

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Charakterisierung des langen Pentraxins PTX3 beim Huhn

von
Anke Staudt, geborene Moritz
aus Meppen

München, 2017

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Physiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, PhD

Referent: Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Hans-Joachim Gabius

Tag der Promotion: 29.07.2017

Für Frida

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1	Pattern Recognition Molecules (PRMs).....	2
2.2	Die Pentraxin-Superfamilie	2
2.2.1	Mitglieder	2
2.2.2	Die Stammesgeschichte der Pentraxin-Familie	4
2.2.3	Die Stammesgeschichte der C- und der N-terminalen Domäne der langen Pentraxine	5
2.3	Das lange Pentraxin PTX3.....	6
2.3.1	Genorganisation und Expression	6
2.3.2	Struktur und N-Glykosylierung	7
2.3.3	PTX3 und das Komplementsystem.....	9
2.3.4	Die Rolle von PTX3 bei der Wirtsabwehr und bei Entzündungen	10
2.3.5	PTX3 bei sterilen Entzündungen	13
2.3.6	PTX3 und Autoimmunität.....	15
2.3.7	Klinische Bedeutung	16
2.4	Akute Phase Proteine bei Haus-und Nutztieren	18
2.4.1	Alpha-1-Acid-Glykoprotein.....	19
2.4.2	Caeruloplasmin	20
2.4.3	C-reaktives Protein.....	20
2.4.4	Haptoglobin.....	21
2.4.5	Fibrinogen	22
2.4.6	Protease-Inhibitoren	22
2.4.7	Serum Amyloid A	23
2.4.8	Transferrin.....	24
2.5	Akute Phase Proteine beim Geflügel.....	24
2.5.1	Alpha-1-Acid-Glycoprotein	24
2.5.2	Caeruloplasmin	24
2.5.3	C-reaktives Protein.....	24
2.5.4	Haptoglobin.....	25
2.5.5	Fibrinogen	25
2.5.6	Serum Amyloid A	25
2.5.7	Transferrin-Ovotransferrin.....	25
2.5.8	Mannose bindendes Lektin	25
3	ZIELSETZUNG	27
4	MATERIAL UND METHODEN	28
4.1	Tiere und Tierhaltung	28

4.1.1	Hühner.....	28
4.1.2	Mäuse.....	28
4.2	Gewinnung von Organproben	29
4.3	Isolierung primärer Leukozyten	29
4.3.1	Gewinnung von Blut und Organen	30
4.3.2	Gewinnung peripherer mononukleärer Blutzellen.....	30
4.3.3	Gewinnung von Zellen aus Milz und Thymus.....	30
4.3.4	Mikroskopische Beurteilung der Zellen.....	30
4.4	Zellkultur.....	31
4.4.1	Medien und Zusätze	31
4.4.2	Verwendete Zelllinien.....	32
4.4.3	Kultivierung von Zelllinien.....	32
4.4.4	Einfrieren von Zellen	32
4.4.5	Auftauen von Zellen	33
4.5	RNA-Präparation	33
4.5.1	Durchführung einer RNA-Präparation.....	33
4.5.2	Konzentrationsbestimmung der RNA im NanoDrop.....	34
4.5.3	Bestimmung der RNA Integrität im Agilent 2100 Bioanalyzer TM	35
4.6	cDNA-Synthese	35
4.6.1	DNase Verdau	35
4.6.2	cDNA Synthese.....	36
4.7	Erstellen von Primern	37
4.7.1	Primer für die konventionelle PCR.....	37
4.7.2	Primer für die quantitative PCR.....	37
4.8	Polymerase Kettenreaktion.....	38
4.8.1	Polymerase Kettenreaktion mittels <i>Phusion DNA Polymerase</i>	38
4.8.2	Polymerase Kettenreaktion mittels <i>5x FIREpol® Master Mix</i>	39
4.8.3	Quantitative RT-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)	39
4.9	Agarose-Gelelektrophorese.....	41
4.10	DNA-Aufreinigung	42
4.11	Klonierung.....	42
4.11.1	Klonierung von PTX3 in den pGEM®-T Easy Vector.....	42
4.11.2	Klonierung von PTX3 in p3xFLAG-myc-CMV-25	44
4.12	Plasmidpräparation aus Bakterien	46
4.12.1	Isolation des vervielfältigten Materials aus Bakterien.....	46
4.12.2	Ligationskontrolle	47
4.13	Eukaryotische Expression von rekombinantem PTX3	47
4.13.1	Transiente Transfektion von HEK-293-T-Zellen	47
4.13.2	Stabile Transfektion von HEK-293-Zellen	48
4.14	Aufreinigung des rekombinanten chPTX3 über eine M2-Gelmatrix	48

4.15	Western Blot	50
4.15.1	SDS-PAGE	50
4.15.2	Immunoblot.....	52
4.15.3	Enzymatische Deglykosylierung von chPTX3-FLAG	54
4.16	Herstellung von monoklonalen Antikörpern	55
4.16.1	Immunisierung von Balb/c-Mäusen.....	55
4.16.2	Zellfusion	55
4.16.3	Screening mittels ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)	57
4.16.4	Subklonierung, Isotyp-Bestimmung und Gewinnung von Hybridoma-Überständen	59
4.17	Aufreinigung des monoklonalen IgG2a-Antikörperklon	60
4.18	Computerprogramme zum Auswerten von Sequenzen	61
5	ERGEBNISSE	62
5.1	Alignment PTX3	62
5.2	Alignment C-reaktives Protein und PTX3 des Huhnes.....	64
5.3	Klonierung von chPTX3 in den Vektor p3xFLAG-Myc-CMV TM -25.....	65
5.4	Untersuchung der Struktur von chPTX3	67
5.5	Analyse der Expression von chPTX3 in verschiedenen Organen	68
5.6	Analyse der Expression von chPTX3 in verschiedenen Zellen.....	71
5.7	Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen chPTX3 und deren Charakterisierung.....	72
6	DISKUSSION	75
6.1	Analyse des PTX3-Gens beim Huhn	76
6.1.1	Alignment der PTX3-Volllängensequenz des Huhns mit PTX3-Sequenzen anderer Spezies	76
6.1.2	Alignment der Sequenz vom CRP des Huhns mit der chPTX3-Sequenz....	79
6.2	Klonierung von chPTX3 und Expression als FLAG markiertes Protein	80
6.3	Struktur von chPTX3	81
6.4	Expressionsanalysen von chPTX3 in verschiedenen Zellen und Organen.....	82
6.5	Generierung von Antikörpern gegen chPTX3	84
6.6	Ausblick	86
7	ZUSAMMENFASSUNG	88
8	SUMMARY	90
9	LITERATURVERZEICHNIS	91
10	ANHANG	117
11	DANKSAGUNG	121

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Aminosäuren-Alignment von chPTX3 mit den Orthologen anderer Spezies.....	63
Abbildung 2: Alignment C-reaktives Protein und PTX3 vom Huhn.....	65
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Vektors p3xFLAG-Myc-CMV-25.....	66
Abbildung 4: Immunoblot der eluierten, reduzierten Fraktionen von der M2-Gelmatrix.....	67
Abbildung 5: Immunoblot-Analyse der chPTX3-SDS PAGE.....	68
Abbildung 6: Expression von chPTX3 in verschiedenen Organen des Huhns.....	69
Abbildung 7: Untersuchung der Expression von chPTX3 in mit LPS stimulierten Organen....	70
Abbildung 8: qRT-PCR-Analyse von Milz und Leber (n=6).....	71
Abbildung 9: Untersuchung der Expression von chPTX3 in B- und T-Zellen.....	72
Abbildung 10: Titration des monoklonalen Antikörpers 6F9-1G6 (aufgereinigt).....	73
Abbildung 11: Titration des monoklonalen Antikörpers 6F9-1G6 (Zellkulturüberstand).....	73
Abbildung 12: Titration des polyklonalen Antikörpers 6H8 (Zellkulturüberstand).....	74

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien	32
Tabelle 2: Primer für die konventionelle PCR	37
Tabelle 3: Verwendete Primer für die qRT-PCR	38
Tabelle 4: Verwendete Konstrukte bei der Klonierung von chPTX3	44
Tabelle 5: Im ELISA eingesetzte Antikörper	58
Tabelle 6: Aufbau des Screening-ELISAs	59

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A. gambiae	<i>Anopheles gambiae</i>
AGP	Alpha-1-Acid-Glycoprotein
Akt	Syn.: Proteinkinase B
Amp	Ampicillin
APP	Akute-Phase-Protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
Aqua dest.	destilliertes Wasser
as	<i>antisense</i>
ASLV	Aviäre Sarkom/Leukose-Viren
Asn	Asparagin
AT	Alpha-1-Antitrypsin
BALT	<i>Bronchus Associated Lymphoid Tissue</i>
bp	Basenpaare
C.albicans	<i>Candida albicans</i>
C4BP	<i>C4b-binding protein</i>
CCL2	CC-Ligand 2
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
ch	<i>chicken</i>
CMV	Cytomegalovirus
Cp	Caeruloplasmin
CRP	C-reaktives Protein
CT	<i>Cycle Threshold</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cys	Cystein
D. melanogaster	<i>Drosophila melanogaster</i>
D. rerio	<i>Danio rerio</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
Fb	Fibrinogen
FBS	fötales Rinderserum, <i>fetal bovine serum</i>
Fc-Fragment	<i>Fragment crystallisable-Fragment</i>
FcγR	<i>Fragment crystallisable gamma receptor</i>
FGF-1	<i>Fibroblast Growth Factor-1</i>
FGF-2	<i>Fibroblast Growth Factor-2</i>
FGF-4	<i>Fibroblast Growth Factor-4</i>
FGF-8	<i>Fibroblast Growth Factor-8</i>
FGF-8b	<i>Fibroblast Growth Factor-8b</i>

FLAG-Tag	Oktapeptid als Epitop zum Nachweis
G. gallus	<i>Gallus gallus</i>
G418	Geneticin
GALT	<i>Gut Associated Lymphoid Tissue</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HT	Hypoxanthin und Thymidin
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin
Hb	Hämoglobin
HD	Homeodomäne
HDL	<i>High-density Lipoprotein</i>
HEK	menschliche Embryonierzellen, <i>human embryonic kidney cells</i>
HEK-293	<i>Human Embryonic Kidney-293</i>
Hp	Haptoglobin
IBD	Infektiöse Burstitis
IFN	Interferon
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IgY	Immunglobulin Y
IL	Interleukin
IL-1	Interleukin-1
IL-10	Interleukin-10
IL-1 β	Interleukin-1beta
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
I α I	Inter-alpha-Inhibitor
kDa	Kilodalton
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LSL	<i>Lohmann's selected leghorn</i>
MBL	Mannose bindendes Lektin
MCMV	Murines Cytomegalievirus
M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
MyD88	<i>Myloid differentiation primary response gene 88</i>
NaOH	Natrium Hydrogencarbonat
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF-IL6	<i>nuclear factor interleukin-6</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
NJ-Baum	<i>Neighbour-joining</i> Baum
NK-Zelle	natürliche Killerzelle, <i>natural killer cell</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	<i>Nucleotide-Binding Oligomerization Domain</i>
NP1	Neuronales Pentraxin 1
NP2	Neuronales Pentraxin 2
NPR	Neuronaler Pentraxin Rezeptor
NPTXR	Neuronaler Pentraxin Rezeptor

NPTXs	neuronale Pentraxine
NTC	<i>non-template control</i>
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
OmpA	<i>Outer membrane protein A</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
POD	Peroxidase
PRM	<i>Pattern Recognition Molecules</i>
PRR	<i>pattern-recognition-receptor</i>
P-Selectin	Thrombozyten-Selectin
PTX3	Pentraxin 3
PTX4	Pentraxin 4
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (<i>quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
RCAS	<i>replication competent ASLV– LTR with a splice acceptor</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RSV	Rous Sarkoma-Virus
RT	Raumtemperatur
s	<i>sense</i>
SAA	Serum Amyloid A
SAP	Serum Amyloid P
SDS	Natrium Dodecylsulfat
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SOC	<i>Super optimal broth with catabolite repression</i>
SP	Signalpeptid
T. rubripes	<i>Takifugu rubripes</i>
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tf	Transferrin
Th	T-Helferzelle
Th17	TH17-Zelle
Th1-Antwort	TH1-Zell-Antwort
Th2	TH2-Zelle
TLR	Toll-like Rezeptoren
TLR-4	<i>Toll like receptor-4</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha
TRAMP-C2	<i>Transgenic adenocarcinoma mouse prostate C2-Zelle</i>
Treg	Regulatorische T-Zelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

TSG-14	<i>TNF-stimulated-gene 14</i>
TSG-6	<i>Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein</i>
UPEC	Uropathogene <i>Escherichia coli</i>
UTI	<i>Urinary tract infection</i>
UV	ultraviolett
ZKÜ	Zellkulturüberstand

1 EINLEITUNG

Akute Phase Proteine (APPs) sind Serumproteine, mit deren Hilfe man die systemische Antwort des angeborenen Immunsystems auf Infektionen, Entzündungen oder Traumata beurteilen kann. Diese Proteine verändern ihre Serumkonzentration um mehr als 25% als Antwort auf proinflammatorische Zytokine, die während einem Krankheitsprozess induziert werden [1-3].

Pentraxine, wichtige Vertreter der APPs, sind eine Familie phylogenetisch konservierter Mustererkennungsproteine und ein Teil des angeborenen Immunsystems [4-8]. Basierend auf der Länge ihrer Primärstruktur werden Pentraxine in kurze und lange Pentraxine unterteilt. Kurze Pentraxine inkludieren das C-reaktive Protein (CRP) und Serum Amyloid P (SAP). Pentraxin 3 (PTX3) ist dagegen der Prototyp der langen Pentraxine. Pentraxine haben eine zyklische, multimere Struktur und sind durch eine 200 Aminosäuren lange Pentraxin-Domäne im C-Terminus charakterisiert, die eine 8 Aminosäuren lange konservierte Pentraxin-Signatur beinhaltet (HxCxS/TWxS, dabei ist x eine beliebige Aminosäure) [4, 9]. Die langen Pentraxine haben zusätzlich zur Pentraxin-Domäne noch eine charakteristische, lange N-terminale Domäne, die den kurzen Pentraxinen fehlt [4].

CRP, das charakteristischste Akute Phase Protein des Menschen, wurde 1929 entdeckt [10]. Seine Plasmakonzentration erhöht sich sowohl bei chronischen als auch akuten entzündlichen Vorgängen [10, 11].

Über den Prototypen der langen Pentraxine - PTX3 - ist bei Mensch und Maus schon Vieles bekannt. Es interagiert mit verschiedenen Liganden, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren, Komponenten der extrazellulären Matrix und bestimmten Pathogenen. Des Weiteren spielt PTX3 auch eine Rolle bei der Komplement-Aktivierung, bei der Opsonierung von Pathogenen und bei der weiblichen Fruchtbarkeit [12].

Beim Huhn ist PTX3 unbeschrieben. Frühere, unveröffentlichte Arbeiten unserer Arbeitsgruppe lassen aber darauf schließen, dass es auch beim Huhn ein bedeutendes APP ist, da es bei Infektionen hochreguliert wird. In dieser Arbeit soll daher das lange Pentraxin PTX3 des Huhns näher untersucht und charakterisiert werden um einen Hinweis auf seine funktionelle Rolle in der Immunantwort auf Infektionen zu erhalten. Dieses Wissen kann zukünftig von Nutzen sein und beispielsweise den Grundstein für diagnostische Tests im Feld, aber auch für weitere Forschung am angeborenen Immunsystem des Huhns legen.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Pattern Recognition Molecules (PRMs)

Das angeborene Immunsystem ist evolutionär älter als das adaptive Immunsystem und steht beim Widerstand des Körpers gegen Pathogene an erster Stelle [13]. Ein wichtiges Werkzeug des angeborenen Immunsystems sind sogenannte Pattern Recognition Molecules (PRMs), die gleichbleibende, charakteristische Muster von Mikroorganismen erkennen können [14]. Basierend auf ihrer Lokalisation und Funktion können diese in zwei große Gruppen eingeteilt werden: (i) zellassozierte Rezeptoren, die sich in verschiedenen zellulären Kompartimenten befinden und endozytische Rezeptoren beinhalten, wie z.B. Scavenger-Rezeptoren [15], Signal-Rezeptoren, wie z.B. Toll-like Rezeptoren (TLR) [16], und NOD-like Rezeptoren [17] und (ii) Flüssige-Phase- oder humorale PRMs [18]. Diese stellen funktionell die Vorfahren der Antikörper dar und sind an der Opsonierung von Pathogenen und der Aktivierung des Komplement-Systems beteiligt [18].

Flüssige-Phase-PRMs bilden eine heterogene Molekülgruppe, die Kollektine, Ficoline und Pentraxine einschließt [19]. Diese Moleküle sind in der Granula von neutrophilen Granulozyten gespeichert und können nach Stimulation innerhalb von Minuten sezerniert werden. Des Weiteren exprimieren Phagozyten als Antwort auf extrazelluläre Signale Flüssige-Phase-PRMs. Epithelzellen und die Leber können die systemische Produktion dieser Moleküle dann letztendlich aufrechterhalten [19].

2.2 Die Pentraxin-Superfamilie

2.2.1 Mitglieder

Pentraxine sind eine Superfamilie evolutionär konservierter Proteine, die charakterisiert sind durch eine zyklische, multimere Struktur. Ihr C-Terminus besteht aus einer circa 200 Aminosäuren langen Pentraxin-Domäne mit einer acht Aminosäuren langen konservierten Pentraxin-Signatur (HxCxS/TWxS, x ist eine beliebige Aminosäure) [4, 9]. Sie werden in kurze und lange Pentraxine eingeteilt [20]. Prototypen für kurze Pentraxine sind hierbei das C-reaktive Protein und Serum Amyloid P; Pentraxin 3 und andere nachträglich identifizierte

Proteine repräsentieren die langen Pentraxine [4].

Das erste beschriebene Pentraxin war das CRP, das im menschlichen Serum in den 1930er Jahren als Akute-Phase-Protein identifiziert wurde [10]. Es hat seinen Namen aufgrund der Eigenschaft mit dem C-Polysaccharid der Zellwand von *Streptococcus pneumoniae* zu reagieren [10, 21] und wird in der Leber unter entzündlichen oder infektiösen Bedingungen produziert. Menschliches SAP wurde nachfolgend als ein verwandtes Molekül von CRP identifiziert, da beide eine Aminosäuren-Homologie von 51% aufweisen und sie unter dem Elektronenmikroskop ein ähnliches Erscheinungsbild haben (ringförmiges Pentamer) [9, 22, 23].

Beide kurzen Pentraxine haben ein Molekulargewicht von 25 kDa mit fünf oder zehn Untereinheiten, die zu einem ringförmigen Pentamer angeordnet sind [24, 25]. CRP und SAP sind die wichtigsten Akute-Phase-Proteine bei Mensch und Maus. C-reaktives Protein ist kaum messbar im Plasma eines gesunden Erwachsenen (< 3 mg/L), aber seine Konzentration schnell bei pathologischen Veränderungen um das 1000-fache in die Höhe, mit einem scharfen Anstieg innerhalb von sechs Stunden und einem Maximum bei ungefähr 48 Stunden. Im Gegensatz dazu ist die Konzentration des menschlichen (nicht des murinen) SAP eher unverändert bei 30-50 mg/L, auch bei einer frühen Akute-Phase-Reaktion [26]. Menschliches CRP und SAP werden von Hepatozyten synthetisiert und als Stimulus wirkt das proinflammatorische Zytokin IL-6 zusammen mit IL-1 [9].

PTX3 wurde in den frühen 1990-er Jahren in Endothelzellen nach Stimulation mit IL-1 und in Fibroblasten als TNF-stimulated-gene (TSG-14) entdeckt [27, 28]. Lange Pentraxine weisen eine 174 Aminosäuren lange aminoternale Domäne auf, die an die carboxyterminale Pentraxin-Domäne gekoppelt ist und sich von kurzen Pentraxinen in der Genorganisation, der chromosomalen Lokation, dem Synthesort, den Stimuli und Liganden unterscheidet [4, 13]. Neben PTX3 wurden auch andere Mitglieder der langen Pentraxine entdeckt, wie z.B. das Guinea Pig Apexin [29], neuronales Pentraxin 1 (NP1) [30], neuronales Pentraxin 2 (NP2) [31] und das transmembrane Protein neuronaler Pentraxin Rezeptor (NPTXR) [32]. In 2010 wurde ein weiteres Pentraxin, das PTX4, entdeckt. Wie auch bei den anderen Mitgliedern der Familie ist das Gen, das PTX4 codiert, hochkonserviert. Allerdings hat PTX4 ein einzigartiges Muster der mRNA-Expression, das sich von dem anderer langer Pentraxine unterscheidet. Anders als bei den NPTXs, ist die PTX4-Expression im Gehirn zum Beispiel gering. Seine hohe Expression im Thymusstroma und der Milz ist einzigartig unter den Pentraxinen [33].

2.2.2 Die Stammesgeschichte der Pentraxin-Familie

Die Pentraxin-Domäne ist bei Säugern, niederen Wirbeltieren (*Xenopus laevis*, *Danio rerio* und *Takifugu rubripes*) und bei Arthropoden (*Limulus polyphemus*, *Tachypleus tridentatus*, *Limulidae* und *Drosophila melanogaster*) hoch konserviert. Ein phylogenetischer Baum hat die Identifikation von fünf Molekül-Hauptgruppen möglich gemacht [33].

Die erste Molekülgruppe bilden die kurzen Pentraxine, CRP und SAP, die von den gemeinsamen Vorfahren aller Pentraxine abweichen. Sie wurden bei Chordata und auch bei Arthropoden beobachtet, was andeutet, dass die Genduplikation, die diese hoch homologen Proteine entstehen ließ, sich sehr früh während der Evolution ereignete. Da die kurzen *Limulus*-Pentraxine sich früher als die kurzen Pentraxine der Säuger in der Pentraxin-Evolution entwickelt haben, erscheinen sie als Ast vor den kurzen Pentraxinen der Säuger und bilden eine separate Klade (geschlossene Abstammungsgemeinschaft). Zur ersten Molekülgruppe gehört auch *Xenopus laevis* XL-PXN1, ein langes Pentraxin. Dieses lange Pentraxin gruppiert sich vermutlich wegen der niedrigen Homologie zwischen seiner N-terminalen Domäne und der N-terminalen Domäne der anderen langen Pentraxine zu den kurzen Pentraxinen [33].

Die zweite Gruppe beinhaltet alle NPTXs, die eine Subklasse der langen Pentraxine sowohl in Säugern als auch in niederen Wirbeltieren sind. Ausgehend von der Länge des Astes kann man schlussfolgern, dass NPR unter den NPTXs am Ältesten ist. Es folgt dann später NP2 und schließlich NP1. Mensch-, Maus- und Ratten-Orthologe von Apexin wurden bis jetzt nicht gefunden [33]. Man vermutet, dass NP2 aufgrund der Sequenzgleichheit ein Apexin-Ortholog ist [31]. Dementsprechend bildet Apexin in dieser Publikation eine Gruppe mit den NPTXs, im Besonderen mit NP2 [33]. Apexin ist im Akromsom eines adulten Meerschweinchens lokalisiert und ist das erste Pentraxin, bei dem eine intrazelluläre Lokalisation beobachtet wurde [29].

Die dritte Molekülgruppe beinhaltet nur PTX3, dessen Sequenz bei Säugern, bei Hühnern (*G. gallus*) und beim Pufferfisch (*T. rubripes*) gefunden wurde. PTX3 entstand sehr früh während der Evolution der Pentraxine direkt vom gemeinsamen Vorfahr [33].

Beim Versuch humane und murine Orthologe zum Apexin zu finden, wurde mit PTX4 ein weiteres, langes Pentraxin entdeckt. Dieses bildet mit dessen Orthologen in Säugern, *Xenopus* und *D. rerio* (Zebrafisch) die vierte Molekülgruppe. Auch PTX4 entstand sehr früh während der Evolution der Pentraxine direkt vom gemeinsamen Vorfahr der Pentraxine [33].

Die letzte Gruppe wird vom *D. melanogaster* B6 (oder CG3100-RA) -Protein und *A.gambiae* AGAP005038-PA repräsentiert. Das *D. melanogaster* B6-Protein ist ein 558 Aminosäuren langes Protein mit einer Pentraxin-Domäne, dessen biologische Funktion aber nicht bekannt ist. Es stammt auch vom gemeinsamen Vorfahr der Pentraxine ab [33].

Der in der Publikation erstellte NJ-Baum zeigt den Mangel an Beziehungen zwischen den vier Gruppen der langen Pentraxine und suggeriert, dass diese Subfamilien unabhängig durch Fusionen des Gens, das für die Ur-Pentaxin-Domäne codiert, mit anderen unverwandten Sequenzen entstanden sind [33].

2.2.3 Die Stammesgeschichte der C- und der N-terminalen Domäne der langen Pentraxine

Die Aminosäurengleichheit bei den Mitgliedern der langen Pentraxine ist in der C-terminalen Domäne relativ hoch und liegt bei 28% zwischen humanem PTX3 und NP1 und bei 68% zwischen humanem NP1 und NP2. Die Sequenzgleichheit ist niedriger in der N-terminalen Domäne der Mitglieder der langen Pentraxine. So zeigt z.B. die N-terminale Domäne von PTX3 nur 10% Homologie zur N-terminalen Domäne von NP1. Im Gegensatz dazu ist die Gleichheit der N-terminalen Domäne zwischen den NPTXs höher und bewegt sich zwischen 28% und 38%, was auf die Existenz einer Subklasse der langen Pentraxine schließen lässt. Die Sequenzähnlichkeit im N-Terminus bei NP1, aber auch NP2 und PTX3 ist auf den äußeren N-Terminus begrenzt [33]. Diese charakteristische Eigenschaft und auch die größere Länge von NP1 und NP2 suggerieren die Präsenz einer dritten Domäne zwischen der N-Terminalen und der Pentraxin-Domäne [34].

Bei einer weiteren phylogenetischen Analyse der Pentraxin- und der N-terminalen Domänen der kurzen und langen Pentraxine der Spezies Mensch, Maus und Ratte fiel auf, dass die Pentraxin- und die N-terminalen Domänen aller Orthologe zwei separate Gruppen bilden. Im Gegensatz dazu bildet die N-terminale Domäne von PTX3 einer jeden Spezies eine Gruppe mit dem ganzen Molekül PTX3, was an der geringen Sequenzgleichheit zwischen den N-terminalen Domänen der Orthologe liegt. Demgegenüber bilden die Pentraxindomänen der verschiedenen Spezies zusammen eine Gruppe. Das gleiche Phänomen lässt sich auch bei PTX4 beobachten. Wie erwartet bilden die kurzen Pentraxine eine Gruppe. Diese Ergebnisse bekräftigen die Hypothese, dass die N-terminale Domäne bei langen Pentraxinen sich unabhängig von der Pentraxin-Domäne entwickelt hat [33].

2.3 Das lange Pentraxin PTX3

2.3.1 Genorganisation und Expression

Das menschliche und das murine PTX3-Gen befindet sich auf Chromosom 3q25 und ist in drei Exons organisiert. Die ersten zwei Exons codieren für das Signalpeptid und die N-terminale Domäne und das dritte Exon codiert für die Pentraxin-Domäne [27]. Mögliche Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren wie z.B. Pu1, AP-1, NF- κ B, SP1 und NF-IL-6 sind am Promotor sowohl beim menschlichen als auch beim murinen Gen präsent [35]. Studien zur humanen und murinen Promotorregion zeigten, dass NF- κ B bei der Reaktion auf die proinflammatorischen Zytokine TNF-alpha und IL-1 β involviert ist, während AP-1 die basale Transkription von PTX3 fördert [35, 36].

PTX3 wurde ursprünglich als ein Zytokin-induzierbares Gen in vaskulären Endothelzellen und Fibroblasten identifiziert [27, 28]. IL-1 β stimuliert die PTX3-Expression in Endothelzellen [37] und TNF- α induziert die PTX3-Expression in Fibroblasten [28]. Die Expression von PTX3 wird schnell bei einer Vielzahl von Zelltypen ausgelöst. Stimuli hierfür sind neben den eben genannten Zytokinen IL-1 β und TNF-alpha auch TLR-Agonisten, mikrobielle Bestandteile (z.B. LPS, OmpA, lipoarabinomannans) oder intakte Mikroorganismen [26]. Myeloide dendritische Zellen sind neben Monozyten, Makrophagen, glatten Muskelzellen, Nierenepithelzellen, Synovialzellen, Chondrozyten, Adipozyten, alveolären Epithelzellen, Gliazellen, Fibroblasten und Epithelzellen eine wesentliche Quelle für PTX3 [27, 38-45]. Im Gegensatz zu diesen Zelltypen, die PTX3 nur nach Stimulation exprimieren, exprimieren sowohl humane als auch murine lymphatische Endothelzellen PTX3 konstitutiv [46-48].

Ruhende T- und B-Lymphozyten und NK-Zellen exprimieren PTX3-RNA nicht [49]. Neutrophile Granulozyten dagegen speichern PTX3 in ihren Granula, welches als Antwort auf TLR- Agonisten freigegeben wird [50, 51]. Zudem hat man PTX3 bei Biopsien der Dickdarm-Mucosa von Patienten, die an Inflammatory Bowel Disease erkrankt waren und in neutrophilen Granulozyten in einem atherosklerotischen Plaque beobachtet [51, 52].

Das inflammatorische Zytokin IL-1 β induziert große Mengen an PTX3 in mononukleären Zellen des peripheren Blutes wie z.B. Monozyten und Lymphozyten, während IL-6 (als Hauptstimulus von CRP und SAP) und auch typische Aktivatoren von Monozyten, wie das CCL2, M-CSF, GM-CSF und IFN- γ keine Stimuli für PTX3 sind [49]. Beim Morbus Castleman wurde dennoch eine PTX3-Expression nach Stimulation mit IL-6 beobachtet und

auch beim Kaposi-Sarkom kommt es zu einer PTX3-Expression nach IL-6-Stimulation [53, 54]. IFN- γ und IL-10 haben verschiedene Effekte auf die PTX3-Expression. Während IFN- γ die PTX3-Produktion durch dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen hemmt, stimuliert IL-10 die LPS-induzierte PTX3-Expression [51, 55]. IL-4, Dexamethason, Calcitriol und Prostaglandin E2 hemmen ebenfalls die LPS-induzierte PTX3-Expression in myeloiden dendritischen Zellen [55].

Verschiedene Signalketten können die PTX3-Produktion abhängig vom Zelltyp und Stimulus beeinflussen. Bei einem Herzinfarkt wird die PTX3-Expression beispielsweise durch den NF- κ B Pathway kontrolliert [56], während die Induktion von PTX3 durch TNF- α in Lungenepithelzellen durch den JNK-Pathway positiv beeinflusst wird [42]. Des Weiteren fördern high-density Lipoproteine (HDLs) die Produktion von PTX3 in Endothelzellen indem sie den PI3K-Akt-Signalweg aktivieren [57].

Glucocorticoide regulieren ebenfalls die Expression von PTX3, indem sie die PTX3-Produktion in nicht-hämatopoetischen Zellen wie z.B. Fibroblasten oder Endothelzellen auslösen oder unter inflammatorischen Bedingungen verstärken. Im Gegensatz dazu hemmen Glucocorticoide die PTX3-Produktion in hämatopoetischen Zellen, beispielsweise in dendritischen Zellen und Makrophagen [58]. Entsprechend dieser Beobachtungen erhöht sich der PTX3-Blutgehalt nach Applikation von Glucocorticoiden. Zudem zeigen Patienten mit Morbus Cushing erhöhte Werte an zirkulierendem PTX3 und solche mit einem iatrogenen Hypocortisolismus dementsprechend niedrige Werte [58].

Des Weiteren wurde gezeigt, dass auch uroepitheliale Zellen PTX3 exprimieren [59]. Abhängig von TLR4 und MyD88 erhöht sich die Expression schnell nach einer Stimulation durch uropathogene *Escherichia coli* (UPEC) [59].

Man fand heraus, dass Neugeborene mit einem noch unreifen Immunsystem eine verminderte Expression von PTX3 zeigen [60]. Demgegenüber wird PTX3 von Brustepithelzellen und CD11b⁺-Leukozyten exprimiert, wodurch hohe Konzentrationen von PTX3 in humaner und muriner Milch entstehen. Dies führt zu einem Infektionsschutz bei neugeborenen Mäusen. Darüber hinaus verstärkt humanes Kolostrum die Expression von PTX3 durch neonatale Monozyten als Reaktion auf LPS. Interessanterweise konnte in Milchpulver für Neugeborene, das aus Kuhmilch hergestellt wurde, kein PTX3 nachgewiesen werden [60].

2.3.2 Struktur und N-Glykosylierung

Das humane und murine PTX3 ist ein multimeres Glycoprotein aus 381 Aminosäuren und hat

ein Signalpeptid mit einer Länge von 17 Aminosäuren [27]. PTX3 beinhaltet eine N-terminale Region und eine 203 Aminosäuren lange C-terminale Region, die homolog ist zu den kurzen Pentraxinen CRP und SAP [61]. Die N-terminale Region (Aminosäuren 18-178) ist beziehungslos zu jeglicher bekannten Proteinstruktur. Dennoch deuten Vorhersagen über die Sekundärstruktur an, dass dieser Teil des Proteins vier alpha-Helices bildet, von denen drei (Aminosäuren 78-97, 109-135 und 104-170) an der Bildung von Superhelices beteiligt sind [62, 63]. Von diesen Superhelices wird angenommen, dass sie entweder eine verlängerte oder eine verdichtete Form annehmen, was dann zu der Gestalt eines asymmetrischen Oktamer führt [63]. Die C-terminale Domäne von PTX3 (Aminosäuren 179-381) ist bis zu 57 % homolog zu der der kurzen Pentraxine CRP und SAP [61, 64]. Die Aminosäurenreste, die die Calcium-bindende-Tasche beim CRP und auch beim SAP formen, fehlen in der Pentraxin-Domäne des PTX3, was möglicherweise sein Bindungsverhalten erklärt (z.B. bindet PTX3 C1q Calcium-unabhängig) [34]. Studien mit rekombinanten Präparationen der N- und der C-terminalen Domäne von PTX3 haben gezeigt, dass die Liganden FGF2, Inter- α -Inhibitor und die Konidien von *Aspergillus fumigatus* an die N-terminale-Region binden [65-67]. C1q und P-Selectin binden an die Pentraxin-Domäne [37, 61, 68], wohingegen beide Domänen mit dem Komplement-Faktor H interagieren [69].

Eine einzige N-Glykosylierung findet man in der C-terminalen Domäne bei Asparagin220 (Asn220). Sie besteht aus fucosylierten und sialylierten Zuckerresten mit einem geringen Anteil mehrfach verzweigter Glykane [70]. Untersuchungen der Sequenz des humanen PTX3 deuten darauf hin, dass die N-Glykosylierung bei Asn220 der Grund für ein höheres Molekulargewicht ist, das bei einer SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen beobachtet wurde (45 kDa gegenüber den berechneten 40 kDa) [61].

Das humane PTX3-Protein weist eine komplexe Quartärstruktur mit Protomeren auf, die sich zu einem Oktamer zusammenlagern (high order Oligomerization), stabilisiert durch Disulfidbrücken [61]. Massenspektrometrie und gezielte Mutagenese des rekombinanten Proteins zeigen, dass PTX3 aus kovalent verknüpften Oktameren mit einem Molekulargewicht von 340 kDa besteht. Cysteinreste an den Positionen 47, 49 und 103 in der N-terminalen-Region formen dabei drei Disulfidbindungen zwischen den Ketten, die vier Proteinuntereinheiten zu einem Tetramer zusammenhalten. Zwei Tetramere sind durch zusätzliche Zwischenkettenbrücken (interchain bridges) zu einem Oktamer verbunden, an denen die Cysteine der C-terminalen Domäne Cys317 und Cys318 beteiligt sind [71]. Insgesamt hat das humane PTX3 neun Cysteinreste: drei in der N-terminalen Region (Cys⁴⁷, Cys⁴⁹ und Cys¹⁰³) und sechs in der C-terminalen Region (Cys¹⁷⁹, Cys²¹⁰, Cys²⁷¹, Cys³¹⁷,

Cys³¹⁸ und Cys³⁵⁷). Cys-Reste an den Positionen 210 und 271 sind hoch konserviert bei den Pentraxinen und basierend auf der Homologie zu CRP und SAP sind sie wahrscheinlich an Disulfidbrückenbindungen innerhalb einer Kette beteiligt [34, 61].

2.3.3 PTX3 und das Komplementsystem

Der Komplementfaktor C1q ist der zuerst entdeckte Ligand von PTX3 und Hauptaktivator des klassischen Wegs [37, 61]. Die Wechselwirkung zwischen der Pentraxin-Domäne des PTX3 [61] und dem runden Kopf von C1q tritt Calcium-abhängig auf und führt entweder zur Aktivierung oder zur Hemmung der Komplementkaskade, abhängig von der Art und Weise wie es präsentiert wird. Die Wechselwirkung zwischen C1q und PTX3, das an einer mikrobiellen Oberfläche gebunden und somit nicht beweglich ist, führt zur Aktivierung der klassischen Komplementkaskade. Andererseits hemmt die Wechselwirkung zwischen C1q und „beweglichem“ PTX3 in der flüssigen Phase die Aktivierung des klassischen Wegs der Komplementkaskade [37].

Inforzato et al. sind in ihrem Paper „The „sweet“ side of long pentraxin: how glycosylation affects PTX3 functions in innate immunity and inflammation“ allerdings der Meinung, dass PTX3 Calcium-unabhängig an C1q bindet [72]. Unglykosyliertes PTX3 zeigt demgegenüber eine effizientere Bindung an C1q, was zu einer gesteigerten Komplementaktivierung führt [70]. PTX3 interagiert ebenfalls mit Faktor H, dem Hauptregulator des alternativen Wegs, indem er an PTX3-beschichtete Flächen bindet und so eine überschießende Aktivierung der Komplementkaskade limitiert [69]. In ähnlicher Weise interagiert PTX3 mit C4BP, das die Komplementaktivierung hemmt, da es als Cofaktor von Faktor I auftritt und C4b inaktiviert [73]. Diese Wechselwirkung fördert die Rekrutierung von C4BP auf apoptotischen Zellen und in der extrazellulären Matrix, sodass eine exzessive, lokale Komplementaktivierung verhindert wird, die andernfalls zu einer Entzündung oder Gewebeschaden führen würde [73].

PTX3 interagiert auch mit den drei Mitgliedern des Lektin-Wegs: Ficolin-1, Ficolin-2 und Mannose-bindendes Lektin (MBL) [74-76]. Es erhöht die Ablagerung von Ficolin-2 und MBL auf der Oberfläche von *Aspergillus fumigatus* und *Candida albicans* und fördert die Komplement-vermittelte, angeborene Immunantwort [75, 76]. Zum Beispiel bindet der MBL-PTX3-Komplex C1q und verstärkt so die Ablage von C3 und C4 auf *C. albicans* und fördert die Phagozytose des Erregers [77]. In ähnlicher Weise ist bewegungsunfähiges PTX3 in der Lage eine Ficolin-1-abhängige Aktivierung des Lektin-Wegs auszulösen [74]. Jüngste Studien zeigten eine Ablage eines Ficolin-1-PTX3-Komplexes auf der Oberfläche von

apoptotischen Zellen [78]. Dieser Komplex ermöglicht die Beseitigung von apoptotischen Zellen und reguliert das Freisetzen von IL-8 durch Makrophagen herunter [78].

