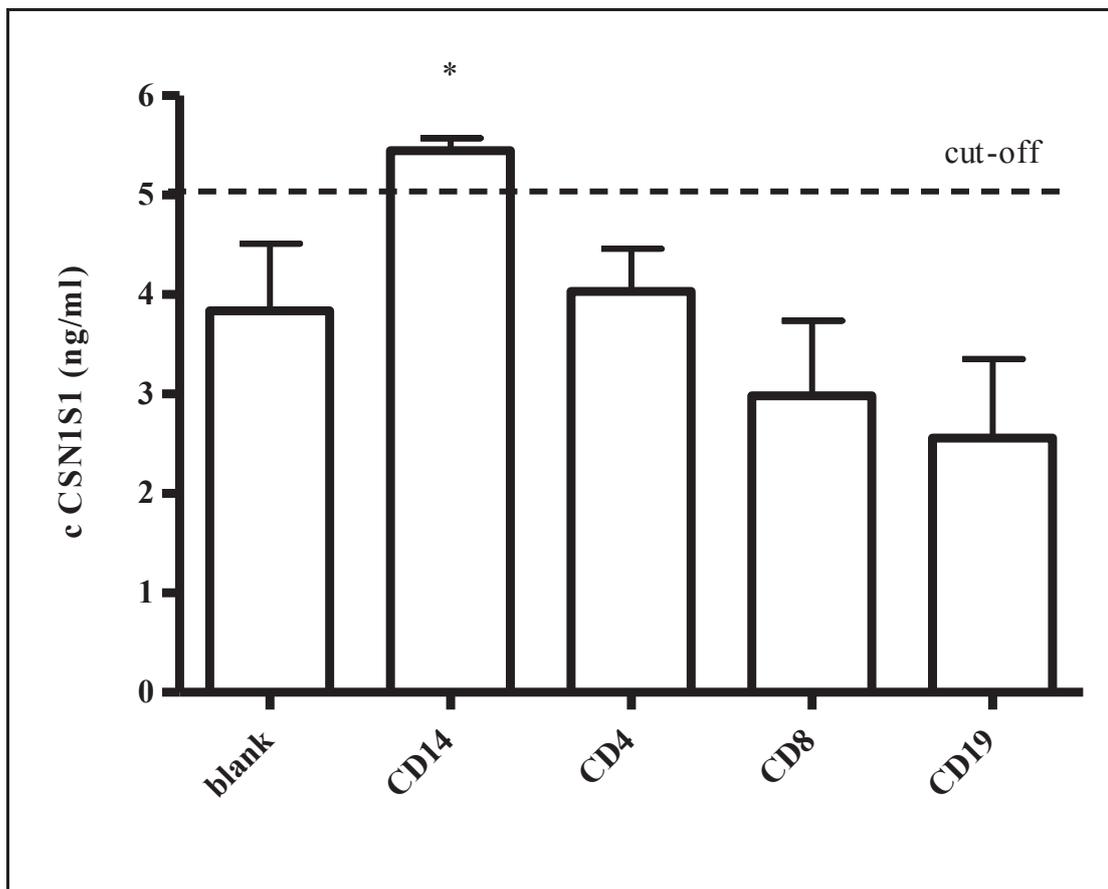
**Abb. 7: CSN1S1-mRNA-Expression in leukozytären Zellen**

Messung von CSN1S1-mRNA in Zellen der leukozytären Tumorzelllinien HL60, MM6, THP1 und U937. Punkte repräsentieren den mittleren individuellen Messwert. Horizontale Balken stellen den Median der Gruppe da. [81]

## 4.2 CSN1S1 Protein-Sekretion

### 4.2.1 CSN1S1 Protein-Sekretion von Leukozyten

Zur Untersuchung, ob diejenigen humanen Leukozyten, die CSN1S1 exprimieren, es auch sezernieren, wurden die Überstände der kultivierten Zellfraktionen mittels eines CSN1S1-ELISAs untersucht. Eine signifikant vom Leerwert erhöhte Menge CSN1S1 ließ sich hierdurch nur bei den CD14-positiven Monozyten nachweisen (siehe Abb. 8).

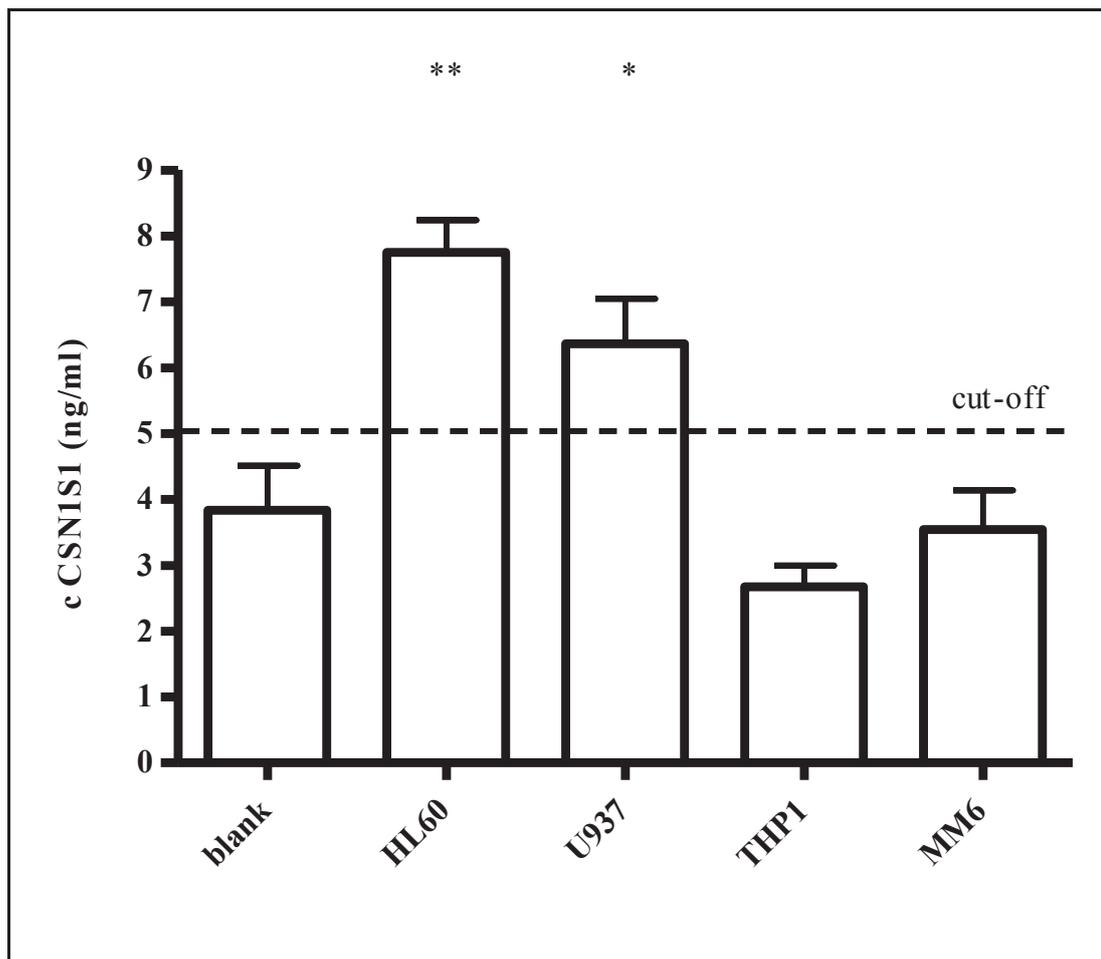


**Abb. 8: CSN1S1 Protein-Sekretion von Leukozyten**

Protein-Messung mittels ELISA in den Überständen von 24 h kultivierten CD14-, CD4-, CD8-, CD19- positiven Leukozyten fünf gesunder erwachsener Spender. Cut-off: Mittlerer Leerwert plus 2 x Standardabweichung (gestrichelte Linie). Balken repräsentieren Mittelwert und Standardabweichung. (\*): ( $p < 0,05$ ). [81]

#### 4.2.2 CSN1S1 Protein-Sekretion von leukozytären Tumorzelllinien

Mit Hilfe des CSN1S1-ELISAs wurden ebenfalls die Überstände der humanen leukozytären Tumorzelllinien HL60, U937, THP1 und MM6 untersucht und überprüft, ob die Zellen CSN1S1 sezernieren. Einen signifikanten CSN1S1-Nachweis ergab sich für die Zellen der promyelozytischen Leukämie-Zelllinie HL60 und der histiozytischen Lymphom-Zelllinie U937, allerdings nicht für die Zellen der monozytischen Zelllinien THP1 oder MM6 (siehe Abb. 9).



**Abb. 9: CSN1S1 Protein-Sekretion von leukozytären Zellen**

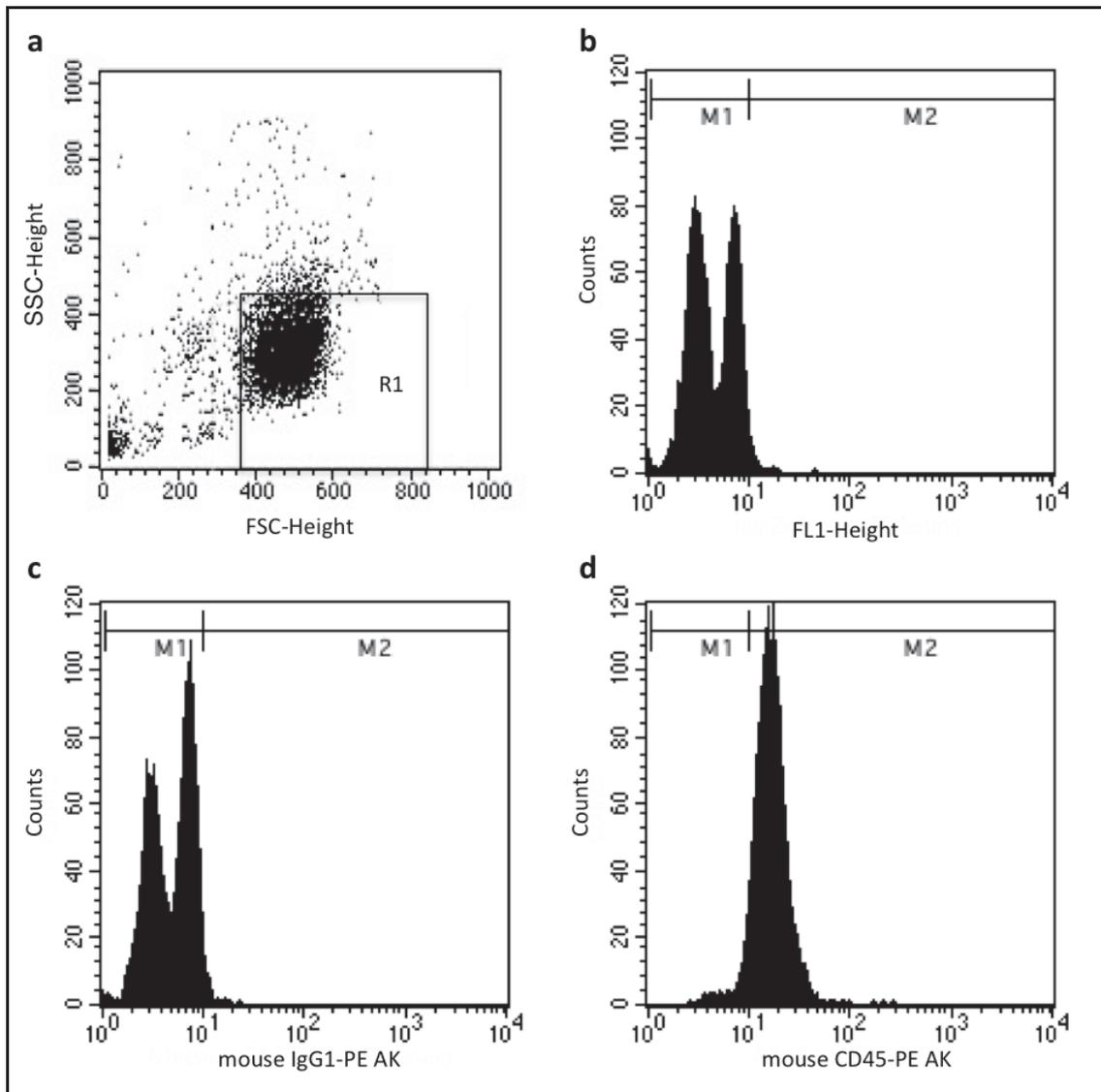
Protein-Messung mittels ELISA in den Überständen der leukozytären Tumorzelllinien HL60, U937, THP1 und MM6 nach 24 h. Cut-off: Mittlerer Leerwert plus 2 x Standardabweichung (gestrichelte Linie). Balken repräsentieren Mittelwert und Standardabweichung. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,005$ . [81]

### 4.3 Flow-Fish: Versuch der Etablierung eines CSN1S1-Nachweises

Im nächsten Schritt wurde versucht, ein schnelles und spezifisches Verfahren zum Nachweis der CSN1S1-Expression auf Einzelzellebene aus Vollblutproben zu etablieren. Hierzu wurden die Verfahren der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung und der Durchflusszytometrie kombiniert (im Weiteren als Flow-Fish bezeichnet).

#### 4.3.1 Detektion der Reinheit der CD14-positiven Zellpopulation mittels FACS

Für die folgenden Flow-Fish Experimente wurden zunächst CD14-positive Monozyten verwendet, welche mittels MACS-Isolierung aus *Buffy-Coats* gesunder Blutspender isoliert wurden. Zur Überprüfung der Reinheit wurde die Zellpopulation im Anschluss durchflusszytometrisch gemessen. Abb. 10 a zeigt die ungefärbten Zellen im *Dotplot*-Diagramm. Die Zellen, die sich in dem für Monozyten spezifischen Bereich befinden, wurden *gated*. In Abb. 10 b-d wurde in der Histogramm-Darstellung die Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der Zellen (*Counts*) aufgetragen. Abb. 10 b zeigt die Intensität der grünen Eigenfluoreszenz der Zellen. In Abb. 10 c ist die Isotypkontrolle dargestellt. Abb. 10 d zeigt eine im Vergleich erhöhte Fluoreszenzintensität der Zellen, die zuvor mit einem Antikörper gegen den Leukozyten-Marker CD45 gefärbt wurden. Die Diagramme zeigen, dass die isolierten und *gatedeten* monozytären Zellen CD45 tragen.



