

**Extragastrale Expression von Gastrokin 2  
und der Einfluss intrauteriner  
Wachstumsrestriktion auf dessen  
plazentare Expression**

Kinder- und Jugendklinik des Universitätsklinikums Erlangen

Arbeitsgemeinschaft Prof. Dr. rer. nat. Hartner / PD Dr. med. Fahlbusch

der Medizinischen Fakultät der

Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. med.

vorgelegt von

Julia Marie Röper

aus Gehrden

Erlangen, 2021

**Als Dissertation genehmigt von der  
Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität  
Erlangen-Nürnberg**

**Vorsitzender des Promotionsorgans:** Prof. Dr. Markus F. Neurath

**Gutachter:** PD Dr. Fabian Fahlbusch

**Gutachter:** Prof. Dr. Andrea Hartner

**Tag der mündlichen Prüfung:** 16. November 2021

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	1
1.1. Hintergrund und Ziele .....	1
1.2. Methoden .....	1
1.3. Ergebnisse und Beobachtungen .....	1
1.4. Praktische Schlussfolgerungen .....	2
<b>2. Abstract</b> .....	3
2.1. Objective .....	3
2.2. Methods .....	3
2.3. Results .....	3
2.4. Conclusion .....	4
<b>3. Einleitung</b> .....	5
3.1 Allgemeines über Gastrokine .....	5
3.2 Funktion der BRICHOS-Domäne .....	6
3.3 Protektive Rolle der Gastrokine .....	7
3.4 Trefoil-Faktor-Proteine .....	8
3.4.1 Allgemeines .....	8
3.4.2 Interaktion von Trefoil-Faktoren mit Gastrokinen .....	9
3.5 Rolle der GKNs in der Plazenta .....	10
3.6 Intrauterine Wachstumsrestriktion und Präeklampsie .....	12
3.7 Nagetiermodelle intrauteriner Wachstumsrestriktion .....	14
3.7.1 Alimentäres IUGR Rattenmodell (maternale Proteinmangeldiät) .....	14
3.7.2 IUGR im eNOS <sup>-/-</sup> Mausmodell mit Präeklampsie-ähnlichen Veränderungen .....	15
<b>4. Hypothese/Fragestellung</b> .....	16
<b>5. Methoden</b> .....	17
5.1 Ethik .....	17
5.2 Tiermodelle .....	17
5.2.1 Alimentäres IUGR Rattenmodell .....	17
5.2.2 PE/IUGR eNOS-knockout Mausmodell .....	18
5.3 Gewebeentnahme und Aufbereitung .....	18

5.4 Bestimmung der Genexpression in den Geweben .....	19
5.4.1 RNA-Extraktion .....	19
5.4.2 Umschreiben von RNA in cDNA durch Reverse Transkriptase .....	19
5.4.3 Real Time Quantitative PCR mit SYBR® Green Master Mix .....	20
5.5 Immunhistochemische Analysen .....	22
5.5.1 Deparaffinieren .....	22
5.5.2 Oxidation und Blocken .....	23
5.5.3 Primärantikörper .....	23
5.5.4 Sekundärantikörper .....	24
5.5.5 Signalverstärkung durch Avidin/Biotin-Methode .....	24
5.5.6 Sichtbarmachen durch DAB .....	24
5.5.7 Gegenfärbung mit Hämatoxylin .....	24
5.6 Statistik und Software .....	25
<b>6. Ergebnisse</b> .....	<b>26</b>
6.1 Gastrokin-Expressionsanalyse in multiplen Geweben der gesunden Ratte .....	26
6.2 Immunhistochemischer Nachweis von Gastrokinen in multiplen Geweben der gesunden Ratte .....	27
6.2.1 Gastrokin 1 .....	27
6.2.2 Gastrokin 2 .....	29
6.3 Gastrokin-Expressionsanalyse in Plazenten von IUGR-Tiermodellen .....	37
6.3.1 Auxologie .....	37
6.3.2 Plazentare Expression von Gastrokin 2 .....	38
6.4 Immunhistochemischer Nachweis von Gastrokinen in verschiedenen humanen Gewebeklassen .....	40
6.4.1 Humanes Gastrokin 1 .....	41
6.4.2 Humanes Gastrokin 2 .....	43
<b>7. Diskussion</b> .....	<b>53</b>
7.1 <i>Gkn1</i> Expression im plazentaren Dottersack .....	53
7.2 Tiermodelle der IUGR und PE/IUGR .....	55
7.2.1 Auxologie unserer Tiermodelle: Erfolgreiche Etablierung eines IUGR- Phänotyps .....	55
7.2.2 Plazentare Alteration der <i>Gkn2</i> Expression bei IUGR .....	55

7.3 Expression von <i>Gkn2</i> in extragastralen Organen von Mensch, Ratte und Maus . .	58
<b>8. Ausblick/Future aspects</b> . . . . .	<b>71</b>
8.1 CCKBR als potentieller GKN-Rezeptor . . . . .	71
8.2 Limitationen der Studie . . . . .	71
8.3 Mögliche weiterführende Untersuchungen . . . . .	72
<b>9. Anhang</b> . . . . .	<b>73</b>
9.1 Literaturverzeichnis . . . . .	73
9.2 Abkürzungsverzeichnis . . . . .	82
9.3 Färbeprotokoll der Peroxidasefärbung . . . . .	86
9.4 Materialien . . . . .	87
<b>10. Danksagung</b> . . . . .	<b>90</b>
<b>11. Lebenslauf</b> . . . . .	<b>91</b>

# 1. Zusammenfassung

## 1.1 Hintergrund und Ziele

Gastrokine (GKNs) sind eine Gruppe von bislang vor allem im Magen und in der Plazenta erforschten Proteinen, deren Funktion noch nicht endgültig geklärt ist. In der gastralen Mukosa wird den sekretorischen BRICHOS-Domän-Proteinen eine tumorsuppressive und homöostatische Rolle zugeschrieben. Gastrokine scheinen jedoch in geringeren Mengen auch in extragastralen Organen wie der Plazenta vorhanden zu sein. Es wird angenommen, dass Gastrokine trophoblastäre Funktionen regulativ beeinflussen. Somit kommt diesen Proteinen eine potentielle Rolle bei plazentarer Fehlfunktion im Rahmen der Schwangerschaftskomplikationen intrauterine Wachstumsrestriktion (IUGR) und Präeklampsie (PE) zu. Bislang bleibt es offen, ob sich diese placentaren Veränderungen analog in IUGR bzw. PE/IUGR Nagetiermodellen nachbilden lassen. Zudem ist bislang wenig über weitere potentielle Lokalisationen von Gastrokinen in extragastralen Organen bekannt.

## 1.2 Methoden

Es wurde die Expression von *Gkn1* und *Gkn2* mittels qRT-PCR in verschiedenen Organen der Ratte sowie in Plazenten von etablierten IUGR-Tiermodellen untersucht, i.e. im alimentären IUGR Proteinmangelmodell der Ratte und im genetischen PE/IUGR Modell der Maus (Knockout der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase, *eNOS*<sup>-/-</sup>) im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle zum Gestationsalter E15 (Maus) und E18.5 (beide Modelle).

Die Bestimmung der Lokalisation von GKN1 und GKN2 in extragastralen Geweben von gesunden Nagetieren und komparativ beim Menschen (humaner tissue microarray) erfolgte immunhistochemisch. Der Magen diente hierbei jeweils als Positivkontrolle.

## 1.3 Ergebnisse und Beobachtungen

Beide Tiermodelle zeigten eine signifikante IUGR mit fetaler Gewichtsreduktion. Während GKN1 fast ausschließlich gastral exprimiert wurde, fand sich eine signifikante *Gkn2* mRNA Expression in zahlreichen weiteren Organen wie Lunge, Hirn,

Hoden und Knochen der Ratte. Zusätzlich ließ sich GKN2 mittels humanem tissue microarray in der Haut, dem Pankreas, den Speicheldrüsen sowie verschiedenen dem Immunsystem zugehörigen Organen mittels Immunhistochemie nachweisen.

Die plazentaren qRT-PCR Analysen unserer Tiermodelle zeigten einen signifikanten Anstieg der *Gkn2* Expression in Wildtyp C57BL/6 Mäusen von E15 zu E18.5. Diese Induktion blieb in den Plazenten von eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen aus, sodass diese an E18.5 eine gegenüber dem Wildtyp signifikant verringerte plazentare *Gkn2* Expression zeigten. In den Plazenten des IUGR Rattenmodells fand sich kein signifikanter Einfluss der Proteinmangelernährung auf die *Gkn2* Expression an E18.5. Es fand sich kein geschlechtsspezifischer Dimorphismus hinsichtlich der *Gkn2* Expression im Vergleich von weiblichen und männlichen Plazenten.

## 1.4 Praktische Schlussfolgerungen

Die hier vorgestellte Arbeit diene der Deskription extragastraler Expression von Gastrokin 2 in Mensch und Nagetier. Während der Magen der Hauptexpressionsort von GKN2 ist, erweitert sich durch den hier vorgestellten Nachweis des Proteins in multiplen Organen der Blick auf weitere potenzielle Funktionen von GKN2 anhand seiner Lokalisation. Unsere Daten deuten zum Teil darauf hin, dass sich die GKN2 Expression in verschiedenen Organen des gleichen endodermalen Ursprungs zeigt, wobei zu klären bleibt, ob GKN2 lokal die Funktionalität anderer BRICHOS-Domän-Proteine übernimmt oder ob sich eine GKN2-spezifische Wirkung findet. Des Weiteren bauen die Untersuchungen dieser Arbeit unser bisheriges Verständnis zur plazentaren Rolle von GKN2 und seiner Regulation im Rahmen von IUGR im Tiermodell aus.

## 2. Abstract

### 2.1 Objective

Gastrokines (GKNs) are a protein cluster so far investigated mainly in stomach and placenta. Their function is subject of current studies. In gastral mucosa those secretory BRICHOS-domain proteins exert tumor suppressive and homeostatic effects. Noteworthy, gastrokine expression seems to be present in extragastric organs, such as the placenta, where they are involved in the trophoblast function. Recently, a potential role of GKN2 in human pregnancy complications of placental malfunction, such as intrauterine growth restriction (IUGR) and preeclampsia (PE), has been hypothesized. Whether these changes can be seen in rodent animal models of IUGR and PE/IUGR remains to be examined. Moreover, little is known about GKN function in other organ systems.

### 2.2 Methods

*Gkn1* and 2 mRNA expression was determined via qRT-PCR in multiple rat organs and in placentas from established rodent models of IUGR, i.e., maternal gestational protein restriction of the rat and genetic PE/IUGR mouse model (knockout of endothelial nitric oxide synthase, eNOS<sup>-/-</sup>), in comparison to the respective controls at gestational age E15 (mouse) and E18.5 (both animal models). Furthermore, we analyzed the localization of GKN1 and 2 in extragastric tissues of healthy rodents in comparison to human tissue microarray immunohistochemically. The stomach served as positive control.

### 2.3 Results

Both animal models showed a significant induction of IUGR with reduced fetal weights. *Gkn1* expression was mainly restricted to the stomach. In contrast, a hitherto unknown *Gkn2* expression was detected in a series of other rat tissues, such as lung, brain, testicle and bone. Additionally, our immunohistochemical analysis of human tissue via histological microarray showed an expression of *Gkn2* in skin, pancreas, salivary glands and in various immune organs.

Wildtype C57BL/6 mice showed a significant increase of placental *Gkn2* expression from E15 to E18.5. This increase was not observed in the placentas of eNOS<sup>-/-</sup> mice, with a significantly reduced placental *Gkn2* expression on E18.5, compared to C57BL/6 wildtype animals. Regarding the IUGR rat model, the maternal low protein diet had no significant impact on placental *Gkn2* expression on E18.5. No sex-specific dimorphism was observed regarding *Gkn2* mRNA expression in placentas of female versus male placentas.

## 2.4 Conclusion

This study provided novel data on extragastric GKN2 expression in humans and rodents. While GKN2 was mainly expressed in the stomach, we could also show protein expression in multiple other tissues, expanding the possibilities of putative protein function based on its localization. Part of our data revealed GKN2 expression in organs of the same endodermal origin. However, it remains to be determined, if GKN2 mimics the function of other local BRICHOS-domain proteins or if specific effects apply. The presented data further extend the current knowledge regarding the placental role of GKN2 on its regulation in IUGR animal models.

## 3. Einleitung

### 3.1 Allgemeines über Gastrokeine

Gastrokine beschreiben eine Gruppe von Proteinen, von denen bislang drei Orthologe bekannt sind. Hierzu gehören Gastrokin 1 (GKN1, AMP-18, Foveolin, TFIZ2), Gastrokin 2 (GKN2, Blottin, GDDR, TFIZ1, PRO813, BRICD1B, VLT1465) und Gastrokin 3 (GKN3) [1, 2]. Die Gene des *Gkn*-Clusters sind auf Chromosom 2p13.3 lokalisiert und codieren für verhältnismäßig kleine Proteine mit einer Größe von 181-184 Aminosäuren [3]. Das Vorkommen der Gastrokine wurde zunächst in den Zellen der gesunden Magenschleimhaut beschrieben [4-8], ist jedoch nach den neusten Erkenntnissen mehrerer Studien nicht auf diese beschränkt [9, 10].

Während GKN1 das magenspezifischere Protein ist, gibt es erste Hinweise, dass GKN2 auch in anderen Geweben wie der Plazenta [10, 11] und der Lunge der Maus in geringer Konzentration exprimiert wird [12]. GKN3 ist im Menschen lediglich als inaktiviertes Pseudogen vorhanden, da posttranslational durch eine Nonsense-Mutation ein vorzeitiges Stopp-Codon erzeugt wird und das Protein dadurch seine Funktionalität verliert [4].

Alle der Familie der Gastrokine zugehörigen Proteine wurden ausschließlich in Säugetieren entdeckt, in Fischen und Insekten konnten sie nicht nachgewiesen werden [3]. Bislang wurde den GKNs keine eindeutige physiologische Funktion zugeordnet; dennoch gibt es diverse Thesen zu der Relevanz von Gastrokinen *in vivo*, die im Folgenden näher erläutert werden.

Alle drei GKNs weisen im menschlichen Magen eine hohe mRNA-Konzentration auf, GKN1 gehört mit einem Anteil von 1% der gastralen mRNA sogar zu den häufigsten Transkripten im humanen Magen [1, 13, 14]. Wie Dai et al. [5] herausfanden, ist die Expression von GKN1 und 2 in den Tumorzellen des Magenkarzinoms vermindert, was zu der Annahme führte, dass Gastrokine antiproliferative sowie homöostatische Aktivität besitzen und im Sinne eines Tumorsuppressors fungieren [15-18]. Dass es sich hierbei um ein hoch konserviertes und kompaktes Gen handelt, stützt die These, dass GKNs eine Rolle bei der Koordination und Kontrolle der Transkription spielen könnten [3].

In einer aktuellen Studie zeigte sich in 78% der untersuchten Magenkarzinome vom diffusen Typ und in 42% der Magenkarzinome vom intestinalen Typ ein *Gkn1*-Verlust. Eine verringerte Expression von *Gkn2* konnte in 85% der diffusen sowie 54% der intestinalen Magenkarzinome nachgewiesen werden [19]. Zusätzlich war ein *Gkn2*-Verlust bei Magenkarzinom mit einer verkürzten Überlebenszeit assoziiert [19]. Dies führt zu der Interpretation, dass der Verlust von GKNs überhaupt erst die notwendige Voraussetzung für eine maligne Transformation und damit die Entstehung eines Magenkarzinoms sein könnte, wobei die Inflamationsreaktion im Rahmen einer bakteriellen Infektion als Trigger fungieren könnte (siehe Abschnitt 3.3, S. 7) [3].

### 3.2 Funktion der BRICHOS-Domäne

Gastrokine besitzen eine BRICHOS-Domäne, deren funktionelle Rolle in diesem Kontext bislang ungeklärt ist. Hierbei handelt es sich um eine in wenigen, nicht miteinander verwandten Proteinen gleichermaßen vorkommende Sequenz von ca. 100 Aminosäuren [20]. Allen bekannten BRICHOS-Domänen gemein ist die Position eines Cystein-Paares, welches in der Tertiärstruktur, die bekanntlich in starkem Zusammenhang mit der *in vivo* Funktionalität des fertigen Proteins steht, die Ausbildung einer Disulfidbrücke zur Folge hat [20].

Auffällig ist, dass viele dieser BRICHOS-Proteine im Kontext von Krankheiten wie Demenz, verschiedenen interstitiellen Lungenerkrankungen sowie bei der Malignomentstehung beschrieben wurden und somit klinische Relevanz vermuten lassen [21, 22]. Verschiedene mögliche Funktionen werden für diese Domäne diskutiert, wie beispielsweise Sekretion, intrazellulärer Transport, Propeptidprozessierung und intrinsische Chaperonfunktion [21, 22]. Die letztere Annahme basiert auf der Erkenntnis, dass die Faltung der BRICHOS-Proteine bei Deletionen innerhalb der Sequenz nicht mehr korrekt funktioniert [23]. Die Tatsache, dass *Gkn1* und *Gkn2* in Magenkarzinom-Zelllinien verringert exprimiert werden [13, 15, 16, 19, 24-26], lässt also vermuten, dass die Funktion der BRICHOS-Domäne hier in irgendeiner Weise gestört ist.

Chromosomale Fehler als regelhafte Ursache werden in diesem Fall jedoch als unwahrscheinlich erachtet [25], da zytogenetische Aberrationen im Bereich der *Gkn*-Genloci (2p13.3) nur sehr selten vorkommen [27-29]. Daher ist anzunehmen, dass

der Grund für den *Gkn*-Verlust in gastralen Tumorzellen auf einer anderen Ebene zu finden ist. In einigen Magenkarzinomen wurde eine Hypermethylierung des *Gkn1*-Promotors gefunden [26], was die Inhibition der *Gkn*-Expression durch epigenetische Mechanismen nahelegt [30].

### 3.3 Protektive Rolle der Gastrokine

Es ist weiterhin bekannt, dass Gastrokine nicht nur im Rahmen der Onkogenese, sondern auch bei der Immunantwort auf inflammatorische Veränderungen im Intestinaltrakt eine Rolle spielen [2, 24, 31-33]. Es wurde mehrfach gezeigt, dass in von *Helicobacter pylori* infizierten Magenschleimhautzellen sowohl die mRNA von GKN1 und GKN2 als auch die reifen Proteine in einer geringeren Menge vorhanden sind als bei gesunden Individuen [2, 24, 31-33].

Dass sich eine Reduktion der *Gkn*-Expression in gastralen Epithelzellen gleichermaßen im Zusammenhang mit Aspirin-assoziierten Schleimhautläsionen zeigt, weist auf eine Ursache hin, die weniger mit der Keimbildung bei einer *H. pylori*-Gastritis, als vielmehr mit einem generell entzündlichen Geschehen an sich zu tun hat [3, 34]. Dies lässt darauf schließen, dass Gastrokine möglicherweise unter normalen Bedingungen leichtere Entzündungsprozesse unterdrücken, diese Fähigkeit jedoch durch beispielsweise eine Infektion mit *H. pylori* verloren geht [12]. Grund dafür ist womöglich die Regulierung der Transkription von *Gkn1* und 2 durch proinflammatorische Zytokine [3]. Nach dieser Theorie könnten Mediatorproteine wie IL-1-beta und TNF-alpha direkt die Expression der ihrerseits antiinflammatorisch agierenden Gastrokine beeinflussen. Tatsächlich fanden Baus-Loncar et al. [12] heraus, dass die oben aufgeführten Zytokine die Aktivität des *Gkn2*-Promotors wahrscheinlich über den NFkB Signalweg herunterregulieren.

Auch im Intestinaltrakt außerhalb des Magens scheinen GKNs eine Rolle zu spielen. Wie Oien et al. [13] und Du et al. [35] zeigten, wurden Gastrokine in abheilenden Arealen der von Morbus Crohn betroffenen Zellen des Kolonepithels nachgewiesen. Der genaue Funktionsmechanismus ist an dieser Stelle nicht ausreichend erforscht, nachweislich festgestellt werden konnte jedoch eine regelhaft erhöhte GKN-Konzentration in sich in Abheilung befindlichen Zellverbänden des Magen-Darm-

Traktes, wie man sie beim Morbus Crohn oder in ulcer-associated cell lineages (UACL) vorfindet [3].

Dies suggeriert eine reaktive Produktion der Proteine in Regionen abklingender Entzündungen und gleichzeitig eine entscheidende Funktion bei der Wundheilung.

## 3.4 Trefoil-Faktor-Proteine

### 3.4.1 Allgemeines

Die Proteine der trefoil factor family (TFF1, TFF2 und TFF3) sind eine schon seit längerem bekannte Gruppe magenspezifischer Proteine, die, ähnlich wie Gastrokine, von den Magenschleimhautzellen in den Muzinfilm sezerniert werden und dort tumorsupprimierende sowie zytoprotektive Aufgaben erfüllen [12, 36, 37]. Ihren Namen haben die Proteine ihrer charakteristischen, an ein Kleeblatt erinnernden Tertiärstruktur zu verdanken. Diese kommt durch Cystein-Reste an sechs verschiedenen Positionen zustande, welche jeweils paarweise Disulfidbrücken ausbilden (Cys1-Cys5, Cys2-Cys4, und Cys3-Cys6) und so zu einer Faltung der Aminosäurekette zu drei großen Bögen führen [38]. Während TFF1 und TFF3 nur eine Kleeblattstruktur besitzen, verfügt TFF2 über zwei dieser auszeichnenden Domänen [38, 39]. Ähnlich wie die GKNs spielen Trefoil-Proteine eine große Rolle bei der Erhaltung der mukosalen Integrität. Man konnte zeigen, dass nach Schleimhautschädigungen unterschiedlichster Art ein starker Anstieg der Expression von allen drei TFFs nachzuweisen war [40]. Trotz dieser und weiteren tumorsupprimierenden Wirkungsweisen der Trefoil-Proteine im homöostatischen und antiapoptotischen Bereich [41], konnte paradoxerweise auch in mehreren tumorassoziierten Zelllinien eine erhöhte Konzentration festgestellt werden [42] [36]. Diese uneinheitlichen Ergebnisse werfen Fragen auf, die bis heute nicht eindeutig geklärt sind. Kontrovers scheint, dass TFFs in extragastralen maligne veränderten Zellen und sogar in solchen des Magens im Sinne eines Onkogens zur Angio- und Karzinogenese beizutragen scheinen [37, 43]. TFF1 wurde ursprünglich sogar im Rahmen einer Forschungsarbeit über Mammakarzinome als in solchen Zelllinien überexprimiertes Protein entdeckt [42, 44], welches allerdings einen günstigen Prognosefaktor für die betroffenen Patienten darstellte [45].

### 3.4.2 Interaktion von Trefoil-Faktoren mit Gastrokinen

Die Kontroverse wurde durch neue Erkenntnisse insoweit relativiert, als dass man zeigen konnte, dass Gastrokine und TFFs *in vitro* und *in vivo* als Heterodimere aneinander gebunden vorliegen können. Aus diesem Grund werden GKNs auch als trefoil factor interacting proteins (TFIZ) bezeichnet [12, 46]. Voraussetzung für diese kovalente Bindung ist das Vorhandensein eines freien Cystein-Restes an beiden beteiligten Bindungspartnern des Heterodimers zur Ausbildung einer Disulfid-Brücke. Da lediglich TFF1 (freies Cys 58) und TFIZ1 (freies Cys 38), welches gleichbedeutend ist mit GKN2, über diese Eigenschaft verfügen, wird die Formation von Heterodimeren in erster Linie zwischen eben diesen Proteinen beobachtet [46]. Weder TFF2 und TFF3 noch GKN1 und GKN3 weisen ein freies Cystein auf, daher beschränkt sich die Interaktion zwischen Trefoil-Faktoren und Gastrokinen nach dem aktuellen Kenntnisstand auf GKN2-TFF1 Heterodimere [3, 37]. Menheniott et al. üben aus diesem Grund Kritik an der Bezeichnung von GKN1 als TFIZ2 [3].

Unter dem Aspekt, dass GKN2-TFF1-Heterodimere vor allem in gesundem Magengewebe gefunden wurden [37], ist es interessant zu beobachten, dass sich die Konzentrationen von GKN2 und TFF1 in malignen Zellen nahezu umgekehrt proportional zueinander verhalten – die Expression des Gastrokins ist deutlich erniedrigt, während die des Trefoil-Proteins im selben Gewebe gesteigert ist [34, 37]. Dies lässt auf ein enges Zusammenspiel und potentielle gegenseitige Beeinflussung beider Proteine schließen. Möglicherweise ist eine Heterodimerisierung sowohl für GKN2 als auch für TFF1 essenziell für eine korrekte Funktionsweise [3].

Im gesunden Magen ist GKN2 abundant vorhanden, es ist also davon auszugehen, dass die meisten dieser Proteine [3] an TFF1 gebunden vorliegen und somit beide Proteine ihrer Rolle als Tumorsuppressor gerecht werden können. In onkogenetisch veränderter Magenschleimhaut, wo GKN2 aufgrund verringerter Expressionsraten in geringerem Maße vorhanden ist oder in anderen Geweben des Körpers, in denen GKN2 physiologisch gar nicht vorkommt, verschiebt sich das Gleichgewicht jedoch zugunsten des Trefoil-Faktors [34]. Dies hat eine Zunahme der Ausbildung von TFF1-Homodimeren zur Folge [37], welche potentiell proonkogen wirken [47, 48]. Tatsächlich werden erhöhte TFF1-Level insbesondere in Tumoren der Mamma, des

Pankreas oder in Gallengangskarzinomen gefunden [45, 47, 49, 50]. In keinem dieser Gewebe ist bisher (Stand 04/2021) eine *Gkn2*-Expression beschrieben [51].

### 3.5 Rolle der GKNs in der Plazenta

Außerhalb des Magens wurden Gastrokine vor allem durch unsere Arbeitsgruppe in der Plazenta oder dem assoziierten Dottersack beschrieben [9, 10, 52]. Fahlbusch et al. untersuchten die Expression von *Gkn1* und *Gkn2* im plazentaren Gewebe in Abhängigkeit des Gestationsalters. Beide Proteine konnten in der Plazenta nachgewiesen werden. Während GKN1 nur im dritten Schwangerschaftsdrittel und ausschließlich in Zellen des extravillösen Trophoblasten (EVT) gefunden wurde [10], zeigte GKN2 ein komplexeres trophoblastäres Expressionsmuster, welches sich im Verlauf der Schwangerschaft änderte [9]. Im ersten Trimenon ließen sich GKN2-Färbungen sowohl im EVT als auch im villösen Trophoblasten (VT) entlang des Synzytiotrophoblasten (SCT) nachweisen [9]. Dies könnte für eine Rolle des GKN2 in Bezug auf Zell-Zell-Kontakte und damit für die Differenzierung des VT sprechen [5]. Im dritten Trimenon verschwand die Positivität für GKN2 im SCT, im EVT blieb sie jedoch erhalten [9]. Nun zeigte sich nicht mehr, wie in der frühen Schwangerschaft, eine gleichmäßige Verteilung der angefärbten Areale, sondern ein kappenartig-direktionales Muster im EVT in Richtung der fetalen Seite der Plazenta [9]. Während der gesamten Schwangerschaft konnte GKN2 außerdem in Myofibroblasten sowie in glatten Muskelzellen der villösen Gefäße angefärbt werden [9]. Diese Erkenntnisse sprechen für eine Relevanz von GKN2 für die korrekte Entwicklung der Plazenta. Die kappenartig-direktionale Anordnung des GKN2 im letzten Schwangerschaftsdrittel legt nahe, dass die bereits im Magen beschriebene antimigratorische Wirkung von GKN2 hier mitverantwortlich für eine fehlerfreie deziduale Verankerung der Plazenta zu sein scheint [9, 53].