2.3.4 Die Rolle von PTX3 bei der Wirtsabwehr und bei Entzündungen

PTX3 bindet an ein breites Spektrum von Mikroorganismen wie z.B. ausgewählte Pilze, Viren und Bakterien. Spezifische Bindungen wurden zu Zymosan und *Paracoccidioides brasiliensis* [79], *Pseudomonas aeruginosa* [80], Konidien von *Aspergillus fumigatus* [81], *Klebsiella pneumoniae* [82], UPEC [59], *Salmonella typhimurium* [81], humanes und murines Cytomegalovirus (MCMV) [83] und ausgewählten Stämme des Influenza Virus [84] beobachtet. PTX3^{-/-}-Mäuse zeigen eine erhöhte Anfälligkeit für eine pulmonare Aspergillose und haben demnach auch eine höhere Sterblichkeit als Wildtyp-Mäuse [81]. Bei der Lunge einer PTX3^{-/-}-Maus sind die IFN- γ - und IL-12-Werte vermindert und die IL-4-Werte sind erhöht. Dieses Ergebnis suggeriert, dass bei einer PTX3-defizienten Maus das Nicht-Erkennen von Konidien von *Aspergillus fumigatus* mit einer fehlenden Entwicklung einer Typ1-T-Helferzellen-Antwort einhergeht und es im Gegensatz dazu aber zu einem Zytokinprofil in Richtung einer Typ2-T-Helferzellen-Antwort kommt [81]. Eine Behandlung mit rekombinantem PTX3 ändert den Phänotyp auf eine protektive Th1-Antwort um, was zeigt, dass PTX3 an einer Steuerung der Immunantwort beteiligt ist [81, 85]. Ähnlich ist es bei einer chronisch granulomatösen Erkrankung (p47^{phox}^{-/-}- Mäuse). Die pathogene Entzündung und eine Th17-Antwort, die durch eine *Aspergillus fumigatus*-Infektion ausgelöst wird, kann durch PTX3 vermindert werden [86]. PTX3 stellt die Fähigkeit des Körpers sich gegen Pilzkrankungen zu schützen wieder her, schränkt eine Th2/ Th17-Antwort ein und verstärkt eine Th1/ T_{reg}-Antwort [86].

Phagozyten mit einer PTX3-Defizienz können *Aspergillus fumigatus* nicht oder nur schlecht erkennen und beseitigen. Die Gabe von PTX3 ändert diesen Zustand allerdings, sodass nahe liegt, dass PTX3 eine opsonisierende Eigenschaft besitzt [50, 67, 81]. Dementsprechend verstärkt PTX3 die Erkennung und Phagozytose von Konidien von *Aspergillus fumigatus* durch neutrophile Granulozyten durch einen Fc γ R-, CD11b- und Komplement-abhängigen Mechanismus [67]. Pentraxine binden an Fc γ -Rezeptoren und aktivieren eine Leukozyten-medierte Phagozytose, weshalb Fc γ -Rs als Pentraxin-Rezeptoren vorgeschlagen wurden [77]. Diese Wechselwirkung führt zu einer Aktivierung von CR3 (CD11b/CD18) und dabei kommt es zu einer Phagozytose von C3-opsonisierten Pathogenen [67]. Dementsprechend ist die Rekrutierung von CD11b in den „phagocytic cup“ bei PTX3- und Fc γ R-defizienten neutrophilen Granulozyten mangelhaft und rekombinantes PTX3 hebt diesen mangelhaften

Phänotyp bei PTX3-defizienten Neutrophilen, aber nicht bei FcγR-defizienten neutrophilen Granulozyten auf [67]. Gegen *Pseudomonas aeruginosa* wirkt PTX3 auch als ein Opsonin und dadurch kann das Bakterium von neutrophilen Granulozyten erkannt werden [13]. Dieser prophagozytische Effekt wird bei C1q-defizienten Mäusen, aber nicht bei C3- und FcγR-defizienten Mäusen beibehalten, sodass nahe liegt, dass die verstärkte Phagozytose von PTX3-opsonierten *Pseudomonas aeruginosa* durch das Wechselspiel zwischen Komplementsystem und Fcγ-Rezeptoren auftritt [13]. Bei einer chronischen *Pseudomonas aeruginosa*-Lungeninfektion, die zu Morbidität und Mortalität bei Patienten mit Mukoviszidose führt, hat PTX3 eine große therapeutische Aktivität [13]. Eine Behandlung mit rekombinantem PTX3 reduziert den Befall der Lunge mit den Bakterien und die Lungenentzündung [13]. Zusätzlich zu dieser therapeutischen Aktivität bei ausgewachsenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass PTX3 neugeborene Mäuse schützt [60]. Oral verabreichtes PTX3 verbreitet sich schnell im Gewebe und schützt daher vor einer *Pseudomonas aeruginosa*-Lungeninfektion [60].

In 2014 wurde PTX3 als das erste PRM identifiziert, das den Körper bei einer Infektion des Harntrakts (UTI) durch uropathogene *E.colis* (UPEC) schützt [59]. Bei einer Harnwegsinfektion kann man PTX3 vergesellschaftet mit Entzündungszellen finden, die den Harntrakt infiltrieren. UPEC führt, TLR4- und MyD88 abhängig, zu einer schnellen Expression von PTX3 in uroepithelialen Zellen. Sezerniertes PTX3 verstärkt dann die Aufnahme von UPEC in neutrophilen Granulozyten. Dementsprechend können PTX3-defiziente Mäuse UPEC nur mangelhaft erkennen und beseitigen, was zu einer verschärften Entzündung und einer Schädigung des befallenen Gewebes führt. Dies zeigt, dass PTX3 auch eine fundamentale Rolle im Kampf gegen eine Harnwegsinfektion spielt [59]. Bei Menschen, die an einer Harnwegsinfektion erkrankt waren, wurde PTX3 in Blasenschnitten gefunden. Lokale und systemische Konzentrationen von PTX3 korrelierten hierbei mit dem Ausmaß der Krankheit. Schlussendlich war noch auffällig, dass in Kohorten mit Patienten, die für Harnwegsinfektionen empfänglich waren, PTX3-Genpolymorphismen mit der Anfälligkeit für akute Nierenbeckenentzündung und Blasenentzündung assoziiert waren [59].

PTX3 hat des Weiteren die Fähigkeit, Entzündungsantworten zu verstärken, was bei einer Wechselwirkung zwischen PTX3 und dem OmpA von *Klebsiella pneumoniae* (KpOmpA) beobachtet wurde [82]. Es optimiert *in vivo* die lokale Entzündung, die durch KpOmpA hervorgerufen wurde, bezüglich Zellrekrutierung und der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen [82]. Diese verstärkte Entzündung ist abhängig vom Komplementsystem und sie klingt ab, sobald der Patient mit Komplement-Inhibitoren

behandelt wird [87]. Bei Mäusen, die PTX3 überexprimieren, wurde beobachtet, dass eine Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* mit einer verstärkten Fähigkeit proinflammatorische Mediatoren, wie z.B. NO und TNF-alpha, zu produzieren, einher geht. Abhängig von der Dosis des Pathogens führt das entweder zum Schutz oder zu einem schnelleren Tod [88]. Aber es ist wichtig zu wissen, dass dieser Mechanismus nicht auf alle Mikroorganismen abgeleitet werden kann, denn PTX3 modifiziert die Entzündungsantwort nicht, wenn sie durch LPS ausgelöst wurde. LPS ist ein Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien, den PTX3 nicht erkennen kann [87].

PTX3 interagiert ebenfalls mit Zymosan und tritt hierbei als Opsonin auf. In Abwesenheit von PTX3 internalisieren Makrophagen Zymosan oder Zymosan-positive Pathogene, wie z.B. *Paracoccidioides brasiliensis*, abhängig von Dectin-1. Wenn PTX3 anwesend ist, binden die acht Untereinheiten des Proteins acht Zymosan-Partikel und diese können dann Dectin-1-abhängig in einen Makrophagen aufgenommen werden. PTX3-abhängig können also in einem Schritt mehrere Zymosanpartikel aufgenommen werden als ohne PTX3. Diese zuletzt beschriebene Aktivität von PTX3 lässt auch mehr Dectin-1 exprimieren, sodass noch mehr Zymosan aufgenommen werden kann [79].

Bei viralen Infektionen spielt PTX3 ebenso eine große Rolle. Beispielsweise bindet es an das murine und humane Cytomegalovirus und reduziert damit den viralen Eintritt und die Infektiosität *in vitro* [83]. PTX3-defiziente Mäuse haben eine höhere Anfälligkeit für Cytomegaloviren als Wildtyp-Mäuse und PTX3 schützt Mäuse vor einer MCMV-Erstinfektion und einer Reaktivierung *in vivo* ebenso wie bei einer *Aspergillus* Superinfektion [83]. Durch eine Interaktion des Sialinsäurerests der N-Glykosylierung und dem viralen Hämagglutinin bindet humanes und murines PTX3 auch an das Influenzavirus (H3N2) [84]. Es inhibiert die Hämagglutination und auch die Aktivität der viralen Neuraminidase und neutralisiert die Virusinfektiosität [84]. Neueste Arbeiten haben gezeigt, dass PTX3-defiziente Mäuse anfälliger sind für Influenza- Infektionen (H3N2) als Wildtypmäuse und dass eine Behandlung mit rekombinantem PTX3 die Mortalität und die virale Belastung reduzieren kann [84]. Im Gegensatz dazu scheint PTX3 bei der Abwehr von H1N1-Influenzaviren ineffektiv zu sein [89]. Die Spezifität des viralen Hämagglutinin und der Neuraminidase für einen bestimmten Typ Sialinsäure bestimmt die Empfindlichkeit von unterschiedlichen Influenza-Virusstämmen für die antivirale Aktivität von PTX3 [90]. Deshalb bewirkt ein Austausch einer einzigen Aminosäure im Hämagglutinin des H3N2-Virus die Resistenz gegen PTX3 und verstärkt die Virulenz bei der Maus [90].

Polymorphismen im PTX3-Gen korrelieren mit einer erhöhten Anfälligkeit für eine pulmonare Tuberkulose, einer schweren Infektion des Harntrakts und dem Risiko eines Mukoviszidose-Patienten sich mit *Pseudomonas aeruginosa* zu infizieren [59, 91, 92]. Ergänzend dazu wurden PTX3-Polymorphismen mit der Anfälligkeit für eine *Aspergillus fumigatus*-Infektion bei zwei Patientenkohorten, denen gerade Knochenmark transplantiert wurde, assoziiert [93]. Kürzlich hat eine Studie angedeutet, dass PTX3-Polymorphismen die Stabilität der mRNA verändern können, was zu einer verringerten Expression von PTX3, beeinträchtigter Phagozytose und der Freigabe von *Aspergillus fumigatus* aus neutrophilen Granulozyten führt [93].

2.3.5 PTX3 bei sterilen Entzündungen

Verschiedene Studien untersuchen die Rolle von PTX3 bei der Modulation der Entzündungsantwort. So bindet PTX3 über seine N-Glykosylierung selektiv an P-Selectin und die Gabe von PTX3 oder endogen sezerniertes PTX3 durch hämatopoetische Zellen führt zu einer negativen Feedbackschleife, die ein exzessives, P-Selectin-abhängiges Rekrutieren von neutrophilen Granulozyten verhindert [20, 94]. Deshalb dämpft von hämatopoetischen Zellen sezerniertes PTX3 die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und reguliert somit die Entzündung [20]. Demzufolge spielt PTX3 auch eine schützende Rolle bei akuter Lungeninsuffizienz und eine PTX3-Defizienz verstärkt die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, die Aktivierung der Gerinnungskaskade, den Zelltod und die Entzündungsantwort [95].

Eine neuere Studie vermutet, dass PTX3 eine interstitielle Fibrose hemmt, die durch akutes Nierenversagen induziert ist [96]. Bei einem Modell einer Reperfusion einer renalen Ischämie verstärkt eine Behandlung mit PTX3 die Rekonvaleszenz, unterdrückt die Glomerulosklerose und hemmt die interstitielle Fibrose [96].

PTX3 ist auch bei der Entzündungsmodulation eines Myocardinfarkts und einer Arteriosklerose beteiligt [97]. Es wurde hierbei beobachtet, dass PTX3 bei einem Myocardinfarkt schnell ausgeschüttet wird und der Myocard-Schaden bei PTX3-defizienten Mäusen erhöht ist, sodass angenommen werden kann, dass PTX3 eine cardioprotektive Rolle spielt [56]. In Bezug auf das Komplementsystem wurde bei PTX3-defizienten Mäusen eine größere Ablagerung vom Faktor C3 beobachtet, ähnlich einer fehlenden Interaktion von PTX3 mit dem Faktor H, was eine verschärfte Komplementaktivierung verhindert [56, 69].

In einem Arteriosklerosis-Mausmodell zeigt eine PTX3- und Apolipoprotein-E-defiziente

Maus große Aortenläsionen, ein größer ausgeprägtes Entzündungsprofil in der Gefäßwand und eine erhöhte Akkumulation von Makrophagen in Plaques [98]. Als Kontrast zu diesem protektiven Effekt ist das Fehlen von PTX3 bei einem Mausmodell zur interstinalen Ischämie und Reperfusion begleitet von einer verringerten Gewebsentzündung und einer verringerten Letalität [99]. Interessanterweise macht die intravenöse Gabe von PTX3 vor der Reperfusion den Schutz rückgängig, was in PTX3-defizienten Mäusen beobachtet wurde. Die Gabe von PTX3 an Wildtyp-Mäusen verschlechtert die Gewebeschädigung und Letalität dementsprechend [99]. Im Grundsatz zeigen diese Daten, dass PTX3 eine protektive Rolle bei Reperfusionsschäden in Herz und Niere spielt und bei Reperfusionsschäden des Darms schädlich ist.

PTX3 interagiert mit dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF-2), der Chemotaxis, Endothelzellproliferation und *in vivo* Neovaskularisation fördert. Sowohl FGF-2 als auch PTX3 werden während einer Entzündung durch Elemente der Gefäßwand wie z.B. Endothelzellen oder glatte Muskelzellen produziert. PTX3 bindet FGF-2 mit seiner N-terminalen Domäne (97-110) [65]. Es bindet mit hoher Affinität an FGF-2, aber nicht an FGF-1, FGF-4 oder FGF-8 [100]. Die Interaktion zwischen PTX3 und FGF-2 hemmt die Bindung von FGF-2 an Endothelzellrezeptoren, was eine FGF-2-abhängige Endothelzellproliferation *in vitro* und eine Angiogenese *in vivo* hemmt [100]. Neueste Daten zeigen anhand der Zellen von Myelompatienten, dass PTX3 FGF-2-abhängige Aktivitäten von Endothelzellen und Fibroblasten hemmt, wie z.B. die Lebensfähigkeit, Chemotaxis, Angiogenese und Zytokinsekretion. Des Weiteren hemmt PTX3 die Adhäsion von Knochenmarks-Plasmazellen [101]. Deshalb könnte PTX3 einen apoptotischen Effekt auf Endothelzellen und Fibroblasten, aber auch auf Knochenmarks-Plasmazellen haben, da es die Aktivitäten dieser Zellen hemmt [101]. Zusätzlich hemmt PTX3 auch die Proliferation von glatten Muskelzellen und die Chemotaxis, die durch endogenes FGF-2 bzw. durch exogenes, rekombinantes FGF-2 angetrieben ist [102]. Des Weiteren vermindert PTX3 das Verdicken der Intima nach einer Verletzung der Arteria carotis durch einen Ballonkatheter und verhindert somit eine Stenose der Arterie [102]. PTX3 antagonisiert auch FGF-8b und hemmt somit FGF-8b-abhängige Vaskularisation und das Wachstum von Tumoren, die durch Steroidhormone reguliert werden [103]. Wie schon bei FGF-2 beobachtet wurde, verhindert PTX3, dass FGF-8b an seinen Rezeptor bindet. Es hemmt die Proliferation von Endothelzellen und die Chemotaxis und unterdrückt die FGF-8b-induzierte Neovaskularisation *in vivo* [103]. Des Weiteren kann es die Proliferation von TRAMP-C2-Zellen inhibieren, nachdem sie mit FGF-2 oder FGF-8b stimuliert wurden. TRAMP-C2-

Zellen sind Zellen, die aus einem Mausmodell zu Prostatakrebs isoliert wurden [104]. Somit verhindert eine PTX3-Überexpression in TRAMP-C2-Zellen die Bildung neuer Gefäße und Tumore zu bilden, wenn diese in genidentische oder immungeschwächte männliche Mäuse ohne Thymus transplantiert werden [104]. PTX3 hat ebenfalls die Funktion die FGF-2-angetriebene Proliferation und nachgeschaltete FGF-2-Rezeptor-Signale in murinen Melanomzellen zu hemmen [105]. Eine PTX3-Überexpression hemmt in diesen Zellen ihre Umwandlung von einem epithelähnlichen zu einem mesenchymalen Erscheinungsbild und ihr Wachstum. Des Weiteren reduziert eine PTX3-Überexpression ihre Motilität [105]. Dementsprechend ist die Fähigkeit Tumore und Metastasen zu bilden bei PTX3-Überexpression von murinen Melanomzellen reduziert [105].

PTX3 wurde auch in der viscoelastischen, hyaluronreichen Matrix im Kumulus-Oozyten-Komplex gefunden. Diese Matrix bildet sich um die Eizelle herum aus [106]. Hier interagiert PTX3 mit TSG-6 und dem Inter- α -Trypsin-Inhibitor. Diese zwei Moleküle sind erforderlich für den Einbau des neu synthetisierten Hyalurons in die Matrix, was ein wichtiger Schritt ist um die Matrix zu organisieren und zu stabilisieren [66, 106]. Als Konsequenz zeigt eine PTX3-defiziente weibliche Maus Fertilitätsstörungen, da ihre Cumulus-Oophorus-Matrix instabil ist [106]. Studien zeigten, dass PTX3 grundsätzlich von humanen Amnionmembranzellen (Eihaut) exprimiert wird [107].

2.3.6 PTX3 und Autoimmunität

Sterbende Zellen geben ihren proinflammatorischen Inhalt frei, nachdem sie ihre zelluläre Integrität verloren haben, und aktivieren damit benachbarte Zellen. Deshalb ist eine schnelle und effiziente Beseitigung von apoptotischen Zellen erforderlich [108]. Pentraxine sind an solch einer Eliminierung von apoptotischen Zellen beteiligt [108]. Während die kurzen Pentraxine CRP und SAP apoptotische Zellen opsonieren und so ihre Beseitigung fördern, hemmt das Binden von PTX3 an sterbende Zellen ihre Eliminierung durch Phagozyten [109-111]. Wenn PTX3 mit C1q zusammen in der flüssigen Phase vorhanden ist, ist das Binden von C1q an apoptotische Zellen signifikant verringert, was bedeutet, dass C1q nicht als Opsonin wirken kann. Des Weiteren hemmt PTX3 die C1q-induzierte Ablage von C3b auf apoptotischen Zellen und somit auch deren Phagozytose, da C3b ebenfalls ein Opsonin ist [112]. Im Gegensatz dazu ist die Ablage von C1q und C3 auf apoptotischen Zellen erhöht, wenn sie vorher mit PTX3 inkubiert wurden [37]. Opsonierung von apoptotischen Zellen durch Faktor H limitiert die Komplement-medierte Lyse dieser Zellen [113]. Die Opsonierung von apoptotischen Zellen durch PTX3 verstärkt interessanterweise aber die

Ablage von Faktor H auf ihrer Oberfläche, was die Aktivierung des alternativen Wegs bei Gewebeschäden reguliert [69].

Bei neutrophilen Granulozyten akkumuliert endogenes PTX3 in Bläschen auf der Oberfläche von späten apoptotischen Zellen, da sie aktiv durch Kaspase-Aktivierung und durch die Rho-Kinase 1 aus der Granula verlagert werden [114]. Membranassoziiertes PTX3 wurde ebenfalls bei späten apoptotischen Makrophagen beobachtet [115]. Bei beiden Arten später apoptotischer Zellen wirkt membranassoziiertes PTX3 als „Iss-mich“-Molekül, was ihre Phagozytose durch andere Phagozyten begünstigt [114]. In Einklang mit der prophagozytischen Aktivität des membranassoziierten PTX3, fördert PTX3 die schnelle Elimination von apoptotischen T-Zellen *in vivo* im Mausmodell zum systemischen Lupus erythematosus (SLE) [116]. Eine PTX3-Defizienz bei einem genetischen Lupus-Hintergrund (C57BL/6 *lpr*) ist mit einer verschärften Autoimmun-Lungen-Erkrankung und mit einer selektiven Expansion CD4/CD8-doppelt-negativer, autoreaktiver T-Zellen vergesellschaftet [116].

2.3.7 Klinische Bedeutung

CRP wird seit über 75 Jahre umfangreich als unspezifischer Marker für Infektionen, Entzündungen und Gewebeschäden genutzt. Basierend auf den Ähnlichkeiten zu CRP und der schnellen Produktion bei einer Entzündung ist man bestrebt, den Nutzen von PTX3 auch als Marker und als therapeutischen Wirkstoff festzulegen. PTX3 verhält sich wie ein Akute-Phase-Protein und seine Blut-Konzentration, die unter normalen Bedingungen gering ist (25 ng/ml bei der Maus und <2ng/ml beim Menschen), erhöht sich schnell (die Spitze wird nach 6-8 Stunden erreicht) und dramatisch (200-800 ng/ml) bei einer Entzündung, zum Beispiel bei einer Infektion, granulomatöser Polyangiitis, akutem progressivem Lungenversagen, mikroskopischer Polyangiitis und Sepsis oder septischem Schock [97, 117-119]. Wichtig ist, dass die Plasmakonzentrationen von PTX3 bei Patienten mit Pilzinfektionen in der Lunge, Meningokokken-Infektionen, Denguefieber, Tuberkulose und Leptospirose signifikant erhöht sind. Des Weiteren korreliert der Plasmaspiegel von PTX3 mit der Schwere der Krankheit und der Mortalität [120-124]. Präklinisch hat man die therapeutische Funktion von PTX3 gegen Pathogene bewiesen und dadurch den Weg für fortlaufende Studien über den möglichen Nutzen von PTX3 als einen antimykotischen Wirkstoff bei immungeschwächten Patienten geebnet. Interessanterweise kommt es in den Luftwegen von Mukoviszidose-Patienten zu einer proteolytische Spaltung von PTX3 durch Proteasen von *Aspergillus fumigatus*. Das könnte zumindest partiell die wiederkehrende Lungenaspergillose, die bei

diesen Patienten beobachtet wurde, erklären [125].

Patienten mit einer schweren Sepsis, einem systemischen inflammatorischen Response-Syndrom oder Infektionsverdacht wiesen einen hohen Spiegel von zirkulierendem PTX3 auf [126-128]. Es ist umstritten, ob PTX3-Plasmaspiegel mit Stoffwechselkrankheiten oder Adipositas in Beziehung stehen [129].

PTX3-Konzentrationsspiegel wurden auch mit kardiovaskulären Risikofaktoren und der Schwere der Erkrankung in Zusammenhang gebracht und haben einen prognostischen Wert bei einer ischämischen Herzerkrankung [130, 131]. Bei Patienten mit einem Herzinfarkt erhöhen sich die PTX3-Plasmakonzentrationen rasch mit einer Spitze nach sechs bis acht Stunden nach dem Einsetzen der Symptome. Zwischen den anderen gängigen Markern wie z.B. CRP, NT-proBNP, troponinT ragt der PTX3-Plasmaspiegel als einziger unabhängiger Mortalitätsanzeiger innerhalb von drei Monaten heraus [130, 132]. Andere Studien bestätigten, dass PTX3-Blutspiegel mit kardiovaskulären Erkrankungen und der Gesamtsterblichkeit assoziiert sind [133]. Bei zwei großen Herzinsuffizienz-Studien fand man heraus, dass ein erhöhter PTX3-Spiegel mit einem höheren Risiko an Gesamtmortalität zusammenhängt und eine 3-Monats-Veränderung des PTX3-Spiegels mit Todesfällen assoziiert wurde [132]. In einer prospektiven Multi-Center-Studie mit 223 Patienten nach einer Herz-OP zeigten PTX3-Blutspiegel prädiktive Werte einer kurzzeitigen, funktionellen Erholung und die basale Konzentration von PTX3 war die einzige Größe assoziiert mit der 1-Jahres-Inzidenz eines großen, unerwünschten, kardiovaskulären Vorfalls [134]. Bei Patienten mit einer instabilen Angina pectoris [135, 136] und mit einer nichtrheumatischen Aortenklappenstenose [137] waren die Spiegel an zirkulierendem PTX3 ebenfalls erhöht. Solche erhöhten Spiegel sind auch verbunden mit einer Entzündungsreaktion und einer Verdickung der Neointima nach einem Gefäßschaden [138].

Bei Schwangerschaftskomplikationen, wie z.B. einer Präeklampsie oder intrauteriner Wachstumsretardierung [139-141] oder einer spontanen Frühgeburt und im Speziellen bei einer Vaskulopathie der Plazenta [142], sind erhöhte maternale PTX3-Spiegel auffällig. Außerdem ist PTX3 Bestandteil der Amnionflüssigkeit und dessen Konzentration ist bei einer intraamniotischen Entzündung/ Infektion und bei Frühwehen erhöht [143-145]. Im Gegensatz dazu wurden erhöhte maternale PTX3-Spiegel während der Wehen beobachtet, die aber nicht auf eine intraamniotische Entzündung oder Infektion bezogen sind [146].

Erhöhte PTX3-Expressionsniveaus wurden auch bei einer Reihe von Autoimmunerkrankungen beobachtet, wie z.B. im Blut von Patienten mit einer Vaskulitis der

kleinen Gefäße und in der Synovia von Patienten mit rheumatoider Arthritis, aber nicht beim SLE [118, 147]. Diese Diskrepanz könnte, zumindest in Teilen, damit erklärt werden, dass Lupus-Patienten anti-PTX3-Autoantikörper bilden, Patienten anderer Rheuma-Autoimmun-Erkrankungen (wie z.B. Polydermatomyositis, systemische Sklerose, Sjörgen-Syndrom und Psoriasis Arthritis) aber nicht [148, 149].

PTX3 wurde als eine essentielle Komponente der angeborenen Resistenz gegen Harninfekte identifiziert [59]. Bei Patienten mit einer akuten Pyelonephritis verringert sich der PTX3-Spiegel im Urin während einer Behandlung mit Antibiotika und er korreliert mit einer Hämaturie. Zusätzlich korreliert der PTX3-Serumspiegel mit klinischen Parametern wie z.B. Harnstoff- und Kreatiningehalt [59].

Bei Lungenkrebs wurde eine PTX3-Expression ebenfalls beobachtet [150], aber auch bei myeloproliferativer Neoplasie [151], Gliomen [152], Ovarialtumoren [153], myxoidem Liposarkom [154], Prostatakarzinom [155] und beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus [156]. Die Expression von PTX3 kann in Tumorgewebe, wie z.B. bei Prostatakrebs [155], hochreguliert sein und ist mit einer schlechten Prognose bei Eierstockkrebs [153] und fortgeschrittenem Stadium eines Gliom [152] verbunden. In Übereinstimmung mit der Antitumor-Wirkung von PTX3 bei experimentellem Prostatakrebs zeigt eine immunhistochemische Analyse von Prostatabiopsien, dass die PTX3-Expression bei hochgradiger prostaticher intraepithelialer Neoplasie und in invasiven Tumorarealen gesunken ist, da parallel die nicht-neoplastischen Parenchymzellen, die PTX3 exprimieren, während der Krebsprogression weichen [104].

2.4 Akute Phase Proteine bei Haus-und Nutztieren

Akute Phase Proteine sind Blutproteine, die dazu genutzt werden können, die systemische Antwort auf eine Infektion, Entzündung oder Trauma zu beurteilen [1-3]. Diese Proteine verändern ihre Serumkonzentration um mehr als 25% als eine Antwort auf proinflammatorische zytokine. Als quantitative Biomarker können Akute Phase Proteine bei der Diagnose und der Prognose einer Erkrankung und beim Monitoring der Therapie wie auch beim generellen Gesundheitsscreening genutzt werden.

Je nach Höhe des Anstiegs einzelner Akute Phase Proteine werden diese in major Akute Phase Proteine, in moderate und in minor Akute Phase Proteine eingeteilt. Dabei haben bei gesunden Tieren major APP eine geringe Serumkonzentration ($<1\mu\text{g/L}$) und steigen

dramatisch auf das 100 bis 1000-fache nach Stimulation an, erreichen ein Maximum nach 24-48 Stunden und nehmen während der Erholungsphase schnell wieder ab. Moderate APP erhöhen sich um das fünf- bis zehnfache nach Aktivierung, haben ihr Maximum nach zwei bis drei Tagen und verringern sich langsamer als die major APPs. Ein minor APP erhöht sich ausgehend von seinem Ruhezustand allmählich um 50 bis 100 %. Negative APP-Biomarker, bei denen die Konzentration während der Entzündungsantwort sinkt, sind auch bekannt, aber außer bei Albumin ist ihr Nutzen in der Veterinärmedizin nicht gebräuchlich [157].

Proinflammatorische Zytokine, die eine Akute Phase Antwort induzieren, haben vielfältige Quellen, Ziele und Funktionen [158]. Zu ihnen gehören IL-1, IL-6 und TNF- α , die in erster Linie von Monozyten ins Blut sezerniert werden, die durch bakterielle Toxine oder als Antwort auf lokale Gewebeschäden aktiviert wurden [159-161].

Die von Hepatozyten produzierten APPs können anhand des Ausmaßes ihrer Erhöhung in positive APPs eingeteilt werden, wie z.B. Haptoglobin, Serum Amyloid A und C-reaktives Protein. Sie werden als negative APPs klassifiziert, wenn sich ihre Serumkonzentration verringert, wie z.B. bei Albumin [162-164].

2.4.1 Alpha-1-Acid-Glykoprotein

Alpha-1-Acid-Glycoprotein (AGP) ist ein Sialoglykoprotein, das hauptsächlich von Hepatozyten synthetisiert und sezerniert wird. Es wird aber auch extrahepatisch produziert [165]. Lokales AGP kann bei der Erhaltung der Homöostase mitwirken, indem es Gewebeschäden reduziert, die mit einem entzündlichen Prozess assoziiert sind. Systemisches AGP bindet Medikamente und eine weitere Funktion ist die Immunomodulation. Wie Albumin bindet und transportiert AGP endogene oder exogene Substanzen wie Heparin, Histamin, Serotonin und Steroide [165]. AGP hemmt auch die Aktivierung neutrophiler Granulozyten und erhöht die Sekretion von IL-1-Rezeptor-Antagonisten durch Makrophagen [165]. AGP bindet direkt an LPS und neutralisiert so dessen Toxizität [166]. Des Weiteren hemmt AGP mitogeninduzierte Lymphozytenproliferation [167] und die Aktivität von NK-Zellen [168].

AGP ist ein klinisch wichtiges Akute Phase Protein bei Rindern und wird zur Überwachung eines entzündlichen Prozesses genutzt [169-179]. Erhöhte AGP-Werte im Serum wurden bei Schweinen mit infektiösen Erkrankungen wie z.B. Pneumonie oder Meningitis beobachtet [180]. Bei Hunden ist AGP ein moderates APP. Hunde mit Hepatitis oder nach einer Behandlung mit Terpentin haben erhöhte AGP-Konzentrationen im Serum [181, 182]. Bei

Katzen hilft das AGP, die Diagnose einer feline infektiösen Peritonitis zu verbessern [183].

2.4.2 Caeruloplasmin

Caeruloplasmin (Cp) ist eine Kupfer-enthaltende Ferroxidase, die toxisches Eisen in eine nichttoxische Form oxidiert [184]. Es schützt Gewebe vor Eisen-medierte freien Radikalen und ist in verschiedenen antioxidativen und zytoprotektiven Aktivitäten involviert [185]. Caeruloplasmin wird primär in der Leber synthetisiert, aber auch extrahepatisch gebildet [186, 187]. Das Atemwegsepithel ist die größte Quelle von Cp in der Lunge [188]. Es kann als antientzündliches Agens wirken, indem es die Zahl der neutrophilen Granulozyten reduziert, die mit dem Endothel verbunden sind und indem es als extrazellulärer Fänger von Peroxiden fungiert [189, 190].

Studien zeigen, dass Cp ein Infektionsindikator bei Rindern [169, 170, 178, 191, 192], bei Pferden [193-195] und bei Hunden [196] ist. Equines Cp wird als APP einer intermediären oder späten Phase einer akuten Infektion betrachtet [197]. Bei Hunden kann Cp als ein Parameter für eine frühe Trächtigkeitsdiagnose genutzt werden [198].

2.4.3 C-reaktives Protein

Das C-reaktive Protein spielt eine wichtige Rolle beim Schutz gegen Infektionen, der Beseitigung von beschädigtem Gewebe, Prävention von Autoimmunisierung und der Regulation der inflammatorischen Antwort [199]. Es bindet an eine Vielzahl von pathogenen Bakterien oder intrazellulären Antigenen beschädigter Zellen. Das Protein aktiviert auch das Komplementsystem, interagiert mit spezifischen Rezeptoren auf phagozytischen Zellen um Phagozytose zu medieren oder es induziert die Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen, wodurch es die nicht-spezifische angeborene Immunität mit der spezifischen adaptiven Immunität vernetzt [200]. CRP hemmt dagegen Chemotaxis und den respiratory burst von neutrophilen Granulozyten [201].

CRP wurde in Wiederkäuern [202, 203], Pferden [204], Schweinen [205], Hunden [206] und Katzen [207] nachgewiesen. Bei Wiederkäuern hat es jedoch weitestgehend keine Anwendung, da es nicht klar ist, ob das Wiederkäuer-CRP ein APP ist. Bovines CRP könnte laktationsassoziiert sein und wird nicht in der Leber synthetisiert [208]. CRP ist ein moderates APP bei Pferden und die Serumwerte sind nach einer Entzündung höher als sein Basiswert [204, 209]. Erhöhte CRP-Werte können auch bei Stuten nach der Geburt eines Fohlens beobachtet werden [209]. Bei Schweinen ist CRP einer der besten Marker zur Identifizierung inflammatorischer Läsionen [210]. Es kann als Parameter für die

Beobachtung des Gesundheitszustands von Schweinen, einschließlich einer Stresseinschätzung, genutzt werden [211]. Bei Hunden ist CRP ein sensitives APP und bekommt die größte Aufmerksamkeit in der caninen Medizin [212]. CRP-Werte sind bei Hunden bei verschiedenen Störungen erhöht und korrelieren generell mit der Schwere der Erkrankung [196, 206, 213-216].

2.4.4 Haptoglobin

Haptoglobin (Hp), ein Alpha-Globulin-Bestandteil, bindet freies Hämoglobin (Hb), das im Plasma toxisch und proinflammatorisch ist [217] und reduziert oxidativen Schaden, der mit Hämolyse assoziiert ist [218]. Der Komplex aus Haptoglobin und Hämoglobin wird via CD163 erkannt, einem spezifischen Oberflächenrezeptor auf Makrophagen und wird dann von diesen Zellen beseitigt [219]. Eine Immunomodulation wird teilweise durch die Bindung von Hp an den CD11/CD18-Rezeptor von Effektorzellen vermittelt [220]. Hp hemmt des Weiteren die Chemotaxis von Granulozyten, die Phagozytose von *E.coli* und die intrazelluläre, bakterizide Aktivität von Granulozyten gegen *E.coli* [221]. Es kann sowohl die Mastzellproliferation [222] als auch die spontane Reifung von epidermalen Langerhans Zellen [223] hemmen oder aber die T-Zell-Proliferation unterdrücken [224-226].

Hp ist ein major APP bei vielen Spezies der Haus- und Nutztiere. Bei Wiederkäuern ist der Basalwert bei gesunden Tieren vernachlässigbar, aber er ist über das 100-fache nach Immunstimulation erhöht [169, 170]. Viele Studien haben die Signifikanz von Hp als klinisch nützlichen Parameter gezeigt, um das Auftreten und die Schwere von entzündlichen Reaktionen bei Rindern mit Mastitis, Pneumonie, Enteritis, Peritonitis, Endocarditis, Abzessen, Endometritis und anderen infektiösen Bedingungen zu messen [175-177, 191, 227-241]. Hp wird bei Rindern mit toxischer puerperaler Mastitis zur Beobachtung der Wirksamkeit von Antibiotika eingesetzt [242]. Ebenso kann man mit Hp nach einer Bullenkastration den Effekt von antiinflammatorischen Medikamenten bestimmen [243]. Zudem wird es genutzt um die relativen Effekte einer bakteriellen Kontamination und einer Involution des Uterus bei Milchkühen nach dem Kalben [178] oder die Effekte einer Behandlung bei durch einen Transport gestresste Mastrinder [179], die Effekte von Schwanz beißen [244] oder einer chirurgischer Kastration [245] zu bestimmen.

Erhöhte Hp-Konzentrationen treten nicht nur bei Entzündungen auf, sondern auch bei Kühen mit einem Fettlebersyndrom [246-249], bei Hunger, der Behandlung mit Dexamethason [250] und nach der Geburt [251], sowie bei Kälbern, die aufgrund von Transport gestresst sind [225].

Hp wird sowohl bei der Diagnose von Gewebeschäden und infektiösen Erkrankungen [252, 253], als auch bei der Prognose einer Dystokie [254] bei Schafen, genutzt. Es dient ebenso bei Mutterschafen zur Bestimmung der Beziehung zwischen Uterusinvolution und der Präsenz von intrauterinen Bakterien [255].

Bei Schweinen wird Hp für das Monitoring von entzündlichen Erkrankungen nach Infektionen oder Terpentinbehandlung genutzt [210, 256-263]. Um zwischen normalen Schweinen und Schweinen mit niedriger Gewichtszunahme infolge subklinischer Infektionen zu differenzieren, können Messungen von Hp-Konzentrationen vorgenommen werden [264].

Bei Pferden wird Hp zur Beobachtung von systemischen, inflammatorischen Antworten verwendet [265-268]. An Equine Grass Sickness erkrankte Tiere und Ponies mit alimentärer Hufrehe weisen eine erhöhte Hp-Konzentration im Serum auf [195, 269, 270]. Ebenfalls können erhöhte Konzentrationen bei tragenden Stuten und nach der Geburt beobachtet werden [266].

Bei Hunden ist Hp ein moderates APP [196].

2.4.5 Fibrinogen

Fibrinogen (Fb) wirkt bei der Homöostase, indem es ein Substrat für die Fibrininformation bereitstellt. Es wirkt ebenso bei der Gewebereparatur mit, indem es eine Matrix für einwandernde Entzündungszellen bereitstellt [271]. Fb bindet speziell an CD11/CD18-Integrine auf der Zelloberfläche von migrierten Phagozyten und triggert damit eine Kaskade intrazellulärer Signale, die zu einer verstärkten Degranulierung, Phagozytose, Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität und verspätete Apoptose führt [272, 273].

Fibrinogen wird bei Rind und Schaf als zuverlässiger Marker für eine Entzündung, bakterielle Infektion oder einem chirurgischen Trauma genutzt [235, 238, 252, 274]. Bei Pferden wird Fb ebenfalls zur Diagnose von Infektionen genutzt [275-278]. Zu einer Hyperfibrinogenämie kommt es nach einer intramuskulären Injektion von Freund´s complete Adjuvans [279]. Bei trächtigen Hunden wurden erhöhte Fb-Werte drei Wochen nach der Einnistung der befruchteten Eizelle beobachtet. Aus diesem Grund könnte Fb für eine frühzeitige Trächtigkeitsdiagnose beim Hund nützlich sein [280].

2.4.6 Protease-Inhibitoren

Alpha-1-Antitrypsin (AT), Alpha-1-Antichymotrypsin und Alpha-2-Makroglobulin sind APPs mit einer großen Proteaseinhibitor-Aktivität. Während einer Entzündung werden sie

hauptsächlich in der Leber synthetisiert um Proteasen zu entfernen, die bei einer Schädigung des Körpers freigesetzt werden. Besonders AT ist der größte zirkulierende Serinproteaseninhibitor, der Gewebe vor einem Angriff von neutrophilen Granulozyten schützt [281]. AT kann auch die Aktivität von NK-Zellen hemmen [168]. Alpha-2-Makroglobulin spielt dagegen eine Rolle als Carrierprotein für IL-6, womit es das Zytokin vor abbauenden Proteasen im Plasma schützt [282].

Die Verwendung von Proteaseinhibitoren ist in der Veterinärmedizin nicht weit verbreitet. Somit ist der diagnostische Wert dieser APP bisher noch nicht ermittelt. Obwohl bei Rindern mit einer Entzündung erhöhte Werte dieser Inhibitoren im Serum beobachtet wurden [169, 170, 191], konnte die klinische Signifikanz von AT bei der Entwicklung einer experimentellen Mastitis in einer Studie nicht bestätigt werden [235]. Die Serumkonzentration von AT bei stationär aufgenommenen Hunden unterscheidet sich nicht von der bei gesunden Hunden [283]. Bei Nagern ist Alpha-2-Makroglobulin ein wichtiges APP [284].

