Untersuchungen zur Assoziation zwischen der Expression von JAM-C und dem Hypoplastischen Linksherz-Syndrom

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Ruth Kathrin Böhnel

aus Göttingen

Gießen, 2006

Aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen,
Direktor: Prof. Dr. G. Bein

Gutachter: Prof. Dr. G. Bein
Gutachter: PD Dr. J. Bauer

Tag der Disputation: 05.07.2007

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen iv

1 Einleitung 1

1.1 Junctional Adhesion Molecules (JAMs) - ein kurzer Überblick 1

1.2 Tight junctions 2

1.2.1 Zonula adhaerens und gap junction 3

1.3 JAM 3

1.3.1 JAM-A 4

1.3.2 JAM-B 5

1.3.3 JAM-4 6

1.3.4 JAM-L 7

1.3.5 JAM-C 8

1.3.5.1 Genetik und Aufbau von JAM-C 10

1.4 Krankheitsassoziationen mit JAM-C 12

1.4.1 Chromosom 11: Eine Assoziation zwischen Kardiogenese und JAMC 12

1.4.1.1 Trankriptionsfaktoren von Bedeutung für die Kardiogenese 13

1.4.2 Mögliche Assoziation zwischen JAM-C und dem Hypoplastischen Linksherz-Syndrom 15

1.4.3 Immunogene Krankheitsassoziationen 18

1.5 Zielsetzung der Arbeit 18

2 Material und Methoden 20

2.1 Probensammlung und Probenaufbereitung 20

2.1.1 Blutproben zur Thrombozytenisolierung 20

2.1.2 Isolierung von Thrombozyten 20

2.1.3 Antikörper 21

2.1.4 DNA-Isolierung 21

2.2 Serologische Untersuchungen 21
2.2.1 Thrombozytenmarkierung und Durchflusszytometrie 21
2.3 Molekularbiologische Untersuchungen 22
2.3.1 Polymerase-Ketten-Reaktion 22
2.3.2 Agarosegel-Elektrophorese 23
2.3.3 Extraktion von PCR-Produkten aus Gelen 24
2.3.4 Klonierung 25
2.3.4.1 Ligation in den pGEM®-T-Easy Vektor (PROMEGA, USA) 25
2.3.4.2 Transformation in JM 109 High Efficiency kompetente Zellen (PROMEGA, USA) 26
2.3.4.3 Ligation in pmLuc-3 AccepTor Vektor™ (Novagen, MERCK, Darmstadt) 27
2.3.4.4 Transformation des pmLuc-3 AccepTor Plasmids in NovaBlue Singles™ (Novagen, MERCK, Darmstadt) kompetente Zellen 28
2.3.5 Plasmidisolierung aus Bakterien 29
2.3.6 Sequenzierung 29
2.3.6.1 Sequenzierreaktion 29
2.3.7 Natriumacetatfällung 29
2.4 Expression in ECV-304 Zellen 30
2.4.1 Zellkultur 30
2.4.2 Transfektion der ECV-304 Zellen 30
2.4.2.1 Transfektionskontrolle mit β-Galactosidase 31
2.4.3 Chemilumineszenz-Test 31
2.4.4 Mighty Light Rlc Assay 32
2.4.5 Stimulation der ECV 304 Zellen mit 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) und Wasserstoffperoxid 33
2.5 Statistische Auswertung 33

3 Ergebnisse 34
3.1 Eingrenzung der Region des JAM-C-Promotors 34
3.1.1 Genetische Untersuchungen 34
3.1.2 Eingrenzung der Bindungsstellen 34
3.1.3 PCR-Produkte JAM-C Promotor 36
3.1.4 Sequenzierungen der JAM-C Promotor Abschnitte 39
3.2 Promotorintensität der einzelnen JAM-C Fragmente 42
3.2.1 Promotorintensität nach Stimulation mit 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) und Wasserstoffperoxid 43
3.3 Expressionsstudie: JAM-C Expression auf Thrombozyten bei HLH-Patienten 44
4 Diskussion 50
4.1 Genetische Variabilität der JAM-C Expression und HLH 50
4.2 Vorstudien zur Promotorregion des JAM-C-Gens 54
5 Zusammenfassung 59
6 Summary 61
7 Literaturverzeichnis 62
8 Danksagung 79
9 Erklärung 80
10 Curriculum vitae 81

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1 JAM-C Aufbau

Abb. 2 Schematische Darstellung des HLH
LV = linker Ventrikel; LA = linker Vorhof; RV = rechter Ventrikel; RA = rechter Vorhof; AO = Aorta; PA = A. pulmonalis

Abb. 3 HLH-Darstellung
LV = linker Ventrikel; RV = rechter Ventrikel; PT = Truncus pulmonalis;
AAo = ascendierende Aorta

Abb. 4 Messung der Expression von JAM-C auf Thrombozyten, positive Kontrolle: GPIa/IIa und negative Kontrolle: Maus IgG

Abb. 5 Vektorkarte des pGEM®-T Easy Vektors mit den wichtigsten Sequenzabschnitten
MCS/Multiple Cloning Sites (PROMEGA, USA, mod.)

Abb. 6 Vektorkarte des pMLuc-3 AccepTor Vektors™ mit den wichtigsten Sequenzabschnitten (Novagen, MERCK, Darmstadt, mod.)

Abb. 7 Reaktion des Luciferins zu Oxyluciferins, durch Renilla Luciferase katalysiert

Abb. 8 Basensequenz der Promotorregion von JAM-C mit markierten putativen RNA-Polymerase-Bindungsstellen, sowie dem markierten ATG, als Beginn des ersten Exons von JAM-C.
Markierte Basensequenzen der Transkriptionsfaktoren Nkx 2-5 und GATA-3 (5´-Ende bis zum 3´-Ende)

Abb. 9 Strategie zur Amplifikation der vier PCR-Produkte

Abb. 10 PCR-Produkte
Auftrennung der Produkte in einem 1%igen Agarosegel mit einem 100 bp Standard (Reihe 1) und einem 1 kbp Standard (BIOLABS, USA) (Reihe 6); 606 bp (Reihe 4); 1337 bp (Reihe 3); 1234 bp (Reihe 5); 1398 bp (Reihe 2)

Abb. 11 Ausschnitte der Sequenzierungen des vorderen und hinteren Übergangs zwischen den Fragmenten 1-4 im pMLuc-3 AccepTor Vektor™

Abb. 12 Gemessene Lichtintensität (RLU) des 2. Fragments ohne Stimulation; Stimulation des 2. Fragments mit TPA und H_2O_2, (n = 3)

Abb. 13 FACS-Messung von Kalibrierungsbeads (QIFIKIT®, Dako)-Eichkurve zur Messung der JAM-C-Moleküle auf der Oberfläche der Thrombozyten

Abb. 14 Exemplarische Darstellung der FACS-Messung von markierten JAM-C Molekülen auf Thrombozyten sowie der negativen Kontrolle (mIgG)

Abb. 15 Exemplarische Darstellung der FACS-Messung von markierten GPIa/IIa Molekülen auf Thrombozyten sowie der negativen Kontrolle (mIgG)

Abb. 16 Absolute Expression von JAM-C auf Thrombozyten bei HLH-Patienten (n = 32) und der Kontrollgruppe (n = 32) ist signifikant (p = 0,028) verringert. Absolute Expression von GPIa/IIa auf Thrombozyten bei HLH-Patienten (n = 32) und der Kontrollgruppe (n = 32) ist nicht signifikant verändert (p = 0,659)

Tab. 1 Nomenklatur der JAM-Familie (Stand 2006)

Tab. 2 Primer und PCR-Bedingungen zur Amplifikation der JAM-C-Produkte

Tab. 3 Gemessene durchschnittliche Lichtintensität der einzelnen Fragmente (RLU = Relative Lichteinheiten)

Tab. 4 Absolute JAM-C-Expression auf Thrombozyten bei HLH-Patienten (n = 32) und der Kontrollgruppe (n = 32)
Absolute GPIa/IIa Expression auf Thrombozyten bei HLH-Patienten (n = 32) und der Kontrollgruppe (n = 32)

1 Einleitung

1.1 Junctional Adhesion Molecules (JAMs) – ein kurzer Überblick

Junctional Adhesion Molecules (JAMs) sind Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie (Chretien et al., 1998; Du Pasquier et al., 1999; Williams et al., 1999).
Sie wurden zum ersten Mal 1998 von Martin-Padura et al. als ein bis dahin noch nicht bekanntes Protein beschrieben.

Die Mitglieder der CD2-Untergruppe, zu der auch die JAMs gehören, sind durch zwei extrazelluläre Immunglobulin-Domänen, eine membran-distale vom variablen V-Typ und eine membran-proximale vom konstanten C2-Typ, eine transmembrane Domäne und durch einen kurzen cytoplasmatischen Anteil charakterisiert. Proximaler und distaler Anteil jeder Immunglobulin-Domäne werden über zwei Disulfidbrücken verbunden (Williams und Barclay, 1988; Bazzoni, 2003; Barlay et al., 1997). Es ist bemerkenswert, dass der proximale Anteil des cytoplasmatischen Anteils sowie der C-terminale intrazelluläre Anteil bei JAM-A, JAM-B und JAM-C in fast 80 Prozent übereinstimmen.

Über die extrazelluläre Domäne können die JAMs mit Integrinen (β2-Integrine LFA-1 und Mac-1, β1-Integrine α4β1) interagieren (s.u.) und sind damit an der Regulation der Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen beteiligt.

Am carboxyterminalen intrazellulären Ende befindet sich bei JAM-A, JAM-B und JAM-C eine Klasse-II-PDZ-Domäne (PSD-95, disc large, ZO-1) / Typ II PDZ-Domäne), über die die Moleküle in der Lage sind Interaktionen mit anderen Molekülen einzugehen, die die PDZ-Domäne ebenfalls besitzen und in der tight junction vorkommen (Songyang et al., 1997; Ebnet et al., 2004).

Vertreter der JAM-Familie wurden auf Thrombozyten, Leukozyten, B-Zellen, Natürlichen Killerzellen, Erythrozyten, Endothel- und Epithelzellen nachgewiesen.

1.2 Tight junctions

Neben Blutzellen tragen vor allem Endothelzellen dort JAMs, wo diese eine wichtige Position bei der Regulation der transzellulären Permeabilität besitzen.

Die tight junction (TJ) ermöglicht einen Verschluss zwischen den Zellen. Diese enthält drei Typen von Transmembranproteinen, die die molekulare Basis darstellen (Tsukita et al., 2001). Occludin wurde als erstes beschrieben, Claudin und die JAMs (s.u.) folgten (Furuse et al., 1993; Furuse et al., 1998). Die Verbindung zu intrazellulären Signalkaskaden erfolgt über mehrere Moleküle, unter anderem ZO-1 (Zonula occludens-1) oder Cingulin (Anderson et al., 1988; Citi et al., 1988).

Die folgenden Proteine kommen in der TJ vor und besitzen die PDZ-Domäne: AF-6 (afadin), PAR-3 (partitioning-defective protein-3), MUPP-1 (multi-PDZ-Domäne Protein-1) und das PATJ (Pals1-assoziertes TJ Protein) (Yamamoto et al., 1997; Izumi et al., 1998; Hamazaki et al., 2002; Lemmers et al., 2002; Roh et al., 2002). Sie stellen für den intrazellulären Abschnitt der JAMs die möglichen Interaktionspartner dar (s.u.).

JAMs befinden sich besonders in der TJ. Dabei sind unterschiedliche Gewebe für die drei Proteine JAM-A, JAM-B und JAM-C identifiziert worden. Es wurde gezeigt, dass die JAM-Proteine als Rezeptoren für Zell-Zell-Interaktionen fungieren können. Zu diesen gehören auch die Regulation der interzellulären Aktivität sowie die Leukozyten-Adhäsion und Transmigration von Leukozyten aus dem Blut in das umgebende Gewebe über die Barriere des Endothels hinweg, wie sie bei entzündlichen Prozessen stattfindet (Muller, 2003; Chavakis et al., 2003; Bazzoni, 2003; Ebnet et al., 2004). Es ist sehr wahrscheinlich, dass die JAMs an einem Multiproteinkomplex in der TJ beteiligt sind (Keiper et al., 2005b; Mandell und Parkos, 2005). Ebenso konnten sie auf unterschiedlichen Blutzell-Typen identifiziert werden (Aurrand-Lions et al., 2001).

1.2.1 Zonula adhaerens und gap junctions

Die Zonula adhaerens besteht aus Cadherinen und transmembranen Glycoproteinen, welche für die Calcium-abhängigen homophilen Zell-Zell-Kontakte verantwortlich sind.

Die gap junctions sind hydrophile, transmembrane Kanäle, welche den Austausch von Ionen und kleinen Molekülen zwischen den Zellen ermöglichen um den Informationsfluss zwischen den Zellen zu gewährleisten. Sie besitzen keine Haftfunktion. Die unterschiedlichen Funktionsbereiche sowie die molekularen Strukturen und Organisationen im Schlussleistennetz sind noch nicht vollständig aufgeklärt.

1.3 JAM

Die Nomenklatur ist nicht einheitlich und wurde zuletzt 2005 verändert. Tab. 1 zeigt die entsprechenden aktuellen Bezeichnungen.

Tab. 1 Nomenklatur der JAM-Familie (Stand 2006)

Aktuelle Nomenklatur	Frühere Bezeichnung			Maus-JAM	
				aktuell	früher
JAM-A	JAM-1	F11R		mJAM-A	mJAM-1
JAM-B	JAM-2	Vascular Endo-thelial JAM	hJAM-2	mJAM-B	mJAM-3
JAM-C	JAM-3			mJAM-C	mJAM-3
JAM-4					
JAM-L					

1.3.1 JAM-A

JAM-A (JAM-1 oder F11R) wurde zuerst als Rezeptor für Antikörper zur Thrombozytenaggregation beschrieben (Kornecki et al., 1990; Wang et al., 1995). Es hat ein Molekulargewicht von 32 kDa. JAM-A befindet sich auf Thrombozyten, Lymphozyten, Erythrozyten und ausserdem auf Endothel- und Epithelzellen (Naik et al., 1995; Sobocka et al., 2000).

Homophile und heterophile Interaktionen sind bekannt (Bazzoni et al., 2000a). Für die homophilen Interaktionen ist die distale V-Typ Ig-like Domäne von Bedeutung, die durch einen Antikörper, der in der Nähe zum N-Terminus bindet, gehemmt werden kann. Damit können die Interaktionen nicht zustande kommen (Kornecki et al., 1990; Kornecki et al., 1995; Babinska et al., 2002b). Diese wurden bei Patienten mit Immunthrombozytopenien gefunden. Ein Antikörper ist dabei in der Lage die Thrombozytenaggregation und -sekretion zu induzieren, wobei diese Prozesse in Abhängigkeit von FcγRII und GPIIb/IIIa stattfinden. Demnach ist hier die immunogene Krankheitsassoziation von JAM-A belegt.

Die homophilen Interaktionen zwischen den Endothelzellen sind auch für den Aufbau, die Stabilität und die parazelluläre Permeabilität der tight junction von Bedeutung.

JAM-A-Dimere werden in Cis-Position über ein Dimerisationsmotiv in der V-Typ Ig-like Domäne gebildet, so dass die Cis- der Trans-Formation möglicherweise vorausgeht, welche dann die homophilen Interaktionen ermöglicht (Kostrewa et al., 2001; Prota et al., 2003).

Heterophile Interaktionen sind mit LFA-1 auf Leukozyten (αLβ2; CD11a/CD18), einem Mitglied der β2-Integrin-Familie, und ebenso mit ZO-1, AF-6, PAR-3 (partitioning defective proteins) und MUPP-1 in der TJ von Endothelzellen bekannt (Carlos und Harlan, 1994; Ebnet et al., 2000; Ebnet et al., 2001; Itoh et al., 2001; Bazzoni et al, 2002b; Hamazaki et al., 2002; Ostermann et al., 2002; Ebnet et al., 2003). Über diese Interaktionen werden die Leukozyten-Adhäsion ebenso wie die Transmigration von T-Zellen und Neutrophilen vermittelt und die parazelluläre Permeabilität verändert (Del Maschio et al., 1999; Ozaki et al., 1999, Mandell et al., 2006). Außerdem reguliert JAM-A die Monozyten-

Transmigration über die Barriere des Endothels hinweg (Martin-Padura et al., 1998).

Intrazelluläre Signalkaskaden des JAM-A wurden für aktivierte Thrombozyten beschrieben (Wang et al., 1995). Dabei wird die Thrombozyten-Sekretion und -aggregation über Actin-Filamente, verbunden mit der Aktivierung der Phosphoinositol-3 Kinase, vermittelt. Auf die JAM-A-Dimerisation folgt der Einstrom von freiem Calcium, eine Phosphorilierung und eine Komplexbildung mit GPIIIa (Sobocka et al., 2004; Bazzoni et al., 2005).