Bislang gibt es nur wenige Studien zur Rolle von Gastrokinen bei verschiedenen Plazentapathologien. Entsprechend ihrer bekannten Rolle als Tumorsuppressor zeigten sich *Gkn1* und *Gkn2* in der Chorionkarzinom-Zellreihe sowie in Neoplasien des Trophoblasten signifikant vermindert [9, 10]. Da diese Malignome durch eine erhöhte Invasivität transformierter Trophoblasten charakterisiert sind [54], lässt sich

annehmen, dass Gastrokine in gesunden Plazentazellen inhibitorisch auf Migration, Zellproliferation und Invasion wirken [10]. Diese Hypothese stimmt mit der Beobachtung überein, dass sowohl für GKN1 als auch für GKN2 bereits im Magen tumorsuppressive Aktivität beschrieben wurde [5, 34]. Hierzu passt auch, dass die Invasion der Plazentazellen der von malignen Tumorzellen sehr ähnelt, wobei sie im Gegensatz zu diesen einer strengen Regulation unterliegt und aus diesem Grund auch als „pseudo-maligne“ bezeichnet wird [55]. Die Zellen des EVT weisen zwar ein invasives Verhalten auf, ihre Invasion ist aber in Dauer und Tiefe begrenzt [56, 57]. Einen Ausnahmefall stellt der weniger invasive placental site trophoblastic tumor (PSTT) dar, bei dem GKN1 weiterhin nachweisbar war [10].

Ein erhöhtes invasives Potential im Rahmen einer malignen trophoblastären Transformation könnte also die Entstehung von Plazentatumoren begünstigen. Andersherum führt aber auch eine zu geringe extravillöse Trophoblasteninvasion zu pathologischen Veränderungen. So ist beispielsweise bekannt, dass eine ausreichende Invasion des EVT in die maternale Dezidua essentiell für eine korrekte Ausbildung und Reifung der Spiralarterien ist [58-60]. Diese wiederum sind für die Aufrechterhaltung der plazentaren Durchblutung und damit für die altersgerechte Entwicklung des Feten unabdingbar [61]. Bei Plazentapathologien (i.e. intrauterine Wachstumsrestriktion – IUGR, Präeklampsie – PE oder der Kombination IUGR/PE), die mit einer plazentaren Minderversorgung des Feten assoziiert sind, wird zudem angenommen, dass im Gestationsverlauf keine physiologische Differenzierung des Trophoblasten erfolgt und daher die synzytiale Transportkapazität negativ beeinträchtigt ist [62]. Diese trophoblastären Entwicklungsstörungen werden auch in der Ätiopathologie des HELLP-Syndroms als Maximalausprägung der PE diskutiert [63]. In Plazentaprobe von HELLP-Patientinnen konnte GKN2 im dritten Trimenon sowohl in der PCR als auch immunhistochemisch im SCT nachgewiesen werden, während sich immunhistochemisch bei gesunden Plazenten zu diesem Gestationszeitpunkt lediglich der EVT positiv auf GKN2 zeigte [9]. Diese alterierte GKN2-Verteilung und die erhöhte villöse GKN2-Konzentration könnten mitverantwortlich für oder Ausdruck einer unzureichenden Trophoblastendifferenzierung sein.

Diese Tatsache könnte auf eine epigenetische Regulation von GKN2 [25] auch in der Plazenta hinweisen, zumal wir in unseren vorausgehenden Studien zeigen konnten, dass sich in HELLP-Plazenten ein verstärkter epigenetischer Einfluss auf die synzytiale Genexpression im Vergleich zu anderen Schwangerschaftspathologien findet [64].

### 3.6 Intrauterine Wachstumsrestriktion und Präeklampsie

Die intrauterine Wachstumsrestriktion (engl. intrauterine growth restriction, IUGR) beschreibt eine pränatale Entwicklungsstörung, welche ihren Ursprung in einer Minderversorgung des Feten hat und zumeist mit einer pathologischen Dopplersonographie der Aa. umbilicales oder Aa. uterinae einhergeht [65]. Die IUGR kann dazu führen, dass sich Feten im Mutterleib nicht entsprechend ihres Gestationsalters entwickeln und zu klein imponieren (engl. small for gestational age, SGA). Die Begriffe SGA und IUGR werden in der Literatur häufig kongruent benutzt, bezeichnen aber verschiedene Schwangerschaftsverläufe. IUGR Neonaten können demnach ein Geburtsgewicht unterhalb der 10. Perzentile aufweisen, müssen dies definitionsgemäß aber nicht. Entscheidend für die Einteilung als IUGR ist vielmehr die Tatsache, dass die betroffenen Feten während der Schwangerschaft nicht mehr perzentilengerecht wachsen (Perzentilenkreuzen als Ausdruck eines dynamischen Wachstumseinbruchs). SGA Feten hingegen zeigen ein kontinuierlich reduziertes intrauterines Wachstum unterhalb der 10. Perzentile. Somit können IUGR-Feten potenziell bei Geburt auch normalgewichtig sein [66]. Da die beiden Gruppen ein anderes Risikoprofil hinsichtlich intrauteriner und perinataler Komplikationen zeigen, ist eine pränatale Differenzierung essenziell [67].

Ursprung der interuterinen Mangelversorgung bei IUGR können sowohl maternale als auch fetale oder uteroplazentare Pathologien sein. Weltweit sind ca. 24% aller Neugeborenen von IUGR betroffen [65, 68].

Unterschieden wird bei der IUGR eine frühe (30%) und eine späte (70%) Form [68]. Die späte Form, auch asymmetrische Retardierung genannt, ist gekennzeichnet durch einen durchschnittlichen Kopfumfang bei gleichzeitig verringertem somatischem Wachstum des restlichen Körpers und stellt eine Pathologie des dritten

Trimesters dar [68, 69]. Bei der selteneren frühen Form, der symmetrischen Restriktion, welche auf eine bereits im 2. Trimester bestehende Minderversorgung des Feten hinweist, ist das gesamte Wachstum einschließlich des Kopfumfangs deutlich verringert [68]. Beide IUGR Formen gehen nicht nur mit einer erhöhten Rate an Frühgeburten und einer erhöhten Morbidität und Mortalität einher, sondern können im Rahmen der fetalen Programmierung auf weite Sicht auch einen Risikofaktor für das Auftreten von Diabetes mellitus Typ II, Adipositas und kardiovaskulären Erkrankungen (Metabolisches Syndrom) darstellen [70-72].

Die plazentare Ursache für IUGR wird in der Literatur als Fehlregulation der trophoblastären Entwicklung in den ersten Schwangerschaftswochen beschrieben [59]. Es wird angenommen, dass durch eine unvollständige Differenzierung des intra- und/oder extravillösen Trophoblasten eine funktionelle Plazentainsuffizienz entsteht. Diese manifestiert sich jedoch nicht vor Ende des zweiten Trimesters, da zu diesem Zeitpunkt die fetalen Stoffwechselansprüche rasch ansteigen. Pathogenetisch ist an diesem Vorgang vor allem der extravillöse Trophoblast (EVT) beteiligt, da dieser essentiell für die Regulation des maternalen Spiralarterientonus ist. In der Folge ist die plazentare Versorgung (Minderperfusion) und die Angiogenese villöser Gefäße gestört, mit der Folge einer embryonalen Unterversorgung [59].

Auch der Präeklampsie (PE), einer schweren Spätgestose, die mit Hypertonie und Proteinurie einhergeht und ca. 5-7% aller Schwangeren betrifft, liegt eine trophoblastäre Differenzierungsstörung zugrunde, die in diesem Fall vor allem den intravillösen Trophoblasten zu betreffen scheint [59, 73]. Weitere mögliche bei der PE auftretende Symptome sind eine maternale Thrombozytopenie, Leber-/Nierendysfunktion sowie Ödeme [74]. Ursächlich ist möglicherweise eine Immunreaktion der Mutter, welche durch trophoblastäre Zellfragmente im intervillösen Raum ausgelöst wird. Diese Fragmente werden in der Spätschwangerschaft im Rahmen von nekrotischen und apoptotischen Prozessen pathologischerweise freigesetzt, welche wiederum durch die plazentare Differenzierungsstörung und die somit unzulänglich ausgebildete Plazentabariere bedingt sein könnten [59].

Sofern der Gestose eine frühe Störung der gemeinsamen Trophoblastendifferenzierung zugrunde liegt, können IUGR und PE auch häufig in Kombination auftreten [59].

### 3.7 Nagetiermodelle intrauteriner Wachstumsrestriktion

Zur Klärung plazentarer Pathomechanismen der IUGR und ihrer Folgen für die postnatale Entwicklung (sogenanntes „developmental origins of health and disease Theorem“ [75]), wird oft auf das Tiermodell von Ratte und Maus zurückgegriffen. Die Plazenta dieser Tiere besitzt, ähnlich der des Menschen, einen hämochorialen Aufbau, zeigt jedoch eine andere Kompartimentierung, was die Übertragbarkeit von Erkenntnissen aus Tierversuchen auf menschliche Erkrankungen zum Teil limitiert [76]. Für die Untersuchung zur plazentaren Expression von Gastrokinen wurde sowohl ein alimentäres IUGR Rattenmodell (maternale Proteinmangel Diät), als auch ein genetisches PE/IUGR Mausmodell (knockout der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase, eNOS<sup>-/-</sup>) verwendet, deren Besonderheiten im Folgenden kurz näher erläutert werden.

#### 3.7.1 Alimentäres IUGR Rattenmodell (maternale Proteinmangeldiät)

In diesem Modell erhalten die Muttertiere während der Schwangerschaft eine isokalorische Niedrigproteindiät (8% Proteingehalt, LP - low Protein). Die Kontrollgruppe (NP – normal protein) erhält Standardfutter mit 17% Proteingehalt. Während der Laktation erhalten beide Gruppen Standardfutter mit 17% Proteingehalt. Die Proteinrestriktion während der Schwangerschaft induziert eine IUGR (Verringerung des Geburts- und Plazentagewichts) bei den LP-Nachkommen im Vergleich zur Kontrollgruppe [77]. Dieses Modell wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits im Vorfeld zur Untersuchung von IUGR-assoziierten Kurz-, sowie Langzeitfolgen (fetale Programmierung renaler, kardialer und endokriner Prozesse) für die Nachkommen herangezogen [78, 79]. Zudem fanden die initialen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zur Rolle von plazentarem GKN2 in gesunden Kontrolltieren dieses Zuchthintergrunds statt [9].

### 3.7.2 IUGR im eNOS<sup>-/-</sup> Mausmodell mit Präeklampsie-ähnlichen Veränderungen

Zusätzlich zu unserem alimentären IUGR Modell der Ratte untersuchten wir die plazentare Expression von Gastrokinen in einem genetischen eNOS-knockout-Modell der Maus (eNOS<sup>-/-</sup>) [79].

Verlust der eNOS bedingt während der Plazentaentwicklung eine Störung adaptiver Prozesse im Rahmen des dezidualen Spiralarterienumbaus mit konsekutiv erhöhtem Gefäßwiderstand. In der Folge zeigen eNOS<sup>-/-</sup> Mäuse eine verminderte fetoplazentare Perfusion mit uteroplazentarer Hypoxie [80] und konsekutiver IUGR [81-84]. Zudem führt die chronische Inhibierung der NO-Synthese während der Schwangerschaft bei Muttertieren zu Präeklampsie-ähnlichen Bedingungen mit Hypertonie und renaler Dysfunktion (verminderter Perfusion, Proteinurie). Dies bedingt eine erhöhte feto-maternale Morbidität und Mortalität [85]. Wir wählten bewusst die eNOS-Defizienz als Ätiopathologie der PE/IUGR, da unsere Vorergebnisse zu GKN2 in der humanen Plazenta Expressionsveränderungen unter vergleichbaren Schwangerschaftsbedingungen nahelegten [11].

## 4. Hypothese/Fragestellung

In den letzten Jahren haben die Erkenntnisse über die funktionelle Implikation von Gastrokinen zugenommen. Der Fokus der bisherigen Forschung lag dabei vor allem auf der gastralen Rolle dieser Proteine, basierend auf ihrer prädominanten Expression in diesem Organ und ihrer ätiopathologischen Rolle im Rahmen der Magenkarzinom-Entstehung und Metastasierung. Erst vor kurzem konnte unsere Arbeitsgruppe jedoch zeigen, dass Gastrokine auch extragastrale Funktionen haben, so etwa in Rahmen der Plazentogenese. Aufbauend auf diesen Voruntersuchungen soll die aktuelle Studie daher folgende weiterführende Fragen beantworten:

1. Lassen sich aus etablierten Tiermodellen der IUGR in der Ratte bzw. der PE/IUGR in der Maus komparativ weitere Erkenntnisse zur funktionellen Rolle von Gastrokinen in der menschlichen Plazenta gewinnen?
2. Findet sich eine relevante Expression von Gastrokinen in weiteren extragastralen Geweben?
3. Finden sich Speziesunterschiede (human versus Maus/Ratte) hinsichtlich der organspezifischen Lokalisation von Gastrokin 2?

## 5. Methoden

Detaillierte Herstellerangaben und Spezifikationen aller verwendeten Materialien sind der Materialliste am Ende dieser Arbeit (Abschnitt 9.4, S. 87) zu entnehmen.

### 5.1. Ethik

Alle Tierversuche wurden gemäß dem NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals und der EU-Richtlinie 2010/63/EU durchgeführt und von der entsprechenden staatlichen Einrichtung (Regierung von Mittelfranken, AZ #54-2531.31-31/09 und AZ #55.2-2532-2-820) genehmigt. Alle Verfahren wurden unter angemessener, ausreichender Anästhesie und Analgesie durchgeführt.

### 5.2 Tiermodelle

Die Plazentaprobe, welche für den Expressionsnachweis der Plazentapathologien verwendet wurden, entstammen dieser Dissertation vorausgegangenen Studien von Mocker et al. [79] und Schmidt et al. [77].

#### 5.2.1 Alimentäres IUGR Rattenmodell

Die Tierversuche wurden wie zuvor ausführlich durch unsere Arbeitsgruppe beschrieben durchgeführt [77]. Die weiblichen Wistar-Ratten wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) erworben. Nach Bestätigung der Schwangerschaft wurden die Tiere zufällig auf zwei Gruppen verteilt und erhielten Spezialfutter (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland), welches entweder aus einer proteinarmen (LP-Gruppe, 25 g/d Altromin C1003, 8% Protein) oder aus einer isokalorischen Diät mit normalem Proteingehalt (NP-Gruppe, 25 g/d Altromin C1000, 17% Protein) bestand. Jede Gruppe bestand aus vier Muttertieren. Die Feten wurden zum Zeitpunkt E18.5 per Kaiserschnitt entnommen. Für unsere Analyse wurden 6 Tiere pro Wurf (je 3 Weibchen und 3 Männchen) ausgewählt. Die Plazentaprobe wurden wie zuvor beschrieben verarbeitet [77]. Die Eigenschaften der Tiere sind in Abbildung 11 a (S. 38) gezeigt. Das fetale Geschlecht wurde durch PCR der

geschlechtsbestimmenden Region des Y (SRY)-Gens festgestellt, wie von Schmidt et al. beschrieben [77].

Die geschlechtsspezifische Expressionsanalyse diente der Identifikation von Dimorphismen, wie sie im Bereich der Plazentaentwicklung und auch bei plazentaren Adaptionsmechanismen im Rahmen von Schwangerschaftskomplikationen vorbeschrieben sind [86].

### 5.2.2 PE/IUGR eNOS-knockout Mausmodell

Die homozygoten eNOS<sup>-/-</sup> Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund wurden von Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA) erworben. Mäuse vom Wildtyp (WT) C57BL/6 dienten als Kontrolle. Die Tiere wurden bei 22°C gehalten und einem 12-Stunden-Tag-/Nachtzyklus ausgesetzt. Es wurde uneingeschränkter Zugang zu Standardfutter (SSNIFF V1534, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Leitungswasser gewährt. Nach einer homozygoten Paarungsstrategie wurde die Schwangerschaft an Tag E0.5 durch das Vorhandensein eines vaginalen Spermapfropfens verifiziert. Die Entnahme der Plazenta erfolgte an Tag E15 und E18.5 der Schwangerschaft. Die Tiermerkmale werden in Abbildung 11 b (S. 38) gezeigt.

Für die immunhistochemischen und molekularen Analysen dieser Studie hatten wir nur Zugang zu Plazenten männlicher Feten.

### 5.3 Gewebeentnahme und Aufbereitung

Die Gewebeproben von Maus und Ratte wurden freundlicherweise von der AG Prof. Dr. rer. nat. Hartner für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden nach der Entnahme entweder sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur RNA- und Proteinextraktion bei -80 °C gelagert oder in Methyl-Carnoy-Lösung oder 4% Paraformaldehyd (PFA) zur immunhistochemischen Färbung fixiert.

Für die hier vorgestellten Untersuchungen an humanem Gewebe wurden uns freundlicherweise in Kooperation ein humaner tissue microarray und ergänzende Dünnschnittpräparate von Hoden und Lunge vom Lehrstuhl für Allgemeine

Pathologie und Pathologische Anatomie, Universitätsklinikum Erlangen anonymisiert zur Verfügung gestellt.

## 5.4 Bestimmung der Genexpression in den Geweben

### 5.4.1 RNA Extraktion

Die RNA-Extraktion sowie die Genexpressionsanalysen wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt [79, 87]. Für die RNA-Extraktion aus Plazentagewebe der Ratte wurde peqGold TriFast-Reagenz (Peqlab, Erlangen, Deutschland) verwendet, Plazentagewebe der Maus wurde unter Verwendung des RNeasy Mini Kit mit DNase-Behandlung (Qiagen, Hilden, Deutschland) protokollgemäß extrahiert. Die RNA-Konzentrationen wurden mittels NanoDrop-Spektrophotometrie (Peqlab, Erlangen, Deutschland) gemessen und die Endkonzentration auf 50ng/μl eingestellt. Die Transkription zu komplementärer DNA (cDNA) wurde mit *TaqMan Reverse Transcription reagents* (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) mit *random hexamer primers* in einem Biometra Trio-Thermocycler (Analytik Jena, Jena, Deutschland) durchgeführt [87]. Um eine Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden, wurden Negativkontrollen ohne reverse Transkriptase durchgeführt.

### 5.4.2 Umschreiben von RNA in cDNA durch Reverse Transkriptase

Hierfür wurde der Reverse Transcription Master-Mix wie in Fahlbusch et al. [11] verwendet. Dieser beinhaltet:

- RNA (2ng/μl)
- MgCl<sub>2</sub>
- 10x RT-Puffer
- dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphate)
- random hexamers (Primer)
- RNase-Inhibitor
- Reverse Transcriptase Multiscribe (50U/μl).

Das Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ ) ist hierbei für eine erhöhte Spezifität der Primer erforderlich; darüber hinaus benötigt das verwendete Enzym  $\text{Mg}^{2+}$ . Der RNase-Inhibitor sorgt dafür, dass die umzuschreibende RNA nicht von ubiquitär vorkommendem RNAsen abgebaut wird [88, 89].

Die Einstellungen des Thermocyclers waren wie folgt:

10min	25°C
45min	48°C
5min	95°C
Unendlich	4°C

### 5.4.3 Real Time Quantitative PCR mit SYBR® Green Master Mix

Anschließend wurde die gewonnene doppelsträngige cDNA im quantitativen Real Time PCR Verfahren (qRT-PCR, dt.: quantitative Echtzeit-PCR) amplifiziert [90]. Der für diese Reaktion verwendete SYBR® Green Mastermix enthielt

- $\text{MgCl}_2$
- dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphate)
- SYBR® Green I Farbstoff
- AmpliAq Gold® Fast DNA Polymerase.

Hinzuzufügen sind noch zweifach destilliertes  $\text{H}_2\text{O}$ , forward (FP) und reverse (RP) primer des jeweiligen Zielgens (housekeeping-Gen 18S, *Gkn1* bzw. *Gkn2*) sowie die zu untersuchenden cDNA-Proben. Alle Komponenten bis auf letztere werden mit einer Multipette in die Vertiefungen einer 96-Well Mikrotiterplatte vorgelegt. Die verwendeten Mengen variieren je nach Konzentration der Reagenzien. Die verschiedenen cDNA-Proben werden anschließend einzeln dazugegeben, wobei jeweils eine Doppelbestimmung erfolgte. Für einige Proben werden zusätzlich Negativkontrollen angesetzt, die alle oben genannten Komponenten mit Ausnahme der Polymerase enthalten.

Die Primer binden nun in dem jeweiligen Zielgen eine für selbiges spezifische Sequenz, welche in den folgenden 40 Zyklen durch die AmpliAq® Fast DNA Polymerase spezifisch vervielfältigt wird. Der in dem Puffer enthaltene Farbstoff

SYBR® Green I interkaliert mit dem während der PCR-Zyklen entstehenden DNA-Doppelstrang.

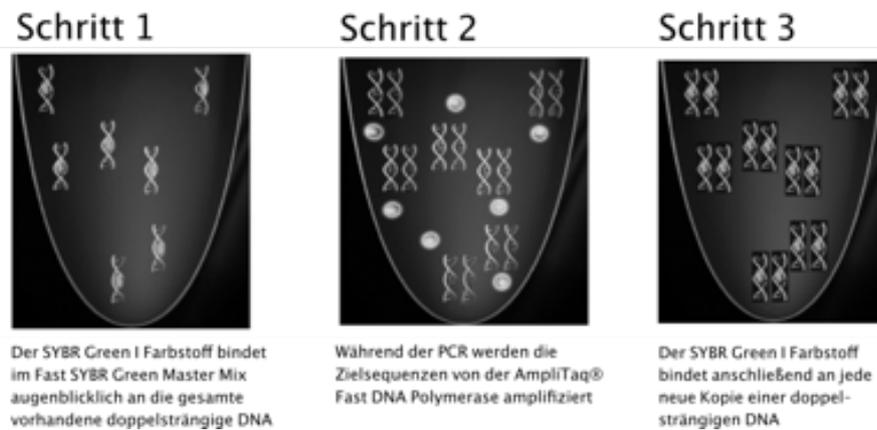


Abb. 1: Rolle des SYBR Green® I in der RT-PCR. Modifiziert nach ThermoFisher Scientific [91].

Schritt	Zeit	Temperatur	Kommentar
Reverse Transkription	30min	50°C	
Initialer Schritt zur Aktivierung der PCR	20s	95°C	Durch diese Erwärmung wird die DNA Polymerase aktiviert
<b>3-schrittiger Zyklus:</b>			
Denaturierung	3s	95°C	
Hybridisierung/Elongation	30s	60°C	Ungefähr 5-8°C unterhalb $T_m$ der Primer
Anzahl der Zyklen	35-45		Die Anzahl der Zyklen hängt von der Anzahl der Genproben sowie der Transkriptmenge ab, hier: 40

Tab. 1: Ablauf der RT-PCR. Modifiziert nach Sample & Assay Technologies [92].

Die bei diesem Schritt von SYBR® Green I emittierte Fluoreszenz kann während der PCR in Echtzeit quantitativ gemessen und dadurch die Expressionsrate indirekt über die DeltaDeltaCt Methode [93] in Relation zum housekeeping Gen quantifiziert werden.

Die Proben wurden jeweils als Doppelbestimmung gemessen, wobei 18S-rRNA als Referenzgen diente. Die Ergebnisse wurden mit der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ausgewertet. Die Primer wurden unter Verwendung der Primer Express Software (Version 3.0.1, Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) oder Primer-BLAST (NCBI, NIH) entworfen. Die Sequenzen sind in Abschnitt 9.4, S. 87 aufgeführt. Das PCR-Verfahren wurde bei der Ratte auf Plazenten von 6 Feten pro Wurf von jeweils 4 NP- und 4 LP-Muttertieren angewandt. Im Mausmodell wurde Plazentagewebe von 2 Feten von je 6 eNOS<sup>-/-</sup> Muttertieren und 5 C57BL/6-Wildtyp-Kontrollen zu zwei unterschiedlichen Gestationszeitpunkten (E15, E18.5) untersucht.

## 5.5 Immunhistochemische Analysen

Für die Färbung der untersuchten Schnitte wurde die Peroxidase-Färbung verwendet, deren einzelne Schritte (siehe auch Abschnitt 9.3, S. 86) im Folgenden näher erläutert werden.

### 5.5.1 Deparaffinieren

Zunächst wurden die Schnitte in einer mehrschrittigen Reaktionsreihe, bestehend aus

- 3x 5min Xylol
- 3x 3min 100% EtOH
- 2x 2min 95% EtOH

deparaffiniert und im Anschluss rehydriert und daraufhin kurz in Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) gewaschen. Anschließend hat es sich bewährt, die Schnitte für ca. 20min zu kochen. Dieser Schritt nennt sich antigen retrieval (dt.: Antigendemaskierung) und hat zum Ziel, die Immunreaktivität des bereits auf dem

Objektträger fixierten Gewebes zu erhöhen. Durch die Fixierung ist zuvor eine Quervernetzung der Proteine erfolgt, sodass diese zum Teil nicht mehr von spezifischen Antikörpern erkannt werden können. Das Kochen der Proben kann diesen Prozess zum Teil rückgängig machen. Dafür werden die Objektträger in einen Färbebehälter aus Plastik gestellt, dieser wird mit 10-fach verdünnter target retrieval solution (TRS) aufgefüllt und anschließend in einen Schnellkochtopf mit destilliertem Wasser gestellt, das nun auf der Herdplatte für eine definierte Zeit, in unserem Fall für 20min, zum Kochen gebracht wird. Vor der weiteren Verarbeitung lässt man die Proben abkühlen.

### 5.5.2 Oxidation und Blocken

Es folgt eine Oxidation in 3%iger Peroxidlösung (10ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf 90ml Aq. dest.) über 20min bei Raumtemperatur. Nach einem weiteren Waschschrift (3x 3min TBS) werden die einzelnen Schnitte getrocknet und mit einem Fettstift umrandet. Nun schließt sich der für eine aussagekräftige Immunhistochemie essenzielle Blocking-Schritt an. Hierbei wird der Objektträger mit 100% fetal calf serum (FCS) benetzt und eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert.

Das sorgt dafür, dass später die primären Antikörper nur auf dem gesuchten Antigen haften bleiben, nicht jedoch auf zusätzlichen unspezifischen Bindungsstellen wie freiem Kollagen und anderen quervernetzten Gewebeelementen [94].

### 5.5.3 Primärantikörper

Die anschließend aufgetragenen primären Antikörper richten sich je nach gesuchtem Protein entweder gegen GKN1 oder GKN2. Zur immunhistochemischen Färbung Paraffin-fixierter humaner Dünnschnitte wurden für GKN1 monoklonale Mouse-Antikörper verwendet, für GKN2 wurden polyklonale Rabbit-Antikörper als Primärantikörper eingesetzt. Die optimale Verdünnung lag bei Antikörper (AK) zu 1% BSA/TBS gleich 1:50 und wurde im Vorfeld mit humanem Magen als Positivkontrolle etabliert. Hiermit ist der erste Tag der Färbung abgeschlossen und die Objektträger werden zur Lagerung über Nacht bei 4°C inkubiert.

### 5.5.4 Sekundärantikörper

Am nächsten Tag wurden die Proben als erstes gewaschen (3x TBS) und mit den Sekundärantikörpern ebenfalls in optimaler Verdünnung (AK zu 1%-BSA/TBS gleich 1:500) versehen. Diese sind abhängig von der Ursprungsspezies der verwendeten Primärantikörper. Zum Detektieren von GKN1 wurden demnach biotinylierte IgG-Antikörper vom Anti-Mouse-Typ, für GKN2 solche vom Anti-Rabbit-Typ gewählt. Durch diese Biotinylierung lassen sich die Antikörper und somit das Protein später leichter nachweisen (s. Abschnitt 5.5.5).

### 5.5.5 Signalverstärkung durch die Avidin/Biotin-Methode

Um die Stärke der immunhistochemischen Reaktion zu vervielfachen, wurde auf die Avidin-Biotin-Methode zurückgegriffen. Diese beruht auf der Fähigkeit des basischen Glykoproteins Avidin, in seinen vier hydrophoben Taschen jeweils ein Molekül des Vitamins Biotin zu binden. Der biotinylierte Sekundärantikörper kann darüber also eine Bindung mit dem Avidin eingehen und somit eine von dessen vier Bindungsstelle besetzen. An die restlichen freien Stellen kann jeweils ein Enzym, in diesem Fall eine ebenfalls biotinylierte Peroxidase, binden [56, 95].