**Abb. 10: Detektion der Reinheit der CD14-positiven Zellpopulation**

Repräsentative FACS-Messung von CD14-positiven Leukozyten, die zuvor mittels magnetischer Zellseparation (MACS) aus Buffy-Coats separiert wurden. (a) ungefärbte Zellen. (b) FL1-Height = grüne Eigenfluoreszenz, Counts = Zellzahl. (c) mouse IgG1-PE AK = Isotypkontrolle. (d) mouse CD45-PE AK = Antikörper gegen den Leukozyten-Marker CD45. Die Marker M1 und M2 wurden anhand der Isotypkontrolle festgelegt.

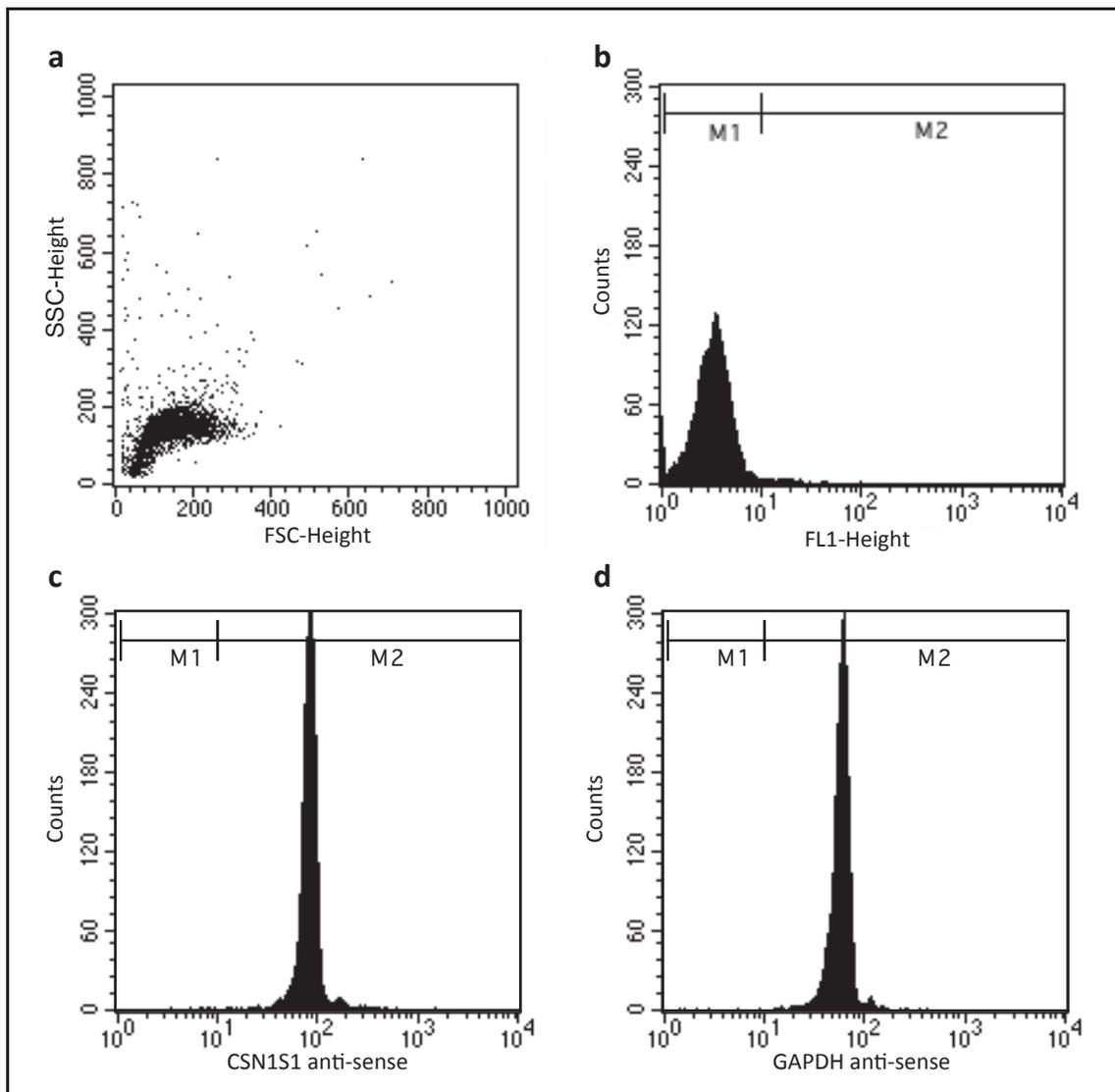
#### 4.3.2 Die Gen-Expression von CSN1S1 und GAPDH CD14-positiver Zellen nach *in-situ*-Hybridisierung

Im Folgenden wurde untersucht, ob mit Hilfe des Flow-Fish Verfahrens ein spezifischer CSN1S1-Nachweis in CD14-positiven Leukozyten möglich ist. Dafür wurden CD14-positive Zellen aus *Buffy-Coats* mittels Polymorphprep-Gradient und MACS-Isolierung separiert und mit fluoreszenzmarkierten Gen-Sonden hybridisiert (siehe Kapitel 3.8.5). Anschließend wurden die Proben durchflusszytometrisch gemessen und die Fluoreszenzintensität der CSN1S1 Gen-Sonden detektiert.

Abb. 11 a zeigt die ungefärbten Zellen als *Dotplot*-Diagramm. Die Zellpopulation befindet sich in dem für Monozyten spezifischen Bereich. In Abb. 11 b wurde in der Histogramm-Darstellung die Intensität der grünen Eigenfluoreszenz dargestellt.

Anschließend wurde eine Bindung der *anti-sense*-Sonde an die CSN1S1-mRNA geprüft, was auf einen Nachweis von CSN1S1 schließen lassen würde. Abb. 11 c veranschaulicht hierzu in der Histogramm Darstellung die Fluoreszenzintensität der Zellen, die mit der fluoreszenzmarkierten CSN1S1 *anti-sense*-Sonde hybridisiert wurden. Die Kurve zeigt eine Bindung der CSN1S1 *anti-sense*-Sonde und legt somit einen CSN1S1-Nachweis nahe.

Im folgenden Abschnitt wurde mittels des *housekeeping*-Gens GAPDH die Spezifität dieses Ergebnis geprüft. Als konstitutiv und sicher in jeder Zelle exprimiertes Gen dient es als Positivkontrolle für das Verfahren und sollte zur Normierung der Quantifizierung dienen. Abb. 11 d zeigt die Fluoreszenzintensität der Zellen, die mit der fluoreszenzmarkierten GAPDH *anti-sense*-Sonde hybridisiert wurden. Die Kurve zeigt eine Bindung der GAPDH *anti-sense*-Sonde und legt somit einen GAPDH-Nachweis nahe.



**Abb. 11: CSN1S1- und GAPDH-Gen-Expression CD14-positiver Zellen**

Die CD14-positiven Leukozyten wurden zuvor mittels magnetischer Zellseparation (MACS) aus *Buffy-Coats* separiert. (a) ungefärbte Zellen. (b) FL1-Height = grüne Eigenfluoreszenz, Counts= Zellzahl. (c) CSN1S1 *anti-sense* = schwarze Kurve, Zellen wurden hybridisiert mit fluoreszenzmarkierter Sonde, die komplementär zur mRNA von CSN1S1 ist. (d) GAPDH *anti-sense* = schwarze Kurve, Zellen wurden hybridisiert mit fluoreszenzmarkierter Sonde, die komplementär zur mRNA von GAPDH ist. Die Marker M1 und M2 wurden anhand der Isotypkontrolle festgelegt.

### 4.3.3 Die Gen-Expression von CSN1S1 und GAPDH in HL60-Zellen nach

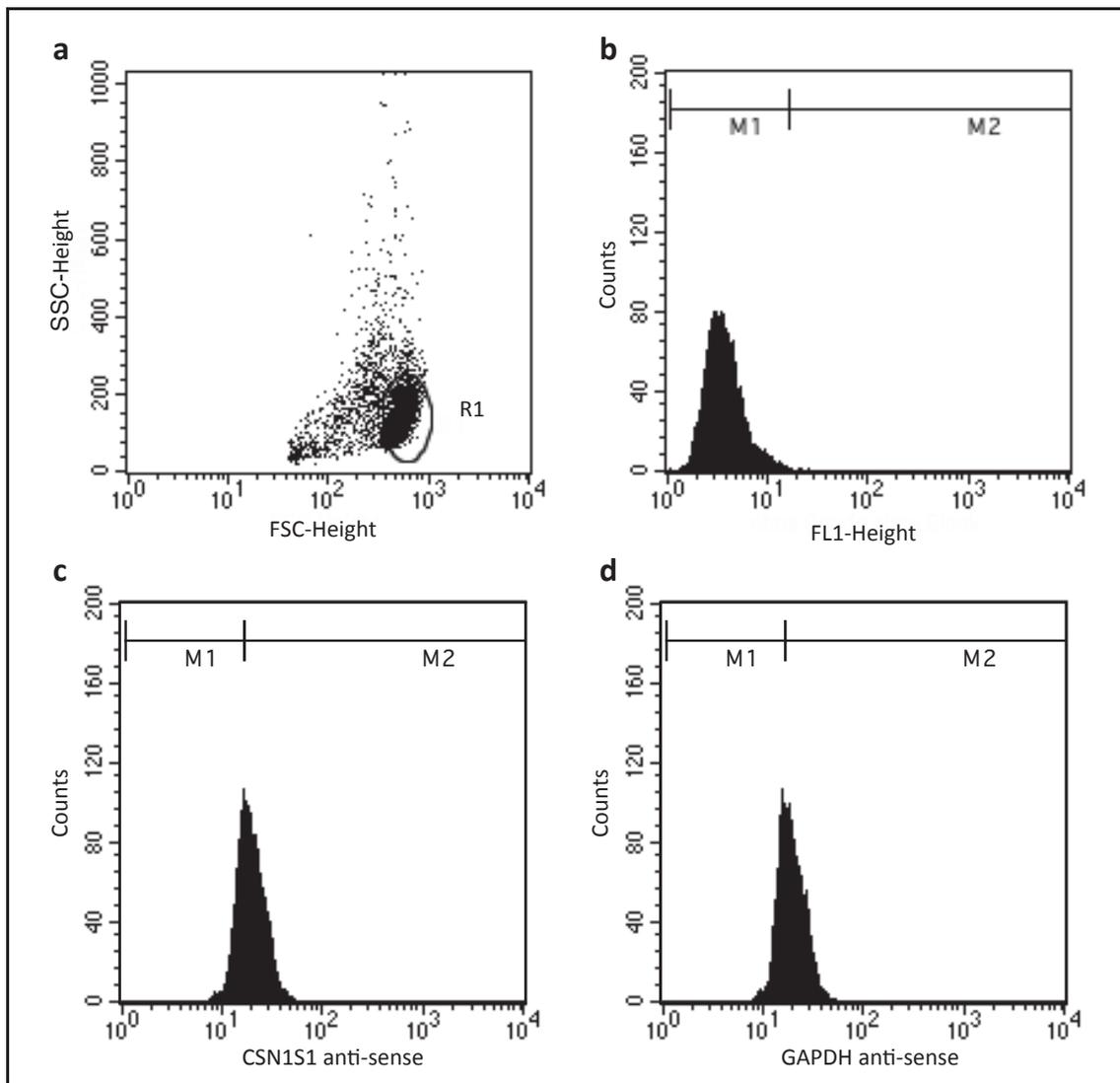
#### Hybridisierung

Da die vorhergehenden Versuche (siehe Kapitel 4.3.2) auf einen CSN1S1-Nachweis schließen lassen, wurde im Folgenden mittels der HL60-Zellen das Flow-Fish Verfahren überprüft. Für die Zelllinie wurde zuvor bereits nachgewiesen, dass sie CSN1S1 exprimiert (siehe Kapitel 4.1.2). Die aus der Zellkultur stammenden Zellen wurden nach gleichem Protokoll wie in Kapitel 4.3.2 mit fluoreszenzmarkierten Gen-Sonden hybridisiert, anschließend durchflusszytometrisch gemessen und die Fluoreszenzintensität der CSN1S1 Gen-Sonden detektiert.

Abb. 12 a zeigt die ungefärbten Zellen als *Dotplot*-Diagramm. Die Zellen in dem für HL60-Zellen spezifischen Bereich wurden *gated*. In Abb. 12 b wurde in der Histogramm-Darstellung die Intensität der grünen Eigenfluoreszenz dargestellt.

Abb. 12 c veranschaulicht den CSN1S1-Nachweis. In der Histogramm-Darstellung wurde dazu die Fluoreszenzintensität der mit der fluoreszenzmarkierten CSN1S1 *anti-sense* Sonde hybridisierten Zellen dargestellt. Wie in dem vorherigen Versuch (siehe Kapitel 4.3.2) sieht man, dass die CSN1S1 *anti-sense*-Sonde bindet, was einen CSN1S1-Nachweis nahelegt.

Im folgenden Abschnitt wurde durch die Positivkontrolle, mittels des *housekeeping*-Gens GAPDH, dieses Ergebnis erneut überprüft. Abb. 12 d zeigt die Fluoreszenzintensität der Zellen, die mit der fluoreszenzmarkierten GAPDH *anti-sense*-Sonde hybridisiert wurden. Die GAPDH *anti-sense*-Sonde bindet ebenfalls und legt somit erneut einen GAPDH-Nachweis nahe.