2.4.7 Serum Amyloid A

Serum Amyloid A (SAA) ist ein Akute Phase Apolipoprotein der High-density Lipoprotein-Fraktion im Plasma. Seine physiologische Rolle bei der Wirtsabwehr während einer Entzündung ist nicht gut verstanden, aber verschiedene Effekte wurden beobachtet. Dazu gehört die Entgiftung von Endotoxin, die Hemmung der Lymphozyten- und Endothelzellproliferation, die Hemmung einer Thrombozytenaggregation und die Hemmung einer Anheftung von T-Lymphozyten an Proteine der extrazellulären Matrix [285]. SAA ist ebenfalls involviert in die Chemotaxis von Entzündungszellen zum Entzündungsort [286]. Es könnte ebenfalls eine Rolle bei der Runterregulierung des inflammatorischen Prozesses spielen, indem es die Freisetzung der Myeloperoxidase und die gezielte Migration von Phagozyten hemmt [287]. Des Weiteren ist bekannt, dass intestinale Epithelzellen SAA nach Stimulation mit TNF-alpha, IL-6 und IL-1-beta freisetzen können [288]. Das Protein könnte auch bei lokalen Verteidigungsmechanismen des Darms gegen Endotoxin involviert sein. Die Sekretion von SAA wurde auch bei physiologischem bovinen, equinen und ovinen Kolostrum beobachtet [289].

Die Verwendung von SAA-Assays in der veterinärmedizinischen Diagnose ist weniger verbreitet wie Hp-Assays, was vermutlich an der Schwierigkeit der Messung von SAA im Serum liegt [212].

SAA ist bei der Diagnose von Entzündungen beim Rind ein nützliches APP [176, 241, 290-295]. Eine Erhöhung von SAA-Werten in der Milch wurde ebenso bei Kühen und Mutterschafen mit Mastitis gefunden [176, 296]. Erhöhte SAA-Werte wurden ebenfalls bei Kühen während der Geburt [291] oder bei gestressten Rindern gemessen [297], was zeigt, dass die Akute Phase Antwort auch unabhängig einer Entzündung aktiviert wird. Bei Pferden ist eine Messung von Serum-SAA-Werten nützlich, um virale Infektionen oder ein chirurgisches Trauma [298], Septikämie und Fohleninfektionen bei neugeborenen Fohlen [299] und Influenzainfektionen [300] zu diagnostizieren. Ebenso fiel auf, dass bei Pferden mit einer experimentell hervorgerufenen Entzündung die SAA-Konzentration schnell bis auf das 40-fache steigt und auch für einige Tage so hoch bleiben kann [301]. SAA ist aber auch bei Schweinen wichtig [302]. Ein Sandwich-ELISA, der für canines SAA etabliert wurde, könnte ebenfalls dazu genutzt werden um felines SAA zu messen [303].

2.4.8 Transferrin

Im Allgemeinen ist Transferrin (Tf) bei Säugern ein negatives APP, das Eisen bindet [304].

Bei Rindern mit einer akuten Infektion ist der Tf-Wert [305, 306], wie auch bei Schweinen mit einer akuten experimentellen Salmonellose [307], verringert.

2.5 Akute Phase Proteine beim Geflügel

2.5.1 Alpha-1-Acid-Glycoprotein

Bei Hühnern ist AGP ein APP von klinischer Signifikanz. Erhöhte AGP-Level wurden bei Hühnern beobachtet, die mit verschiedenen bakteriellen oder viralen Pathogenen infiziert waren [308-311]. AGP ist ein vielversprechender Serumparameter um Infektionsprobleme bei Hennen zu diagnostizieren, besonders wenn die Schwere der Infektion durch Stress verschlimmert wird [312].

2.5.2 Caeruloplasmin

Diese Ferroxidase ist auch ein Infektionsindikator bei Hühnern [313]. Es ist ein moderates APP, das auf das 10-bis 100-fache nach Stimulation ansteigt. Moderate bis hohe Werte wurden bei Infektionen mit *Eimeria tenella* und *E.coli* beobachtet [314, 315].

2.5.3 C-reaktives Protein

Bei Hühnern induzieren Infektionen mit Parasiten wie *Eimeria* spp. und *Histomonas* hohe

Werte an CRP [314].

2.5.4 Haptoglobin

Das Plasma von Säugern und Fischen beinhaltet Haptoglobin, jedoch fehlt dieses APP gänzlich bei Frosch und Huhn. Jedoch gibt es ein anderes Hämoglobin-bindendes Protein, PIT54, das die Funktion von Haptoglobin während der Evolution der Vögel übernommen und das Haptoglobin beim Huhn vollständig ersetzt hat [316]. PIT54 ist ein Mitglied der Scavenger Rezeptoren, das nur bei Hühnern existiert. Es ist ein major APP bei Hühnern und erhöhte Werte wurden als Antwort auf eine *E.coli*-Infektion beobachtet [315].

2.5.5 Fibrinogen

Fb ist ein major APP beim Huhn, das um das drei- bis vierfache ansteigt, sein Maximum nach drei Tagen und nach sieben Tagen dann wieder seinen Basalwert erreicht hat [317]. Nach einer Infektion mit *E. tenella* und *E.coli* wurden moderate bis hohe Werte beobachtet [315].

2.5.6 Serum Amyloid A

SAA ist beim Huhn ein moderates APP, das um das 10-bis 100-fache nach Stimulation mit *E.coli* oder *Staphylococcus aureus* ansteigt. Hühner-SAA ist ein Vorläufer des Amyloid-A-Proteins. Tiere mit chronisch erhöhtem SAA können eine Amyloidose entwickeln. Seitdem Amyloidosen ein großes Problem bei Legehennenhaltungen sind, ist das Interesse der Geflügelindustrie an diesem Protein erhöht [314].

2.5.7 Transferrin-Ovotransferrin

Gegenteilig zum Säuger-Transferrin ist Ovotransferrin beim Huhn ein positives, moderates APP [304], das um das 10-bis 100-fache nach einem Entzündungsstimulus ansteigt. Erhöhte IL-6-Konzentrationen und eine erhöhte Anzahl an heterophilen Granulozyten führen zu einer Erhöhung von Ovotransferrin [318]. Nach drei Tagen kommt es zu einem Maximum des Wertes und dieser bleibt für fünf Tage so hoch. Nach weiteren zehn Tagen wird wieder der Basalwert erreicht. Infektionen mit *E.coli*, Pocken, dem Reovirus, infektiöser Bursitis, infektiöser Bronchitis und infektiöser Laryngotracheitis haben zu einem erhöhten Wert von Ovotransferrin im Serum geführt [319, 320]. Ovotransferrin erscheint als ein multifunktionelles Protein mit Eisen bindenden, Eisen liefernden, bakteriostatischen, bakteriziden, antiviralen und immunomodulierenden Eigenschaften [304].

2.5.8 Mannose bindendes Lektin

Das Mannose bindende Lektin gehört neben Surfactant und Conglutinin zur Familie der

Kollektine. Hühner-MBL wird in erster Linie in der Leber produziert und wird ins Blut sezerniert. Es wurden aber auch schon eine schwache Expression im Trachea-Larynx-Bereich, im abdominalen Luftsack, Infundibulum und Thymus beobachtet [321-323]. Das Hühner-MBL ist, wie das Säuger-MBL, ein schwaches APP, das nach einer Infektion nur um das ein- bis zweifache im Serum erhöht ist [324]. Messungen der Werte und der Verteilung von Hühner-MBL in verschiedenen Geweben während der Embryogenese und des juvenilen und adulten Lebens [322, 323] haben gezeigt, dass das Serum-MBL von Tag 11 vor dem Schlupf bis zu einem Alter von einem Jahr erhöht ist. Allerdings variieren die Werte zwischen verschiedenen Vogelspezies. Der Wert im Eigelb war vergleichbar zu dem im Serum, aber im Eiweiß wurde kein MBL gefunden. Es wird als wahrscheinlich angesehen, dass maternales Hühner-MBL, wie auch maternales IgY, vom Dottersack zum Embryo transportiert wird. Nach dem Schlupf wird dieses Hühner-MBL abgebaut, während neues, endogenes MBL im Huhn synthetisiert wird [322].

Nielsen et al. erforschten die Verteilung und die Funktion von Hühner-MBL in verschiedenen Geweben nach einer Infektion mit infektiöser Laryngotracheitis und infektiöser Bursitis. Bei nicht infizierten Hühnern wurde MBL im Cytoplasma einiger Leberzellen gefunden, aber die Werte stiegen bei infizierten Hühnern an. Des Weiteren wurden MBL-positive Zellen in den germinalen Zentren der Caecaltonsillen bei nicht infizierten Zellen, auf der Oberfläche und in mit infektiöser Laryngotracheitis infizierten Trachealzellen und im Cytoplasma Makrophagen-ähnliche Zellen in der Milz von IBD-infizierten Vögeln beobachtet [323]. Komplementaktivierung ist direkt assoziiert mit der Konzentration von MBL im Serum, was die Hypothese unterstützt, dass der Wert von MBL im Serum das Ausmaß der Virusneutralisation bestimmt, bevor die Antwort des adaptiven Immunsystems überhandnimmt [324].

Studien zeigten, dass Hühner mit einer niedrigen Konzentration an zirkulierendem MBL vor einer Infektion stärker an einer infektiösen Bronchitis erkranken [325] und nach einer *E.coli*-Infektion eine reduzierte Wachstumsrate aufweisen [326]. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass nach einer Infektion eine geringe MBL-Konzentration mit einer erhöhten Anzahl von *Pasteurella multocida* in der Milz assoziiert ist [327].

3 ZIELSETZUNG

Das Akute Phase Protein PTX3 ist bei den Spezies Mensch und Maus bereits gut untersucht und seine Funktionen im angeborenen Immunsystem sind zu weiten Teilen aufgeklärt. Bei früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe ist dieses Protein auch beim Huhn des Öfteren aufgefallen, da es bei Infektionen mit verschiedenen Erregern oder durch Immunstimuli hochreguliert wird. Daher ist es wahrscheinlich, dass es ebenfalls eine wichtige Rolle im aviären Immunsystem spielt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, das lange Pentraxin PTX3 des Huhns strukturell und funktionell näher zu untersuchen und zu charakterisieren um Hinweise über seine immunologische Rolle in der Abwehr von Infektionen zu erhalten.

Hierzu sollten Sequenz-Alignments gemacht werden um eine Aussage zur Struktur des PTX3 beim Huhn machen zu können. Um noch mehr über die Struktur von chPTX3 sagen zu können, sollte das Protein kloniert und als FLAG-getaggtetes Protein in HEK-293-Zellen exprimiert werden. Darüber hinaus sollten PCRs und qRT-PCRs Hinweise zum Expressionsmuster in verschiedenen Organen und Zellen liefern. Um einen direkten Nachweis von nativem PTX3 des Huhnes und damit weitere spezifische Forschung zu ermöglichen, sollten monoklonale Antikörper gegen das Protein generiert werden.

4 MATERIAL UND METHODEN

Die Hochzahlen beziehen sich auf die im Anhang alphabetisch aufgeführten Bezugsquellen.

4.1 Tiere und Tierhaltung

4.1.1 Hühner

Von Hühnern der Linie M11 wurde die RNA für die Genexpressionsanalysen mittels PCR präpariert und hieraus cDNA synthetisiert.

Hühnereier der Linie M11 wurden vom Institut für Tierzucht in Mariensee bezogen und am Institut für Tierphysiologie der LMU München unter Standardbedingungen bebrütet. Nach dem Schlüpfen wurden die Hühner in Kleingruppen (4 bis 8 Tiere) in Volieren gehalten. An die Hühner wurde handelsübliches Alleinfuttermittel für die jeweilige Aufzuchtphase²⁶ verfüttert und die Tiere wurden ad libitum mit Wasser versorgt.

Für den *in vivo* Tierversuch zur Bestimmung der Lipopolysaccharid (LPS)-Wirkung auf die Genexpression in Milz und Leber wurden Hühner der Linie LSL im Alter von 6 Wochen von Gut Heinrichsruh, Berglern geliefert und für 5 Tage bis zum Versuchsbeginn am Lehrstuhl für Tierphysiologie in München aufgestellt. Den Tieren wurde am Versuchstag LPS in die *Vena jugularis* injiziert. Nach drei Stunden wurden die Tiere getötet und Milz und Leber entnommen. Die *in vivo* Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern unter der Tierversuchsnummer 55.2-1-54-2531-121-09 genehmigt. Das Probenmaterial war aus dem genannten Versuch bereits vorhanden.

Die LSL-Hühner wurden in Kleingruppen in Volieren aufgestellt und bekamen ebenfalls handelsübliches Alleinfuttermittel²⁶. Die Wasserversorgung erfolgte ad libitum.

4.1.2 Mäuse

Balb/c-Mäuse wurden von der Firma Charles River, Wilmington/USA erworben um mit ihnen monoklonale Antikörper zu erzeugen. Sie wurden ab einem Lebensalter von 26 Tagen in Gruppen von 4 bis 5 Tieren in offener Käfighaltung gehalten, wobei die Käfige artgerecht mit Beschäftigungsmaterial und mit roten Plastik-Mäusehäusern ausgestattet waren. Den Mäusen wurde Alleinfuttermittel und auch frisches Wasser ad libitum zur Verfügung gestellt.

Die Mäuse wurden mehrfach immunisiert. Dies geschah mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern unter der Anzeigennummer 55.2-1-54-2532.0-60-2015.

4.2 Gewinnung von Organproben

Material:

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,2

40g	Natriumchlorid ¹
5,75g	Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat ¹
1,0g	Kaliumchlorid ¹
1,0g	Kaliumhydrogenphosphat ¹

ad 5L Aqua dest.

Einstellen des pH mit HCl und NaOH auf 7,2

Für die Arbeiten mit sterilem PBS wurde die Lösung autoklaviert

RNAlater¹⁵

Skalpellklingen²⁴

Steriles Besteck

Durchführung:

Nach einer Betäubung wurden die Hühner unter Blutentzug getötet. Anschließend wurden die Organe mit sterilem Besteck entnommen und in geeignete Medien aufgenommen. Für die nachfolgende Isolation der RNA wurden die entnommenen Organe in eiskaltem RNAlater überführt, bei 4°C für 12 Stunden gekühlt und bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

4.3 Isolierung primärer Leukozyten

Material:

PBS, pH7,2

Biocoll Separating Solution²

Dichte 1,077g/ml, isotonisch

Trypanblau-Lösung²

Zählkammer, modifiziert nach Neubauer²²

Heparinlösung (500 U/ ml)

5 ml Heparin-Natrium (25.000IU/5ml)²³

45ml RPMI 1640 with Glutamax³

Die Lösung wurde aliquotiert und bei 4°C gelagert

4.3.1 Gewinnung von Blut und Organen

Das Blut wurde aus der *Vena jugularis dextra* oder *Vena cutanea ulnaris superficialis* gewonnen. Die Spritzen wurden hierzu mit 0,2 ml Heparinlösung (500U/ml) beschichtet und es wurden Kanülen der Größe 0,7 x 40 mm gewählt.

Nach der Betäubung der Hühner folgte die Tötung mittels Blutentzug. Die Organe wurden anschließend mit sterilem Besteck entnommen und in 4°C sterilem PBS pH7,2 bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

4.3.2 Gewinnung peripherer mononukleärer Blutzellen

Nachdem die heparinisierten Vollblutproben im Verhältnis 1:2 mit PBS pH 7,2 verdünnt wurden, wurden die Proben über die *Biocoll Separating Solution* in einem 50ml-Falconröhrchen geschichtet. Mit einem bremsfreien, langsam beschleunigenden Programm wurde bei Raumtemperatur und 650xg die Dichtegradienten-Zentrifugation für 12 Minuten durchgeführt. Mittels einer Pipette wurden die Leukozyten danach aus der Interphase entnommen und zwei Mal für 10 Minuten mit PBS pH 7,2 bei 225xg und 4°C gewaschen.

4.3.3 Gewinnung von Zellen aus Milz und Thymus

Die Öffnung der Milzkapsel erfolgte mit sterilem Besteck. Beide Organe wurden ohne weitere Vorbereitung mittels eines Spritzenstempels durch ein Zellsieb in 4°C kaltem PBS pH 7,2 dissoziiert. Die daraus erhaltene Zellsuspension wurde anschließend für 10 Minuten zur Sedimentation in einem 50ml-Falconröhrchen auf Eis gestellt. Der somit gewonnene Überstand wurde ohne Sediment abpipettiert und im Anschluss für 10 Minuten in einem neuen Falconröhrchen bei 225xg und 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand wieder abpipettiert und das erhaltene Zellpellet in PBS pH 7,2 resuspendiert. Wie in 4.3.2 wurde eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt.

4.3.4 Mikroskopische Beurteilung der Zellen

Mittels Trypanblau-Lösung wurden die gewonnenen Leukozyten gefärbt, wodurch eine Differenzierung nach Lebend/Tot möglich wurde. Nachdem 10µl der Einzelzellsuspension mit 10µl Trypanblau gemischt wurden, wurden die Zellen in eine Zählkammer (modifiziert nach Neubauer) pipettiert. Danach wurde die Zellzahl mikroskopisch bestimmt und abschließend der Lebendzellanteil beurteilt. Bei allen verwendeten Proben lag dieser Wert

über 95%.

4.4 Zellkultur

4.4.1 Medien und Zusätze

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Medien und Zusätze bei 4°C gelagert.

Medium zum Kultivieren von HEK-293-Zellen (HEK-Medium)

445ml DMEM, high glucose, pyruvate, no glutamine³

50ml fetales Rinderserum (fetal bovine serum, FBS)²

5ml GlutaMAX™ Supplement³

Lagerung des FBS als Aliquots bei -20°C

Selektionsmedium bei der Erstellung stabil transfizierter Zelllinien

445ml DMEM, high glucose, pyruvate, no glutamine³

50 ml fetales Rinderserum (fetal bovine serum, FBS)²

5ml GlutaMAX™ Supplement³

2,5ml G418 (50mg/ml-Stammlösung)²

0,25% Trypsin-EDTA (1X)³

1x Trypsin-EDTA, pH 7,2

5ml 10x Trypsin-EDTA-Lösung²

45ml Aqua bidest., steril

Lagerung der 1x Trypsin-EDTA-Lösung als Aliquot bei -20°C

Fusionsmedium

425ml Iscove Basal Medium²

50ml Ultra low IgG Serum²⁷

10ml HAT-Supplement (50x)⁵

5ml Penicillin/Streptomycin-Lösung²

10ml murines IL-6 (Überstand der Zelllinie X-63)⁴

Erhaltungsmedium

425ml Iscove Basal Medium²

50ml Ultra low IgG Serum²⁷

10ml HT-Supplement (50x)⁵

5ml Penicillin/Streptomycin-Lösung²

10ml murines IL-6 (Überstand der Zelllinie X-63)⁴

Hybridoma-Medium

- 445ml Iscove Basal Medium²
- 50ml Fetal Bovine Serum, ultra-low IgG²
- 5ml Penicillin/Streptomycin-Lösung²

Einfriermedium

- 9ml fetales Rinderserum (fetal bovine serum, FBS)²
- 1ml DMSO (Dimethylsulfoxid, (CH₃)₂SO)¹

RPMI 1640 with Glutamax³**4.4.2 Verwendete Zelllinien**

Nachfolgende Tabelle zeigt die bei dieser Doktorarbeit eingesetzten Zelllinien.

Zelllinie	Zellart	Spezies	Medium	Referenz
HEK-293	Embryonale Nierenzellen	Mensch	HEK-Medium	[328]
HEK-293-T	Embryonale Nierenzellen	Mensch	HEK-Medium	[329]
X63-Ag8.653	Myleomazellen	Maus	Hybridoma-Medium	[330]

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

4.4.3 Kultivierung von Zelllinien

Für das Ausdünnen der adhärent wachsenden HEK-293 und HEK-293-T wurde das alte Medium abgenommen und die Zellen zwei Mal mit sterilem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 0,25% Trypsin-EDTA (1x) versetzt, um sie abzulösen. Nach 5 Minuten wurde das Trypsin-EDTA mit der doppelten Menge an Medium inaktiviert und die Zellen zusammen mit dem Trypsin-EDTA-Medium-Gemisch in ein Falconröhrchen überführt. Das Falconröhrchen wurde daraufhin 10 Minuten bei 1200U/min. bzw. 258xg zentrifugiert, sodass ein Zellpellet am Boden entstand. Der Überstand wurde abgeschüttet, das Pellet in frischem Medium resuspendiert und ein Fünftel davon erneut bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Bei jeder dritten Passage wurde den Zellen zur Selektion 250µg/ml G418 zugegeben.

Die Myelomazellen X63-Ag8.653 und auch die Hybridomazellen wurden zum Ausdünnen mit einem Zellschaber abgelöst. Im Anschluss daran wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 geteilt und das entnommene Volumen mit frischem Medium ersetzt. Danach wurden die Zellen wieder bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

4.4.4 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden in einer Einzelzellsuspension abzentrifugiert und anschließend wurde die

Dichte auf 5×10^6 Zellen/ml in kaltem Einfriermedium eingestellt. Zum Einfrieren wurde die Zellsuspension dann in Gefrierröhrchen in Aliquots von 1,8 ml pipettiert. Die Gefrierröhrchen wurden für mindestens 12 Stunden in einen CoolCell®-Gefrierbehälter von *Bio Cision* mit einer Kühlrate von $1^\circ\text{C}/\text{min}$ bei -80°C eingefroren. Nach spätestens drei Monaten wurden die Zellen für die Langzeit-Lagerung in einen Stickstofftank überführt.

4.4.5 Auftauen von Zellen

Das Auftauen erfolgte unter Schwenken im Wasserbad bei 37°C . Die nun aufgetauten Zellen wurden danach zügig in ein 50ml-Falconröhrchen überführt. Unter Schwenken wurde tropfenweise kaltes RPMI-Medium zur Ausdünnung des zytotoxischen DMSO zugegeben, bis eine Füllmenge von circa 20ml erreicht war. Das Falconröhrchen wurde anschließend zügig mit RPMI aufgefüllt und für 10 Minuten bei $225 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zur Kultivierung in Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche pipettiert.

4.5 RNA-Präparation

4.5.1 Durchführung einer RNA-Präparation

Material:

TpeqGold Trifast⁹

Lagerung bei 4°C

Chloroform pro analysis¹

Lagerung bei RT unter dem Abzug

Aqua bidest. (nukleasefrei)

Lagerung bei -20°C

Isopropanol¹

Lagerung bei RT unter dem Abzug

75% Ethanol

75ml Ethanol absolut¹

Lagerung bei RT unter dem Abzug

25ml Aqua bidest. (nukleasefrei)

Aus Organen

Für sämtliche Arbeiten wurde RNase freies Einwegmaterial und Handschuhe verwendet. 100mg Organgewebe wurden in 1ml gekühltem Trizol aufgenommen, mit 1g Keramik-Beads⁹

versetzt und mittels eines PreCellys Homogenisators⁹ aufgeschlossen. Dafür wurden diese Proben in einem ersten Durchgang für 30 Sekunden bei 6800rpm und danach in einem zweiten Durchgang 15 Sekunden bei 6000rpm homogenisiert. Zur Extraktion der RNA wurde den homogenisierten Organproben je 200µl Chloroform zugegeben und die Mischung 15 Sekunden stark geschüttelt. Danach wurden die Proben 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem darauffolgenden Zentrifugationsschritt (12.000xg für 15 Minuten bei 6°C) hatte sich die Suspension in drei Phasen aufgetrennt: am Boden eine rosa Protein-Phase, eine mittlere weiße DNA-Phase und eine obere wässrige RNA-Phase. Von der oberen wässrigen Phase wurden vorsichtig 500 µl abgenommen und in ein 2ml-Cup, das 500µl Isopropanol enthält, überführt und durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Die Probe wurde danach für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Probe 10 Minuten bei 12.000xg und 6°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand über dem RNA-Pellet vorsichtig abgegossen, das Cup ein paar Sekunden umgedreht auf einem sauberen Tuch stehen gelassen und 1ml 75%-iges Ethanol zugegeben. Das Cup wurde erneut für 5 Minuten bei 7500xg und 6°C zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Cup ein paar Sekunden umgedreht auf einem sauberen Tuch stehen gelassen. Nach dem folgenden Zentrifugationsschritt (für 1 Minute bei 7.500xg und 6°C) wurde das restliche Ethanol vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und das RNA-Pellet unter der PCR-Arbeitsstation⁹ 10 bis 30 Minuten getrocknet. Nach der Trocknungszeit wurde das RNA-Pellet mit 100µl RNase-freiem Wasser gelöst und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde das Cup für 10 Minuten im Thermoblock bei 58°C und 300rpm geschüttelt und danach direkt auf Eis gelagert. Die RNA-Konzentration und Reinheit wurde dann mit einem NanoDrop⁹ bestimmt und die Konzentration der RNA auf 500ng/ml bis 800ng/ml mit nukleasefreiem Aqua bidest. eingestellt. Die RNA wurde kurzfristig auf -20°C und langfristig auf -80°C gelagert.

Aus Blutzellen

Zellen aus 4.3.2 und 4.3.3 wurden zu je 1×10^7 Zellen aliquotiert und in 1ml Trizol lysiert bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Die RNA-Präparation wurde wie für die Organe beschrieben weiter durchgeführt.

4.5.2 Konzentrationsbestimmung der RNA im NanoDrop

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit wurde die Absorption der RNA bei 230nm bis 280nm mit einem NanoDrop⁹ gemessen. Bei einer Verunreinigung der RNA mit Guanidinisothiocyanat absorbiert die RNA bei 230nm, wohingegen mit Phenol verunreinigte

RNA bei 270nm absorbiert. Reine RNA absorbiert maximal bei 260nm. Der NanoDrop bestimmt Absorptionsverhältnisse von 260nm zu 230nm (260/230) und von 260nm zu 280nm (260/280). Für die RNA lag der Grenzwert zur Weiterverarbeitung im 260/280 Verhältnis bei mindestens 1,9. Für das 260/230 Verhältnis wurde der Grenzwert bei mindestens 2,0 festgelegt.

4.5.3 Bestimmung der RNA Integrität im Agilent 2100 Bioanalyzer™

Material:

RNA 6000 Nano-Kit

Durchführung:

Die isolierte RNA wurde zur Qualitätskontrolle im Agilent 2100 Bioanalyzer⁸ analysiert. Durch eine chip-basierte Technologie kann dieser die Intaktheit der RNA ermitteln und eventuell geschädigte RNA erkennen. Hierfür werden die RNA-Moleküle ihrer Größe nach aufgetrennt und in einem Elektropherogramm dargestellt. Die Integrität der RNA (RIN) wird anschließend u.a. aus dem Verhältnis des 18s zum 28s rRNA Peak ermittelt. Der Wert 1 entspricht einer vollständig degradierten RNA, wohingegen der Wert 10 auf eine vollständig intakte RNA hindeutet.

Für eine Weiterverarbeitung wurde ausschließlich RNA mit einer RIN größer 8,2 vorausgesetzt.

4.6 cDNA-Synthese

Um Verunreinigungen mit genomischer DNA zu entfernen wurde vor der cDNA-Synthese ein DNase-Verdau durchgeführt. 400ng der reinen RNA wurde mittels *GoScript™ Reverse Transcription System* in cDNA umgeschrieben.

4.6.1 DNase Verdau

Material:

RNA Proben

Lagerung bei -80°C

25mM EDTA Lösung³

Lagerung bei -20°C

10x Reaktionspuffer mit MgCl₂³

Lagerung bei -20°C

DNase I, RNase free³ (1U/μl)

Lagerung bei -20°C

Aqua bidest. (nukleasefrei)

Lagerung bei -20°C

Durchführung:

Ansatz für einen DNase Verdau:

RNA	1μg
DNase	1μl (1U/μl)
10x Reaktionspuffer mit MgCl ₂	1μl
Aqua bidest. (nukleasefrei)	ad 9μl

30 Minuten Inkubation bei 37°C im PCR Cycler

25mM EDTA	1μl
-----------	-----

10 Minuten Inkubation bei 65°C im PCR Cycler**4.6.2 cDNA Synthese****Material:****DNase verdaute RNA****GoScript™ Reverse Transcription System⁷**

Lagerung bei -20°C

Aqua bidest. (nukleasefrei)

Lagerung bei -20°C

Durchführung:

DNase verdaute RNA	4,4μl
Oligo(dt)15 Primer	1μl
Aqua bidest. (nukleasefrei)	4,6μl

5 Minuten Inkubation im PCR Cycler bei 70°C**5 Minuten Inkubation auf Eis**

GOScript 5x Reaktionspuffer	4μl
MgCl ₂ (25mM)	2μl
GOScript Reverse Transkriptase	1μl
PCR Nukleotid Mix (0,5mM)	1μl
RNasin Ribonuklease Hemmer	0,5μl

Aqua bidest. (nukleasefrei) 1,5µl

5 Minuten Inkubation im PCR Cycler bei 25°C, 60 Minuten Inkubation im PCR Cycler bei 42°C und 15 Minuten Inkubation im PCR Cycler bei 70°C

Anschließende Lagerung der Proben bis zur Verwendung bei -20°C

4.7 Erstellen von Primern

Für die konventionelle PCR wurden die Primer mithilfe des NEB Builder Assembly Tools erstellt, wobei die Synthese durch die Firma Eurofins Genomics aus Ebersberg erfolgte.

4.7.1 Primer für die konventionelle PCR

Folgende Primer wurden in den konventionellen PCRs, die während dieser Doktorarbeit angesetzt wurden, verwendet.

Zielsequenz	Sequenz (5'→3')	Verwendung
chPTX3	ATGCTGCCTGGAGGAGTGCTTTC (s)	Kapitel 4.11.1
chPTX3	TTAAGAAACATACTGAGCTCCTCC (as)	Kapitel 4.11.1
chPTX3 ohne SP	TTACAAGGATGACGATGACAAGCTTCCGTGCTG GATGAAGGC (s)	Kapitel 4.11.2
chPTX3 ohne SP	CTGAGATGAGTTTTTGTCTCTAGATTAAGAAACA TACTGAGCTCCTCCATATAG (as)	Kapitel 4.11.2
chGAPDH	CACGGACACTTCAAGGGCACTG (s)	Kapitel 4.8.2 (chGAPDH-Nachweis)
chGAPDH	CTCCACAATGCCAAAGTTGTC (as)	Kapitel 4.8.2 (chGAPDH-Nachweis)
chPTX3	ACCAACCTGAGGATGCTG (s)	Kapitel 4.8.2 (chPTX3-Nachweis)
chPTX3	CCGTAGGAGAAGATGATGGTT (as)	Kapitel 4.8.2 (chPTX3-Nachweis)

Tabelle 2: Primer für die konventionelle PCR

4.7.2 Primer für die quantitative PCR

Die verwendeten GAPDH-Primer wurden von der Firma MWG aus Ebersberg synthetisiert und hatten eine Annealing-Temperatur von 59°C. Die Spezifität dieses Primerpaars wurde durch Sequenzierung der amplifizierten DNA durch die Firma GATC aus Konstanz überprüft. Die Primer mit der PTX3-Sequenz wurden dagegen von der Firma QIAGEN QuantiTect¹¹ nach firmeneigenen Kriterien designt und synthetisiert. Hier empfiehlt der Hersteller eine Annealing-Temperatur von 56°C.

Primer	Primersequenz sense	Primersequenz antisense
GAPDH	AGGGTGGTGCTAAGCGTGTT	AAGGGTGCCAGGCAGTTG

Tabelle 3: Verwendete Primer für die qRT-PCR

4.8 Polymerase Kettenreaktion

Mittels Polymerase Kettenreaktion kann eine spezifische DNA-Sequenz millionenfach vervielfacht werden, indem zu einer Lösung mit der Zielsequenz ein Primerpaar, dNTPs und eine hitzestabile DNA-Polymerase zugegeben wird. Ein Amplifikationszyklus läuft in drei Phasen ab:

- 1) Die zwei Stränge der ursprünglichen DNA werden bei 95°C getrennt
- 2) Hybridisieren der Primer mit jeweils einem Strang bei spezifischen Temperaturen
- 3) DNA-Synthese (Elongation) bei 72°C

Um die in den Klonierungen eingesetzten Inserts herzustellen, wurden PCR-Reaktionen mittels *Phusion DNA Polymerase*³ angesetzt. Zum Nachweis von PTX3 in verschiedenen Geweben wurden mit einer PCR-Reaktion mittels Taq-Polymerase *FIREpol*¹⁰ das gewünschte DNA-Fragment amplifiziert. Zur Bestimmung des mRNA-Gehaltes von PTX3 in verschiedenen Gewebeproben, wurden qRT-PCR-Analysen durchgeführt.

4.8.1 Polymerase Kettenreaktion mittels *Phusion DNA Polymerase*

Die *Phusion DNA Polymerase*³ hat wegen ihrer Korrekturfunktion (engl. proof reading) eine besonders niedrige Fehlerrate beim Einbau neuer Nucleotide während der Amplifikation der DNA und eignet sich deshalb gut für Klonierungen und andere Anwendungen, bei denen eine hohe Genauigkeit ausschlaggebend ist. Den Amplifikationszyklen wurde eine initiale Denaturierung bei 98 °C für 30 Sekunden vorgeschaltet sowie eine finale Elongation bei 72 °C für 10 Minuten nachgeschaltet.

Reaktionsansatz:

5x Phusion HF Buffer ³	10µl
Primer sense (10pm)	10µl
Primer antisense (10pm)	10µl
dNTPs ³	5µl

<i>Phusion DNA Polymerase</i> ³	0,5µl
Template	variabel
Nukleasefreies Wasser	variabel
Gesamt	50µl

4.8.2 Polymerase Kettenreaktion mittels *5x FIREpol® Master Mix*

Der *FIREpol® Master Mix* enthält eine Taq-Polymerase ohne *proof reading*-Funktion, die bei hohen Temperaturen nicht zerstört wird. Den 34 Amplifikationszyklen wurde eine initiale Denaturierung bei 95°C für vier Sekunden vorgeschaltet sowie eine finale Elongation bei 72°C für 10 Minuten nachgeschaltet. Das Anlagern der Primer erfolgt bei 50°C und die Verlängerung des DNA-Strangs dauert 45 Sekunden.

Reaktionsansatz:

<i>5x FIREpol® Master Mix</i> ¹⁰	4µl
Primer sense (1pmol/µl)	4µl
Primer antisense (1pmol/µl)	4µl
Template (cDNA)	2µl
Nukleasefreies Wasser	6µl
Gesamt	20µl

Um nachzuweisen, dass die in der PCR verwendete cDNA noch intakt ist, wurde eine PCR mit Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) im gleichen Ansatz unter gleichen Bedingungen pipettiert.

4.8.3 Quantitative RT-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

Material:

GoTaq q-PCR Master Mix⁷

Lagerung bei -20°C

qPCR Primer (5pmol/µl)

Lagerung bei -20°C

Aqua bidest (nukleasefrei)

Lagerung bei -20°C

Durchführung qRT-PCR:

Ein Mastermix wurde mit folgenden Komponenten angesetzt:

<i>GoTaq Mastermix</i>	12,5µl
Primer sense	1,5µl

Primer antisense	1,5µl
100xCXR Reference Dye	0,25µl
Aqua bidest (nukleasefrei)	4,25µl

20µl von diesem Mastermix wurden in eine 96-Loch-qPCR-Platte²⁵ gegeben und jeweils 5µl cDNA (entsprechen 10ng) zupipettiert und gemischt. Die Platte wurde dann mit einer Folie abgedichtet. Hierbei wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen bilden und die Platte luftdicht verschlossen ist.

Die Durchführung der qRT-PCR erfolgte nach folgendem Temperaturprotokoll:

Phase	Temperatur	Zeit	Wiederholungen	Funktion
Initiale Aktivierungsphase	95°C	2 min.	1 mal	
	95°C	15 sek.		Denaturierung
Amplifikationsphase	59°C	30 sek.	40 mal	Annealing
	72°C	30 sek.		Extension
Schmelzkurve	95°C	15 sek.		
	57°C	30 sek.	1 mal	
	95°C	15 sek.		

Auswertung:

Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde der CT-Wert der exponentiellen Phase bestimmt. Da alle Reaktionen in Duplikaten angesetzt wurden, werden fortlaufend Mittelwerte der CT-Werte verwendet. Der CT-Wert der Probe wurde vom CT-Wert des *Housekeeping*-Gens (GAPDH) subtrahiert und die daraus erhaltene Differenz (Δ CT) von der maximalen Anzahl (40) der Amplifikationszyklen abgezogen. Somit ist eine direkte Proportionalität zur Expression gegeben. Um zwei verschiedene Gruppen vergleichbar zu machen, wurde die Differenz der Δ CT-Werte der Gruppen gebildet - der $\Delta\Delta$ CT-Wert. Somit erhielt man die relative Expressionsänderung zwischen den beiden Gruppen. Die Ermittlung der n-fachen Expression E eines Gens wurde die Formel $E=2^{-\Delta\Delta CT}$ vorgenommen.

4.9 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Stücke können durch die Agarose-Gelelektrophorese ihrer Länge nach aufgetrennt werden. Die geladenen Fragmente wandern dank einer konstanten Spannung durch das Gel und werden somit nach einer Färbung mit GelRED unter UV-Licht sichtbar.

Material:

Agarose¹

5x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)

54g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)¹

27,5g Borsäure¹

20ml 0,5M EDTA¹, pH 8,0

ad 1000ml Aqua dest.

1x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)

1:5 Verdünnung des 5x Stocks mit Aqua dest.

Orange G Loading Dye Buffer

60ml Glycerol¹

12ml 0,5M EDTA¹

100mg Orange G¹

ad 100ml Aqua bidest.

6x Orange G Loading Dye mit GelRed (Ladepuffer)

990µl 6x Orange G Loading Dye

10µl *GelRed™ Nucleid Acid Stain* (10000X in water)¹²

1kb Plus DNA-Ladder mit GelRed (Marker)

4,5µl *1 kb Plus DNA Ladder*³

25µl 6x Orange G Loading Dye mit GelRed

120,5µl nukleasefreies Wasser

Durchführung:

Zur Herstellung von 1%-Agarosegel wurde die benötigte Menge Agarose abgewogen und einer entsprechenden Menge 1x TBE-Puffer zugegeben. Anschließend wurde die Lösung bis zum Klarwerden bei höchster Stufe in einer Mikrowelle erhitzt um sie dann abgekühlt und ohne Blasen in einen Gelträger mit eingespanntem Probenkamm zu gießen. Das Gel härtete nach circa 30 Minuten bei Raumtemperatur aus, wurde anschließend in eine Gelelektrophoresekammer überführt und diese mit 1x TBE aufgefüllt. Nach dem Versetzen der Proben mit 6x Orange G Loading Dye mit GelRed (5 Teile Probe + 1 Teil Loading Dye)

wurde die Mischung in die Geltaschen pipettiert. Als Referenz diente eine Tasche mit DNA-Marker. Nach Anlegen einer konstanten Spannung von 150V durch das Power Pack wanderten die negativ geladenen DNA-Fragmente im Gel in Richtung der Kathode. Die dadurch entstandenen Banden wurden mittels Gel Doc-System *ImageQuant TL 7.0*²¹ fotografisch festgehalten.

Die Herstellung der 1%-igen Agarosegele erfolgte stets kurz vor der Verwendung.

4.10 DNA-Aufreinigung

Material:

Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System⁷

DNA-haltige Probe

Um DNA sowohl aus Agarosegelen als auch aus PCR-Reaktionen aufzureinigen wurde das Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System verwendet. Die Durchführung erfolgte zum größten Teil gemäß Angaben des Herstellers. Einzige Änderung war die Zugabe von 32µl statt 50µl nukleasefreiem Wasser im Elutionsschritt.

4.11 Klonierung

4.11.1 Klonierung von PTX3 in den pGEM®-T Easy Vector

Um sicherzustellen, dass die cDNA die richtige chPTX3-Sequenz enthält, wurde das Protein zunächst in den kommerziellen pGEM®-T Easy Klonierungsvektor⁷ von Promega kloniert und anschließend wurde zur Kontrolle das Plasmid zur Sequenzierung zu GATC, Konstanz geschickt.

Der pGEM®-T Easy Klonierungsvektor ist 3 kb groß, linearisiert durch Restriktionsverdau mit EcoRV und besitzt einen 3'-terminalen Thymidinüberhang. Er verfügt außerdem über ein lacZ-Gen mit integrierter multipler Klonierungsstelle und ein Ampicillin-Resistenzgen. Die multiple Klonierungsstelle wird von T7 und SP6 RNA-Polymerase-Promotoren flankiert.

Amplifikation der Gensequenz von PTX3 mittels PCR

Für diese PCR wurde die *Phusion DNA Polymerase*³ genutzt und als Template die cDNA des Stimulationsversuchs mit LPS aus der Milz (s. 4.1.1) verwendet.