### 5.5.6 Sichtbarmachen durch DAB

Um die markierten Antigene sichtbar zu machen, benötigt es eine chromogene Reaktion. Hierfür sorgt die Avidin-konjugierte Meerrettich Peroxidase (HRP). Als Komplex mit ihrem gebundenen Substrat  $H_2O_2$  ist sie in der Lage, den in Wasser und organischen Lösungsmitteln unlöslichen [96] Farbstoff DAB (3,3'-Diaminobenzidin) zu oxidieren, was in einem braunen Farbumschlag resultiert.

### 5.5.7 Gegenfärbung mit Hämatoxylin

Zum Abschluss wurden die Schnitte in Hämatoxylinlösung (Gill's III) gegengefärbt. Dieser Farbstoff hebt vor allem basophile Zellstrukturen wie den Zellkern hervor und setzt die bisher nicht spezifisch gefärbten Anteile des Gewebes als Hintergrund in

Kontrast zu den bräunlichen Arealen, welche den mit DAB sichtbar gemachten Gastrokinen entsprechen.

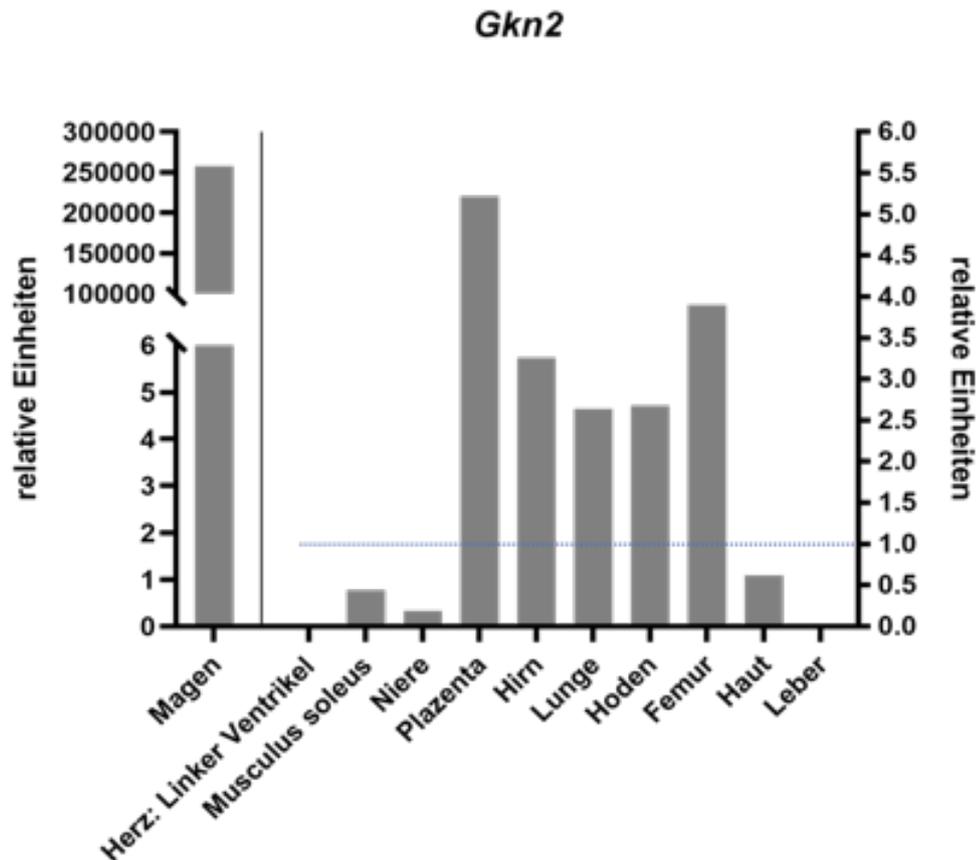
Die Färbung wirkt zunächst beige, schlägt jedoch während des zehnmütigen Spülens mit Leitungswasser aufgrund der Anhebung des pH-Wertes in ein dunkles Blau-violett um [97].

## 5.6 Statistik und Software

Die statistischen Unterschiede wurden mittels Student's t-Test unter Verwendung von GraphPad Prism 9.0.2 (GraphPad Software LLC, San Diego, CA, USA) analysiert. Die Daten entsprechen den Mittelwerten  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean, SEM). Ein p-Wert  $<0,05$  wurde als signifikant angesehen. Die Tabellen wurden mit Excel erstellt (Office 2016, Microsoft, Redmond, WA, USA), die Abbildungen mit CorelDRAW x6 (Version 14.6.1, Corel Corporation, Ottawa, Kanada) und Adobe Photoshop CC 2018 (Adobe, Dublin, Republik Irland).

## 6. Ergebnisse

### 6.1 Gastrokin-Expressionsanalyse in multiplen Geweben der gesunden Ratte



**Abb. 2:** mRNA Expression von *Gkn2* in multiplen extragastralen Organen der gesunden Wistar Ratte. Linke y-Achse = Magen (Positivkontrolle); Rechte y-Achse = extragastrale Gewebeproben. Gestrichelte blaue Linie = Cut-off bei Ct-Wert von 34, entspricht 1 auf der rechten y-Achse.

Zur Evaluation der Expression von *Gkn1* und *Gkn2* in extragastralen Organen der Wistar Ratte, führten wir eine qRT-PCR Analyse in glatter Muskulatur des linken Herzventrikels, Skelettmuskulatur (Musculus Soleus), sowie in Plazenta, Niere, Hirn, Lunge, Femurknochen, Haut und Leber durch.

Beide Gastrokine zeigten eine ähnlich starke Expression im Magen (Positivkontrolle). Die Expression von *Gkn1* lag in den anderen untersuchten Geweben unter der Nachweisgrenze (cut-off bei einem Ct-Wert von 34, Daten nicht dargestellt). Dies

unterstützt die Annahme, dass es sich bei GKN1 um ein rein magenspezifisches Protein handelt [1].

*Gkn2* dagegen zeigte eine geringe, jedoch reproduzierbare Expression außerhalb des Magens in weiteren Organen der Ratte (Abb. 2), insbesondere in Plazenta (Voruntersuchung unserer Arbeitsgruppe [11]), Hirn, Lunge, Hoden und Knochen (Abb. 2).

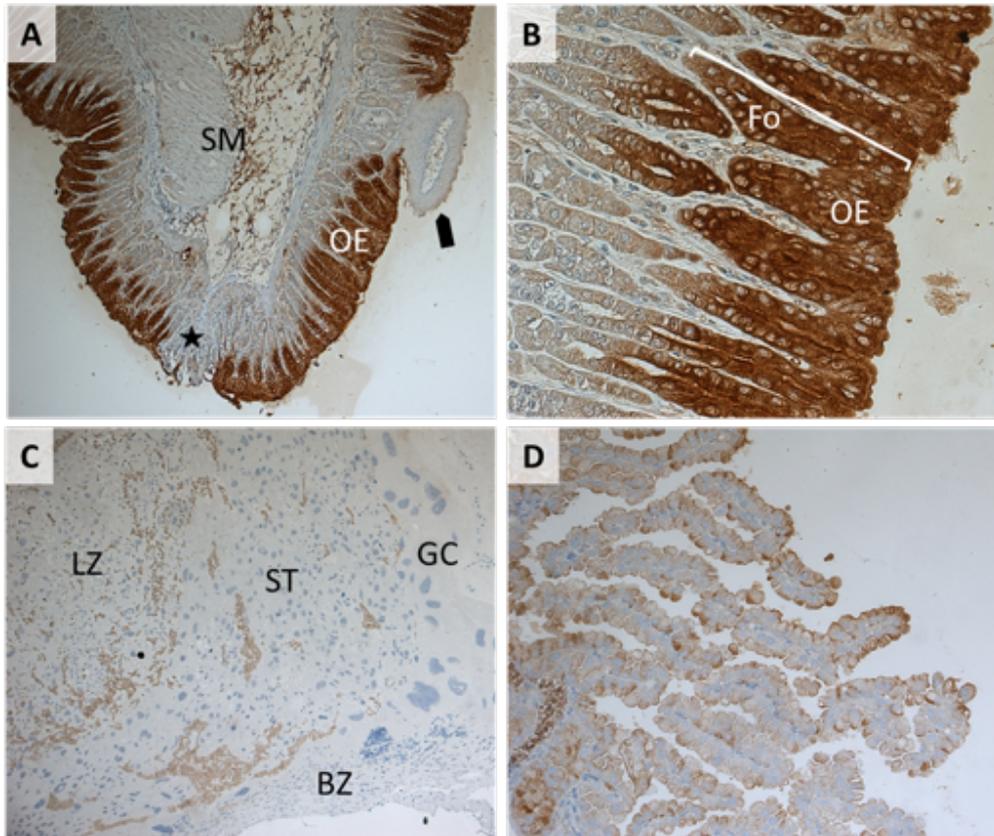
## 6.2 Immunhistochemischer Nachweis von Gastrokinen in multiplen Geweben der gesunden Ratte und Maus

### 6.2.1 Gastroklin 1

Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit gab es keinen kommerziell erwerblichen Antikörper gegen GKN1 in Ratte und Maus. Daher wurden für den immunhistochemischen Nachweis zwei verfügbare monoklonale anti-human GKN1 Antikörper aus der Maus exemplarisch auf ihr Färbeverhalten in unseren Nagetieren getestet. Beide Antikörper waren nicht spezifisch für die Immunhistochemie vom Hersteller etabliert worden (i.e. nur für ELISA und Western Blot) und richteten sich gegen das rekombinante humane GKN1 in voller Länge (Abnova, H00056287-M01), bzw. gegen die Aminosäuren 21-186 (Abcam, ab57623).

Im Magen (Positivkontrolle, Abbildung 3 A+B) ergab sich ein spezifisches Färbeverhalten für GKN1 im Bereich des Oberflächenepithels der Foveolae, was dem Färbeverhalten des menschlichen Magens in der Literatur entspricht [13]. Zudem zeigte sich, wie ebenfalls in der Literatur beschrieben [98], bei einem Polypen ein Ausbleiben der Färbung im Schleimhautrelief (Abb. 3 A). Basierend auf früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe in humaner Plazenta, bei denen wir eine GKN1 Expression in extravillösen Trophoblasten nachweisen konnten, führten wir eine Testung obiger GKN1-Antikörper in der Plazenta der Tiere durch. Entgegen den humanen Ergebnissen im Bereich der Plazenta (GKN1 Nachweis im EVT), bestätigte die Untersuchung unseren initialen Eindruck hinsichtlich der vernachlässigbaren *Gkn1* mRNA Expression (Abschnitt 6.1, S. 26) in extragastralem Gewebe der Ratte mit fehlendem immunhistochemischen Nachweis von GKN1 in der Nagetierplazenta (Abb. 3 C+D). Interessanterweise fand sich jedoch eine bislang nicht beschriebene

GKN1 Proteinexpression im Dottersack der Mausplazenta. Eine Vergleichbare Expression wurde von uns [11] und von anderen bereits für GKN2 vorbeschrieben [52].



**Abb. 3: Immunhistochemischer Nachweis von GKN1. A+B) Magen, C+D) Plazenta.** Verwendeter Antikörper: Abnova, H00056287-M01. GKN1-positive Bereiche: bräunliche Färbung, HE-Gegenfärbung: bläuliche Färbung. **A)** Übersichtsaufnahme Magen. **OE** = Oberflächenepithel, **Fo** = Foveolae, **SM** = Submukosa. Nachweis eines Polypen (schwarze Pfeilspitze) und einer reduzierten Schleimhautintegrität (schwarzer Stern). **B)** Vergrößerung des Schleimhautreliefs aus A) mit Darstellung der Foveolae. **C)** Plazenta Übersichtsaufnahme der Ratte. Kein Nachweis von GKN1 in **GC** = giant cell, i.e. trophoblastäre Riesenzelle; **BZ** = Basalzone, **ST** = Spongiotrophoblast, **LZ** = Labyrinthzone. **D)** Dottersack der Maus. Darstellung von apikal GKN1-positiven Bläschen.

## 6.2.2 Gastrokin 2

Basierend auf den positiven qRT-PCR Ergebnissen mit Nachweis von *Gkn2* in extragastralen Geweben (Abb. 2) führten wir einen immunhistochemischen Proteinnachweis zur Lokalisation von GKN2 in Wistar-Ratten und C57BL/6 Mäusen durch (Abb. 4 bis 10).

Hierfür wurden verschiedene Antikörper ausgetestet. Die verwendeten kommerziellen Antikörper entstammten dem Kaninchen mit Spezifität für GKN2 in Mensch, Maus und Ratte. Wir verglichen das immunhistochemische Färbeverhalten eines polyklonalen (Biorbyt, orb183844, Ziel: Aminosäuren 31-90 von GKN2) mit dem eines monoklonalen Antikörpers (Abcam, Klon EPR15377(B), ab188866, Ziel: 100 Aminosäuren C-terminal).

Unser immunhistochemischer Nachweis von GKN2 bestätigte unsere qRT-PCR Ergebnisse (siehe Abschnitt 6.1, S. 26) zu dessen Expression in multiplen extragastralen Geweben der Ratte (Abb. 7-10). Daher fokussierten wir uns im weiteren Duktus dieser Arbeit auf die genauere Untersuchung von GKN2, i.e. seiner plazentaren Expression in Tiermodellen der intrauterinen Wachstumsrestriktion (siehe Abschnitt 5.2, S. 17f.) sowie seiner Expression in extragastralem Gewebe beim Menschen, wo GKN1 ebenfalls nur eine gastrale Expression zeigte (siehe Abschnitt 6.4, S. 40ff.).

Hinsichtlich der immunhistochemischen Nachweisqualität von GKN2 ergaben sich im Zusammenhang mit den ausgetesteten Antikörpern (Hersteller Abcam und Biorbyt) unter der hier verwendeten Methode folgende Unterschiede (Tab. 2): Während im Magen mit hohem GKN2 Proteingehalt beide Antikörper einen stabilen immunhistochemischen Nachweis erlaubten (Abb. 4 und 5), zeigte sich in den extragastralen Geweben der Ratte ein gewebeunabhängigeres Färbeverhalten des C-Terminal bindenden, monoklonalen Antikörpers von Abcam bei niedrigem Hintergrund (Tab. 2). Bei Lunge (Abb. 6), Hoden (Abb. 7) und Haut (Abb. 10) wählten wir die Darstellung der Biorbyt Färbung bei vergleichbarem Ergebnis hinsichtlich des Färbeverhaltens (Tab. 2).

Basierend auf diesem Vergleich wurde für die weitere Darstellung der extragastralen Expression von GKN2 im Nagetier in dieser Arbeit die immunhistochemische (IHC)

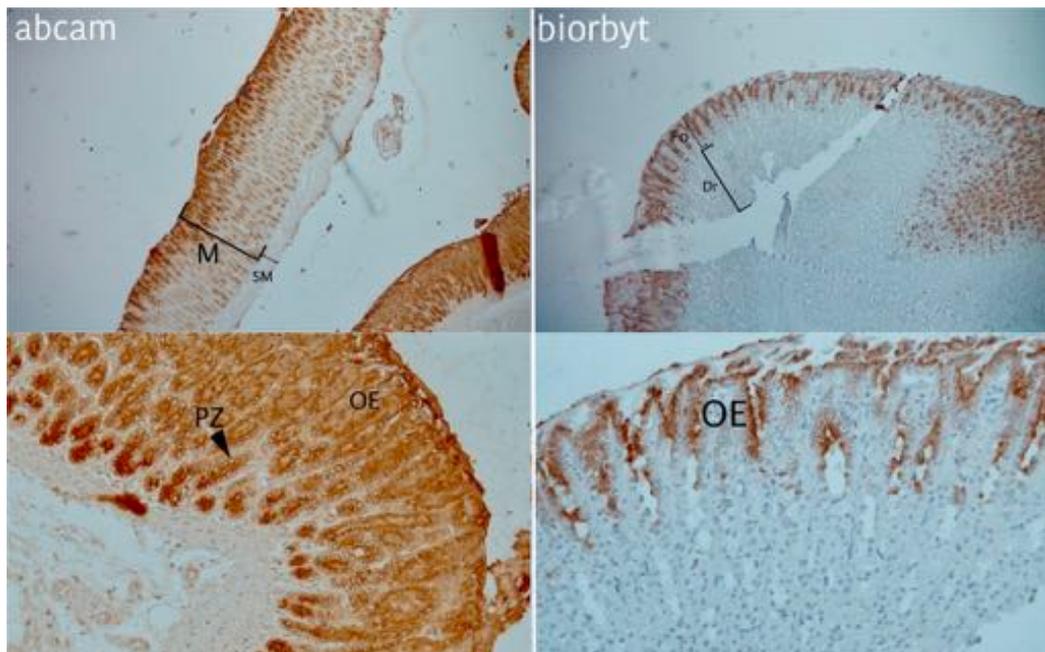
Färbung entsprechend der in Tab. 2 indizierten Präferenz gewählt. Für den Magen (Positivkontrolle) wurde das Färbeverhalten beider Antikörper dargestellt (Abb. 4 und 5, S. 31).

	<b>Abcam</b>	<b>Biorbyt</b>
Knochen	X	
Leber	X	
Lunge	X	<b>X</b>
Magen	X	X
Hoden	X	<b>X</b>
Haut	X	<b>X</b>

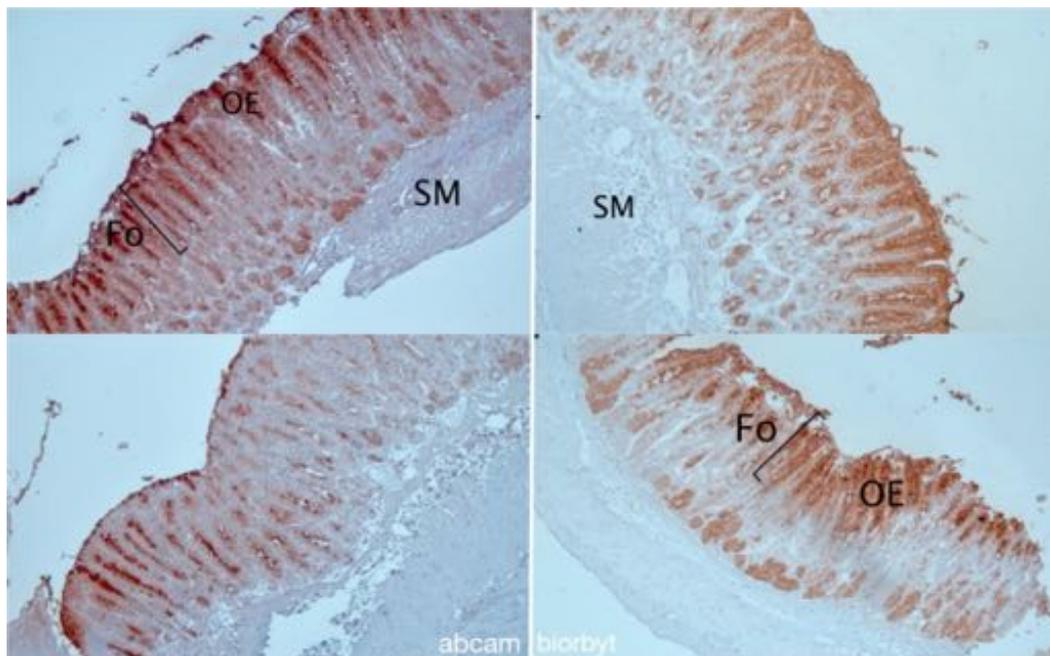
**Tab. 2: Vergleich des immunhistochemischen Nachweises von GKN2 mittels unterschiedlicher Antikörper.** Abcam = Hersteller des monoklonalen Antikörpers (Klon EPR15377(B), ab188866, Ziel: 100 Aminosäuren C-terminal); Biorbyt = Hersteller des polyklonalen Antikörpers (orb183844, Ziel: Aminosäuren 31-90 von GKN2); „X“ markiert den Antikörper mit dem spezifischeren Färbeverhalten. Das hinterlegte **X** steht für unsere Auswahl im Falle eines gleich guten Färbeverhaltens.

### **GKN2 Protein Expression im Magen**

In den immunhistochemischen Färbungen der Magenschleimhaut in Ratte (Abb. 4) und Maus (Abb. 5) ließen sich unsere vorherigen Ergebnisse [11] und die anderer [4-8, 99] in Analogie zur Expression (siehe Abschnitt 6.1, S. 26) reproduzieren, weshalb der Magen als Positivkontrolle definiert wurde. Untersucht wurde der Corplusbereich des Magens. Während sich in der Magenschleimhaut der Ratte (Abb. 4) die GKN2 Expression apikal auf die Foveolae beschränkte, ließen sich bei der Maus (Abb. 5) auch in tiefer gelegenen Schleimhautarealen wie dem Drüsengrund GKN2 nachweisen, wenn auch in geringerer Intensität. In der Submukosa fand sich kein GKN2 Nachweis. Im Vergleich zum polyklonalen Antikörper zeigte der monoklonale Antikörper von Abcam die stärkere Immunreaktivität in beiden Spezies. Die immunhistochemischen GKN2 Negativkontrollen sind bereits durch unsere Arbeitsgruppe [11] veröffentlicht worden.



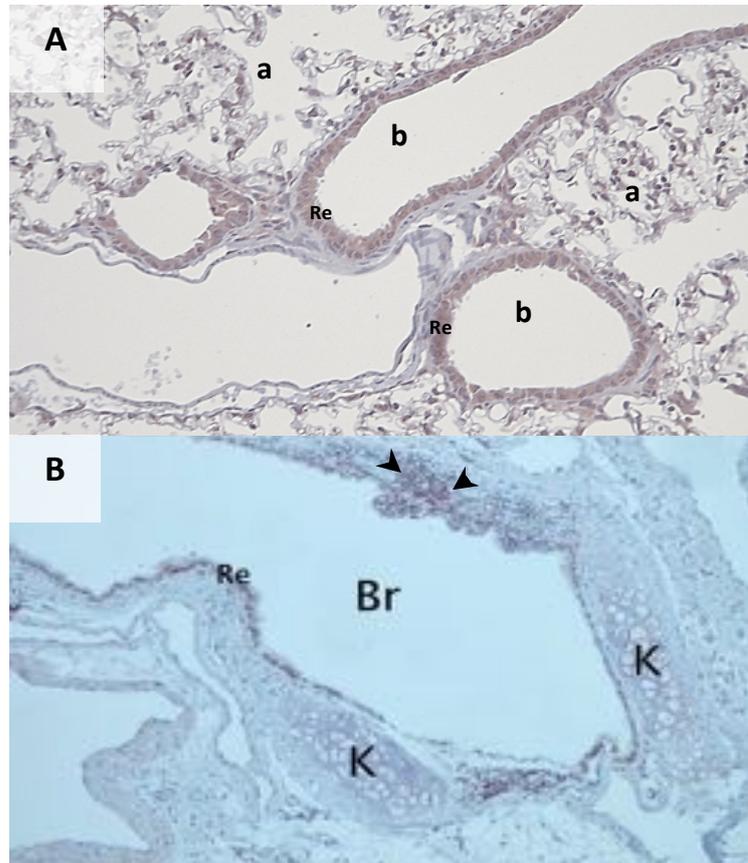
**Abb. 4: Gesunde Magenschleimhaut der Ratte.** GKN2 positive Bereiche: bräunliche Färbung, HE-Gegenfärbung: bläuliche Färbung. Oberflächenepithel der Magenschleimhaut (OE) im Bereich der Foveolae (Fo). Dr = Drüsenzellen, PZ = Parietalzelle, M = Mukosa, SM = Submukosa.



**Abb. 5: Gesunde Magenschleimhaut der Maus.** GKN2 positive Bereiche: bräunliche Färbung, HE-Gegenfärbung: bläuliche Färbung. OE = Oberflächenepithel, Fo = Foveolae, SM = Submukosa.

### GKN2 Protein Expression in der Lunge

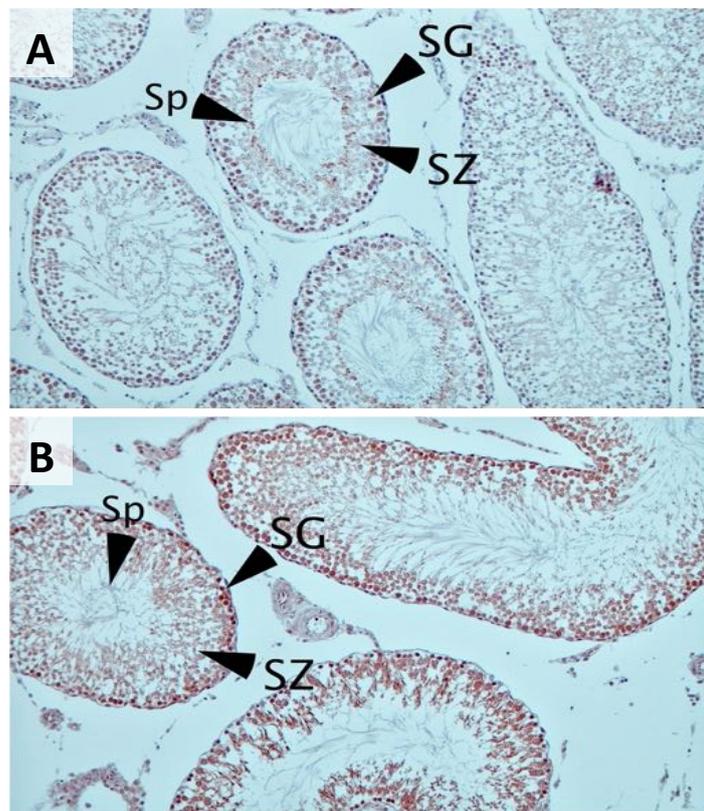
Unsere immunhistochemische Analyse zeigte eine GKN2 Expression in Zellen des apikalen bronchialen Flimmerepithels sowie in alveolären Pneumozyten Typ II in Maus und Ratte (hier dargestellt: Maus, Abb. 6 A). Zudem zeigte sich eine GKN2 Expression in Chondrozyten des Ringknorpels (Abb. 6 B) sowie in subepithelialen Entzündungszellen (Abb. 6 B).



**Abb. 6: Gesundes Lungengewebe der Maus.** Verwendeter Antikörper: abcam. GKN2 positive Bereiche: bräunliche Färbung, HE-Gegenfärbung: bläuliche Färbung. **Br** = Bronchus, **B** = Bronchiolus, **Re** = respiratorisches Epithel, **A** = Alveolen, **K** = Knorpel, schwarze Pfeilspitze = subepitheliale Entzündungszellen.

### GKN2 Protein Expression im Hoden

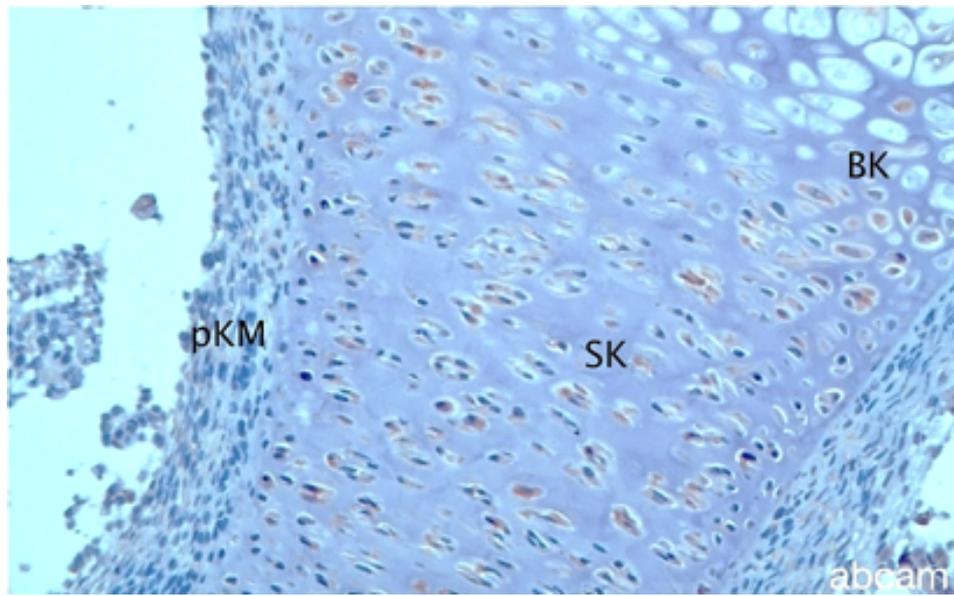
In der Ratte (Abb. 7 A+B) zeigte sich mittels polyklonalem Biorbyt Antikörper (Abb. 7 A) eine differenzierte GKN2 Expression in den der Tunica fibrosa anliegenden Spermatozyten sowie in den dem Lumen der Tubuli seminiferi nahen Spermatozoen. Es fand sich keine deutliche GKN2 Immunreaktivität der Leydigzellen oder des umgebenden Stromas. Mittels des monoklonalen Abcam Antikörpers (Abb. 7B ) zeigte sich ebenfalls eine betonte GKN2 Immunreaktivität in den Spermatozyten ohne weitere Differenzierung hinsichtlich der GKN2 Färbeintensität zwischen den weiteren Entwicklungsstufen.