Durch die Hemmung von JAM-A wurde eine deutlich verlängerte Erholungsphase zur Wiederherstellung des transepithelialen Widerstands in Epithelzellen beobachtet (Liang et al., 2000; Liu et al., 2000; Keiper et al., 2005b). Damit ist davon auszugehen, dass JAM-A für die vollständige Polarisation des Epithels und der damit verbundenen vollständigen Wiederherstellung als Barriere mitverantwortlich ist.

Therapieansätze, die sich daraus möglicherweise ergeben könnten, hätten eine Angriffsmöglichkeit an JAM-A, um die Anheftungsprozesse der Thrombozyten zu unterbinden, was unter anderem bei entzündlichen Gefäßerkrankungen genutzt werden könnte (Babinska et al., 2002a; Babinska et al., 2002b).

1.3.2 JAM-B

JAM-B hat ein Molekulargewicht von 45 kDa und wird während der Embryogenese stark exprimiert. Es ist hauptsächlich im Endothel der hochendothelialen Venulen (HEV) in Lymphknoten und Lymphsinus, aber auch in anderen lymphatischen Organen, in der Niere und in den Testes lokalisiert (Aurrand-Lions et al., 2000). Es ist besonders eng mit den TJ von Endothelzellen verbunden.

Homophile und heterophile Interaktionen sind bekannt. Homophile Interaktionen mit anderen JAM-B-Proteinen gibt es auf Endothelzellen. Heterophil interagiert JAM-B mit JAM-C ebenfalls auf Endothelzellen.

Über die PDZ-Domäne wurden auch Interaktionen mit ZO-1, AF-6 und PAR-3 beschrieben (Aurrand-Lions et al., 2001; Itoh et al., 2001). Es wurde gezeigt, dass die erste PDZ-Domäne des PAR-3 mit dem Carboxyterminus von JAM-B interagiert, so dass damit die Proteinkinase C (PKC) in den TJs aktiviert wird (Ebnet et al., 2003). ZO-1 und AF-6 stehen in direkter Verbindung zum Actin des Zytoskeletts. Das würde für einen dynamischen Komplex zwischen den JAM-Familienmitgliedern und ZO-1 oder AF-6 sprechen, der noch weitestgehend unaufgeklärt ist (Fanning et al., 1998; Boettner et al., 2000).

Des Weiteren interagiert JAM-B mit dem β1-Integrin VLA-4 (very late antigen-4) (α4β1) auf T-Lymphozyten (Cunningham et al., 2000; Arrate et al., 2001; Cunningham et al., 2002; Liang et al., 2002). Über VLA-4 wird die Bindung von T-Zellen an entzündetem Gewebe über eine Interaktion mit VCAM-1 vermittelt und durch JAM-B verstärkt (Butcher und Picker, 1996). Das spricht für eine Beteiligung des Proteins am Lymphozyten-Homing (Palmeri et al., 2000). Außerdem interagiert JAM-B mit JAM-C auf Leukozyten.

1.3.3 JAM-4

JAM-4 hat ein Molekulargewicht von 93 kDa (Hirabayashi et al., 2003; Tajima et al., 2003). Es ist wiederum in der TJ lokalisiert. Der zytoplasmatische Abschnitt des JAM-4 unterscheidet sich aufgrund der Länge und der Struktur der PDZ-Domäne von JAM-A. Der cytoplasmatische Anteil ist länger und JAM-4 hat eine Typ I PDZ-Domäne (Mori et al., 2004). Deshalb kann angenommen werden, dass JAM-4 eher zu der Unterklasse gehört, der auch der Coxsackie- und Adenovirusrezeptor (CAR) und die endothelial cell-selective adhesion molecules angehören (Mori et al., 2004).

JAM-4 findet sich in den Glomeruli der Niere sowie in Epithelzellen des Dünndarms. Es konnte allerdings nicht auf Endothelzellen nachgewiesen werden. Auf dem Epithel befindet sich ZO-1 in der Nähe von MAGI-1 (membrane associated guanylate kinase protein) (Ide et al., 1999).

Es kommt zu Interaktionen zwischen JAM-B und MAGI-1, nicht aber mit ZO-1. Es spielt ebenso wie JAM-A, JAM-B und JAM-C eine Rolle bei Zell-Zell-Interaktionen.

1.3.4 JAM-L

Bei JAM-L (Junction Adhesion Molecule-Like) handelt es sich um ein Protein, welches aufgrund seines strukturellen Aufbaus zu den JAMs gehören könnte (Moog-Lutz et al., 2003). Der extrazelluläre Anteil enthält wie die JAM-Proteine und unter anderem die Rezeptoren des humanen Coxsackie- und Adenovirus zwei Ig-like Domänen, einen C2- und einen V-Typ.

JAM-L ist auf Chromosom 11q23 ähnlich wie JAM-C (11q25) und das endothelium cell-selective adhesion molecule (11q24) lokalisiert (Santoso et al., 2002; Moog-Lutz et al., 2003).

Die Bildung von JAM-L wird während der Differenzierung von myeloischen Leukämiezellen angeregt und in normalen haematopoetischen Zellen der fetalen Leber, der fetalen Milz und des fetalen Thymus exprimiert. Außerdem ist es auf der Zellmembran und in Regionen mit Zell-Zell-Kontakten lokalisiert. Dagegen wurde keine Expression auf freien Zellgrenzen gefunden, so dass JAM-L ebenso wie JAM-A, JAM-B und JAM-C eine Rolle bei homophilen Interaktionen spielen könnte. JAM-L wird ausserdem auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten exprimiert. Interaktionen zwischen JAM-L auf neutrophilen Granulozyten und CAR in der tight junction konnten gezeigt werden; damit sind sie ebenfalls an der Transmigration über die Barriere des Endothels hinweg beteiligt (Zen et al., 2005). Eine Verstärkung der Anheftung von myeloisch-leukämischen Zellen an Endothelzellen konnte ebenfalls beobachtet werden (Moog-Lutz et al., 2003).

1.3.5 JAM-C

JAM-C, das vorletzte identifizierte Mitglied der JAM-Familie, ist auf Chromosom 11q25 lokalisiert (Palmeri et al., 2000; Santoso et al., 2002). Es wird hauptsächlich im Gewebe von Herz, Placenta, Gehirn und Nieren exprimiert (Cunningham et al., 2002). JAM-C befindet sich auf Endothel- und Epithelzellen, ebenso auf Thrombozyten, T-Zellen und natürlichen Killerzellen (Aurrand-Lions et al., 2000; Aurrand-Lions et al., 2001; Liang et al., 2002; Santoso et al., 2002). Im Gegensatz dazu scheint es keine Expression von JAM-C auf T-Zellen und Natürlichen Killerzellen der Maus zu geben (Johnson-Leger et al., 2002). Eine signifikante Expression von JAM-C wurde mit 1594±303 Kopien auf der Zelloberfläche von Thombozyten bei Erwachsenen gemessen (Santoso et al., 2002). JAM-C wird nur auf megakaryozytischen- (z.B.: MEG-01) nicht aber auf U937- und K562-Zelllinien exprimiert.

JAM-C ist in der Lage homophile und heterophile Interaktionen einzugehen (Santoso et al., 2005). Für die homophilen Interaktionen ist die aminoterminale Ig-Domäne verantwortlich. Es kann mit JAM-B auf Endothelzellen (Arrate et al., 2001; Liang et al., 2002) und mit Mac-1 auf Leukozyten (Santoso et al., 2002) interagieren.

Es wurde gezeigt, dass JAM-C die Leukozyten-Bindung als direkter Gegenrezeptor für das β2-Intergrin Mac-1 (αMβ2; CD11b/CD18) vermittelt (Santoso et al., 2002; Zen et al., 2004). Das Glycoprotein Ibα (GPIbα) stellt ausserdem einen Gegenrezeptor für Mac-1 dar, der die Anheftung von Leukozyten und Thrombozyten unter starken Scherkräften erleichtert (Simon et al., 2000). JAM-C ist dagegen eher unter schwachen Scherkräften der Gegenrezeptor für Mac-1. Dabei kommen JAM-C und Fibrinogen als Bindungspartner für Mac-1 in Frage. Das lässt vermuten, dass die beiden Proteine eine überlappende Bindungsstelle auf Mac-1 haben. Diese liegt möglicherweise in der ersten Liganden-bindenden Domäne.

JAM-C ist nicht an der Anheftung der neutrophilen Granulozyten an das Endothel beteiligt, es vermittelt aber deren Transmigration in Abhängigkeit von Mac-1 über die Barriere des Endothels hinweg (Springer, 1995; Chavakis et al., 2004).

Es nimmt dabei an den späteren Schritten im Verlauf der Granulozyten-Endothel-Anheftungsphase teil (Aurrand-Lions et al., 2005).

Durch einen monoklonalen Antikörper gegen JAM-C, Gi11, konnte die Mac-1-abhängige Anheftung von neutrophilen Granulozyten an Thrombozyten aufgehoben werden. Die Aktivität des GPIbα wurde geringfügig ebenfalls durch einen monoklonalen Antikörper gehemmt (Santoso et al., 2002). Die Kombination der beiden Antikörper konnte dagegen die Zell-Zell-Interaktion komplett aufheben. Damit stellt JAM-C zusammen mit GPIbα, beide Gegenrezeptoren von Mac-1, den Anheftungsrezeptor für die Interaktion zwischen Leukozyten und Thrombozyten dar (Simon et al., 2000; Santoso et al., 2002). Ebenso interagiert JAM-C mit p150.95 (αXβ2, CD11c/CD18), dem dritten β2-Integrin. Im Gegensatz dazu konnte keine spezifische Bindung zu LFA-1 (αLβ2, CD11a/CD18) identifiziert werden (Santoso et al., 2002). Die Expression von JAM-C wird durch oxidiertes LDL hochreguliert. Allerdings ist durch die Überexpression von JAM-C dieses nicht mehr auf die inter-endothelialen Verbindungen in der TJ beschränkt. Durch die Überexpression läuft neben der Transmigration auch die Anheftung von Leukozyten JAM-C vermittelt ab (Keiper et al., 2005a).

Alle heterophilen Gegenrezeptoren von JAM-C und auch von JAM-A (LFA-1, Mac-1 und α4β1) haben wieder Gegenrezeptoren direkt auf den Epithelzellen, z.B. ICAM-1 und ICAM-2 (intercellular adhesion molecule-1/ -2) und VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), so dass JAM-C möglicherweise eine unterstützende Rolle bei diesen Interaktionen zukommen kann (Ebnet et al., 2004).

Als weiterer Bindungspartner über die PDZ-Domäne wurde PAR-3 beschrieben (Ebnet et al., 2003). Auf Fibroblasten kann JAM-C in Koexpression mit ZO-1 nachgewiesen werden (Morris et al., 2006).

Humanes JAM-3 (hJAM-C) hat 86% Übereinstimmung mit Maus-JAM-2 (mJAM-C) und Maus-JAM-3 (mJAM-B) hat eine 79% Übereinstimmung mit humanem JAM-3 (hJAM-C), allerdings ergab die Nomenklaturänderung (Tab. 1) Veränderungen in Zuordnung und Bezeichnung (Muller et al., 2003).

Durch die vermittelnde Rolle des JAM-C zwischen Endothel und neutrophilen Granulozyten könnte sich dadurch eine neue therapeutische Möglichkeit bei

entzündlichen Gefäßerkrankungen ergeben. Außerdem konnte gezeigt werden, dass JAM-C einen wesentlichen Teil zur Pathophysiologie der akuten Pancreatitis beiträgt und somit auch hier wiederum einen neuen therapeutischen Ansatz liefern könnte (Vonlaufen et al., 2006).

Von Takai und Nakanishi (2003) wurde belegt, dass Mitglieder der Ig-Superfamilie über Punctuae adherentiae an Zell-Zell-Kontakten der Spermatiden und Sertoli-Zellen beteiligt sind. Gliki et al. (2004) konnten weiterhin zeigen, dass die Differenzierung von runden Spermatiden zu Spermatozoen in Mäusen entscheidend von dem Vorhandensein von JAM-C abhängig ist.

Ein Knock-out-Modell für JAM-C zeigte eine gestörte Spermatidendifferenzierung und Infertilität (Gliki et al., 2004). Neben JAM-C wird CAR auf männlichen Keimzellen exprimiert (Mirza et al., 2006). Es kommt zur Komplexbildung; falls diese gestört ist, wird die Spermatidendifferenzierung unterbrochen. Untersuchungen zu serologischen und/oder immunologischen Defekten sind nicht veröffentlicht.

1.3.5.1 Genetik und Aufbau von JAM-C

JAM-C gehört wie die anderen Mitglieder der JAM-Familie zu den Typ-1-Transmembranproteinen mit einem extrazellulären, einem transmembranen sowie einem cytoplasmatischen Abschnitt und mit dem Carboxy-Terminus (Abb. 1).

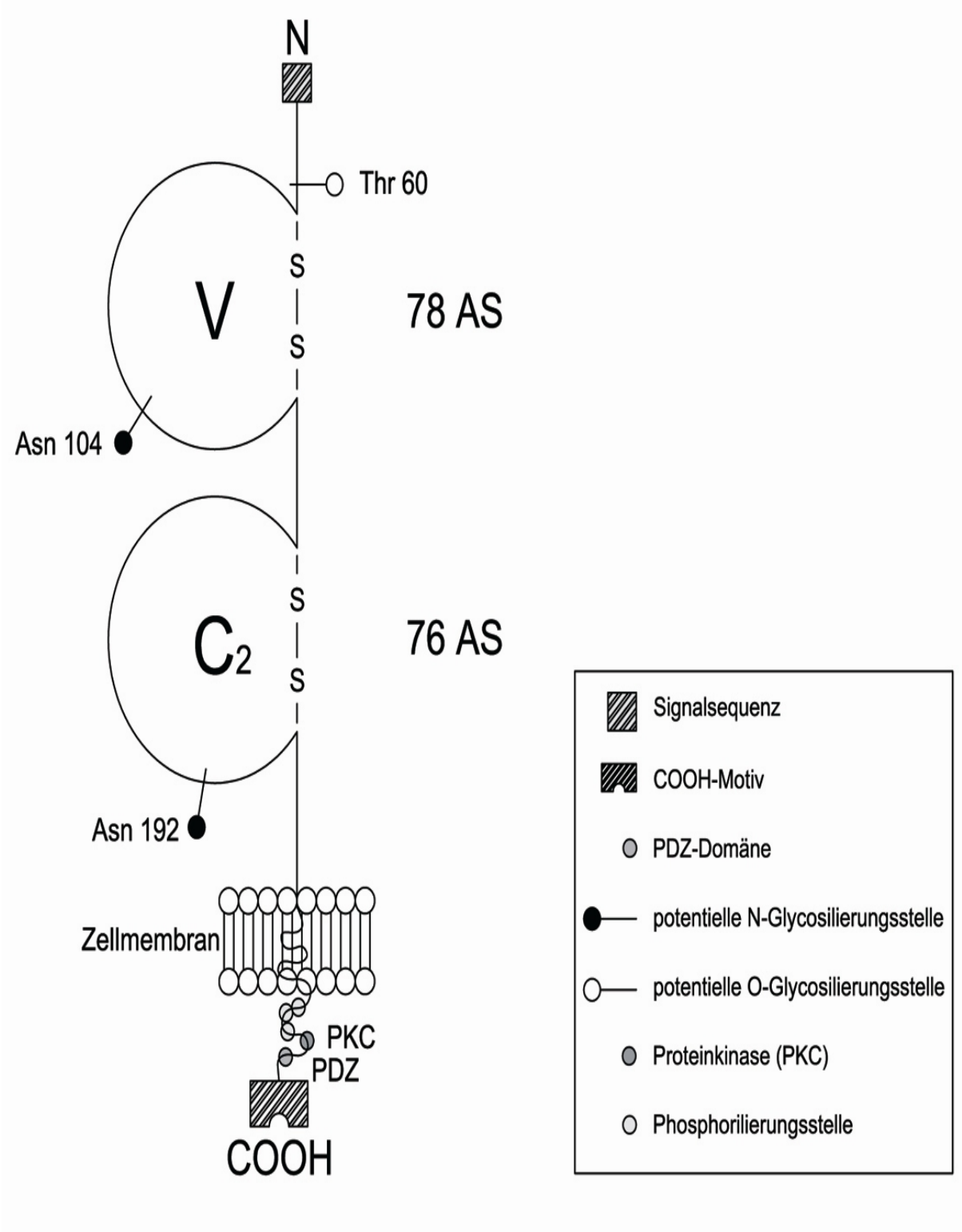


Abb. 1 Aufbau von JAM-C

Die 1740 Basen der mRNA kodieren für die 310 Aminosäuren des Proteins mit einem Molekulargewicht von 43 kDa.