Reaktionsansatz:

5x Phusion HF Buffer ³	10µl
dNTPs ³	5µl
Primer sense (10pm)	10µl
Primer antisense (10pm)	10µl
Nukleasefreies Wasser	12,5µl
cDNA-Template	2µl
<i>Phusion DNA Polymerase</i> ³	0,5µl
Gesamt	50µl

PCR-Bedingungen:

Annealing-Temperatur	63°C
Extensionszeit	20 sek.

Anhängen von 3'-A-Überhängen an PCR-Produkte

PCR-Produkte der *Phusion DNA Polymerase* besitzen am 3'Ende keinen Adenosin-Überhang (A-Überhang). Dieser ist für die erfolgreiche Klonierung in den pGEM-Vektor aber notwendig, da er einen 3'-terminalen Thymidinüberhang besitzt. Für eine TA-Klonierung in den pGEM®-T Easy Vector mussten diesen DNA-Fragmenten also zuerst 3'-A-Überhänge mittels einer *GoTaq®G2 DNA Polymerase* angefügt werden. Nach dem Pipettieren des Reaktionsansatzes wurde dieser im PCR Cycler 2 Minuten bei 95°C und 10 Minuten bei 72°C inkubiert.

Material:**PCR-Produkt****GoTaq-Reaktionspuffer⁷****10mM dNTPs⁷****GoTaq®G2 DNA Polymerase⁷ (5u/µl)****Reaktionsansatz:**

PCR-Produkt	19µl
1x-Reaktionspuffer	5µl
10mM dNTPs	0,5µl
GoTaq®G2 DNA Polymerase (5u/µl)	0,5µl
Gesamt	25µl

Ligation von PCR-Produkten mit dem pGEM®-T Easy Vector

Die Ligation des PCR-Produkts mit dem pGEM®-T Easy Vector erfolgte mit der im Klonierungskit vorhandenen T4 DNA-Ligase. Anschließend erfolgte die Transformation von 50µl des Ligationsansatzes in kompetente *E.coli* JM109 nach Herstellerangaben und eine Plasmidpräparation (s. 4.12). Die Lagerung der transformierten Bakterien erfolgte bei -80°C.

Material:

2x Rapid Ligation Buffer⁷

pGEM®-T Easy Vector⁷

PCR-Produkt

T4 DNA-Ligase⁷

Super optimal broth with catabolite repression Medium (SOC-Medium)

5,1g	SOC-Pulvermedium ¹
150ml	Aqua bidest.
2ml	250mM KCl ¹ zugeben
	Mit 1M HCl ¹ auf pH 7,0 einstellen
	Ad 200ml Aqua bidest., Autoklavieren der Lösung
1ml	MgCl ₂ – Lösung ¹⁷ (2M, steril)
4ml	Glucose-Lösung ¹ (1M, steril)

Lysogeny broth (LB)-Agar-Platte

Dem noch flüssigen Agar wurde bei einer Temperatur von unter 60°C

Ampicilin in einer Konzentration von 100µg/ml zugesetzt

***E.coli* JM109**⁷

Nukleasefreies Wasser

4.11.2 Klonierung von PTX3 in p3xFLAG-myc-CMV-25

Folgende Konstrukte wurden während dieser Arbeit verwendet bzw. erstellt:

Interne Konstrukte-Nr.	Insert	Vektor	Klonierungsenzyme	Resistenz
K 108	chIL7	p3xFLAG-myc-CMV-25	HindIII/XbaI	Amp/Neo
K 225	PTX3	p3xFLAG-myc-CMV-25		Amp/Neo

Tabelle 4: Verwendete Konstrukte bei der Klonierung von chPTX3

Das Konstrukt K108 wurde in vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe Univ.-Prof. Dr.

Bernd Kaspers erstellt und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Das Konstrukt K225 wurde im Rahmen dieser Arbeit erstellt.

Verdau des Vektors K108 durch die Restriktionsenzyme HindIII/XbaI

Nachdem in der Gensequenz mit Hilfe des Programmes *Lasergene SeqMan*, Madison, USA geeignete Schnittstellen identifiziert wurden, konnte der Vektor des K108 durch die Restriktionsenzyme HindIII/XbaI verdaut und für eine spätere Klonierungsreaktion linearisiert werden. Um die optimalen Reaktionsbedingungen für die verschiedenen Enzyme zu gewährleisten, wurde der vom Hersteller empfohlene Puffer verwendet. Nach dem Pipettieren des Reaktionsansatzes wurde dieser für drei Stunden bei 37°C inkubiert.

Material:

DNA-Plasmid von K108 (1µg)

Restriktions-Endonukleasen HindIII/XbaI

Enzym-spezifische Reaktions-Puffer

Reaktionsansatz:

HindIII	1µl
XbaI	0,5µl
10x-Tango Reaktions-Puffer	5µl
DNA-Plasmid K108	2,1µl
Aqua bidest. (nukleasefrei)	41,4µl
Gesamt	50µl

Amplifikation der Gensequenz von PTX3 mittels PCR

Abermals wurde für die PCR die *Phusion DNA Polymerase*³ genutzt. Zur Herstellung des PTX3-Inserts wurde als Template für die PCR der vierte Klon obiger Plasmidpräparation ausgewählt (4.11.1). Wichtig war hierbei, dass das PTX3 ohne Signalpeptid amplifiziert wurde, da der Vektor bereits über ein Signalpeptid verfügt. Die hierfür verwendeten Primer sind in Tabelle 2 (s. 4.7.1) aufgeführt.

Reaktionsansatz:

5x Phusion HF Buffer ³	10µl
dNTPs ³	5µl
Primer sense (10pm)	10µl

Primer antisense (10pm)	10µl
DNA aus Klon 4 (1µg)	0,73µl
<i>Phusion DNA Polymerase</i> ³	0,5µl
Nukleasefreies Wasser	13,77µl
Gesamt	50µl

PCR-Bedingungen:

Annealing-Temperatur	64°C
Extensionszeit	20 sek.

Ligation von chPTX3 mit dem Vektor p3xFLAG-myc-CMV-25 mittels Gibson Assembly

Um das chPTX3 mit dem Vektor zu verbinden, wurden die aufgereinigten DNA-Stücke in einer Konzentration von 0,02-0,05pmol/µl zusammen mit dem Gibson Assembly Kloning Kit bei 50°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden 2µl dieses Reaktionsansatzes nach Herstellerangaben in NEB 5-alpha kompetente *E.coli* transformiert. Diese transformierten Bakterien wurden dann bei -80°C gelagert.

Material:

*Gibson Assembly Kloning Kit*¹³

Vektor, linearisiert¹⁵

PCR-Insert

Super optimal broth with catabolite repression Medium (SOC-Medium)

Lysogeny broth (LB) -Amp-Agar-Platte

LB-Amp-Medium¹

4.12 Plasmidpräparation aus Bakterien

4.12.1 Isolation des vervielfältigten Materials aus Bakterien

Um die Bakteriensuspensionen aus 4.11.1 und 4.11.2 langfristig lagern zu können wurden 850µl der Bakteriensuspensionen mit 150µl Glycerol gemischt. Diese Glycerolstocks wurden bei -80°C gelagert. Mittels des *PureYield*TM *Plasmid Miniprep Systems* wurde dann die Plasmid-DNA der übrigen Bakteriensuspensionen aufgereinigt und im NanoDrop ihre Konzentration spektrophotometrisch bestimmt. Das *PureYield*TM *Plasmid Midiprep System* wurde nach Herstelleranweisungen zur Aufreinigung größere Mengen an Bakteriensuspensionen genutzt.

Material:

*PureYield™ Plasmid Miniprep System*⁷

*PureYield™ Plasmid Midiprep System*⁷

Glycerol¹

4.12.2 Ligationskontrolle

Die durch einen Restriktionsenzymverdau erhaltenen Banden (Vektor und Insert) können anhand ihrer Größe per Agarose-Gelelektrophorese beurteilt werden. Die Plasmide wurden dann im Anschluss zur Sequenzierung an die Firma GATC nach Konstanz geschickt. Unter der Verwendung des Programms *Lasergene*® von DNASTAR, Madison, USA wurden die zurückerhaltenen Gensequenzen mit den angefertigten Konstruktkarten verglichen und die Plasmid-DNA wurde bei einem positiven Resultat nummeriert. Die Langzeitlagerung des Konstrukts erfolgte bei -20°C.

4.13 Eukaryotische Expression von rekombinantem PTX3**Material:**

Medium zum Kultivieren von HEK-293-T-Zellen und HEK-293-Zellen (s. 4.3.1.)

RPMI 1640 mit Glutamax³

XTreme-Gene⁶

Opti-MEM™³

Plasmid-DNA

G418¹⁶

Trypsin³

4.13.1 Transiente Transfektion von HEK-293-T-Zellen

Die Zellzahl der sich im Wachstum befindenden Zellen wurde auf 1×10^5 Zellen pro Delle eingestellt und anschließend wurden die Zellen auf eine 24-Loch-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde die Zelldichte mikroskopisch kontrolliert, wobei die Konfluenz bei circa 80% liegen sollte. Die verwendeten Reagenzien hatten Raumtemperatur. Für die Herstellung des Transfektionsansatzes wurde 1µg DNA des Konstruktes K225, 6µl der Transfektionsreagenz XTreme-Gene und 94µl serumfreiem Medium Opti-MEM™ verwendet. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 25µl Transfektionsansatz pro 24-Loch-Delle zu den mit neuem Medium versorgten Zellen

pipettiert. Der Zellkulturüberstand wurde nach 48 Stunden abgenommen und konnte für weitere Tests verwendet werden.

4.13.2 Stabile Transfektion von HEK-293-Zellen

Die stabile Transfektion erfolgte nach dem Schema der transienten Transfektion. Der Unterschied zwischen beiden besteht jedoch darin, dass die Zellen nach der stabilen Transfektion mit dem Antibiotikum Geneticin (G418) inkubiert werden und so einem Selektionsdruck ausgesetzt werden. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium über den Zellen abgenommen, die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und mit Trypsin vom Boden gelöst. Anschließend wurde das Trypsin mit der doppelten Menge an Medium inaktiviert, 10µl der Zellsuspension entnommen und in 20ml G418-haltiges Selektionsmedium gegeben. Im Anschluss wurden 200µl dieser Zellsuspension pro 96-Loch-Delle pipettiert und bei 37°C für 7 bis 10 Tage inkubiert. Die gewachsenen Klone wurden auf der Platte aufsuspendiert und die gesamte Zellsuspension bis auf wenige Mikroliter abgenommen und verworfen. Danach wurde pro Delle 200µl frisches Selektionsmedium zugegeben und die Platte bei 37° für weitere 7 bis 10 Tage inkubiert. Daraufhin konnten die Klone erstmalig per Immunoblot (s. 4.15.2) getestet werden und positiv getestete Klone wurden weiter in einer 24-Loch-Platte kultiviert. Nach weiteren Tests blieb am Ende ein einziger Klon zur Kultivierung in einer Zellkulturflasche übrig, wobei der produzierte Überstand gesammelt werden konnte. Die erhaltene stabile Zelllinie wurde wie in 4.4.4 beschrieben eingefroren und für die Langzeitlagerung in einen Stickstofftank überführt.

4.14 Aufreinigung des rekombinanten chPTX3 über eine M2-Gelmatrix

Das in eukaryotischen Zellen exprimierte rekombinante chPTX3 wurde durch die Klonierung in den p3xFLAG-myc-CMV-25-Vektor mit einem Flag-Epitop markiert. Das Protein konnte dadurch mittels Affinitätschromatographie aus dem Zellkulturüberstand mithilfe der M2 Flag Gelmatrix aufgereinigt werden.

Material:

Anti-Flag® M2 Agarose¹⁵

Lagerung bei -20°C

Autoklavierung und Filtrierung der nachfolgend aufgeführten Puffer;

anschließende Lagerung bei 4°C

PBS, pH 7,2

TBS, pH 7,4

29g Natriumchlorid¹
60,5g Tris¹
ad 5L Aqua bidest.
2,5ml Tween20¹

Elutionspuffer: (Glycin-HCl 0,1M, pH 3,5)

7,51g Glycin¹
ad 1L Aqua dest.
mit HCl auf pH 3,5 eingestellt

Neutralisationspuffer: (Tris-HCl 1M, pH 8,0)

12,11g Tris, reinst¹
ad 100ml Aqua dest.
Mit HCl auf pH 8,0 eingestellt

PBS mit 0,02% NaN₃

0,2g NaN₃¹
ad 1L PBS, pH 7,2

PBS mit 0,02% NaN₃ und 50% Glycerol

0,2g NaN₃¹
50ml Glycerol für die Molekularbiologie¹
ad 100ml PBS, pH 7,2

Dialyse-Puffer, pH 7,8

23g Na₂HPO₄¹
45g NaCl¹
1,65g KH₂PO₄¹
ad 5L Aqua dest.

Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices, 14 kDa Cut-off**Durchführung:**

Um Zellen und Zellabfall aus den Zellkulturüberständen zu entfernen, wurde der Überstand der stabil transfizierten HEK-293-Zellen (s. 4.13.2) bei 225xg 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der pH-Wert mittels Indikatorpapier kontrolliert und bei Bedarf mit HCl oder NaOH neutralisiert. Danach wurde der Überstand mit einem 0,45µm Spritzenfilter²⁵ filtriert. Die nachfolgenden Schritte wurden bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt. Der Auftrag des Zellkulturüberstands erfolgte, nach der Gleichgewichtseinstellung der Säule mit PBS, mittels einer peristaltischen Pumpe mit einer

Fließgeschwindigkeit von 1ml pro Minute. Nachdem die Säule eine Stunde mit TBS gewaschen wurde, erfolgte das Eluieren des an die Gelmatrix gebundenen Proteins. Dies geschah durch das Auftragen des Elutionspuffers auf die Säule. Das eluierte Protein wurde in Fraktionen aufgefangen und sofort mit Tris-Lösung neutralisiert. Um die Säule zu re-äquilibrieren wurde diese nach dem Elutionsvorgang für mindestens 30 Minuten mit PBS gespült. Zur kurzzeitigen Aufbewahrung der Säule bei 4°C wurde PBS-NaN₃, zur Langzeitlagerung bei -20°C PBS-NaN₃ mit 50% Glycerol, aufgetragen. Die Fraktionen mit dem eluierten Protein wurden zusammen in einen gewässerten Dialyseschlauch (Cut-Off 14 kDa) pipettiert und über Nacht unter Rühren in 5 Litern Dialysepuffer bei einer Temperatur von 4°C umgepuffert. Nach spektralphotometrischer Messung mit dem NanoDrop⁹ wurden größere Volumina mittels Amicon™ Ultra³ Zentrifugenröhrchen aufkonzentriert. Am Schluss wurde der Proteingehalt ein weiteres Mal im Spektralphotometer gemessen.

4.15 Western Blot

4.15.1 SDS-PAGE

Material:

4x TrisHCl/SDS Puffer pH 8,8

91g Tris¹
2g SDS¹
ad 500ml Aqua dest.
pH mit HCl auf 8,8 eingestellt, Lagerung bei 4°C

4x TrisHCl/SDS Puffer pH 6,8

6,05g Tris¹
0,4g SDS¹
ad 100ml Aqua dest.
pH mit HCl auf 6,8 eingestellt, Lagerung bei 4°C

APS 10%

0,5g Ammoniumpersulfat (APS)¹
ad 5ml Aqua bidest
Lagerung bei -20°C in Aliquots

TEMED (N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin)¹

Trenngel 8%

4,83ml Aqua bidest
2,5ml 4x TrisCl/SDS Puffer pH 8,8

2,66ml	Acrylamid - Lösung (30 %) - Mix 37,5:1 ¹
50µl	APS 10%
10µl	TEMED ¹

Sammelgel 4%

3,05ml	Aqua bidest
1,25ml	4x TrisHCl/SDS Puffer pH 6,8
0,65ml	Acrylamid - Lösung (30 %) - Mix 37,5:1 ¹
25µl	APS 10%
7,5µl	TEMED ¹

4–15% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 15-well, 15 µl¹⁸**5x Elektrophoresepuffer pH 8,3**

15g	Tris ¹
72g	Glycin ¹
5g	SDS ¹
ad 1L	Aqua dest

Zum Gebrauch 1:5 mit Aqua dest. verdünnen

Lagerung bei Raumtemperatur

6x Probenpuffer (Lämmli)

7ml	4x TrisCl/SDS- Puffer pH 6,8
3ml	Glycerin, wasserfrei ¹
1g	SDS ¹
1mg	Bromphenolblau ¹

Lagerung bei -20°C in Aliquots von 500µl

HiMark™ Pre-Stained Proteinstandard, 30-460kDa³**PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10-180 kDa³****DTT 1M³****Aqua bidest****Durchführung:**

Für die SDS-PAGE wurden sowohl SDS-Gele selbst gegossen als auch gekaufte Gele verwendet.

Herstellung SDS-Gel:

Zuerst wurden 4,83ml Aqua bidest. mit 2,5ml 4xTris-HCL/SDS Puffer pH 8,8 und 2,66ml Acrylamid in ein 15ml Falconröhrchen pipettiert. Nach der Zugabe von 50µl APS und 10µl

TEMED wurde die Lösung bis circa 1cm unter den Rand der Gelkassette gefüllt und mit Aqua bidest. überschichtet. Dies verhinderte, dass das Gel, während es polymerisierte, austrocknete. Nach einer halben Stunde wurde das Aqua bidest. abgegossen und die restliche Feuchte vorsichtig mit einem Filterpapier aufgesaugt.

Die Bestandteile des Sammelgels wurden nacheinander, wie unten aufgeführt, in ein 15ml-Falconröhrchen pipettiert und anschließend dreimal geschwenkt. Die hier aufgeführten Mengenangaben ergeben zwei Gele.

3,05ml	Aqua bidest
1,25ml	4x TrisHCl/SDS Puffer pH 6,8
0,65ml	Acrylamid - Lösung (30 %) - Mix 37,5:1 ¹
25µl	APS 10%
7,5µl	TEMED ¹

Dieses flüssige, noch nicht auspolymerisierte Sammelgel wurde nun bis zum Rand der Gelkassette auf das Trenngel gegeben. Danach wurde ein Probenaschenkamm eingefügt und das Gel zur Polymerisation für eine gute halbe Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Nach der Polymerisation wurde der Probenaschenkamm vorsichtig entfernt und das SDS-Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt. Diese wurde zuvor mit 1x Elektrophoresepuffer beschickt.

Probenauftrag:

Zu 20µl des aufgereinigten, umdialysierten und aufkonzentrierten Zellkulturüberstandes (s. 4.14) wurden 4µl 6x Probenpuffer (Lämmli) gegeben. Unter reduzierenden Bedingungen wurden zusätzlich noch 0,5µl DTT dazupipettiert.

Danach wurde die Probe bei 95° und 300rpm für 5 Minuten im Thermomixer erhitzt. Im Anschluss wurden 20µl der Proben bzw. 8µl des Markers in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese mit 80V gestartet. Nachdem die Lauffront das Trenngel erreicht hatte, wurde die Stromstärke auf 200V erhöht. Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn ersichtlich war, dass die Lauffront des Probenpuffers aus dem Gel herauszulaufen drohte.

4.15.2 Immunoblot

Der Immunoblot diente zum Nachweis des rekombinanten Proteins chPTX3-Flag.

Material:

SDS-PAG (s. 4.17)

Towbin-Puffer mit 10% Methanol

3,03g Tris¹
14,4g Glycin¹
ad 900ml Aqua dest.
100ml Methanol reinst¹

Lösung zum Blockieren

4g Magermilchpulver¹
ad 100ml PBS, pH 7,2

Waschlösung PBS-T (0,05% Tween20)

500µl Tween20¹
ad 1L PBS, pH 7,2

Nitrocellulosemembran Amersham Protran®, Porengröße 0,2µm²¹**Filterpapier¹⁸****Entwicklerreagenz (ECL-Lösung, selbst gefertigt)**

ECL-Lösung pro Membran:

4ml Lösung A
400µl Lösung B
1,2µl H₂O₂ (30%)

Lösung A

200ml 0,1M Tris-HCl (pH 8,6)

50mg Luminol¹⁵

Lagerung bei 4°C

Lösung B

11mg para-Hydroxycoumarinsäure¹⁵

in 10ml DMSO¹⁵ lösen

Lagerung im Dunkeln bei Raumtemperatur

Antikörper

Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody produced in mouse¹⁵ (1:10.000)

Durchführung:

Nach abgeschlossener SDS-PAGE wurde dem Gel eine Nitrocellulosemembran aufgelegt. Das Gel und die Membran wurden anschließend von jeweils zwei Filterpapieren und Faserpads eingeschlossen, so in die Blotkassette gelegt und diese in die Blottingkammer eingesetzt. Das Blotting der mittels SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte in der *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell¹⁸*.

Der Blot-Vorgang wurde unter Einsatz eines -20°C kalten Kühlakkus und eines 4°C kalten Towbin-Puffers mit dem *Bio-Rad Power-Pac Basic* bei 100V für 1 Stunde durchgeführt.

Um freie Bindungsstellen für Antikörper auf der Membran zu blockieren, wurde die Nitrocellulosemembran danach für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht auf einem Schüttler bei 4°C mit Magermilchlösung inkubiert.

Um die aufgetrennten Proteine zu detektieren wurde der *ANTI-FLAG® M2*-Antikörper in PBS-T verdünnt. Die Membran wurde nach dreimaligem Waschen (jeweils fünf Minuten mit PBS-T) für 60 Minuten bei Raumtemperatur in ein 50ml-Falconröhrchen gegeben um sicherzustellen, dass diese während der Inkubation mit dem Antikörper immer vollständig benetzt war. Durch fünfmaliges Waschen mit PBS-T für jeweils fünf Minuten wurde ungebundener Antikörper entfernt.

Zur Detektion des immunologisch spezifisch markierten FLAG-Tags am chPTX3 wurden die Membranen in kleine Schalen gelegt und mit der ECL-Lösung für 1 Minute benetzt. Anschließend wurden die Proteinbanden mittels des MicroChemi von *DNR Bio Imaging systems ltd.* sichtbar gemacht.

Abschätzung des Molekulargewichts von PTX3 im Immunoblot

Nach der Entwicklung des Immunoblots mittels ECL erfolgte die Abschätzung der Molekulargewichte der chPTX3-Banden anhand der Markerbanden. Hierzu wurde zuerst die Laufstrecke jeder dieser Banden ausgemessen und der Quotient dieses Wertes und der Gesamtlaufstrecke, also der Distanz zwischen der oberen Grenze des Laufgels und der Lauffront, gebildet. Der Logarithmus des Molekulargewichtes jeder Markerbande wurde nun jeweils als Funktion dieses Quotienten dargestellt. Das Bestimmtheitsmaß R^2 der so entstandenen Gerade wurde ermittelt und beurteilt. In die Funktionsgleichung konnte anschließend der Quotient der individuellen PTX3-Laufstrecke und der Gesamtlaufstrecke eingesetzt und daraus das Molekulargewicht ermittelt werden.

4.15.3 Enzymatische Deglykosylierung von chPTX3-FLAG

Die Peptid-N-Glykosidase F spaltet spezifisch N-Glykane vom Asparaginrest von chPTX3-FLAG.

Material:

Aufgereinigtes chPTX3-FLAG

Denaturation Buffer (10x)¹³

GlycoBuffer 2¹³

NP-40 10%¹³

PNGase F¹³

Aqua bidest.

Durchführung:

Ansatz für eine enzymatische Deglykosylierung

chPTX3-FLAG 9µl

Denaturation Buffer (10x) 1µl

10 Minuten Inkubation bei 100°C im Thermomixer, danach auf Eis und 10

Sekunden bei 5000xg zentrifugieren

GlycoBuffer 2 2µl

NP-40 10% 2µl

Aqua bidest. 6µl

PNGase F 1µl

1 Stunde Inkubation bei 37°C im Thermomixer

4.16 Herstellung von monoklonalen Antikörpern

4.16.1 Immunisierung von Balb/c-Mäusen

Zur Immunisierung der Mäuse wurde 200µl aufgereinigtes Protein von stabil transfizierten HEK-293-chPTX3-FLAG (siehe 4.13.2 und 4.14) verwendet.

Für die Herstellung eines Hybridoms wurde eine Maus im Abstand von 4 Wochen dreimal durch eine intraperitoneale Injektion von aufgereinigtem Zellkulturüberstand in Kombination mit Freund's Incomplete Adjuvans immunisiert. Die Mäuse wurden drei Tage nach der letzten Immunisierung getötet und die Milzen mit sterilem Besteck entnommen. Die Tötung geschah durch zervikale Dislokation.

4.16.2 Zellfusion

Material:

Iscove Basal Medium²

Polyethylene Glycole 1500 (PEG)⁶

X63-Ag8.653-Zellen

Fusionsmedium (s. 4.4.1.)

Erhaltungsmedium (s. 4.4.1.)**Hybridoma-Medium (s. 4.4.1.)****Durchführung:**

Die Mäusemilz wurde in kaltes Iscove Basal Medium überführt und mit einem Spritzenstempel durch ein Zellsieb homogenisiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde in ein 50ml-Falconröhrchen gegeben und mit kaltem Iscove Basal Medium aufgefüllt. Anschließend folgte eine 5 bis 10 minütige Sedimentation auf Eis. Danach wurde der Überstand in ein neues 50ml-Falconröhrchen überführt und 10 Minuten bei 300xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit 10ml raumtemperiertem Iscove Basal Medium aufgenommen und danach die Milzzellen nach Trypanblaufärbung unter dem Mikroskop gezählt.

Die schon etwa 10 Tage vor der Fusion in Kultur gebrachten X63-Ag8.653-Zellen wurden in mehrere 50ml-Falconröhrchen überführt und für 10 Minuten bei 300xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, die Zellpellets vereint und in 20ml raumtemperiertem Iscove Basal Medium aufgenommen. Nach der Trypanblaufärbung wurden diese Zellen qualitativ und quantitativ beurteilt.

Für die Fusion wurden $1,4 \times 10^8$ Milzzellen und $2,8 \times 10^8$ X63-Ag8.653-Zellen in ein 50ml-Falconröhrchen gegeben und bei Raumtemperatur für 5 Minuten und 300xg zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen wurde, wurde das verbliebene Zellpellet gelockert und tropfenweise innerhalb einer Minute unter leichtem Schwenken 1,5ml 37°C warmes Polyethylenglykol dazugegeben. Diese Mischung wurde für eine Minute im 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Die Zugabe von 37°C warmem Iscove Basal Medium erfolgte tropfenweise und schwenkend nach folgendem Vorgehensweise:

1. 1ml in 30 Sekunden
2. 3ml in 30 Sekunden
3. 16ml in 60 Sekunden

Im direkten Anschluss wurde die Zellsuspension bei Raumtemperatur und 300xg für 5 Minuten zentrifugiert und bei 37°C für weitere 5 Minuten inkubiert. Wiederum wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 420ml Fusionsmedium aufgenommen. Abschließend wurde die Zellsuspension auf zwanzig 96-Loch-Platten pipettiert. Dabei wurde in jede Delle 200µl gegeben. Die Platten wurden für 10 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und alle 3 Tage mikroskopisch geprüft.

4.16.3 Screening mittels ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

Material:

NUNC-Maxisorp Polystyren 96-Lochplatten²⁰

Beschichtungspuffer pH 9,6

3,11g Na₂CO₃

6g NaHCO₃

ad 1L Aqua dest.

pH auf pH 9,6 eingestellt, Lagerung bei 4°C

Magermilchlösung 4%

4g Magermilchpulver¹

ad 100ml PBS

kurz vor Gebrauch ansetzen

SuperBlock™ (PBS) Blocking Buffer³

PBS-T (0,05% Tween20)

0,5ml Tween20¹

ad 1L PBS

TMB-Puffer pH 5,0

4,9g Na-Acetat (60mM)¹

3,15g Citronensäure¹

ad 1L Aqua bidest.

pH auf pH 5,0 eingestellt, Lagerung bei 4°C

TMB-Stammlösung

6mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)¹

ad 1ml DMSO¹⁵

Lagerung lichtgeschützt bei Raumtemperatur, eine Woche haltbar nach

Herstellung

TMB-Gebrauchslösung

10ml TMB-Puffer, 37°C

332µl TMB-Stammlösung

3µl H₂O₂ (30%)¹

kurz vor Gebrauch anmischen und sofort verwenden

Schwefelsäure 1M¹

Lagerung bei Raumtemperatur

Antikörper

Antikörper	Gebundenes Antigen	Isotyp	Tierart	Konzentration
anti Flag ¹⁵	Flag-Epitop	IgG	Kaninchen	1:4000
anti Maus IgG POD ²⁸	mu-IgG (H+L)	IgG	Ziege	1:10.000
anti-Maus IgG ³⁰	mu-IgG (H+L)	IgG	Ziege	1:10.000
anti-Maus IgG ₁ ³⁰	muIgG1	poly	Ziege	1:10.000
anti-Maus IgG _{2a} ³⁰	muIgG2a	poly	Ziege	1:10.000
anti-Maus IgG _{2b} ³⁰	muIgG2b	poly	Ziege	1:10.000
anti-Maus IgG ₃ ³⁰	muIgG3b	poly	Ziege	1:10.000
anti-Maus IgM ²⁹	muIgM	poly	Ziege	1:250

Tabelle 5: Im ELISA eingesetzte Antikörper

Allgemeine Durchführung eines ELISAs:

Die Volumina beziehen sich, sofern nicht anders beschrieben, auf eine Delle einer Nunc Maxisorb 96-Lochplatte. Vor jedem weiteren Arbeitsschritt wurden die Platten mit PBS-T im ELISA Washer dreimal gewaschen. Jegliche Verdünnungen wurden mit PBS-T angesetzt. Die Inkubation zwischen den einzelnen Arbeitsschritten erfolgte bei 37°C für jeweils eine Stunde.

Die Platten wurden jeweils am Vortag mit 100µl des in Beschichtungspuffer verdünnten Antikörpers beschichtet und bei 4°C inkubiert.

Nicht gebundener Beschichtungs-Antikörper wurde tags darauf mit PBS-T von der Platte gewaschen. Freie Bindungsstellen wurden mit 200µl Blockierungslösung blockiert. Im nächsten Schritt wurden 100µl des zu detektierenden Proteins aufgetragen. In zwei weiteren Arbeitsschritten erfolgt eine Inkubation für jeweils 60 Minuten mit 50µl eines geeigneten Antikörpers bzw. mit 50µl des passenden sekundären Antikörpers. Durch das Auftragen von 100µl einer 37°C warmen TMB-Gebrauchslösung und einer Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit wurde der ELISA entwickelt. Bei einer positiven Reaktion färbte sich die entsprechende Delle blau. Ohne einen weiteren Waschschrift wurde zum Abbruch der Peroxidasereaktion 50µl Schwefelsäurelösung zugegeben. Daraufhin änderte sich die Farbe der Delle von blau nach gelb. Die Quantifizierung wurde mittels Messung im ELISA-Reader Tecan mit dem Programm X-Read Plus bei einer Wellenlänge von 450nm sichergestellt.

Spezielles zur Durchführung des Screening-ELISAs:

Beschichtung	Probe	Primärer Antikörper	Detektions-Antikörper
rb-anti-Flag (1:4000)	HEK-293-chPTX3- FLAG (ZKÜ)	Fusions-AK (ZKÜ)	Goat-anti-mouse-IgG-POD (1:10.000)

Tabelle 6: Aufbau des Screening-ELISAs

Zehn Tage nach der Fusion wurden je Delle der zwanzig 96-Loch-Platten 80µl Zellkulturüberstand entnommen. Direkt danach wurden die Dellen wieder mit frischem Medium versorgt und die zwanzig Platten zurück in den Zellkultur-Brutschrank verbracht. Beim ersten Screening wurde der Überstand mittels ELISA getestet. Positiv getestete Klone wurden nach der Entwicklung des ELISAs direkt in 24-Loch-Platten umgesetzt. Ein weiteres ELISA Screening wurde nach Dichtwachsen der Klone durchgeführt. Übrig blieben einige wenige Klone, die subkloniert wurden.

4.16.4 Subklonierung, Isotyp-Bestimmung und Gewinnung von Hybridoma-Überständen

Um mit Sicherheit monoklonale Antikörper zu erhalten, wurden die positiven Klone nochmals subkloniert. Hierbei wurde jeder Klon mit einer Dichte von 0,4 Zellen pro Delle in zwei 96-Loch-Platten ausgesät. Nach dem Dichtwachsen dieser Klone folgte, analog zum Screening-ELISA der initialen Fusion, ein erneutes Screening.

Der ELISA zur Bestimmung der Isotypen ist wie folgt aufgebaut:

1. Beschichtung der ELISA-Platte am Vortag mit rb-anti-Flag (1:4000)
2. Inkubation mit HEK-293-chPTX3-FLAG (ZKÜ)
3. Auftrag des Fusions-AK (ZKÜ, 1:10)
4. Auftrag der isotypspezifischen, biotinylierten Antikörper (s. Tabelle 6)
5. Detektion mit Streptavidin-POD (1:4500)

Die Isotypbestimmung erfolgte ebenso wie das Screening mittels ELISA unter Verwendung von isotypspezifischen biotinylierten Antikörpern (anti-Maus IgG³⁰, anti-Maus IgG₁³⁰, anti-Maus IgG_{2a}³⁰, anti-Maus IgG_{2b}³⁰, anti-Maus IgG₃³⁰ und anti-Maus IgM²⁹) und anschließender Detektion mit Streptavidin-POD. Dies ist der einzige Unterschied zwischen dem Screening-ELISA und dem Isotyp-ELISA: nach dem Auftrag der biotinylierten, isotypspezifischen Antikörper inkubierten diese für eine Stunde bei 37°C. Danach wurde die ELISA-Platte mit PBS-T drei Mal gewaschen und 50µl der Streptavidin-Verdünnung (1:4500) wurden pro

Delle aufgetragen und die Platte für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die ELISA-Platte wurde dreimal mit PBS-T gewaschen und danach erfolgte analog dem Screening-ELISA die Entwicklung mittels der TMB-Gebrauchslösung.

Die Hybridome wurden nach dem letzten Screening für zwei Wochen in Fusionsmedium kultiviert. Anschließend wurden diese weitere zwei Wochen mit Erhaltungsmedium versorgt, bevor eine sukzessive Umstellung auf Hybridoma-Medium stattfand. Die Langzeitlagerung der Zellkulturüberstände, die für weitere Tests und Aufreinigungen gesammelt wurden, erfolgte bei 4°C.

4.17 Aufreinigung des monoklonalen IgG2a-Antikörperklon

Material:

Startpuffer (20mmol Phosphatpuffer, pH 7,0)

1,424g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}^1$ in 400ml Aqua dest. lösen

0,936g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1\text{H}_2\text{O}^1$ in 300ml Aqua dest. lösen

$\text{NaH}_2\text{PO}_4^-$ zur $\text{Na}_2\text{HPO}_4^-$ Lösung geben bis pH 7,0 erreicht ist

Elutionspuffer (0,1mol Glycinpuffer pH 2,5)

3,75g Glycin¹ in 500ml Aqua dest. lösen

mit HCl den pH-Wert auf pH 2,5 einstellen

Dialysepuffer pH 7,8

1,65g KH_2PO_4^1

29,03g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}^1$

45g NaCl^1

in 5L Aqua dest. lösen

Trislösung 1M

1,211g Tris¹ in 10ml Aqua dest. lösen

Guanidinhydrochlorid 6M¹

57,32g $\text{CH}_5\text{N}_3 \cdot \text{HCl}$ in 100ml Aqua dest. lösen

Dialyse-Schlauchmembran (MWCO 14000)¹⁷

in Aqua dest. vor Gebrauch mindestens 30 Minuten einweichen

Unvergällter Ethanol (20%)¹

*Protein G Sepharose 4 Fast Flow*¹⁹

*0,45 Nalgene® Filter*³

Antikörperhaltiger Zellkulturüberstand

Durchführung:

Um Zellen und Zellabfall aus den Zellkulturüberständen zu entfernen, wurde der Überstand bei 225xg 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand noch durch einem *Nalgene® Filter* mit einer Porengröße von 0,45µm filtriert. Die nachfolgenden Schritte wurden bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt. Die *Protein G Sepharose 4 Fast Flow* wurde in eine Säule gegeben, die an eine Chromatographie-Anlage des Typs BiolLogic LP¹⁸ in Kombination mit einem Model 2110 Fraction Collector¹⁸ angeschlossen wurde. Vor der Aufreinigung eines neuen Antikörpers wurde die Säule mit mindestens 20ml 6M Guanidinhydrochlorid gewaschen. Nach der Äquilibration der Säule mit mindestens 30ml Startpuffer wurde der antikörperhaltige Zellkulturüberstand mit einer Fließgeschwindigkeit von 1ml/min. aufgetragen. Nach einem halbstündigen Waschen der Säule mit Startpuffer folgte die Elution des gebundenen Proteins. Hierfür wurde der Elutionspuffer auf die Säule gebracht, das Eluat in Fraktionen von 1ml aufgefangen und sofort mit Tris-Lösung neutralisiert. Zum Re-Äquilibrieren der Säule wurde diese nach der Elution mindestens 30 Minuten mit Startpuffer gespült. Die Protein-Konzentrationen im Eluat wurden mittels NanoDrop⁹ bestimmt. Danach wurden die Fraktionen mit hohen Antikörper-Konzentrationen gepoolt und mittels Dialyse-Schlauchmembran über Nacht in Dialysepuffer umdialysiert. Die Konzentration der Antikörper-Lösung wurde zum Schluss ein weiteres Mal spektralphotometrisch gemessen. Die Lösung wurde in aliquotierter Form bei -20°C gelagert.

4.18 Computerprogramme zum Auswerten von Sequenzen

Um das Alignment zu erstellen wurden die Programme Clustal X 2.1 und GeneDoc genutzt. Die jeweilige Software ist im Internet frei verfügbar unter <http://www.clustal.org> und <http://www.nrbsc.org>.

Molekulargewichte, Signalpeptide und N-Glykosylierungsstellen wurden unter Zuhilfenahme von speziellen Tools, die unter <https://www.expasy.org> zu finden sind, bestimmt.