**Abb. 7: Gesundes Hodengewebe der Ratte.** GKN2 positive Bereiche: bräunliche Färbung, HE-Gegenfärbung: bläuliche Färbung. Der Ausschnitt zeigt Tubuli seminiferi mit Keimepithel, einige Zellen sind exemplarisch markiert. **SG** = Spermatoγονie, **SZ** = Spermatozyt, **Sp** = Spermatozoon. **A)** Biorbyt Antikörper, **B)** Abcam Antikörper.

### GKN2 Expression im Knochen

Im Femurknochen der Ratte (Alter 2-3 Wochen) (Abb. 8) zeigte sich eine GKN2 Expression in hypertrophen Chondroblasten der Proliferationszone. Hierbei handelte es sich vor allem um den Säulenknorpel. Hyaliner Knorpel, Blasenknorpel sowie die umgebende Matrix zeigten keine relevante GKN2 Immunreaktivität.

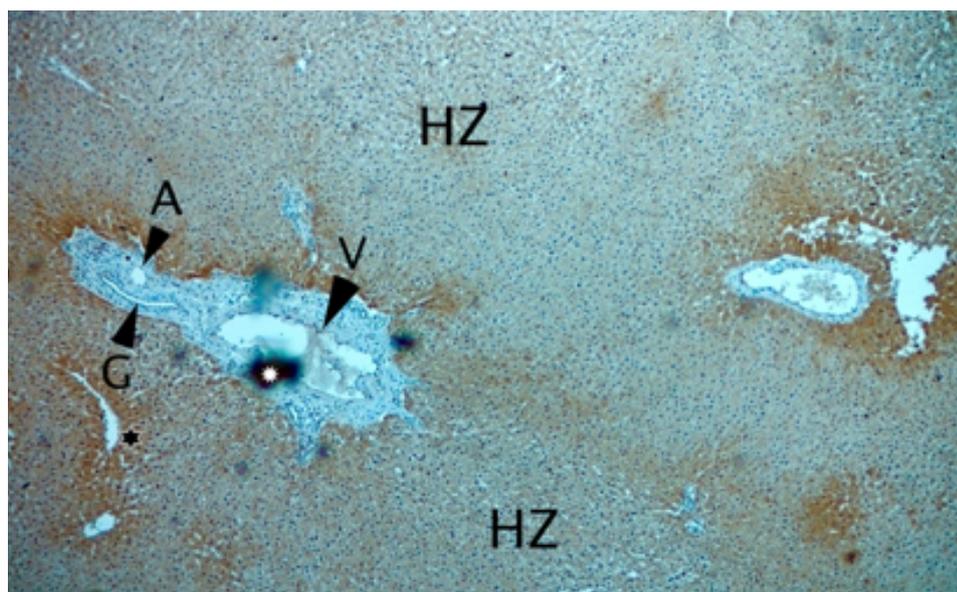


**Abb. 8: Femurknochen Ratte (Alter 2-3 Wochen).** Verwendeter Antikörper: Abcam. GKN2 positive Bereiche: bräunliche Färbung, HE-Gegenfärbung: bläuliche Färbung. Zu sehen ist die Zone der chondralen Ossifikation im Femurknochen der Ratte. Dabei differenziert sich der fetale hyaline Knorpel (**HK**) weiter zu Säulenknorpel (**SK**) und schließlich zu Blasenknorpel (**BK**). An den äußeren Rändern hat sich bereits eine perichondrale Knochenmanschette (**pKM**) gebildet, von wo aus sich der Vorgang der Verknöcherung nach innen ausbreitet.

### GKN2 Expression in der Leber

Es zeigte sich eine hepatozytäre GKN2 Färbung um die Periportalfelder unter Verwendung des Abcam Antikörpers. Zudem fand sich eine hepatozytäre GKN2 Expression um die angegliederten intrahepatischen Gallengänge.

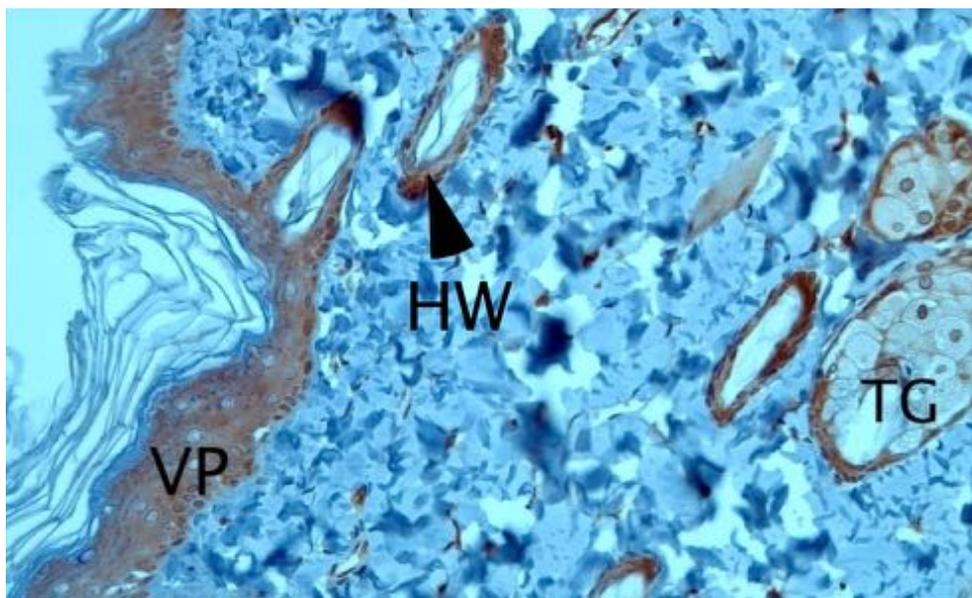
Die Immunreaktivität nahm in Richtung Zentralvene mit der Entfernung zur Glisson Trias (Ductus biliferi, Arteria und Vena interlobularis) bis auf Hintergrundniveau ab. Die Strukturen des Glisson Trias und das assoziierte Bindegewebe wiesen keinen Nachweis von GKN2 auf (Abb. 9).



**Abb. 9: Leber Ratte.** Verwendeter Antikörper: Abcam. GKN2 positive Bereiche: bräunliche Färbung, HE-Gegenfärbung: bläuliche Färbung. Periportalfeld mit Glisson Trias bestehnd aus **A** = Arteria interlobularis, **V** = Vena interlobularis, **G** = Gallengang und umgebendem Bindegewebe; **HZ** = Hepatozyten, weißer Stern = Artefakt, schwarzer Stern = hepatozytäre GKN2 Expression im Bereich der intrahepatischen Gallengänge.

### GKN2 Expression in der Haut

Entgegen unserer Erwartung in Bezug auf die in Abschnitt 6.1 (siehe S. 26) ermittelte niedrige *Gkn2* mRNA Expression im Integument der Ratte (Abb. 10) zeigte sich eine Proteinexpression von GKN2 im Stratum basale, spinosum und granulosum des verhornten Plattenepithels. Zusätzlich fanden wir subkutan eine relevante GKN2 Expression in Haarwurzelscheiden sowie in den Sebozyten assoziierter Talgdrüsenläppchen. Hier zeigten germinative Sebozyten eine betonte Immunreaktivität (Abb. 10).



**Abb. 10: Haut der Ratte.** Verwendeter Antikörper: Biorbyt. GKN2 positive Bereiche: bräunliche Färbung, HE-Gegenfärbung: bläuliche Färbung. **VP** = verhorntes Plattenepithel bestehend aus Stratum basale, spinosum und granulosum, **HW** = Haarwurzelscheide; **TG** = Talgdrüsenverbände: holokrine alveoläre Drüsen mit peripher germinativen und zentral vakuoligen Sebozyten.

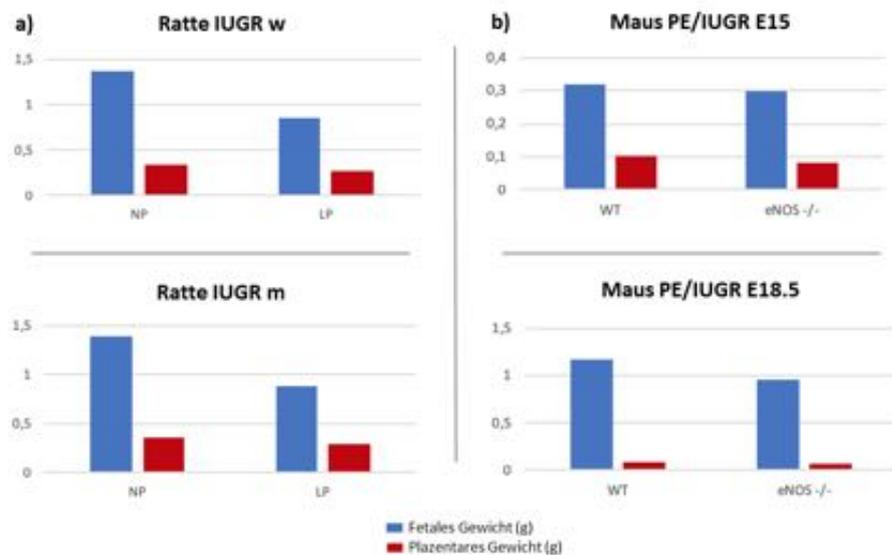
## 6.3 Gastrokin-Expressionsanalyse in Plazenten von IUGR-Tiermodellen

### 6.3.1 Auxologie

Bei der Untersuchung der Feten und Plazenten konnte sowohl bei den einer Proteinmangeldiät ausgesetzten Ratten als auch bei den eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen eine signifikante Wachstumsrestriktion induziert werden (Abb. 11).

Dieser Effekt war bei IUGR Ratten (Abb. 11 a) unabhängig vom Geschlecht. An E18.5 wogen männliche NP Feten  $1,39 \pm 0,05$  Gramm, mit einem Plazentagewicht von  $0,35 \pm 0,02$  Gramm, während LP Tiere eine signifikante Reduktion ( $p < 0,05$ ) um 36,7% und 14,9% zeigten (Abb. 11 a). Weibliche NP Feten wogen im gleichen Gestationsalter  $1,36 \pm 0,05$  Gramm mit einem Plazentagewicht von  $0,34 \pm 0,01$ . Die maternale LP Diät reduzierte das Körper- und Plazentagewicht signifikant ( $p < 0,05$ ) um 34,62%, bzw. 17,65% (Abb. 11 a).

Im eNOS<sup>-/-</sup> Mausmodell (Abb. 11 b) zeigte sich zum Gestationszeitpunkt E15 und E18.5 das Plazentagewicht signifikant ( $p < 0,05$ ) um 20,0%, bzw. 11,11% reduziert im Vergleich zum C57BL/6 Wildtyp. Eine signifikante Reduktion des Fetalgewichts ergab sich an E18.5 (C57BL/6:  $1,16 \pm 0,05$  Gramm versus eNOS<sup>-/-</sup>:  $0,96 \pm 0,07$  Gramm;  $p < 0,05$ ).



**Abb. 11: Auxologie der untersuchten Tiermodelle.**

**a) Alimentäres IUGR Rattenmodell, Schwangerschaftszeitpunkt E18.5**

Männliche Ratten (m), n=25-26 Feten und Plazenten pro Gruppe (NP/LP) von 4 Muttertieren. Weibliche Ratten (w), n=21-23 Feten und Plazenten von 4 Muttertieren. Gewichtung der Ergebnisse auf den jeweiligen Wurf. NP = normaler Proteingehalt des Futters, Kontrollgruppe; LP = niedriger (low) Proteingehalt des Futters, IUGR.

**b) PE/IUGR eNOS<sup>-/-</sup> Mausmodell, Schwangerschaftszeitpunkt E15 und E18.5**

An E15 wurden n=40 Feten und Plazenten pro Gruppe (C57BL/6 und eNOS<sup>-/-</sup>) von 6-7 Muttertieren analysiert. An E18.5 wurden n=26 Feten und Plazenten pro Gruppe von 6 Muttertieren analysiert. Gewichtung der Ergebnisse auf den jeweiligen Wurf. WT = C57BL/6 Wildtyp, eNOS<sup>-/-</sup> = eNOS Knockout Mäuse.

### 6.3.2 Plazentare Expression von Gstrokin 2

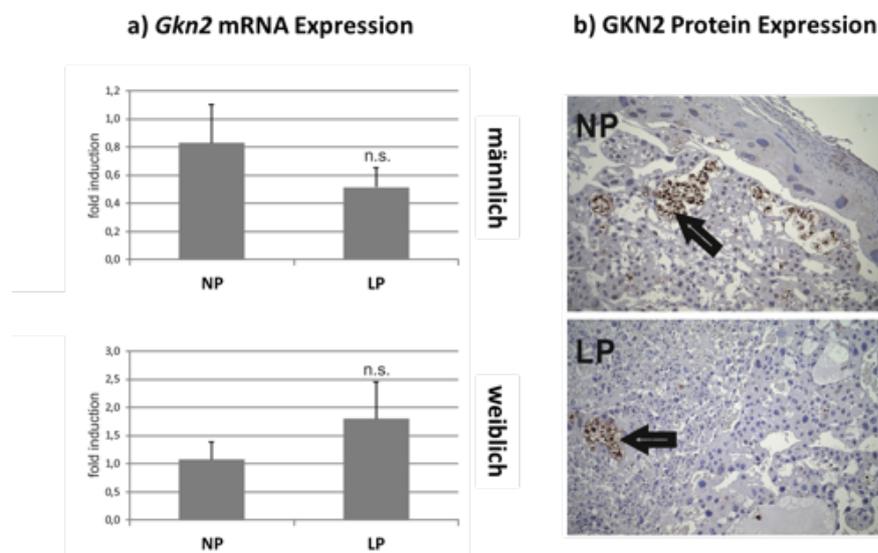
Wir untersuchten die plazentare *Gkn2* Expression in Plazenten von männlichen und weiblichen Ratten unter maternaler Proteinmangeldiät (Abb. 12) sowie bei männlichen eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen (Abb. 13) mittels qRT-PCR.

Im IUGR Modell der Ratte zeigten sich weder Diät- noch geschlechtsspezifische Alterationen in der plazentaren *Gkn2*-Expression (Abb. 12 a). Immunhistochemisch zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der Lokalisation von GKN2 zwischen NP und LP Tieren, mit spezifischer Expression von GKN2 in den Glykogenzellen des Spongiotrophoblasten (Abb 12 b).

Im PE/IUGR Modell der eNOS<sup>-/-</sup> Maus (Abb. 13) zeigte sich eine signifikante Reduktion der plazentaren Expression von *Gkn2* zum Gestationsalter E18.5 gegenüber dem C57BL/6 Wildtyp. Nur der Wildtyp zeigte mit zunehmendem Gestationsalter von E15

zu E18.5 einen signifikanten Anstieg seiner plazentaren *Gkn2* Expression (Abb. 13a). Im Vergleich zur Ratte (Abb. 12 b), bei der GKN2 spezifisch in den Glykogenzellen exprimiert wurde, zeigte sich in der Maus (Abb 13 b) auch eine Expression in der umgebenden spongiotrophoblastären Zone. Bei *eNOS*<sup>-/-</sup> war dieses Kompartiment im Vergleich zum C57BL/6 Wildtyp strukturell verändert mit zum Teil aufgehobener Organisation und eingestreuten Feldern von Glykogenzellen (Abb. 13 b).

### Plazentare Gastrokin 2 Expression im IUGR Modell der Ratte

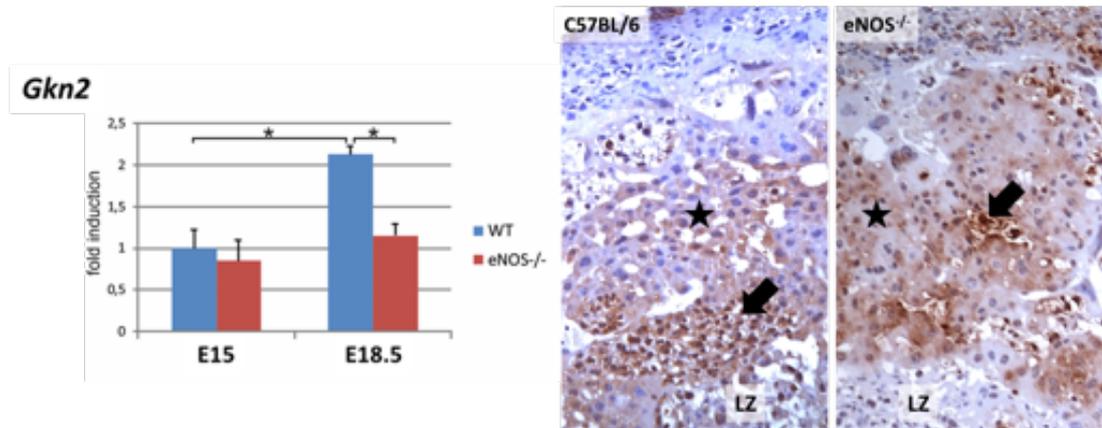


**Abb. 12: Plazentare GKN2 Expression im IUGR Rattenmodell. a) Plazentare *Gkn2* mRNA Expression nach Geschlecht. b) Immunhistochemischer Nachweis der GKN2 Expression. Schwarzer Pfeil = Glykogenzellen im Bereich der spongiotrophoblastären Zone. NP = normaler Proteingehalt des Futters, Kontrollgruppe; LP = niedriger (low) Proteingehalt des Futters, IUGR, n.s. = nicht signifikant.**

## Plazentare Gastrokin 2 Expression in der Maus

### a) *Gkn2* mRNA Expression

### b) GKN2 Protein Expression



**Abb. 13: Plazentare *Gkn2* Expression im PE/IUGR Modell der Maus. a) Plazentare *Gkn2* mRNA Expression nach Gestationszeitpunkt. b) Immunhistochemischer Nachweis der GKN2 Expression.**

Schwarzer Pfeil = Glykogenzellen im Bereich der spongiotrophoblastären Zone. Schwarzer Stern: Spongiotrophoblast. WT = C57BL/6 Wildtyp, eNOS<sup>-/-</sup> = eNOS Knockout Mäuse, LZ= Labyrinthzone.

## 6.4 Immunhistochemischer Nachweis von Gastrokinen in verschiedenen humanen Gewebeklassen

Zur Untersuchung der extragastralen Expression von Gastrokin 1 und 2 in humanem Gewebe benutzten wir einen tissue microarray (TMA), welcher die Analyse von Gewebeproben multipler Organe auf einem Schnitt erlaubt. Bei manchen Organen, i.e. Magen, Lunge und Leber, erfolgte die Analyse ergänzend in separaten humanen Gewebeschnitten. In Analogie zur angewandten Methodik in unseren Tiermodellen (siehe Abschnitt 6.2, S. 27) wurden jeweils Antikörper verschiedener Hersteller verwendet, wobei diese sich im Falle von GKN2 hinsichtlich ihrer Klonalität und Ursprungsspezies unterschieden.

Für den immunhistochemischen Nachweis von GKN1 benutzten wir zwei monoklonale Antikörper aus der Maus, die sich gegen die Aminosäuren 21-185, bzw. -186 von rekombinantem GKN1 richteten (Abcam, ab57623; Abnova, H00056287-M01). Im Gegensatz zu den verwendeten Antikörpern gegen GKN2 waren diese durch den Hersteller bislang nur für den Einsatz für Western Blot und ELISA getestet

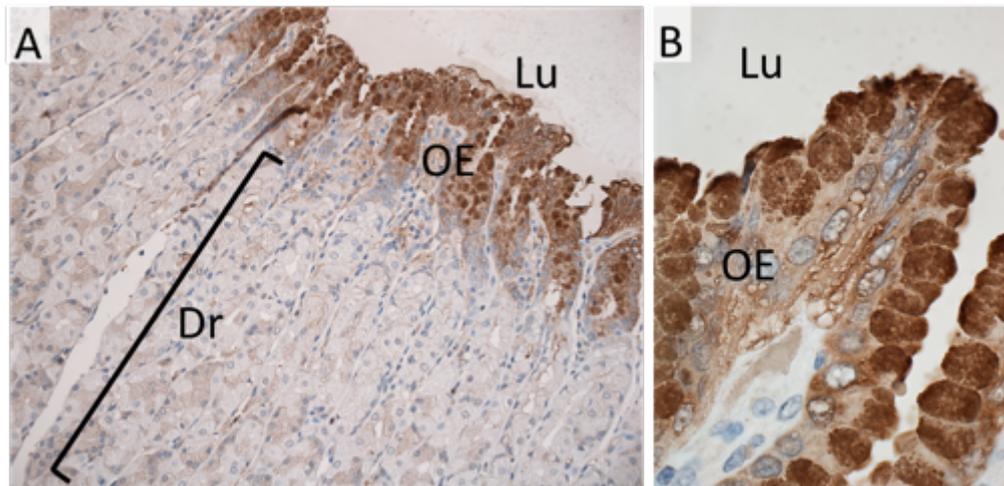
worden. Wie bei Maus (Abb. 5, S. 31) und Ratte (Abb. 4, S. 31) diene auch beim Mensch der Magen als Positivkontrolle für die Expression von GKN1 und 2 (Abb. 14 und 16, S. 42).

Die extragastralen Organe Lunge, Hoden und Haut konnten spezies-komparativ, i.e. human versus Maus/Ratte (siehe Abschnitt 7.3, 58ff.) analysiert werden.

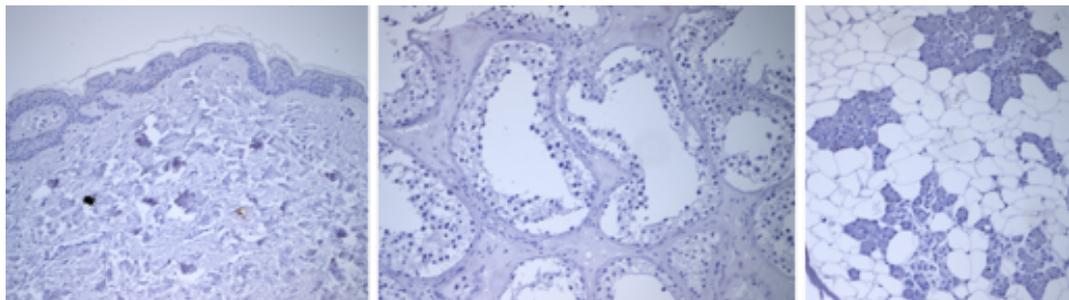
Im Folgenden werden die immunhistochemischen Ergebnisse nach Organsystem im Einzelnen erläutert:

#### 6.4.1 Humanes Gastrokin 1

GKN1 ist als magen-spezifisches Protein beschrieben worden [13]. Unsere Arbeitsgruppe hatte jedoch im Nachgang eine spezifische Expression im extravillösen Trophoblasten [10] in der Plazenta identifizieren können. Zudem wird in der vorliegenden Arbeit auf eine bislang noch nicht beschriebene Expression von GKN1 im Dottersack der Maus eingegangen. Neben der positiven GKN1 Färbung im humanen Magen (Abb. 14, Positivkontrolle) konnten wir keine sonstige relevante GKN1 Immunreaktivität in den im TMA enthaltenen histologischen Gewebeproben erkennen (siehe exemplarisch Abb. 15). Die Expressionsanalyse im Nagetiermodell (siehe Abschnitt 6.1, S. 26) zeigte ebenfalls keine signifikante extragastrale Expression von GKN1 in weiteren Geweben. Daher fokussiert sich die weitere Darstellung der Ergebnisse dieser Arbeit auf den immunhistochemischen Nachweis von extragastral exprimiertem GKN2.



**Abb. 14: GKN1 Expression in humanem Magen (non-TMA).** Verwendeter Antikörper: Abcam. GKN1 positive Bereiche: bräunliche Färbung, HE-Gegenfärbung: bläuliche Färbung. Mukosa in der Übersicht – 10-facher Vergrößerung (A) und 40-facher Vergrößerung (B) mit GKN1 positivem Oberflächenepithel (OE) im Bereich der Foveolae gastricae. **Dr** = Drüsenzellen, **Lu** = Lumen.



**Abb. 15: GKN1 Expression im humanen TMA.** Verwendeter Antikörper: Abcam. GKN1 positive Bereiche: bräunliche Färbung, HE-Gegenfärbung: bläuliche Färbung. Exemplarische Darstellung von Haut (links), Hoden (Mitte) und Glandula submandibularis (rechts). Kein Nachweis von extragastraler GKN1 Expression.

## 6.4.2 Humanes Gastromodulin 2

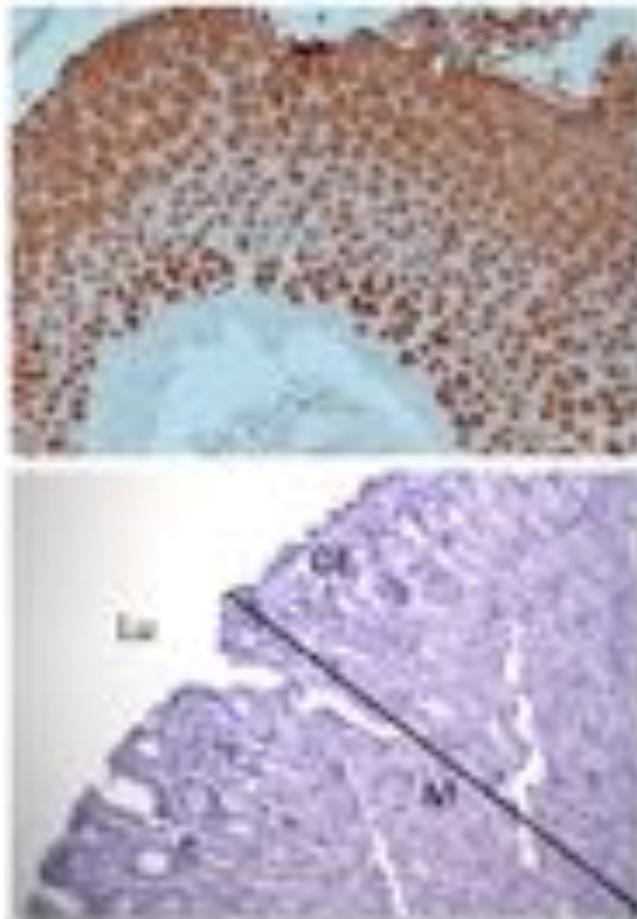
In Tab. 3 sind die humanen Organe aufgeführt, in deren histologischen Schnitten mit mindestens einem der verwendeten Antikörper eine signifikante Färbung von GKN2 zu erzielen war, sowie die Präferenz hinsichtlich der immunhistochemischen Qualität der Färbung. Entgegen den in dieser Arbeit untersuchten Nagetiergeweben (Tab. 2) zeigte sich in humanen Gewebeschnitten ein spezifischerer GKN2 Antigennachweis mit dem polyklonalem Biorbyt Antikörper.

	<b>Abcam</b>	<b>Biorbyt</b>
Haut TMA	X	
Hoden TMA		X
Lunge TMA		X
Milz TMA		X
Omentum TMA		X
Pankreas TMA		X
Parotis TMA		X
Speicheldrüse TMA		X
Tonsille TMA		X
Magen non-TMA	<b>X</b>	X
Leber non-TMA	X	

**Tab. 3: Übersicht über den immunhistochemischen Nachweis von GKN2 in multiplen humanen Organen (tissue microarray /TMA).** Dargestellt ist die organspezifische Präferenz (mit X markiert) hinsichtlich der Antikörper in Bezug auf die immunhistochemische Qualität in dieser Arbeit. „X“ markiert den Antikörper mit dem spezifischeren Färbeverhalten. Das hinterlegte **X** steht für unsere Auswahl im Falle eines gleich guten Färbeverhaltens.