**Abb. 12: CSN1S1- und GAPDH-Gen-Expression von HL60-Zellen**

(a) ungefärbte Zellen. (b) FL1-Height = grüne Eigenfluoreszenz, Counts= Zellzahl. (c) CSN1S1 *anti-sense* = schwarze Kurve, Zellen wurden hybridisiert mit fluoreszenzmarkierter Sonde, die komplementär zur mRNA von CSN1S1 ist. (d) GAPDH *anti-sense* = schwarze Kurve, Zellen wurden hybridisiert mit fluoreszenzmarkierter Sonde, die komplementär zur mRNA von GAPDH ist. Die Marker M1 und M2 wurden anhand der Isotypkontrolle festgelegt.

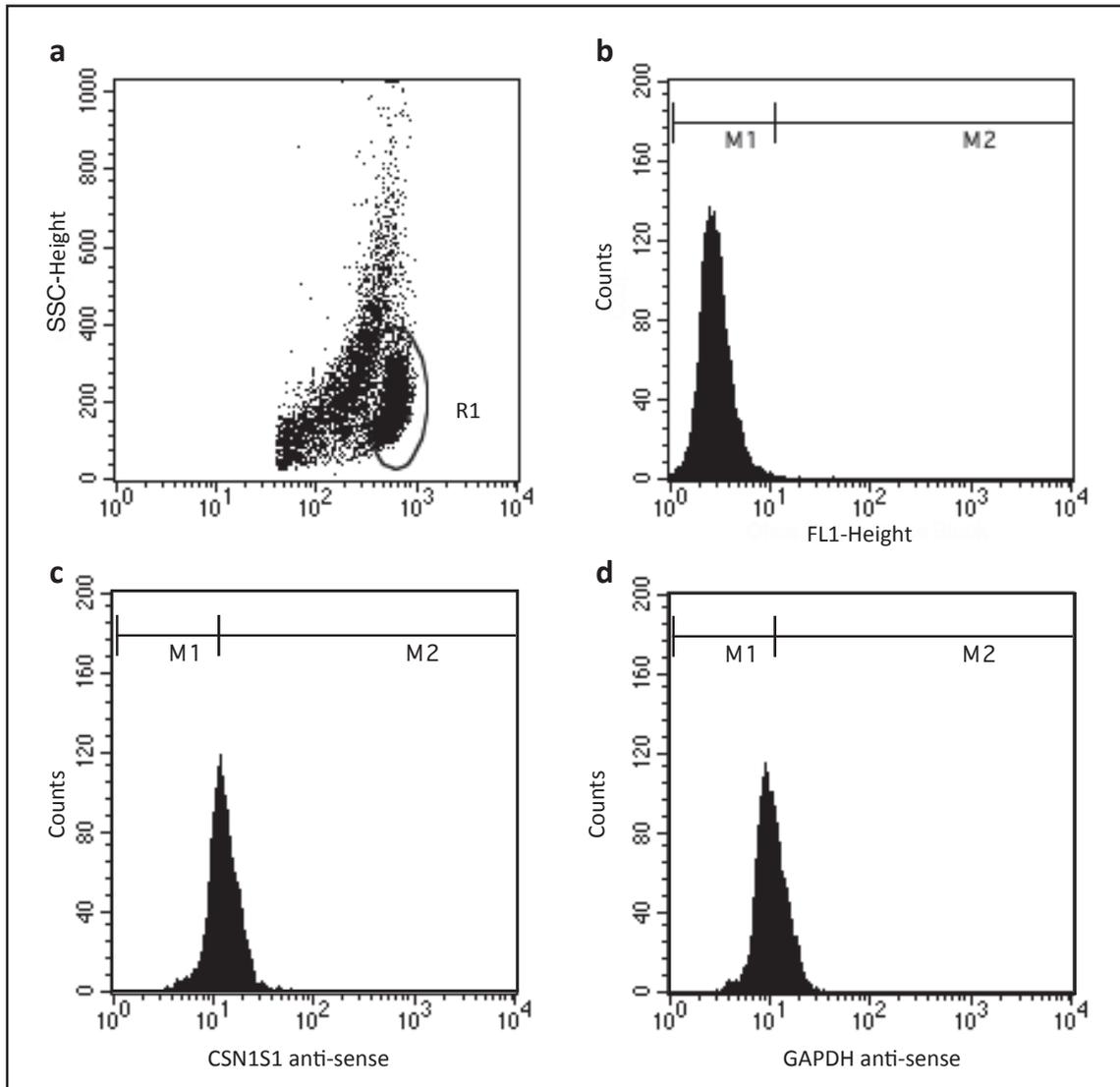
#### 4.3.4 Die Gen-Expression von CSN1S1 und GAPDH in MM6-Zellen nach *in-situ*-Hybridisierung

Zur weiteren Überprüfung der Methodik war der nächste Schritt, anhand einer Negativkontrolle zu zeigen, dass die CSN1S1-Sonde nicht bindet, wenn die entsprechende Gensequenz nicht exprimiert ist. Ein Anstieg des Fluoreszenzniveaus sollte folglich nicht nachweisbar sein. Dafür wurden die aus der Zellkultur stammenden MM6-Zellen verwendet, die nach dem bisherigen Kenntnisstand kein CSN1S1 exprimieren (Kapitel 4.1.2). Sie wurden nach gleichem Protokoll wie in Kapitel 4.3.2 mit den fluoreszenzmarkierten Gen-Sonden hybridisiert, anschließend durchflusszytometrisch gemessen und die Fluoreszenzintensität der Sonden wurde detektiert.

Abb. 13 a zeigt die ungefärbten Zellen als *Dotplot*-Diagramm. Die Zellpopulation in dem für MM6-Zellen spezifischen Bereich wurde *gated*. In Abb. 13 b wurde in der Histogramm-Darstellung die Menge an grüner Eigenfluoreszenz dargestellt.

Die Abbildung Abb 13c zeigt, dass die CSN1S1 *anti-sense*-Sonde wie in den vorherigen Versuchen (Kapitel 4.3.2 – 4.3.3) bindet und legt auch für diese Zelllinie einen CSN1S1-Nachweis nahe.

Im folgenden Abschnitt wurde wie zuvor anhand der Positivkontrolle, mittels des *housekeeping*-Gens GAPDH, überprüft, ob die Sonde an die entsprechende Gensequenz bindet. Abb. 13 d zeigt die Fluoreszenzintensität der Zellen, die mit der fluoreszenzmarkierten GAPDH *anti-sense*-Sonde hybridisiert wurden. Die Sonde bindet und legt somit einen GAPDH-Nachweis nahe.



**Abb. 13: CSN1S1- und GAPDH-Gen-Expression von MM6-Zellen**

(a) ungefärbte Zellen. (b) FL1-Height = grüne Eigenfluoreszenz, Counts = Zellzahl. (c) CSN1S1 *anti-sense* = schwarze Kurve, Zellen wurden hybridisiert mit fluoreszenzmarkierter Sonde, die komplementär zur mRNA von CSN1S1 ist. (d) GAPDH *anti-sense* = schwarze Kurve, Zellen wurden hybridisiert mit fluoreszenzmarkierter Sonde die komplementär zur mRNA von GAPDH ist. Die Marker M1 und M2 wurden anhand der Isotypkontrolle festgelegt.

#### 4.3.5 Wechselwirkungen der CSN1S1 *anti-sense*-Sonde und der CSN1S1 Block-Sonde

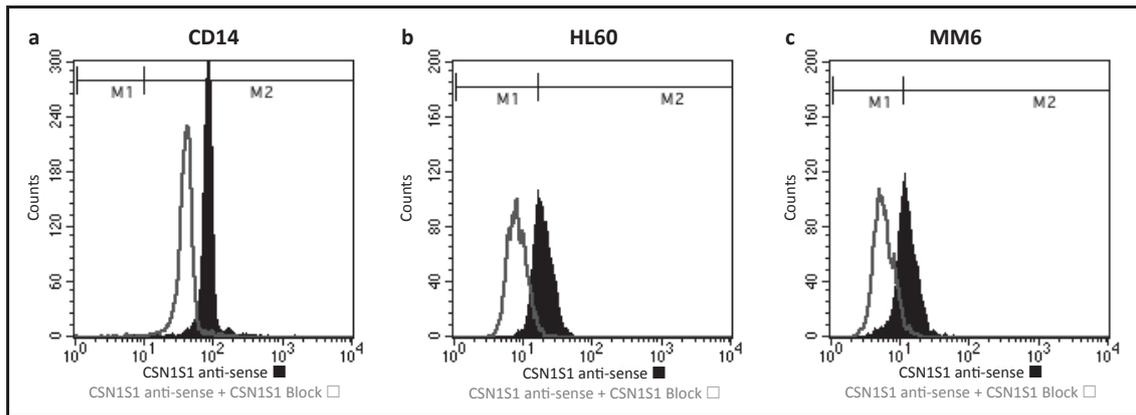
Da die vorherige Versuchsreihe (siehe Kapitel 4.3.4) eine unspezifische Bindung der CSN1S1 *anti-sense*-Sonde annehmen lässt, sollte das Bindungsverhalten im folgenden mittels der unmarkierten CSN1S1 Block-Sonde untersucht werden. Diese Block-Sonde besitzt die gleiche Sequenz wie die CSN1S1 *anti-sense*-Sonde, ist allerdings nicht fluoreszenzmarkiert. Das kompetitive Bindungsverhalten der Sonden soll genutzt werden, potentielle Wechselwirkungen der Sonden untereinander, sowie ein unspezifisches Binden zu erfassen.

CD14-positive, HL60- und MM6-Zellen wurden dazu mit beiden Sonden-Typen hybridisiert, durchflusszytometrisch gemessen und anschließend die Fluoreszenzintensität der Gen-Sonden detektiert.

Abb. 14 a veranschaulicht hierzu in der Histogramm Darstellung zum einen die Fluoreszenzintensität der CD14-positiven Zellen, die mit der fluoreszenzmarkierten CSN1S1 *anti-sense*-Sonde hybridisiert wurden, zum anderen die Fluoreszenz der Zellen, die sowohl mit der fluoreszenzmarkierten CSN1S1 *anti-sense*-Sonde als auch der unmarkierten CSN1S1 Block-Sonde (CSN1S1 *anti-sense* + CSN1S1 Block) hybridisiert wurden. Mittels *Overlay* sieht man zum einen, dass die CSN1S1 *anti-sense*-Sonde bindet und legt somit einen CSN1S1-Nachweis nahe, zum anderen ist ein deutlicher *Shift* der zweiten Kurve nach links sichtbar. Dieses Ergebnis sprach für das erwartete gegenseitige kompetitive Verdrängen der Sonden von der Zielsequenz.

In Abb. 14 b sieht man anhand des *Overlays* ähnliche Ergebnisse für die HL60-Zellen. Die CSN1S1 *anti-sense*-Sonde bindet, was den CSN1S1-Nachweis nahelegt, zum anderen ist erneut ein deutlicher *Shift* der zweiten Kurve nach links sichtbar.

Die folgende Abbildung (Abb. 14 c) zeigt die Negativkontrolle mittels der MM6-Zellen, die nach bisherigem Kenntnisstand kein CSN1S1 exprimieren (siehe Kapitel 4.1.2). Für diese Zellen sollte kein CSN1S1-Nachweis möglich sein, infolgedessen sollte auch die Block-Sonde nicht binden. Die Zellen wurden auf gleiche Art und Weise wie in Abb. 14 a-b mit den verschiedenen Sonden inkubiert. Mittels *Overlay* sieht man, dass die CSN1S1 *anti-sense*-Sonde sowie die CSN1S1 Block-Sonde erneut binden. Ein *Shift* der zweiten Kurve nach links ist sichtbar. Dieses Ergebnis deutet auf ein unspezifisches Binden oder Interagieren sowohl der CSN1S1 *anti-sense* als auch der CSN1S1 Block-Sonde hin.



**Abb. 14: Interaktion der CSN1S1 *anti-sense*-Sonde und CSN1S1 Block-Sonde**

(a-c) Counts = Zellzahl. Overlay: CSN1S1 *anti-sense* = schwarze Kurve, Zellen wurden hybridisiert mit fluoreszenzmarkierter Sonde, die komplementär zur mRNA von CSN1S1 ist. CSN1S1 *anti-sense* + CSN1S1 Block = graue Kurve, Zellen wurden hybridisiert mit fluoreszenzmarkierter Sonde, die komplementär zur mRNA von CSN1S1 ist, und mit unmarkierter Sonde gleicher Sequenz. Überprüft wurden in (a) CD14-positive Zellen. (B) HL60-Zellen. (c) MM6-Zellen. Die Marker M1 und M2 wurden anhand der Isotypkontrolle festgelegt.

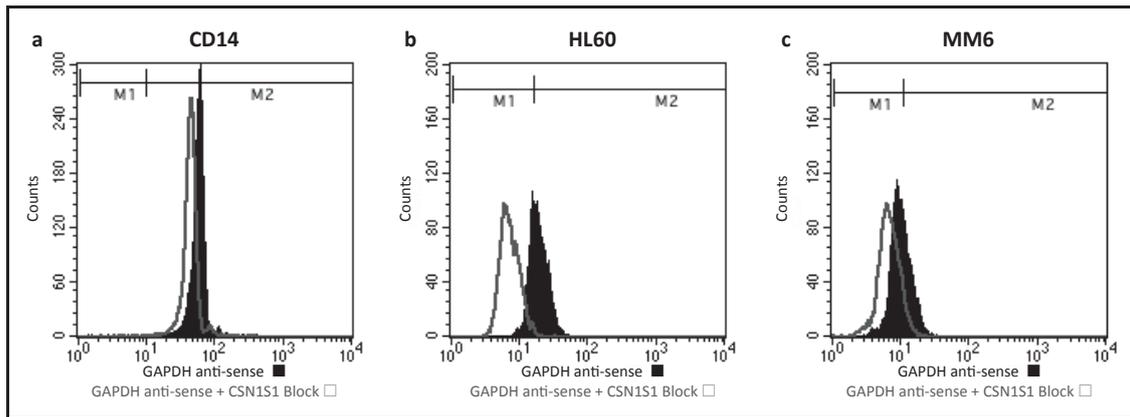
#### 4.3.6 Interaktionen der GAPDH *anti-sense*-Sonde und der CSN1S1 Block-Sonde

Aufgrund der Hinweise, dass die CSN1S1 *anti-sense* Sonde unspezifische Bindung eingeht (siehe Kapitel 4.3.4) und mit der CSN1S1 Block Sonden interagiert (siehe Kapitel 4.3.5) sollte mittels der folgenden Versuchsreihe überprüft werden, ob die Wechselwirkungen der Sonden durch ihre identische Sequenz zu erklären sind.