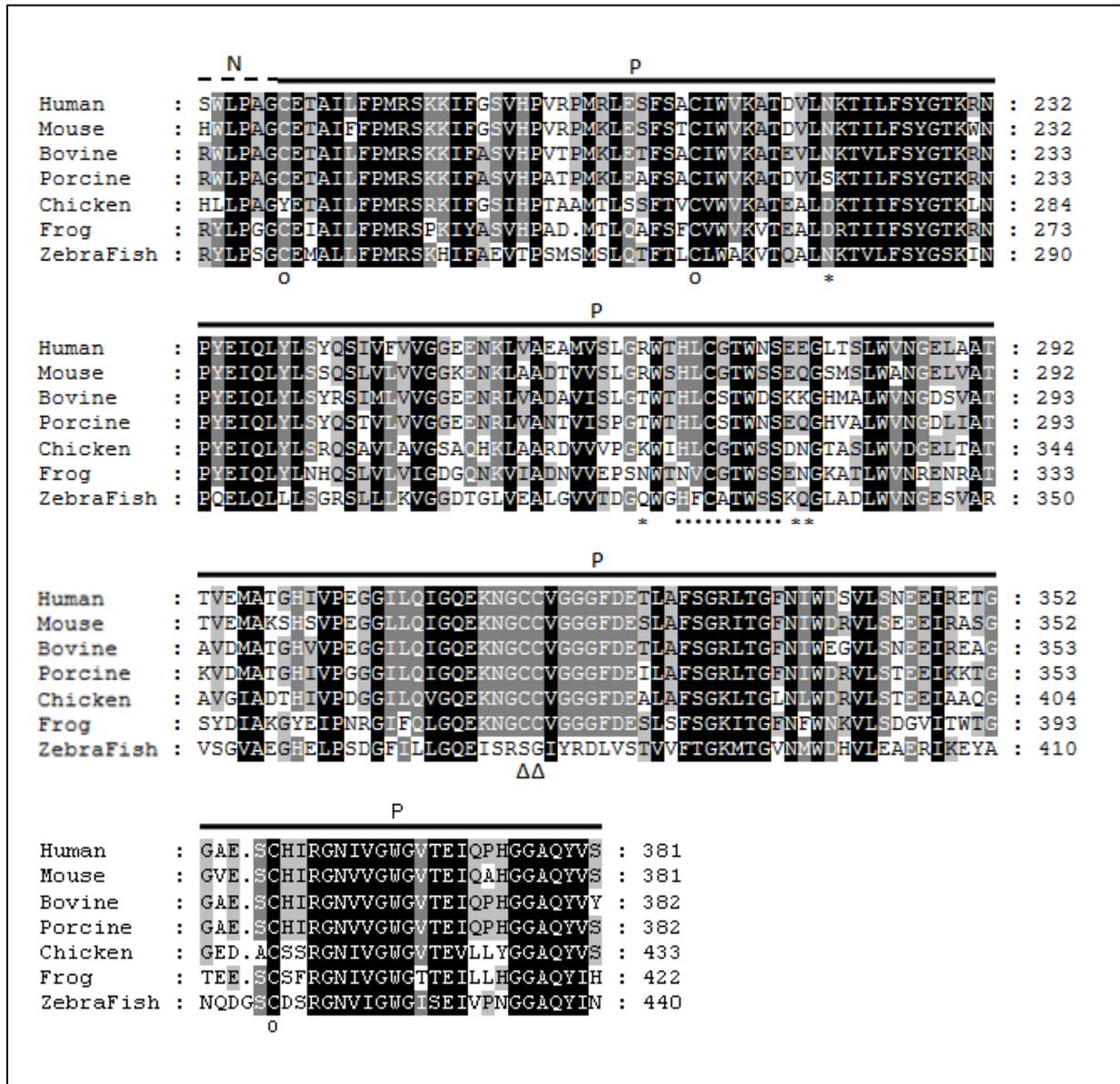


Abbildung 1: Aminosäuren-Alignment von chPTX3 mit den Orthologen anderer Spezies

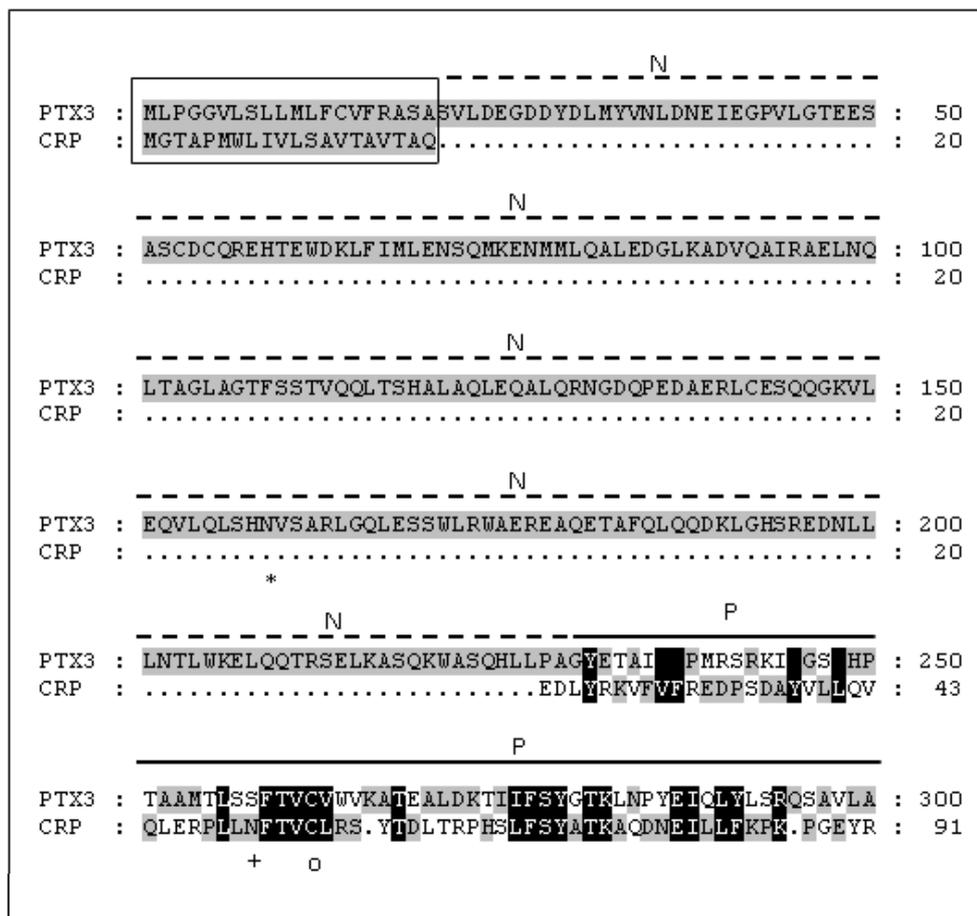
Schattierte Bereiche zeigen konservierte Aminosäuren, wobei dunklere Schattierungen auf eine höhere Konservierung unter den Spezies hinweisen. Punkte zwischen den Aminosäuren stehen für Lücken im Alignment. Sterne deuten auf theoretisch berechnete N-Glykosylierungen hin. Zwei Sterne (**) kennzeichnen die N-Glykosylierungsstellen beim Huhn, ein Stern (*) eine N-Glykosylierungsstelle bei einer anderen Spezies. Dreiecke (Δ) unter den Sequenzen repräsentieren Cysteinreste, die Bestandteil einer Disulfidbrücke beim Menschen sind. Das Huhn hat an diesen Stellen auch Cysteinreste. Das umgedrehte Dreieck (∇) zeigt demgegenüber einen Disulfidbrücken-bildenden Cysteinrest beim Menschen, wobei das Huhn an dieser Stelle keinen Cysteinrest hat. Weitere hochkonservierte Cysteinreste sind als Kreise (o) markiert. Die Aminosäuresequenz für die Pentraxinsignatur (HxCxT/SWxS) ist mit einer gepunkteten Linie (.....) unterstrichen und der Kasten beinhaltet die Signalpeptidsequenz. Die gestrichelte mit einem N über der Sequenz beschriftete

Linie weist auf die N-terminale Domäne und die durchgehende mit einem P beschriftete Linie weist auf die Pentraxin-Domäne hin.

Das Alignment ergibt eine hohe Sequenzhomologie sowohl in der N-terminalen Domäne als auch, in noch stärkerem Ausmaß, in der Pentraxin-Domäne. Auffällig ist auch, dass die Pentraxin-Signatur bei allen Spezies, bis auf den Frosch, homolog ist. Des Weiteren zeigt das Alignment, dass Cysteinreste bei vielen Spezies konserviert sind. Die theoretisch berechneten N-Glykosylierungsstellen sind bei den Spezies Mensch und Maus gleich, das Schwein hat gar keine N-Glykosylierungsstellen und die Spezies Zebrafisch, Frosch und Huhn haben zwei theoretisch berechnete Glykosylierungsstellen.

5.2 Alignment C-reaktives Protein und PTX3 des Huhnes

Um beim Huhn die Unterschiede oder Übereinstimmungen bei CRP als Prototyp der kurzen Pentraxine und PTX3 darzustellen, wurden auch diese Vollängen-Aminosäuresequenzen mithilfe der Programme ClustalX 2.1 und GeneDoc verglichen (s. 4.18). Auch diese sind über NCBI frei zugänglich.



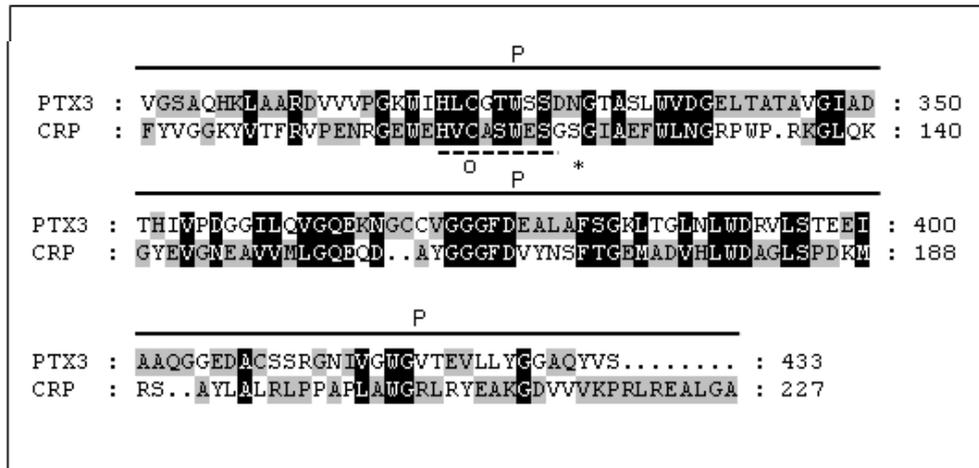


Abbildung 2: Alignment C-reaktives Protein und PTX3 vom Huhn

Schattierte Bereiche zeigen konservierte Aminosäuren, wobei dunklere Schattierungen auf eine höhere Konservierung hinweisen. Punkte zwischen den Aminosäuren stehen für Lücken im Alignment. Der Stern (*) deutet auf theoretisch berechnete N-Glykosylierungsstellen beim chPTX3 hin. Das Kreuz (+) steht für theoretisch berechnete N-Glykosylierungsstellen bei chCRP. Hochkonservierte Cysteinreste sind mit Kreisen (o) markiert. Die Aminosäuresequenz für die Pentraxinsignatur (HxCxT/SWxS) ist mit einer gestrichelten Linie (-----) unterstrichen und der Kasten beinhaltet die Signalpeptidsequenzen der beiden APPs. Die gestrichelte mit einem N über der Sequenz beschriftete Linie weist auf die N-terminale Domäne beim chPTX3 hin, wohingegen die durchgehende mit einem P beschriftete Linie auf die Pentraxin-Domäne bei chPTX3 und chCRP hinweist.

Das Alignment zeigt, dass das C-reaktive Protein im Gegensatz zum langen Pentraxin chPTX3 keine N-terminale Domäne besitzt. Es besteht lediglich aus der Pentraxin-Domäne mit der charakteristischen Pentraxin-Signatur. Auffällig sind zwei Stellen mit hochkonservierten Cysteinresten bei beiden Molekülen. Des Weiteren zeigt das Alignment, dass PTX3 zwei theoretisch berechnete N-Glykosylierungsstellen hat, von denen eine in der N-terminalen Domäne liegt. Diese fehlt beim C-reaktiven Protein entsprechend.

5.3 Klonierung von chPTX3 in den Vektor p3xFLAG-Myc-CMVTM-25

Zur weiteren Charakterisierung wurde das Protein chPTX3 in den Vektor p3xFLAG-Myc-CMVTM-25 (s. Abb. 3) kloniert und eukaryotisch exprimiert. Hierfür wurde aus der cDNA der LPS-stimulierten Milz mittels PCR die Sequenz von chPTX3 amplifiziert, der Vektor aus dem bereits vorhandenen Konstrukt K108 per Doppelverdau herausgeschnitten und die Sequenz von chPTX3 anschließend in den Vektor kloniert. Mit dem erhaltenen Konstrukt konnten

dann humane embryonale Nierenfibroblasten (HEK-293) transfiziert werden. In der Zelle kommt es in Folge dessen zur Produktion und Sekretion des Proteins in das Kultivierungsmedium. Der Vektor p3xFLAG-Myc-CMVTM-25 wurde gewählt um ein FLAG-getaggtetes Protein zu exprimieren, das dann per ANTI-FLAG M2-Antikörper im Immunoblot oder ELISA detektiert werden kann.

Laut Herstellerangaben dient der Vektor als Derivat von pCMV5 dazu [331] eine transiente oder stabile Expression von Proteinen in Säugerzellen zu etablieren, die N-terminal mit einem 3xFLAG und C-terminal mit einem c-Myc markiert sind. Der Vektor codiert drei aufeinanderfolgende FLAG-Epitope und ein c-Myc-Epitop ober- und unterhalb der multiple cloning site, die verschiedene Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen direkt hintereinander enthält.

Die Promotor-Region des humanen Cytomegalovirus [332, 333] fördert die Transkription von Konstrukten, die mit einem FLAG oder c-Myc markiert sind. Das Aminoglykosid Phosphotransferase II-Gen [334] (Neo) verleiht dem Konstrukt eine Resistenz gegenüber Aminoglykosiden wie G418 [335], was eine Selektion ermöglicht.

p3xFLAG-Myc-CMVTM-25 ist laut Hersteller ein Pendelvektor für *E.coli* und Säugerzellen.

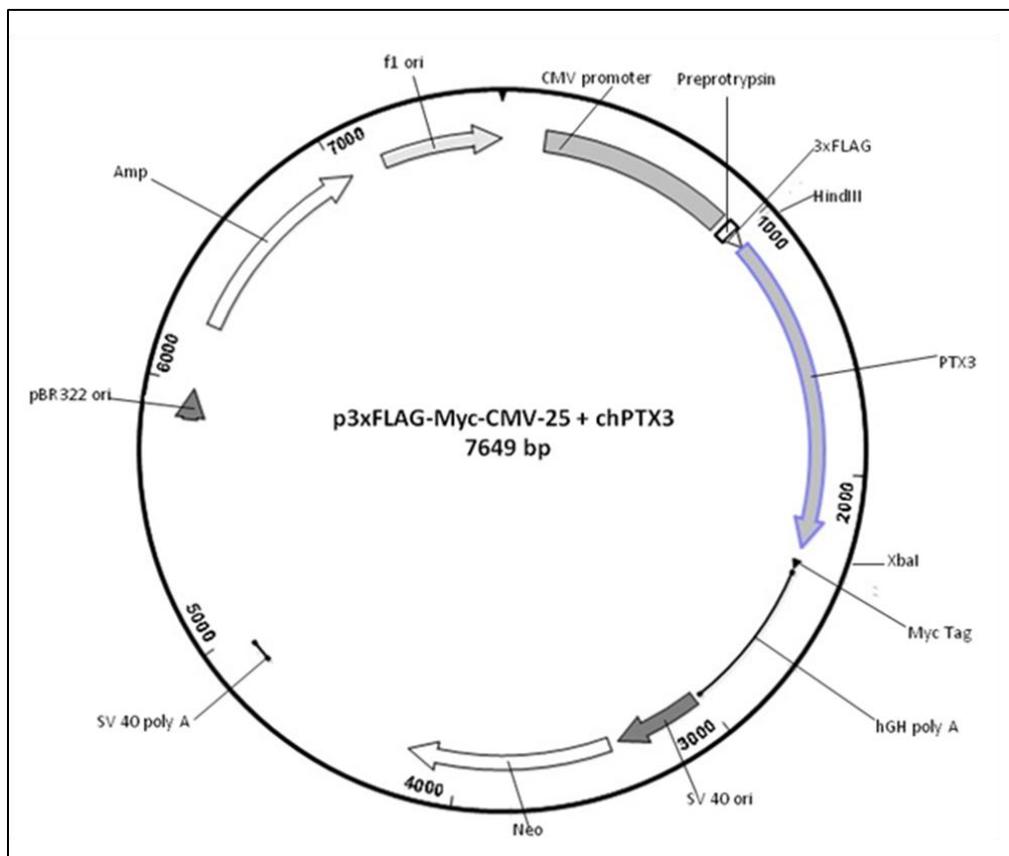


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Vektors p3xFLAG-Myc-CMV-25

Die Abbildung wurde mithilfe der Programme Lasergene SeqBuilder und Microsoft Power Point erstellt und zeigt den Vektor p3xFLAG-Myc-CMV-25 mit seinen Merkmalen und dem Insert chPTX3.

Das in das Kultivierungsmedium abgegebene Protein chPTX3-FLAG wurde anschließend mithilfe einer M2-Gelmatrix gereinigt. Abbildung 4 zeigt die Fraktionen 11-19, die gereinigtes chPTX3-FLAG enthalten, im Immunoblot.

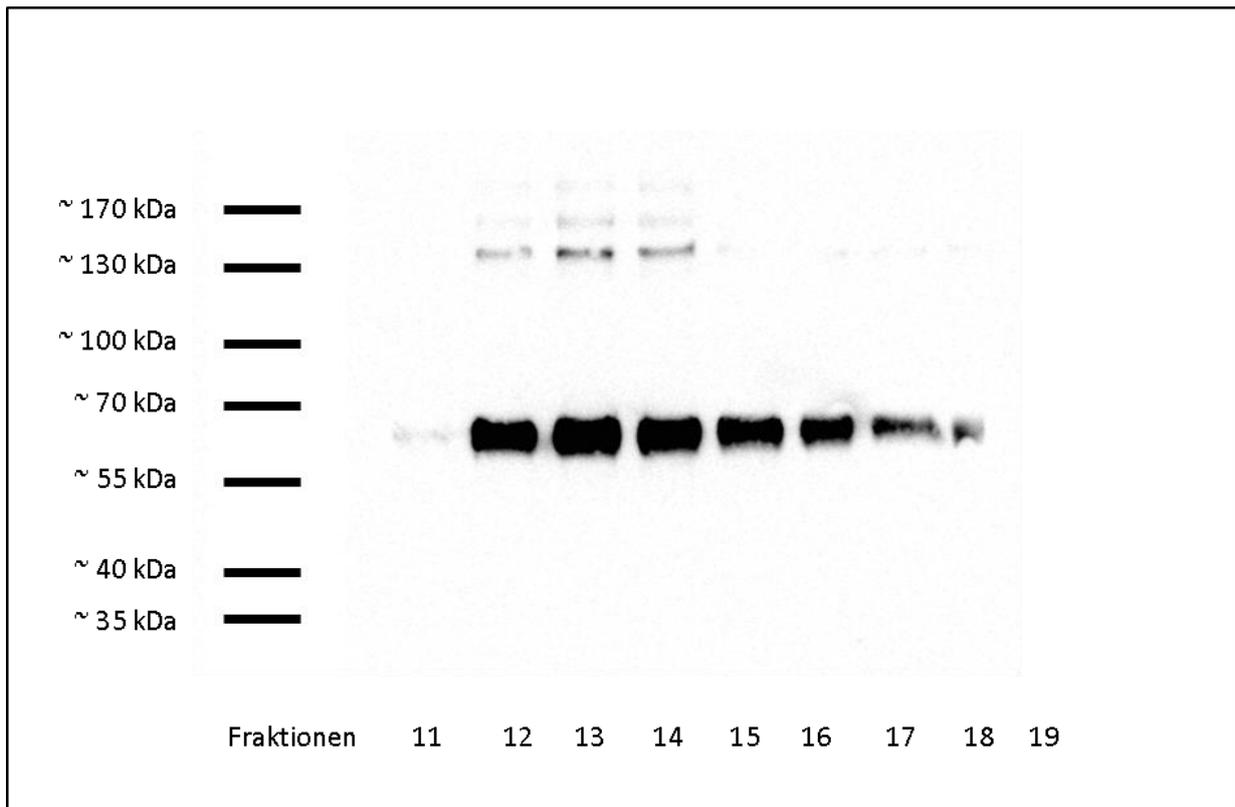


Abbildung 4: Immunoblot der eluierten, reduzierten Fraktionen von der M2-Gelmatrix

5.4 Untersuchung der Struktur von chPTX3

Um eine Aussage zur Struktur des PTX3 beim Huhn machen zu können, wurde das rekombinante chPTX3-FLAG unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen sowie glykosyliert und deglykosyliert im Immunoblot analysiert.

Wie in Abbildung 5 zu sehen lag das Molekulargewicht von chPTX3-FLAG unter nicht reduzierenden Bedingungen bei circa 300kDa, unter reduzierenden Bedingungen bei 65 kDa sowie nach Deglykosylierung bei 61kDa.

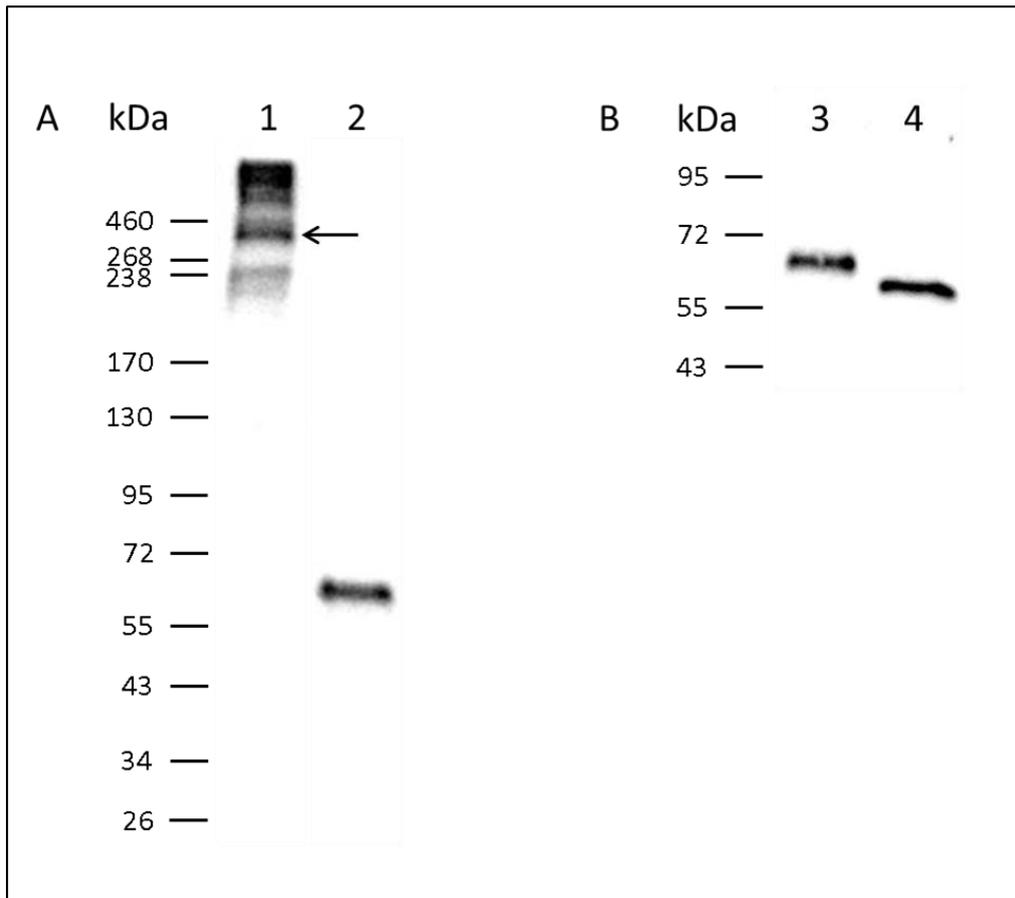


Abbildung 5: Immunoblot-Analyse der chPTX3-SDS PAGE

Teil A der Abbildung zeigt chPTX3 vor (Spalte 1) und nach (Spalte 2) der Reduzierung der Disulfidbrücken. Das kalkulierte Molekulargewicht beträgt unter nicht reduzierenden Bedingungen 313 kDa (vermutete Bande von chPTX3 ist mit einem Pfeil gekennzeichnet) und unter reduzierenden Bedingungen 65 kDa. Das Bestimmtheitsmaß beträgt $R^2=0,98$.

Teil B zeigt chPTX3 vor (Spalte 3; kalkuliertes Molekulargewicht: 67 kDa) und nach (Spalte 4; kalkuliertes Molekulargewicht: 61 kDa) der Deglykosylierung. Das Bestimmtheitsmaß beträgt $R^2=0,98$.

5.5 Analyse der Expression von chPTX3 in verschiedenen Organen

Für die Untersuchung, ob chPTX3 in verschiedenen Organen des Huhns exprimiert wird, wurden einem M11-Huhn Haut, Muskel, Muskelmagen, Drüsenmagen, Dünndarm, Dickdarm, Leber, Gehirn, Niere, Herz, Lunge, Trachea, Harder'sche Drüse, Milz, Thymus, Bursa und Caecaltonsille entnommen. Anschließend wurde die mRNA dieser Organe in cDNA umgeschrieben und diese cDNA wurde dann mittels PCR auf die Expression von chPTX3 untersucht.

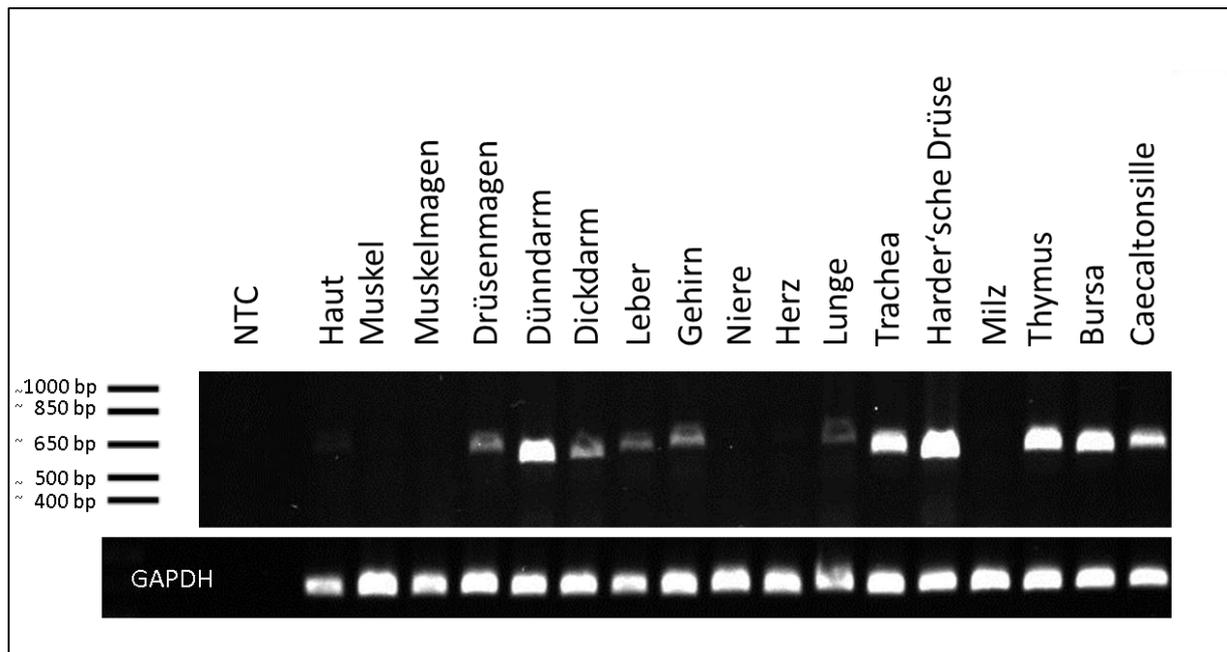


Abbildung 6: Expression von chPTX3 in verschiedenen Organen des Huhns

Die oberen Banden stellen die Expression von chPTX3 in den jeweiligen Organen dar. Darunter wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) als Ladungskontrolle aufgetragen. NTC: Kontrolle ohne PCR-Matrize (engl.: non-template control)

Wie in Abbildung 6 zu sehen, konnte eine Expression von chPTX3 in Drüsenmagen, Dünndarm, Dickdarm, Leber, Gehirn, Lunge, Trachea, Harder'scher Drüse, Thymus, Bursa und Caecaltonsille nachgewiesen werden, während in Haut, Muskel, Muskelmagen, Niere, Herz und Milz keine Expression zu beobachten war.

Des Weiteren wurde untersucht, ob chPTX3 in LPS-stimulierter Leber und Milz exprimiert wird. Dazu wurde Hühnern der Linie LSL intravenös pro Kilogramm Gewicht 10µg LPS injiziert. Nach drei Stunden wurde den Tieren Milz und Leber entnommen und die mRNA dieser Organe in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde dann mittels PCR auf die Expression von chPTX3 untersucht.

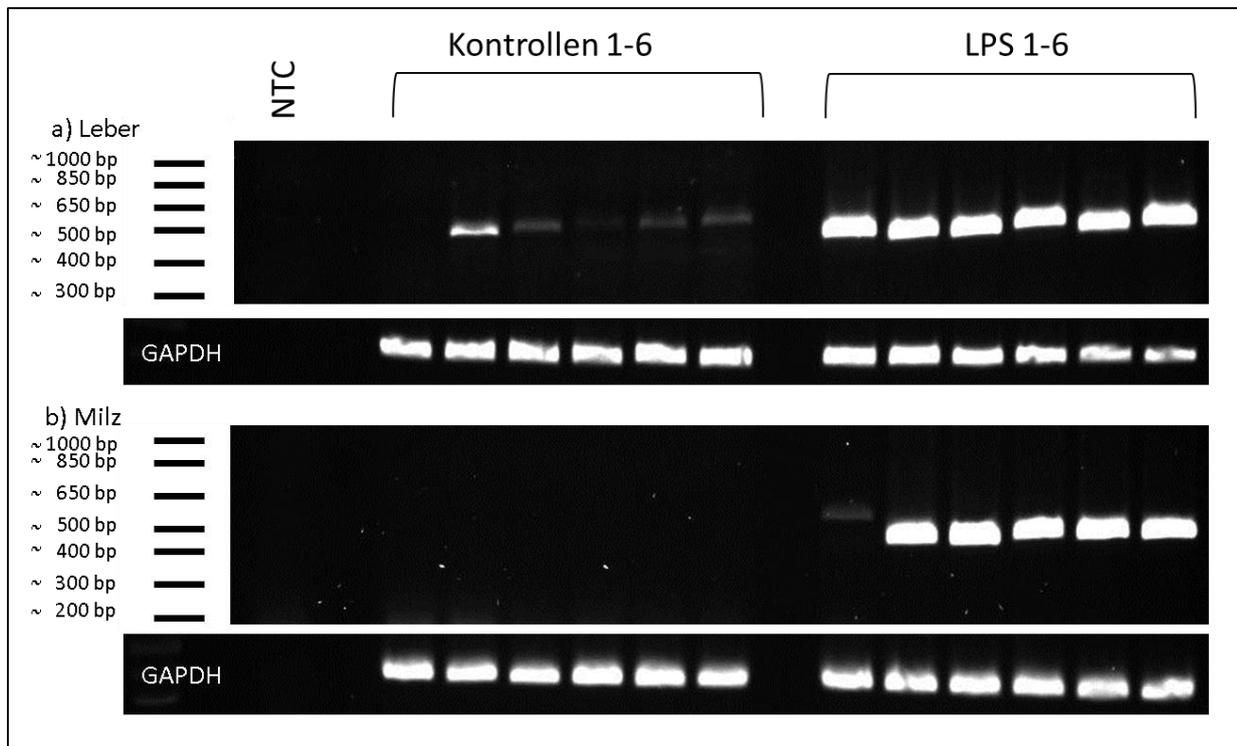


Abbildung 7: Untersuchung der Expression von chPTX3 in mit LPS stimulierten Organen

- a) Die oberen Banden stellen die Expression von chPTX3 in Lebern von unstimulierten (Kontrollen 1-6) und mit LPS stimulierten (LPS 1-6) Hühnern dar. Darunter wurde GAPDH als Ladungskontrolle aufgetragen. NTC: Kontrolle ohne PCR-Matrize
- b) Die oberen Banden stellen die Expression von chPTX3 in Milzen von unstimulierten (Kontrollen 1-6) und mit LPS stimulierten (LPS 1-6) Hühnern dar.

Wie aus Abbildung 7 ersichtlich, lässt sich mit LPS die Expression von chPTX3 in Milz und Leber bei allen sechs Tieren stimulieren. Interessanterweise war in keiner Milz vor der Stimulation mit LPS chPTX3 messbar, wohingegen die Leber eines einzelnen Tieres auch ohne Stimulation bereits chPTX3 exprimiert (s. auch Abbildung 6).

Um noch genauer auf die Expression von chPTX3 nach einer Injektion von 10µg/kg LPS einzugehen, wurde das Protein mittels qRT-PCR quantifiziert.

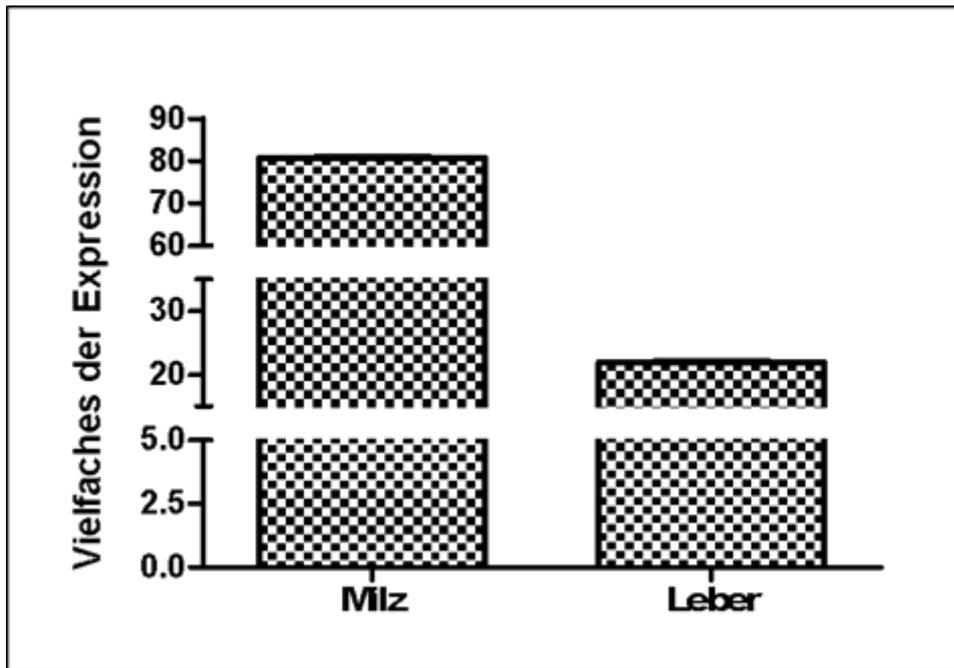


Abbildung 8: qRT-PCR-Analyse von Milz und Leber (n=6)

Die Abbildung zeigt eine qRT-PCR-Analyse von Milz und Leber drei Stunden nach einer LPS-Injektion. Die Milzen zeigen das 81-fache der Expression in Gewebeproben unbehandelter Tiere und die Lebern weisen das 22-fache der Expression in Gewebeproben unbehandelter Tiere auf.

Die qRT-PCR-Analyse zeigt, dass chPTX3-mRNA drei Stunden nach der Gabe von LPS in den Milzen um das 81-fache und in den Lebern um das 22-fache erhöht war.

5.6 Analyse der Expression von chPTX3 in verschiedenen Zellen

Für eine Untersuchung, ob chPTX3 in B- und T-Zellen exprimiert wird, wurden heparinisierte Vollblutproben von M11-Hühnern entnommen. Danach wurden B- und T-Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen (s. 4.3.2). Anschließend wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben und diese mittels PCR auf die Expression von chPTX3 untersucht.

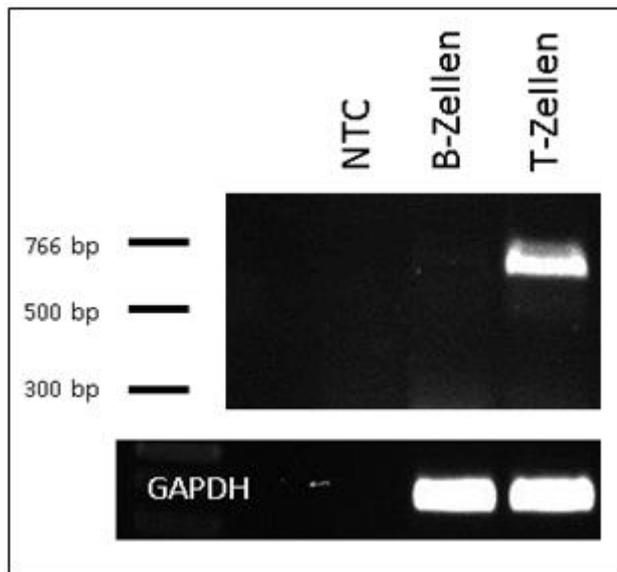


Abbildung 9: Untersuchung der Expression von chPTX3 in B- und T-Zellen

Die oberen Banden stellen die Expression von chPTX3 in B- und T-Zellen dar. Darunter wurde GAPDH als Ladungskontrolle aufgetragen. NTC: Kontrolle ohne PCR-Matrize

Wie in Abbildung 9 zu sehen, konnte eine Expression von chPTX3 in T-Zellen nachgewiesen werden, während in B-Zellen keine Expression zu beobachten ist.

5.7 Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen chPTX3 und deren Charakterisierung

Für die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen chPTX3 wurden zwei Balb/c-Mäuse mit aufgereinigtem Protein im Abstand von 4 Wochen dreimalig immunisiert. Nach Fusion der Milzzellen dieser Balb/c-Mäuse mit X63-Ag8.653-Zellen wurden die von den Hybridomen produzierten Antikörper per ELISA mehrfach gescreent und spezifische Hybridome selektiert. Am Ende der Selektion lagen zwei Klone vor, die 6F9 und 6H8 bezeichnet wurden. Diese beiden Klone binden spezifisch an chPTX-FLAG.

Der Klon 6F9 wurde subkloniert (s. 4.16.4). Die darauf folgende Isotyp-Bestimmung ergab IgG2a für 6F9-1G6 und IgM für 6H8.

Anhand der Abbildungen 10 bis 12 lässt sich erkennen, dass sowohl der monoklonale anti-chPTX3-FLAG-Antikörper 6F9-1G6 als auch der polyklonale anti-chPTX3-FLAG-Antikörper 6H8 spezifisch an chPTX3-FLAG binden, was die Negativkontrollen bestätigen. Als Negativkontrollen wurde der Beschichtungsantikörper rb-anti-Flag bzw. das Antigen chPTX3-FLAG im Screening-ELISA weggelassen und durch PBS-T ersetzt (s. 4.16.3).

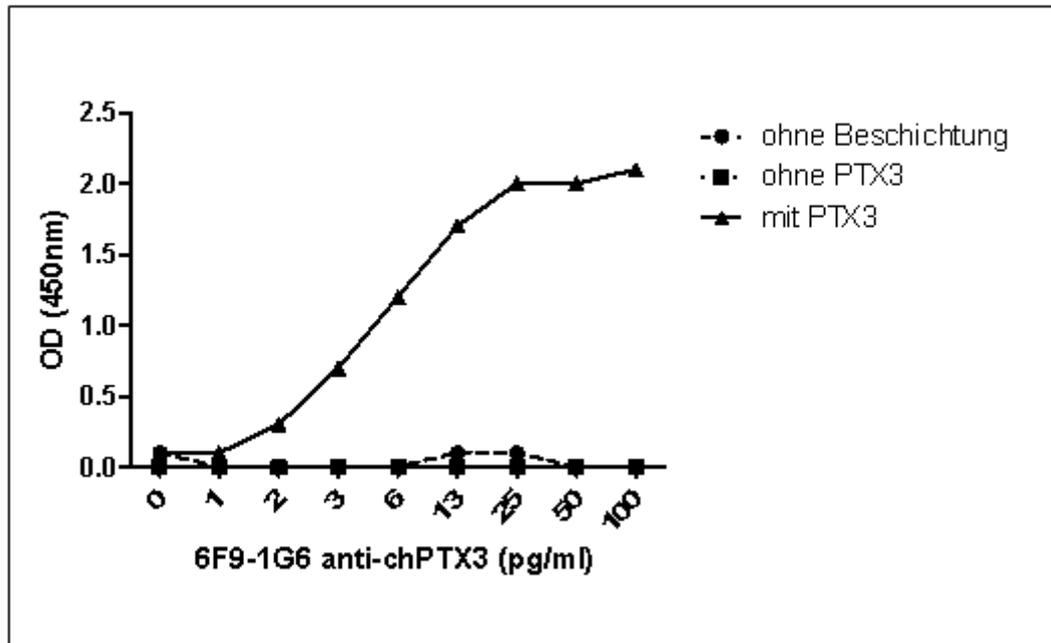


Abbildung 10: Titration des monoklonalen Antikörpers 6F9-1G6 (aufgereinigt)

Die Titration des Antikörpers wurde mittels ELISA durchgeführt.