### Gastrokin 2 Expression in humanem Magen

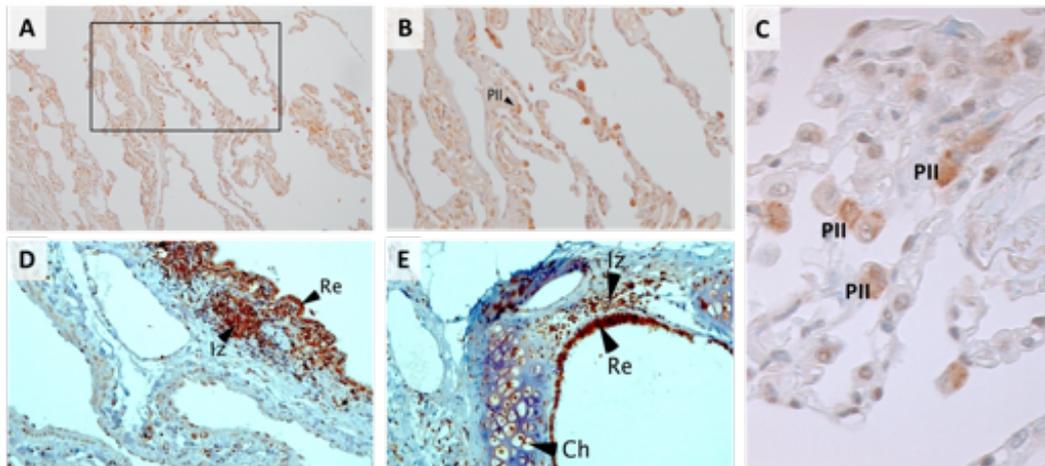
Die immunhistochemischen (IHC) Färbungen der Magenschleimhaut (Abb. 16) dienten als Positivkontrolle, zumal die *Gkn2* Expression und Lokalisation in diesen Gewebesentitäten gut belegt ist [4-8, 99]. Im humanen Magen (Abb. 16) fand sich eine signifikante GKN2-Konzentration in den sekretorischen Zellen des Oberflächenepithels im Bereich der Magenfoveolae [3].



**Abb. 16: GKN2 Expression in humanem Magen (non-TMA).** Verwendeter Antikörper: Abcam. GKN2 positive Bereiche: bräunliche Färbung, HE-Gegenfärbung: bläuliche Färbung. **Oben:** Mukosa Längsschnitt in der Übersicht – 10-fache Vergrößerung mit GKN2 positivem Oberflächenepithel im Bereich der Foveolae gastricae. **Unten:** GKN2 Negativkontrolle des humanen Magens im Querschnitt. Für Durchführung immunhistochemischer Negativkontrollen wurden equimolare Konzentrationen eines pre-Immunsersums (IgG) aus dem Kaninchen eingesetzt [11]. **OE** = Oberflächenepithel, **Lu** = Lumen, **M** = Mukosa.

### Gastrokin 2 Expression in humaner Lunge

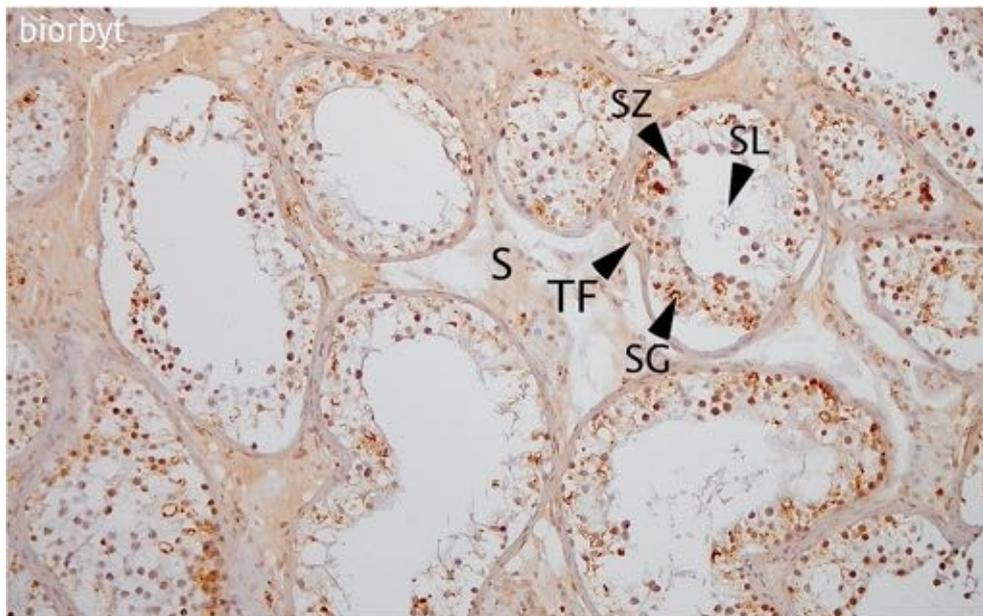
In gesundem humanen Lungengewebe des TMA (Abb. 17 A und B) konnte GKN2 in Zellen des apikalen bronchialen Flimmerepithels sowie in alveolären Pneumozyten Typ II (Abb 17 C) angefärbt werden. In der weiterführenden Immunhistochemie von zusätzlichen PFA-Dünnschnitten der humanen Lunge (Abb. 17 D-C) zeigte sich ein Nachweis von GKN2 in subepithelialen Entzündungszellen (Abb 17 D und E) sowie in Chondrozyten des trachealen Ringknorpels (Abb. 17 E).



**Abb. 17: Gesundes Lungengewebe des Menschen.** Verwendeter Antikörper: Biorbyt. GKN2 positive Bereiche: bräunliche Färbung, HE-Gegenfärbung: bläuliche Färbung. A+B) Humaner TMA; C-E) Separate humane Gewebeschnitte. A) Übersicht. B) 20-fach, C) 40-fach. D) und E) Bronchen großen Atemwege mit Immunzellen und trachealem Knorpel, **PII** = Surfactant produzierender Typ II Pneumozyt, **Ch** = Chondrozyten, **Re** = Respirationsepithel, **Iz** = Immunzellen.

### Gastrokin 2 Expression in humanem Hoden

In gesundem humanem Hodengewebe des TMA (Abb. 18) ließ sich eine GKN2 Expression nur unter Inkaufnahme einer relativ hohen interstitiellen Hintergrundfärbung nachweisen. Es zeigte sich eine GKN2 Expression in den der Tunica fibrosa anliegenden Spermatogonien sowie in den dem Lumen der Tubuli seminiferi nahen Spermatozoen. Die Immunreaktivität der Leydigzellen und des umgebenden Stromas entsprach der Hintergrundaktivität der Färbung.

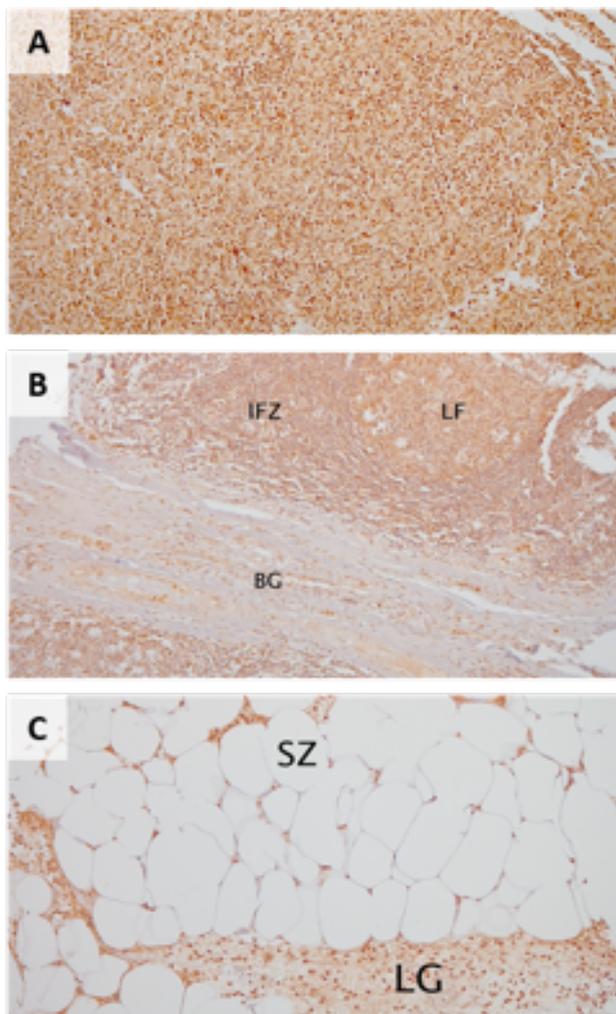


**Abb. 18: Gesundes Hodengewebe des Menschen.** Verwendeter Antikörper: Biorbyt. GKN2 positive Bereiche: bräunliche Färbung, HE-Gegenfärbung: bläuliche Färbung. Der Ausschnitt zeigt Tubuli seminiferi mit Keimepithel, einige Zellen sind exemplarisch markiert. **TF** = Tunica fibrosa, **S** = Stroma, **SG** = Spermatogonie, **SZ** = Spermatozyt, **SL** = Spermatozoon liberum.

## Gastrokin 2 Expression in Organen des humanen Immunsystems

Wie bereits in Färbungen der Lunge (Abb 17 E) angedeutet, konnten in mehreren am humanen Immunsystem beteiligten Organen immunhistochemisch eine GKN2 Proteinexpression nachgewiesen werden. Hierzu gehören Immunzellen der roten Milzpulpa (Abb. 19 A), der Tonsille (Abb. 19 B), sowie des abdominellen Omentums (Abb. 19 C).

In der Tonsille (Abb. 19 B) fanden sich GKN2-positive Immunzellen sowohl im Bereich der Lymphfollikel als auch in der interfollikulären Zone. Das umliegende Bindegewebe der Tonsille (Abb. 19 B) sowie die Adipozyten des Omentums (Abb. 19 C) zeigten keine GKN2 Expression. Eine weiterführende B-/T-Differenzierung der GKN2 positiven Immunzellen der jeweiligen Organe mittels spezifischer Doppelfärbung war nicht Gegenstand dieser Arbeit.

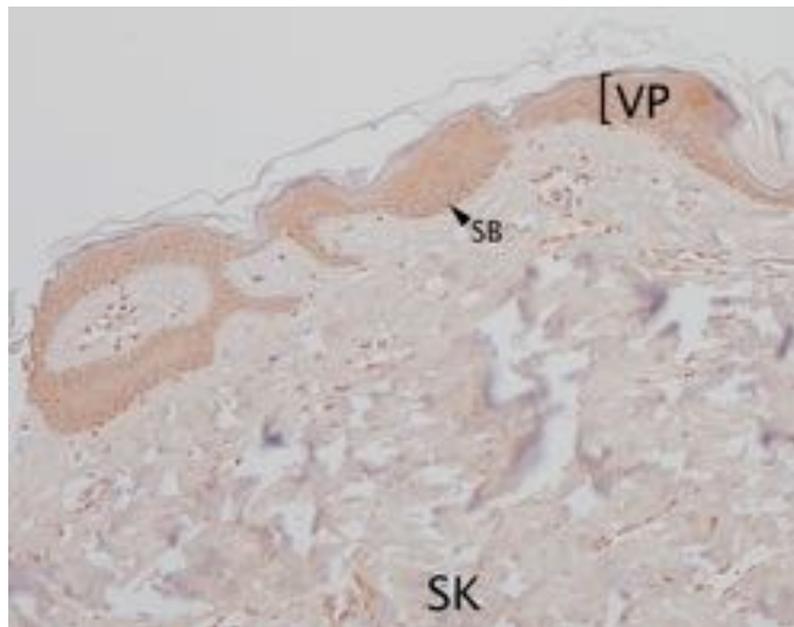


**Abb. 19: Nachweis von GKN2 in humanen immunologischen Organen.**

Verwendeter Antikörper: Biorbyt. GKN2-positive Bereiche: bräunliche Färbung, HE-Gegenfärbung: bläuliche Färbung. **A) Rote Pulpa der humanen Milz.** Zu sehen sind Retikulumzellen. **B) Tonsille.** BG = Bindegewebskapsel, LK = Lymphfollikel mit Keimzentren und dazwischenliegende interfollikuläre Zone (IFZ). **C) Abdominelles Omentum.** SZ = Adipozyten (Siegelringzellen) in ihrer klassischen Siegelringform. LG = lymphatisches Gewebe mit GKN2-positiven Immunzellen.

### Gastrokin 2 Expression in humaner Haut

Im humanen TMA (Abb. 20) zeigte sich eine GKN2-positive Immunreaktivität in Hautschnitten mit verhorntem Plattenepithel in Zellen des Stratum basale, spinosum und granulosum. Keine Anfärbbarkeit fand sich im anliegenden Subkutangewebe. In den vorliegenden humanhistologischen Präparaten waren keine Hautanhangsgebilde enthalten, sodass eine Aussage über eine GKN2 Expression im Bereich des Haares, bzw. assozierter Strukturen (siehe Ratte, Abschnitt 6.2, S. 36) nicht möglich war.

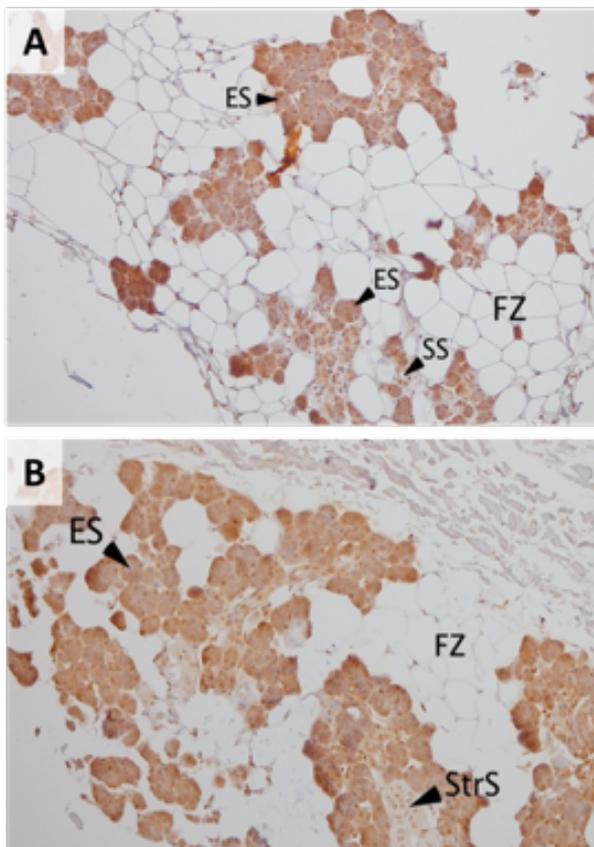


**Abb. 20: Humane Haut.** Verwendeter Antikörper: Biorbyt. GKN2-positive Bereiche: bräun-liche Färbung, HE-Gegenfärbung: bläuliche Färbung. **SB** = Stratum basale, **VP** = verhorntes Platten-epithel, **SK** = Subkutangewebe.

### Gastrokin 2 Expression in humanen Speicheldrüsen

Des Weiteren wurde die GKN2 Lokalisation in der seromukösen Unterkieferspeicheldrüse (Glandula submandibularis, Abb. 21 A), sowie in der größeren serösen Ohrspeicheldrüse (Glandula parotis, Abb. 21 B) in humanem TMA untersucht. GKN2 ließ sich deutlich in den Endstücken beider Drüsen nachweisen. In der Glandula parotis (Abb. 21 B) imponierten die charakteristischen Streifenstücke GKN2-negativ, während die Schaltstücke sich in beiden untersuchten Drüsen gering GKN2-positiv zeigten. Umgebendes Fett- und Bindegewebe zeigte keinen GKN2 Nachweis (Abb. 21).

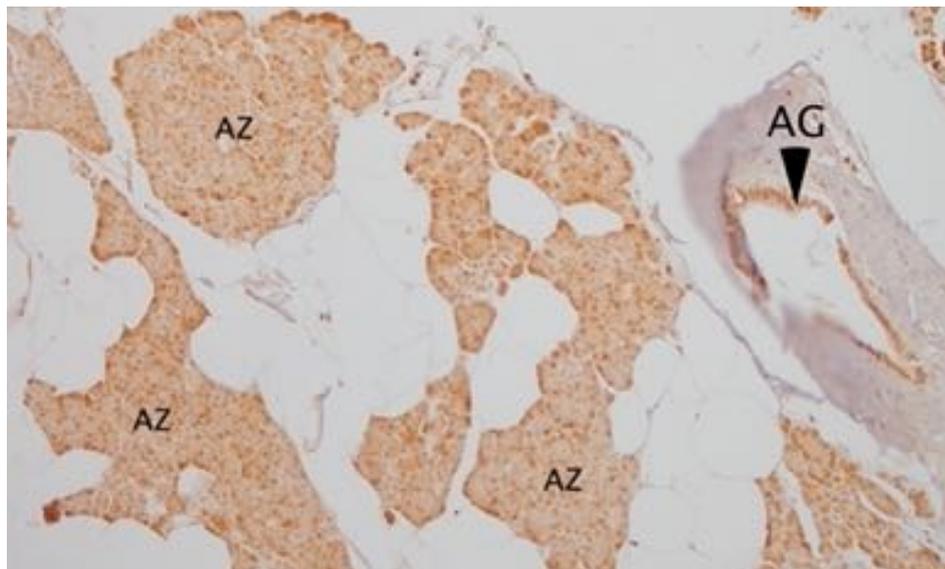
Trotz des seromukösen Aufbaus der Unterkieferdrüse waren im TMA keine mukösen Anteile angeschnitten (Abb. 21 A). Somit kann vorerst keine Aussage über eine GKN2 Expression in diesen Drüsenanteilen getroffen werden.



**Abb. 21: Humane Speicheldrüsen.** Verwendeter Antikörper: Biorbyt. GKN2-positive Bereiche: bräunliche Färbung, HE-Gegenfärbung: bläuliche Färbung. A) Glandula submandibularis: **SS** = Schaltstücke, **ES** = Endstücke, **FZ** = Fettzellen. B) Parotis: **EZ** = Endstücke, **StrS** = Streifenstück, **FZ** = Fettzellen.

### Gastrokin 2 Expression im humanen Pankreas

In der Gewebeprobe des Pankreas im humanen TMA (Abb. 22) zeigte sich eine randbetonte positive GKN2 Färbung der Azini im exokrinen Anteil, sowie des Epithels eines interlobulären Ausführungsgangs. Im umliegenden Fettgewebe konnte kein GKN2 nachgewiesen werden. Die zur Verfügung stehenden histologischen Schnitte beinhalteten keinen endokrinen Anteil des Pankreas, weshalb über eine GKN2 Expression in diesen Arealen vorerst keine Aussage getroffen werden kann.



**Abb. 22: Humanes Pankreas.** Verwendeter Antikörper: Biorbyt. GKN2-positive Bereiche: bräunliche Färbung, HE-Gegenfärbung: bläuliche Färbung. **AZ** = exokrine Azini, **AG** = interlobulärer Ausführungsgang.

### Gastrokin 2 Expression im humanen Gehirn

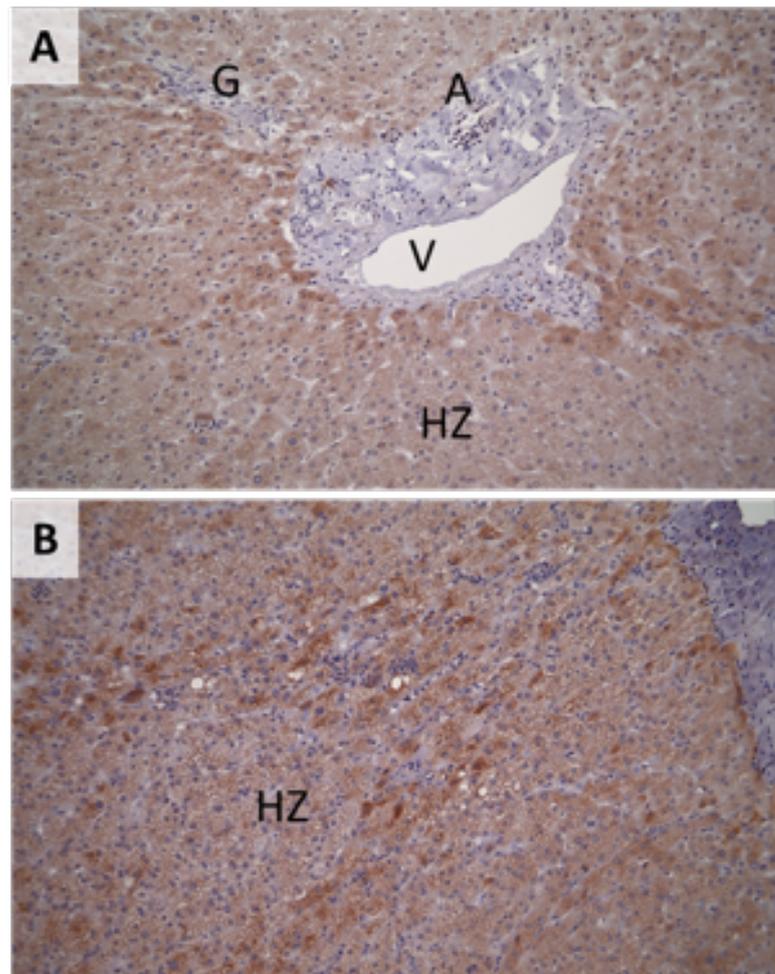
Für die TMA Gewebeprobe des Gehirns (Abb. 23) gab es keine Angabe des anatomischen Entnahmeorts. GKN2 konnte ubiquitär in Zellen gefunden werden, deren Verteilungsmuster am ehesten auf eine Zugehörigkeit zur Mikrogliafamilie hindeutet.



**Abb. 23: Gehirn human.** Verwendeter Antikörper: Biorbyt. GKN2-positive Bereiche: bräunliche Färbung, HE-Gegenfärbung: bläuliche Färbung. Schwarze Pfeilspitzen = Mikrogliazellen.

### Gastrokin 2 Expression in humaner Leber

Die humane Leber (Abb. 24 A und B, non-TMA Schnitte) zeigte einen hepatozytären, teils homogenen (Abb. 24 A), teils granulären (Abb. 24 B) Nachweis von GKN2 unter Aussparung der Portalvenenfelder. Die Immunreaktivität für GKN2 in direkter Umgebung des Portalvenenfelds war betont (Abb. 24 A). Im restlichen Bereich der Leber war die GKN2 Expression inhomogen und orientierte sich entlang der Achse Zentralvene-Periportalfeld (Abb. 24 B).



**Abb. 24: Humane Leber.** Verwendeter Antikörper: Biorbyt. GKN2-positive Bereiche: bräunliche Färbung, HE-Gegenfärbung: bläuliche Färbung. A) Periportalfeld mit Glisson Trias bestehend aus **A** = Arteria interlobularis (Ast der A. hepatica propria), **V** = Vena interlobularis (Ast der V. portae), **G** = Gallengang (Ductus interlobularis biliferi) und umgebendem Bindegewebe; **HZ** = Hepatozyten. B) Übersicht über die Expression von GKN2 im Leberläppchen, **HZ** = Hepatozyten.

## 7. Diskussion

Basierend auf der Beobachtung unserer Arbeitsgruppe, dass sich Gastrokine auch extragastral in der Plazenta finden, diente die vorliegende Arbeit der Analyse weiterer Expressionsorte dieser Proteine außerhalb des Magens. Hierfür wurden diverse Gewebeproben von Mensch sowie von Maus und Ratte mittels qRT-PCR (Nagetiere) bzw. Immunhistochemie (Mensch, Maus, Ratte) untersucht. Parallel wurde die plazentare Bedeutung von Gastrokinen durch Analysen in Tiermodellen der Schwangerschaftspathologien IUGR (alimentäres Proteinmangelmodell der Ratte) und PE/IUGR (genetisches knockout Modell der eNOS<sup>-/-</sup> Maus) weiter differenziert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass GKN1 keine relevante extragastrale Expression in Mensch (Ausnahme extravillöser Trophoblast der Plazenta) und Ratte/Maus (Ausnahme plazentarer Dottersack) aufzuweisen scheint. Die Expression von GKN1 ist somit weitestgehend magenspezifisch. GKN2 hingegen zeigte eine bislang noch nicht beschriebene Expression in mehreren extragastralen Geweben wie Lunge, Hoden, Knochen, Immunorganen, Speicheldrüsen, Pankreas, Leber, Haut und Hirn im Menschen und den hier untersuchten Tiermodellen. Hinsichtlich seiner vorbeschriebenen Expression in der Plazenta konnte weiterführend gezeigt werden, dass die *Gkn2* Expression im PE/IUGR Modell der Maus eine Abhängigkeit vom Gestationsalter zeigte und an E18.5 unter PE/IUGR signifikant reduziert war. In der Plazenta von Ratten der alimentär-induzierten IUGR ergab sich unabhängig vom Geschlecht keine signifikante Alteration der plazentaren *Gkn2* Expression. Im Folgenden werden die Ergebnisse im Detail diskutiert.

### 7.1 *Gkn1* Expression im plazentaren Dottersack

Unsere immunhistochemischen Analysen zur extragastralen Expression von GKN1 erbrachten als einziges Novum eine bislang nicht beschriebene Expression im Dottersack der Maus. Eine derartige Expression wurde für GKN2 von uns [11] und Antas et al. [52] bereits beschrieben. Der plazentare Dottersack ist ein wichtiges Organ der Embryogenese bei Säugetieren, da er zu Beginn der Schwangerschaft unter anderem an der Hämatopoese beteiligt ist. Die gemeinsame Expression von *Gkn1* in

Magen und Dottersack könnte sich anhand der gastrischen Organogenese erklären: Das primitive Darmrohr ist eine endodermal abgeleitete Struktur, die sich aus dem dorsalen Teil des Dottersacks bildet, der durch frühe Faltprozesse (beim Menschen ungefähr am 16. Entwicklungstag) ins Innere des Embryos wandert. Im Anschluss finden Abschnürprozesse statt, in deren Folge der primitive Darm und später auch der Magen entsteht [100].

Die Expression von *Gkn2* im Dottersack der Maus zeigt einen graduellen Anstieg im Laufe der Schwangerschaft bis E12.5, wonach seine Expression wieder abfällt [52]. Bislang existiert keine vergleichbare Untersuchung zur Expression von GKN1 in Abhängigkeit vom Gestationsalter. Während beim Menschen GKN1 im extravillösen Trophoblasten in der dezidualen Basalplatte exprimiert wird [11], findet sich kein entsprechendes trophoblastäres Korrelat in Ratte und Maus. Dieses Ergebnis spricht für speziesspezifische Unterschiede, zumal Nagetierplazenten zwar einen hämochorialen Aufbau haben, aber keine vergleichbar tiefe Invasion von Trophoblasten in die maternale Dezidua [76]. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass GKN1 die Migration einer trophoblastären Chorionkarzinomzelllinie hemmt; in diesem Zusammenhang wurde die Bedeutung von GKN1 für die Regulation der extravillösen Invasion bzw. der dezidualen Verankerung der Plazenta beim Menschen diskutiert [10].

Einschränkend bleibt zu erwähnen, dass unsere immunhistochemische Analyse von GKN1 in Maus und Ratte nicht auf speziesspezifischen Antikörpern basierte. In Ermangelung kommerzieller Alternativen etablierten wir die Färbung im Tiermodell mit den im TMA eingesetzten anti-humanen GKN1 Antikörpern. Daher sind die gewonnenen Erkenntnisse zu GKN1 unter Vorbehalt zu sehen und bedürfen einer erneuten Reevaluation.