Von den Aminosäuren entfallen die Positionen 1-31 auf die Signalsequenz, 32-244 auf den extrazellulären, 245-267 auf den transmembranären und 268-310 auf den cytoplasmatischen Anteil. Der extrazelluläre Abschnitt besteht (wie auch bei JAM-A und JAM-B) aus zwei Immunglobulin-Domänen. Zwei Regionen, AS 44-122 und AS 151-226, zeigen Übereinstimmungen zu den Mitgliedern der Ig-Superfamilie. Diese entsprechen den Typ-C2-Immunglobulin-Domänen. Der extrazelluläre Abschnitt enthält zwei potentielle N-Glycosilierungsstellen (Asn 104, Asn 192) und eine O-Glycosilierungsstelle (Thr 60). Der cytoplasmatische Abschnitt enthält drei potentielle Phosphorylierungsstellen (Tyr 270, 282, 293) und eine mögliche Phosphorylierungsstelle für die Caseinkinase II (Thr 296) oder für die Proteinkinase C (Ser 281). Von Ebnet et al. (2003) wurde gezeigt, dass JAM-C in transfizierten CHO-Zellen an der Aminosäure Serin phosphoryliert werden kann. Am Carboxyende befindet sich das Bindungsmotiv FLI COOH, das Interaktionen mit PDZ-Domänen vermitteln kann (Santoso et al., 2002; Ebnet et al., 2004).

1.4 Krankheitsassoziationen mit JAM-C

1.4.1 Chromosom 11: Eine Assoziation zwischen Kardiogenese und JAM-C

JAM-C wird auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 kodiert. Philipps et al. (2002) beschreiben zum ersten Mal einen Zusammenhang zwischen der embryonalen Herzentwicklung und JAM-C aufgrund der engen gemeinsamen Lokalisation auf Chromosom 11q und der Tatsache, dass JAMs für die Zell-Zell-Interaktionen mitverantwortlich sind.

Für die normale Kardiogenese sind Zell-Zell-Interaktionen von enormer Bedeutung. Falls diese durch Mutationen oder Deletionen eingeschränkt oder nicht möglich sind, können daraus schwere Herzfehler resultieren.

Bei der Kardiogenese beginnen die Zellteilungen in der 3. Entwicklungswoche an der Grenze von extra- und intraembryonalem Mesoderm. Die auftretenden Bläschen bilden dann eine zusammenhängende Lichtung, aus der der primäre Herzschlauch entsteht. In der weiteren Entwicklung kommt es zur Ausbildung der Herzschleife, aus der sich dann das vierkammerige Herz bildet.

Die Entwicklung von embryonalen Stammzellen zu kardialen Zellen wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren (TGF-β, IGF FGF und Erythropoetin) reguliert. Nach deren Bindung an jeweils spezifische Rezeptoren induzieren sie die Expression von einer Reihe herzspezifischer Transkriptionsfaktoren. Dazu gehören z. B. die zinc finger, GATA-Proteine sowie Nkx2-5, der ein Koaktivator von GATA-4 ist (Lyons et al., 1995; Sachinidis et al., 2002*)*.

1.4.1.1 Transkriptionsfaktoren von Bedeutung für die Kardiogenese

Die Transkriptionsfaktoren Nkx2-5 und GATA-4 sind für die frühen präkardialen Zellen von Bedeutung und damit von essentieller Wichtigkeit für die Herzentwicklung. Allerdings sind sie nicht in der Lage diese einzuleiten (Durocher et al., 1997).

Die Basensequenz des Transkriptionsfaktors Nkx2-5 befindet sich in der putativen Promotorregion von JAM-C, so dass auch darin eine mögliche Funktion des JAM-C zu finden ist.

Der Transkriptionsfaktor Nkx2-5 nutzt ebenso wie GATA-4 den ANF-(atrial natriuretic factor) Promotor. Die Interaktion zwischen Nkx2-5 und GATA-4 erfolgt in vivo und in vitro über den C-terminalen zinc finger. Die C-terminale Domäne des Nkx2-5 ist dafür verantwortlich, dass diese Interaktion zu Stande kommt, die für die Aktivierung von herzspezifischen Promotoren genutzt wird (Durocher et al., 1997; Brown et al., 2004).

Die Mitglieder der GATA-Familie spielen eine Schlüsselrolle in der Regulatorenentwicklung (Fu et al., 1990).

Die GATA-Familie kann bis jetzt in zwei Untergruppen gegliedert werden. GATA-1, GATA-2 und GATA-3 gehören zur ersten Gruppe, die eine wichtige

Rolle im hämatopoetischen System spielt. GATA-1 ist in Proerythroblasten in Koexpression mit GATA-2 zu finden. Die funktionelle Spezifität der GATA-Proteine kommt auch durch die Interaktion mit zellgebundenen Cofaktoren zu Stande. GATA-1 interagiert mit dem erythroid-spezifischem LIM-Protein RBTN2 und dem hematopoetic basic helix-loop protein SCL/TAL 1 (Osada et al., 1995), ebenso mit dem überall vorkommenden SP1 und zwei anderen erythropoetischen Faktoren NFE-2 (Walters und Martin, 1992) und dem zinc-finger eklf (Merika und Orkin, 1995). Weiss et al. (1997) konnten zeigen, dass GATA-1 von entscheidender Bedeutung für die Erythropoese ist. Allerdings konnte ein Teil der entsprechenden Basenabfolge als identisch bei GATA-3 identifiziert werden, das anteilig auch GATA-1 in seiner erythropoetischen Funktion ersetzen konnte. Ein großer Teil der Interaktionen der GATA-Proteine, die von Bedeutung für das hämatopoetische System sind, ist bis jetzt noch nicht vollständig bekannt, so auch die spezielle Funktion vom GATA-3. In der putativen JAM-C-Promotorregion befindet sich mit einer Übereinstimmung von 90% die Basensequenz des GATA-3.

Zu der anderen Untergruppe gehören GATA-4, GATA-5 und GATA-6, deren Expression für die Herz- und auch die Eingeweideentwicklung von Bedeutung ist (Arcei et al., 1993; Kelley et al., 1993; Blumberg et al., 1993; Jiang et al., 1996). Dabei wird GATA-5 bevorzugt in endokardialen und GATA-4/GATA-6 in myokardialen Zellen gefunden (Kelley et al., 1993). Durch Nkx2-5 wird die Expression von GATA-6 weiter verstärkt, was wiederum für die Kardiogenese von Bedeutung ist (Brewer et al., 2005). GATA-4 ist ein starker Koaktivator von mehreren herzspezifischen Promotoren. Wenn die Entwicklung von GATA-4 gehemmt wird, können sich die Kardiomyozyten nicht vollständig differenzieren (Grépin et al., 1995; Grépin et al., 1997).

1.4.2 Mögliche Assoziation zwischen JAM-C und dem Hypoplastischen Linksherz-Syndrom

Angeborene Herzfehler haben eine Inzidenz von 5-8 auf 1000 Lebendgeborene. Die relative Inzidenz des Hypoplastischen Linksherz-Syndroms (HLH) liegt dabei bei 7-9 % (Sitzmann, 2002).

Das HLH ist gekennzeichnet durch eine Stenose oder Atresie der Mitral- und Aortenklappe, eine ausgeprägte Hypoplasie des linken Ventrikels, häufig in Kombination mit Endocardfibroelastose. Des Weiteren besteht eine Hypoplasie der aszendierenden Aorta und des Aortenbogens (Abb. 2 und Abb. 3). Der Karyotyp der Patienten ist, wenn das HLH allein auftritt, normal. Sonst kommt es häufig in Kombination mit dem Turner-Syndrom und dem Jacobsen-Syndrom vor.

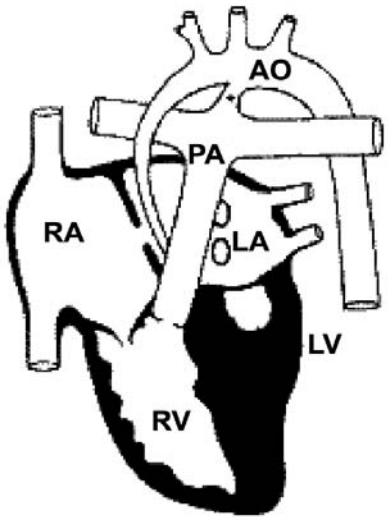


Abb. 2 Schematische Darstellung des HLH
LV = linker Ventrikel; LA = linker Vorhof; RV = rechter Ventrikel; RA = rechter Vorhof; AO = Aorta; PA = A. pulmonalis
(Freundlicherweise überlassen von Jürgen Bauer, Gießen)

Das Jacobsen-Syndrom wurde 1973 zum ersten Mal beschrieben (Jacobsen et al.). Seine Ursache ist eine Deletion auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11. Dabei bestehen häufig eine Thrombozytopenie, angeborene Herzfehler, ophtalmologische, gastrointestinale und urogenitale Abnormalitäten. Außerdem

kann die Intelligenz vermindert sein. Von Grossfeld et al. (2004) wurde des Weiteren ein Zusammenhang zwischen dem Paris-Trousseau-Syndrom und dem Jacobsen-Syndrom beschrieben.

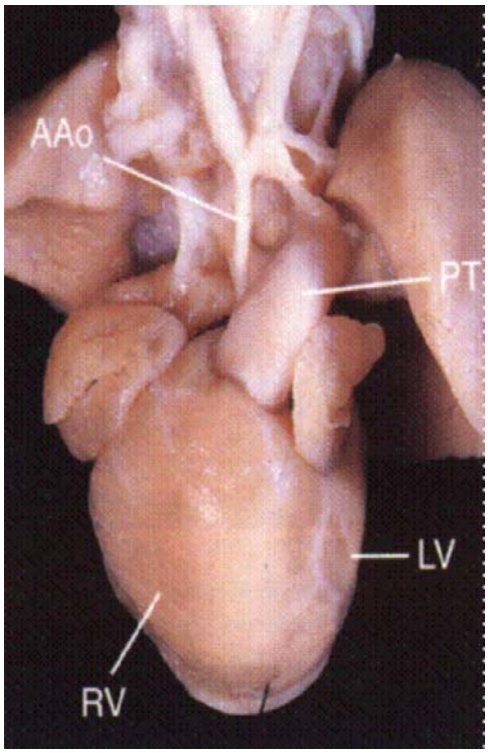


Abb. 3 HLH-Darstellung
LV = linker Ventrikel; RV = rechter Ventrikel; PT = Truncus pulmonalis; AAo = ascendierende Aorta
(Freundlicherweise überlassen von Jürgen Bauer, Gießen)

Das Paris-Trousseau-Syndrom ist ebenfalls durch eine Thrombozytopenie gekennzeichnet. Die Patienten fallen durch eine milde haemorrhagische Tendenz und eine abnorme Thrombozytenmorphologie auf. Die Thrombozyten enthalten im Elektronenmikroskop deutlich sichtbare Granula. Molekulare Analysen konnten zeigen, dass als eine mögliche Ursache eine Deletion auf Chromosom 11 vorliegen kann, und damit das Friend leukemia integration-1 (Fli-1)-Gen, ebenso wie JAM-C nicht vorhanden sind (Favier et al., 1993; Breton-Gorius et

al., 1995; Favier et al., 2003). Fli-1 ist ebenso wie GATA-1 für die normale Expression von megakaryozyten-spezifischen Genen verantwortlich (Lemarchandel et al., 1993; van Geet und Freson, 2003).

Wie weiter oben (1.4.1) erwähnt, besteht eine Assoziation zwischen JAM-C und der Kardiogenese. Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine Assoziation zwischen JAM-C und dem HLH gegeben ist, da beide auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 lokalisiert sind. Als eine mögliche Ursache des HLH kommt wiederum eine terminale Deletion von 20 Mb am Chromosom 11q25 in Betracht. In dieser Region ist JAM-C lokalisiert (Phillips et al., 2002).

Die Migration von Endothelzellen in endokardiales Gewebe stellt einen zentralen Prozess in der Kardiogenese dar, so dass die Zell-Zell-Kontakte für diesen Prozess entscheidend sind. Phillips et al. (2002) konnten zeigen, dass die kardiale Expression von JAM-C in den geweblichen Strukturen während der Embryonalperiode zu finden ist, welche durch geringe chromosomale Veränderungen stark beeinflusst werden können. Deshalb könnte durchaus ein Zusammenhang zwischen dem HLH-Gen und JAM-C bestehen. Des Weiteren wurde die Expression von JAM-C in Lunge, Niere und Darm bestätigt, obwohl darin kein Zusammenhang zum Jacobsen-Syndrom gesehen wurde. Das ist keine Besonderheit, da die Genlokalisation bei vielen Krankheiten nicht ausschlaggebend für deren Phänotyp ist. HLH-Patienten wurden im Bezug auf Punktmutationen und Deletionen untersucht. Diese Untersuchung brachte jedoch kein aufschlussreiches Ergebnis. Das könnte gegen JAM-C in Bezug auf das HLH sprechen. Doch die Breite der möglichen Ursachen ist zu groß um eine eindeutige Stellungnahme abzugeben.

Die chromosomale Nähe von HLH und JAM-C ist eindeutig vorhanden, so dass JAM-C als möglicher Kandidat zur Beeinflussung der Kardiogenese nicht ausgeschlossen werden kann.

1.4.3 Immunogene Krankheitsassoziationen

Im Gegensatz zu JAM-A, bei dem unterschiedliche Antiköper in einzelnen Fällen bei Patienten mit Immunthrombozytopenie (s.o.) beschrieben sind, wurden bis jetzt in diesem Zusammenhang noch keine Antikörper gegen JAM-C gefunden. JAM-C stellt nach diesen Untersuchungen kein Targetprotein für Thrombozytenantikörper dar. Fast 1000 untersuchte Patienten mit Immunthrombozytopenie waren negativ für Antikörper, die mit JAM-C hätten reagieren können (Santoso et al., 2002).

Demnach gibt es zum jetzigen Zeitpunkt keine immunogene Kranheitsassoziation für JAM-C.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

JAM-C ist ein neues Mitglied der JAMs, welches 2002 zum ersten Mal beschrieben wurde. Es ist in der Lage Thrombozyten-Leukozyten-Interaktionen zu vermitteln, die unter anderem bei Stress oder entzündlichen Reaktionen von Bedeutung sind.

Als Grundlage dieser Arbeit dient die Veröffentlichung von Phillips et al. (2002). Es wurde darin gemutmaßt, dass ein Zusammenhang zwischen JAM-C und dem Hypoplastischen Linksherz-Syndrom (HLH) bestehen könne.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Deletion von 20 Mb auf Chromosom 11q24 ursächlich für die Ausbildung des HLH sein kann. In dieser Region wurde JAM-C identifizert, das auch während der Kardiogenese exprimiert wird. In diesem Entwicklungszeitraum können gewebliche Strukturen durch geringe chromosomale Veränderungen stark beeinflusst werden. Das HLH ist durch Stenose oder Atresie der Mitral- und Aortenklappe, ausgeprägte Hypoplasie des linken Ventrikels, sowie häufig Endocardfibroelastose und Hypoplasie der aszendierenden Aorta und des Aortenbogens gekennzeichnet.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst die Expression von JAM-C auf der Oberfläche von Thrombozyten in einem Normalkollektiv und bei HLH-Patientien untersucht werden. Falls der oben dargestellt Zusammenhang bestehen würde, müsste die Expression von JAM-C auf Thrombozyten bei HLH-Patienten nicht vorhanden oder stark vermindert sein.

Außerdem sollte die putative Promotorregion des JAM-C-Gens, welche von entscheidender Bedeutung für die Regulation von JAM-C ist, weiter charakterisiert werden. Die Ergebnisse können möglicherweise aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten auf die anderen Mitglieder, insbesondere auf JAM-A und JAM-B, übertragen werden.

Die gewonnenen Ergebnisse könnten eine Grundlage zur medikamentösen Therapie bei entzündlichen, thrombembolischen und tumorösen Prozessen bilden, da JAM-C unter anderem die Leukozyten-Transmigration bei Stress, entzündlichen Prozessen und Infektionen über die Barriere des Endothels hinweg vermittelt.

Die Fragestellungen waren im Speziellen:

- Steht die Entwicklung des hypoplastischen Linksherzens im Zusammenhang mit fehlender oder reduzierter Expression von JAM-C auf der Oberfläche von Thrombozyten?
- Befinden sich Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren in der Sequenz von JAM-C, die für die Kardiogenese von Bedeutung sind?
- Wo befindet sich der JAM-C-Promotor? Lässt sich diese Region durch spezifische Basensequenzen weiter eingrenzen?