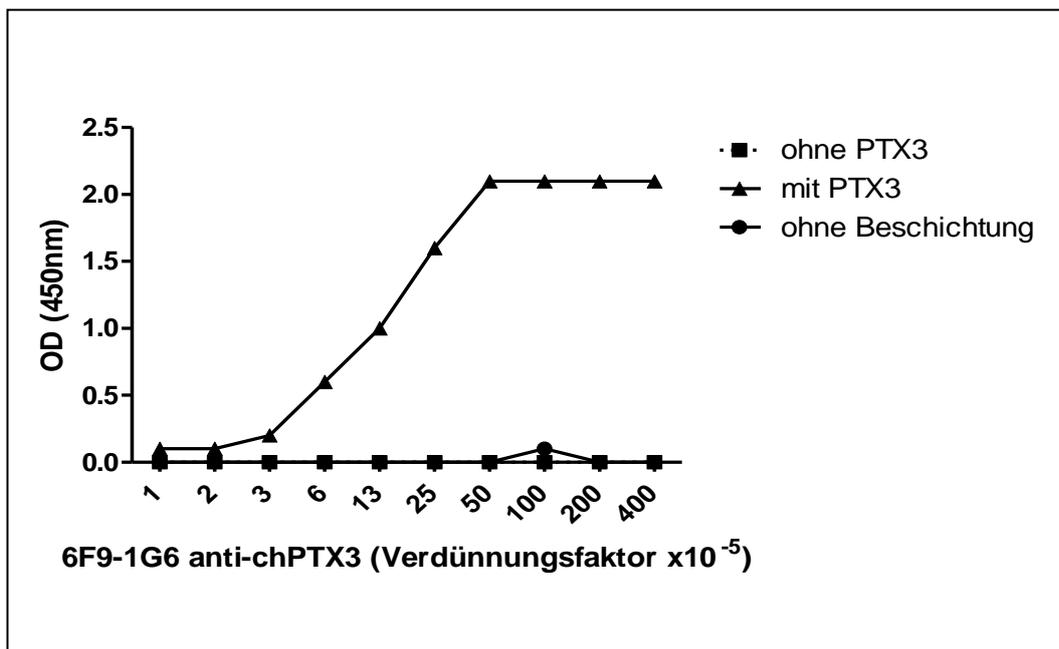


Abbildung 11: Titration des monoklonalen Antikörpers 6F9-1G6 (Zellkulturüberstand)

Die Titration des Antikörpers wurde mittels ELISA durchgeführt.

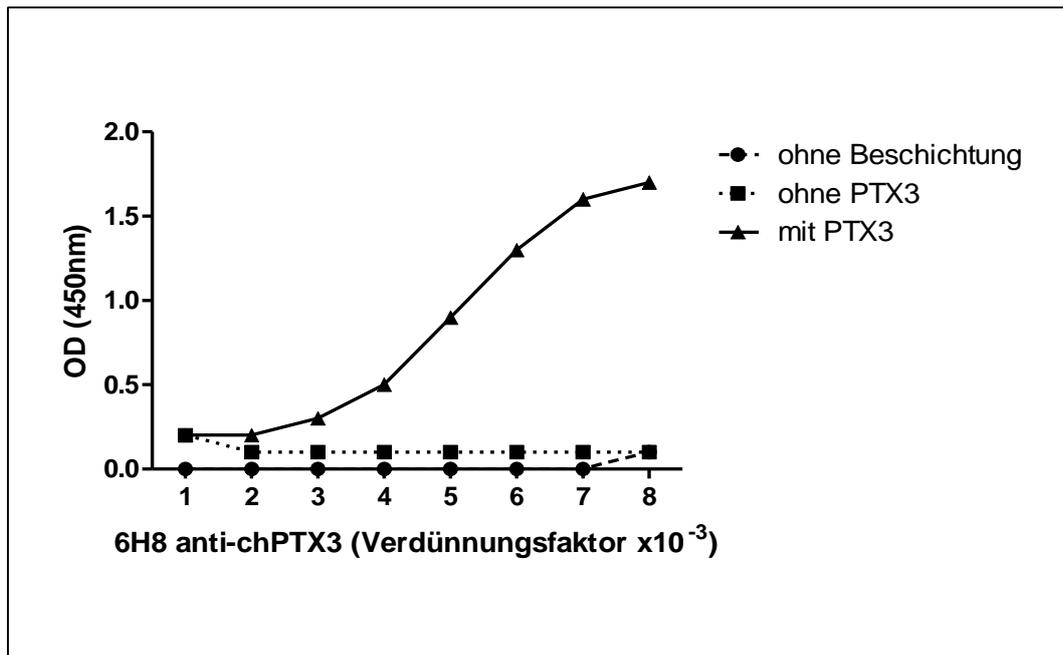


Abbildung 12: Titration des polyklonalen Antikörpers 6H8 (Zellkulturüberstand)

Die Titration des Antikörpers wurde mittels ELISA durchgeführt.

6 DISKUSSION

Akute Phase Proteine sind Proteine, die ihre Serumkonzentration als eine Antwort auf proinflammatorische Zytokine um mehr als 25% verändern. Sie können als quantitative Biomarker bei der Diagnose und Prognose einer Erkrankung und beim Monitoring der Therapie, wie auch beim generellen Gesundheitsscreening, genutzt werden [157].

Die von HepatoZyten produzierten APPs können anhand des Ausmaßes ihrer Erhöhung in positive APPs, wie z.B. Haptoglobin, Serum Amyloid A und C-reaktives Protein, eingeteilt werden oder sie werden als negative APPs klassifiziert, falls sich ihre Serumkonzentration verringert, wie das z.B. bei Albumin der Fall ist [162-164].

Zahlreiche Studien berichten auch beim Huhn über Veränderungen des Serumspiegels von Akute Phase Proteinen im Zuge verschiedener Infektionskrankheiten [308, 311, 313, 315, 324]. So zeigte sich beispielsweise, dass nach parasitärem Befall das kurze Pentraxin CRP stark überexprimiert wird [336].

Über das lange Pentraxin PTX3, welches ebenfalls zur Gruppe der APPs gehört, ist bei Mensch und Maus schon Vieles bekannt [18, 19, 337]. Zum Beispiel aktiviert es das Komplementsystem, interagiert mit verschiedenen Pathogenen und reguliert Entzündungen [13]. Beim Huhn ist es in der Literatur aber unbeschrieben.

Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zum Thema aviäre pathogene *E.coli* (unveröffentlicht von Dr. Susanne Rehfeld) und aviäre Influenza (unveröffentlicht von Dr. Carsten Krohmann) lassen jedoch darauf schließen, dass PTX3 auch beim Huhn ein bedeutendes Akute Phase Protein ist, da es bei Infektionen hochreguliert wird. Auch die Studie von Röhl et al. (*BMC Genomics*, angenommen) aus unserem Haus zeigt, dass nach einer Injektion von rekombinantem Interferon- α chPTX3 hochgradig exprimiert wird, was auch verdeutlicht, dass PTX3 offensichtlich ein wichtiges APP beim Geflügel ist.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, dieses Protein im Huhn zu charakterisieren und monoklonale Antikörper zu entwickeln, die für die Etablierung eines quantitativen Nachweises des PTX3-Proteins verwendet werden können.

6.1 Analyse des PTX3-Gens beim Huhn

6.1.1 Alignment der PTX3-Vollängensequenz des Huhns mit PTX3-Sequenzen anderer Spezies

Als erster Schritt erfolgte die Untersuchung der Struktur von PTX3 des Huhns *in silico* mit Hilfe frei zugänglicher Software. Die Aminosäuren-Sequenz von chPTX3 wurde hierbei zunächst mit der des gleichen Proteins anderer Tierarten verglichen, wobei neben den vier Säugetierspezies *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Bos taurus* und *Sus scrofa* auch die Sequenz des Krallenfrosches (*Xenopus tropicalis*) und des Zebrafisches (*Danio rerio*) mit der Hühnersequenz abgeglichen wurde (Abb. 1). Der strukturelle Aufbau von chPTX3 mit einer N-terminalen Domäne, einer Pentraxin-Domäne und der charakteristischen Pentraxin-Signatur entspricht grundsätzlich auch dem Aufbau des PTX3 der anderen Spezies. Interessanterweise weist die N-terminale Domäne und das Signalpeptid bei Huhn, Frosch und Zebrafisch deutlich mehr Aminosäuren als bei den Spezies Mensch, Maus, Rind und Schwein auf. Dies fällt vor allem in zwei Bereichen auf, in denen die Sequenzen der Nicht-Säugetiere Abschnitte von 27 bzw. 18 Aminosäuren enthalten, welche in den Sequenzen der Säugetiere fehlen. Auch außerhalb dieser, exklusiv in den Nicht-Mammalia vorkommenden, Bereiche weist die N-terminale Domäne zwischen den Spezies eine geringere Homologie als die Pentraxin-Domäne auf. Ähnliches wurde bereits bei der Erforschung der Stammesgeschichte der C- und der N-terminalen Domäne der langen Pentraxine entdeckt (s. 2.2.3.). So ist die Sequenzhomologie zwischen den N-terminalen Domänen der Mitglieder der langen Pentraxine sehr viel niedriger als in der Pentraxin-Domäne, woraus sich auch die Namensgebung ableitet. Beispielsweise zeigt die N-terminale Domäne des humanen PTX3 nur 10% Übereinstimmung zur N-terminalen Domäne des langen Pentraxins NP1 [33]. Die hier festgestellte größere Länge von PTX3 bei den Spezies Huhn, Frosch und Zebrafisch könnte möglicherweise ein erster Hinweis auf andere oder erweiterte Funktionen bei den Nicht-Säugetern sein. So könnten sich in den zusätzlichen Abschnitten Bindungsstellen für Liganden befinden, welche im Lauf der weiteren Evolution in diesem Protein verloren gegangen sind. Ähnliche strukturelle Veränderungen sind auch für andere Proteine, wie zum Beispiel das Rax-Protein beschrieben worden und haben unterschiedliche funktionelle Konsequenzen. Vor 525 Mio. Jahren sind aus dem Rax-Gen des Wirbeltier-Ahns die zwei Subgruppen Rax1 und Rax2 entstanden [338]. Das Rax-Protein hat drei konservierte Regionen: ein N-terminales Octapeptid-Motiv, eine C-terminale OAR-Domäne und eine DNA bindende zentrale Homeodomäne (HD). Die OAR-Domäne ist auch bei den

Transkriptionsfaktoren Otp, Aristaless und Rax zu finden ist, woraus sich ihr Name ableitet [339]. Alle Rax-Proteine haben das Octapeptid-Motiv, die HD- und die OAR-Domäne. Nur die Rax2-Proteine der Tetrapoden sind kürzer und weisen das Octapeptid-Motiv nicht auf. Dieses ging während der Evolution verloren. Die Wirbeltier-Rax-Gene scheinen zwei Funktionen von einem Chordata-Vorfahren geerbt zu haben. Zum einen spielen sie eine Rolle im Vorderhirn und bei der Entwicklung des Hypothalamus und zum anderen eine Rolle bei der Entwicklung des Auges und der Photorezeptoren. Die Rax1- und Rax2-Paraloge sind vor 525 Mio. Jahren, bevor sich die Abstammungslinien von Knorpel- und Knochenfischen geteilt haben, aus dem primitiven Rax-Gen neu aufgetaucht und haben verschiedene Subfunktionen des Rax-Gens übernommen. So ist das Rax1-Gen als das Hauptgen bei der frühen Entwicklung der Augenstrukturen und des Hypothalamus involviert. Die Funktion des Rax2-Gens ist spezialisierter, indem es die Proliferation und die Differenzierung der Retina kontrolliert [340]. Insgesamt deutet dies darauf hin, dass die Entstehung der Rax-Paraloge ein stärker differenziertes Sehen ermöglicht und somit einen evolutionären Vorteil mit sich gebracht hat. Hier lässt sich eine Parallele zum PTX3 ziehen. Auch bei diesem ist im Laufe der Evolution zwar keine ganze Domäne, aber ein Teil einer Domäne, verloren gegangen und das führt möglicherweise zu einer spezifischeren Funktion beim Säuger-PTX3. Die Untersuchung eines solchen möglichen evolutionären Vorteils bei den Säugetieren im Vergleich zu den phylogenetisch älteren Spezies aufgrund der verkürzten N-terminalen Sequenz des Pentraxins könnte deshalb künftig ein interessantes Forschungsfeld begründen.

Des Weiteren ist auffällig, dass PTX3 bei den drei Spezies Huhn, Frosch und Zebrafisch zwei errechnete N-Glykosylierungsstellen hat, während das Schwein keine und die Spezies Mensch, Maus und Rind nur eine errechnete N-Glykosylierungsstelle aufweisen. Durch eine Interaktion des Sialinsäurerests der N-Glykosylierung mit dem viralen Hämagglutinin bindet humanes und murines PTX3 an das Influenzavirus (H3N2). Es inhibiert die Hämagglutination und auch die Aktivität der viralen Neuraminidase und neutralisiert somit die Virusinfektiösität [84]. Möglicherweise lässt sich damit auch erklären, dass das Schwein bei Influenzainfektionen als Mischgefäß („mixing vessel“) gilt, was bedeutet, dass es sowohl Rezeptoren für aviäre als auch für humane Influenzastämme hat, also für aviäre und humane Influenzastämme gleichermaßen empfänglich ist. Aufgrund der fehlenden N-Glykosylierungsstellen kann das porcine PTX3 die Hämagglutination und auch die virale Neuraminidase nicht inhibieren. Somit wäre das Schwein weniger vor Influenzaviren geschützt und folglich anfälliger für derartige Infektionen. Dass die Spezies Huhn, Frosch und Zebrafisch sogar zwei N-Glykosylierungsstellen aufweisen, könnte bedeuten, dass sie eine

Influenzainfektion effizienter abwehren können als die Spezies Mensch, Maus und Rind mit nur einer N-Glykosylierungsstelle. Voraussetzung für diese Überlegung ist allerdings, dass die N-Glykosylierungsstellen beim PTX3 der Spezies Huhn, Frosch und Zebrafisch einen Sialinsäurerest enthalten. In der Literatur gibt es dazu jedoch keinen Hinweis.

Ein weiterer Unterschied fällt bei der Betrachtung der PTX3-Sequenzen bezüglich des Auftretens von Cysteinresten auf. Das humane PTX3 hat insgesamt neun Cysteinreste: drei in der N-terminalen Domäne (Cys⁴⁷, Cys⁴⁹ und Cys¹⁰³) und sechs in der Pentraxin-Domäne (Cys¹⁷⁹, Cys²¹⁰, Cys²⁷¹, Cys³¹⁷, Cys³¹⁸ und Cys³⁵⁷). Die Cys-Reste an den Positionen 210 und 271 sind in der Familie der Pentraxine hoch konserviert und, basierend auf der Homologie zu CRP und SAP, wahrscheinlich an Disulfidbrückenbindungen innerhalb einer Kette beteiligt [34, 61]. Die Cysteinreste an den Positionen 47 und 49 formen Disulfidbindungen zwischen zwei Ketten. Der Cysteinrest an Position 103 hält vier Proteinuntereinheiten zu einem Tetramer zusammen, wohingegen die Cysteine an den Positionen 317 und 318 der Pentraxin-Domäne zwei Tetramere zu einem Oktamer verbinden [71]. Bis auf die Cysteine an den Positionen 103 und 179 hat das PTX3 beim Huhn alle Cysteinreste, die auch das humane PTX3 aufweist. Es fehlt demnach der Cysteinrest, der vier Proteinuntereinheiten zu einem Tetramer zusammenzufasst (Cys¹⁰³), sowie ein hochkonservierter Cysteinrest an Position 179, der an einer Disulfidbrückenbindung innerhalb einer Kette beteiligt ist. Das könnte für chPTX3 strukturell bedeuten, dass die vier Einzelketten nicht als Tetramer zusammengefügt sind und die Cysteinreste an Position 317 und 318 acht lose Ketten zu einem Oktamer zusammenfügen und das Protein dadurch weniger stabil ist. Möglicherweise ergeben sich für das Huhn aufgrund dieser weniger stabilen Struktur funktionelle Unterschiede. Durch die eher lockere Struktur könnten beispielsweise Bindungsstellen freigelegt werden, die bei anderen Spezies im Inneren der Tertiärstruktur des Pentraxin 3-Polymers verborgen sind und die es dem Protein ermöglichen könnten noch mehr oder andere Moleküle bzw. Pathogene zu binden.

Ausgehend vom kalkulierten Molekulargewicht unter nicht reduzierenden Bedingungen von circa 300kDa bis 325kDa und einem kalkulierten Molekulargewicht unter reduzierenden Bedingungen von circa 65kDa könnte man allerdings eher von einem Pentamer und nicht von einem Oktamer ausgehen. Durch die geringere Zahl an miteinander verbundenen PTX3-Ketten würden so auch weniger Cysteinreste bzw. Disulfidbrücken ausreichen, um dem Molekül eine stabile Struktur zu geben. Die Untersuchung der Kristallstruktur von chPTX3 könnte in Zukunft zur Aufklärung des Polymerisierungsverhaltens dieses Proteins beitragen.

6.1.2 Alignment der Sequenz vom CRP des Huhns mit der chPTX3-Sequenz

Um die Unterschiede zwischen kurzen und langen Pentraxinen beim Huhn herauszuarbeiten, wurde nach dem Alignment der PTX3-Sequenzen verschiedener Spezies als nächstes die Aminosäuresequenz des C-reaktiven Protein des Huhns als Vertreter der kurzen Pentraxine mit der von chPTX3 verglichen.

Wie bei Mensch und Maus bekannt, unterscheiden sich die kurzen von den langen Pentraxinen darin, dass sie nur aus der Pentraxin-Domäne mit der Pentraxin-Signatur bestehen und ihnen die N-terminale Domäne fehlt [341]. Dieser Unterschied ist auch zwischen chCRP und chPTX3 vorhanden. Das C-reaktive Protein des Huhns besteht, wie bei Mensch und Maus auch, nur aus der Pentraxin-Domäne mit der Pentraxin-Signatur. Das PTX3 des Huhns hat noch zusätzlich eine N-terminale Domäne. Diese strukturellen Unterschiede zwischen CRP und PTX3 führen bei Mensch und Maus dazu, dass beide Moleküle bestimmte Bakterien, Pilze und Viren erkennen und binden, das Erkennen von Hefen und Parasiten (*Plasmodium*, *Leishmania*) aber nur CRP vorbehalten ist [342]. CRP und PTX3 erkennen beide apoptotische Zellen, wobei aber eine zusätzliche Funktion von CRP auch das Erkennen von beschädigten Zellen ist [9]. Ein weiterer deutlicher Unterschied bei den Funktionen von CRP und PTX3 ist die Bindung von CRP an Low Density Lipoprotein (LDL, deutsch: Lipoprotein niederer Dichte) über Phosphorylcholin [343]. PTX3 bindet mit seiner N-terminalen Domäne an eine Komponente der extrazellulären Matrix (IαI), an einen Faktor der Angiogenese (FGF-2) und auch an Konidien von *Aspergillus fumigatus*. Des Weiteren kann es als ganzes Molekül mit TSG-6, ebenfalls eine Komponente der extrazellulären Matrix, interagieren [65, 66, 81]. Da sich die kurzen und langen Pentraxine beim Huhn vermutlich ähnlich zueinander in Bezug setzen lassen wie die von Mensch und Maus, vermutet man eine Unterscheidung der Funktionen auf ähnliche Weise. Untersuchungen dazu liegen jedoch bisher nicht vor.

Das CRP des Huhns hat eine errechnete N-Glykosylierungsstelle bei Asparagin51. Wie in 5.1 bereits erwähnt hat das PTX3 des Huhns zwei Glykosylierungsstellen und wie gezeigt wurde, kann das humane CRP den Menschen nicht vor Influenza schützen [341]. Beim Huhn liegen hierzu keine Untersuchungen vor, doch lässt das mögliche Vorhandensein einer N-Glykosylierung die Vermutung zu, dass in dieser Spezies CRP zur Bindung von Hämagglutinin befähigt sein könnte, falls die N-Glykosylierung einen Sialinsäurerest beinhaltet. Dennoch dürfte es aber nicht an die antivirale Wirkung von PTX3 heranreichen, welches, wie im letzten Punkt bereits diskutiert, sogar über zwei Glykosylierungsstellen (bei Asparagin159 und bei Asparagin330) verfügt [84]. Auch bei dieser Überlegung ist es eine

Voraussetzung, dass die N-Glykosylierung einen Sialinsäurerest enthält um eine Influenzainfektion zu hemmen. Die genaue Struktur einer N-Glykosylierung ist jedoch nur bei den Spezies Mensch und Maus bekannt [72] und muss bei der Spezies Huhn noch geklärt werden.

Ansonsten ist es auffällig, dass bei den beiden Molekülen nur zwei Cysteinreste homolog sind. Diese bilden beim humanen PTX3 Disulfidbrücken innerhalb einer Kette. Die geringe Homologie lässt sich mit der unterschiedlichen Struktur der beiden Moleküle erklären. Das humane CRP ist ein ringförmiges Pentamer [25], während das humane PTX3 ein asymmetrisches Oktamer ist [63] und dementsprechend mehr Disulfidbrücken benötigt um stabil zu sein.

Eine weitere Erklärung, warum kurze und lange Pentraxine einige Unterschiede aufweisen (wie z.B. die zusätzliche N-terminale Domäne und zusätzliche N-Glykosylierungsstellen bei PTX3), könnte die stammesgeschichtliche Entwicklungsanalyse geben [33]. Laut dieser weichen die kurzen Pentraxine CRP und SAP der Säuger und des Pfeilschwanzkrebses von den gemeinsamen Vorfahren aller Pentraxine ab. Die Erwähnung des Pfeilschwanzkrebses weist darauf hin, dass sich die Genduplikation, die diese hoch homologen Proteine entstehen ließ, sehr früh während der Evolution ereignete. Bei dieser stammesgeschichtlichen Entwicklungsanalyse erscheint PTX3 in einer eigenen Gruppe weit weg von den kurzen Pentraxinen. PTX3 entstand ebenfalls sehr früh während der Evolution der Pentraxine, allerdings stammt es nicht von den kurzen Pentraxinen, sondern direkt von den gemeinsamen Vorfahren ab [33]. Diese Tatsachen könnten die Unterschiede der kurzen und langen Pentraxine CRP und PTX3 erklären.

6.2 Klonierung von chPTX3 und Expression als FLAG markiertes Protein

Um das PTX3 des Huhns weiter charakterisieren zu können, wurde chPTX3 zuerst in den kommerziellen Klonierungsvektor pGEM[®]-T Easy kloniert. Anschließend wurde dann das Plasmid zur Sequenzierung geschickt. Die zurückerhaltene Sequenz wurde mit der Sequenz von chPTX3, die in der Datenbank des NCBI frei verfügbar ist, verglichen. Damit wurde sichergestellt, dass sich in der synthetisierten cDNA die korrekte Sequenz von chPTX3 befindet.

Danach wurde das Protein in den zweiten Vektor „p3xFLAG-myc-CMV-25“ kloniert. Da zu diesem Zeitpunkt noch kein spezifischer Antikörper zum Detektieren von chPTX3 zur

Verfügung stand, konnte durch die so erzielte Anheftung des 3xFLAG-Tags an das exprimierte Protein der Nachweis mittels immunbiochemischer Methoden erfolgen. Die Detektion des Proteins im Immunoblot oder im ELISA erfolgte anschließend also mit einem Anti-FLAG-Antikörper. Wichtig war bei dieser Klonierung, dass das chPTX3 ohne sein Signalpeptid in den Vektor kloniert wurde, da dieser bereits über das Signalpeptid Präprotrypsin verfügt und ein zweites Signalpeptid möglicherweise die Fusion des 3xFLAG-Tags mit chPTX3 stören würde.

6.3 Struktur von chPTX3

Das humane PTX3 weist eine komplexe Quartärstruktur mit Protomeren auf, die sich zu einem Oktamer zusammenlagern (high order oligomerization), das durch Disulfidbrücken stabilisiert ist [61]. Massenspektrometrie und gezielte Mutagenese des rekombinanten Proteins zeigen, dass huPTX3 kovalent verknüpfte Oktamere mit einem Molekulargewicht von 340 kDa bildet. Da die PTX3-Sequenzen der verschiedenen Spezies laut dem Alignment in 5.1 sehr homolog sind, war die Arbeitshypothese, dass auch chPTX3 ein multimeres Protein ist. Bei der Analyse der Struktur im Immunoblot unter nicht reduzierenden Bedingungen wurde bei chPTX3 ein Molekulargewicht von circa 300kDa bis 325kDa beobachtet (s. Abbildung 5). Da dieses Molekulargewicht geringer als das des humanen PTX3 ist, könnte man davon ausgehen, dass chPTX3 aus weniger Protomeren aufgebaut ist und beispielsweise nur ein Hexamer oder ein Heptamer bildet. Das oben genannte kalkulierte Molekulargewicht unter nicht reduzierenden Bedingungen sowie das kalkulierte Molekulargewicht unter reduzierenden Bedingungen von circa 65kDa spricht allerdings eher für ein Pentamer.

Humanes PTX3 hat eine einzige N-Glykosylierung in der Pentraxin-Domäne bei Asparagin220 [70]. Bei einer SDS-PAGE wurde unter reduzierenden Bedingungen ein höheres Molekulargewicht beobachtet als man rechnerisch für diese Aminosäuresequenz annehmen würde (45 kDa gegenüber den berechneten 40 kDa). Untersuchungen der Sequenz des humanen PTX3 deuten darauf hin, dass die N-Glykosylierung bei Asparagin220 für das höhere Molekulargewicht verantwortlich ist [61]. Bei der Analyse der Struktur von chPTX3 im Immunoblot unter reduzierenden und deglykosylierten Bedingungen konnte gezeigt werden, dass das Molekulargewicht 61kDa beträgt (s. Abbildung 5). Glykosyliert und reduzierend weist chPTX3 ein Molekulargewicht von 65kDa auf. Daraus kann man schließen,

dass die zwei berechneten N-Glykosylierungsstellen für eine Erhöhung des Molekulargewichts um 4kDa verantwortlich sind. Möglicherweise hat also jede N-Glykosylierung ein Molekulargewicht von 2kDa, eine andere Verteilung des Molekulargewichts auf die einzelnen N-Glykosylierungsstellen wäre aber auch möglich. Auch darf die Option, dass eine der theoretisch möglichen N-Glykosylierungen im nativen Protein nicht vorhanden ist, nicht außer Acht gelassen werden, was wiederum von funktioneller Bedeutung, z. B. für die Kompetenz des Proteins Influenzaviren zu binden, sein könnte. Eine wichtige Information für zukünftige Studien ist das Vorliegen mindestens einer N-Glykosylierung am PTX3 des Huhns, was durch das veränderte Molekulargewicht nach der Deglykosylierung eindeutig nachgewiesen werden konnte.

6.4 Expressionsanalysen von chPTX3 in verschiedenen Zellen und Organen

Wie aus Abbildung 6 ersichtlich, exprimieren die unstimulierten Organe Haut, Muskel, Muskelmagen, Niere und Herz wenig bzw. kein chPTX3. Beim Menschen wird die Präsenz von PTX3 im Herzen kontrovers diskutiert. In einigen Studien wurde PTX3 in gesundem, intaktem Myocard nachgewiesen [130], während die Präsenz von PTX3 in anderen Studien nur bei Infarkten im Herzen beobachtet wurde [344]. Des Weiteren ist beim Menschen bekannt, dass Nierenepithelzellen nach einem Entzündungsstimulus PTX3 exprimieren [26]. Es gibt in der Literatur jedoch bis dato auch beim Menschen keine Hinweise auf eine PTX3-Expression in unstimulierten Nierenzellen (PubMed-Recherche Stand 26.01.2017), was mit unseren Untersuchungen am Huhn konform geht.

Darüber hinaus fällt auf, dass eine Vielzahl von lymphatischen Organen des Huhns wie die Caecealtonsille, die Bursa, der Thymus, die Harder'sche Drüse und auch Organe, in denen mucosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (BALT/GALT) induziert werden kann, wie z.B. Dünndarm, Dickdarm, Trachea und Lunge, chPTX3 mäßig bis stark ohne vorangegangene Stimuli exprimieren. Die Expression in diesen lymphatischen Organen des Huhns ist wenig erstaunlich, da PTX3 ein Akute Phase Protein und somit Bestandteil der Immunabwehr ist [345]. Auch die unstimulierte Leber zeigt beim Huhn eine mäßige PTX3-Expression (s. Abb. 6). Wie aus der Literatur bekannt, exprimieren humane Hepatozyten, stimuliert durch die Zytokine IL6 und IL1 β , die kurzen Pentraxine CRP und SAP während einer Infektion oder einem Gewebeschaden [9]. Daher stellt die Leber ein besonders interessantes Organ zur

Untersuchung der Expression von PTX3 beim Huhn dar und wurde deshalb im weiteren Verlauf mit in die qRT-PCR-Analyse nach LPS-Stimulation (s. Abbildung 8) einbezogen.

Interessanterweise ist PTX3 in der unstimulierten Milz des Huhns mittels PCR-Analyse nicht messbar (s. Abbildung 6). Die Milz ist beim Huhn ein peripher lymphatisches Organ und besteht wie beim Säuger aus roter und weißer Milzpulpa. Nachdem die Hämatopoese mit Abschluss der Fötalperiode in der roten Pulpa eingestellt wird, wechselt diese die Funktion, sodass sie nun für das Ausfiltern zirkulierender, alter Erythrozyten zuständig ist. Die weiße Pulpa stellt das eigentliche lymphoide Organ dar [346]. Sie wird beim Huhn, wie auch beim Säuger [347], bereits sehr früh in der Ontogenese von lymphoiden Zellen besiedelt. Die endgültige Entwicklung der lymphoiden Struktur und die Differenzierung der enthaltenen Lymphozyten zu Effektorzellen findet beim Huhn jedoch erst nach dem Schlupf mit Beginn des Antigenkontaktes statt [348]. Antigene erreichen die Milz über die Blutzirkulation, weshalb die hier gebildeten Antikörper auch hauptsächlich gegen Antigene aus dem Blut gerichtet sind [349]. Mit dieser Beschreibung der Struktur lässt sich möglicherweise erklären, warum die Milz des ersten mit LPS stimulierten Tieres in Abbildung 7 eine deutlich geringere Expression von PTX3 aufweist. Eventuell enthielt die Milzprobe dieses Tieres nicht die weiße Milzpulpa als immunologisch aktiven Teil des Organs, sondern zum größten Teil die rote Milzpulpa, sodass in diesem Fall eine deutlich geringere Expression von PTX3 sichtbar wurde.

Zur weiteren Untersuchung von Milz und Leber wurde Hühnern LPS injiziert und 3 Stunden später die Organe entnommen. Die daraus isolierte mRNA wurde mittels qRT-PCR untersucht. Die Veränderung der PTX3-Expression in den beiden Organen im Zuge der Stimulation ist in den Abbildungen 7 und 8 dargestellt. Hierbei bestätigen die unstimulierten Kontrolltiere in der PCR den Befund aus Abbildung 6: Milzen von unstimulierten Tieren exprimieren kein messbares PTX3, Lebern dieser Tiere zeigten eine geringe PTX3-Expression. Die Organe der mit LPS stimulierten Tiere weisen bis auf eine Milz hingegen eine extrem hohe Expression von PTX3 auf. Die qRT-PCR-Analyse (Abbildung 8) bestätigt die PCR (Abbildung 7) und liefert genaue Zahlen zum Expressionsunterschied. So war die Expression von chPTX3 in der Milz nach LPS-Injektion um das circa 81-fache erhöht, bei der Leber um das circa 22-fache. Die Tatsache, dass die Leber unstimuliert schon in messbarem Ausmaß PTX3 exprimiert, lässt den geringeren Expressionsunterschied in diesem Organ im Vergleich zum starken Unterschied zwischen stimulierten und unstimulierten Milzen erklären. Möglicherweise wird in der unstimulierten Leber stärker PTX3 exprimiert, weil sie als Entgiftungsorgan ständig ein Ort geringgradiger Akute-Phase-Reaktion und der

Hauptsyntheseort für Akute Phase Proteine ist. Bei jeglicher Akute Phase Reaktion im Körper exprimiert die Leber daher APP, wie beispielsweise PTX3.

Beim Menschen exprimieren ruhende T- und B-Zellen keine PTX3-RNA [40]. Bei der Untersuchung dieser Zellen beim Huhn war jedoch auffällig, dass T-Zellen PTX3 sogar in hohem Maß exprimierten (Abbildung 9). Da T-Zellen sich im Thymus entwickeln und PTX3 auch stark im Thymus exprimiert wird (Abbildung 6), ist die Expression in diesen nicht verwunderlich. Des Weiteren verhielten sich B-Lymphozyten entsprechend ihren humanen Pendanten. Allerdings ist aus Abbildung 6 ersichtlich, dass in der Bursa fabricii, als Ort der primären B-Zellentwicklung [350], viel PTX3-mRNA detektierbar ist. Die Reifung von B-Zellen ist beim Huhn in der Bursa auf eine frühe Lebensphase begrenzt. Der Grund hierfür ist die Involution der Bursa mit Eintritt der sexuellen Reife [351]. Danach wird der periphere B-Zellpool durch eine kleine Population sich selbst erneuernder B-Zellen, den sogenannten post-bursalen Stammzellen, aufrechterhalten [352]. Möglicherweise ist dies ein Hinweis darauf, dass sich die PTX3-Expression in B-Zellen im Verlauf der Zeit verändert. Scheinbar exprimieren B-Zellen in der frühen Lebensphase in der Bursa PTX3, im Blut zirkulierende B-Zellen stellen diese Expression aber ein.

Bei zirkulierenden B-Zellen könnte aber, wie schon in der Milz (Abb. 6,7 und 8), nach Stimulation möglicherweise ebenfalls eine Expression beobachtet werden, was einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Forschungsarbeit darstellt.

6.5 Generierung von Antikörpern gegen chPTX3

Da chPTX3 ein Akute Phase Protein ist und deshalb ein Marker für Infektionen, Entzündungen und Gewebeschäden sein könnte, haben wir zwei Antikörper generiert, die chPTX3 spezifisch binden und möglicherweise in der Zukunft diagnostisch genutzt werden können, wie z.B. in einem Sandwich-ELISA zur Beurteilung von PTX3-Konzentrationen im Serum.

Der erste generierte Antikörper 6F9-1G6 ist ein monoklonaler IgG2a-Antikörper, wohingegen der zweite Antikörper 6H8 polyklonal ist und den Isotyp IgM hat. Wie aus den Abbildungen 10 bis 12 ersichtlich, binden beide Antikörper spezifisch an chPTX3. Sie ermöglichen damit neben einem CRP-ELISA die direkte Detektion eines wichtigen Akute Phase Proteins und potentiellen Entzündungsmarkers beim Huhn mittels immunochemischer Methoden. Da das CRP und das PTX3 des Huhns eine große Sequenzhomologie aufweisen (s. 4.2), wäre es

möglich, dass der CRP-Antikörper auch ein im PTX3 konserviertes Epitop detektieren kann. Dies sollte in zukünftigen Studien untersucht werden.

Der Prozess, in dessen Ergebnis die beiden anti-chPTX3-Antikörper entstanden, war auch von Herausforderungen geprägt. Viele Klone produzierten Antikörper, die unspezifisch an die Blockierungslösung Magermilch (der Kuh) oder den Beschichtungsantikörper des ELISAs gebunden haben und somit für weitere Untersuchungen unbrauchbar waren. Eine Erklärung für das Binden an die Blockierungslösung könnte sein, dass PTX3 von Brustepithelzellen und CD11b⁺-Leukozyten exprimiert wird, was zu hohen Konzentrationen von PTX3 in humaner und muriner Milch führt. Milch-PTX3 führt zu einem Infektionsschutz bei neugeborenen Mäusen [60]. Bei einer weiterführenden Studie wurde aber auch gezeigt, dass in Milchpulver für Neugeborene, das aus Kuhmilch hergestellt wurde, kein PTX3 nachgewiesen wurde [60]. Dennoch kann es sein, dass in der Magermilch-Blockierungslösung Proteine enthalten sind, die dem chPTX3-FLAG ähnliche Epitope aufweisen, an die die generierten Antikörper gebunden haben und somit für ein falsch positives Ergebnis gesorgt haben. Ähnlich lässt sich die unspezifische Bindung einiger Antikörper an den Beschichtungsantikörper erklären: dieser könnte dem chPTX3 ähnliche Epitope aufweisen, die von einigen der neu generierten Antikörper erkannt wurden, wodurch es zu einem falsch positiven Ergebnis kam. Eine andere Erklärung für das falsch positive Ergebnis wäre die Bindung der Antikörper an strukturell ähnliche Zuckerreste. Darüber hinaus kann ein Kontakt der Maus mit einem dem Beschichtungsantikörper ähnlichen Antigen-Epitops eine unspezifische Reaktion auslösen.

Eine weitere Herausforderung sind verschiedene Isotypen der generierten murinen anti-chPTX3-Antikörper. Für eine leichtere Detektion ist es bei einem Sandwich-ELISA, vor allem in der frühen Phase der Etablierung, von Vorteil, wenn beide Antigen-bindende Antikörper verschiedenen Isotypen angehören. Ungelabelte Antikörper mit verschiedenen Isotypen können so spezifisch detektiert werden. Neben dieser Variante mit zwei Antikörpern unterschiedlicher Isotypen wäre es beim Polymer PTX3 auch möglich, den ELISA mit nur einem Antikörper zu etablieren. Dieser Antikörper wird dann einmal ungelabelt als Beschichtungsantikörper genutzt und könnte gelabelt auch als Detektionsantikörper fungieren.

Der IgG2a-Antikörper wurde mittels einer Protein G-Sepharose aufgereinigt. Das Protein G ist ein Bestandteil der Zellwand des Bakteriums Streptococcus. Rekombinant hergestellt weist es keine Bindungsstellen für Albumin auf, wodurch sich die Spezifität bei einer Aufreinigung erhöht. Der zu reinigende Zellkulturüberstand der Hybridoma-Kultur wurde mittels Druck durch eine Säule mit einer Protein G-Sepharose geführt. Der IgG2a-Antikörper band

daraufhin mit seinem Fc-Fragment an das Protein G und wurde so, im Gegensatz zum Rest der Lösung, zurückgehalten. Anschließend konnte das gebundene Immunglobulin mithilfe eines Puffers mit saurem pH-Wert von der Protein G-Sepharose gelöst und aufgefangen werden. Anhand der Abbildungen 10 und 11 erkennt man, dass der aufgereinigte IgG2a-Antikörper bis zu 1:2000 verdünnt werden kann und immer noch hoch affin an chPTX3 bindet.

Der zweite generierte Antikörper besitzt den Isotyp IgM. Da Protein G nicht an das Pentamer IgM bindet [353], ist die Aufreinigung eines IgM-Antikörpers mittels Protein G-Sepharose nicht möglich. Solch ein multimerer Antikörper kann entweder über Ionen-Austausch-Chromatographie, über Größen-Ausschlusschromatographie oder über Protein L von *Peptostreptococcus magnus* aufgereinigt werden, da Protein L an die freiliegende variable Region der leichten Kette bindet. Diese Methoden sind im Vergleich zur IgG-Aufreinigung kompliziert und teuer und ergeben vor allem keinen ausreichenden Reinheitsgrad des Antikörpers. Dies stellt bei der Anwendung für diagnostische Tests ein Problem dar, da jede Verunreinigung der Antikörperlösung die Testgenauigkeit potenziell senkt. Die Aufreinigung mittels einer Protein G-Sepharose stellt somit für die Durchführung von diagnostischen Tests mit größtmöglicher Spezifität und Sensitivität das deutlich bessere Verfahren dar. Obwohl der hier generierte IgM-AK 6H8 bereits als unbearbeiteter ZKÜ eine gute Spezifität für chPTX3 aufweist (Abb.12), sollte daher, sofern ein zweiter Antikörper für die Etablierung eines diagnostischen Tests erforderlich sein sollte, ein weiterer IgG-Antikörper gegen chPTX3 generiert werden, der mittels einer Protein G-Sepharose aufgereinigt werden kann.

6.6 Ausblick

In Zukunft könnten, auf die bereits erfolgte Strukturklärung aufbauend, weitere Studien zu Liganden, Bindungsstellen, Bindungskapazitäten und biologischen Funktionen im Zellkulturmodell durchgeführt werden. Ein interessanter Studienschwerpunkt wäre z.B. die Untersuchung des Bindungsverhaltens an verschiedene Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), zu denen unter anderem aviäre pathogene *E.coli* gehören. Nach einer Infektion mit uropathogenen *E.coli* tritt im Urin und Serum von Wildtyp-Mäusen eine deutlich höhere Konzentration von PTX3 auf und auch die bakterielle Besiedlung der Blase bei PTX3-Knockout-Mäusen ist im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen erhöht [50]. Daher wäre es interessant herauszufinden, ob chPTX3 bei einer

Infektion mit APEC ähnlich reguliert. Jaillon et al. zeigten, dass PTX3 als Opsonin auftritt und direkt an uropathogene *E.coli* bindet. Dadurch wird eine Aufnahme der Bakterien durch neutrophile Granulozyten gefördert und somit der Körper von der bakteriellen Infektion befreit [50].