## 7.2 Tiermodelle der IUGR und PE/IUGR

### 7.2.1 Auxologie unserer Tiermodelle: Erfolgreiche Etablierung eines IUGR-Phänotyps

Um die Wirksamkeit unserer Nagetiermodelle in Bezug auf die Etablierung einer IUGR einzuschätzen, erfassten wir das Gewicht von Plazenta und Fetus zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten (E15, E18.5).

Die reduzierten Plazenta- und Fetalgewichte in unseren Nagetiermodellen zeigen, dass es sich um effektive Modelle für IUGR handelt. Die IUGR hatte keinen Einfluss auf die Wurfgröße in beiden Modellen [77, 79], was einen suffizienten Gruppenvergleich ermöglichte. Unser isokalorisches Proteinmangelmodell der Ratte zeigte keine Reduktion des Verhältnisses von Plazenta zu Körpergewicht, wie zuvor beschrieben [77]. Dies spricht für einen signifikanteren Einfluss der LP-Diät auf das fetale Körpergewicht. Dementgegen findet sich in Modellen mit strengeren Mangelernährungsregimen während der Trächtigkeit ein reduziertes Verhältnis von Plazenta- zu Körpergewicht [101]. Es ist daher anzunehmen, dass unser alimentäres IUGR Modell eine intakte plazentare Kompensationskapazität besitzt, ähnlich wie von Chu et al. in einem vergleichbaren IUGR-Modell [102] beschrieben.

### 7.2.2 Plazentare Alteration der *Gkn2* Expression bei IUGR

Über die Rolle von GKN2 in der Plazenta wurde bislang nur spekuliert [9]. Es ist bekannt, dass GKN2 für die Entwicklung der humanen Plazenta eine Rolle spielt, wobei in frühen Schwangerschaftsphasen eine ubiquitäre Expression zu finden ist, während in späteren Schwangerschaftsstadien ein differenzierteres Expressionsmuster vor allem in extravillösen Trophoblasten der dezidualen Basalplatte zu beobachten ist. Bei der Schwangerschaftspathologie HELLP persistiert die synzytiale Expression von GKN2, was für einen reduzierten Zustand der Differenzierung des Synzytiotrophoblast bei dieser Erkrankung sprechen könnte. In der Nagetierplazenta konnte unsere Arbeitsgruppe GKN2 spezifisch in Glykogenzellen der spongiotrophoblastären Zone nachweisen, einer Struktur, die der des humanen extravillösen Trophoblasten ähnelt. Des Weiteren findet sich eine

Induktion von GKN2 im Rahmen von villöser Fibrose, wie man sie bei IUGR und PE beobachtet [9].

Bislang bleibt jedoch unklar, ob die Alteration von synzytialer bzw. villöser GKN2 Expression eine Folge oder mit Ursache für diese Schwangerschaftskomplikation ist. Beim Menschen wurde GKN 1 nur in der Plazenta gefunden. Demgegenüber besitzt humanes GKN2 hinsichtlich seiner Expression ein anatomisches Korrelat in der Nagetierplazenta, weshalb in der vorliegenden Arbeit den Einfluss von IUGR (Ratte), bzw. PE/IUGR (Maus) auf dessen Lokalisation und Expression untersucht wurde.

Die Tatsache, dass kein Einfluss der maternalen Proteinmangeldiät auf die plazentare Lokalisation und Expression in unserem Rattenmodell gefunden wurde, könnte für eine erhaltene plazentare Kompensationsreserve sprechen, wie sie bereits oben diskutiert wurde [77, 102]. Die Mechanismen einer solchen Kompensation bleiben offen.

Interessanterweise zeigte sich in unseren C57BL/6 Wildtyp Mäusen ein signifikanter Anstieg der plazentaren *Gkn2* Expression im Gestationsverlauf, welcher bis E18.5 persistierte. Ein vergleichbarer, wenn auch transienter Anstieg der *Gkn2* Expression (bis E12.5, dann wieder abfallend) wurde auch für den Dottersack von Mäusen beschrieben [52]. Der *Gkn2* Expressionsanstieg in Plazenta und Dottersack von Nagetieren im Laufe der Schwangerschaft steht scheinbar im Widerspruch zu unseren bisherigen humanen Daten, bei denen die immunhistochemischen Analysen von GKN2 eine fast ubiquitär trophoblastäre Expression im ersten Trimenon zeigen, mit einer auf das extravillöse Kompartiment fokussierten Expression im dritten Trimenon. Hierzu existieren aber bislang weder quantitative noch kompartimentspezifische humane Analysen. Histologische Untersuchungen hinsichtlich einer vergleichbaren Alteration der Lokalisation der GKN2 Expression beim Nagetier sind durch unsere Arbeitsgruppe bislang nicht erfolgt.

Eine Induktion der *Gkn2* Expression in den Glykogenzellen der gesunden Maus (Ratte bislang nur E18.5 untersucht) könnte für eine vermehrte auto-/parakrine Sekretion des Proteins sprechen.

Von GKN2 knockout (*GKN2<sup>-/-</sup>*) Mäusen weiß man, dass der Verlust des Proteins die epitheliale Differenzierung der Magenschleimhaut hemmt [34]. Auf die Plazenta der

Maus übertragen könnte die zunehmende Sezernierung von GKN2 hypothetisch zur strukturellen Ausdifferenzierung des Organs beitragen.

Eine weitere Rolle von GKN2 im Magen ist die Regulation der T-Helferzelle Typ 1 (Th1) Immunantwort [34]: *Helicobacter pylori*-infizierte GKN2<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen eine übersteigerte Th1 Antwort, welche in Verbindung gebracht wird mit der Dysregulation der angeborenen Schleimhautimmunität in diesen knockout Tieren und verantwortlich für die Magenkrebsentstehung ist.

Die Th1 Immunantwort und ihre Regulation ist auch für die Plazenta essenziell [103]. Eine unkontrollierte Aktivierung der Th1 Antwort, z.B. im Rahmen einer bakteriellen Infektion, könnte zur Rekrutierung zytotoxischer T-Zellen führen, welche den Schwangerschaftserhalt gefährdet. So konnte in *Listeria monocytogenes*-infizierten schwangeren Mäusen gezeigt werden, dass die zur Abwehr benötigte Th1 Antwort (Produktion von Tumor Nekrose Faktor (TNF) alpha, Interferon (IFN) gamma) nicht von der Plazenta selbst, sondern von der Mutter ausgeht [103]. Ob GKN2 in der Suppression der plazentaren Th1 Antwort eine regulative Rolle in Analogie zum Magen spielt, ist bislang noch nicht untersucht worden.

In der hier vorgestellten Arbeit blieb der Anstieg der plazentaren *Gkn2* Expression an E18.5 durch den knockout von eNOS aus. Dies scheint keinen signifikanten Einfluss auf die Th1 Antwort der Plazenta zu nehmen, zumal keine plazentare Induktion von TNF-alpha in diesen Tieren nachgewiesen werden konnte [83]. Jedoch könnte die plazentare Immunantwort in eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen auch durch andere Botenstoffe, wie Interleukine (IL), moduliert sein. So konnte unsere Arbeitsgruppe [79] eine Induktion von IL-11 in den Plazenten von eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen zeigen, einem Interleukin, welches die Produktion von TNF-alpha und IFN-gamma reduzieren kann [104]. Die Rolle von GKN2 in der Regulation solcher inflammationsmodulierenden Botenstoffen an der feto-maternalen Grenzfläche ist bislang nicht untersucht worden.

In ihren Untersuchungen zur plazentaren Schädigung durch Superoxide in eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen konnten Kusinski et al. [80] zeigen, dass an E17.5 insbesondere der Spongiotrophoblast betroffen war, also das Kompartiment, in dem die GKN2-produzierenden Glykogenzellen liegen. Die Glykogenzellen wurden allerdings nicht gesondert untersucht [80]. Unsere immunhistochemische Analyse zeigt, dass die C57BL/6 Wildtyp Maus im Gegensatz zur Ratte GKN2 auch in der die GKN2-positiven

Glykogenzellen umgebenden spongiotrophoblastären Zone produziert. Der Knockout von eNOS führte auch in unserer immunhistochemischen Analyse zur strukturellen Schädigung dieser plazentaren Zone, was die Ergebnisse von Kusinski et al. [80] bestätigt. Somit könnte ein durch defiziente Spiralarterienversorgung bedingter Sauerstoffmangel oder eine Schädigung der Glykogenzellen durch Superoxide zur verminderten Expressionsrate von plazentarem *Gkn2* an E18.5 in unseren Tieren geführt haben. Eine solche Regulation ist bislang noch nicht untersucht worden.

### 7.3 Expression von *Gkn2* in extragastralen Organen von Mensch, Ratte und Maus

#### Allgemeines

Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse der GKN2 Expression in multiplen Organen von Mensch, Ratte und Maus sind rein deskriptiver Natur. Daher können nur hypothetische Schlussfolgerungen basierend auf der Lokalisation von GKN2 bzw. der lokalen Expression anderer BRICHOS-Domänen-Proteine gezogen werden, welche einer Verifizierung durch Folgestudien bedürfen. Die Funktion vieler dieser Proteine ist unbekannt und auch, ob die verschiedenen Proteine der BRICHOS-Familie die gleiche lokale Funktion über ihre gemeinsame BRICHOS-Domäne ausüben. Mehrere funktionelle Rollen von BRICHOS-domänenhaltigen Proteinen einschließlich GKNs wurden in früheren Studien beschrieben [20, 22]: Es gibt 8 bekannte BRICHOS-domänenhaltige Familienmitglieder. Hierzu gehören die Krebs-assoziierten Gastroke 1 und 2, Chondromodulin-1, die Demenz-assoziierte Familie der Typ II integralen Membranproteine (ITM2a, ITM2b, ITM2c), das mit Atemwegserkrankungen assoziierte Prosurfactant Protein C (ProSP-C) und Tenomodulin (TNMD). Bislang vorgeschlagene Funktionen der BRICHOS-Domäne in den verschiedenen Familienmitgliedern sind a) Chondrogenese (ITM2A, Chondromodulin-I), b) tumorsuppressive Funktion und Schleimhautintegrität (GKN1, GKN2), c) Lungentensidaktivität (proSP-C) sowie alzheimer- und demenzassoziierte Aktivität (proSP-C, ITM2, GKN1) [20, 22].

Im Allgemeinen zeigte sich für die Organe, die parallel in Mensch und Nagetier untersucht wurden, i.e. Hoden, Lunge und Leber, ein vergleichbares Ergebnis hinsichtlich der Proteinlokalisierung. Bezüglich der verwendeten Antikörper ergaben sich bessere Ergebnisse mit dem polyklonalen Biorbyt Antikörper beim Menschen, während das Färbeverhalten des monoklonalen Antikörpers von Abcam in den Nagetierorganen optimaler war. Beim Vergleich der Qualität der immunhistochemischen Schnitte beim Menschen zeigte sich, dass die Gewebeproben des TMA aufgrund der längeren Fixierung in PFA teils eine verminderte Immunreaktivität gegenüber den unmittelbar aufbereiteten Gewebeproben aufwiesen.

Die Expression von GKN2 in Plazenta und Magen ist bereits ausführlich durch uns [11] und andere [3] beschrieben worden. Im Folgenden werden die neuen immunhistochemischen Erkenntnisse zur extragastralen Expression nach Organsystem gegliedert diskutiert.

### **GKN 2 Expression in der Leber**

In der Leber zeigte sich eine Expression von GKN2 nach funktionellen Zonen (sog. „functional liver zonation“ [105], wobei diese beim Nagetier ausgeprägter schien. Die höchste Immunreaktivität ergab sich in Hepatozyten in unmittelbarer Umgebung der Periportalfelder und nahm in Richtung Zentralvene ab.

Die grundlegende architektonische Einheit der Leber bei Mensch, Ratte und Maus ist das Leberläppchen. Es besteht aus hepatozytären Schichten, die sinusförmig von Kapillaren durchzogen werden, welche in Richtung einer zentralen efferenten Vene ausstrahlen. Leberläppchen sind grob hexagonal, wobei jede der sechs Ecken durch das Vorhandensein einer Portaltriade von Gefäßen abgegrenzt wird, die aus einer Portalvene, einem Gallengang und einer Leberarterie bestehen [105]. Sowohl die Portalvene als auch die Leberarterie versorgen das Leberläppchen mit Blut, das durch ein Netz sinusförmiger Kapillaren strömt, bevor es durch die zentrale Vene abfließt.

Der Bauplan der Leber bedingt einen Sauerstoffgradienten, wobei der Sauerstoffgehalt im Gewebe vom afferenten Schenkel (Periportalfeld) bis zum efferenten Schenkel (zentrale Lebervene) abnimmt. Zudem richtet sich die Expression von Stoffwechsellzymen zonal an dieser anatomischen Gegebenheit aus: So finden sich beispielsweise Enzyme der Glukoneogenese und die Carbamoylphosphatase des Harnstoffzyklus periportal bis midzonal, während die Glykogenolyse und Lipolyse in der Nähe der Zentralvene stattfindet und die Glutaminsynthese nur in den beiden die Zentralvene umgebenden Schichten zu finden ist [106].

In den letzten Jahrzehnten [106] hat man versucht zu ergründen, woher diese funktionelle Zonierung rührt. Initial wurde überlegt, ob die periportalen Schichten einem stärkeren endokrinen Einfluss von Glukokortikoiden [107] unterliegen, oder ob diese Unterschiede embryonal präformiert sind [108]. Es zeigte sich jedoch, dass diese zonalen Unterschiede sich erst postpartal ausprägen und der Wnt/ademomatous polyposis coli (APC)/beta-Catenin Signalweg verantwortlich für deren Regulation ist. Dabei findet sich eine hohe beta-Catenin Expression im Bereich der Zentralvene und eine hohe APC Expression periportal [106].

Da sich die hepatische GKN2 Expression vor allem periportal zeigt, könnte man hypothetisieren, dass a) es sich um ein downstream von Wnt/APC/beta-Catenin reguliertes Gen handelt (periportal fehlt das Wnt Signal, so dass es zur Degradierung von beta-Catenin über den APC Komplex kommt [106]), b) es, in Analogie zur Expression in Glykogenzellen der Plazenta von Ratte und Maus, in Hepatozyten exprimiert wird, die im Glykogenstoffwechsel, hier vermutlich Glukoneogenese, involviert sind, c) ähnlich seiner Schleimhautfunktion im Magen die Integrität der periportalen Strukturen vor dem Erstkontakt mit Stoffen der Leberafferenz schützt und d) ggf. unter dem endokrinen Einfluss von Glukokortikoiden steht. Bislang wurde keine dieser Hypothesen in anderen Organen oder dem Magen untersucht.

Ähnlich dem Dottersack (siehe Abschnitt 7.1, S. 53) könnte die Expression von GKN2 in der Leber sowie in weiteren der hier untersuchten Organe auf der gemeinsamen endodermalen Organogenese mit dem Magen als Hauptort der Gastrokinexpression beruhen. Aus dem embryonalen Endoderm entwickelt sich der Vorderdarm und aus diesem die Organe Magen, Lunge, Leber, Gallenblase und Pankreas. Das hepatische Mesenchym hingegen ist mesodermalen Ursprungs [109].

Zu beachten ist, dass sich die Leber von Mensch Ratte und Maus zwar in ihrem Leberläppchen-basierten Grundbauplan ähneln, sich aber strukturelle Unterschiede zeigen, die in den beobachteten Unterschied der zonalen Expression von GKN2 zwischen den Spezies mit hineingespielt haben könnten [110].

Diese Unterschiede sind vor allem quantitativer Natur: So besitzt die Ratte im Gegensatz zu Maus und Mensch beispielsweise keine Gallenblase. Interessanterweise konnten Baus-Loncar et al. [12] - entgegen unseren Ergebnissen aus der Ratte - keine relevante *Gkn2* Expression in der Leber der Maus nachweisen. Dies könnte auf Unterschieden der Gewebeentnahme/Lokalisation bzw. auf Speziesunterschieden beruhen. Ein vergleichender *Gkn2* Expressionsnachweis in der Leber der Maus ist durch uns bislang nicht erfolgt.

Die Galle von Maus und Ratte ist hydrophiler als beim Menschen, da sie die Fähigkeit besitzen, Muricholsäure zu synthetisieren, was im Gegensatz zum Menschen eine renale Ausscheidung der Galle ermöglicht. Zudem finden sich anatomische Unterschiede hinsichtlich der makroskopischen Lappung und bindegewebigen Anteile [110]. Entscheidend beim Vergleich von Ratte/Maus und Mensch ist die fünffach stärkere humane Abhängigkeit der Produktion und des Verbrauchs von Metaboliten von der Perfusion des Leberläppchens durch die A. hepatica und seiner im Speziesvergleich geringeren Abhängigkeit von der Portalvene (25% niedriger) [110].

### **GKN 2 Expression in der Lunge**

Baus-Loncar et al. [12] konnten bereits eine minimale *Gkn2* mRNA Expression in der Lunge der Maus nachweisen, welche aber nicht weiter untersucht wurde.

Laut dem menschlichen Proteinatlas [111] findet sich eine mRNA Expression von humanem Gastrokin 2 in den sekretorischen Keulenzellen sowie in alveolaren Pneumozyten I und II der Lunge.

In unserer Untersuchung an gesundem Lungengewebe fand sich eine GKN2 Immunreaktivität in Zellen des Flimmerepithels auf Höhe der großen Atemwege, sowie in Pneumozyten Typ II. Die Lokalisation von GKN2 in der Lunge stimmen bei Nagetier und Mensch überein.

Wie auch die Leber (siehe Diskussion S. 7.3, S. 59) entstammt die Lunge sowie der Gastrokin-produzierende Magen dem endodermalen Vorderdarm.

Bislang wurde die Expression von GKN2 in der humanen Lunge nicht untersucht. Jedoch gibt es gute Untersuchungen zur Rolle und Wirkung von Prosurfactant Protein C (ProSP-C), welches an seinem C-terminalen Ende eine BRICHOS-Domäne besitzt und die Vorstufe zu Surfactant (SP-C) bildet, einem von Pneumozyten Typ II sezernierten oberflächenaktivem Protein [21]. Gain-of-function Mutationen in ProSP-C führen zur interstitiellen Lungenerkrankung über die Induktion von apoptotischem Zelltod via unfolded protein response (UPR) [21].

Basierend auf der Lokalisation von GKN2 und den beschriebenen Funktionen im Magen [3] könnte dieses hypothetisch eine Rolle für die Oberflächenintegrität des Flimmerepithels spielen sowie in der Regulation der lokalen Th1/Th2 Immunantwort von Bedeutung sein. Letzteres könnte theoretisch im Bereich der Asthmaentstehung (akzentuierte Th2 Antwort [112]) bzw. -therapie eine Rolle spielen. Hinsichtlich der Regulation von immunologischen Vorgängen sei auch auf unseren Nachweis einer subepithelialen Expression von GKN2 in pulmonalen Immunzellen hingewiesen.

Sollten sich hinsichtlich der Funktionalität der BRICHOS-Domäne Überschneidungen mit SP-C ergeben, hätte GKN2 eine potenzielle Rolle in der Verhinderung interstitieller Fibrose über seine Chaperonfunktion [21, 113].

Die abschließende Bewertung der funktionellen Rolle von GKN2 bleibt Folgeuntersuchungen vorbehalten. Die Bedeutung der Expression von GKN2 in trachealem Knorpel wird unter der Diskussion „GKN2 Expression in Knochen“ (siehe Abschnitt 7.3, S. 66f.) diskutiert.

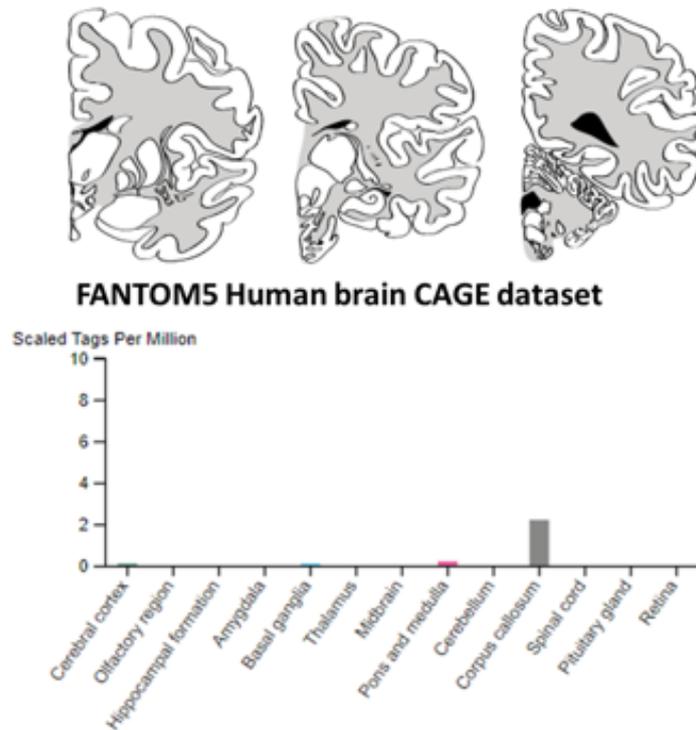
## GKN 2 Expression in extragastralen Geweben mit Amyloid-abhängiger Pathophysiologie

Über die Expression und die funktionelle Rolle von GKN2 im Gehirn, Hoden und Pankreas ist bislang nichts bekannt. Allen 3 Organen ist jedoch gemein, dass Amyloid eine bedeutende Rolle für die Ätiopathologie von Erkrankungen dieser Organe spielt [114-116], zum Beispiel im Rahmen von Morbus Alzheimer und Diabetes mellitus. In diesem Zusammenhang kommt der BRICHOS-Domäne, wie GKN2 sie besitzt, eine entscheidende Rolle zu, zumal es die Aggregation des Amyloid-beta (Ab) Peptids verhindert und damit die Entstehung toxischer Oligomere und Fibrillen [117].

**Im Gehirn** ist die pathologische Anhäufung von Beta-Amyloid an der Entstehung der Alzheimer Erkrankung beteiligt, wobei bislang vor allem das BRICHOS-Domän-Protein Bri2 (auch bekannt als integral membrane protein 2B, ITM2B) hinsichtlich seiner therapeutischen, anti-amyloiden Rolle untersucht wurde, zumal es die Blut-Hirnschranke überqueren kann [116]. Interessanterweise konnte 2014 von Altieri et al. gezeigt werden, dass GKN1 bei Patienten mit Morbus Alzheimer die Amyloidaggregation und die Formation von Fibrillen verhindern kann [118]. 2017 wurde in diesem Zusammenhang im Vergleich mit Bri2 die Rolle von GKN1 im Journal of Neurology and Neuromedicine als potentiell Therapeutikum bei Morbus Alzheimer diskutiert [118]. Die Rolle von GKN2 ist bislang nicht untersucht worden. Unsere Untersuchung von GKN2 im humanen Gehirn zeigte eine Expression in der Mikroglia. In der Maus hingegen konnten Baus-Loncar et al. [12] - entgegen unseren Ergebnissen aus der Ratte - keine relevante *Gkn2* Expression im Gehirn der Maus nachweisen. Dies könnte auf Unterschieden der Gewebeentnahme/Lokalisation, bzw. Speziesunterschieden beruhen. Ein vergleichender *Gkn2* Expressionsnachweis im Hirn der Maus ist durch uns bislang nicht erfolgt.

Es ist bekannt, dass diese Mikroglia pathophysiologisch bei Morbus Alzheimer involviert ist [119]. Während bei Ratte und Maus nur eine *Gkn2* mRNA Expression im Gehirn gezeigt werden konnte, unterstreicht das humane Ergebnis eine potenzielle zerebrale Bedeutung auch dieses BRICHOS-Domän-Proteins, welche weiter untersucht werden muss.

Laut dem Brain Proteom Atlas [120] findet sich eine humane GKN2 Expression in absteigender Quantität im Bereich des Corpus callosum > Pons/Medulla > Basalganglien > Cortex. Im Speziesvergleich findet sich bei der Maus kaum eine Expression in diesen Regionen (Abb. 25).



**Abb 25: Expression von GKN2 in verschiedenen Hirnregionen.** Nach Human Brain Protein Atlas [120].

Der Entnahmeort der in dieser Arbeit untersuchten zerebralen Gewebeprobe ist unklar. Zudem wurde die *Gkn2* mRNA Expression nur im Gesamtgehirn der Ratte untersucht. Eine Expression von GKN2 in humanem Corpus callosum könnte aber in Hinblick auf seine potentielle Rolle für Ab-Fibrillen assoziierte Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer eine Rolle spielen. So konnten Teipel et al. [121] zeigen, dass ein MRT-basierter Nachweis der Atrophie dieser Hirnregion den Verlust von intrakortikal projizierender neokortikaler Neuronen des pyramidalen Systems bei M. Alzheimer reflektiert. Es wurde postuliert, dass die Größe des Corpus callosum somit als klinischer Marker zur Evaluation der medikamentösen Therapie bei dieser Erkrankung dienen könnte [121].

**Im Hoden** sind Amyloide in physiologische Prozesse mit eingebunden [115]. Im Gegensatz zu anderen menschlichen biologischen Flüssigkeiten enthält Sperma in Abwesenheit von Krankheit mehrere Arten von Amyloidfibrillen. Roan et al. konnten zeigen, dass Amyloidfibrillen im Sperma eine Rolle bei der Reproduktion spielen können, indem sie an der Spermienauswahl teilnehmen und die schnelle Entfernung von Spermiantigenen erleichtern: So hemmten Amyloidfibrillen die Befruchtung durch Immobilisation von Sperma. Dies erleichterte die Phagozytose von beschädigten und apoptotischen (minderwertigen) Spermien durch Makrophagen im weiblichen Fortpflanzungstrakt [115]. Es konnte sowohl in Ratte und Maus als auch im Menschen eine GKN2-spezifische Immunreaktivität in Spermatogonien und Spermatozyten gezeigt werden (Abschnitt 6.2, S. 33 und Abschnitt 6.4.2, S. 46). Eine Verifikation mittels qRT-PCR oder Western Blot ist Bestandteil künftiger Projekte. Basierend auf der oben diskutierten Chaperon-Funktion der BRICHOS-Domäne und seiner Regulation der Amyloid-assoziierten Fibrillenbildung könnte GKN2 eine relevante Rolle in der Fertilitätsphysiologie zukommen.

In der Untersuchung **des Pankreas** zeigte sich eine GKN2 Expression im Bereich des exokrinen Pankreas des Menschen. Daten von Ratte und Maus bzw. immunhistochemische Analysen des endokrinen Pankreas waren der Untersuchung nicht zugänglich. Es ist bekannt, dass die BRICHOS-Domäne von Bri2 die Fibrillenbildung des Inselzell Amyloid Polypeptids (IAPP) verhindern kann, welches sich bei Diabetes Mellitus Typ 2 in pankreatischen Langerhans Inselzellen anhäufen kann und zum lokalen Zelluntergang beiträgt [114]. Zudem findet sich in endokrinen Zellen des Pankreas nach Information des humanen Proteinatlas eine Expression von *Gkn2* mRNA [111].

Ähnlich dem Magen, dem Hauptsyntheseort der Gastrokine, ist das Pankreas vom gleichen endodermalen Ursprung. Im humanen exokrinen Pankreas konnte eine randbetonte positive Färbung der Azini (Abschnitt 6.4.2, S. 50) festgestellt werden. Die Funktion von GKN2 im Pankreas ist bisher nicht bekannt. Es ließe sich jedoch ähnlich wie bei der Magenschleimhaut eine protektive Funktion als Schutz vor Autodigestion [35, 99] vermuten.

Chronische Pankreatitis ist eine inflammatorische Erkrankung des exokrinen Pankreas mit starkem Zelluntergang und fibrotischem Umbau. In der Folge kommt es zur Induktion der duktaalen und tubulären Trefoil Faktor 1 (TFF1) Expression [122]. Dieses Protein interagiert wie eingangs beschrieben mit GKN2 (siehe Abschnitt 3.4, S. 8f.), was auf eine antifibrotische Rolle von GKN2 im Bereich des exokrinen Pankreas – ähnlich der Funktion von proSP-C in der Lunge (siehe oben) – hindeuten könnte.