Dazu wurde als Positivkontrolle das *housekeeping*-Gen GAPDH genutzt, welches als sicher und in jeder Zelle exprimiertes Gen gilt. CD14-positiven, HL60-, sowie MM6-Zellen wurden zum einen mit der fluoreszenzmarkierten GAPDH *anti-sense*-Sonde, zum anderen mit der fluoreszenzmarkierten GAPDH *anti-sense*-Sonde und der unmarkierten CSN1S1 Block-Sonde (GAPDH *anti-sense* + CSN1S1 Block) hybridisiert. Im Anschluss wurde durchflusszytometrisch die Fluoreszenzintensität der Gen-Sonden detektiert. Bedingt durch die unterschiedliche Gen-Sequenz der GAPDH und CSN1S1 Sonde sollten keine Wechselwirkungen nachweisbar sein.

Abb. 15 a zeigt in der Histogramm Darstellung die Ergebnisse für die CD14-positiven Zellen. Mittels Overlay sieht man, dass die GAPDH *anti-sense*-Sonde bindet, was einen GAPDH-Nachweis nahelegt. Darüberhinaus ist ein *Shift* der zweiten Kurve nach links sichtbar. Dieses Ergebnis war unerwartet und deutet auf Wechselwirkung der beiden Sonden.

Abb. 15 b und 15 c zeigen vergleichbare Ergebnisse. Die HL60- sowie MM6-Zellen wurden auf gleiche Art und Weise wie die CD14-positiven Zellen mit der GAPDH *anti-sense*- und CSN1S1 Block-Sonde hybridisiert. Für beide Zell-Typen gelang wie erwartet der GAPDH-Nachweis. Darüber hinaus zeigte sich ebenfalls ein *Shift* der zweiten Kurve nach links. Auch hier deuten die Ergebnisse auf eine Interaktion der GAPDH *anti-sense* und CSN1S1 Block hin. Besonders ausgeprägt ist der *Shift* bei den HL60-Zellen (siehe Abb. 15 b).



**Abb. 15: Interaktion der GAPDH anti-sense-Sonde und CSN1S1 Block-Sonde**

(a-c) Counts = Zellzahl. Overlay: GAPDH *anti-sense* = schwarze Kurve, Zellen wurden hybridisiert mit fluoreszenzmarkierter Sonde, die komplementär zur mRNA von GAPDH ist. GAPDH *anti-sense* + CSN1S1 Block = graue Kurve, Zellen wurden hybridisiert mit fluoreszenzmarkierter Sonde, die komplementär zur mRNA von GAPDH ist, und mit unmarkierter Sonde die komplementär zur mRNA von CSN1S1 ist. Überprüft wurden in (a) CD14-positive Zellen. (B) HL60- Zellen. (c) MM6-Zellen. Die Marker M1 und M2 wurden anhand der Isotypkontrolle festgelegt.

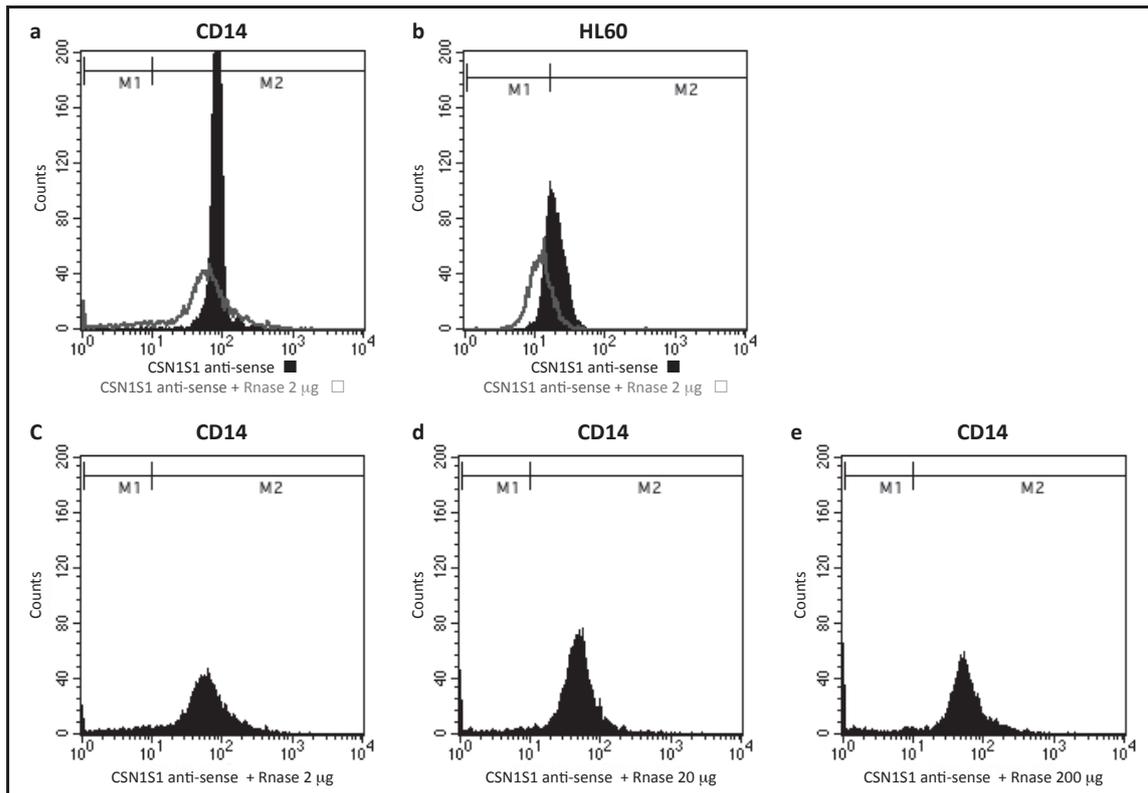
#### 4.3.6.1 RNase-Behandlung zur Überprüfung unspezifischer Bindungen der CSN1S1 Sonde

Die vorhergehenden Versuchsreihen (Kapitel 4.3.4 – 4.3.6) lieferten Hinweise auf ein unspezifisches Binden der Sonden. Im folgenden Teil sollte deshalb geklärt werden, ob die Sonden die Zellmembran durchdringen und Interaktionen im Zellinneren mit unspezifischer mRNA eingehen.

Um jegliche mRNA zu eliminieren wurden dafür die Zellen mit RNase vorbehandelt, und im Anschluss mit der fluoreszenzmarkierten CSN1S1 *anti-sense*-Sonde hybridisiert. Nach dem Verdau der mRNA sollten die Sonden folglich nicht mehr in der Lage sein zu binden und nur eine sehr geringe Fluoreszenz messbar sein. Im Histogramm wurde die Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl (*Counts*) aufgetragen.

Abb. 16 a-b vergleicht im *Overlay* die Fluoreszenzen von Zellen, die mit der CSN1S1 *anti-sense*-Sonde hybridisiert wurden, und Zellen, die zuvor außerdem mit 2 µg RNase behandelt wurden (CSN1S1 *anti-sense* + RNase 2 µg). Dabei zeigt sowohl die Kurve der mit RNase vorbehandelten CD14-positiven Zellen (Abb. 16 a) als auch die Kurve für die mit RNase vorbehandelten HL60-Zellen (Abb. 16 b) eine Abnahme der Fluoreszenz. Dieser *Shift* der Kurve nach links war wiederholt nachweisbar und vereinbar damit, dass weniger mRNA vorlag und somit weniger Sonden binden konnten. Diese Abnahme der Fluoreszenz weist darauf hin, dass die Sonden das Innere der Zelle erreichen und an RNA binden. Der *Shift* war allerdings geringer als erwartet, da davon ausgegangen wurde, dass die RNase weitestgehend die gesamte mRNA verdauen würde.

Zur Überprüfung, ob eventuell die RNase-Dosis nicht ausreichend war, wurden dann die Proben der CD14-positiven Zellen mit RNase in ansteigenden Verdünnungen von 2 µg/ml, 20 µg/ml und 200 µg/ml behandelt. Unabhängig von der RNase-Dosis gehen die Sonden allerdings eine Verbindung ein und eine Fluoreszenz ist messbar (Abb. 16 c-e). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Sonden zum einen unspezifische Bindungen mit RNA, darüber hinaus aber auch mit weiteren Strukturen, wie beispielsweise DNA oder Proteinen eingehen, was in Kapitel 5.8 diskutiert wird. Ein spezifischer Nachweis der CSN1S1-Expression in Vollblutproben ist folglich mittels des Flow-Fish-Verfahrens nicht möglich.



### Abb. 16: RNase-Behandlung zur Überprüfung unspezifischer Bindungen

(a-b) Overlay: CSN1S1 *anti-sense* = schwarze Kurve, Zellen wurden hybridisiert mit fluoreszenzmarkierter Sonde, die komplementär zur mRNA von CSN1S1 ist. CSN1S1 *anti-sense* + RNase 2 µg = graue Kurve, Zellen wurden mit 2 µg/ml RNase vorbehandelt und im Anschluss mit gleicher Sonde hybridisiert. Counts = Zellzahl. (a-c) CD14-positive Zellen wurden mit ansteigenden Verdünnungen (2, 20, 200 µg/ml) RNase vorbehandelt und anschließend mit der CSN1S1 *anti-sense* Sonde hybridisiert. Die Marker M1 und M2 wurden anhand der Isotypkontrolle festgelegt.

## 5 Diskussion

### 5.1 Übersicht

Es wurde lange angenommen, dass der einzige Produktionsort der Caseine beim Menschen die Epithelzellen der laktierenden Mamma seien [10]. Folgende Forschungsergebnisse beschreiben darüber hinaus immunmodulatorische Eigenschaften von CSN1S1, welche zu der Hypothese führen, dass CSN1S1 aus bisher ungeklärtem Grund von Zellen des Immunsystems exprimiert wird: Dafür sprechen der Nachweis von Casein in Lymphknoten von Mäusen mit experimenteller Enzephalomyelitis [25], erhöhte Casein-Serumspiegel im Blut von MS-Patienten [25], die Assoziation von Casein und Auto-Immunkrankheiten wie Diabetes und SLE [59, 61, 65] sowie der Expressions-Nachweis von CSN1S1 in Gewebe von Patienten mit benigner Prostatahyperplasie [22] und Prostata-Karzinom [67].

Vor diesem Hintergrund ergab sich die Fragestellung, ob humane Leukozyten und leukozytäre Zellen CSN1S1 exprimieren und sezernieren. Um dies zu klären, wurde nach Verfahren gesucht, um CSN1S1 spezifisch auf Gen- und Protein-Ebene für verschiedene Zelltypen nachzuweisen.

In dieser Arbeit gelang mittels *real-time* RT-PCR der Nachweis, dass CSN1S1 von Monozyten, T-Zellen und leukozytären Zelllinien exprimiert wird. Außerdem konnte die Sezernierung des entsprechenden Proteins mit Hilfe eines CSN1S1-Sandwich-ELISAs für Monozyten und die leukozytären Zelllinien HL60 und U937 nachgewiesen werden. Die Ergebnisse für das neu etablierte Flow-Fish-Verfahren sind als unspezifisch zu bewerten.

Im Folgenden werden die PCR- und ELISA-Ergebnisse sowie die Auswahl der Zelltypen bzw. Zelllinien erläutert. Anschließend werden die Vor- und Nachteile dieser Verfahren sowie die Ergebnisse der Flow-Fish-Versuchsreihe diskutiert.

### 5.2 CSN1S1-Nachweis in Leukozyten

Um CSN1S1 in Zellen des humanen Immunsystems nachzuweisen, wurden folgende Zelltypen als repräsentative Auswahl für Leukozyten untersucht: Zum einen Monozyten, die als Vertreter der myeloiden Zellreihe gelten und eine Verbindung zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem herstellen. Sie wurden ausgewählt aufgrund

der Erkenntnis, dass Peptiden aus humanem  $\alpha$  s1- und  $\beta$ -Casein ein stimulierender Effekt auf Maus-Makrophagen nachgewiesen wurde [19, 55]. Darüber hinaus konnte Alpha s1-Casein in mononukleären Zellen des peripheren Blutes von Ziegen nachgewiesen wurde [82, 83].

Zum anderen wurden B- und T-Lymphozyten als Vertreter der lymphatischen Reihe und des adaptiven Immunsystems untersucht. Lymphozyten sind in der Vergangenheit mit Autoimmunkrankheiten in Verbindung gebracht worden [58, 84]. Ebenso wurde für Casein ein Zusammenhang mit verschiedenen Autoimmunkrankheiten wie Diabetes, SLE und MS beschrieben [25, 59, 65, 85], was zu der Frage führte, ob Lymphozyten CSN1S1 exprimieren und sezernieren. Aufgrund dieser Hinweise konzentrierte sich diese Arbeit auf die Untersuchung der mononukleären Zellen.

Für CD14-positive Monozyten sowie für CD4- und CD8-positive T-Lymphozyten konnte CSN1S1-mRNA mit Hilfe einer *real-time two-steps* RT-PCR nachgewiesen werden.

Der CSN1S1 Protein-Nachweis mittels ELISA gelang nur aus Überständen von Monozyten und nicht für Lymphozyten.

### 5.3 CSN1S1-Protein-Nachweis in leukozytären Zellen

In weiteren Versuchsreihen wurden vier verschiedene humane monozytäre Zelllinien verwendet. Neben dem Vorteil der unbegrenzten Fortpflanzbarkeit dieser Zelllinien konnten so die verschiedenen Reifestufen oder Ausprägungen der Monozyten auf ihre Eigenschaft hin, CSN1S1 zu produzieren, genauer untersucht werden.