Es wäre, um die schützende Funktion von chPTX3 im aviären Immunsystem besser zu verstehen, ein interessanter Ansatz mithilfe des retroviralen Vektorsystems RCAS (replication competent ASLV– LTR with a splice acceptor) eine Überexpression von chPTX3 im Huhn herbeizuführen und anhand von Infektionsversuchen beispielsweise die Wirkung von chPTX3 bei einer Infektion mit APEC zu beurteilen. Das RCAS-Gentransfersystem basiert auf dem Rous Sarkoma-Virus (RSV). Dieses Retrovirus gehört zur Gruppe der aviären Typ C Retroviren, welche auch aviäre Sarkom/Leukose-Viren (ASLV) genannt werden [354]. RCAS ist replikationskompetent und über die eingefügte *Clal*-Schnittstelle [355] können Transgene bis zu einer Größe von 2,5kb eingefügt werden [356-359], was chPTX3 mit einschließt. Mit diesem RCAS-Konstrukt transfizierte Fibroblasten werden im nächsten Schritt in Hühnerembryonen injiziert, woraufhin diese Hühnerembryonen chPTX3 überexprimieren sollten und zu beobachten wäre, ob diese Überexpression von chPTX3 eine experimentelle Infektion des Wirts abmildert oder möglicherweise ganz verhindert. Solche Infektionsversuche, beispielsweise mit APEC, eröffnen die Möglichkeit, die Rolle von chPTX3 bei der Bekämpfung einer Infektion zu beurteilen.

Mithilfe der beiden während dieser Arbeit generierten Antikörper ist bereits heute ein direkter Nachweis von chPTX3 möglich. Für die Wissenschaft und die Industrie wäre dies eine gute Grundlage um einen Sandwich-ELISA zur Felddiagnostik zu entwickeln. Dieser Sandwich-ELISA könnte dazu genutzt werden um beispielsweise Influenzainfektionen oder Infektionen mit APEC frühzeitig zu erkennen, eine schnelle Reaktion darauf zu ermöglichen und gegebenenfalls tierseuchenrechtliche Maßnahmen zu ergreifen.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Das lange Pentraxin PTX3 ist ein inflammatorisches Akute Phase Protein. APPs sind Proteine, deren Plasmakonzentrationen sich nach einem inflammatorischen Stimulus um 25 % oder mehr verändern. Über das lange Pentraxin PTX3 ist bei Mensch und Maus schon Vieles bekannt [18, 19, 337]. Zu seinen Funktionen gehört beispielsweise die Aktivierung des Komplementsystems, die Bindung an verschiedene Pathogene und die Regulierung von Entzündungen [13]. Beim Huhn ist es in der Literatur aber unbeschrieben. Frühere Genexpressionsstudien unserer Arbeitsgruppe bei Hühnern, die mit rekombinantem IFN- α behandelt wurden, führten allerdings zur Identifizierung eines stark induzierten Gens, das zur Pentraxin-Superfamilie gehört. Detailliertere genomische Analysen zeigten eine hohe Homologie zum langen Pentraxin PTX3 des Menschen.

Um dieses bislang im Huhn unbeschriebene Protein näher zu charakterisieren, wurde die Struktur von chPTX3 *in silico* mithilfe frei zugänglicher Software untersucht. Die Aminosäure-Sequenz von chPTX3 wurde hierbei zunächst mit der des gleichen Proteins anderer Tierarten verglichen, wobei neben den vier Säugetierspezies *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Bos taurus* und *Sus scrofa* auch die Sequenz des Krallenfrosches (*Xenopus tropicalis*) und des Zebrafisches (*Danio rerio*) herangezogen wurde. Der strukturelle Aufbau von chPTX3 mit einer N-terminalen Domäne, einer Pentraxin-Domäne und der charakteristischen Pentraxin-Signatur entspricht grundsätzlich auch dem Aufbau des PTX3 der anderen Spezies. Um die Unterschiede zwischen kurzen und langen Pentraxinen beim Huhn herauszuarbeiten, wurde nach dem Alignment der PTX3-Sequenzen verschiedener Spezies als nächstes die Aminosäuresequenz des C-reaktiven Protein des Huhns als Vertreter der kurzen Pentraxine mit der von chPTX3 verglichen. Wie bei Mensch und Maus beschrieben, unterscheiden sich die kurzen von den langen Pentraxinen darin, dass sie nur aus der Pentraxin-Domäne mit der Pentraxin-Signatur bestehen und ihnen die N-terminale Domäne fehlt [331]. Dieser Unterschied ist auch zwischen chCRP und chPTX3 vorhanden.

Um weitere Informationen zur Struktur und Funktion des chPTX3 zu gewinnen, wurde das APP kloniert und als ein Flag-getagtes Protein in HEK-293-Zellen exprimiert. Rekombinantes chPTX3 ist ein Protein aus 433 Aminosäuren, welches unter nativen Bedingungen ein Multimer mit einem Molekulargewicht von circa. 300 kDa bildet. Unter reduzierenden Bedingungen hat es ein Molekulargewicht von 65kDa. Das Protein hat zwei theoretische N-Glykosylierungsstellen bei Asn159 und bei Asn330. Ohne diese

Glykosylierungen hat es ein Molekulargewicht von 61kDa.

Quantitative RT-PCR-Analysen zeigten, dass sich nach einer *in vivo* LPS-Gabe die Expression von chPTX3 in der Milz um das 81-fache und in der Leber um das 22-fache erhöht. Bei weiteren Expressionsanalysen von Organen des Huhns konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von lymphatischen Organen auch unstimuliert chPTX3 exprimieren. Nur die Milz zeigt als einziges lymphatisches Organ keine messbare Expression in unstimuliertem Zustand. Auf Zellebene konnte gezeigt werden, dass ruhende T-Zellen chPTX3 exprimieren, ruhende B-Zellen aber nicht.

Um einen direkten Nachweis von PTX3 des Huhnes zu ermöglichen, wurden erstmals zwei Antikörper generiert, die spezifisch an chPTX3 binden. Der erste generierte monoklonale Antikörper 6F9-1G6 ist ein Maus-IgG2a-Antikörper und der zweite polyklonale Antikörper 6H8 hat den Isotyp Maus-IgM. Mithilfe dieser ersten spezifischen anti-chPTX3-Antikörper konnte der Grundstein für weitergehende Untersuchungen dieses Akute-Phase-Proteins im Kontext von Infektionserkrankungen und nicht infektiösen Entzündungen beim Huhn gelegt werden.

8 SUMMARY

The long pentraxin PTX3 is an inflammatory acute phase protein. Acute phase proteins are proteins with plasma concentration changes of 25% or more following an inflammatory stimulus. In contrast to human and mouse, the acute phase response in birds is poorly understood. The functions of PTX3 are: activation of the complement system, binding to and neutralization of different pathogens and regulation of inflammation. Micro-array based gene expression studies in chickens treated with recombinant IFN- α led to the identification of a strongly induced gene belonging to the pentraxin family. More detailed genomic analysis revealed high homology to the human long pentraxin PTX3, a thus far undescribed protein in birds.

To characterize this protein in more detail, we aligned and compared the amino acid sequences of chPTX3 with the sequences of the protein in other species (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Bos Taurus*, *Sus scrofa*, *Xenopus tropicalis* and *Danio rerio*) and found that the structure of chPTX3 with a long N-terminal domain and a pentraxin-like C-terminal domain, which is characterized by a conserved pentraxin signature, is homologous to the structure of PTX3 in other species. Furthermore, we aligned and compared the amino acid sequence of chPTX3 with the sequence of C-reactive protein from chicken to analyze the differences between short and long pentraxins, which resemble those found in mammals.

To understand the structure of chPTX3, we cloned chicken PTX3 and expressed it as a Flag-tagged protein in HEK-293 cells. Recombinant chicken PTX3 is a 433 amino acid protein which forms approximately 300 kDa multimers under native conditions and runs as a 65 kDa protein under reducing conditions. The protein has two predicted N-glycosylation sites at Asn159 and Asn330. Without these N-glycosylations, the protein has a molecular weight of 61 kDa.

PCR assays showed that PTX3 is expressed in not stimulated lymphoid tissues (except for spleen) and in some non-lymphoid organs as well. In spleen and liver PTX3 is strongly up-regulated in response to LPS-treatment, as was revealed by qRT-PCR. To further investigate PTX3 production during acute phase responses we generated specific antibodies, which render detection of the recombinant protein possible. Two clones, a monoclonal IgG2a and a polyclonal IgM clone, were identified, which strongly bound to PTX3.

9 LITERATURVERZEICHNIS

1. Murata, H., N. Shimada, and M. Yoshioka, *Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview*. Vet J, 2004. **168**(1): p. 28-40.
2. Petersen, H.H., J.P. Nielsen, and P.M. Heegaard, *Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry*. Vet Res, 2004. **35**(2): p. 163-87.
3. Ceron, J.J., P.D. Eckersall, and S. Martynez-Subiela, *Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives*. Vet Clin Pathol, 2005. **34**(2): p. 85-99.
4. Garlanda, C., et al., *Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 337-66.
5. Agrawal, A., *CRP after 2004*. Mol Immunol, 2005. **42**(8): p. 927-30.
6. Volanakis, J.E., *Human C-reactive protein: expression, structure, and function*. Mol Immunol, 2001. **38**(2-3): p. 189-97.
7. Black, S., I. Kushner, and D. Samols, *C-reactive Protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(47): p. 48487-90.
8. Skinner, M. and A.S. Cohen, *Amyloid P component*. Methods Enzymol, 1988. **163**: p. 523-36.
9. Pepys, M.B. and G.M. Hirschfield, *C-reactive protein: a critical update*. Journal of Clinical Investigation, 2003. **111**(12): p. 1805-1812.
10. Tillett, W.S. and T. Francis, *Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus*. J Exp Med, 1930. **52**(4): p. 561-71.
11. Hirschfield, G.M. and M.B. Pepys, *C-reactive protein and cardiovascular disease: new insights from an old molecule*. Qjm, 2003. **96**(11): p. 793-807.
12. Agrawal, A., et al., *Pattern recognition by pentraxins*. Adv Exp Med Biol, 2009. **653**: p. 98-116.
13. Moalli, F., et al., *Pathogen Recognition by the Long Pentraxin PTX3*. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2011. **2011**: p. 830421.
14. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Regulation of adaptive immunity by the innate immune system*. Science (New York, N.Y.), 2010. **327**(5963): p. 291-295.
15. Murphy, J.E., et al., *Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors*.

- Atherosclerosis, 2005. **182**(1): p. 1-15.
16. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
 17. Meylan, E., J. Tschopp, and M. Karin, *Intracellular pattern recognition receptors in the host response*. Nature, 2006. **442**(7098): p. 39-44.
 18. Bottazzi, B., et al., *An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 157-83.
 19. Jaillon, S., et al., *The long pentraxin PTX3 as a key component of humoral innate immunity and a candidate diagnostic for inflammatory diseases*. Int Arch Allergy Immunol, 2014. **165**(3): p. 165-78.
 20. Deban, L., et al., *Pentraxins in innate immunity: lessons from PTX3*. Cell Tissue Res, 2011. **343**(1): p. 237-49.
 21. Abernethy, T.J. and O.T. Avery, *The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood : I. distribution of the reactive protein in patients' sera and the effect of calcium on the flocculation reaction with c polysaccharide of pneumococcus*. J Exp Med, 1941. **73**(2): p. 173-82.
 22. Szalai, A.J., et al., *C-reactive protein: structural biology and host defense function*. Clin Chem Lab Med, 1999. **37**(3): p. 265-70.
 23. Gewurz, H., X.H. Zhang, and T.F. Lint, *Structure and function of the pentraxins*. Curr Opin Immunol, 1995. **7**(1): p. 54-64.
 24. Emsley, J., et al., *Structure of pentameric human serum amyloid P component*. Nature, 1994. **367**(6461): p. 338-45.
 25. Rubio, N., et al., *Structure, expression, and evolution of guinea pig serum amyloid P component and C-reactive protein*. J Biochem, 1993. **113**(3): p. 277-84.
 26. Bottazzi, B., et al., *The long pentraxin PTX3 as a prototypic humoral pattern recognition receptor: interplay with cellular innate immunity*. Immunol Rev, 2009. **227**(1): p. 9-18.
 27. Breviario, F., et al., *Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component*. J Biol Chem, 1992. **267**(31): p. 22190-7.
 28. Lee, G.W., T.H. Lee, and J. Vilcek, *TSG-14, a tumor necrosis factor- and IL-1-inducible protein, is a novel member of the pentaxin family of acute phase proteins*. J Immunol, 1993. **150**(5): p. 1804-12.

29. Reid, M.S. and C.P. Blobel, *Apexin, an acrosomal pentaxin*. J Biol Chem, 1994. **269**(51): p. 32615-20.
30. Omeis, I.A., Y.C. Hsu, and M.S. Perin, *Mouse and human neuronal pentraxin 1 (NPTX1): conservation, genomic structure, and chromosomal localization*. Genomics, 1996. **36**(3): p. 543-5.
31. Hsu, Y.C. and M.S. Perin, *Human neuronal pentraxin II (NPTX2): conservation, genomic structure, and chromosomal localization*. Genomics, 1995. **28**(2): p. 220-7.
32. Dodds, D.C., et al., *Neuronal pentraxin receptor, a novel putative integral membrane pentraxin that interacts with neuronal pentraxin 1 and 2 and taipoxin-associated calcium-binding protein 49*. J Biol Chem, 1997. **272**(34): p. 21488-94.
33. Martinez de la Torre, Y., et al., *Evolution of the pentraxin family: the new entry PTX4*. J Immunol, 2010. **184**(9): p. 5055-64.
34. Goodman, A.R., et al., *Long pentraxins: an emerging group of proteins with diverse functions*. Cytokine & growth factor reviews, 1996. **7**(2): p. 191-202.
35. Basile, A., et al., *Characterization of the promoter for the human long pentraxin PTX3. Role of NF-kappaB in tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta regulation*. J Biol Chem, 1997. **272**(13): p. 8172-8.
36. Altmeyer, A., et al., *Promoter structure and transcriptional activation of the murine TSG-14 gene encoding a tumor necrosis factor/interleukin-1-inducible pentraxin protein*. J Biol Chem, 1995. **270**(43): p. 25584-90.
37. Nauta, A.J., et al., *Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q*. Eur J Immunol, 2003. **33**(2): p. 465-73.
38. A. Abderrahim-Ferkoune, O.B., C. Chiellini et al., *Charakterization of the long pentraxin PTX3 as a TNFalpha-induced secreted protein of adipose cells*. Journal of Lipid Research, 2003. **44**(5): p. 994-1000.
39. Doni, A., et al., *Production of the soluble pattern recognition receptor PTX3 by myeloid, but not plasmacytoid, dendritic cells*. Eur J Immunol, 2003. **33**(10): p. 2886-93.
40. dos Santos, C.C., et al., *DNA microarray analysis of gene expression in alveolar epithelial cells in response to TNFalpha, LPS, and cyclic stretch*. Physiol Genomics, 2004. **19**(3): p. 331-42.
41. Goodman, A.R., et al., *Differential regulation of TSG-14 expression in murine fibroblasts and peritoneal macrophages*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(3): p. 387-95.
42. Han, B., et al., *TNFalpha-induced long pentraxin PTX3 expression in human lung*

- epithelial cells via JNK*. J Immunol, 2005. **175**(12): p. 8303-11.
43. Introna, M., et al., *Cloning of mouse ptx3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites*. Blood, 1996. **87**(5): p. 1862-72.
 44. Nauta, A.J., et al., *Human renal epithelial cells produce the long pentraxin PTX3*. Kidney Int, 2005. **67**(2): p. 543-53.
 45. Jeon, H., et al., *Analysis of glial secretome: the long pentraxin PTX3 modulates phagocytic activity of microglia*. J Neuroimmunol, 2010. **229**(1-2): p. 63-72.
 46. Amatschek, S., et al., *Blood and lymphatic endothelial cell-specific differentiation programs are stringently controlled by the tissue environment*. Blood, 2007. **109**(11): p. 4777-85.
 47. Sironi, M., et al., *Generation and characterization of a mouse lymphatic endothelial cell line*. Cell Tissue Res, 2006. **325**(1): p. 91-100.
 48. Wick, N., et al., *Transcriptomal comparison of human dermal lymphatic endothelial cells ex vivo and in vitro*. Physiol Genomics, 2007. **28**(2): p. 179-92.
 49. Alles, V.V., et al., *Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes*. Blood, 1994. **84**(10): p. 3483-93.
 50. Jaillon, S., et al., *The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps*. The Journal of Experimental Medicine, 2007. **204**(4): p. 793-804.
 51. Maina, V., et al., *Coregulation in human leukocytes of the long pentraxin PTX3 and TSG-6*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(1): p. 123-32.
 52. Savchenko, A., et al., *Expression of pentraxin 3 (PTX3) in human atherosclerotic lesions*. J Pathol, 2008. **215**(1): p. 48-55.
 53. Klouche, M., et al., *Human herpesvirus 8-derived viral IL-6 induces PTX3 expression in Kaposi's sarcoma cells*. Aids, 2002. **16**(8): p. F9-18.
 54. Malaguarnera, L., et al., *PTX3 gene expression in Castleman's disease*. Eur J Haematol, 2000. **64**(2): p. 132-4.
 55. Doni, A., et al., *Regulation of PTX3, a key component of humoral innate immunity in human dendritic cells: stimulation by IL-10 and inhibition by IFN-gamma*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(4): p. 797-802.
 56. Salio, M., et al., *Cardioprotective function of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction*. Circulation, 2008. **117**(8): p. 1055-64.

57. Norata, G.D., et al., *Long pentraxin 3, a key component of innate immunity, is modulated by high-density lipoproteins in endothelial cells.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(5): p. 925-31.
58. Doni, A., et al., *Cell-specific regulation of PTX3 by glucocorticoid hormones in hematopoietic and nonhematopoietic cells.* J Biol Chem, 2008. **283**(44): p. 29983-92.
59. Jaillon, S., et al., *The humoral pattern recognition molecule PTX3 is a key component of innate immunity against urinary tract infection.* Immunity, 2014. **40**(4): p. 621-32.
60. Jaillon, S., et al., *Prototypic long pentraxin PTX3 is present in breast milk, spreads in tissues, and protects neonate mice from Pseudomonas aeruginosa lung infection.* J Immunol, 2013. **191**(4): p. 1873-82.
61. Bottazzi, B., et al., *Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component.* J Biol Chem, 1997. **272**(52): p. 32817-23.
62. Presta, M., et al., *Role of the soluble pattern recognition receptor PTX3 in vascular biology.* J Cell Mol Med, 2007. **11**(4): p. 723-38.
63. Inforzato, A., et al., *The angiogenic inhibitor long pentraxin PTX3 forms an asymmetric octamer with two binding sites for FGF2.* J Biol Chem, 2010. **285**(23): p. 17681-92.
64. Bottazzi, B., et al., *The long pentraxin PTX3 as a link among innate immunity, inflammation, and female fertility.* J Leukoc Biol, 2006. **79**(5): p. 909-12.
65. Camozzi, M., et al., *Identification of an Antiangiogenic FGF2-binding Site in the N Terminus of the Soluble Pattern Recognition Receptor PTX3.* Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(32): p. 22605-22613.
66. Scarchilli, L., et al., *PTX3 interacts with inter-alpha-trypsin inhibitor: implications for hyaluronan organization and cumulus oophorus expansion.* J Biol Chem, 2007. **282**(41): p. 30161-70.
67. Moalli, F., et al., *Role of complement and Fc{gamma} receptors in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against Aspergillus fumigatus.* Blood, 2010. **116**(24): p. 5170-80.
68. Deban, L., et al., *Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3.* Nat Immunol, 2010. **11**(4): p. 328-34.
69. Deban, L., et al., *Binding of the long pentraxin PTX3 to factor H: interacting domains and function in the regulation of complement activation.* J Immunol, 2008. **181**(12): p. 8433-40.
70. Inforzato, A., et al., *Structure and function of the long pentraxin PTX3 glycosidic*

- moiety: fine-tuning of the interaction with C1q and complement activation.* Biochemistry, 2006. **45**(38): p. 11540-51.
71. Inforzato, A., et al., *Structural characterization of PTX3 disulfide bond network and its multimeric status in cumulus matrix organization.* J Biol Chem, 2008. **283**(15): p. 10147-61.
 72. Inforzato, A., et al., *The "sweet" side of a long pentraxin: how glycosylation affects PTX3 functions in innate immunity and inflammation.* Front Immunol, 2012. **3**: p. 407.
 73. Braunschweig, A. and M. Jozsi, *Human pentraxin 3 binds to the complement regulator c4b-binding protein.* PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23991.
 74. Gout, E., et al., *M-ficolin interacts with the long pentraxin PTX3: a novel case of cross-talk between soluble pattern-recognition molecules.* J Immunol, 2011. **186**(10): p. 5815-22.
 75. Ma, Y.J., et al., *Heterocomplexes of mannose-binding lectin and the pentraxins PTX3 or serum amyloid P component trigger cross-activation of the complement system.* J Biol Chem, 2011. **286**(5): p. 3405-17.
 76. Ma, Y.J., et al., *Synergy between ficolin-2 and pentraxin 3 boosts innate immune recognition and complement deposition.* J Biol Chem, 2009. **284**(41): p. 28263-75.
 77. Lu, J., et al., *Structural recognition and functional activation of FcγR by innate pentraxins.* Nature, 2008. **456**(7224): p. 989-92.
 78. Ma, Y.J., et al., *Ficolin-1-PTX3 complex formation promotes clearance of altered self-cells and modulates IL-8 production.* J Immunol, 2013. **191**(3): p. 1324-33.
 79. Diniz, S.N., et al., *PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages.* J Leukoc Biol, 2004. **75**(4): p. 649-56.
 80. Moalli, F., et al., *The therapeutic potential of the humoral pattern recognition molecule PTX3 in chronic lung infection caused by Pseudomonas aeruginosa.* J Immunol, 2011. **186**(9): p. 5425-34.
 81. Garlanda, C., et al., *Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response.* Nature, 2002. **420**(6912): p. 182-6.
 82. Jeannin, P., et al., *Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors.* Immunity, 2005. **22**(5): p. 551-60.
 83. Bozza, S., et al., *Pentraxin 3 protects from MCMV infection and reactivation through TLR sensing pathways leading to IRF3 activation.* Blood, 2006. **108**(10): p. 3387-96.

84. Reading, P.C., et al., *Antiviral activity of the long chain pentraxin PTX3 against influenza viruses*. J Immunol, 2008. **180**(5): p. 3391-8.
85. Gaziano, R., et al., *Anti-Aspergillus fumigatus efficacy of pentraxin 3 alone and in combination with antifungals*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(11): p. 4414-21.
86. D'Angelo, C., et al., *Exogenous pentraxin 3 restores antifungal resistance and restrains inflammation in murine chronic granulomatous disease*. J Immunol, 2009. **183**(7): p. 4609-18.
87. Cotena, A., et al., *Complement dependent amplification of the innate response to a cognate microbial ligand by the long pentraxin PTX3*. J Immunol, 2007. **179**(9): p. 6311-7.
88. Soares, A.C., et al., *Dual function of the long pentraxin PTX3 in resistance against pulmonary infection with Klebsiella pneumoniae in transgenic mice*. Microbes Infect, 2006. **8**(5): p. 1321-9.
89. Job, E.R., et al., *Pandemic H1N1 influenza A viruses are resistant to the antiviral activities of innate immune proteins of the collectin and pentraxin superfamilies*. J Immunol, 2010. **185**(7): p. 4284-91.
90. Job, E.R., et al., *A single amino acid substitution in the hemagglutinin of H3N2 subtype influenza A viruses is associated with resistance to the long pentraxin PTX3 and enhanced virulence in mice*. J Immunol, 2014. **192**(1): p. 271-81.
91. Chiarini, M., et al., *PTX3 genetic variations affect the risk of Pseudomonas aeruginosa airway colonization in cystic fibrosis patients*. Genes and Immunity, 2010. **11**(8): p. 665-670.
92. Olesen, R., et al., *DC-SIGN (CD209), pentraxin 3 and vitamin D receptor gene variants associate with pulmonary tuberculosis risk in West Africans*. Genes Immun, 2007. **8**(6): p. 456-67.
93. Cunha, C., et al., *Genetic PTX3 Deficiency and Aspergillosis in Stem-Cell Transplantation*. New England Journal of Medicine, 2014. **370**(5): p. 421-432.
94. Lech, M., et al., *Endogenous and exogenous pentraxin-3 limits postischemic acute and chronic kidney injury*. Kidney Int, 2013. **83**(4): p. 647-61.
95. Han, B., et al., *Long pentraxin PTX3 deficiency worsens LPS-induced acute lung injury*. Intensive Care Med, 2011. **37**(2): p. 334-42.
96. Xiao, Y., et al., *Pentraxin 3 Inhibits Acute Renal Injury-Induced Interstitial Fibrosis Through Suppression of IL-6/Stat3 Pathway*. Inflammation, 2014. **37**(5): p. 1895-1901.
97. Mantovani, A., et al., *The long pentraxin PTX3: a paradigm for humoral pattern*

- recognition molecules*. Ann N Y Acad Sci, 2013. **1285**: p. 1-14.
98. Norata, G.D., et al., *Deficiency of the long pentraxin PTX3 promotes vascular inflammation and atherosclerosis*. Circulation, 2009. **120**(8): p. 699-708.
 99. Souza, D.G., et al., *The Long Pentraxin PTX3 Is Crucial for Tissue Inflammation after Intestinal Ischemia and Reperfusion in Mice*. The American Journal of Pathology, 2009. **174**(4): p. 1309-1318.
 100. Rusnati, M., et al., *Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis*. Blood, 2004. **104**(1): p. 92-9.
 101. Basile, A., et al., *Pentraxin 3 (PTX3) inhibits plasma cell/stromal cell cross-talk in the bone marrow of multiple myeloma patients*. J Pathol, 2013. **229**(1): p. 87-98.
 102. Camozzi, M., et al., *Pentraxin 3 inhibits fibroblast growth factor 2-dependent activation of smooth muscle cells in vitro and neointima formation in vivo*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(9): p. 1837-42.
 103. Leali, D., et al., *Long pentraxin-3 inhibits FGF8b-dependent angiogenesis and growth of steroid hormone-regulated tumors*. Mol Cancer Ther, 2011. **10**(9): p. 1600-10.
 104. Ronca, R., et al., *Long pentraxin-3 as an epithelial-stromal fibroblast growth factor-targeting inhibitor in prostate cancer*. J Pathol, 2013. **230**(2): p. 228-38.
 105. Ronca, R., et al., *Long pentraxin-3 inhibits epithelial-mesenchymal transition in melanoma cells*. Mol Cancer Ther, 2013. **12**(12): p. 2760-71.
 106. Salustri, A., et al., *PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization*. Development, 2004. **131**(7): p. 1577-1586.
 107. Zhang, S., et al., *Constitutive expression of pentraxin 3 (PTX3) protein by human amniotic membrane cells leads to formation of the heavy chain (HC)-hyaluronan (HA)-PTX3 complex*. J Biol Chem, 2014. **289**(19): p. 13531-42.
 108. Jeannin, P., S. Jaillon, and Y. Delneste, *Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(5): p. 530-7.
 109. Gershov, D., et al., *C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity*. J Exp Med, 2000. **192**(9): p. 1353-64.
 110. van Rossum, A.P., et al., *The prototypic tissue pentraxin PTX3, in contrast to the short pentraxin serum amyloid P, inhibits phagocytosis of late apoptotic neutrophils by macrophages*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(8): p. 2667-74.

111. Rovere, P., et al., *The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells*. Blood, 2000. **96**(13): p. 4300-6.
112. Baruah, P., et al., *The tissue pentraxin PTX3 limits C1q-mediated complement activation and phagocytosis of apoptotic cells by dendritic cells*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(1): p. 87-95.
113. Trouw, L.A., et al., *C4b-binding protein and factor H compensate for the loss of membrane-bound complement inhibitors to protect apoptotic cells against excessive complement attack*. J Biol Chem, 2007. **282**(39): p. 28540-8.
114. Jaillon, S., et al., *Endogenous PTX3 translocates at the membrane of late apoptotic human neutrophils and is involved in their engulfment by macrophages*. Cell Death Differ, 2009. **16**(3): p. 465-74.
115. Guo, T., et al., *PTX3 is located at the membrane of late apoptotic macrophages and mediates the phagocytosis of macrophages*. J Clin Immunol, 2012. **32**(2): p. 330-9.
116. Lech, M., et al., *Lack of the long pentraxin PTX3 promotes autoimmune lung disease but not glomerulonephritis in murine systemic lupus erythematosus*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e20118.
117. Mauri, T., et al., *Persisting high levels of plasma pentraxin 3 over the first days after severe sepsis and septic shock onset are associated with mortality*. Intensive Care Med, 2010. **36**(4): p. 621-9.
118. Fazzini, F., et al., *PTX3 in small-vessel vasculitides: an independent indicator of disease activity produced at sites of inflammation*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(12): p. 2841-50.
119. Mauri, T., et al., *Pentraxin 3 in acute respiratory distress syndrome: an early marker of severity*. Crit Care Med, 2008. **36**(8): p. 2302-8.
120. Biagi, E., et al., *PTX3 as a potential novel tool for the diagnosis and monitoring of pulmonary fungal infections in immuno-compromised pediatric patients*. J Pediatr Hematol Oncol, 2008. **30**(12): p. 881-5.
121. Sprong, T., et al., *Pentraxin 3 and C-reactive protein in severe meningococcal disease*. Shock, 2009. **31**(1): p. 28-32.
122. Mairuhu, A.T., et al., *Elevated plasma levels of the long pentraxin, pentraxin 3, in severe dengue virus infections*. J Med Virol, 2005. **76**(4): p. 547-52.
123. Azzurri, A., et al., *IFN-gamma-inducible protein 10 and pentraxin 3 plasma levels are tools for monitoring inflammation and disease activity in Mycobacterium tuberculosis infection*. Microbes Infect, 2005. **7**(1): p. 1-8.
124. Wagenaar, J.F., et al., *Long pentraxin PTX3 is associated with mortality and disease*

- severity in severe Leptospirosis. J Infect, 2009. 58(6): p. 425-32.*
125. Hamon, Y., et al., *Proteolytic cleavage of the long pentraxin PTX3 in the airways of cystic fibrosis patients. Innate Immun, 2013. 19(6): p. 611-22.*
 126. Bastrup-Birk, S., et al., *Pentraxin-3 serum levels are associated with disease severity and mortality in patients with systemic inflammatory response syndrome. PLoS One, 2013. 8(9): p. e73119.*
 127. Muller, B., et al., *Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients. Crit Care Med, 2001. 29(7): p. 1404-7.*
 128. Uusitalo-Seppälä, R., et al., *Pentraxin 3 (PTX3) Is Associated with Severe Sepsis and Fatal Disease in Emergency Room Patients with Suspected Infection: A Prospective Cohort Study. PLoS ONE, 2013. 8(1): p. e53661.*
 129. Zanetti, M., et al., *Circulating pentraxin 3 levels are higher in metabolic syndrome with subclinical atherosclerosis: evidence for association with atherogenic lipid profile. Clin Exp Med, 2009. 9(3): p. 243-8.*
 130. Peri, G., et al., *PTX3, A prototypical long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans. Circulation, 2000. 102(6): p. 636-41.*
 131. Jylhava, J., et al., *Pentraxin 3 (PTX3) is associated with cardiovascular risk factors: the Health 2000 Survey. Clin Exp Immunol, 2011. 164(2): p. 211-7.*
 132. Latini, R., et al., *Prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. Circulation, 2004. 110(16): p. 2349-54.*
 133. Jenny, N.S., et al., *Associations of pentraxin 3 with cardiovascular disease and all-cause death: the Cardiovascular Health Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. 29(4): p. 594-9.*
 134. Ferratini, M., et al., *Pentraxin-3 predicts functional recovery and 1-year major adverse cardiovascular events after rehabilitation of cardiac surgery patients. J Cardiopulm Rehabil Prev, 2012. 32(1): p. 17-24.*
 135. Inoue, K., et al., *Establishment of a high sensitivity plasma assay for human pentraxin3 as a marker for unstable angina pectoris. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. 27(1): p. 161-7.*
 136. Matsui, S., et al., *Pentraxin 3 in unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction. Atherosclerosis, 2010. 210(1): p. 220-5.*
 137. Naito, Y., et al., *Increase in tissue and circulating pentraxin3 levels in patients with aortic valve stenosis. Am Heart J, 2010. 160(4): p. 685-91.*

138. Kotooka, N., et al., *Pentraxin3 is a novel marker for stent-induced inflammation and neointimal thickening*. *Atherosclerosis*, 2008. **197**(1): p. 368-74.
139. Cetin, I., et al., *Elevated maternal levels of the long pentraxin 3 (PTX3) in preeclampsia and intrauterine growth restriction*. *Am J Obstet Gynecol*, 2006. **194**(5): p. 1347-53.
140. Rovere-Querini, P., et al., *Plasma and tissue expression of the long pentraxin 3 during normal pregnancy and preeclampsia*. *Obstet Gynecol*, 2006. **108**(1): p. 148-55.
141. Cozzi, V., et al., *PTX3 as a potential endothelial dysfunction biomarker for severity of preeclampsia and IUGR*. *Placenta*, 2012. **33**(12): p. 1039-44.
142. Assi, F., et al., *Pentraxin 3 in plasma and vaginal fluid in women with preterm delivery*. *Bjog*, 2007. **114**(2): p. 143-7.
143. Cruciani, L., et al., *Pentraxin 3 in maternal circulation: an association with preterm labor and preterm PROM, but not with intra-amniotic infection/inflammation*. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2010. **23**(10): p. 1097-105.
144. Kacerovsky, M., et al., *Pentraxin 3 in amniotic fluid as a marker of intra-amniotic inflammation in women with preterm premature rupture of membranes*. *Int J Gynaecol Obstet*, 2010. **108**(3): p. 203-6.
145. Martin, L.F., et al., *Pentraxin-3 concentration in the amniotic fluid of women at term, in spontaneous preterm labor and when not in labor*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2014. **176**: p. 86-9.
146. Cruciani, L., et al., *Pentraxin 3 in amniotic fluid: a novel association with intra-amniotic infection and inflammation*. *J Perinat Med*, 2010. **38**(2): p. 161-71.
147. Luchetti, M.M., et al., *Expression and production of the long pentraxin PTX3 in rheumatoid arthritis (RA)*. *Clin Exp Immunol*, 2000. **119**(1): p. 196-202.
148. Augusto, J.F., et al., *Detection of anti-PTX3 autoantibodies in systemic lupus erythematosus*. *Rheumatology (Oxford)*, 2009. **48**(4): p. 442-4.
149. Bassi, N., et al., *IgG anti-pentraxin 3 antibodies in systemic lupus erythematosus*. *Ann Rheum Dis*, 2010. **69**(9): p. 1704-10.
150. Planque, C., et al., *Identification of Five Candidate Lung Cancer Biomarkers by Proteomics Analysis of Conditioned Media of Four Lung Cancer Cell Lines*. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 2009. **8**(12): p. 2746-2758.
151. Barbui, T., et al., *Inflammation and thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: different role of C-reactive protein and pentraxin 3*. *Haematologica*, 2011. **96**(2): p. 315-318.

152. Locatelli, M., et al., *The long pentraxin PTX3 as a correlate of cancer-related inflammation and prognosis of malignancy in gliomas*. J Neuroimmunol, 2013. **260**(1-2): p. 99-106.
153. Tothill, R.W., et al., *Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(16): p. 5198-208.
154. Germano, G., et al., *Antitumor and anti-inflammatory effects of trabectedin on human myxoid liposarcoma cells*. Cancer Res, 2010. **70**(6): p. 2235-44.
155. Ravenna, L., et al., *Up-regulation of the inflammatory-reparative phenotype in human prostate carcinoma*. Prostate, 2009. **69**(11): p. 1245-55.
156. Wang, J.X., et al., *Aberrant methylation of the 3q25 tumor suppressor gene PTX3 in human esophageal squamous cell carcinoma*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(37): p. 4225-30.
157. Eckersall, P.D. and R. Bell, *Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine*. Vet J, 2010. **185**(1): p. 23-7.
158. Gabay, C. and I. Kushner, *Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation*. N Engl J Med, 1999. **340**(6): p. 448-54.
159. Gruys E., T.M.J.M., Landman W.J.M., Tivapasi M., Chamanza R., van Veen L., *Infection, inflammation and stress inhibit growth. Mechanisms and non-specific assessment of the processes by acute phase proteins.*, in *Production Diseases in Farm Animals*
W. T., Editor. 1999, Wageningen Press: The Netherlands. p. pp. 72-87.
160. Murtaugh, M.P., et al., *Inflammatory cytokines in animal health and disease*. Vet Immunol Immunopathol, 1996. **54**(1-4): p. 45-55.
161. Webel, D.M., et al., *Time course of increased plasma cytokines, cortisol, and urea nitrogen in pigs following intraperitoneal injection of lipopolysaccharide*. J Anim Sci, 1997. **75**(6): p. 1514-20.
162. Shank, R.E., *C-Reactive Protein and the Plasma Protein Response to Tissue Injury*. Edited by Irving Kushner, John E. Volankis, and Henry Gewur. Hepatology, 1982. **3**(1.): p. 482 pp.
163. Kushner, I. and A. Mackiewicz, *Acute phase proteins as disease markers*. Dis Markers, 1987. **5**(1): p. 1-11.
164. Steel, D.M. and A.S. Whitehead, *The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein*. Immunol Today, 1994. **15**(2): p. 81-8.