Welche Rolle spielt dabei die Aktivität des Promotors und lässt sich diese möglicherweise steigern? Damit könnte gezeigt werden, dass die Aktivität des Promotors und damit die Expression von JAM-C auch durch externe Einflüsse herauf- oder herabreguliert werden könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Probensammlung und Probenaufbereitung

2.1.1 Blutproben zur Thrombozytenisolierung

Kindern mit hypoplastischem Linksherzsyndrom und der Kontrollgruppe wurden in der kardiologischen Ambulanz der Kinderklinik Giessen 1-2 ml venöses Vollblut entnommen und durch den Zusatz von Ethylendiamintetraacetat (EDTA) ungerinnbar gemacht.

2.1.2 Isolierung von Thrombozyten

Die Thrombozyten wurden aus venösem Vollblut durch differenzielle Zentrifugation gewonnen. Dabei wurden 1-2 ml EDTA-Blut mit 2 ml Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (1x) ohne Calcium und Magnesium (PBS; PAA, Cölbe) aufgeschwemmt. Das aufgeschwemmte Blut wurde bei 760 rpm für 25 min bei RT zentrifugiert (Biofuge 13; HAEREUS, Staufen). Das plättchenreiche Plasma (PRP) wurde in Polycarbonatröhrchen überführt. Die korpuskulären Bestandteile des Blutes wurden nochmals mit 1 ml PBS aufgeschwemmt und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das entstandene PRP wurde ebenfalls abgenommen und bei 2200 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, so dass das Thrombozytenpellet wieder in 400 µl PBS resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß (EPPENDORF-NETHELER-HINZ, Hamburg) überführt werden konnte. 400 µl Thrombozytensuspension wurden mit 400 µl 2 % Paraformaldehyd (400 mg PFA (4 % 1:2 mit PBS verdünnt); 10 ml PBS, 300 µl 3M NaOH bei 56 °C im Wasserbad für 2 h gelöst und mit 3M HCl auf pH 7,0-7,4 eingestellt) versetzt und 5 min bei 4 °C im Dunkeln fixiert. Nach erneuter Zugabe von 400 µl PBS wurde die Suspension bei 10 000 rpm 1 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde zwei weitere Male mit PBS gewaschen und in 300 µl PBS aufgenommen.

2.1.3 Antikörper

Die monoklonalen Antikörper Gi9 (GPIa/IIa) und Gi11 (JAM-C) wurden im Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität hergestellt und charakterisiert (Santoso et al., 1993; Santoso et al., 1984). Der Kontroll-Antikörper Mouse IgG (0,5 mg/ml) wurde zugekauft (BECTON DICKINSON, Heidelberg).

2.1.4 DNA-Isolierung aus Vollblut

Die Isolierung erfolgte gemäß den Herstellerangaben mit dem Purgene Blood Kit™ (GENTRA SYSTEMS; Minneapolis, USA). Die DNA wurde mit einem Zielvolumen von 100 µl Aqua dest. aus der Matrix gelöst und bei -20 °C eingefroren.

2.2 Serologische Untersuchungen

2.2.1 Thrombozytenmarkierung und Durchflusszytometrie

Abhängig von der Anzahl der Primärantikörper wurde die Zellsuspension aufgeteilt. 100 µl wurden mit 20 µl der Antikörper (0,02 mg/ml) versetzt und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte mit zweimaliger Wiederholung das Waschen der Thrombozyten mit 0,2 % bovinem Serum (BSA, ORTHO CLINICAL DIAGNOSTICS, Neckargmünd)/ PBS. Auf die gewaschenen und mit Primärantikörper markierten Thrombozyten wurden 100 µl des Sekundärantikörpers (Goat-anti-Mouse, FITC markiert; Qifikit®, DAKO, Dänemark) pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 45 min bei 4 °C wurden die Waschschritte wiederholt und dann die markierten Thrombozyten in ein Röhrchen (5 ml; Polystyrene Round-Bottom Tubes, FALCON, Karlsruhe) überführt.

Die mit den Primär- und Sekundärantikörpern markierten Thrombozyten wurden in jeweils 300 µl 0,2 % BSA/PBS, die Kalibrierungsbeads (Standardpartikel, Qifikit®) in 500 µl 0,2 % PBS/BSA aufgenommen und in 5 ml Röhrchen (FALCON) überführt und mit einem Durchflusszytometer (BECTON DICKINSON) analysiert.

Abb. 4 zeigt eine beispielhafte Darstellung der Messungen.

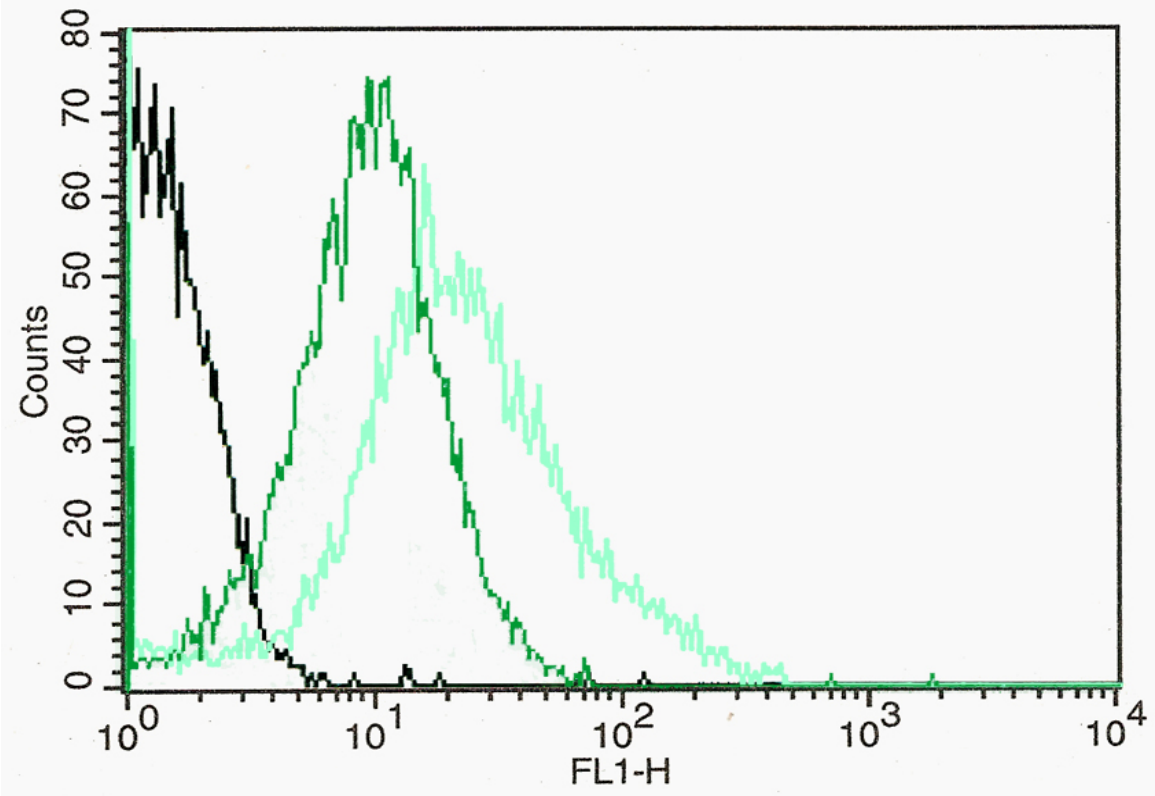


Abb. 4 Beispielhafte Messung der Expression von JAM-C auf Thrombozyten (grün), positive Kontrolle: GPIa/IIa (blau), negative Kontrolle: Maus IgG (schwarz)

2.3 Molekularbiologische Untersuchungen

2.3.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Alle Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) wurden in der Hybaid PCR Express Maschine (THERMO LIFE SCIENCES, Engelsbach) durchgeführt. Der Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl je Einzelansatz wurde in Strip Ease Tubes (PCR Soft Strips 0,2 ml; BIOZYM, Hessisch Oldendorf) pipettiert.

Je Ansatz wurden falls nicht anders beschrieben 8 µl dNTP 10 mM (Mix Standard; PEQ LAB, Erlangen), 3-5 µl Primer 5 pmol/µl, 5 µl DNA, 5 µl 10x PCR-

Puffer (enthält 15 mM $MgCl_2$) (ROCHE) und 1 µl Ampli Taq Gold Polymerase (5 U/µl; ROCHE, Mannheim) pipettiert. Dieser Ansatz wurde dann jeweils auf 50 µl mit Aqua dest. (BAXTER, Unterschleißheim) aufgefüllt.

Das 1. Fragment (606 bp), das die 5. putative RNA-Polymerasebindungsstelle umfasst, wurde mit den Primern +47/+66R und P-559/-540F (siehe Tab. 2) amplifiziert (15 pmol je Primer, 8 mM dNTP, 1,5 mM $MgCl_2$ in der entsprechenden Menge 10x PCR Puffer, 5x Q-Solution in der entsprechenden Menge, 5 U Hot Star Taq Polymerase (QUIAGEN, Hilden), 5 µl DNA (ca. 500 ng).

Das 2. Fragment (1337 bp), das die 4. und die 5. putative RNA-Polymerase-Bindungsstelle umfasst, wurde mit den Primern P+2/-17R und P-1320/-1303F (s.u.) amplifiziert (25 pmol je Primer, 8mM dNTP, 1,5 mM $MgCl_2$ in der entsprechenden Menge 5x GC-RICH PCR Buffer, 5M GC-RICH Solution in der entsprechenden Menge, 1 U GC-RICH Enzyme Mix (ROCHE, Mannheim).

Das 3. Fragment (1398 bp), das die 3. und die 4. putative RNA-Polymerase-Bindungsstelle umschließt, wurde mit den Primern P-540/-559R und P-1957/-1939F (s.u.) und der Taq Polymerase (15 pmol je Primer, sonst wie 2.2.1) amplifiziert.

Das 4. Fragment (1234 bp), das die 1., 2. und 3. putative RNA-Polymerase-Bindungsstelle einschließt, wurde mit den Primern P-1303/-1320R und P-2554/-2537F (s.u.) und der Taq Polymerase (15 pmol je Primer, sonst wie 2.2.1) amplifiziert.

2.3.2 Agarosegel-Elektrophorese

Agarosegel-Elektrophorese dient der Darstellung von PCR-Produkten, zur Aufreinigung von Amplifikaten und zur Analyse der Restriktionsfragment-Längen. Normalerweise wurden einprozentige Agarosegele verwendet. Allerdings wurden dabei, je nach Länge der aufzutrennenden Proben und der absoluten Anzahl der Basenpaare Art und Konzentration der verwendeten Agarose sowie Art des Laufpuffers variiert. Die entsprechende Agarosemenge (Ultra Pure; LIFE TECHNOLOGIES, Karlsruhe) wurde in 25 ml TBE-Puffer (54,0 g Tris, 27,5 g

Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8) mit 1000 ml Aqua dest. aufgefüllt), durch Erhitzen in der Mikrowelle und durch Rühren mit dem Magnetrüttler gelöst, mit 2,5 µl Ethidiumbromid 10 mg/ml (INVITROGEN, Karlsruhe) versetzt und dann in einen Schlitten gegossen. Nach dem Abkühlen des Gels wurden jeweils 8 µl Analysenprobe und 2 µl LB-Puffer (0,4 g Saccharose 40 %, 2,5 mg Bromphenolblau 0,25 %, 100 µl EDTA GIBCO BRL pH 8, 900 µl Aqua dest.) in die entsprechen Geltaschen pipettiert. Bei jedem Ansatz wurde ein Molekulargewichtsmarker mitgeführt. 1 µl Molekulargewichtsmarker wurde in 7 µl Aqua dest. und 2 µl LB-Puffer gelöst. Die Auftrennung erfolgte in der Regel bei jedem Ansatz bei 125 V in TBE-Puffer in der Elektrophoresekammer bis eine ausreichende Trennung erreicht war. Die Proben wurden dann durch UV-Licht sichtbar gemacht und mit dem Digit-Store Videosystem (SONY) photographiert.

2.3.3 Extraktion von PCR-Produkten aus Gelen

Nach der Auftrennung von 150 µl Amplifikat mit der Agarosegel-Elektrophorese wurde das entsprechende Produkt auf dem UV-Schirm sichtbar gemacht und mit dem Skalpell ausgeschnitten. Mit einer modifizierten Silika-Matrix-Absorptionsmethode (QIAquick Gel Extraktions Kit™; QUIAGEN, Hilden) wurde die entsprechende Bande gemäß Herstellerangabe aus dem Agarosegel extrahiert. Die DNA wurde mit 30 µl HPLC-Wasser (MERCK, Darmstadt) eluiert. Die Konzentration der eluierten DNA wurde teilweise am Photometer und teilweise mit Schätzgel bestimmt.

Zur photometrischen Messung wurde Eluat 1:20 in Trispuffer (3 M, pH 7,5) verdünnt und am Photometer (Spekol UV Vis; ZEISS, Berlin) gemessen. Die Bestimmung per Schätzgel entspricht der Agarose-Gelelektrophorese, nur dass 1 µl Analysenprobe in 7 µl Aqua dest. und 2 µl LB-Puffer gelöst wurde.

2.3.4 Klonierung

2.3.4.1 Ligation in den pGEM®-T-Easy Vektor PROMEGA, USA)

1 µl des Vektors pGEM®-T Easy (50 ng/µl) (Abb. 5), 5 µl 2x Rapid Ligation Buffer/ T_4 Ligase und 1 µl T_4 Ligase (3 Weiss units/µl) wurden mit der per Gelextraktion eluierten DNA im Verhältnis 3:1 eingesetzt und jeweils auf 10 µl mit Aqua dest. aufgefüllt. Bei der mitgeführten positiven Kontrolle wurden 2 µl Control Insert DNA (4 ng/µl) verwendet. Der Ansatz wurde in ein Eppendorf Gefäß 1,7 ml (SORENSON™ RNase/DNase Free, USA) pipettiert und bei 4 °C 16 h im Thermoblock (Trio Thermoblock; BIOMETRA, Göttingen) inkubiert. 3 µl des Ligationsansatzes wurden bei der Transformation eingesetzt.

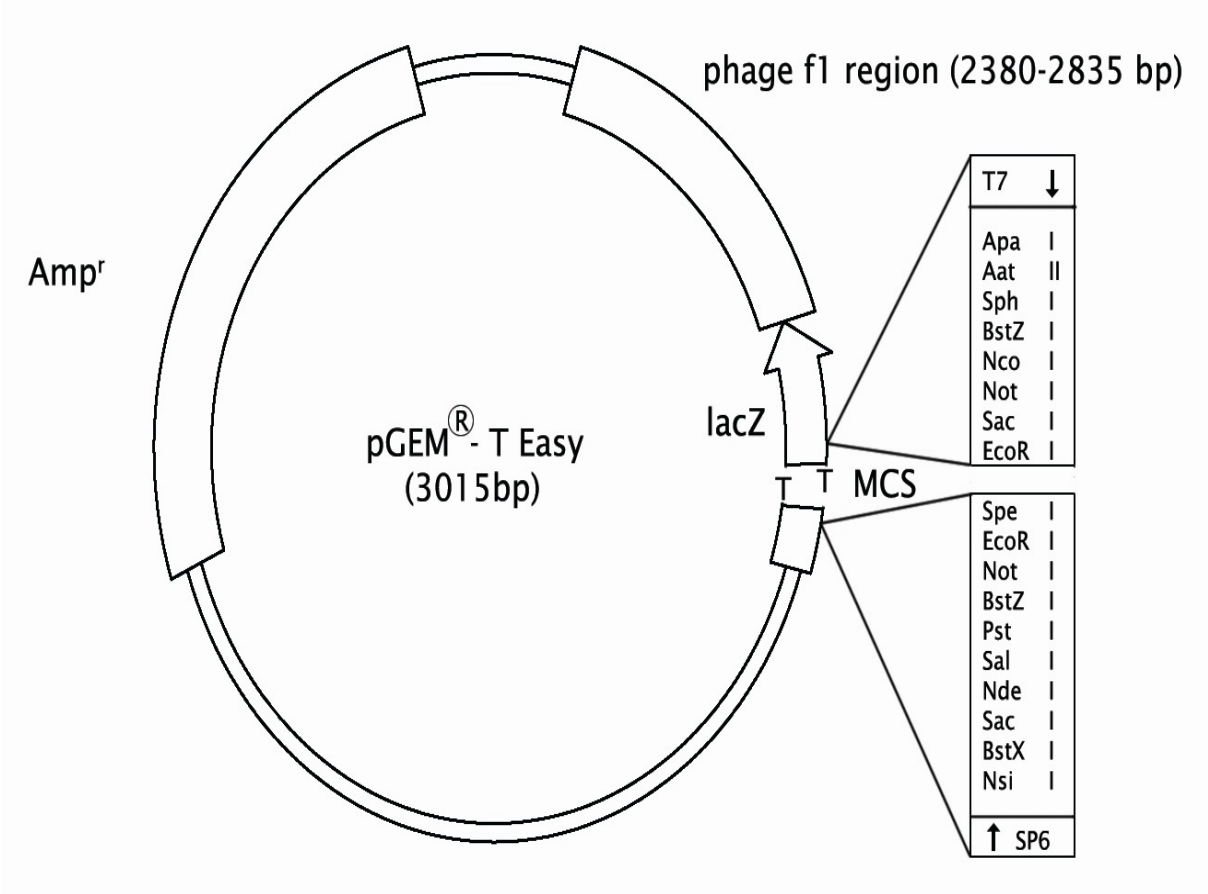


Abb. 5 Vektorkarte des pGEM®-T Easy Vektors mit den wichtigsten Sequenzabschnitten.
MCS/Multiple Cloning Sites
(PROMEGA, USA, mod.)