Die MM6-Zellen wurden ursprünglich aus einem Patienten mit akuter monoblastischer Leukämie isoliert [69] und weisen die charakteristischen Merkmale von reifen Monozyten im Blut auf [69, 86]. Allerdings exprimieren die Zellen keine CSN1S1-mRNA, noch sezernieren sie das entsprechende Protein.

Hingegen wird von der Leukämie-Zelllinie HL60 [71, 72] CSN1S1-mRNA exprimiert und das Protein sezerniert. Es handelt sich dabei in erster Linie um Promyelozyten, Entwicklungsstufen der myeloiden Zellreihe [71, 72]. Die Besonderheit dieser Zelllinie macht aus, dass die Zellen durch die Gabe bestimmter Stimulatoren sowohl zu Monozyten als auch zu Granulozyten ausdifferenzieren können [87-89].

Für die Zellen der humanen histiozytischen Lymphom-Zelllinie U937 (DSMZ GmbH, Braunschweig) [73] wurde ebenfalls nachgewiesen, dass sie CSN1S1 exprimieren und

sezernieren. Die Zellen weisen Charakteristika eines frühen Stadiums der monozytären Differenzierung auf [69].

Die THP1-Zelllinie (DSMZ GmbH, Braunschweig) stammt von einem Patienten mit akuter monozytischer Leukämie [70]. Ähnlich wie bei der U937-Zelllinie zeigten auch diese Zellen Charakteristika eines frühen Stadiums der monozytären Differenzierung [69]. CSN1S1-mRNA war ebenfalls messbar, allerdings konnte keine Protein-Sekretion nachgewiesen werden.

Diese Resultate lassen spekulieren, dass die CSN1S1-Expression und -Sekretion abhängig vom Reifestadium der Monozyten ist [81]. So gelang für die Zelllinien HL60, U937 und THP1 der CSN1S1-Gen-Expressions-Nachweis, nicht jedoch für die Zellen der MM6-Zelllinie, welche die Charakteristika reifer Monozyten haben. Der Protein-Nachweis gelang für die Zelllinien HL60 und U937. Da es sich bei den untersuchten Zellen um Tumorzelllinien handelt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Varianz in der CSN1S1-Expression und -Sekretion auch durch unphysiologisches Transkriptions- oder Translations-Verhalten bedingt sein könnte [81].

Für die Belegung der oben genannten Hypothese sind folglich weitere Nachweise nötig. Möglich wäre die weiterführende Untersuchung von Monoblasten, Monozyten und Makrophagen aus humanem Vollblut mittels PCR und ELISA. Zusammenfassend legen diese Ergebnisse allerdings nahe, dass CSN1S1 von humanen Monozyten produziert wird [81].

## 5.4 Isolierung der Zellpopulationen

Die mononukleären Zellen wurden mittels des Zellisolationsmediums Polymorphprep<sup>TM</sup> isoliert. Dieses Verfahren ist gut etabliert und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Das MACS-Verfahren bietet zwei Möglichkeiten der Separation: Durch die sogenannte positive Isolierung kann die gewünschte Zellpopulation entweder magnetisch markiert, zunächst in der Säule zurückgehalten und später außerhalb des magnetischen Feldes eluiert werden, oder alle unerwünschten Zellen werden durch negative Isolierung markiert und zurückgehalten, so dass sich nur die gewünschte Population im Durchfluss befindet. In einer Studie von Mayer et al. (2011) konnte zwar ein Vorteil bezüglich der Reinheit der Zellfraktion für die negative Isolierung gezeigt werden [90], bedingt durch den Versuchsaufbau und die kürzere Durchführungsdauer erwies sich in diesem Fall

allerdings die positive Isolierung als vorteilhafter. Dabei konnten Schritt für Schritt aus einer Probe die gewünschten Zellpopulationen isoliert werden, zuerst die CD14-positiven Monozyten, dann die CD4-positiven T-Lymphozyten, die CD8-positiven T-Lymphozyten und abschließend die CD19-positiven B-Lymphozyten.

Im Rahmen der Flow-Fish-Versuchsreihe wurden auf diese Art und Weise CD14-positive Zellen aus Buffy-Coats isoliert. Im Anschluss wurde die Reinheit der Zellpopulation mittels Durchflusszytometrie überprüft und bestätigt (siehe Abb. 10).

## 5.5 CSN1S1-Nachweis mittels *real-time* RT-PCR

Mit der hier durchgeführten *real-time* RT-PCR konnte ein CSN1S1-mRNA-Nachweis aus peripherem humanem Blut etabliert werden. Das Verfahren ist reproduzierbar und durch die Verwendung von speziell designten *Primern*, deren Sequenz Exon-übergreifend ist, ist sowohl die Vervielfältigung von abweichenden Gensequenzen als auch von genomischer DNA sehr unwahrscheinlich [81]. Als CSN1S1-*Primer* wurden sequenzspezifische, komplementäre und gegenläufige Oligonukleotide zweier verschiedener Exons verwendet (siehe Kapitel 3.6.2).

Abhängig von der CSN1S1-Gen-Sequenz, der Länge des Matrizen-Strangs und der *Primer* wurden die Temperaturen für die jeweiligen PCR-Schritte angepasst (siehe 3.6.4) [91]. Während der *annealing*-Phase kann eine zu niedrige Temperatur dazu führen, dass die *Primer* sich auch an Sequenzen binden, die nur teilweise komplementär sind [91]. Es entstehen folglich unspezifische Gen-Produkte. Eine zu hohe Temperatur kann andererseits aber auch dazu führen, dass die *Primer* nicht ausreichend an den Matrizen-Strang binden können [91]. Durch die optimale Temperatur konnte eine hohe Stringenz der *Primer* und damit eine spezifische Amplifikation der gewünschten Gen-Sequenz erreicht werden. Anhand der Schmelzkurvenanalyse konnte die Spezifität der Amplifikation ebenfalls verifiziert werden.

Da alle Zellen gleich behandelt wurden und von gesunden Probanden stammen, lassen sich die unterschiedlich hohen mRNA-Mengen (siehe Abb. 6) vermutlich durch physiologische interindividuelle Schwankungen erklären [81]. Eine mögliche Erklärung wäre auch, dass dies durch eine Aktivierung der Zellen entstanden ist. Es wurde speziell darauf geachtet, die blutgefüllten Vacutainer erschütterungsfrei zu transportieren und das Blut innerhalb von zwei Stunden zu verarbeiten, um eine Stimulation der Zellen durch

unsachgemäße Behandlung auszuschließen. Weiterhin ist eine durch Ungenauigkeiten beim Pipettiervorgang unterschiedliche Ausbeute an isolierter mRNA denkbar. Schwankungen in der mRNA-Menge werden aber bei der relativen Quantifizierung durch Normalisierung mittels des *housekeeping*-Gens GAPDH ausgeglichen.

Otaegui et al. (2007) stellten im Rahmen ihrer Versuchsreihe zu inflammatorischen Prozessen bei Autoimmunerkrankungen die These auf, dass Casein nicht konstitutiv, sondern im Rahmen von immunregulatorischen Prozessen erhöht im Blut vorliegt [25]. Begründet war dies durch die Beobachtung, dass die CSN1S1-Gen-Expression besonders während der Erholungsphase erhöht vorliegt [25].

Eine weitere potentielle Erklärung für unterschiedlich hohe mRNA-Mengen liefern Raj et al., die dieses dadurch erklären, dass mRNA jeweils in kurzen und intensiven Stößen synthetisiert wird [92].

Zur Erklärung der variierenden mRNA-Mengen wären eventuell eine größere Studienpopulation und der Vergleich mit kranken Spendern sinnvoll gewesen. Außerdem müssten longitudinale Messungen der gleichen Patienten zu verschiedenen Tageszeiten durchgeführt werden, um eine eventuelle zirkadiane Rhythmik aufzudecken. Dies wären potentielle Fragestellungen weiterer Versuche.

## 5.6 Protein-Nachweis mittels ELISA

Mit dem durchgeführten CSN1S1-Sandwich-ELISA gelang es, für CD14-positive Monozyten und die leukozytären Zelllinien HL60 und U937 CSN1S1-Protein nachzuweisen. Auffallend war, dass für T-Lymphozyten und THP1-Zellen kein Protein-Nachweis gelang, obwohl zuvor eine CSN1S1-mRNA-Expression mittels PCR nachgewiesen werden konnte. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass diese Zellen das Protein nicht sezernieren. Des Weiteren mag es durch eine zu geringe Sensitivität des ELISAs begründet sein, dass folglich nur für Monozyten quantitative ausreichende Mengen an Protein für einen Nachweis vorliegen [81].

Andere Forschungsmeinungen besagen, dass mRNA-Expression und Protein-Menge nur schlecht korrelieren und eine solche Korrelation sich mit der aktuellen Methodik nicht sicher nachweisen lasse [93].

Ein weiterer Erklärungsansatz sind die vielzähligen und komplizierten posttranslationalen Modifikationen [93]. Denkbar ist, dass dabei durch Veränderungen das Protein unnachweisbar für die verwendeten Antikörper wird [81].

Eine ebenfalls mögliche Erklärung für die Verringerung der Protein-Translation ist der Einfluss von microRNAs [94-96]. MicroRNAs sind ca. 21-23 Nukleotide lang, nicht kodierend und besitzen, je nach Komplementarität zur Ziel-mRNA, die Eigenschaften zur Hemmung der Translation oder Degradation der mRNA [94, 95]. Nach Berechnungen sollen etwa 30 % der Gene des menschlichen Genoms durch microRNAs reguliert sein [97]. Sie sollen dabei auch eine Rolle in der Entstehung von Immunität und Autoimmunität spielen [98, 99]. Für CSN1S1 gab es bisher allerdings nur experimentelle Forschungsarbeiten an Ziegen. Diese liefern Hinweise auf einen Einfluss von Polymorphismen am microRNA-Zielort auf die Casein-Expression [100]. Zum Beweis einer Beeinflussung der humanen CSN1S1-Protein-Translation durch microRNAs sind allerdings erst weitere Forschungsarbeiten nötig.

Eine weitere Begründung ist, dass die Sezernierung von CSN1S1 verschiedener Gewebe pathophysiologischen Veränderungen unterliegt. Hinweise darauf sind zum einen die Arbeiten von Xu et al., in denen CSN1S1 mittels *two-dimensional* Gel-Elektrophorese und *Western Blot* im Prostatasekret und immunhistochemisch in den Prostataepithelzellen von Patienten mit BPH nachgewiesen werden konnte [22, 66].

Zum anderen konnte gezeigt werden, dass die CSN1S1-Gen-Expression in Lymphknoten von Mäusen mit experimenteller Enzephalomyelitis und im Serum von MS-Patienten, nicht jedoch in der gesunden Kontrollgruppe, erhöht vorliegt [25].

Sowohl die PCR als auch der Elisa sind wie dargestellt spezifische Methoden, um CSN1S1-mRNA bzw. das dadurch kodierte Protein nachzuweisen. Die PCR hat eine sehr niedrige Nachweisgrenze. Theoretisch sollte dabei schon ein Molekül zur Vervielfältigung ausreichend sein [101]. Der Elisa hingegen weist das Protein nach, hat dabei allerdings eine höhere Nachweisgrenze. Zum Protein-Nachweis hätte auch ein *Western Blot* verwendet werden können. Beide Verfahren gehören zu der Gruppe der *Immunoassays*, wobei der *Western Blot* den Vorteil hat, dass die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt werden und auch Proteinveränderungen nachgewiesen werden können. Der ELISA hat den Vorteil, dass er zur quantitativen Bestimmung benutzt werden kann, was in diesem Fall gewünscht war.

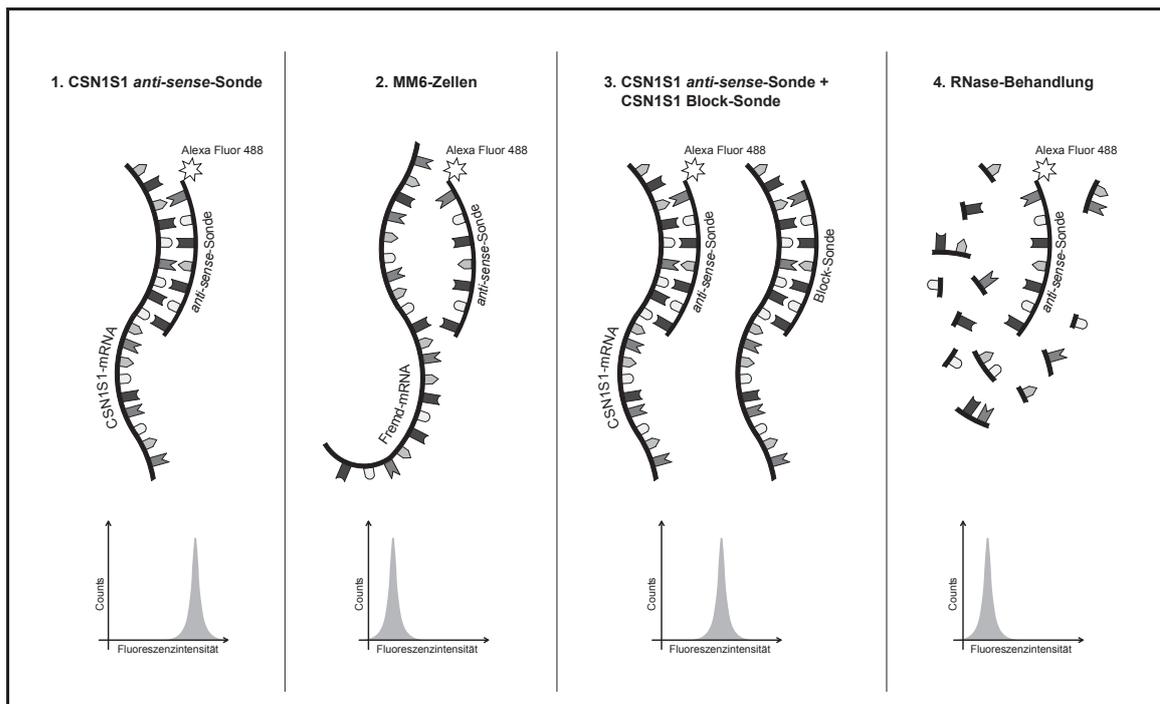
Da der PCR langwierige Schritte wie die RNA-Extraktion und cDNA-Synthese vorausgehen und der ELISA, bedingt durch lange Inkubationszeiten, zeitlich aufwendig ist,

kann keiner der beiden Tests an einem Tag durchgeführt werden. Dies waren Gründe, nach einer Methode zu suchen, mit der man CSN1S1 mRNA auf Einzelzellebene in Leukozyten und leukozytären Zellen spezifisch, quantitativ, reproduzierbar und mit geringem Zeitaufwand aus peripherem Blut nachweisen kann. Diese Kriterien treffen theoretisch auf das Flow-Fish-Verfahren zu und es folgte der Versuch der Etablierung eines neuen Verfahrens.