### **GKN 2 Expression im Knochen**

Basierend auf seiner Lokalisation in proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten von langen Röhrenknochen wie dem Femur von Ratte und Maus im Alter von 2 Wochen lässt sich vermuten, dass GKN2 eine Rolle für das juvenile enchondrale Knochenwachstum spielen könnte.

Während der Knochenreifung im Kindesalter bildet sich auf dem Knorpelgerüst der Wachstumsplatte eine verkalkende Knochenmatrix. Dieser Prozess nennt sich enchondrale Knochenbildung (EBF, endochondral bone formation) und führt am Ende der Pubertät zur Beendigung des Längswachstums [123]. EBF ist von der Aktivität von Chondrozyten abhängig, welche durch eine Vielzahl von Hormonen, Wachstumsfaktoren und metabolischen Bedingungen reguliert werden [124]. Beim Menschen ist die Dysregulation der EBF mit der Osteochondrodysplasie assoziiert, eine Störung des Knochenaufbaus, deren Pathophysiologie mit weiteren skelettalen Störungen wie beispielsweise der Achondroplasie [125, 126] und anderen [127-130] assoziiert ist. Die aktuelle Herausforderung der Forschung in diesem Bereich besteht darin, neuartige lokale Nischenfaktoren (sog. „microenvironmental factors“) zu identifizieren, die zur (Patho-)Physiologie der Skelettentwicklung und des Längswachstums beitragen [123]. Wir glauben, dass ein solcher neuartiger Faktor Gastrokin 2 (GKN2) sein könnte.

Es konnte bereits von anderen gezeigt werden, dass BRICHOS-Domän-Proteine, zu denen GKN2 zählt, eine wichtige Rolle für die Physiologie von Chondrozyten spielen: So fördert Chondromodulin-1 das Chondrozytenwachstum und hemmt die lokale Angiogenese [131, 132]. Das entsprechende Gen wird in der avaskulären Zone des prähypertrophen Knorpels exprimiert und seine Expression nimmt während der Chondrozytenhypertrophie und der Gefäßinvasion ab [131, 132]. Interessanterweise

hat sich gezeigt, dass Chondromodulin-1 bei Magenadenokarzinomen [133] als Tumorsuppressor fungiert, ähnlich wie Gastrokine.

Ein weiteres BRICHOS-domänenhaltiges Protein, Integral Membrane Protein 2A (ITM2A), ist an der osteo- und chondrogenen Differenzierung in der Maus beteiligt [134]. ITM2A-assoziierte Skeletterkrankungen sind Gaumenspalte mit/ohne Ankyloglosson (X chromosomal gebunden) und Ankyloglosson mit/ohne Zahnanomalien [135].

Es spielt des Weiteren eine Rolle in dem chondrogenen (weniger im osteogenen) Signalweg von C3H10T1/2-Zellen [134, 136]. Die Expression von ITM2A korreliert umgekehrt mit dem Expressionsmuster des Kollagentyps X während der chondrogenen Differenzierung von MCT- und ATDC5-Zellen, was die These der Beteiligung von BRICHOS-Domän-Proteinen in den frühen Stadien der Chondrogenese *in vitro* unterstützt [136].

Hinsichtlich der Rolle von GKN2 wird seine Bedeutung für die chondrale Funktion auch jenseits des langen Röhrenknochens durch unseren Nachweis seiner Expression in pulmonalem Ringknorpel gestützt (siehe Abschnitt 6.2, S. 32 und Abschnitt 6.4.2, S. 45).

### **GKN 2 Expression in Speicheldrüsen**

Speicheldrüsen haben, wie der Magen als Hauptproduktionsstätte der Gastrokine, einen endodermalen Ursprung [137]. Es konnte eine GKN2 Expression in der humanen Glandula parotis und submandibularis nachgewiesen werden. Vor allem die Endstücke, in denen das Drüsensekret gebildet wird, imponierten positiv. Da es sich bei GKN2 um ein sezerniertes Protein handelt, lässt sich vermuten, dass es in Form eines Speichelbestandteils eine Wirkung auf die orale Mukosa ausüben könnte. Unser Ergebnis wird durch den humanen Proteinatlas bestätigt, der eine mRNA von Gastrokine 2 in exokrinen Drüsenzellen zeigt [111].

Tatsächlich gab es bereits erste Studien zur Bedeutung von GKN1 (alternative Bezeichnung: AMP-18) für die Integrität der oralen Schleimhaut im Rahmen von zytotoxischer Krebstherapie und oraler Mukositis [138, 139]:

Chen et al. [138] konnten zeigen, dass AMP-18, bzw. sein synthetisches Peptid, zellprotektive und mitogene Effekte bei *in vitro* und *in vivo* Modellen

gastrointestinaler Epithelschädigung aufwiesen. Diese Wirkung beruhte unter anderem auf der Fähigkeit von AMP-18, spezifische Zell-Zellverbindungen und die Ausbildung von Adhärenzzonen zu stimulieren und zu stabilisieren. AMP-18 verhinderte strahlungsbedingte orale Mukositis in einem Mausmodell und stimulierte das Wachstum von HaCaT Zellen (human adult low-calcium, high-temperature keratinocytes; aneuploide immortale humane Hautkeratinozyten).

Wu et al. [139] konnten in Hamstermodellen von Kopf- und Halskrebs, bei deren Behandlung es zu oraler Mukositis (Bestrahlung/Einsatz von Cisplatin) kommt, zeigen, dass tägliche subkutane Gaben von AMP-18 Erytheme und Ulzerationen der Mundschleimhaut minimierten sowie deren Regeneration förderten. AMP-18 verhinderte dabei nicht die Effektivität der Tumortherapie. Wu et al. belegten weiterhin, dass eine Behandlung mit AMP-18 die TNF-alpha-induzierte Apoptose in HaCaT Zellen verhindern kann.

Die Rolle von GKN2 in diesem Zusammenhang ist bislang nicht untersucht. Da es sich aber nach unseren humanen TMA Daten bei GKN2 - im Gegensatz zu GKN1 (AMP-18, siehe Abb. 15, Abschnitt 6.4.1, S. 42) - um das lokal in den Speicheldrüsen exprimierte Gastrokin handelt, könnte diesem eine vergleichbare, wenn nicht sogar physiologischere Rolle für den Erhalt der oralen Schleimhautintegrität zukommen.

### **GKN 2 Expression im Immunsystem**

Der humane Proteinatlas [111, 140] gibt eine mRNA Expression von Gastrokin 2 in neutrophilen Granulozyten und Monozyten an. Bislang gelang in der Maus kein Nachweis einer relevanten *Gkn2* mRNA Expression in der Milz [12].

Während wir keine Untersuchungen zu zirkulierenden Immunzellen des Blutes unternahmen, konnte immunhistochemisch ein Nachweis von GKN2 in mehreren Organen des menschlichen Immunsystems, i.e. dem Stroma der Milz, der Tonsille, dem Omentum sowie in subepithelialen Immunzellen der Lunge erfolgen. Die Subklassenanalyse der Immunzellen mittels Oberflächenantigenen in diesen Organen stand zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit aus. Es wurde kein vergleichbarer Nachweis von GKN2 in der Milz von Nagetieren durchgeführt.

Basierend auf Daten aus der GKN2<sup>-/-</sup> Maus lässt sich hypothetisch eine Rolle von GKN2 auf die Th1/Th2 Antwort ableiten [34]. Diese ergibt sich zum Teil aus einer

Reduktion von myeloiden Suppressorzellen (MDSC, engl. myeloid-derived suppressor cells). Dies sind unreife Vorstufen gemischten Hintergrunds (Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen), welche in der Lage sind, T-Zell-vermittelte Immunantworten zu unterdrücken [141].

GKN2<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten eine spezifische Reduktion monozytärer MDSCs, was zu einer gesteigerten Th1 Inflammationsreaktion nach Infektion mit *Helicobacter pylori* beitrug [34]. Menheniott et al. belegten, dass diese überschießende Reaktion mit dem Verlust der Immunregulation durch IL-10 und der reziproken Anreicherung von Antigen-präsentierenden Zellen (Makrophagen und dendritische Zellen) in diesem Modell zusammenhängt [34].

Eine Untersuchung hinsichtlich der Rolle von MDSCs sollte daher Bestandteil weiterführender Analysen zur Rolle von GKN2 in diesen Immunorganen sein.

#### **GKN 2 Expression in der Haut**

Entgegen der endodermalen Expression im Magen und Organen gleichen Ursprungs (siehe oben), wies auch die Haut von Ratte und Maus als ektodermales Organ eine starke Immunreaktivität für GKN2 auf. Dementsprechend zeigt auch der humane Proteinatlas eine Expression von GKN2 in der humanen Kerationzytenzelllinie HaCaT [142], in der auch bereits funktionelle *in vitro* Untersuchungen zur Rolle von GKN2 (AMP-18, siehe Diskussion Speicheldrüsen, Abschnitt 7.3, S. 67f.) durchgeführt wurden [138, 139]. Während sich in der Ratte auch GKN2 Immunreaktivität in Haar-assoziierten Strukturen zeigte, fehlten Hautanhangsgebilde im humanen TMA. Die Klärung der Bedeutung von GKN2 in der Haut bleibt weiterführenden Studien überlassen. Während im Rahmen dieser Diskussion vor allem auf die Funktion der BRICHOS-Domäne eingegangen wurde, ist erwähnenswert, dass Gastrokinen außer ihrer Chaperonfunktion auch weitere funktionelle Rollen zugesprochen werden [53]. Hnia et al. konnten für GKN1 im Kaumagen von Hühnern zeigen, dass es an das azide N-terminale Ende von Aktin bindet und am Aktinaufbau beteiligt ist. Es wurde diskutiert [53], ob GKN1 eine Rolle für die Verankerung des Aktin-Netzwerks an die Membran von Muskelzellen oder für die Interaktion von Aktin-Myosin in glatten Muskelzellen spielt [143]. Es konnte keine Expression von GKN1 im humanen TMA der Haut identifiziert werden (siehe Abb. 15, Abschnitt 6.4.1, S. 42). Diesem Ergebnis

steht die Expression von GKN2 in humaner Haut des TMA, in der Haut der Ratte und in keratinozytären Zelllinien gegenüber. Aufgrund der Tatsache, dass Gastrokeine (GKN1-3) in verschiedensten Säugetierspezies konserviert vorkommen [4], könnte man eine GKN1-ähnliche Rolle für das Aktin-Netzwerk der Haut auch für GKN2 annehmen. In diesem Zusammenhang konnte durch unsere Arbeitsgruppe bereits GKN2 in Myofibroblasten der Plazenta in Kollokalisierung mit smooth muscle actin (SMA) nachgewiesen werden [11]. Diese Zellen zeichnen sich durch eine gesteigerte Kontraktilität aus und haben unter anderem eine entscheidende Bedeutung für Reparaturprozesse der Haut [144]. Dort werden diese Zellen bei Verletzung zur Regeneration und Narbenbildung transient rekrutiert. Ein länger anhaltendes Rekrutment von Myofibroblasten trägt jedoch über die Entstehung von Fibrose zu Pathologien der Haut und in inneren Organen bei [144]. Somit könnte GKN2 über eine Aktinbindung eine Rolle bei Reparaturprozessen der Haut spielen. Zudem ist eine Aktinvernetzung für die Etablierung eines funktionellen Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix in Fibroblasten der Haut entscheidend [143, 145]. Eine Destabilisierung des Aktin-Zytoskeletts wirkt sich negativ auf die fibroblastäre Funktion aus und trägt zur atrophischen Hautalterung bei [145].

#### **GKN 2 Expression in Zelllinien**

Neben der oben beschriebenen Expression von *Gkn2* mRNA in HaCaT Zellen, findet sich die mRNA laut dem humanen Proteinatlas [142] auch in folgenden humanen Zelllinien: A549, HMC-1, MOLT-4, NTERA-2, PC-3, U-2 OS, U-266/70. Hier ergeben sich potenzielle Ansätze für weiterführende (funktionelle) Untersuchungen in Zelllinien aus Prostata (PC-3), Lunge (A549), neuronalen Vorläuferzellen (NTERA-2), dem Mesenchym (U-2 OS, U-266/70) sowie in lymphoiden (MOLT-4, U-266/70) und myeloiden Zelllinien (HMC-1).

## 8. Ausblick/Future aspects

### 8.1 CCKBR als potenzieller GKN-Rezeptor

Bislang gibt es noch keine Untersuchungen des Rezeptors, welcher die Wirkung von GKN2 vermittelt.

Erst kürzlich wurde jedoch mit dem Cholecystokin B Rezeptor (CCKBR) ein Protein identifiziert, über welches GKN1 seine Wirkung zu entfalten scheint. CCKBR vermittelt G-Protein-gekoppelt die Wirkung von Cholezystokin und Gastrin [146] und wurde zuerst im Intestinaltrakt sowie im ZNS beschrieben [138]. Neuere Studien konnten nun eine Kolo-kalisation von GKN1 und CCKRB in verschiedenen Zelllinien nachweisen [138]. Ebenso konnte in einigen Zellreihen die Wirkung von GKN1 durch den selektiven CCKBR-Antagonisten YM022 blockiert werden [147], was darauf schließen lässt, dass GKN1 über den CCKBR je nach Zelltyp verschiedene Signalkaskaden aktiviert [138, 148].

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu GKN1 und des gemeinsamen Vorhandenseins der funktionellen BRICHOS-Domäne [20] ließe sich hypothetisch ein ähnliches Rezeptorbindungsverhalten für GKN2 vermuten.

In zahlreichen von uns untersuchten Organen wurde bereits durch andere Arbeitsgruppen eine signifikante CCKBR Expression nachgewiesen. Hierzu gehört der Magen, das Pankreas und das Gehirn [81]. Eine geringe Expression wurde in der Lunge, der Milz, der Leber und dem Knochen nachgewiesen [149]. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die mutmaßliche funktionelle Rolle von CCKBR für GKN2 in extragastralen Organen zu belegen.

### 8.2 Limitationen der Studie

Die Untersuchung der GKN1- und 2-Expression in PE-/IUGR-Plazenten lässt nur eine eingeschränkte Interpretation zu, da im Rahmen dieser Studie ausschließlich Nagetierplazenten verwendet wurden. In der humanen Plazenta ist nicht nur ein anderes Expressionsmuster von GKN1 und 2 innerhalb der Plazenta, sondern aufgrund der abweichenden Anatomie und Physiologie möglicherweise auch eine andere Rolle bei der plazentaren Entwicklung anzunehmen. Darüber hinaus hat sich unsere Studie ausschließlich auf einen quantitativen Nachweis mittels PCR

konzentriert, welcher sich durch Western Blotting noch weiter verifizieren ließe. Für die Untersuchung von GKN2 im eNOS<sup>-/-</sup> Mausmodell standen zudem nur männliche Feten zur Verfügung.

### 8.3 Mögliche weiterführende Untersuchungen

Die in der hier vorgestellten Studie gelieferten Daten zur Expression von GKN2 in humanem Gewebe (TMA) und in Geweben von Ratte und Maus sind rein deskriptiver Natur. Weitere funktionelle Untersuchungen müssen folgen, wobei immortale kanzerogene Zelllinien wie die trophoblastären Chorionkarzinomzelllinien [9] oftmals den Tumorsuppressor GKN2 nicht exprimieren (siehe GKN2 Expression in Zelllinien, S. 70). Hierfür könnte das GKN2<sup>-/-</sup> Mausmodell ein wichtiges Mittel darstellen, zumal sich das GKN2 Expressionsprofil von Mensch und Nagetier in der hier vorgestellten Studie in vielen Organen gleich. Weiterhin gilt es neben der immunhistochemischen Analyse die Expression mittels qRT-PCR oder Western Blotting zu verifizieren.

Hinsichtlich der Analyse der GKN2 Expression in unserem eNOS<sup>-/-</sup> PE/IUGR Modell wären weiterführende Studien an Modellen mit ausgeprägter plazentarer Unterversorgung, wie dem Modell der A. uterina Ligatur [150], denkbar, sowie Untersuchungen zum Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks und von inflammatorischen Faktoren auf die Expression von placentarem GKN2.

Hinsichtlich der Analytik mittels TMA ergaben sich Einschränkungen bezüglich der reduzierten Qualität der oft überfixierten Gewebeproben mit erhöhtem immunhistochemischen Hintergrund sowie der unklaren Lokalisation des Entnahmeortes. Der TMA gab zudem nur ein sehr limitiertes Bild der menschlichen Organe wieder, wobei manche Organe (z.B. Speicheldrüsen, immunologische Organe) überrepräsentiert waren, während andere fehlten. Weiterhin gab es zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Studie keinen kommerziell erwerblichen GKN1 Antikörper zur immunhistochemischen Analyse in Ratte und Maus.

## 9. Anhang

### 9.1 Literaturverzeichnis

1. Martin, T.E., et al., *A novel mitogenic protein that is highly expressed in cells of the gastric antrum mucosa*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **285**(2): p. G332-43.
2. Nardone, G., et al., *Gastrokine 1 expression in patients with and without Helicobacter pylori infection*. Dig Liver Dis, 2007. **39**(2): p. 122-9.
3. Menheniott, T.R., B. Kurklu, and A.S. Giraud, *Gastrokines: stomach-specific proteins with putative homeostatic and tumor suppressor roles*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2013. **304**(2): p. G109-21.
4. Menheniott, T.R., et al., *A novel gastrokine, Gkn3, marks gastric atrophy and shows evidence of adaptive gene loss in humans*. Gastroenterology, 2010. **138**(5): p. 1823-35.
5. Dai, J., et al., *Gastrokine-2 is downregulated in gastric cancer and its restoration suppresses gastric tumorigenesis and cancer metastasis*. Tumour Biol, 2014. **35**(5): p. 4199-207.
6. Kim, O., et al., *GKN2 contributes to the homeostasis of gastric mucosa by inhibiting GKN1 activity*. J Cell Physiol, 2014. **229**(6): p. 762-71.
7. Rippa, E., et al., *Overexpression of gastrokine 1 in gastric cancer cells induces Fas-mediated apoptosis*. J Cell Physiol, 2011. **226**(10): p. 2571-8.
8. Toback, F.G., et al., *Peptide fragments of AMP-18, a novel secreted gastric antrum mucosal protein, are mitogenic and motogenic*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **285**(2): p. G344-53.
9. Fahlbusch, F.B., et al., *Trophoblast expression dynamics of the tumor suppressor gene gastrokine 2*. Histochem Cell Biol, 2015. **144**(3): p. 281-91.
10. Fahlbusch, F.B., et al., *The tumor suppressor gastrokine-1 is expressed in placenta and contributes to the regulation of trophoblast migration*. Placenta, 2013. **34**(11): p. 1027-35.
11. Fahlbusch, F.B., Bartunik, H. M., Volkert G. , Hartner A., Huebner H., Ruebner M., Kehl S., Schneider-Stock R., Rascher W., *Characterisation of the tumor-suppressor gene gastrokine 2 in the human placenta*. 2014. **35**(9): p. A52.
12. Baus-Loncar, M., et al., *Cytokine regulation of the trefoil factor family binding protein GKN2 (GDDR/TFIZ1/blottin) in human gastrointestinal epithelial cells*. Cell Physiol Biochem, 2007. **20**(1-4): p. 193-204.
13. Oien, K.A., et al., *Gastrokine 1 is abundantly and specifically expressed in superficial gastric epithelium, down-regulated in gastric carcinoma, and shows high evolutionary conservation*. J Pathol, 2004. **203**(3): p. 789-97.
14. Oien, K.A., et al., *Profiling, comparison and validation of gene expression in gastric carcinoma and normal stomach*. Oncogene, 2003. **22**(27): p. 4287-300.
15. Du, J.J., et al., *[Study on novel gene GDDR related to gastric cancer]*. Zhonghua Wai Ke Za Zhi, 2005. **43**(1): p. 10-3.
16. Du, J.J., et al., *[Down-regulated full-length novel gene GDDR and its effect on gastric cancer]*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2003. **83**(13): p. 1166-8.
17. Xing, R., et al., *Gastrokine 1 induces senescence through p16/Rb pathway activation in gastric cancer cells*. Gut, 2012. **61**(1): p. 43-52.

18. Yan, G.R., et al., *Proteomics characterization of gastrokine 1-induced growth inhibition of gastric cancer cells*. *Proteomics*, 2011. **11**(18): p. 3657-64.
19. Moss, S.F., et al., *Decreased expression of gastrokine 1 and the trefoil factor interacting protein TFIZ1/GKN2 in gastric cancer: influence of tumor histology and relationship to prognosis*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(13): p. 4161-7.
20. Hedlund, J., J. Johansson, and B. Persson, *BRICHOS - a superfamily of multidomain proteins with diverse functions*. *BMC Res Notes*, 2009. **2**: p. 180.
21. Mulugeta, S., et al., *A surfactant protein C precursor protein BRICHOS domain mutation causes endoplasmic reticulum stress, proteasome dysfunction, and caspase 3 activation*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005. **32**(6): p. 521-30.
22. Sanchez-Pulido, L., D. Devos, and A. Valencia, *BRICHOS: a conserved domain in proteins associated with dementia, respiratory distress and cancer*. *Trends Biochem Sci*, 2002. **27**(7): p. 329-32.
23. Maguire, J.A., S. Mulugeta, and M.F. Beers, *Endoplasmic reticulum stress induced by surfactant protein C BRICHOS mutants promotes proinflammatory signaling by epithelial cells*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011. **44**(3): p. 404-14.
24. Nardone, G., et al., *Molecular expression of Gastrokine 1 in normal mucosa and in Helicobacter pylori-related preneoplastic and neoplastic gastric lesions*. *Cancer Biol Ther*, 2008. **7**(12): p. 1890-5.
25. Yoon, J.H., et al., *Inactivation of the Gastrokine 1 gene in gastric adenomas and carcinomas*. *J Pathol*, 2011. **223**(5): p. 618-25.
26. Yoshikawa, Y., et al., *Isolation of two novel genes, down-regulated in gastric cancer*. *Jpn J Cancer Res*, 2000. **91**(5): p. 459-63.
27. Kim, Y.S., et al., *Detection of genetic alterations in the human gastric cancer cell lines by two-dimensional analysis of genomic DNA*. *Int J Oncol*, 2000. **17**(2): p. 297-308.
28. Koizumi, Y., et al., *Changes in DNA copy number in primary gastric carcinomas by comparative genomic hybridization*. *Clin Cancer Res*, 1997. **3**(7): p. 1067-76.
29. Panani, A.D., *Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: clinical implications*. *Cancer Lett*, 2008. **266**(2): p. 99-115.
30. Moore, L.D., T. Le, and G. Fan, *DNA methylation and its basic function*. *Neuropsychopharmacology*, 2013. **38**(1): p. 23-38.
31. Resnick, M.B., et al., *Global analysis of the human gastric epithelial transcriptome altered by Helicobacter pylori eradication in vivo*. *Gut*, 2006. **55**(12): p. 1717-24.
32. Mao, W., et al., *Helicobacter pylori infection and administration of non-steroidal anti-inflammatory drugs down-regulate the expression of gastrokine-1 in gastric mucosa*. *Turk J Gastroenterol*, 2012. **23**(3): p. 212-9.
33. Martin, G., et al., *Low-dose aspirin reduces the gene expression of gastrokine-1 in the antral mucosa of healthy subjects*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2008. **28**(6): p. 782-8.
34. Menheniott, T.R., et al., *Loss of gastrokine-2 drives premalignant gastric inflammation and tumor progression*. *J Clin Invest*, 2016. **126**(4): p. 1383-400.
35. Otto, W.R., et al., *Identification of blottin: a novel gastric trefoil factor family-2 binding protein*. *Proteomics*, 2006. **6**(15): p. 4235-45.
36. Xiao, P., et al., *Trefoil factors: Gastrointestinal-specific proteins associated with gastric cancer*. *Clin Chim Acta*, 2015. **450**: p. 127-34.

37. May, F.E., S.M. Griffin, and B.R. Westley, *The trefoil factor interacting protein TFIZ1 binds the trefoil protein TFF1 preferentially in normal gastric mucosal cells but the co-expression of these proteins is deregulated in gastric cancer*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009. **41**(3): p. 632-40.
38. Thim, L., *A new family of growth factor-like peptides. 'Trefoil' disulphide loop structures as a common feature in breast cancer associated peptide (pS2), pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP), and frog skin peptides (spasmolysins)*. *FEBS Lett*, 1989. **250**(1): p. 85-90.
39. Aihara, E., K.A. Engevik, and M.H. Montrose, *Trefoil Factor Peptides and Gastrointestinal Function*. *Annu Rev Physiol*, 2017. **79**: p. 357-380.
40. Wong, W.M., R.J. Playford, and N.A. Wright, *Peptide gene expression in gastrointestinal mucosal ulceration: ordered sequence or redundancy?* *Gut*, 2000. **46**(2): p. 286-92.
41. Yio, X., et al., *Trefoil factor family-1 mutations enhance gastric cancer cell invasion through distinct signaling pathways*. *Gastroenterology*, 2006. **130**(6): p. 1696-706.
42. Masiakowski, P., et al., *Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line*. *Nucleic Acids Res*, 1982. **10**(24): p. 7895-903.
43. Regalo, G., N.A. Wright, and J.C. Machado, *Trefoil factors: from ulceration to neoplasia*. *Cell Mol Life Sci*, 2005. **62**(24): p. 2910-5.
44. Jakowlew, S.B., et al., *Sequence of the pS2 mRNA induced by estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7*. *Nucleic Acids Res*, 1984. **12**(6): p. 2861-78.
45. Buache, E., et al., *Deficiency in trefoil factor 1 (TFF1) increases tumorigenicity of human breast cancer cells and mammary tumor development in TFF1-knockout mice*. *Oncogene*, 2011. **30**(29): p. 3261-73.
46. Westley, B.R., S.M. Griffin, and F.E. May, *Interaction between TFF1, a gastric tumor suppressor trefoil protein, and TFIZ1, a brichos domain-containing protein with homology to SP-C*. *Biochemistry*, 2005. **44**(22): p. 7967-75.
47. Kjellef, S., *The trefoil factor family - small peptides with multiple functionalities*. *Cell Mol Life Sci*, 2009. **66**(8): p. 1350-69.
48. Prest, S.J., F.E. May, and B.R. Westley, *The estrogen-regulated protein, TFF1, stimulates migration of human breast cancer cells*. *FASEB J*, 2002. **16**(6): p. 592-4.
49. Kosriwong, K., et al., *Trefoil factors: tumor progression markers and mitogens via EGFR/MAPK activation in cholangiocarcinoma*. *World J Gastroenterol*, 2011. **17**(12): p. 1631-41.
50. Arumugam, T., et al., *Trefoil factor 1 stimulates both pancreatic cancer and stellate cells and increases metastasis*. *Pancreas*, 2011. **40**(6): p. 815-22.
51. *Genecards*. 04/2021; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GKN2>.
52. Antas, V.I., et al., *Gastrokine-2 is transiently expressed in the endodermal and endothelial cells of the maturing mouse yolk sac*. *Gene Expr Patterns*, 2014. **16**(2): p. 69-74.
53. Hnia, K., et al., *Biochemical properties of gastrokine-1 purified from chicken gizzard smooth muscle*. *PLoS One*, 2008. **3**(12): p. e3854.