165. Fournier, T., N.N. Medjoubi, and D. Porquet, *Alpha-1-acid glycoprotein*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1482**(1-2): p. 157-71.
166. Moore, D.F., et al., *Alpha-1-acid (AAG, orosomucoid) glycoprotein: interaction with bacterial lipopolysaccharide and protection from sepsis*. *Inflammation*, 1997. **21**(1): p. 69-82.
167. Itoh, H., Motoi, Y., Tamura, K., Murata, H., Chiba, T., Takeda, S., , *Serum alpha 1-acid glycoprotein in bovine leukosis and its effects on blastogenesis of lymphocytes*. *Journal of the Japanese Veterinary Medical Association* 42, 1989: p. 39-43.
168. Okumura, Y., et al., *Influence of acute-phase proteins on the activity of natural killer cells*. *Inflammation*, 1985. **9**(2): p. 211-9.
169. Conner, J.G., et al., *Bovine acute phase response following turpentine injection*. *Res Vet Sci*, 1988. **44**(1): p. 82-8.
170. Conner, J.G., et al., *Acute phase response in calves following infection with Pasteurella haemolytica, Ostertagia ostertagi and endotoxin administration*. *Res Vet Sci*, 1989. **47**(2): p. 203-7.
171. Tamura, K., et al., *Isolation, characterization, and quantitative measurement of serum alpha 1-acid glycoprotein in cattle*. *Nihon Juigaku Zasshi*, 1989. **51**(5): p. 987-94.
172. Itoh, H., et al., *Serum alpha 1-acid glycoprotein in cattle with inflammatory disease and that after operation*. *Nihon Juigaku Zasshi*, 1990. **52**(6): p. 1293-6.
173. Motoi, Y., et al., *Correlation of serum concentration of alpha 1-acid glycoprotein with lymphocyte blastogenesis and development of experimentally induced or naturally acquired hepatic abscesses in cattle*. *Am J Vet Res*, 1992. **53**(4): p. 574-9.
174. Sato, S., T. Suzuki, and K. Okada, *Suppression of lymphocyte blastogenesis in cows with puerperal metritis and mastitis*. *J Vet Med Sci*, 1995. **57**(2): p. 373-5.
175. Hirvonen, J., et al., *Acute-phase response in dairy cows with acute postpartum metritis*. *Theriogenology*, 1999. **51**(6): p. 1071-83.
176. Eckersall, P.D., et al., *Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis*. *Vet Rec*, 2001. **148**(2): p. 35-41.
177. Ohtsuka, H., et al., *Acute phase response in naturally occurring coliform mastitis*. *J Vet Med Sci*, 2001. **63**(6): p. 675-8.
178. Sheldon, I.M., et al., *Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving*. *Vet Rec*, 2001. **148**(6): p. 172-5.
179. Carter, J.N., et al., *Relationship of vitamin E supplementation and antimicrobial*

- treatment with acute-phase protein responses in cattle affected by naturally acquired respiratory tract disease. Am J Vet Res, 2002. 63(8): p. 1111-7.*
180. Itoh, H., et al., *The influence of age and health status on the serum alpha 1-acid glycoprotein level of conventional and specific pathogen-free pigs. Canadian Journal of Veterinary Research, 1993. 57(2): p. 74-78.*
181. Yamashita, K., et al., *Canine acute phase response: relationship between serum cytokine activity and acute phase protein in dogs. J Vet Med Sci, 1994. 56(3): p. 487-92.*
182. Sevelius, E. and M. Andersson, *Serum protein electrophoresis as a prognostic marker of chronic liver disease in dogs. Vet Rec, 1995. 137(26): p. 663-7.*
183. Duthie, S., et al., *Value of alpha 1-acid glycoprotein in the diagnosis of feline infectious peritonitis. Vet Rec, 1997. 141(12): p. 299-303.*
184. Patel, B.N., et al., *Ceruloplasmin regulates iron levels in the CNS and prevents free radical injury. J Neurosci, 2002. 22(15): p. 6578-86.*
185. Inoue, K., et al., *Nitrosothiol formation catalyzed by ceruloplasmin. Implication for cytoprotective mechanism in vivo. J Biol Chem, 1999. 274(38): p. 27069-75.*
186. Pan, Y., K. Katula, and M.L. Failla, *Expression of ceruloplasmin gene in human and rat lymphocytes. Biochim Biophys Acta, 1996. 1307(2): p. 233-8.*
187. Mazumder, B., et al., *Induction of ceruloplasmin synthesis by IFN-gamma in human monocytic cells. J Immunol, 1997. 159(4): p. 1938-44.*
188. Yang, F., et al., *Cellular expression of ceruloplasmin in baboon and mouse lung during development and inflammation. Am J Respir Cell Mol Biol, 1996. 14(2): p. 161-9.*
189. Broadley, C. and R.L. Hoover, *Ceruloplasmin reduces the adhesion and scavenges superoxide during the interaction of activated polymorphonuclear leukocytes with endothelial cells. Am J Pathol, 1989. 135(4): p. 647-55.*
190. Segelmark, M., et al., *Binding and inhibition of myeloperoxidase (MPO): a major function of ceruloplasmin? Clin Exp Immunol, 1997. 108(1): p. 167-74.*
191. Conner, J.G., et al., *Acute phase response and mastitis in the cow. Res Vet Sci, 1986. 41(1): p. 126-8.*
192. Chassagne, M., J. Barnouin, and J.P. Chacornac, *Biological predictors for early clinical mastitis occurrence in Holstein cows under field conditions in France. Preventive Veterinary Medicine, 1998. 35(1): p. 29-38.*
193. Barton, M.D. and D.H. Embury, *Studies of the pathogenesis of Rhodococcus equi*

- infection in foals*. Aust Vet J, 1987. **64**(11): p. 332-9.
194. Auer, D.E., et al., *Acute phase response in horses: changes in plasma cation concentrations after localised tissue injury*. Vet Rec, 1989. **124**(10): p. 235-9.
195. Fagliari, J.J., et al., *Changes in plasma protein concentrations in ponies with experimentally induced alimentary laminitis*. Am J Vet Res, 1998. **59**(10): p. 1234-7.
196. Conner, J.G., et al., *Acute phase response in the dog following surgical trauma*. Res Vet Sci, 1988. **45**(1): p. 107-10.
197. Okumura, M., et al., *Isolation, characterization, and quantitative analysis of ceruloplasmin from horses*. Am J Vet Res, 1991. **52**(12): p. 1979-85.
198. Vannucchi, C.I., R.M. Mirandola, and C.M. Oliveira, *Acute-phase protein profile during gestation and diestrus: proposal for an early pregnancy test in bitches*. Anim Reprod Sci, 2002. **74**(1-2): p. 87-99.
199. Mold, C., et al., *C-reactive protein mediates protection from lipopolysaccharide through interactions with Fc gamma R*. J Immunol, 2002. **169**(12): p. 7019-25.
200. Du Clos, T.W. and C. Mold, *The role of C-reactive protein in the resolution of bacterial infection*. Current Opinion in Infectious Diseases, 2001. **14**(3): p. 289-293.
201. Mortensen, R.F. and W. Zhong, *Regulation of phagocytic leukocyte activities by C-reactive protein*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(4): p. 495-500.
202. Maudsley, S., et al., *Isolation and characterisation of goat C-reactive protein*. Biochim Biophys Acta, 1987. **924**(1): p. 75-80.
203. Morimatsu, M., et al., *Isolation and characterization of C-reactive protein and serum amyloid P component from bovine serum*. Nihon Juigaku Zasshi, 1989. **51**(4): p. 723-32.
204. Takiguchi, M., et al., *Isolation, characterization, and quantitative analysis of C-reactive protein from horses*. Am J Vet Res, 1990. **51**(8): p. 1215-20.
205. Burger, W., et al., *C-reactive protein--a characteristic feature of health control in swine*. Zentralbl Veterinarmed A, 1992. **39**(8): p. 635-8.
206. Caspi, D., et al., *C-reactive protein in dogs*. Am J Vet Res, 1987. **48**(6): p. 919-21.
207. Watanabe, A., et al., *Isolation of C-reactive protein from cat serum*. Journal of Small Animal Practice, 1992. **33**(2): p. 71-77.
208. Morimatsu, M., et al., *Elevation of bovine serum C-reactive protein and serum amyloid P component levels by lactation*. J Dairy Res, 1991. **58**(3): p. 257-61.

209. Yamashita, K., et al., *Serum C-reactive protein (CRP) in horses: the effect of aging, sex, delivery and inflammations on its concentration*. J Vet Med Sci, 1991. **53**(6): p. 1019-24.
210. Eckersall, P.D., P.K. Saini, and C. McComb, *The acute phase response of acid soluble glycoprotein, α 1-acid glycoprotein, ceruloplasmin, haptoglobin and C-reactive protein, in the pig*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1996. **51**(3): p. 377-385.
211. Burger, W., C. Ewald, and E.M. Fennert, *Increase in C-reactive protein in the serum of piglets (pCRP) following ACTH or corticosteroid administration*. Zentralbl Veterinarmed B, 1998. **45**(1): p. 1-6.
212. Eckersall, P.D., *Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals*. Revue de Medicine Veterinaire, 2000. **151**: p. 577-584.
213. Yamamoto, S., et al., *Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas*. Vet Res Commun, 1993. **17**(2): p. 85-93.
214. Burton, S.A., et al., *C-reactive protein concentration in dogs with inflammatory leukograms*. Am J Vet Res, 1994. **55**(5): p. 613-8.
215. Yamamoto, S., et al., *Serum C-reactive protein and immune responses in dogs inoculated with Bordetella bronchiseptica (phase I cells)*. Vet Res Commun, 1994. **18**(5): p. 347-57.
216. Otabe, K., et al., *C-reactive protein (CRP) measurement in canine serum following experimentally-induced acute gastric mucosal injury*. Lab Anim, 2000. **34**(4): p. 434-8.
217. Wagener, F.A., et al., *Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase*. Blood, 2001. **98**(6): p. 1802-11.
218. Yang, F., et al., *Haptoglobin reduces lung injury associated with exposure to blood*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. **284**(2): p. L402-9.
219. Schaer, D.J., et al., *Induction of the CD163-dependent haemoglobin uptake by macrophages as a novel anti-inflammatory action of glucocorticoids*. Br J Haematol, 2002. **119**(1): p. 239-43.
220. El Ghmati, S.M., et al., *Identification of haptoglobin as an alternative ligand for CD11b/CD18*. J Immunol, 1996. **156**(7): p. 2542-52.
221. Rossbacher, J., L. Wagner, and M.S. Pasternack, *Inhibitory effect of haptoglobin on granulocyte chemotaxis, phagocytosis and bactericidal activity*. Scand J Immunol, 1999. **50**(4): p. 399-404.
222. El-Ghmati, S.M., et al., *Haptoglobin interacts with the human mast cell line HMC-1*

- and inhibits its spontaneous proliferation. Scand J Immunol, 2002. 55(4): p. 352-8.*
223. Xie, Y., et al., *Haptoglobin is a natural regulator of Langerhans cell function in the skin. J Dermatol Sci, 2000. 24(1): p. 25-37.*
224. Baseler, M.W. and R. Burrell, *Purification of haptoglobin and its effects on lymphocyte and alveolar macrophage responses. Inflammation, 1983. 7(4): p. 387-400.*
225. Murata, H. and T. Miyamoto, *Bovine haptoglobin as a possible immunomodulator in the sera of transported calves. Br Vet J, 1993. 149(3): p. 277-83.*
226. Arredouani, M., et al., *Haptoglobin directly affects T cells and suppresses T helper cell type 2 cytokine release. Immunology, 2003. 108(2): p. 144-51.*
227. Makimura, S. and N. Suzuki, *Quantitative determination of bovine serum Haptoglobin and its elevation in some inflammatory diseases. Nihon Juigaku Zasshi, 1982. 44(1): p. 15-21.*
228. Makimura, S. and M. Usui, *Correlation between haptoglobin and sialic acid or mucoprotein in diseased bovine serum. Nihon Juigaku Zasshi, 1990. 52(6): p. 1245-50.*
229. Skinner, J.G., R.A. Brown, and L. Roberts, *Bovine haptoglobin response in clinically defined field conditions. Vet Rec, 1991. 128(7): p. 147-9.*
230. Morimatsu, M., et al., *Bovine haptoglobin: single radial immunodiffusion assay of its polymeric forms and dramatic rise in acute-phase sera. Vet Immunol Immunopathol, 1992. 33(4): p. 365-72.*
231. Höfner, M.C., et al., *Haptoglobin response of cattle infected with foot-and-mouth disease virus. Research in Veterinary Science, 1994. 57(1): p. 125-128.*
232. Horadagoda, A., et al., *Immediate responses in serum TNF alpha and acute phase protein concentrations to infection with Pasteurella haemolytica A1 in calves. Res Vet Sci, 1994. 57(1): p. 129-32.*
233. Young, C.R., et al., *Validation of immunoassays for bovine haptoglobin. Vet Immunol Immunopathol, 1995. 49(1-2): p. 1-13.*
234. Godson, D.L., et al., *Serum haptoglobin as an indicator of the acute phase response in bovine respiratory disease. Vet Immunol Immunopathol, 1996. 51(3-4): p. 277-92.*
235. Hirvonen, J., S. Pyorala, and H. Jousimies-Somer, *Acute phase response in heifers with experimentally induced mastitis. J Dairy Res, 1996. 63(3): p. 351-60.*
236. Salonen, M., et al., *Quantitative determination of bovine serum haptoglobin in experimentally induced Escherichia coli mastitis. Res Vet Sci, 1996. 60(1): p. 88-91.*

237. Wittum, T.E., et al., *Haptoglobin response to clinical respiratory tract disease in feedlot cattle*. Am J Vet Res, 1996. **57**(5): p. 646-9.
238. Hirvonen, J. and S. Pyorala, *Acute-phase response in dairy cows with surgically-treated abdominal disorders*. Vet J, 1998. **155**(1): p. 53-61.
239. Hirvonen, J., et al., *Acute phase response in dairy cows with experimentally induced Escherichia coli mastitis*. Acta Vet Scand, 1999. **40**(1): p. 35-46.
240. Deignan, T., et al., *Serum haptoglobin: an objective indicator of experimentally-induced Salmonella infection in calves*. Res Vet Sci, 2000. **69**(2): p. 153-8.
241. Heegaard, P.M., et al., *The acute phase response of haptoglobin and serum amyloid A (SAA) in cattle undergoing experimental infection with bovine respiratory syncytial virus*. Vet Immunol Immunopathol, 2000. **77**(1-2): p. 151-9.
242. Smith, B.I., et al., *Serum haptoglobin concentrations in Holstein dairy cattle with toxic puerperal metritis*. Vet Rec, 1998. **142**(4): p. 83-5.
243. Earley, B. and M.A. Crowe, *Effects of ketoprofen alone or in combination with local anesthesia during the castration of bull calves on plasma cortisol, immunological, and inflammatory responses*. J Anim Sci, 2002. **80**(4): p. 1044-52.
244. Eicher, S.D., et al., *Tail-docking influences on behavioral, immunological, and endocrine responses in dairy heifers*. J Dairy Sci, 2000. **83**(7): p. 1456-62.
245. Fisher, A.D., et al., *Effects of surgical or banding castration on stress responses and behaviour of bulls*. Aust Vet J, 2001. **79**(4): p. 279-84.
246. Yoshino, K., et al., *Purification of a protein from serum of cattle with hepatic lipidosis, and identification of the protein as haptoglobin*. Am J Vet Res, 1992. **53**(6): p. 951-6.
247. Nakagawa, H., et al., *Detection of serum haptoglobin by enzyme-linked immunosorbent assay in cows with fatty liver*. Res Vet Sci, 1997. **62**(2): p. 137-41.
248. Yamamot, M., et al., *Increased serum concentration of apolipoprotein C-III and its greater distribution to chylomicrons than to the high-density lipoprotein fraction in a calf with hyperlipidemia*. J Vet Med Sci, 2000. **62**(10): p. 1033-9.
249. Oikawa, S. and N. Katoh, *Decreases in serum apolipoprotein B-100 and A-I concentrations in cows with milk fever and downer cows*. Canadian Journal of Veterinary Research, 2002. **66**(1): p. 31-34.
250. Yoshino, K., et al., *Possible involvement of protein kinase C with induction of haptoglobin in cows by treatment with dexamethasone and by starvation*. Am J Vet Res, 1993. **54**(5): p. 689-94.

251. Uchida, E., N. Katoh, and K. Takahashi, *Appearance of haptoglobin in serum from cows at parturition*. J Vet Med Sci, 1993. **55**(5): p. 893-4.
252. Pfeffer, A., et al., *Acute phase protein response, food intake, liveweight change and lesions following intrathoracic injection of yeast in sheep*. Res Vet Sci, 1993. **55**(3): p. 360-6.
253. Skinner, J.G. and L. Roberts, *Haptoglobin as an indicator of infection in sheep*. Vet Rec, 1994. **134**(2): p. 33-6.
254. Scott, P.R., L.D. Murray, and C.D. Penny, *A preliminary study of serum haptoglobin concentration as a prognostic indicator of ovine dystocia cases*. Br Vet J, 1992. **148**(4): p. 351-5.
255. Regassa, F. and D.E. Noakes, *Acute phase protein response of ewes and the release of PGFM in relation to uterine involution and the presence of intrauterine bacteria*. Vet Rec, 1999. **144**(18): p. 502-6.
256. Hall, W.F., et al., *Serum haptoglobin concentration in swine naturally or experimentally infected with Actinobacillus pleuropneumoniae*. J Am Vet Med Assoc, 1992. **201**(11): p. 1730-3.
257. Francisco, C.J., et al., *Serum haptoglobin concentration in growing swine after intranasal challenge with Bordetella bronchiseptica and toxigenic Pasteurella multocida type D*. Can J Vet Res, 1996. **60**(3): p. 222-7.
258. Harding, J.C., M.J. Baarsch, and M.P. Murtaugh, *Association of tumour necrosis factor and acute phase reactant changes with post arrival disease in swine*. Zentralbl Veterinarmed B, 1997. **44**(7): p. 405-13.
259. Agerso, H., C. Friis, and J.P. Nielsen, *Penetration of amoxicillin to the respiratory tract tissues and secretions in Actinobacillus pleuropneumoniae infected pigs*. Res Vet Sci, 1998. **64**(3): p. 251-7.
260. Asai, T., et al., *Elevated serum haptoglobin in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. Veterinary immunology and immunopathology, 1999. **70**(1-2): p. 143-148.
261. Magnusson, U., et al., *Interferon-alpha and haptoglobin in pigs selectively bred for high and low immune response and infected with Mycoplasma hyorhinitis*. Vet Immunol Immunopathol, 1999. **68**(2-4): p. 131-7.
262. Baarsch, M.J., D.L. Foss, and M.P. Murtaugh, *Pathophysiologic correlates of acute porcine pleuropneumonia*. Am J Vet Res, 2000. **61**(6): p. 684-90.
263. Petersen, H.H., et al., *Serum haptoglobin concentration as a marker of clinical signs in finishing pigs*. Vet Rec, 2002. **151**(3): p. 85-9.

264. Eurell, T.E., et al., *Serum haptoglobin concentration as an indicator of weight gain in pigs*. Can J Vet Res, 1992. **56**(1): p. 6-9.
265. Kent, J.E., *Specific serum protein changes associated with primary and secondary Strongylus vulgaris infections in pony yearlings*. Equine Vet J, 1987. **19**(2): p. 133-7.
266. Taira, T., et al., *Equine haptoglobin: isolation, characterization, and the effects of ageing, delivery and inflammation on its serum concentration*. J Vet Med Sci, 1992. **54**(3): p. 435-42.
267. Eurell, T.E., D.A. Wilson, and G.J. Baker, *The effect of exploratory laparotomy on the serum and peritoneal haptoglobin concentrations of the pony*. Can J Vet Res, 1993. **57**(1): p. 42-4.
268. Hulten, C., et al., *Dynamics in serum of the inflammatory markers serum amyloid A (SAA), haptoglobin, fibrinogen and alpha2-globulins during induced noninfectious arthritis in the horse*. Equine Vet J, 2002. **34**(7): p. 699-704.
269. Johnson, P., A.M. Dawson, and D.L. Mould, *Serum protein changes in grass sickness*. Res Vet Sci, 1983. **35**(2): p. 165-70.
270. Milne, E.M., et al., *Acute phase proteins in grass sickness (equine dysautonomia)*. Res Vet Sci, 1991. **50**(3): p. 273-8.
271. S., T.J., *Overview of plasma proteins*, in *Schalm's Veterinary Hematology*, B.F. Feldman, Zinkl, J.G., Jain, N.C., Editor. 2000, Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia. p. 891-898.
272. Sitrin, R.G., et al., *Fibrinogen activates NF-kappa B transcription factors in mononuclear phagocytes*. J Immunol, 1998. **161**(3): p. 1462-70.
273. Rubel, C., et al., *Fibrinogen promotes neutrophil activation and delays apoptosis*. J Immunol, 2001. **166**(3): p. 2002-10.
274. Cheryk, L.A., K.E. Hooper-McGrevy, and P.A. Gentry, *Alterations in bovine platelet function and acute phase proteins induced by Pasteurella haemolytica A1*. Can J Vet Res, 1998. **62**(1): p. 1-8.
275. Falcon, J., et al., *Clinical and radiographic findings in Corynebacterium equi pneumonia of foals*. J Am Vet Med Assoc, 1985. **186**(6): p. 593-9.
276. Johnstone, I.B. and S. Crane, *Hemostatic abnormalities in equine colic*. Am J Vet Res, 1986. **47**(2): p. 356-8.
277. Morris, D.D., et al., *Effect of equine ehrlichial colitis on the hemostatic system in ponies*. Am J Vet Res, 1988. **49**(7): p. 1030-6.

278. Held, J.P., et al., *Bacterial epididymitis in two stallions*. J Am Vet Med Assoc, 1990. **197**(5): p. 602-4.
279. Mills, P.C., et al., *Effects of inflammation-associated acute-phase response on hepatic and renal indices in the horse*. Aust Vet J, 1998. **76**(3): p. 187-94.
280. Concannon, P.W., et al., *Postimplantation increase in plasma fibrinogen concentration with increase in relaxin concentration in pregnant dogs*. Am J Vet Res, 1996. **57**(9): p. 1382-5.
281. Dabbagh, K., et al., *Alpha-1-antitrypsin stimulates fibroblast proliferation and procollagen production and activates classical MAP kinase signalling pathways*. J Cell Physiol, 2001. **186**(1): p. 73-81.
282. Matsuda, T., et al., *Identification of alpha 2-macroglobulin as a carrier protein for IL-6*. J Immunol, 1989. **142**(1): p. 148-52.
283. Hughes, D., et al., *Effects of age, sex, reproductive status, and hospitalization on serum alpha 1-antitrypsin concentration in dogs*. Am J Vet Res, 1995. **56**(5): p. 568-72.
284. Jinbo, T., T. Sakamoto, and S. Yamamoto, *Serum alpha2-macroglobulin and cytokine measurements in an acute inflammation model in rats*. Lab Anim, 2002. **36**(2): p. 153-7.
285. Urieli-Shoval, S., R.P. Linke, and Y. Matzner, *Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states*. Curr Opin Hematol, 2000. **7**(1): p. 64-9.
286. Xu, L., et al., *A novel biologic function of serum amyloid A. Induction of T lymphocyte migration and adhesion*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1184-90.
287. Gatt, M.E., et al., *Effect of serum amyloid A on selected in vitro functions of isolated human neutrophils*. J Lab Clin Med, 1998. **132**(5): p. 414-20.
288. Vreugdenhil, A.C., et al., *Lipopolysaccharide binding protein and serum amyloid A secretion by human intestinal epithelial cells during the acute phase response*. J Immunol, 1999. **163**(5): p. 2792-8.
289. McDonald, T.L., et al., *Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A 3 (M-SAA3) into colostrum*. Vet Immunol Immunopathol, 2001. **83**(3-4): p. 203-11.
290. Boosman, R., et al., *Serum amyloid A concentrations in cows given endotoxin as an acute-phase stimulant*. American journal of veterinary research, 1989. **50**(10): p. 1690-1694.
291. Alsemgeest, S.P., et al., *Peripartum acute-phase protein serum amyloid-A concentration in plasma of cows and fetuses*. Am J Vet Res, 1993. **54**(1): p. 164-7.

292. Horadagoda, A., et al., *Purification and quantitative measurement of bovine serum amyloid-A*. Res Vet Sci, 1993. **55**(3): p. 317-25.
293. Alsemgeest, S.P., et al., *Concentrations of serum amyloid-A (SAA) and haptoglobin (HP) as parameters of inflammatory diseases in cattle*. Vet Q, 1994. **16**(1): p. 21-3.
294. Werling, D., et al., *Characterisation of the acute phase response of heifers to a prolonged low dose infusion of lipopolysaccharide*. Res Vet Sci, 1996. **61**(3): p. 252-7.
295. Horadagoda, N.U., et al., *Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation*. The Veterinary record, 1999. **144**(16): p. 437-441.
296. Winter, P., et al., *Serum amyloid A in the serum and milk of ewes with mastitis induced experimentally with Staphylococcus epidermidis*. Vet Rec, 2003. **152**(18): p. 558-62.
297. Alsemgeest, S.P., et al., *Influence of physical stress on the plasma concentration of serum amyloid-A (SAA) and haptoglobin (Hp) in calves*. Vet Q, 1995. **17**(1): p. 9-12.
298. Pepys, M.B., et al., *Serum amyloid A protein (SAA) in horses: objective measurement of the acute phase response*. Equine Vet J, 1989. **21**(2): p. 106-9.
299. Stoneham, S.J., et al., *Measurement of serum amyloid A in the neonatal foal using a latex agglutination immunoturbidimetric assay: determination of the normal range, variation with age and response to disease*. Equine Vet J, 2001. **33**(6): p. 599-603.
300. Hulten, C., et al., *The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker in equine influenza virus infection*. Acta Vet Scand, 1999. **40**(4): p. 323-33.
301. Satoh, M., et al., *Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative measurement of serum amyloid A protein in horses*. Am J Vet Res, 1995. **56**(10): p. 1286-91.
302. Heegaard, P.M., et al., *The porcine acute phase response to infection with Actinobacillus pleuropneumoniae. Haptoglobin, C-reactive protein, major acute phase protein and serum amyloid A protein are sensitive indicators of infection*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 1998. **119**(2): p. 365-73.
303. Kajikawa, T., et al., *Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of feline serum amyloid A protein by use of immunological cross-reactivity of polyclonal anti-canine serum amyloid A protein antibody*. J Vet Med Sci, 1996. **58**(11): p. 1141-3.
304. Giansanti, F., et al., *Physiological roles of ovotransferrin*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1820**(3): p. 218-25.
305. Moser, M., et al., *Blood serum transferrin concentration in cattle in various physiological states, in veal calves fed different amounts of iron, and in cattle affected by infectious and non-infectious diseases*. Zentralbl Veterinarmed A, 1994. **41**(6): p.

- 413-20.
306. McNair, J., et al., *Bovine serum transferrin concentration during acute infection with Haemophilus somnus*. Vet J, 1998. **155**(3): p. 251-5.
307. Kramer, T.T., R.W. Griffith, and L. Saucke, *Iron and transferrin in acute experimental Salmonella cholerae-suis infection in pigs*. Am J Vet Res, 1985. **46**(2): p. 451-5.
308. Nakamura, K., K. Imai, and N. Tanimura, *Comparison of the effects of infectious bronchitis and infectious laryngotracheitis on the chicken respiratory tract*. J Comp Pathol, 1996. **114**(1): p. 11-21.
309. Inoue, M., W. Satoh, and H. Murakami, *Plasma alpha 1-acid glycoprotein in chickens infected with infectious bursal disease virus*. Avian Dis, 1997. **41**(1): p. 164-70.
310. Nakamura, K., et al., *Serum levels of interleukin-6, alpha1-acid glycoprotein, and corticosterone in two-week-old chickens inoculated with Escherichia coli lipopolysaccharide*. Poult Sci, 1998. **77**(6): p. 908-11.
311. Takahashi, K., et al., *Changes in plasma alpha 1-acid glycoprotein concentration and selected immune response in broiler chickens injected with Escherichia coli lipopolysaccharide*. Br Poult Sci, 1998. **39**(1): p. 152-5.
312. Holt, P.S. and R.K. Gast, *Comparison of the effects of infection with Salmonella enteritidis, in combination with an induced molt, on serum levels of the acute phase protein, alpha1 acid glycoprotein, in hens*. Poult Sci, 2002. **81**(9): p. 1295-300.
313. Piercy, D.W., *Acute phase responses to experimental salmonellosis in calves and colibacillosis in chickens: serum iron and caeruloplasmin*. J Comp Pathol, 1979. **89**(3): p. 309-19.
314. Chamanza, R., et al., *Acute phase proteins in the domestic fowl*. World's Poultry Science Journal, 2007. **55**(1): p. 61-71.
315. Georgieva, T.M., et al., *Effects of Escherichia coli infection and Eimeria tenella invasion on blood concentrations of some positive acute phase proteins (haptoglobin (PIT 54), fibrinogen and ceruloplasmin) in chickens*. Revue de Médecine Vétérinaire, 2010. **161**(2): p. 84-89.
316. Wicher, K.B. and E. Fries, *Haptoglobin, a hemoglobin-binding plasma protein, is present in bony fish and mammals but not in frog and chicken*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(11): p. 4168-73.
317. Amrani, D.L., D. Mauzy-Melitz, and M.W. Mosesson, *Effect of hepatocyte-stimulating factor and glucocorticoids on plasma fibronectin levels*. Biochem J, 1986. **238**(2): p. 365-71.

318. Xie, H., et al., *Identification of ovotransferrin as an acute phase protein in chickens*. Poult Sci, 2002. **81**(1): p. 112-20.
319. Sylte, M.J. and D.L. Suarez, *Vaccination and acute phase mediator production in chickens challenged with low pathogenic avian influenza virus; novel markers for vaccine efficacy?* Vaccine, 2012. **30**(20): p. 3097-105.
320. Xie, H., et al., *Changes in serum ovotransferrin levels in chickens with experimentally induced inflammation and diseases*. Avian Dis, 2002. **46**(1): p. 122-31.
321. Hogenkamp, A., et al., *Characterization and expression sites of newly identified chicken collectins*. Mol Immunol, 2006. **43**(10): p. 1604-16.
322. Laursen, S.B., et al., *Serum levels, ontogeny and heritability of chicken mannan-binding lectin (MBL)*. Immunology, 1998. **94**(4): p. 587-93.
323. Nielsen, O.L., et al., *Immunohistochemical investigation of the tissue distribution of mannan-binding lectin in non-infected and virus-infected chickens*. Immunology, 1998. **94**(1): p. 122-8.
324. Juul-Madsen, H.R., et al., *Serum levels of mannan-binding lectin in chickens prior to and during experimental infection with avian infectious bronchitis virus*. Poult Sci, 2003. **82**(2): p. 235-41.
325. Juul-Madsen, H.R., et al., *Crosstalk between innate and adaptive immune responses to infectious bronchitis virus after vaccination and challenge of chickens varying in serum mannose-binding lectin concentrations*. Vaccine, 2011. **29**(51): p. 9499-507.
326. Norup, L.R., et al., *Influence of chicken serum mannose-binding lectin levels on the immune response towards Escherichia coli*. Poult Sci, 2009. **88**(3): p. 543-53.
327. Schou, T.W., et al., *Mannan-binding lectin (MBL) in two chicken breeds and the correlation with experimental Pasteurella multocida infection*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2010. **33**(3): p. 183-95.
328. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol, 1977. **36**(1): p. 59-74.
329. DuBridge, R.B., et al., *Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(1): p. 379-87.
330. Kearney, J.F., et al., *A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines*. J Immunol, 1979. **123**(4): p. 1548-50.
331. Andersson, S., et al., *Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme*. J Biol Chem,

1989. **264**(14): p. 8222-9.
332. Hernan, R., K. Heuermann, and B. Brizzard, *Multiple epitope tagging of expressed proteins for enhanced detection*. Biotechniques, 2000. **28**(4): p. 789-93.
333. Campbell, A.M., P.D. Kessler, and D.M. Fambrough, *The alternative carboxyl termini of avian cardiac and brain sarcoplasmic reticulum/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPases are on opposite sides of the membrane*. J Biol Chem, 1992. **267**(13): p. 9321-5.
334. Chapman, B.S., et al., *Effect of intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene on heterologous expression in mammalian cells*. Nucleic Acids Research, 1991. **19**(14): p. 3979-3986.
335. Brewer, C.B., *Cytomegalovirus plasmid vectors for permanent lines of polarized epithelial cells*. Methods Cell Biol, 1994. **43 Pt A**: p. 233-45.
336. Dalgaard, T.S., et al., *Immune gene expression in the spleen of chickens experimentally infected with Ascaridia galli*. Vet Immunol Immunopathol, 2015. **164**(1-2): p. 79-86.
337. Vilahur, G. and L. Badimon, *Biological actions of pentraxins*. Vascul Pharmacol, 2015. **73**: p. 38-44.
338. Blair, J.E. and S.B. Hedges, *Molecular Phylogeny and Divergence Times of Deuterostome Animals*. Molecular Biology and Evolution, 2005. **22**(11): p. 2275-2284.
339. Furukawa, T., C.A. Kozak, and C.L. Cepko, *rax, a novel paired-type homeobox gene, shows expression in the anterior neural fold and developing retina*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(7): p. 3088-93.
340. Orquera, D.P. and F.S.J. de Souza, *Evolution of the Rax family of developmental transcription factors in vertebrates*. Mechanisms of Development.
341. Daigo, K., A. Mantovani, and B. Bottazzi, *The yin-yang of long pentraxin PTX3 in inflammation and immunity*. Immunol Lett, 2014. **161**(1): p. 38-43.
342. Szalai, A.J., *The antimicrobial activity of C-reactive protein*. Microbes Infect, 2002. **4**(2): p. 201-5.
343. Chang, M.K., et al., *C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 13043-8.
344. Nebuloni, M., et al., *PTX3 expression in the heart tissues of patients with myocardial infarction and infectious myocarditis*. Cardiovasc Pathol, 2011. **20**(1): p. e27-35.
345. Slusher, A.L., A.B. Mischo, and E.O. Acevedo, *Pentraxin 3 is an anti-inflammatory*

- protein associated with lipid-induced interleukin 10 in vitro*. Cytokine, 2016. **86**: p. 36-40.
346. Oláh I., e.a., *Structure of the avian lymphoid system*, in *Avian Immunology*, B.M. Freeman, Editor. 1981, British Poultry Science Ltd.: Edinburgh. p. p. 28 ff.
347. Namikawa, R., et al., *Ontogenic development of T and B cells and non-lymphoid cells in the white pulp of human spleen*. Immunology, 1986. **57**(1): p. 61-69.
348. Toivanen, A., et al., *Ontogeny of the chicken lymphoid system*, in *Avian Immunology*, B.M. Freeman, Editor. 1981, British Poultry Science Ltd.: Edinburgh. p. p. 45 ff.
349. White, R.G., et al., *Localization of a protein antigen in the chicken spleen. Effect of various manipulative procedures on the morphogenesis of the germinal centre*. Immunology, 1975. **28**(1): p. 1-21.
350. Glick, B., T.S. Chang, and R.G. Jaap, *The bursa of Fabricius and antibody production*. Poult Sci, 1956(35): p. p. 224-225.
351. Ciriaco, E., et al., *Age-related changes in the avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius)*. Microsc Res Tech, 2003. **62**(6): p. 482-7.
352. Toivanen, P. and A. Toivanen, *Bursal and postbursal stem cells in chicken. Functional characteristics*. Eur J Immunol, 1973. **3**(9): p. 585-95.
353. Björck, L. and G. Kronvall, *Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent*. The Journal of Immunology, 1984. **133**(2): p. 969-974.
354. Coffin, J.M.H., S.H.; Varmus, H.E., *Retroviruses*. 1997, U.S.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
355. Sorge, J.a.S.H.H., *Polypurine tract adjacent to the U3 region of the Rous sarcoma virus genome provides a cis-acting function*. J Virol, 1982. **43** (2): p. p. 482-8.
356. Hughes, S.H., *The RCAS vector system*. Folia Biol (Praha), 2004. **50**(3-4): p. 107-19.
357. Petropoulos, C.J. and S.H. Hughes, *Replication-competent retrovirus vectors for the transfer and expression of gene cassettes in avian cells*. J Virol, 1991. **65**(7): p. 3728-37.
358. Greenhouse, J.J., et al., *Helper-independent retrovirus vectors with Rous-associated virus type O long terminal repeats*. J Virol, 1988. **62**(12): p. 4809-12.
359. Hughes, S.H., et al., *Adaptor plasmids simplify the insertion of foreign DNA into helper-independent retroviral vectors*. J Virol, 1987. **61**(10): p. 3004-12.

10 ANHANG

A Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Die Bezugsquellen wurden als Hochzahlen entsprechend nachfolgender Tabelle in Kapitel 4 (Material und Methoden) integriert:

1. Applichem, Darmstadt
2. Biochrom, Berlin
3. Thermo Scientific, Waltham, USA
4. Institut für Tierphysiologie, München
5. Invitrogen GmbH, Karlsruhe
6. Roche, Mannheim
7. Promega Corp, Mannheim
8. Applied Bioscience, Darmstadt
9. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
10. Solis Biodyne, Tartu, Estland
11. Qiagen GmbH, Hilden
12. Biotrend Chemikalien GmbH, Köln
13. New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
14. PRO LAB, Ontario
15. Sigma Aldrich, Saint Louis/USA
16. Invivogen, Toulouse, Frankreich
17. Carl Roth, Karlsruhe
18. BioRad, München
19. VWR International GmbH, Darmstadt
20. Nunc, Wiesbaden
21. GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
22. Brand, Wertheim
23. Rotexmedica, Trittau
24. Bayha GmbH, Tuttlingen

25. Sarstedt, Nürnberg
26. BayWa AG, München
27. Bio&SELL GmbH, Feucht bei Nürnberg
28. Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., New Market, UK
29. Vector Laboratories, Burlingame, California, USA
30. Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA

B. Laborgeräte in alphabetischer Reihenfolge

Gerät	Bezeichnung	Herstellerrfirma
Analysewaage	Mettler PJ400	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Bakterienbrutschrank	Mini Inkubator	Labnet International. Inc., Woodbridge, USA
Bioanalyzer	Agilent 2100 Bioanalyzer	Applied Biosciences, Darmstadt
Brüter	BSS 200/8203	Grumbach Brutgeräte GmbH, Asslar
Brutschrank für die Zellkultur	MCO-20AIC	Sanyo, München
Brutschrank für die Zellkultur	Galaxy R	Nunc, Wiesbaden
Chemilumineszenz-System	MicroChemi 4.2	Biostep GmbH, Jahnsdorf
Chromatographie-Anlage	Bio-Rad BioLogic LP mit Model2100 Fraction Collector	Bio-Rad, München
Dampfersterilisator	Varioklav Typ 500E	Thermo Scientific, München
Flockeneisbereiter	Scotsman AF100	Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien
Gel Dokumentation Software: Image Quant Capture 300	Image Quant 300	GE Healthcare, Garching
Gelkammer	Mini-Sub®-cell GT	Bio-Rad, München
Handzentrifuge	Rotilabo®-Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Horizontalschüttler	KL-2	Edmund Bühler GmbH
Homogenisator	Precellys24	Peqlab, Erlangen
Magnetrührer	IKAMAG®RCT	IKA®Werke GmbH + Co.KG, Staufen
Mikroskop	Axioskop	Zeiss, Jena
Mikroskop	Leica DMIL Kamera DF340XF	Leica, Bensheim
Mikrowelle S2	MS1987U	LG Electronics, Ratingen
Mikrozentrifuge	5415R	Eppendorf AG, Hamburg
PCR-Workstation	Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation	Peqlab, Erlangen
pH-Meter	Sartorius PB-11 mit Glaselektorde PY-P10	Sartorius AG, Göttingen
Platten-Photometer	Sunrise-Remote	Tecan, Crailsheim
Power Supply	Power Pac 300	Bio-Rad, München
qPCR System	7300 Real-Time PCR System	Applied Biosciences, Darmstadt
Schüttelinkubator	Schüttler KS15A mit Inkubatorhaube TH15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
SDS-Gel-Gießkammer	Mini Potean III	Bio-Rad, München
Sicherheitswerkbank	Mikroflow	Nunc, Wiesbaden
Spectrophotometer	NanoDrop ND-100	Peqlab, Erlangen
Stickstofftank	Locator 6 Plus	Barnstead Thermolyne, Dubuque/USA
Tank-Blotter	Criterion Blotter	Bio-Rad, München

Taumel-Rollenmischer	RM5	neoLab, Heidelberg
Thermocycler	MJ Mini	Bio-Rad, München
Thermocycler	T100TM Thermal Cycler	BioRad, München
Thermoschüttler	TS 1 Thermoshaker	Biometra, Göttingen
Ultrazentrifuge	Avanti J-25	Beckmann Coulter, Krefeld
UV-Bildschirm zur Gelpräparation	TFP-20.L	Spicker Kadie, Schwandorf
Vortex-Mixer	GVLab®	Gilson Inc., Middleton, USA
Wärmeschrank	neoLab Universal Wärmeschrank Basic 391	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Wasserbad	GFL1004	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zählkammer	Modifizierte Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim
Zentrifuge	4K15	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz
Zentrifuge	Centrifuge 5810	Eppendorf, Köln

11 DANKSAGUNG

An erster Stelle gilt mein Dank Professor Dr. Bernd Kaspers für die Überlassung dieses Dissertationsthemas und für seine stets freundliche wissenschaftliche und methodische Unterstützung. Außerdem bin ich ihm sehr dankbar, dass er es mir ermöglicht hat trotz Schwangerschaft die Arbeit an der Dissertation weiterführen zu können. Auch Professor Dr. Benjamin Schusser möchte ich im Besonderen danken, dass er mich durch ein Praktikum in die Welt der Forschung eingeführt und ermutigt hat, diese Doktorarbeit zu schreiben.

Prof. Dr. Göbel danke ich für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Bei Beatrice Schaerer und Marina Kohn bedanke ich mich ganz besonders für ihre Geduld und Hilfsbereitschaft. Sie hatten immer ein offenes Ohr bei methodischen Problemen und eine Lösung parat. Ingrid Riehl danke ich für ihre große Hilfe beim Western Blotting, sowie für ihre Unterstützung beim Aufreinigen von Proteinen.

Für die Betreuung der Hühner und Mäuse bedanke ich mich bei Fritz Meggendorfer, Thomas Hoschka, Andreas Schöffmann und Daniela Hölle. Frau Crass und Frau Summer danke ich für ihre Unterstützung in Verwaltungsangelegenheiten und Herrn Schmitt für seine Hilfe bei Reparaturen jeglicher Art.

Karin Begsteiger hat mich in meiner Schwangerschaft als Kursbetreuerin vertreten. Dafür möchte ich mich recht herzlich bei ihr bedanken.

Auch bei meinen Mitdoktoranden Larissa Postrak, Dorothea Aumann, Sarah Lettmann, Maria Laparidou und Franziska Rohde möchte ich mich ganz besonders bedanken. Sie sind nicht nur Kollegen für mich, sondern mir auch privat ans Herz gewachsen.

Für ihre Unterstützung und große Hilfe beim Erstellen der Alignments möchte ich mich bei Ph.D. Kate Sutton bedanken.

Auch seitens der Postdoktorandinnen Dr. Nina Burkhardt und Dr. Susanne Röhl habe ich stets große Hilfsbereitschaft erfahren, wofür ich ihnen sehr dankbar bin.

Besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen Eltern bedanken, die mir schon im Studium (auch finanziell) immer eine große Stütze waren. Und abschließend gebührt meinem Mann Florian noch großer Dank, da er immer an mich glaubt und mein größter Motivator ist.