## 5.7 Unspezifische Ergebnisse bei CSN1S1-Nachweis mittels Flow-Fish

Das Flow-Fish Verfahren basiert auf einer Kopplung von *in-situ*-Hybridisierung und Durchflusszytometrie. Zur quantitativen Bestimmung der Telomerlänge, unter anderem in humanen Granulozyten und Lymphozyten [77], gilt das Verfahren als akkurat und reproduzierbar [77]. Ein Test mittels Flow-Fish kann innerhalb eines Tages durchgeführt werden [78]. Gegenüber den herkömmlichen Verfahren zur Telomerlängen-Bestimmung *Southern Blot* und Q-Fish hat es die Vorteile, dass weniger Zellen benötigt werden, es weniger zeitaufwendig ist und Längenunterschiede noch genauer bestimmt werden können [78, 102]. Zur Telomerlängenbestimmung binden Sonden (*peptic nucleic acid probes*) mittels *in-situ*-Hybridisierung an repetitive Telomersequenzen [77, 78]. Im Anschluss wird die Fluoreszenz durchflusszytometrisch gemessen. Durch Subtrahieren der Eigenfluoreszenz der Zellen kann so die Telomerlänge berechnet werden [75, 78]. Bereits 1992 gelang Lalli et al. durch die Kombination von *in-situ*-Hybridisierung und Flow-Cytometry der GAPDH-Genexpressions-Nachweis in einer Leukämie-Zelllinie [103]. GAPDH wird in die dieser Versuchsreihe als Positivkontrolle verwendet.

In Abb. 17 wird der geplante CSN1S1-mRNA-Nachweis schematisch erläutert, bevor im Anschluss die Ergebnisse und Erweiterungen des Versuchsplans diskutiert werden. Die mit Alexa Fluor 488 markierte CSN1S1 *anti-sense*-Sonde bindet an die Zielsequenz. Dabei wird eine hohe Fluoreszenzintensität mittels Durchflusszytometrie messbar (siehe Abb. 17-1.). Der zweite Teil stellt die Negativkontrolle exemplarisch anhand der MM6-Zellen dar. Da diese Zellen keine CSN1S1-mRNA exprimieren, kann die Sonde demnach nicht binden und die Fluoreszenzintensität ist gering. Der dritte Teil der Abbildung erläutert das erwartete Bindungsverhalten der Proben, wenn diese sowohl mit der CSN1S1 *anti-sense*- als auch der CSN1S1 Block-Sonde inkubiert werden. Bedingt durch ihre gleiche Sequenz konkurrieren sie folglich um die gleichen Bindungsstellen. Es resultiert eine Fluoreszenzabnahme. Abschließend wird das erwartete Ergebnis der RNase-Behandlung erläutert. Die mRNA der Probe ist verdaut und die *anti-sense*-Sonde kann nicht binden. Dies resultiert ebenfalls in einer sehr geringen Fluoreszenzintensität (siehe Abb. 17-4.).



### Abb. 17: geplanter CSN1S1-mRNA-Nachweis

Die Abb. erläutert den geplanten Versuchsaufbau und das zu erwartende Bindungsverhalten der Sonden sowie die daraus resultierende Fluoreszenzintensität.

Zu Beginn der Flow-Fish-Versuchsreihe sollte zuerst die CSN1S1-Gen-Expression für CD14-positive Zellen nachgewiesen werden. Durchflusszytometrisch konnte die Reinheit der isolierten Zellpopulation mit Hilfe des *mouse* CD45-PE Antikörper überprüft und nachgewiesen werden (siehe Abb. 10). Anschließend wurden die Zellen mit der fluoreszenzmarkierten CSN1S1 *anti-sense*-Sonde hybridisiert und die Fluoreszenz durchflusszytometrisch bestimmt.

Das gemessene Fluoreszenzniveau veranschaulicht dabei, dass die CSN1S1 *anti-sense*-Sonde bindet und legt somit einen CSN1S1-Nachweis nahe (siehe Abb. 11 c). Im Anschluss wurde die Positivkontrolle GAPDH untersucht. Als konstitutiv und sicher in jeder Zelle exprimiertes *housekeeping*-Gen sollte es zur Normierung der Quantifizierung dienen. Es wurde erwartet, dass die GAPDH *anti-sense*-Sonde bindet, was auch am Fluoreszenzniveau nachweisbar war (siehe Abb. 11 d).

Äquivalente Ergebnisse konnten für HL60-Zellen gezeigt werden (siehe Abb. 12). Für diese Zelllinie wurde ebenfalls im vorherigen Teil dieser Arbeit nachgewiesen, dass sie CSN1S1 exprimiert.

Da die bisherigen Ergebnisse auf einen CSN1S1-Nachweis schließen lassen, wurde im folgenden Teil das Flow-Fish-Verfahren mittels Negativkontrolle überprüft (siehe Abb.

13). Für die MM6-Zelllinie konnte zuvor mittels PCR eine CSN1S1-Gen-Expression ausgeschlossen werden. Die CSN1S1 *anti-sense*-Sonde sollte folglich auch nicht binden. In Unstimmigkeit dazu zeigt die Abbildung 13 c, dass die CSN1S1 *anti-sense*-Sonde bindet, was auf eine unspezifische Interaktion der Sonde schließen lässt. Es entstehen falsch positive Ergebnisse.

Aufgrund dessen wurde das Bindungsverhalten der CSN1S1 *anti-sense*-Sonde genauer überprüft. CD14-positive, HL60- sowie MM6-Zellen wurden dazu zusätzlich zur CSN1S1 *anti-sense*-Sonde mit der unmarkierten CSN1S1 Block-Sonde inkubiert, durchflusszytometrisch gemessen und anschließend die Fluoreszenzintensität der Gen-Sonden detektiert.

Abbildung 14 a und b zeigen im *Overlay* das erwartete Ergebnis. Bedingt durch die identische Sequenz der Sonden kommt es zur kompetitiven Verdrängung der Sonden von der Zielsequenz. Jeweils dargestellt durch einen *Shift* der zweiten Kurve im *Overlay*.

Auf gleiche Art wurden auch die MM6-Zellen mit beiden Sonden inkubiert. Unerwarteterweise konnte zuvor für die Negativkontrolle gezeigt werden, dass die CSN1S1 *anti-sense*-Sonde bindet (siehe Abb. 13). Abb. 14 c zeigt, dass ebenfalls die CSN1S1 Block-Sonde bindet und es zu einer kompetitiven Verdrängung kommt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Sonden unspezifische Bindungen eingehen und darüber hinaus auch untereinander zu interagieren scheinen.

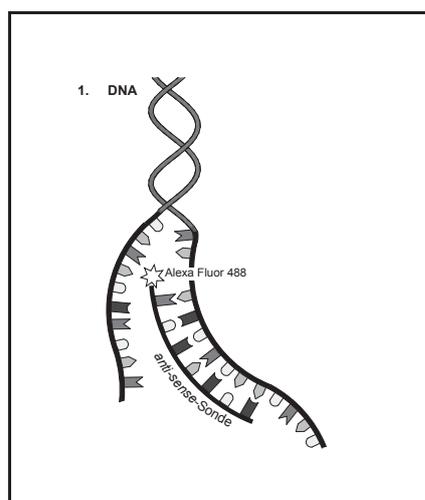
Es folgte eine weitere Versuchsreihe zur Klärung, ob die Sonden bedingt durch ihre identische Sequenz interagieren oder es sequenzunspezifische Wechselwirkungen sind. Dazu wurden CD14-positive, HL60- sowie MM6-Zellen zum einen mit der fluoreszenzmarkierten GAPDH *anti-sense*-Sonde, zum anderen mit der fluoreszenzmarkierten GAPDH *anti-sense*-Sonde und auch mit der unmarkierten CSN1S1 Block-Sonde (GAPDH *anti-sense* + CSN1S1 Block) hybridisiert. Im Anschluss wurden sie durchflusszytometrisch gemessen und die Fluoreszenzintensität der Gen-Sonden detektiert. Im *Overlay* konnte auch hier gezeigt werden, dass es zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität kommt (siehe Abb. 15). Besonders ausgeprägt ist dieser *Shift* bei den HL60-Zellen. Dieses Ergebnis war überraschend, da die verschiedenen Sonden-Typen sequenzspezifisch und Exon-überspannend designed wurden und nur an die entsprechende mRNA binden sollten. Dennoch scheinen die Sonden unabhängig von ihrer Sequenz zu interagieren.

Zur Klärung, ob die Sonden die Zellmembran durchdringen und Interaktionen im Zellinneren mit unspezifischer mRNA eingehen, wurden im anschließenden Teil HL60-

und CD14-positive Zellen mit RNase vorbehandelt. Dadurch sollte die gesamte mRNA verdaut werden und im Anschluss sollten die Zellen mit der fluoreszenzmarkierten CSN1S1 *anti-sense*-Sonde hybridisiert werden. Nach dem Verdau der mRNA sollten die Sonden folglich nicht mehr in der Lage sein zu binden und nur eine sehr geringe Fluoreszenz sollte messbar sein.

Abb. 16 a-b vergleicht im *Overlay* die Fluoreszenzen von Zellen, die mit der CSN1S1 *anti-sense*-Sonde hybridisiert wurden, und Zellen, die zuvor außerdem mit 2  $\mu\text{g}$  RNase behandelt wurden (CSN1S1 *anti-sense* + RNase 2  $\mu\text{g}$ ). Ein *Shift* der zweiten Kurve nach links war wiederholt nachweisbar und vereinbar mit der Annahme, dass weniger mRNA vorlag und somit weniger Sonden binden konnten. Diese Abnahme der Fluoreszenz weist darauf hin, dass die Sonden das Innere der Zelle erreichen und an RNA binden. Der *Shift* war allerdings geringer als erwartet, da davon ausgegangen wurde, dass die RNase weitestgehend die gesamte mRNA verdauen würde.

Zur Überprüfung, ob eventuell die RNase-Dosis nicht ausreichend war, wurden dann die Proben der CD14-positiven Zellen mit RNase in ansteigenden Verdünnungen behandelt. Unabhängig von der RNase-Dosis gehen die Sonden allerdings eine Verbindung ein und eine Fluoreszenz ist messbar (Abb. 16 c-e). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Sonden zum einen unspezifische Bindungen mit RNA, darüber hinaus aber auch mit weiteren Strukturen, wie beispielsweise DNA oder Proteinen eingehen. Abbildung 18 veranschaulicht schematisch das potentielle unspezifische Binden der CSN1S1 *anti-sense*-Sonde an einen DNA-Einzelstrang.



**Abb. 18: Unspezifische Bindung der CSN1S1 *anti-sense*-Sonde**

Die Abb. zeigt die potentiellen unspezifischen Bindungen der Sonde an ein DNA-Molekül

Zusammenfassend legen die Ergebnisse nahe, dass mittels des Flow-Fish Verfahrens ein CSN1S1-Gen-Expressions-Nachweis in Leukozyten und leukozytären Zellen aufgrund unspezifischer Interaktionen der Sonden mit anderen Molekülen nicht möglich ist.

Weitere potentielle Erklärungsansätze und Optimierungsmöglichkeiten werden im Folgenden diskutiert. Die verwendeten Gen-Sonden sind Oligonukleotide, deren Basenabfolge komplementär zur Zielsequenz ist. Die Stabilität der Bindung ist abhängig von einer Reihe von Faktoren: Homologie der Nukleotidsequenz, Länge der Gen-Sonde, Zusammensetzung des Hybridisierungspuffer und Inkubationstemperatur während der Hybridisierung. Die Proben wurden bei 60°C inkubiert. Dabei wurde berücksichtigt, dass zu geringe Temperaturen zu unspezifischen Bindungen und zu hohe zu instabilen Bindungen bei der Hybridisierung führen [104].

Bei der Erarbeitung der Versuchsprotokolle wurde berücksichtigt, dass eine höhere Temperatur sowie Formamid-Konzentration und eine geringere Salz-Konzentration grundsätzlich die Stringenz bei der *in-situ*-Hybridisierung erhöhen können [105]. Auch die anschließenden Waschvorgänge mit SSC-Puffer in absinkender Konzentration wurden speziell so gewählt, um unspezifische Hybridisierungs-Produkte herauszuwaschen und die Stringenz zu erhöhen.

Ferner wurde das Verhältnis von Proben und Sonden abgestimmt und modifiziert, da es durch eine zu hohe Konzentration der Sonden zu unspezifischen Bindungen kommen kann und bei zu geringer Konzentration das Signal zu schwach wird (siehe Kapitel 3.8.5) [78, 104]. Dem Hybridisierungspuffer wurde zusätzlich *Herring Sperm* DNA hinzugegeben, um unspezifische Sequenzen abzusättigen und somit die Sonden mit diesen nicht interagieren können. Es wurden viele Maßnahmen berücksichtigt, um eine hohe Stringenz zu erhalten.