2.3.4.2 Transformation in JM 109 High Efficiency kompetente Zellen (PROMEGA, USA)

Die für die Transformation benötigten Agarplatten wurden wie folgt hergestellt: 3,75 g Bacto Agar (DIFCO BECTON DICKINSON; Sparks, USA) wurden in 250 ml Luria-Bertani-Medium (LB-Medium; 10 g Tryptone, 5 g Yeast, 10 g NaCl ad 1000 ml Aqua dest., pH 7,5) beim Autoklavieren (121 °C/15 min) gelöst und im Wasserbad auf 45 °C abgekühlt. 50 mg X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-inodyl-β-D-galactoside, ad 1 ml Dimethylformamid; GIBCO BRL, USA) wurden direkt in die Flasche gegeben. 100 µg/ ml Ampicillin (50 ng/ml; SIGMA-ALDRICH, Steinheim) und 59,5 mg IPTG (Isopropylthio-β-D-galactoside, ad 5 ml Aqua dest.; GIBCO, USA) wurden steril in die Flasche filtriert. Je 25 ml des flüssigen Agars wurde auf eine Petrischale (Optilux; FALCON, Karlsruhe) gegeben und bei RT gehärtet. Die Agarplatten wurden mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C aufbewahrt.

3 µl des Ligationsansatzes wurden mit 50 µl kompetenten JM 109 Escherichia-coli-Bakterien (eingefroren bei -70 °C) in ein Bakterienröhrchen (14 ml; Greiner, Nürtingen) auf Eis zusammen pipettiert und 30 min inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42 °C für 45 sec im Wasserbad, wobei danach das Bakterienröhrchen sofort ins Eisbad gestellt wurde. 250 µl SOC-Medium (10 ml: 2 % Tryptone, 0,5 % Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM Glucose; INVITROGEN, Karlsruhe) wurden bei Raumtemperatur in das Bakterienröhrchen pipettiert. Dieses Röhrchen wurde verschlossen 1,5 h bei 37 °C und 225 rpm in den Schüttelinkubator (GFL, Mannheim) gestellt. Vom Bakterien-Medium wurden je 50 µl und 200 µl auf die Agarplatten (RT) pipettiert und gleichmäßig ausgestrichen. Die Agarplatten wurden verschlossen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Nach 16 h wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und bei 8 °C gelagert.

Die hergestellten Agarplatten eignen sich für blue-white screening, so dass die Klone ohne Insert (blau) von denen mit Insert (weiß) unterschieden werden können. Zur Kontrolle, ob die Klone das Insert richtig eingebaut haben, wurde ½ Klon jeweils mit einer sterilen Öse von der Platte gepickt und in ein Reaktionsgefäß mit 50 µl Aqua dest. überführt und bei 99 °C, 5 min im Thermo-Cycler

(EPPENDORF, Hamburg) gekocht und anschließend bei 13 000 rpm 1 min zentrifugiert. 30 µl des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Von diesem Überstand werden 10 µl in die PCR eingesetzt. Vorgehen siehe Polymerase-Ketten-Reaktion, wobei 5 µl der entsprechenden Primer (5 pmol/µl), mit denen das eingebrachte Insert zuvor amplifiziert worden war, und anstelle der DNA 10 µl Überstand eingesetzt wurden. PCR-Bedingungen: Denaturierung bei 95 °C 10 min; 30 Zyklen mit einer Denaturierungstemperatur von 95 °C 1 min, Annealingtemperatur je nach Primer von 55 °C bis 62 °C, für 1 min und Elongationstemperatur von 72 °C 1 min, schließlich bei 72 °C 10 min.

Die PCR-Produkte wurden mit der Gelelektrophorese (s.o.) aufgetrennt und auf dem UV-Schirm sichtbar gemacht.

Stellte sich die erwartete Bande in der Größe des eingesetzten Inserts dar, wurde die zweite Hälfte des Klons von der Platte gepickt und in 3 ml LB-Medium (s.o.) mit 30 µl Ampicillin (50 µl/ml) aufgenommen und in ein Bakterienröhrchen überführt und für 16 h in den Schüttelinkubator (225 rpm) bei 37 °C gestellt.

Von der Bakterienkultur wurden 900 µl abgenommen, mit 100 µl Glycerin reinst (87 %) versetzt und in einem Kryoröhrchen bei -70 °C eingefroren.

2.3.4.3 Ligation in pMLuc-3 AccepTor Vektor™ (Novagen, MERCK, Darmstadt)

Der Gesamtansatz von 10 µl wurde in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß pipettiert und über Nacht bei 4 °C im Thermoblock inkubiert. Für die Ligationsreaktion wurde die mit Gelextraktion aufgereinigte DNA im Verhältnis 1:3 mit dem Vektor (50 ng/µl) (Abb. 6) versetzt und mit 5 µl Clonables Ligation Premix 2fach, sowie der entsprechenden Menge Aqua dest. aufgefüllt. Die gesamten verwendeten Chemikalien stammen, bis auf das verwendete Aqua dest., aus dem pMLuc-3 AccepTor Vektor™ Kit (Novagen, MERCK, Darmstadt).

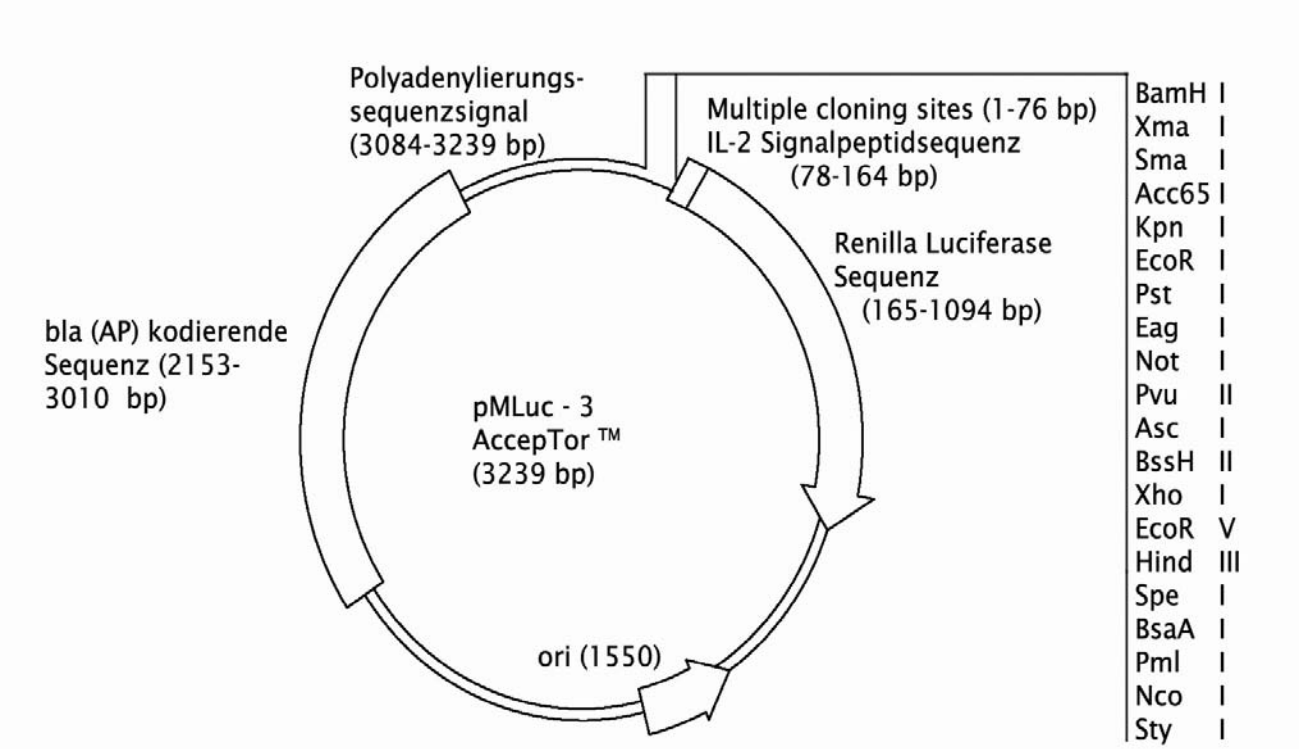


Abb. 6 Die wichtigsten Sequenzabschnitte der Vektorkarte des pMLuc-3 AccepTor Vektors™ (Novagen, MERCK, Darmstadt, mod.)

2.3.4.4 Transformation des pMLuc-3 AccepTor Plasmids in NovaBlue Singles™ (Novagen, MERCK, Darmstadt) kompetente Zellen

Zur Transformation wurden 3 µl des Ligationsansatzes mit 50 µl der kompetenten Bakterien vermischt und in einem Bakterienröhrchen für 30 min auf Eis inkubiert. Der einminütige Hitzeschock der Bakterien erfolgte bei 42 °C im Wasserbad. Nach der Abkühlung (2 min auf Eis) wurde 250 µl SOC Medium hinzugegeben und für eine Stunde bei 37 °C bei 225 rpm in den Schüttelinkubator gestellt. Je 50 und 200 µl der Bakteriensuspension wurden auf Agarplatten (s.o., ohne X-gal und IPTG, mit 50 µg/ml Carbenicillin (GERBU, Gaiberg) ausgestrichen. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden die Klone mit einer sterilen Öse von der Platte genommen und in 3 ml LB-Medium, mit 30 µl Ampicillin (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) versetzt, resuspendiert und bei 37 °C über Nacht bei 225 rpm in den Schüttelinkubator gestellt. Danach erfolgte die Plasmid-Isolierung (s.u.).

2.3.5 Plasmidisolierung aus Bakterien

2 ml Bakterienkultur wurden bei 3 500 rpm für 10 min zentrifugiert und das Pellet in das Plasmid Miniprep™ Kit (QIAGEN, Hilden) eingesetzt. Die Plasmide wurden mit 30 µl Aqua dest. von der Silikamatrix eluiert. Mit dem HiSpeed Midi Prep Kit™ (QIAGEN, Hilden) wurde eine größere Ausbeute aus einem Bakterienkulturvolumen von 30 ml isoliert.

2.3.6 Sequenzierung

2.3.6.1 Sequenzierreaktion

Der verwendete Ansatz hatte ein Gesamtvolumen von 20 µl je Einzelansatz, in den 4 µl Big Dye Terminator 3.1 Cycle Sequenzing Ready Reaction (ABI, USA) und 2 µl des T_7 Primers (für die Sequenzierung des pGEM-T Easy Vektors) oder 2 µl pmLuc Up1/3 / Down (für die Sequenzierung des pMLuc-3 Vektors) eingesetzt wurden. Die Menge des einzusetzenden Plasmids wurde auf 1000 ng berechnet und mit HPLC-Wasser (Li Chrosolv®; MERCK, Darmstadt) aufgefüllt.

Die Sequenzierbedingungen: 96 °C für 10 sec, 50 °C für 5 sec und 60 °C für 4 min für 25 Zyklen. Die PCR-Produkte wurden mit Natriumacetat (s.u.) gefällt. Das Pellet wurde im Dunkeln getrocknet. Nach 30 min wurde es in 20 µl Hi Di Formamid (ABI-Prism, PERKIN-ELMER, Boston, USA) aufgenommen und in 0,5-ml-Sequenziergefäße (ABI-Prism Genetic Analyser; PERKIN-ELMER, Boston, USA) überführt. Die Analyse erfolgte im ABI-Prism 3100 (PERKIN-ELMER, Boston, USA).

2.3.7 Natriumacetatfällung

Insbesondere für die Aufreinigung und Einengung von PCR-Produkten wurde die Natriumacetatfällung verwendet. 3 M Natriumacetat (pH 4,56) wurde zum DNA-Lösungsvolumen gegeben. Das zweieinhalbfache Volumen 100 % Ethanol (RIEDEL-DE HÄEN, Seelze) (-20 °C) wurde zugegeben, anschließend erfolgte

die Präzipitation 20 min bei -20 °C. Danach wurde bei 13 000 rpm 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der dabei entstehende Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde das DNA-Pellet wiederum in 500 µl 70 %igem Ethanol (-20 °C) aufgenommen. Nach der erneuten Zentrifugation wurde das Pellet getrocknet und dann im erwünschten Zielvolumen Wasser aufgenommen.

2.4 Expression in ECV-304 Zellen

2.4.1 Zellkultur

Die ECV-304 Zellen (humane Endothelzelllinie) wurden freundlicherweise von Dr. Stephan Immenschuh (Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, JLU Giessen) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in Endothelial Cell Basal Medium (PROMO CELL®) mit 5 % fetalem Kälberserum (FCS Gold; PAA, Linz, Österreich) und 1 % Gentamycin Lösung (50 mg/ml; PAA, Linz) bei 37 °C mit 5 % CO_2 kultiviert.

2.4.2 Transfektion der ECV-304 Zellen

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und 25 min mit 1 ml Trypsin/EDTA (0,5 g Trypsin, 0,2 g EDTA) (PAA, Linz) bei RT aus der Petrischale abgelöst und in 50-mm²-Zellkulturschalen ausgesät, so dass eine Dichte von ca. 70-80 % am Tag der Transfektion erreicht wurde. 2,5 µl Lipofectamine™ 2000 Reagent (1 mg/ml) (GIBCO BRL LIFE TECHNOLOGIES, Eggenstein) und 1 µg Plasmid-DNA wurden getrennt in 50 µl Opti-MEM (Gibco BRL, Eggenstein) pipettiert. Das Lipofectamin wurde zuvor 5 min mit Opti-MEM zur Ausbildung der Komplexe inkubiert. Die beiden Suspensionen wurden vorsichtig durchmischt und zusammen bei Raumtemperatur 20 min zusammen inkubiert. Die Suspension wurde auf die zweimal mit DPBS gewaschenen ECV-304 Zellen gegeben und bei 37 °C im Brutschrank (5 % CO_2) 5 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde jeweils 1 ml Medium mit 5 % fetalem Kälberserum zugesetzt. 48 h nach der Transfektion wurde das Medium (Überstand) abge-

nommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Jeweils 100 µl wurden in das Mighty Light Rluc™ Assay Kit (Novagen, MERCK, Darmstadt) eingesetzt (s.u.).

2.4.2.1 Transfektionskontrolle mit β-Galactosidase

Die Zellen wurden vorbereitet und ausgesät (s.o.). Die Transfektion erfolgte mit 2,5 µl Lipofectamine™ 2000 und 1 µg pβgal-Basic Vektor (BD Biosciences, CLONTECH, Heidelberg), welche getrennt mit 50 µl Opti-MEM versetzt wurden. Die Suspension wurde vorsichtig durchmischt und zusammen bei Raumtemperatur 20 min inkubiert. Diese Suspension wurde auf die gewaschenen Zellen gegeben und in den Brutschrank gestellt (s.o.). Nach 48 h und nach 72 h wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS (3,9 g NaCl; 8,23 g Na_2HPO_4; 2,3 g NaH_2PO_4 in 1000 ml Aqua dest. gelöst und mit 3 M NaOH auf pH 7,4 eingestellt) gewaschen. In jede Kavität wurden 500 µl PBS pipettiert, die Zellen abgelöst und die Suspension in ein Eppendorf-Gefäß überführt und sofort auf Eis gelagert. Die Zellen wurden bei 13 000 rpm zentrifugiert; der Überstand wurde abgenommen. Um die Zellen zu lysieren wurde das Pellet in 50 µl Lyse-Puffer (100 mM K_2HPO_4, 100 mM KH_2PO_4, 1 000x stock DTT (1mM final), 0,2 % Triton-X-100, SIGMA, Steinheim; pH 7,8) bei Raumtemperatur gelöst und insgesamt dreimal komplett gefroren und anschließend bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und abzentrifugiert (13 000 rpm/5 min/4 °C). Von diesem Überstand wurden 30 µl in den Chemilumineszenz-Test (s.u.) eingesetzt.

2.4.3 Chemilumineszenz-Test

30 µl des Zell-Lysats wurden mit 200 µl Puffer-Mixture (4 µl Reaktionssubstrat und 196 µl Reaktionspuffer; BD, CLONTECH, Heidelberg) versetzt, vorsichtig resuspendiert und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Messen am Luminometer wurden die Zell-Lysate in ein Kryoröhrchen überführt. Um die Transfektionseffizienz zu bestimmen wurden die gemessenen Einheiten (Relative Light Units, RLU) in Verhältnis zu den Ergebnissen der Überstandsmessung gesetzt.