54. Seckl, M.J., N.J. Sebire, and R.S. Berkowitz, *Gestational trophoblastic disease*. *Lancet*, 2010. **376**(9742): p. 717-29.
55. Ferretti, C., et al., *Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts*. *Hum Reprod Update*, 2007. **13**(2): p. 121-41.
56. Soundararajan, R. and A.J. Rao, *Trophoblast 'pseudo-tumorigenesis': significance and contributory factors*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004. **2**: p. 15.
57. Kokkinos, M.I., et al., *Cadherins in the human placenta--epithelial-mesenchymal transition (EMT) and placental development*. *Placenta*, 2010. **31**(9): p. 747-55.
58. Vicovac, L. and J.D. Aplin, *Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation*. *Acta Anat (Basel)*, 1996. **156**(3): p. 202-16.
59. Huppertz, B., *Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis*. *Hypertension*, 2008. **51**(4): p. 970-5.
60. Kaufmann, P., S. Black, and B. Huppertz, *Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia*. *Biol Reprod*, 2003. **69**(1): p. 1-7.
61. Maulik, D., et al., *Evidence-based approach to umbilical artery Doppler fetal surveillance in high-risk pregnancies: an update*. *Clin Obstet Gynecol*, 2010. **53**(4): p. 869-78.
62. Ruebner, M., et al., *Regulation of the human endogenous retroviral Syncytin-1 and cell-cell fusion by the nuclear hormone receptors PPARgamma/RXRalpha in placentogenesis*. *J Cell Biochem*, 2012. **113**(7): p. 2383-96.
63. Kolben, M., et al., *Proteases and their inhibitors are indicative in gestational disease*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1996. **68**(1-2): p. 59-65.
64. Ruebner, M., et al., *Reduced syncytin-1 expression levels in placental syndromes correlates with epigenetic hypermethylation of the ERVW-1 promoter region*. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e56145.
65. Srinivas Murki, D.S., *Intrauterine Growth Retardation - A Review Article*. *J Neonatal Biol*, 2014.
66. Kehl, S., et al., *Intrauterine Growth Restriction. Guideline of the German Society of Gynecology and Obstetrics (S2k-Level, AWMF Registry No. 015/080, October 2016)*. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 2017. **77**(11): p. 1157-1173.
67. Cox, S.e.a., *ACOG Practice Bulletin No. 12: Interuterine Growth Restriction*. *ACOG Pract Bull.* , 2000.
68. Wollmann, H.A., *Intrauterine growth restriction: definition and etiology*. *Horm Res*, 1998. **49 Suppl 2**: p. 1-6.
69. Lin, C.C., S.J. Su, and L.P. River, *Comparison of associated high-risk factors and perinatal outcome between symmetric and asymmetric fetal intrauterine growth retardation*. *Am J Obstet Gynecol*, 1991. **164**(6 Pt 1): p. 1535-41; discussion 1541-2.
70. Pallotto, E.K. and H.W. Kilbride, *Perinatal outcome and later implications of intrauterine growth restriction*. *Clin Obstet Gynecol*, 2006. **49**(2): p. 257-69.
71. Visentin, S., et al., *Early origins of adult disease: low birth weight and vascular remodeling*. *Atherosclerosis*, 2014. **237**(2): p. 391-9.
72. Barker, D.J., *The developmental origins of well-being*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2004. **359**(1449): p. 1359-66.

73. Pridjian, G. and J.B. Puschett, *Preeclampsia. Part 1: clinical and pathophysiologic considerations*. *Obstet Gynecol Surv*, 2002. **57**(9): p. 598-618.
74. Rinehart, B.K., et al., *Preeclampsia-associated hepatic hemorrhage and rupture: mode of management related to maternal and perinatal outcome*. *Obstet Gynecol Surv*, 1999. **54**(3): p. 196-202.
75. Wadhwa, P.D., et al., *Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms*. *Semin Reprod Med*, 2009. **27**(5): p. 358-68.
76. Serman, A. and L. Serman, *Development of placenta in a rodent--model for human placentation*. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2011. **3**: p. 233-9.
77. Schmidt, M., et al., *Influence of Low Protein Diet-Induced Fetal Growth Restriction on the Neuroplacental Corticosterone Axis in the Rat*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019. **10**: p. 124.
78. Menendez-Castro, C., et al., *Early and late postnatal myocardial and vascular changes in a protein restriction rat model of intrauterine growth restriction*. *PLoS One*, 2011. **6**(5): p. e20369.
79. Mocker, A., et al., *Expression of Retinoid Acid Receptor-Responsive Genes in Rodent Models of Placental Pathology*. *Int J Mol Sci*, 2019. **21**(1).
80. Kusinski, L.C., et al., *eNOS knockout mouse as a model of fetal growth restriction with an impaired uterine artery function and placental transport phenotype*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2012. **303**(1): p. R86-93.
81. Hefler, L.A., et al., *Perinatal development of endothelial nitric oxide synthase-deficient mice*. *Biol Reprod*, 2001. **64**(2): p. 666-73.
82. van der Heijden, O.W., et al., *Uterine artery remodeling and reproductive performance are impaired in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice*. *Biol Reprod*, 2005. **72**(5): p. 1161-8.
83. Kulandavelu, S., et al., *Endothelial nitric oxide synthase deficiency reduces uterine blood flow, spiral artery elongation, and placental oxygenation in pregnant mice*. *Hypertension*, 2012. **60**(1): p. 231-8.
84. Pallares, P. and A. Gonzalez-Bulnes, *Intrauterine growth retardation in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice is established from early stages of pregnancy*. *Biol Reprod*, 2008. **78**(6): p. 1002-6.
85. Podjarny, E., G. Losonczy, and C. Baylis, *Animal models of preeclampsia*. *Semin Nephrol*, 2004. **24**(6): p. 596-606.
86. Kalisch-Smith, J.I., et al., *Review: Sexual dimorphism in the formation, function and adaptation of the placenta*. *Placenta*, 2017. **54**: p. 10-16.
87. Marek, I., et al., *Sex differences in the development of vascular and renal lesions in mice with a simultaneous deficiency of Apoe and the integrin chain Itga8*. *Biol Sex Differ*, 2017. **8**: p. 19.
88. ThermoFisher Scientific. *Reverse Transcription Reaction Setup—Seven Important Considerations*. 2019; Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/rt-education/reverse-transcription-setup.html>.
89. de Martynoff, G., E. Pays, and G. Vassart, *Synthesis of a full length DNA complementary to thyroglobulin 33 S messenger RNA*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1980. **93**(3): p. 645-53.

90. Higuchi, R., et al., *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions*. Biotechnology (N Y), 1993. **11**(9): p. 1026-30.
91. ThermoFisher Scientific. *Fast sybr® green master mix protocol*. 2010; Available from: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms\\_046776.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_046776.pdf).
92. Technologies, S.A., *Quantitect® sybr® green rt-pcr handbook*. 2011, July: p. 14.
93. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
94. Karl F. Hilgers, L.J., Nada Cordasic, Johannes Jacobi, Kerstin Amann, Roland Veelken, Andrea Hartner, *Impaired angiogenesis distinguishes malignant from non-malignant course of experimental renovascular hypertension*. 2011.
95. Hsu, S.M., L. Raine, and H. Fanger, *Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures*. J Histochem Cytochem, 1981. **29**(4): p. 577-80.
96. KG, C.R.G.C., *Gebrauchsanweisung diaminobenzidin*. 2017.
97. Avwioro, G., *Histochemical Uses of Haematoxylin - A Review* International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences, 2011: p. 24-34.
98. Kim, O., et al., *Gastrokine 1 inhibits gastrin-induced cell proliferation*. Gastric Cancer, 2016. **19**(2): p. 381-391.
99. Liu, W., et al., *Trefoil factor 1 and gastrokine 2 inhibit Helicobacter pylori-induced proliferation and inflammation in gastric cardia and distal carcinogenesis*. Oncol Lett, 2020. **20**(6): p. 318.
100. BM, C., *Human Embryology and Developmental Biology 3rd ed*. 2004, Saint Louis: Mosby
101. Fernandez-Twinn, D.S., et al., *The maternal endocrine environment in the low-protein model of intra-uterine growth restriction*. Br J Nutr, 2003. **90**(4): p. 815-22.
102. Chu, A., et al., *Gestational food restriction decreases placental interleukin-10 expression and markers of autophagy and endoplasmic reticulum stress in murine intrauterine growth restriction*. Nutr Res, 2016. **36**(10): p. 1055-1067.
103. Barber, E.M., M. Fazzari, and J.W. Pollard, *Th1 cytokines are essential for placental immunity to Listeria monocytogenes*. Infect Immun, 2005. **73**(10): p. 6322-31.
104. Bozza, M., et al., *Interleukin-11 modulates Th1/Th2 cytokine production from activated CD4+ T cells*. J Interferon Cytokine Res, 2001. **21**(1): p. 21-30.
105. Gebhardt, R. and M. Matz-Soja, *Liver zonation: Novel aspects of its regulation and its impact on homeostasis*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(26): p. 8491-504.
106. Kaestner, K.H., *In the zone: how a hepatocyte knows where it is*. Gastroenterology, 2009. **137**(2): p. 425-7.
107. Christoffels, V.M., et al., *Glucocorticoid receptor, C/EBP, HNF3, and protein kinase A coordinately activate the glucocorticoid response unit of the carbamoylphosphate synthetase I gene*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(11): p. 6305-15.

108. Kuo, C.F., K.E. Paulson, and J.E. Darnell, Jr., *Positional and developmental regulation of glutamine synthetase expression in mouse liver*. Mol Cell Biol, 1988. **8**(11): p. 4966-71.
109. Si-Tayeb, K., F.P. Lemaigre, and S.A. Duncan, *Organogenesis and development of the liver*. Dev Cell, 2010. **18**(2): p. 175-89.
110. Kruepunga, N., et al., *Anatomy of rodent and human livers: What are the differences?* Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019. **1865**(5): p. 869-878.
111. *Proteinatlas GKN2 Celltype*. 18.04.2021; Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000183607-GKN2/celltype>.
112. Fahy, J.V., *Type 2 inflammation in asthma--present in most, absent in many*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(1): p. 57-65.
113. Saenz, A., et al., *Folding and Intramembraneous BRICHOS Binding of the Prosurfactant Protein C Transmembrane Segment*. J Biol Chem, 2015. **290**(28): p. 17628-41.
114. Oskarsson, M.E., et al., *Heparan Sulfate Proteoglycans Are Important for Islet Amyloid Formation and Islet Amyloid Polypeptide-induced Apoptosis*. J Biol Chem, 2015. **290**(24): p. 15121-32.
115. Roan, N.R., et al., *Semen amyloids participate in spermatozoa selection and clearance*. Elife, 2017. **6**.
116. Tambaro, S., et al., *BRICHOS - an anti-amyloid chaperone: evaluation of blood-brain barrier permeability of Bri2 BRICHOS*. Amyloid, 2017. **24**(sup1): p. 7-8.
117. Willander, H., et al., *BRICHOS domains efficiently delay fibrillation of amyloid beta-peptide*. J Biol Chem, 2012. **287**(37): p. 31608-17.
118. Altieri, F., et al., *Anti-amyloidogenic property of human gastrokine 1*. Biochimie, 2014. **106**: p. 91-100.
119. D'Andrea, M.R., G.M. Cole, and M.D. Ard, *The microglial phagocytic role with specific plaque types in the Alzheimer disease brain*. Neurobiol Aging, 2004. **25**(5): p. 675-83.
120. *Proteinatlas GKN2 Brain*. 18.04.2021; Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000183607-GKN2/brain>.
121. Teipel, S.J., et al., *Progression of corpus callosum atrophy in Alzheimer disease*. Arch Neurol, 2002. **59**(2): p. 243-8.
122. Ebert, M.P., et al., *Induction of TFF1 gene expression in pancreas overexpressing transforming growth factor alpha*. Gut, 1999. **45**(1): p. 105-11.
123. Long, F. and D.M. Ornitz, *Development of the endochondral skeleton*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(1): p. a008334.
124. Stevens, D.A. and G.R. Williams, *Hormone regulation of chondrocyte differentiation and endochondral bone formation*. Mol Cell Endocrinol, 1999. **151**(1-2): p. 195-204.
125. Ornitz, D.M. and L. Legeai-Mallet, *Achondroplasia: Development, pathogenesis, and therapy*. Dev Dyn, 2017. **246**(4): p. 291-309.
126. Richette, P., T. Bardin, and C. Stheneur, *Achondroplasia: from genotype to phenotype*. Joint Bone Spine, 2008. **75**(2): p. 125-30.
127. Hellemans, J., et al., *Homozygous mutations in IHH cause acrocapitofemoral dysplasia, an autosomal recessive disorder with cone-shaped epiphyses in hands and hips*. Am J Hum Genet, 2003. **72**(4): p. 1040-6.

128. Jobert, A.S., et al., *Absence of functional receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Blomstrand chondrodysplasia*. J Clin Invest, 1998. **102**(1): p. 34-40.
129. Schipani, E., et al., *Targeted expression of constitutively active receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide delays endochondral bone formation and rescues mice that lack parathyroid hormone-related peptide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(25): p. 13689-94.
130. Rimoin, D.L., et al., *Endochondral ossification in achondroplastic dwarfism*. N Engl J Med, 1970. **283**(14): p. 728-35.
131. Patra, D. and L.J. Sandell, *Antiangiogenic and anticancer molecules in cartilage*. Expert Rev Mol Med, 2012. **14**: p. e10.
132. Fang, W., et al., *Expression of chondromodulin-1 in the temporomandibular joint condylar cartilage and disc*. J Oral Pathol Med, 2010. **39**(4): p. 356-60.
133. Zhang, P., et al., *Chondromodulin-1 functions as a tumor suppressor in gastric adenocarcinoma*. Int J Oncol, 2015. **47**(3): p. 941-50.
134. Boeuf, S., et al., *Enhanced ITM2A expression inhibits chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells*. Differentiation, 2009. **78**(2-3): p. 108-15.
135. Garcia, M.I., et al., *LGR5 deficiency deregulates Wnt signaling and leads to precocious Paneth cell differentiation in the fetal intestine*. Dev Biol, 2009. **331**(1): p. 58-67.
136. Van den Plas, D. and J. Merregaert, *In vitro studies on Itm2a reveal its involvement in early stages of the chondrogenic differentiation pathway*. Biol Cell, 2004. **96**(6): p. 463-70.
137. Hisatomi, Y., et al., *Flow cytometric isolation of endodermal progenitors from mouse salivary gland differentiate into hepatic and pancreatic lineages*. Hepatology, 2004. **39**(3): p. 667-75.
138. Chen, P., et al., *Role of AMP-18 in oral mucositis*. Oral Oncol, 2011. **47**(9): p. 831-9.
139. Wu, X., et al., *A novel Peptide to treat oral mucositis blocks endothelial and epithelial cell apoptosis*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2012. **83**(3): p. e409-15.
140. *Proteinatlas GKN2 Blood*. 18.04.2021; Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000183607-GKN2/blood>.
141. Gabilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(3): p. 162-74.
142. *Proteinatlas GKN2 Cell*. 18.04.2021; Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000183607-GKN2/cell>.
143. Pollard, T.D., *Actin and Actin-Binding Proteins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016. **8**(8).
144. Darby, I.A., et al., *The myofibroblast, a key cell in normal and pathological tissue repair*. Cell Mol Life Sci, 2016. **73**(6): p. 1145-57.
145. Qin, Z., et al., *Actin cytoskeleton assembly regulates collagen production via TGF-beta type II receptor in human skin fibroblasts*. J Cell Mol Med, 2018. **22**(9): p. 4085-4096.
146. Wank, S.A., *G protein-coupled receptors in gastrointestinal physiology. I. CCK receptors: an exemplary family*. Am J Physiol, 1998. **274**(4 Pt 1): p. G607-13.

147. Murayama, T., et al., *Antiproliferative effect of a novel cholecystokinin-B/gastrin receptor antagonist, YM022*. Jpn J Cancer Res, 1996. **87**(7): p. 743-50.
148. Chen, P., et al., *AMP-18 facilitates assembly and stabilization of tight junctions to protect the colonic mucosal barrier*. Inflamm Bowel Dis, 2012. **18**(9): p. 1749-59.
149. Roy, J., et al., *Assessment of cholecystokinin 2 receptor (CCK2R) in neoplastic tissue*. Oncotarget, 2016. **7**(12): p. 14605-15.
150. Neitzke, U., et al., *Intrauterine growth restriction in a rodent model and developmental programming of the metabolic syndrome: a critical appraisal of the experimental evidence*. Placenta, 2008. **29**(3): p. 246-54.
151. Eurofinsgenomics. 2020; Available from: <https://www.eurofinsgenomics.eu/de/dna-rna-oligonucleotides/custom-dna-rna-oligos/>.

## 9.2 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Ab	Amyloid-beta
Abb.	Abbildung
ABC-Kit	Avidin/Biotin Complex Kits
AK	Antikörper
AMP-18	antrum mucosa protein 18
AmpliTag	DNA Polymerase, hergestellt aus <i>Thermus aquaticus</i>
Aq. dest.	Aqua destillata
AS	Aminosäuren
BRICD1B	BRICHOS domain containing 1B
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CA	Kalifornien
CCKBR	Cholezystokinin B Rezeptor
cDNA	copy-DNA
Ct	cycle threshold
Cys	Cystein
d	Tag
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dt.	Deutsch
E15/E18.5	Gestationsalter in Tagen
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
engl.	Englisch
et al.	et alii
EtOH	Ethanol
EVT	extravillöser Trophoblast

FCS	fetales Kälberserum
FP	forward primer
g	Gramm
GDDR	down-regulated in gastric cancer
GKN1/2/3	Gastrokin 1/2/3 (Protein)
<i>Gkn1/2/3</i>	Gastrokin 1/2/3 (Gen)
GKNs	Gastrokine (Pl.)
GmbH & Co. KG	Gesellschaft mit beschränkter Haftung & Compagnie Kommanditgesellschaft
h	Stunde
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HaCaT	Humane Keratinozyten Zelllinie (human adult low-calcium, high-temperature keratinocytes; aneuploide immortale humane Hautkeratinozyten)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> O II	Typ II Reinwasser ( <i>Aqua valde purificata</i> )
HE	Hämatoxylin-Eosin
HELLP	<b>Haemolysis, Elevated Liver Enzymes, Low Platelets</b>
HRP	Meerrettichperoxidase
i.e.	id est
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin gamma
IHC	immunhistochemisch/Immunhistochemie
IUGR	intrauterine growth restriction
LP	low protein
MA	Massachusetts
MDSC	myeloid-derived suppressor cells
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure

μl	Mikroliter
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFκB	nuklearer Faktor „kappa-Leichtketten-Verstärker“ von aktivierten B-Zellen
ng	Nanogramm
NIH	National Institutes of Health
NP	normal protein
PCR	polymerase chain reaction
PE	Präeklampsie
PFA	Paraformaldehyd
pH	Potentia hydro genii, dekadischer Logarithmus der Konzentration der Wasserstoffionen
Pl.	Plural
PSTT	placental site trophoblastic tumor
qRT-PCR	quantitative real time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RP	reverse primer
RT	Reverse Transkriptase bzw. Raumtemperatur
S.	Seite
SCT	Synzytiotrophoblast
SEM	standard error of the mean
SGA	small for gestational age
SMA	smooth muscle actin
SRY	sex determining region of Y
SYBR Green I	2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino]-1-phenyl-1H-chinolin-4-ylidenmethyl}-3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur (temperature of melting)
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus Aquaticus
TBS	Tris-buffered saline
TFF1/2/3	trefoil factor family 1/2/3

TFIZ 1/2	trefoil factor interactions(z) 1/2
Th1/Th2	Typ1-/Typ2-T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TRS	Target Retrieval Solution
UACL	ulcer-associated cell lineages
USA	United States of America
VT	villöser Trophoblast
WA	Washington
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## 9.3 Färbeprotokoll der Peroxidasefärbung

### 1. Tag

- -Deparaffinieren
    - Xylol **3x5min**
    - 100% EtOH **3x3min**
    - 95% EtOH **2x2min**
  - kurz waschen in TBS
  - Kochen in TRS **ca. 2x 10min**
    - ca. 10min abkühlen lassen bis nicht mehr trüb
  - **3x 3min TBS**
  - Endogene Peroxidase 3%
    - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% → 10x verdünnen (10ml auf 90ml Aq.dest.) **20min RT**
  - **3x 3min TBS**
  - 100% FCS **30min 37°C**
  - Primärantikörper **über Nacht 4°C**
    - optimale Verdünnung in BSA/TBS (1:50)
- 

### 2. Tag

- **3x 3min TBS**
- Sekundärantikörper **30min-1h RT**
  - optimale Verdünnung in BSA/TBS (1:500)
  - ↳ hier: Anti-Maus für GKN1, Anti-Rabbit für GKN2
  - in der Zeit ABC-Kit-vorbereiten (muss 30min stehen)
- **3x 3min TBS**
- ABC-Kit/Avidin **30min-1h RT**
  - optimale Verdünnung: je 4µl A und B auf 250µl TBS
- **3x 3min TBS**
- DAB-Kit **10min RT**
  - Handschuhe anziehen, DAB-Abfall verwenden
  - 1 Tropfen Buffersolution
  - 2 Tropfen DAB-Solution } im Set
  - 1 Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
  - 2,5ml Aq. dest.
- waschen in Aqua dest. **5min**
- Hämatoxylin **10-20s**
- fließendes Leitungswasser **10min**
- Dehydrieren
  - 95% EtOH **kurz**
  - 100% EtOH **3x3min**
  - Xylol **3x5min**
- Eindecken mit Entellan

## 9.4 Materialien

### *RNA-Isolation*

- RNeasy Kit, Qiagen, Hilden

### *RNA-Umschreibung*

- Multiscribe™ Reverse Transkriptase, rekombinant aus Retrovirus „Molony Murine Leukaemia Virus“ (rMoMuLV)
- Thermocycler: Trio Thermoblock, Biometra

### *rtPCR*

- Fast SYBR® Green Master Mix, Part No. 4385621, Lot No. 00606792
- Primer, Eurofins genomics, Designsoftware: Primer3 [151]
  - Forward Primer GKN1 Ratte (Sequenz CCACCATGCTGTCGACATG)
  - Reverse Primer GKN1 Ratte (Sequenz CCATTGATGTTGATAGTGAAGCAA)
  - Forward Primer GKN2 Ratte (Sequenz CGCAGGCTAAGGAGGTTTTTAA)
  - Reverse Primer GKN2 Ratte (Sequenz CGATGGTCACTGTCTCCTGGAT)
  - Forward Primer GKN1 Maus (Sequenz CCATGAAGCTACAATGTTCGT)
  - Reverse Primer GKN1 Maus (Sequenz TGTTGACCGTGTAAGCAAACC)
  - Forward Primer GKN2 Maus (Sequenz CGCAGGCAGAGGAGATTTTTAA)
  - Reverse Primer GKN2 Maus (Sequenz CGATGGTCACTGTCTCCTGGAT)
  - Forward Primer 18S (Sequenz TTGATTAAGTCCCTGCCCTTTGT)
  - Reverse Primer 18S (Sequenz CGATCCGAGGGCCTCACTA)
- Thermocycler: Step One Plus, Real Time PCR System, Applied Biosystems

## *Peroxidase- und Immunfluoreszenzfärbung*

- Primärantikörper
  - Anti-Gastrokine 1 antibody ab57623, Mouse monoclonal to GKN1, abcam
  - Anti-Gastrokine 2 antibody [EPR15377(B)] – C-terminal ab188866, Rabbit monoclonal to GKN1, abcam
  - Gastrokine 2 antibody orb18384, Rabbit polyclonal, biorbyt
  - Gastrokine 1 antibody orb183814, Rabbit polyclonal, biorbyt
  - Gastrokine 2 antibody orb183844, Ziel: 31-90 Aminosäuren von GKN2, polyclonal, biorbyt
  - Abcam, Klon EPR15377(B), ab188866, Ziel: 100 Aminosäuren C-terminal, monoclonal
  - DAKO Anti-Human Smooth Muscle Actin, Mouse monoclonal, Code No. M 0851, Typ IgG2a, kappa
  - Abnova GKN1 H00056287-M01, Monoclonal Maus anti-human, IHC not approved, clone 2E5, full length recombinant protein.
  - Abcam ab57623, Monoclonal Maus anti-human, IHC not approved, full length protein aa 21-186.
- Sekundärantikörper
  - Linaris biotinylated anti-Rabbit IgG (H+L), catalog number BA-1000
  - biotinylated anti-Mouse IgG
  - Cy<sup>TM</sup>3-conjugated AffiniPure F(ab')<sub>2</sub>, Fragment Sheep Anti-Mouse IgG (H+L), Code Number 515-166-003
  - Cy<sup>TM</sup>3-conjugated AffiniPure F(ab')<sub>2</sub>, Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), Code Number 711-166-152
  - Cy<sup>TM</sup>3-conjugated AffiniPure F(ab')<sub>2</sub>, Anti-Mouse IgG (H+L)
- TBS (10 l): Fisher Bioreagents, Tris 60,55g, NaCl 85,20g, HCl 25% 48,1ml - pH auf 7,6 einstellen, mit aqua dest. auf 10l auffüllen
- BSA/TBS: AppliChem GmbH, Darmstadt
- Avidin-D-Peroxidase, Life Technologies, Thermo-Fischer Scientific Inc.

- DAB: DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit, SK-4100, Vector Laboratories Inc., Burlingham, CA, USA
- Hämatoxylin: Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill III, (Nr. 1.05174.0500), Merck KgaA, Darmstadt
- Objektträger: Menzel Gläser Superfrost Plus, ThermoScientific, Braunschweig
- Fettstift: Liquid Blocker Super Pap Pen, Liquid Repellant Slide Marker, Science Services, München
- Target Retrieval Solution, DAKO
- FCS (fetal calf serum), Sigma-Aldrich
- DAPI, Life Technologies, Thermo-Fischer Scientific Inc.
- Lichtmikroskop: Leica DMR Microscope, Seriennummer 211185
- Fluoreszenzmikroskop: Nikon Eclipse Microscope, Nikon GmbH Düsseldorf, Kamerakopf DS-Qi2, Japan

## 10. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. med. Fabian Fahlbusch bedanken, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und dank dessen engmaschiger Betreuung die Fertigstellung dieser Arbeit erst möglich wurde.

Außerdem gilt mein Dank Frau Prof. Dr. rer. nat. Andrea Hartner, auf deren Unterstützung ich ebenfalls jederzeit zählen konnte und die mich mit vielen notwendigen Informationen speiste.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. h.c. Dr. med. W. Rascher als Emeritus, sowie Herrn Prof. Dr. med. J. Wölfle für die Möglichkeit der Durchführung meiner wissenschaftlichen Arbeit und das zur Verfügung Stellen aller Gerätschaften und Räumlichkeiten.

Insbesondere ist mein Dank auch Mirka Kupraszewicz-Hutzler und Rainer Wachtveitl geschuldet, die viel wertvolle Zeit und Geduld investiert haben, um mir die Grundlagen der PCR sowie der immunhistochemischen Färbetechniken nahezubringen, sodass ich diese letztendlich selbstständig durchführen konnte.

Der größte Dank geht an meine Familie, die mich während der Arbeit an meiner Promotion sowie während des gesamten Studiums begleitet und unterstützt hat. Ohne die Liebe und den Rückhalt meiner Eltern und meiner Schwester hätte ich nie die Kraft und das Durchhaltevermögen aufgebracht, um dort anzukommen, wo ich heute stehe.

## 11. Lebenslauf

### Julia Marie Röper

Großstr. 4 • 90480 Nürnberg

---

#### ■ Persönliche Daten

Name: Julia Marie Röper  
Geburtsdatum/-ort: 30.01.1996, Gehrden  
Nationalität: deutsch  
Vater: Dr. med. Christoph Röper, Facharzt für Orthopädie  
Mutter: Dr. med. Melanie Röper, Praktische Ärztin  
Geschwister: Jette Sophie Röper, geb. 2001

#### ■ Ausbildung

2001-2005 Grundschole am Langen Feld, 30989 Gehrden  
2005-2013 Matthias-Claudius-Gymnasium, 30989 Gehrden  
Abschluss: Abitur 2013

2013-2020 Studiengang der Humanmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen/Nürnberg,  
Herbst 2015 -Physikum  
WS 17/18 Erasmus Auslandssemester (Universität de Barcelona)  
Frühjahr 2019 -Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung,  
schriftlicher Teil  
Mai 2020 -Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung,  
mündlicher Teil

#### ■ Praktisches Jahr

- 1. Tertial:
  - Allgemeinohirurgie im Bezirkskrankenhaus Schwaz, Tirol
  - Kinderohirurgie in der Kinder- und Jugendklinik des Universitätsklinikums Erlangen
- 2. Tertial: Pädiatrie in der Kinder- und Jugendklinik des Universitätsklinikums Erlangen
- 3. Tertial: Innere Medizin im Klinikum Robert Koch Gehrden

#### ■ Assistenzarztausbildung

- 07/2020-02/2021 Assistenzärztin an der Kinder- und Jugendklinik des Universitätsklinikums Erlangen
- seit 05/2021 Assistenzärztin am Klinikum Nürnberg Süd, Medizin 4