Eine mögliche Erklärung ist, dass sich die Sonden aneinandergelagert und so Hybridisierungs-Produkte gebildet haben. Allerdings sollte dies durch ein bestmögliches Sonden-Design verhindert werden und im Falle von Interaktionen sollten diese Produkte durch die Waschvorgänge herausgewaschen werden und nicht mehr nachweisbar sein. Denkbar ist außerdem, dass die Sonden durch elektrostatische Bindungen an Zytoplasma-Strukturen gebunden haben [105]. In Betracht zu ziehen wäre auch die Verwendung mehrerer verschiedener Sonden, die an unterschiedlichen Stellen der Ziel-DNA binden. Somit könnte eventuell die Gesamtspezifität erhöht werden, indem die geringere Spezifität einzelner Sonden-Typen ausgeglichen wird.

Das 2012 von Kitaoka et al. etablierte Verfahren der Transglutaminase vermittelten *in-situ*-Hybridisierung, mit alkalischer Phosphatase markierten Sonden, bietet ebenfalls potentielle Modifizierungsmöglichkeiten für das Flow-Fish-Verfahren [106].

## 6 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit gelang der Nachweis, dass Monozyten, T-Zellen und leukozytäre Zelllinien CSN1S1 exprimieren. Außerdem konnte die Sezernierung des Proteins für Monozyten und die leukozytären Zelllinien HL60 und U937 nachgewiesen werden.

Die Nachweise von CSN1S1 in Prostatasekret und Gewebe von Patienten mit benigner Prostatahyperplasie [22] und mit Prostata-Karzinom [67], von Casein in Lymphknoten bei Mäusen mit experimenteller Enzephalomyelitis [25] und von erhöhtem Casein-Serumspiegel im Blut von MS-Patienten [25] führten zu der Fragestellung dieser Arbeit. Unter Berücksichtigung der eigenen Ergebnisse stellt sich weiterführend die Frage, welche Zell- und Gewebetypen darüber hinaus CSN1S1 produzieren. Zur Klärung dieser Fragestellung könnten die in dieser Arbeit beschriebenen Verfahren, *real-time* RT-PCR- und CSN1S1-Sandwich-ELISA, verwendet werden. Wie von Xu et al. beschrieben, besteht Interesse an der Erforschung eines CSN1S1-Nachweises aus Vollblut-Proben zur Diagnosefindung bei BPH [22]. Da in dieser Arbeit der Nachweis für Leukozyten und leukozytäre Zellen gelang, wäre eine Weiterentwicklung des Verfahrens in diese Richtung denkbar und eine potentielle Thematik für weitere Arbeiten.

Besonders die Optimierung des Flow-Fish-Verfahrens bietet dabei großes Potential. Neben dem geringen Zeitaufwand kann es auch für Proben verwendet werden, in denen die gewünschte Zielsequenz nur in geringem Maße vorliegt [78, 102].

Da für andere Fragestellungen bereits funktionierende Flow-Fish-Protokolle etabliert wurden, ist es ein potentielles Ziel weiterer Forschungen, das Problem der unspezifischen Bindung der Sonden zu beheben und einen spezifischen und sensitiven CSN1S1-Nachweis mittels dieses Verfahrens zu erreichen.

Weiterführend stellt sich die Frage, auf welchem Wege CSN1S1 Einfluss auf das Immunsystem nimmt. Die Identifizierung des Rezeptors und der Signalkaskade könnte dabei sehr hilfreich sein und weitere Aufschlüsse über die Rolle von CSN1S1 geben. Richtungsweisend ist hier unter anderem die Arbeit von Kampa et al. (1997). Für alpha-S1-Casomorphin konnten durch partielle Interaktion mit Opioid-Rezeptoren, Somatostatin-Rezeptoren und weiteren unbekanntenen Wirkungsweisen antiproliferative Eigenschaften auf Prostatakrebs-Zell-Linien dargestellt werden [67].

Als Hauptmerkmal wurde bisher die nutritive Funktion der Caseine als Milchprotein beschrieben. Aufgrund der erforschten Ergebnisse, dass CSN1S1 von Leukozyten produziert wird, ergibt sich eine neue Fragestellung, aus welchem Grunde dies geschieht.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Cross, M.L. and H.S. Gill, *Immunomodulatory properties of milk*. Br J Nutr, 2000. **84 Suppl 1**: p. S81-9.
2. Goldfarb, M.F., M.S. Savadove, and J.A. Inman, *Two-dimensional electrophoretic analysis of human milk proteins*. Electrophoresis, 1989. **10**(1): p. 67-70.
3. Fiat, A.M., et al., *Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities*. J Dairy Sci, 1993. **76**(1): p. 301-10.
4. Belitz, H.-D., *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Vol. 6. 2008, Berlin: Springer. 1118.
5. Fiat, A.M. and P. Jolles, *Caseins of various origins and biologically active casein peptides and oligosaccharides: structural and physiological aspects*. Mol Cell Biochem, 1989. **87**(1): p. 5-30.
6. Petermann, K., et al., *Autoantibodies to alphaS1-casein are induced by breast-feeding*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e32716.
7. Thomä-Worringer, C., *Caseinomacropptide - fractionation by means of membrane techniques and technological characterization*. 2007, Düsseldorf VDI-Verlag. 151.
8. Clare, D.A., G.L. Catignani, and H.E. Swaisgood, *Biodefense properties of milk: the role of antimicrobial proteins and peptides*. Curr Pharm Des, 2003. **9**(16): p. 1239-55.
9. Fujiwara, Y., et al., *Genomic organization and chromosomal localization of the human casein gene family*. Hum Genet, 1997. **99**(3): p. 368-73.
10. Britton, J.R. and A.J. Kastin, *Biologically active polypeptides in milk*. Am J Med Sci, 1991. **301**(2): p. 124-32.
11. Ginger, M.R. and M.R. Grigor, *Comparative aspects of milk caseins*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 1999. **124**(2): p. 133-45.
12. Rijnkels, M., *Multispecies comparison of the casein gene loci and evolution of casein gene family*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2002. **7**(3): p. 327-45.

13. Mellander, O., *On casein from human and cow's milk and their behaviour on hydrolysis with different proteolytic enzymes; preliminary report*. Acta Paediatr, 1945. **32**(3-4): p. 668-83.
14. Bhattacharyya, J. and K.P. Das, *Molecular chaperone-like properties of an unfolded protein, alpha(s)-casein*. J Biol Chem, 1999. **274**(22): p. 15505-9.
15. Rasmussen, L.K., H.A. Due, and T.E. Petersen, *Human alpha s1-casein: purification and characterization*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 1995. **111**(1): p. 75-81.
16. Johnsen, L.B., et al., *Characterization of three types of human alpha s1-casein mRNA transcripts*. Biochem J, 1995. **309 ( Pt 1)**: p. 237-42.
17. Kunz, C. and B. Lonnerdal, *Casein and casein subunits in preterm milk, colostrum, and mature human milk*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1990. **10**(4): p. 454-61.
18. Kunz, C. and B. Lonnerdal, *Human-milk proteins: analysis of casein and casein subunits by anion-exchange chromatography, gel electrophoresis, and specific staining methods*. Am J Clin Nutr, 1990. **51**(1): p. 37-46.
19. Migliore-Samour, D. and P. Jolles, *Casein, a prohormone with an immunomodulating role for the newborn?* Experientia, 1988. **44**(3): p. 188-93.
20. Shah, N.P., *Effects of milk-derived bioactives: an overview*. Br J Nutr, 2000. **84 Suppl 1**: p. S3-10.
21. Anderson, G.H., *Multifunctional roles of dietary proteins in the regulation of metabolism and food intake: Application to feeding infants*. The Journal of Pediatrics, 2006. **06**.
22. Xu, K., et al., *Evidence of a novel biomarker, alphas1-Casein, a milk protein, in benign prostate hyperplasia*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2006. **9**(3): p. 293-7.
23. Meisel, H. and R.J. FitzGerald, *Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences*. Br J Nutr, 2000. **84 Suppl 1**: p. S27-31.
24. Cavaletto, M., et al., *Human alpha S1-casein like protein: purification and N-terminal sequence determination*. Biol Chem Hoppe Seyler, 1994. **375**(2): p. 149-51.
25. Otaegui, D., et al., *Increased transcriptional activity of milk-related genes following the active phase of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis*. J Immunol, 2007. **179**(6): p. 4074-82.

26. Huq, N.L., et al., *A review of protein structure and gene organisation for proteins associated with mineralised tissue and calcium phosphate stabilisation encoded on human chromosome 4*. Arch Oral Biol, 2005. **50**(7): p. 599-609.
27. Rijnkels, M., et al., *Physical map and localization of the human casein gene locus*. Mamm Genome, 1997. **8**(4): p. 285-6.
28. Yu-Lee, L.Y., et al., *Evolution of the casein multigene family: conserved sequences in the 5' flanking and exon regions*. Nucleic Acids Res, 1986. **14**(4): p. 1883-902.
29. Mercier, J.C. and J.L. Vilotte, *Structure and function of milk protein genes*. J Dairy Sci, 1993. **76**(10): p. 3079-98.
30. Jones, W.K., et al., *The rat casein multigene family. Fine structure and evolution of the beta-casein gene*. J Biol Chem, 1985. **260**(11): p. 7042-50.
31. Swaisgood, H.E., *Review and update of casein chemistry*. J Dairy Sci, 1993. **76**(10): p. 3054-61.
32. Kim, *High-level expression of human alpha s1-casein in Escherichia Coli*. Biotechnology Techniques, 1997. **11**(9): p. 675-678.
33. Franco, O.L., *Peptide promiscuity: an evolutionary concept for plant defense*. FEBS Lett, 2011. **585**(7): p. 995-1000.
34. Nobeli, I., A.D. Favia, and J.M. Thornton, *Protein promiscuity and its implications for biotechnology*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(2): p. 157-67.
35. Kilara, A. and D. Panyam, *Peptides from milk proteins and their properties*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2003. **43**(6): p. 607-33.
36. Ferranti, P., et al., *Casein proteolysis in human milk: tracing the pattern of casein breakdown and the formation of potential bioactive peptides*. J Dairy Res, 2004. **71**(1): p. 74-87.
37. Meisel, H. and R.J. FitzGerald, *Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects*. Curr Pharm Des, 2003. **9**(16): p. 1289-95.
38. FitzGerald, R.J. and H. Meisel, *Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme*. Br J Nutr, 2000. **84 Suppl 1**: p. S33-7.
39. Jorgensen, A.L., H.R. Juul-Madsen, and J. Stagsted, *Colostrum and bioactive, colostrum peptides differentially modulate the innate immune response of intestinal epithelial cells*. J Pept Sci, 2010. **16**(1): p. 21-30.

40. Kitazawa, H., et al., *Enzymatic digestion of the milk protein beta-casein releases potent chemotactic peptide(s) for monocytes and macrophages*. *Int Immunopharmacol*, 2007. **7**(9): p. 1150-9.
41. Ford, J.T., C.W. Wong, and I.G. Colditz, *Effects of dietary protein types on immune responses and levels of infection with Eimeria vermiformis in mice*. *Immunol Cell Biol*, 2001. **79**(1): p. 23-8.
42. Wong, C.W., et al., *Modulation of immune responses by bovine beta-casein*. *Immunol Cell Biol*, 1996. **74**(4): p. 323-9.
43. Aihara, K., H. Ishii, and M. Yoshida, *Casein-derived tripeptide, Val-Pro-Pro (VPP), modulates monocyte adhesion to vascular endothelium*. *J Atheroscler Thromb*, 2009. **16**(5): p. 594-603.
44. Bicer, S., et al., *Induction of muscle weakness by local inflammation: an experimental animal model*. *Inflamm Res*, 2009. **58**(4): p. 175-83.
45. Solymossy, M., et al., *Interaction of casein with human polymorphonuclear cells*. *Biochem Med Metab Biol*, 1986. **35**(3): p. 293-301.
46. Lewis, S.L. and D.E. Van Epps, *Demonstration of specific receptors for fluoresceinated casein on human neutrophils and monocytes using flow cytometry*. *Inflammation*, 1983. **7**(4): p. 363-75.
47. Katagiri, T., et al., *Alpha-casein-binding proteins of guinea pig macrophage membranes and their possible roles in chemotaxis*. *J Biochem*, 1980. **87**(5): p. 1421-30.
48. Van Epps, D.E., A.D. Bankhurst, and R.C. Williams, Jr., *Casein-mediated neutrophil chemotaxis: a parallel between surface binding and chemotaxis*. *Inflammation*, 1977. **2**(2): p. 115-23.
49. Pocovi, C., et al., *Comparison of the activity of human and bovine milk on two cell lines*. *J Dairy Res*, 2009. **76**(3): p. 308-16.
50. Ramos-Mandujano, G., et al., *Alpha-, beta- and kappa-caseins inhibit the proliferation of the myeloid cell lines 32D cl3 and WEHI-3 and exhibit different differentiation properties*. *Immunobiology*, 2008. **213**(2): p. 133-41.
51. Hatori, M., et al., *Effects of a casein hydrolysate prepared from Aspergillus oryzae protease on adjuvant arthritis in rats*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008. **72**(8): p. 1983-91.