Abb. 7 zeigt die chemische Reaktion des Luciferins zu Oxyluciferin, welche durch die Renilla-Luciferase katalysiert wird. Das entstehende Licht wird im Luminometer gemessen.

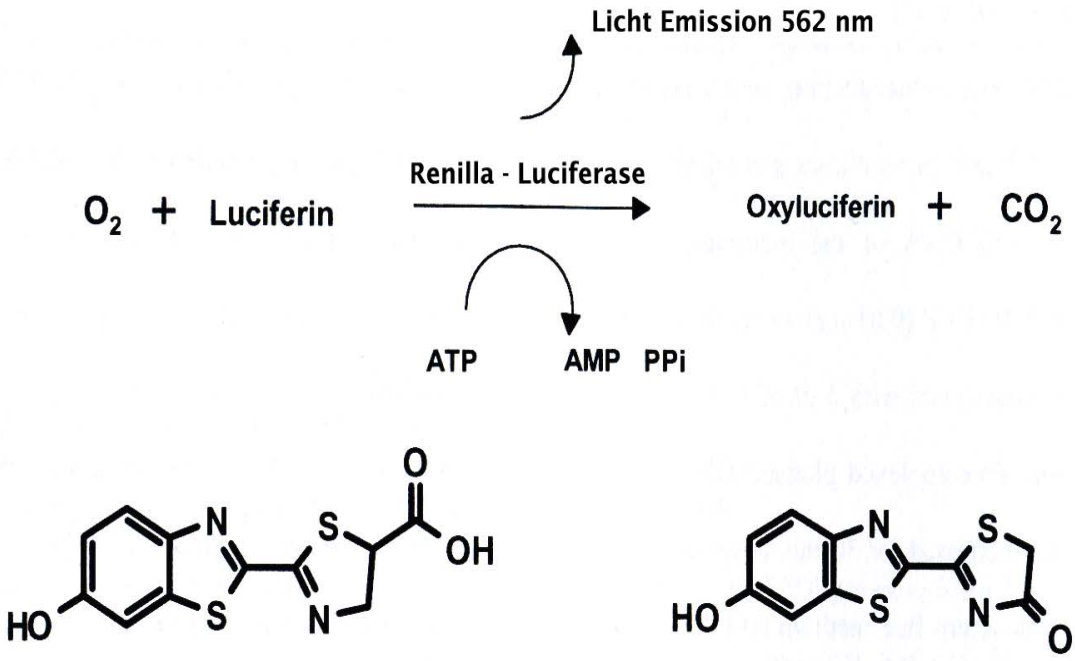


Abb. 7 Reaktion des Luciferins zu Oxyluciferin, katalysiert durch die Renilla-Luciferase

2.4.4 Mighty Light Rluc Assay

100 µl des Überstands bzw. des Zell-Lysates wurden mit 100 µl Substrat-Puffer-Mix (Mighty Light™ Rluc Assay Kit; NOVAGEN, Darmstadt) versetzt und sofort in ein Kryoröhrchen überführt. Die Messung der Lichtemission für jeweils 10 sec erfolgte auch für die Zell-Lysate im Luminometer (Lumat), in das jedes Röhrchen einzeln eingestellt wurde. Vorgehen laut Anleitung des Herstellers im Cutoff-Protokoll.

2.4.5 Stimulation der ECV-304 Zellen mit 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) und Wasserstoffperoxid

Von den transfizierten ECV-304 Zellen (s.o.) wurde nach 24 h das Endothelial Basal Cell Medium (s.o.) abgenommen, durch 1 ml serum-freies DMEM High Glucose Medium ersetzt und 5 h inkubiert (37 °C/5 % CO_2). Die Stimulation erfolgte mit 5 µl H_2O_2 (1 mM) pro Kavität 10 min, 30 min, 60 min und 5 h. Das entsprechende Medium wurde abgenommen und in ein Eppendorf-Gefäß überführt und durch DMEM für weitere 24 h ersetzt. Dieses wurde ebenfalls abgenommen und im Luminometer (s.o.) gemessen. TPA wurde freundlicherweise vom Institut für Klinische Chemie durch Dr. Stephan Immenschuh zur Verfügung gestellt. Die Stimulation erfolgte mit 1 µl TPA (1mM, Endkonzentration 0,5 µM), das nach 24 h in das Endothelial Cell Basal Medium (s.o.) pipettiert wurde. Nach 18 h erfolgte die Messung im Luminometer (s.o.), nach dem der Überstand abgenommen worden war.

2.4.5 Statistische Auswertung

Die Prüfung der Normalverteilung erfolgte mit dem Kolmogorow-Smirnov-Test. Die homogenen Varianzen der zu vergleichenden Gruppen wurden mit dem Levene-Test berechnet. Bei einer Normalverteilung erfolgte die weitere Auswertung mit einem zweiseitigen t-Test für Gruppen mit gleicher Varianz. Lag keine Normalverteilung vor, erfolgte die weitere Auswertung mit dem Whitney U-Test.

3 Ergebnisse

3.1 Eingrenzung der Region des JAM-C Promotors

3.1.1 Genetische Untersuchungen

Zur Eingrenzung des JAM-C Promotors wurden die genomischen DNA-Abschnitte vom JAM-C amplifiziert, sequenziert, mit Datenbankeinträgen verglichen und in pMLuc-3 Vektoren kloniert. Dazu wurden die einzelnen DNA-Abschnitte in die Vektoren ligiert und in E. coli transformiert (siehe 2.3.4). Die abgegebene Lichtintensität der Renilla-Luciferase wurde im Luminometer gemessen. Dazu wurden die pMLuc-3 Plasmide in die ECV-304 Zellen transfektiert und inkubiert. Als Transfektionskontrolle wurden β-Galactosidase-Vektoren ebenfalls in die ECV-304 Zellen transfektiert. 100 ml des Überstandes wurden jeweils nach 48 h in das Mighty Light Rluc™ Assay Kit eingesetzt und daraufhin erfolgte die Messung des von der Probe abgegebenen Lichtes im Luminometer. Die Zellen wurden lysiert und die β-Galactosidase-Aktivität wurde ebenfalls im Luminometer gemessen und ins Verhältnis zur Aktivität der Renilla-Luciferase der einzelnen Proben gesetzt. Damit konnte auch die Transfektionseffizienz überprüft werden.

3.1.2 Eingrenzung der Bindungsstellen

Die putativen RNA-Polymerase-Bindungsstellen wurden aufgrund von bekannten Sequenzmustern anderer Promotoren mit dem Programm von Reed (www.fruitfly.org) eingegrenzt und das entsprechende Score des bestimmten Sequenzabschnitts errechnet. Damit ergaben sich für den putativen JAM-C Promotor-Abschnitt fünf mögliche Bindungsstellen. Diese Bindungsstellen können damit mögliche Transkriptionsstartpunkte darstellen.
Sie wurden anhand von schon publizierten Ergebnissen in der Promotor-Region von JAM-C lokalisiert (Abb. 8).

5´-
caaactcctgaactcaggtgattcgccc**accttggcctcctaaagggcctggattacagg**cctgaaccac
cgcacctggccctatcagtcttaagatctgttttaatgttgatgctggtcagttggcctgaattccaaa**agggtgg**
agggtataataaggcatatccaactccccgatcatggcttaaactagtttttcaggttaactttgcagtgccttt
ggctgagaggaggggtcatttcagattgttgaggggcttagctttttttttttttgagacagagtctcactctgtcacc
caggctgaagtgcagtggcgcaatcttggctcactgcaacttccacctcccgggttcaagtgattctcctgcctc
agcctcccgagtagctgggattacaggcgcctgccaccatgcctggcaaatttttgtatttttagtagagacagg
gtttcaccatgttggtcaggctggtctcaaactcctgacctcatggtcttccctccttggtctgccaaagtgctgaga
ttataggcgtgagccaccacgcctggccagggcttagcattttattgttggtttacattcagttccccgagctctttta
agaagtgcatgtctccctagtaagccacaccttagaaataagcatattcagatgagtaatgctgtgatggaggc
agagcctcctcagccctgctcacggaatgcttccaggactttgctgctggccttattgagctctgattcccttctgc
acagggtcagagctctccagggaacaatgaaaccctaaggaagagcagaccacttcacagccacgtgtgt
cctaccccactctgctgcatccctagttagacttccattccaggaactgtctcagctgttggtaatgacatgccga
ctccatctgcagaggaaaatcaatgtcttacaatgaagcacctgccatccactctcctaggaacctctgcccctt
atagaatattcatgcagccctttttttgtaatctcggtctgagtttcaaaagattccctagcaggaagaccatttaac
agatagaccattttacaacgcaaacactgaaaattccgcaggagaaaagaggcactggtttttgaaaaccgt
gctctgtccacagtcagacaccatctcacatttccaagtaacccaaacagttcc**ttcagttaggtaaatatgcc**
tggccatgtgaccaggagctaaagggaataatagggaaaacagagggcagaaaaaaatgtcagtggg
cataagacgaattttcttctttttaatttctcgattttgtgcttgataaagggaaagaggccaccattataaaacaact
tttacacacttttacttgtgatttagtgcatggtgacctggaacataaagaagatttatgaaaggaaagacagaat
catagtaggtaattgagttatttttaatttttattctgtctttataagattttgagaaggtaatcaattaacataaagat
ctgagcagttataaagatttacaaagaagattatacagtgatggaaactgaagcatattcttggcaacaatctc
aatctatttcacgtttcccgg**cttttacatatataaatttggtatacataatatgtaaatatacttcta**ttttgcatga
aaactaaaaatactaaaaaagtagcatgagtatatgaaaaagttaaacattaaaaatattagttggaaactgg
cttattttactaacaattatattcagaattctgttgctagactgctgtttctgggaacattggaggtgtactttctatactt
gctaaaatacaagcttttcaagtattttccatagta**ttaagtga**gactttaaatactcttgctttttagatctaatttct
gctttaatttatccttctcttcatttttcctgtttgtcctcatcttacctgttcttccctggttttactatctcccagtattcagaa
atcagagcaaataattagtctgcttttctgcagaataaactattgggtatgccatcatgcttttgatctaccacataa
acaaattattttagcaagacatcacttttatatgctgtataatgtatgttattgcttatgttttaagcagatttcagctctttt
ccttccatcaatttggaattgggggccca**aaagatgtga**aggcgataatgcttccaagataactgggctgcat
ccttatttgtaaaataagaaatactttatttcccaaattttaaaggagtgttccttctccgacctgttgtgatggatttatt
ctatagctatggaaatataccctgcttcactcttgtacatacttctttactctcctcccgccaagttcattgaaagag
aacccatgtgccggtccagagcatcgctgcatccgtaagcagctagacctcagcttcctctgtcaccatggtgc
cggctcggctgggcccggcggtcgccatggtaactggggcgggtcgcagggtcctggcaggctgggcgcat
g**cgcgcggggactacaagccgcgccgcgctgccgctggcccctcagcaac**cctcgac***atg***gcgct
gag--------´3

Abb. 8 **Basensequenz der putativen Promotorregion von JAM-C mit markierten möglichen RNA-Polymerase-Bindungsstellen, sowie dem *markierten* ATG, als Beginn des ersten Exons von JAM-C (www.fruitfly.org, nach Reed Sep 2002)**
Markierte Basensequenzen der Transkriptionsfaktoren Nkx2-5 und GATA-3 (5´-Ende bis zum 3´-Ende)

3.1.3 PCR-Produkte JAM-C Promotor

Die PCR-Produkte wurden mit den Primern (s.u.) so hergestellt, dass vier sich überlappende Abschnitte zur Verfügung standen um die putative Promotorregion des JAM-Cs weiter eingegrenzen zu können. Die gesamte Region umfasst ca. 2500 bp und befindet sich vor dem ersten Exon des JAM-C (Abb. 9).

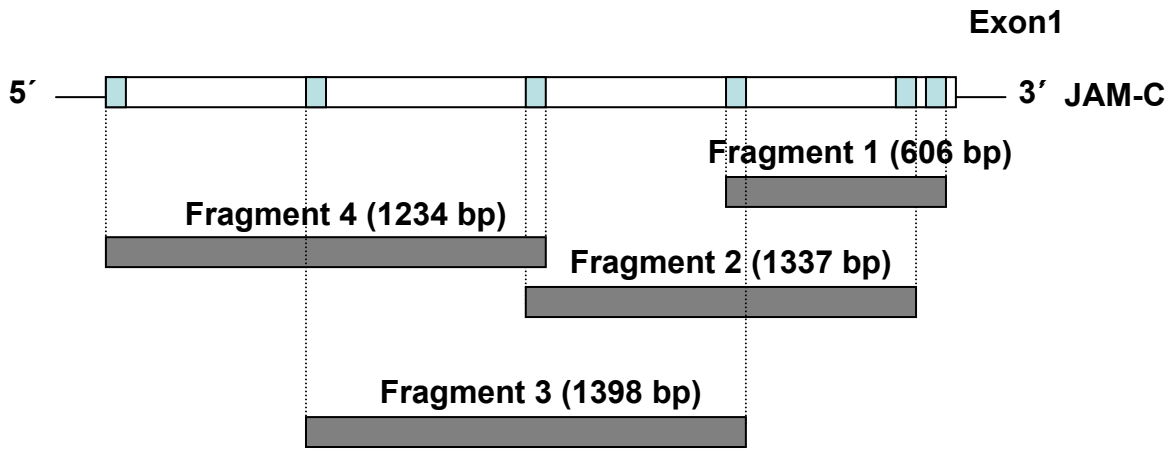
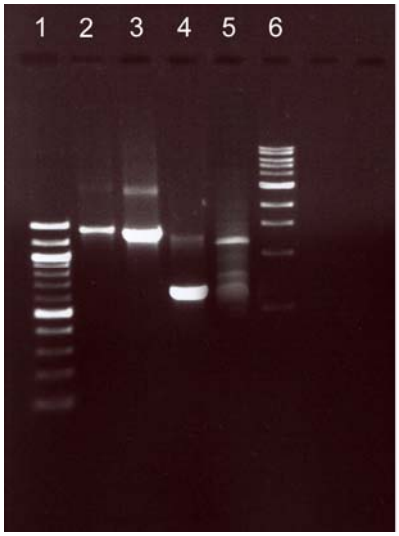


Abb. 9 Strategie zur Amplifikation der vier PCR-Produkte

Die Untersuchungen führten zu folgenden PCR-Bedingungen mit den entsprechenden Primern (Tab. 2). Damit konnte ein entsprechendes Ergebnis der PCR-Produkte, welche auf einem UV-Schirm sichtbar gemacht wurden, erreicht werden (Abb. 10).



1 = 100 bp Standard
2 = 1398 bp Produkt (3.Fragment)
3 = 1337 bp Produkt (2.Fragment)
4 = 606 bp Produkt (1.Fragment)
5 = 1234 bp Produkt (4.Fragment)
6 = 1kb Standard

Abb. 10 PCR-Produkte; Auftrennung der Produkte in einem 1%igen Agarosegel mit einem 100 bp Standard (Reihe 1) und einem 1 kbp Standard (Biolabs, USA) (Reihe 6); 606 bp (Reihe 4); 1337 bp (Reihe 3); 1234 bp (Reihe 5); 1398 bp (Reihe 2)

Tab. 2 Primer und PCR-Bedingungen zur Amplifikation der JAM-C-Produkte

Primer	Primersequenz (5'…3')	Position	PCR-Bedingungen	
			°C	min
	JAM-C 1 Fragment			
			Denat 95	1
P+47/+66R	CAGCAGCAGGAAGAAGTCAG	+47/+66	Anneal. 58	1
P -559/-540F	CTATTGGGTATGCCATCATG	-559/-540	Polym. 72	1
			(30 Zyklen)	
	JAM-C 2 Fragment			
			Denat. 93	1
P+2/-17R	CATGTCGAGGGTTGCTGAGG	+2/-17	Anneal. 57	1
P-1320/-1303F	GTCAGTGGGCATAAGACG	-1320/-1303	Polym. 72	1
			(34 Zyklen)	
	JAM-C 3 Fragment			
			Denat. 95	1
P-540/-559R	CATGATGGCATACCCAATAG	-540/-559	Anneal. 55	1
P-1957/-1939F	CTAGTAAGCCACACCTTAG	-1957/-1939	Polym. 72	1
			(30 Zyklen)	
	JAM-C 4 Fragment			
			Denat. 94	1
P-1303/-1320R	CGTCTTATGCCCACTGAC	-1303/-1320	Anneal. 56	1
P-2554/-2537F	CACCTTGGCCTCCTAAAG	-2554/-2537	Polym. 72	1
			(34 Zyklen)	

Die Positionsangaben beziehen sich auf die Sequenz von JAM-C in der Datenbank. Für das 1. Fragment wurden die Ansätze zunächst bei 95 °C für 15 min denaturiert und nach 30 Zyklen bei 72 °C für 10 min gehalten.