52. Noursadeghi, M., et al., *Production of granulocyte colony-stimulating factor in the nonspecific acute phase response enhances host resistance to bacterial infection*. J Immunol, 2002. **169**(2): p. 913-9.
53. Lotem, J. and L. Sachs, *Independent regulation of myeloid cell growth and differentiation inducing proteins: in vivo regulation by compounds that induce inflammation*. Int J Cancer, 1985. **35**(1): p. 93-100.
54. Metcalf, D., et al., *Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in the development of an acute neutrophil inflammatory response in mice*. Blood, 1996. **88**(10): p. 3755-64.
55. Parker, F., et al., *Immunostimulating hexapeptide from human casein: amino acid sequence, synthesis and biological properties*. Eur J Biochem, 1984. **145**(3): p. 677-82.
56. Migliore-Samour, D., F. Floc'h, and P. Jolles, *Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation*. J Dairy Res, 1989. **56**(3): p. 357-62.
57. Kanazawa, T. and K. Kohmoto, *Immunochemical demonstration of alpha(s1)- and beta-casein in mouse mammary glands at early stages of pregnancy*. J Histochem Cytochem, 2002. **50**(2): p. 257-64.
58. Winer, S., et al., *T cells of multiple sclerosis patients target a common environmental peptide that causes encephalitis in mice*. J Immunol, 2001. **166**(7): p. 4751-6.
59. Riemekasten, G., et al., *Casein is an essential cofactor in autoantibody reactivity directed against the C-terminal SmD1 peptide AA 83-119 in systemic lupus erythematosus*. Immunobiology, 2002. **206**(5): p. 537-45.
60. Gerstein, H.C., *Cow's milk exposure and type I diabetes mellitus. A critical overview of the clinical literature*. Diabetes Care, 1994. **17**(1): p. 13-9.
61. Monetini, L., et al., *Antibodies to bovine beta-casein in diabetes and other autoimmune diseases*. Horm Metab Res, 2002. **34**(8): p. 455-9.
62. Hummel, M., et al., *No major association of breast-feeding, vaccinations, and childhood viral diseases with early islet autoimmunity in the German BABYDIAB Study*. Diabetes Care, 2000. **23**(7): p. 969-74.
63. Couper, J.J., et al., *Lack of association between duration of breast-feeding or introduction of cow's milk and development of islet autoimmunity*. Diabetes, 1999. **48**(11): p. 2145-9.

64. Kostraba, J.N., et al., *Early exposure to cow's milk and solid foods in infancy, genetic predisposition, and risk of IDDM*. Diabetes, 1993. **42**(2): p. 288-95.
65. Wasmuth, H.E. and H. Kolb, *Cow's milk and immune-mediated diabetes*. Proc Nutr Soc, 2000. **59**(4): p. 573-9.
66. Xu, K., et al., *Identification of a specifically expressed modified form of novel PSP-94 protein in the secretion of benign prostatic hyperplasia*. Electrophoresis, 2003. **24**(7-8): p. 1311-8.
67. Kampa, M., et al., *Opioid alkaloids and casomorphin peptides decrease the proliferation of prostatic cancer cell lines (LNCaP, PC3 and DU145) through a partial interaction with opioid receptors*. Eur J Pharmacol, 1997. **335**(2-3): p. 255-65.
68. Hatzoglou, A., et al., *Antiproliferative and receptor binding properties of alpha- and beta-casomorphins in the T47D human breast cancer cell line*. Eur J Pharmacol, 1996. **310**(2-3): p. 217-23.
69. Ziegler-Heitbrock, H.W., et al., *Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes*. Int J Cancer, 1988. **41**(3): p. 456-61.
70. Tsuchiya, S., et al., *Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)*. Int J Cancer, 1980. **26**(2): p. 171-6.
71. Breitman, T.R., S.E. Selonick, and S.J. Collins, *Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(5): p. 2936-40.
72. Gallagher, R., et al., *Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia*. Blood, 1979. **54**(3): p. 713-33.
73. Sundstrom, C. and K. Nilsson, *Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)*. Int J Cancer, 1976. **17**(5): p. 565-77.
74. Tichopad, A., A. Didier, and M.W. Pfaffl, *Inhibition of real-time RT-PCR quantification due to tissue-specific contaminants*. Mol Cell Probes, 2004. **18**(1): p. 45-50.
75. Baerlocher, G.M., et al., *Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH)*. Nat Protoc, 2006. **1**(5): p. 2365-76.
76. Lauzon, W., et al., *Flow cytometric measurement of telomere length*. Cytometry, 2000. **42**(3): p. 159-64.

77. Baerlocher, G.M. and P.M. Lansdorp, *Telomere length measurements in leukocyte subsets by automated multicolor flow-FISH*. Cytometry A, 2003. **55**(1): p. 1-6.
78. Baerlocher, G.M., et al., *Telomere length measurement by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry: tips and pitfalls*. Cytometry, 2002. **47**(2): p. 89-99.
79. Raines, R.T., *Ribonuclease A*. Chem Rev, 1998. **98**(3): p. 1045-1066.
80. Shapiro, H.M., *Practical flow cytometry*. 3 ed. 1995, New York: Wiley-Liss.
81. Vordenbaumen, S., et al., *Casein alpha s1 is expressed by human monocytes and upregulates the production of GM-CSF via p38 MAPK*. J Immunol, 2011. **186**(1): p. 592-601.
82. Tokarska, M., et al., *Sequencing of caprine alpha-S1 casein cDNAs confirms the accuracy of the RT-PCR approach for detecting of the variants of the gene*. J Appl Genet, 2001. **42**(4): p. 479-91.
83. Tokarska, M., et al., *Over-seasonal and sex-independent expression of kappa casein gene (CSN3) in mammalian blood lymphocytes*. Biochem Genet, 2009. **47**(7-8): p. 602-8.
84. Dosch, H.M., *Persistent T cell anergy in human type I diabetes*. The journal of immunology, 1999. **163**(12): p. 6933.
85. Pedersen, K.O., *Ultracentrifugal and electrophoretic studies on the milk proteins: Introduction and preliminary results with fractions from skim milk*. Biochem J, 1936. **30**(6): p. 948-60.
86. Ziegler-Heitbrock, H.W., et al., *Distinct patterns of differentiation induced in the monocytic cell line Mono Mac 6*. J Leukoc Biol, 1994. **55**(1): p. 73-80.
87. Fibach, E., et al., *Modulation of the maturation of human leukemic promyelocytes (HL-60) to granulocytes or macrophages*. Leuk Res, 1982. **6**(6): p. 781-90.
88. Rovera, G., D. Santoli, and C. Damsky, *Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(6): p. 2779-83.
89. Collins, S.J., et al., *Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(5): p. 2458-62.
90. Mayer, A., et al., *Efficacy of CD14(+) blood monocytes/macrophages isolation: positive versus negative MACS protocol*. Clin Hemorheol Microcirc, 2011. **48**(1): p. 57-63.

91. Kramer, M.F. and D.M. Coen, *Enzymatic amplification of DNA by PCR: standard procedures and optimization*. Curr Protoc Immunol, 2001. **Chapter 10**: p. Unit 10 20.
92. Raj, A., et al., *Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells*. PLoS Biol, 2006. **4**(10): p. e309.
93. Greenbaum, D., et al., *Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale*. Genome Biol, 2003. **4**(9): p. 117.
94. Guo, H., et al., *Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels*. Nature, 2010. **466**(7308): p. 835-40.
95. Baek, D., et al., *The impact of microRNAs on protein output*. Nature, 2008. **455**(7209): p. 64-71.
96. Selbach, M., et al., *Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs*. Nature, 2008. **455**(7209): p. 58-63.
97. Lewis, B.P., C.B. Burge, and D.P. Bartel, *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets*. Cell, 2005. **120**(1): p. 15-20.
98. Bernecker, C., et al., *MicroRNAs miR-146a1, miR-155\_2, and miR-200a1 are regulated in autoimmune thyroid diseases*. Thyroid, 2012. **22**(12): p. 1294-5.
99. Xiao, C. and K. Rajewsky, *MicroRNA control in the immune system: basic principles*. Cell, 2009. **136**(1): p. 26-36.
100. Zidi, A., et al., *Short communication: genetic variability in the predicted microRNA target sites of caprine casein genes*. J Dairy Sci, 2010. **93**(4): p. 1749-53.
101. Eisenstein, B.I., *The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis*. N Engl J Med, 1990. **322**(3): p. 178-83.
102. Rufer, N., et al., *Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(8): p. 743-7.
103. Lalli, E., et al., *In situ hybridization in suspension and flow cytometry as a tool for the study of gene expression*. Anal Biochem, 1992. **207**(2): p. 298-303.
104. Yu, H., et al., *Sensitive detection of RNAs in single cells by flow cytometry*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(1): p. 83-8.
105. Lang, G., *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik Vol. 2*. 2013: Springer.

106. Kitaoka, M., et al., *Transglutaminase-mediated in situ hybridization (TransISH) system: a new methodology for simplified mRNA detection*. *Anal Chem*, 2012. **84**(14): p. 5885-91.

## 8 Anhang

Geräte	Hersteller
Anthos 2001 ELISA reader	Anthos Mikrosysteme, Krefeld
Brutkasten Function line	Heraeus Holding GmbH, Hanau
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
FACSort	BD bioscience, San Jose, USA
FACS-Laser (488 nm)	BD bioscience, San Jose, USA
FACS-Software CELLquest Version 3.3	BD bioscience, San Jose, USA
Hämatologiegerät KX-21 N	Sysmex Digitana AG, Horgen, Schweiz
Heizblock HBS-130	Unitek, Puchheim
Kühlschrank Liebherr Premium	Liebherr Holding GmbH, Biberach
Nanodrop 1000	Thermo Scientific, Lafayette, USA
Octo-MACS	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
PCR-Software StepOne software v2.0	Applied Biosystems GmbH, Darmstadt
Sicherheitsbank Laminair HB2472	Heraeus Holding GmbH, Hanau
StepOnePlus Real-Time PCR System	Applied Biosystems GmbH, Darmstadt
Thermocycler T3	Biometra GmbH, Göttingen
Vortexer VF2	IKA-Werke GmbH & Co. Kg, Staufen
Vortexer MS2 Minishaker	IKA-Werke GmbH & Co. Kg, Staufen
Zentrifuge „groß“ Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode
Zentrifuge „klein“ Centrifuge 5415 C	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge „Büro“	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode

Materialliste	Hersteller
<b>Antikörper</b>	
coating-Antikörper RB13	ModiQuest, Nijmegen, Niederlande
mouse-anti-human IgG1-PE	BD bioscience, San Jose, USA
mouse CD45-PE	BD bioscience, San Jose, USA
mouse-anti-CSN1S1	Abnova Corporation, Heidelberg
RP13	Selbsthergestellt
ALEXA Fluor 488	Invitrogen, Karlsruhe
Auto-MACS Running Buffer	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
Aqua B.Braun	B.Braun Melsung AG, Melsung
Aqua dest.	Qiagen GmbH, Hilden
Biocidal ZF	WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach
BSA Albumin from bovine serum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>Buffy-Coat</i>	Universitätsklinikum Düsseldorf, Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin
Casein – Alpha, His Tag Fusion	Calbiochem, Darmstadt
Cellwash	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Costar Stripette	Corning incorporated, New York, USA
Cytofix Fixation Buffer	BD bioscience, San Jose, USA
Diethyl Pyrocarbonate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dulbecco's PBS without Ca & Mg	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
Eppendorf Safe-Lock Tubes	Eppendorf AG, Hamburg
Ethanol 70%	Merck KGaA, Darmstadt
Falcon-Röhrchen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Foetal Bovine Serum, heat inactivated	Invitrogen, Karlsruhe
Formamid Deionized	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hank's BSS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
Hefe-t-RNA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
HEPES	Invitrogen, Karlsruhe
Ref-RNA	Stratagene, Santa Clara, USA
<i>Herring Sperm DNA</i>	Promega GmbH, Mannheim

Isotone Natriumchlorid Lösung	B.Braun Melsung AG, Melsung
MACS Separation Columns	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
MaxiSorp flat-bottom 96 well plate	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
MicroBeads human	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
Natriumbicarbonat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt
Natrium-Pyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Non Essential Amino Acids	Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pasteurpipette	Welabo Laborbedarf GmbH, Düsseldorf
PBS-Puffer	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
PCR-Platte MicroAmp Fast Optical	Qiagen GmbH, Hilden
PCR MicroAmp Optical Adhesive Film	Qiagen GmbH, Hilden
Penicillin, human recombinant	Invitrogen, Karlsruhe
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg
24er-Platte Zellkultur ELISA	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
PP-Test Tubes Cell Star	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Polymorphprep <sup>TM</sup>	Axis-Shield, Oslo, Norwegen
<b>Primer</b>	
GAPDH	Tib Molbiol, Berlin
CSN1S1	Tib Molbiol, Berlin
ALEXA Fluor 488	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K recombinant	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Qia-Shredder	Qiagen GmbH, Hilden
QuantiTect SYBR Green PCR	Qiagen GmbH, Hilden
RLT-Puffer	Qiagen GmbH, Hilden
RNase A	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden
RPE-Buffer	Qiagen GmbH, Hilden
RPMI 1640 + Glutamax TM1 GIBCO	Invitrogen, Karlsruhe

RW1-Buffer	Qiagen GmbH, Hilden
Schwefelsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Sodium Dodecyl Sulfate Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SSC-Buffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Streptavidin/HRP	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Tetramethylbenzidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tip one Filter Tips	Star Lab GmbH, Ahrensburg
Tris HCL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
BD Vacutainer Blood Collection Set	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
<b>Zelllinien</b>	
HL60	DSMZ GmbH, Braunschweig
U937	DSMZ GmbH, Braunschweig
TH1	DSMZ GmbH, Braunschweig
Mono Mac 6	DSMZ GmbH, Braunschweig

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Schneider für die Schaffung der Rahmenbedingungen für diese Arbeit, die Überlassung dieses spannenden Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie seine konstruktive Kritik.

Vor allem möchte ich Herrn Dr. med. Stefan Vordenbäumen danken für die Hilfestellung bei der Auswahl des Themas, für seine hervorragende fachliche Betreuung dieser Arbeit und die verständnisvolle Unterstützung während des gesamten Zeitraums.

Für die ausgezeichnete Einarbeitung im Rheumalabor, die technische Unterstützung, das freundliche Arbeitsklima sowie die stete Beratung und Hilfsbereitschaft bedanke ich mich herzlich bei Frau Ellen Bleck.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir das Studium und die Durchführung dieser Promotion ermöglicht haben. Auf die moralische Unterstützung meiner Eltern sowie das Korrekturlesen der Arbeit konnte ich mich verlassen. Bei der grafischen Ausarbeitung unterstützte mich meine kreative Schwester Tina Roenick-Vonberg.

Für die stete Motivation und Aufmunterung danke ich Anna-Katharina Klemt.

### **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, den 15.08.2016

Paul Robert Roenick