Für das 2. Fragment wurden die Ansätze zunächst bei 96 °C für 10 min denaturiert und nach 34 Zyklen bei 72 °C für 7 min gehalten, bevor sie auf 7 °C abgekühlt wurden.

Für das 3. und das 4. Fragment wurden die Ansätze bei 95 °C für 10 min denaturiert und nach 30 Zyklen bei 72 °C gehalten.

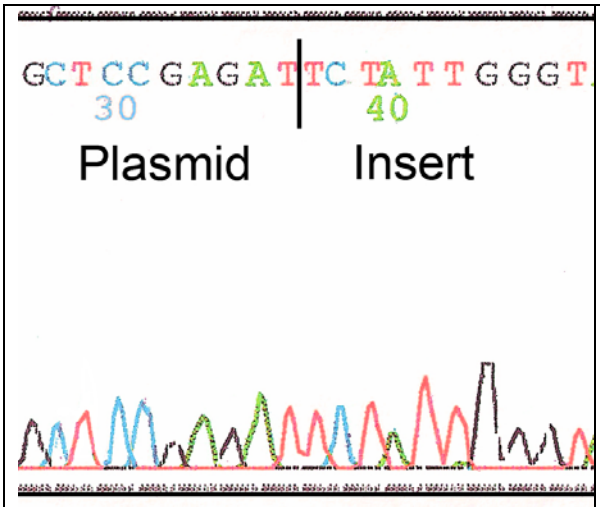
3.1.4 Sequenzierungen der JAM-C-Promotor Abschnitte

Die einzelnen Fragmente wurden durch eine PCR wieder aus dem Plasmid isoliert und in den pMLuc-3 Vektor wie beschrieben insertiert. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem pMLuc-3 Up 1/3 Primer und dem jeweiligen Rückwärtsprimer und dem pMLuc-3 Down Primer und dem jeweiligen Vorwärtsprimer durchgeführt. Damit konnte die Orientierung und die Vollständigkeit der einzelnen Fragmente nochmals überprüft werden. Abb. 11 zeigt ausschnittsweise die vorderen und hinteren Übergänge des Plasmids pMLuc-3 AccepTor Vektor™ und der einzelnen Fragmente 1-4.

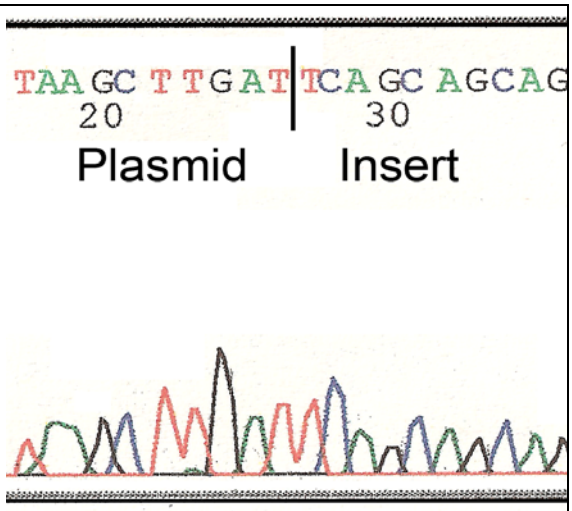
Bei allen vier Fragmenten wurden die zu erwartenden Ergebnisse bestätigt, so dass die Plasmide in EVC-304 Zellen transfiziert werden konnten.

Die Transkriptionsfaktoren Nkx2-5 und GATA-3 sind für die präkardiale Zellen von Bedeutung und damit von essentieller Wichtigkeit für die Herzentwicklung. Allerdings sind sie nicht in der Lage diese einzuleiten (Durocher et al., 1997). GATA-3 ist jedoch von größerer Bedeutung für die Erythropoese. Die Basensequenzen der Transkriptionsfaktoren Nkx2-5 (5´-ttaagtg-3´) und GATA-3 (5´-aaagatctga-3´) befinden sich in der putativen Promotorregion von JAM-C (Abb. 1).

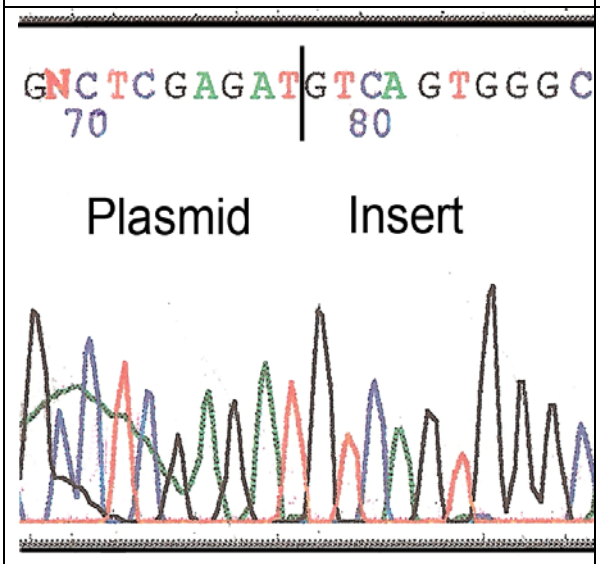
Die Ergebnisse der Übereinstimmung der Basensequenz der Transkriptionsfaktoren in der putativen Promotorregion mit der Sequenz der Datenbank zeigen, dass es bei Nkx2-5 eine vollständige und bei GATA-3 eine neunzigprozentige Übereinstimmung gibt (www.gene-regulation.com).



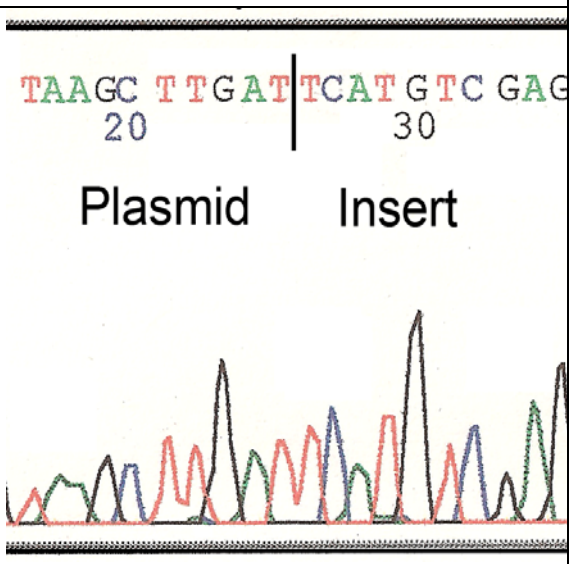
1. Fragment vorderer Übergang zwischen Plasmid und Insert



1. Fragment hinterer Übergang zwischen Plasmid und Insert

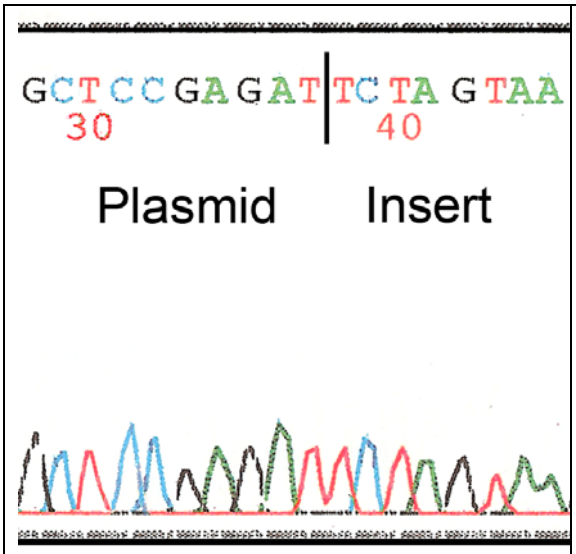


2. Fragment vorderer Übergang zwischen Plasmid und Insert

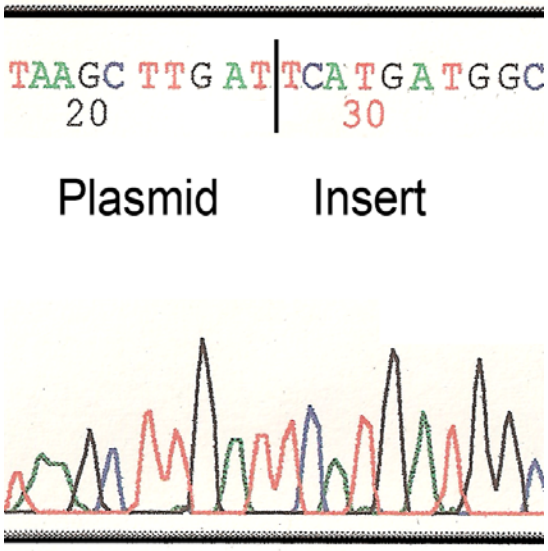


2. Fragment hinterer Übergang zwischen Plasmid und Insert

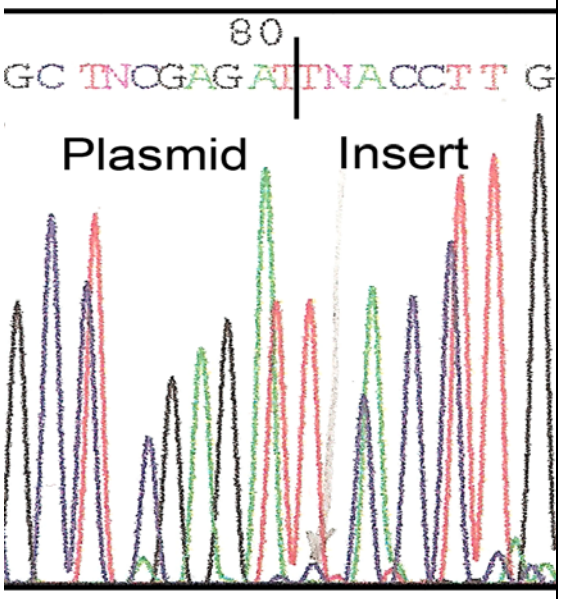
Abb. 11 Ausschnitte der Sequenzierungen des vorderen und hinteren Übergangs zwischen den Fragmenten 1-4 im pMLuc-3 AccepTor Vektor™



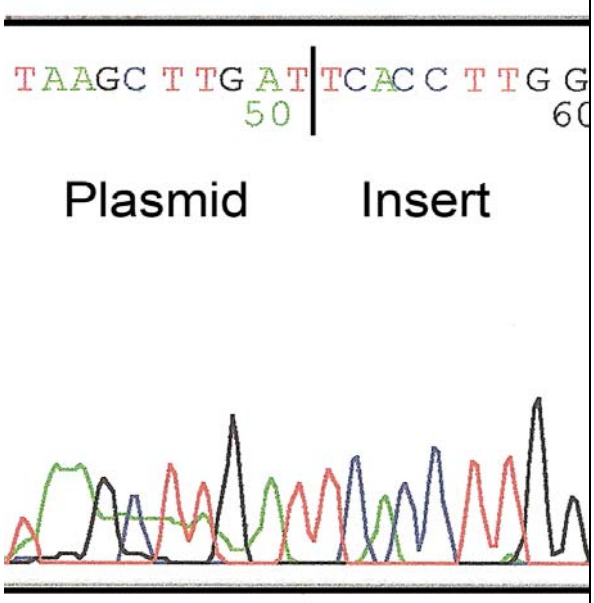
3. Fragment vorderer Übergang zwischen Plasmid und Insert



3. Fragment hinterer Übergang zwischen Plasmid und Insert



4. Fragment vorderer Übergang zwischen Plasmid und Insert



4. Fragment hinterer Übergang zwischen Plasmid und Insert

Abb. 11 (Forts.) Ausschnitte der Sequenzierungen des vorderen und hinteren Übergangs zwischen den Fragmenten 1-4 im pMLuc-3 AccepTor Vektor™

3.2 Promotorintensität der einzelnen JAM-C Fragmente

Die einzelnen Fragmente, welche in pMLuc-3 Vektoren insertiert waren, ein pMLuc DNA Vektor ohne Promotor (negative Kontrolle) und ein pmLuc-3 CMV Vektor mit einem CMV Promotor (positive Kontrolle) (beide Novagen, MERCK, Darmstadt) wurden in EVC-304 Zellen (humane Endothelzelllinie) nach Beschreibung transfiziert. Ebenso wurde zur Kontrolle der Transfektionseffizienz ein pβ-Galactosidase (pβgal) Basic Vektor zeitgleich in die ECV-304 Zellen transfiziert. Nach 48 h wurde der Überstand abgenommen und in den Mighty Light Rluc Assay eingesetzt. Die Promotoraktivität der einzelnen Fragmente wurde anhand der gemessenen Lichtintensität bestimmt. Des Weiteren wurden nach 48 h die Zellen lysiert und in den Chemilumineszenz-Test eingesetzt. Die Lichtintensität wurde wiederum im Luminometer gemessen. Aus dem Verhältnis der gemessenen Lichtintensität des jeweiligen Fragmentes 1-4, pMLuc-3 zu pβgal, wurde die Transfektionseffizienz berechnet.

Die gemessenen Lichtintensitäten sind in Tab. 3 dargestellt.

Damit haben die Messungen im Luminometer deutliche Unterschiede zwischen den vier Abschnitten ergeben. Die niedrigen Lichtintensitäten, die bei Fragment 3 und 4 gemessen wurden, sprechen dafür, dass die Renilla-Luciferase durch den putativen JAM-C Promotor nicht entsprechend aktiviert wurde.

Tab. 3 Durchschnittliche Lichtintensität der einzelnen Fragmente (RLU = Relative Lichteinheiten) gemessen im Luminometer; (n = 3)

Fragment	Lichtintensität nach 48 h (RLU)	Standardabweichung
1	2,0	0,2
2	1,4	0,15
3	0,4	0,3
4	0,5	0,9

Deutlich höhere Aktivitäten wurden beim 1. Fragment sowie auch beim 2. Fragment gemessen. Die Renilla-Luciferase wurde demnach durch den putativen JAM-C-Promotor entsprechend deutlich stärker aktiviert. Wie in Abb. 8 dargestellt, befindet sich auch in diesem Abschnitt eine RNA-Polymerasebindungsstelle, die 98 % Übereinstimmung mit bekannten Sequenzmustern aufweist (Reed, 2002).

3.2.1 Promotorintensität nach Stimulation mit 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA) und Wasserstoffperoxid

Das 2. Fragment, welches das 1. Fragment mit einschließt wurde untersucht um erkennen zu können, ob der putative Promotor durch Stimulation an Aktivität zunimmt. Beide Fragmente zeigen eine deutlich höhere Aktivität als Fragment 3 und 4 (Abb. 11). Zur Kontrolle wurde das 2. Fragment mit dem putativen Promotor mitgeführt, ohne dass bei diesem eine Stimulation durchgeführt wurde. Sonst erfolgte die Stimulation des 2. Fragments jeweils mit TPA und H_2O_2. Die gemessene Lichtintensität des 2. Fragments, und damit die Promotoraktivität, konnte noch weiter durch die Stimulation mit TPA erhöht werden. Keine Intensitätssteigerung ergab sich durch die Stimulation mit H_2O_2. Die Zellen hatten sich nach der Stimulation mit H_2O_2 bei der mikroskopischen Kontrolle sehr stark verändert, außerdem waren mehr als die Hälfte der Zellen abgestorben.

Durch die TPA-Testung konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des JAM-C-Promotors gesteigert werden kann. TPA ist ein Tumor Promotor, der die Proteinkinase C aktiviert und über diesen Weg Promotoraktivitäten beeinflussen kann. Demnach konnte gezeigt werden, dass der JAM-C Promotor ebenfalls durch TPA stimulierbar ist.
Abb. 12 zeigt ein Box Plot Diagramm mit den Ergebnissen der Stimulation mit TPA und H_2O_2.

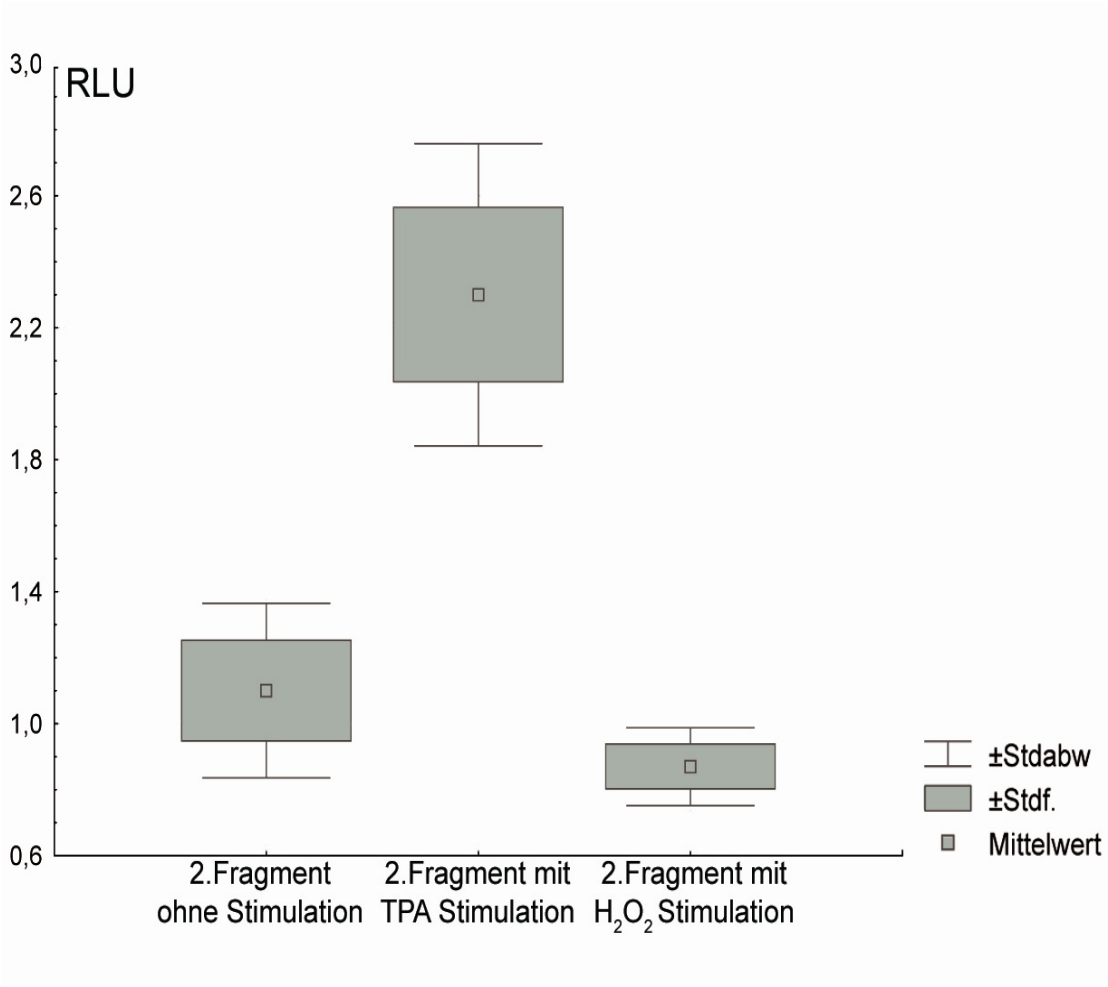


Abb. 12 Gemessene Lichtintensität (RLU) des 2. Fragments ohne Stimulation; Stimulation des 2. Fragments mit TPA und H_2O_2 (n = 3)

3.3 Expressionsstudie: JAM-C-Expression auf Thrombozyten bei HLH

Die Thrombozyten der Kinder mit HLH und der Kontrollgruppe wurden aus venösem Vollblut isoliert. Auf den gewaschenen Thrombozyten wurde GPIa/IIa mit Gi09 und JAM-C mit Gi11 und beide Proteine jeweils mit FITC-Konjugat markiert. Die JAM-C-Moleküle und die GPIa/IIa-Moleküle auf der Oberfläche von Thrombozyten wurden quantitativ im Durchflusszytometer gemessen. Abb. 13 zeigt die beispielhafte Darstellung einer Messung der Kalibrierungsbeads (Standardpartikel) am FACS. Anhand dieser Eichkurve wurden die JAM-C-Mo-

leküle und die GPIa/IIa-Moleküle auf der Oberfläche von Thrombozyten gemessen. Abb. 14 und Abb. 15 zeigen jeweils eine Messung der Expression von JAM-C und von GPIa/IIa am FACS sowie jeweils die negative Kontrolle (Maus IgG). Um die absoluten Zahlen der Expression zu erhalten wurde diese jeweils von den Messergebnissen von JAM-C und GPIa/IIa abgezogen.

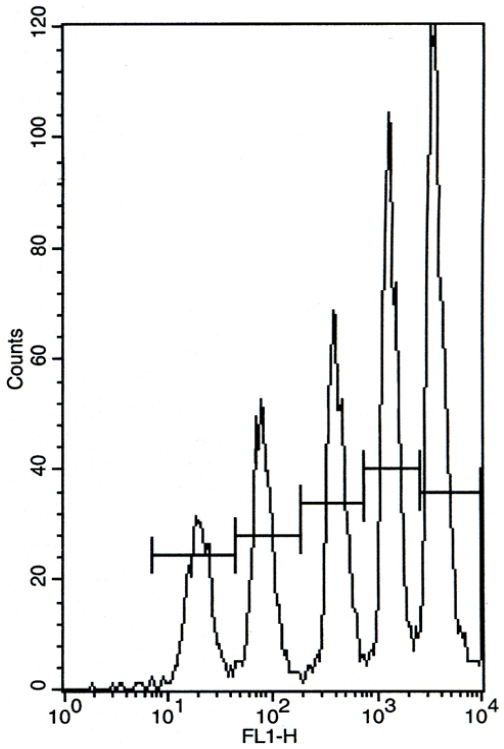


Abb. 13 Darstellung der FACS-Messung von Kalibrierungsbeads (Qifikit®, DAKO). Eichkurve zur Messung der JAM-C- und GPIa/IIa-Moleküle auf der Oberfläche der Thrombozyten

Die gemessen Daten sind in Tab. 4 für JAM-C und für GPIa/IIa zusammengestellt. Bei den dargestellten Ergebnissen handelt es sich um modifizierte Daten, da jeweils die entsprechenden Maus-IgG-Messungen als negative Kontrolle von den Rohwerten subtrahiert wurden. Die Messungen im FACS zeigen, dass es keinen wesentlichen Unterschied zwischen der Expression von JAM-C (Gi11) bei Erwachsenen (Santoso et al., 2002) mit 1594±303 Molekülen auf der Oberfläche von Thrombozyten und der JAM-C Expression bei Kindern mit 1618±627

Molekülen gibt. Zum ersten Mal wurde JAM-C bei einer Gruppe dieser Größe bestimmt (n = 32).

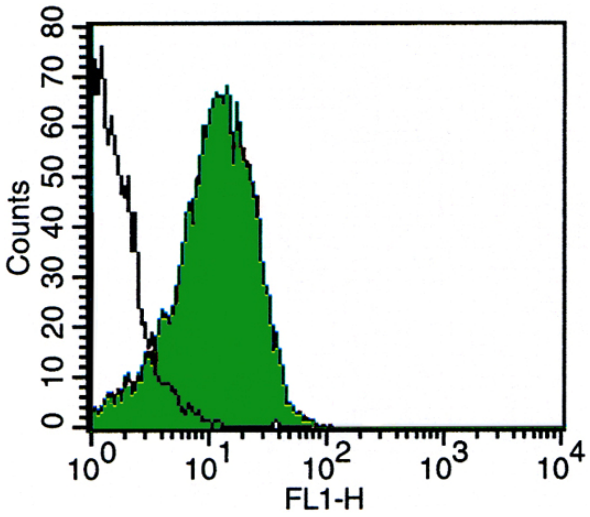


Abb. 14 Exemplarische Darstellung der FACS-Messung von markierten JAM-C-Molekülen auf Thrombozyten sowie der negativen Kontrolle (mIgG)

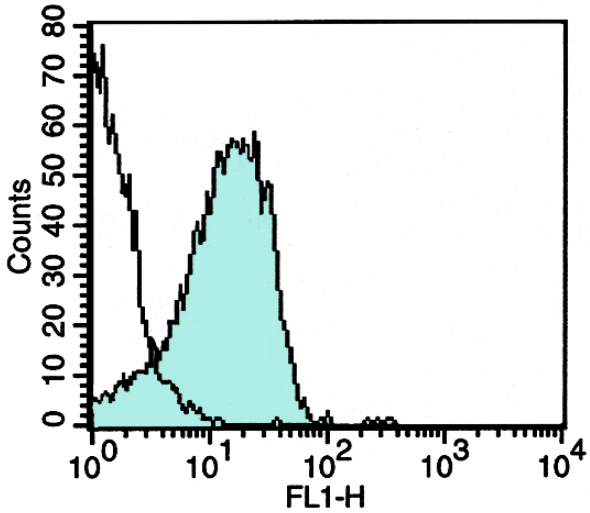


Abb. 15 Exemplarische Darstellung der FACS-Messung von markierten GPIa/IIa-Molekülen auf Thrombozyten sowie der negativen Kontrolle (mIgG)

Im Kolomogorow-Smirnov-Test ergeben sich keine signifikanten Abweichungen von der Normalverteilung. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die vorliegenden Daten normal verteilt sind und parametrische Verfahren zur Analyse herangezogen werden können. Mittels zweiseitigem t-Test für unabhängige

Beobachtungen kann davon ausgegangen werden, dass die Varianzen in den zu vergleichenden Gruppen homogen sind.

Es zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied (p = 0,028) in der Expression von JAM-C (Gi11) auf Thrombozyten zwischen der Kontrollgruppe und den HLH-Patienten.

Tab. 4 Absolute JAM-C-Expression auf Thrombozyten bei HLH-Patienten (n = 32) und der Kontrollgruppe (n = 32)
Absolute GPIa/IIa-Expression auf Thrombozyten bei HLH-Patienten (n = 32) und der Kontrollgruppe (n = 32)

JAM-C		GPIa/IIa	
Kontrollgruppe	**HLH**	**Kontrollgruppe**	**HLH**
511	298	810	966
815	590	872	971
869	745	913	1033
932	745	953	1114
1033	766	1049	1144
1034	800	1121	1161
1065	847	1149	1188
1067	883	1196	1206
1161	899	1202	1233
1175	910	1235	1245
1242	934	1261	1299
1262	936	1322	1314
1311	953	1329	1322
1376	987	1340	1428
1545	1112	1421	1478
1643	1113	1501	1505
1649	1116	1501	1559
1764	1251	1559	1738
1790	1284	1590	1738
1800	1298	1596	1744
1874	1328	1647	1829
1974	1468	1723	1848
1974	1581	2023	1862
1976	1673	2040	1866
1980	1699	2069	1867
2012	1746	2163	1873
2022	2022	2206	1874
2036	2112	2226	1882
2140	2155	2262	2023
2382	2183	2591	2269
2630	2339	3476	2543
3750	2345	3609	2773

Abb. 16 zeigt die Ergebnisse der Expressionsstudie des JAM-C. Als Kontrollgruppe wurden Kinder der Kinderkardiologie des Klinikums Giessen herangezogen. Diese Gruppe gliedert sich jeweils zur Hälfte in Mädchen und Jungen.

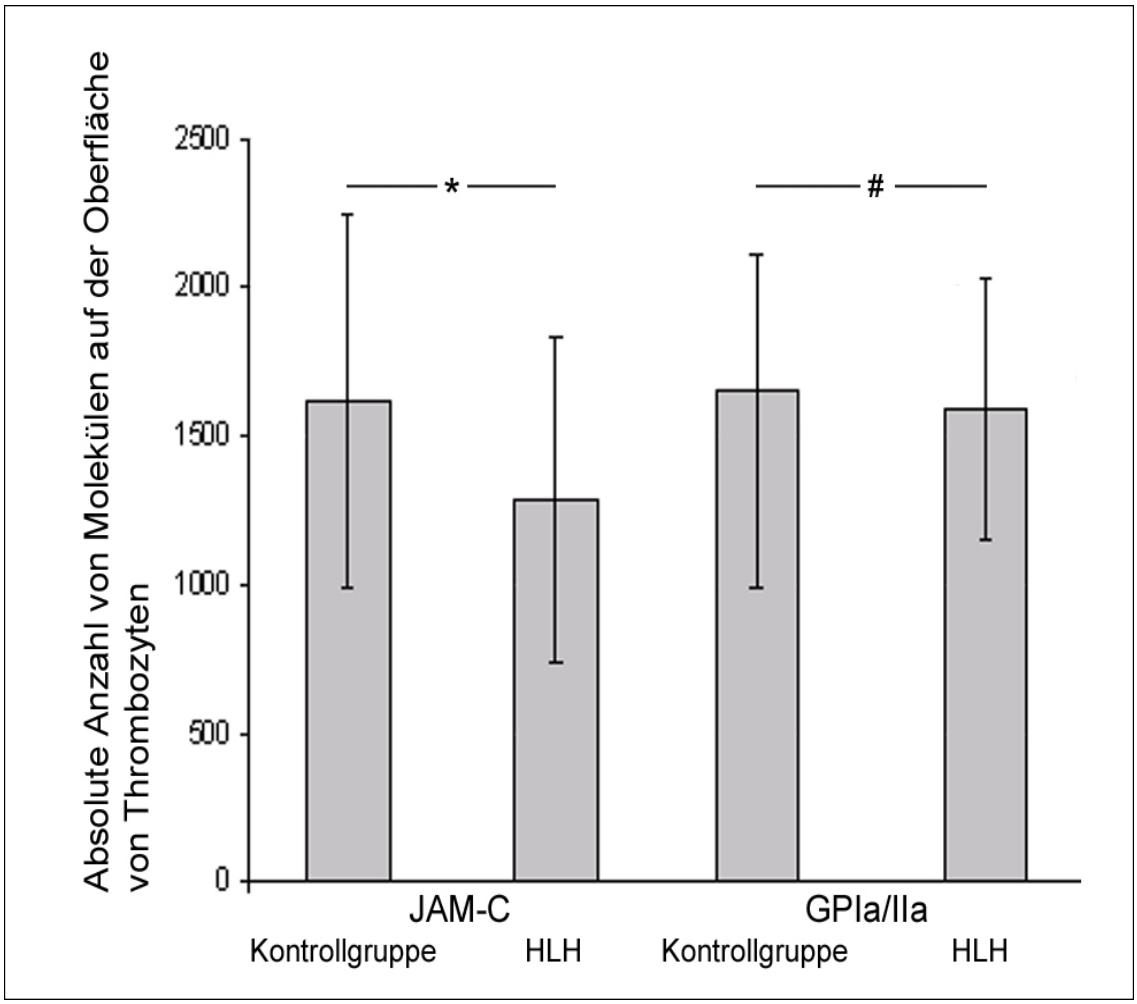


Abb. 16 Absolute Expression von JAM-C auf Thrombozyten bei HLH-Patienten (n = 32) und der Kontrollgruppe (n = 32) ist signifikant verringert (* p = 0,028). Absolute Expression von GPIa/IIa auf Thrombozyten bei HLH-Patienten (n = 32) und der Kontrollgruppe (n = 32) ist nicht signifikant verändert (# p = 0,654)

Die Expressionskontrolle wurde mit GPIa/IIa (Gi09) durchgeführt, da die Expressionsdichte des GPIa/IIa in etwa der des JAM-C entspricht. In Abb. 16 ist

diese Expression als Balkendiagramm dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 0,654$) zwischen den HLH-Patienten und der Kontrollgruppe festgestellt werden.

4 Diskussion

Die hier vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Zum einen wurde die genetische Variabilität der JAM-C-Expression im Bezug auf das Hypoplastische Linksherz-Syndrom (HLH) untersucht, und zum anderen wurden Vorstudien zur Promotorregion des JAM-C durchgeführt.

4.1 Genetische Variabilität der JAM-C-Expression und HLH

Seit der Erstbeschreibung des neuen JAM-Familienmitglieds JAM-C (Santoso et al., 2002) sind eine Reihe von Funktionen von diesem Protein erkannt worden, die grob in heterophile und homophile Interaktionen unterschieden werden können (Santoso et al., 2005). Für heterophile Interaktionen konnte gezeigt werden, dass JAM-C mit JAM-B auf Endothelzellen (Arrate et al., 2001; Liang et al., 2002) und mit dem β2-Integrin Mac-1 auf Leukozyten (Santoso et al., 2002) interagieren kann. Über diese Interaktion wird die Transmigration der neutrophilen Granulozyten über das Endothel vermittelt (Chavakis et al., 2004; Aurrand-Lions et al., 2005). Weitere heterophile Interaktionspartner stellen CD11c/CD18, als weiteres β2-Integrin und PAR-3 dar (Santoso et al., 2002; Ebnet et al., 2003). Die homophilen Interaktionen werden über die aminoterminale Ig-Domäne vermittelt (Santoso et al., 2005; Vonlaufen et al., 2006).

Die Frage der genetisch bedingten Variabilität und der Regulation von JAM-C ist hingegen weitgehend ungeklärt. Die vorliegende Arbeit verfolgte daher das Ziel, zunächst die Variabilität in der Expression von JAM-C in einem größeren Kollektiv von Kindern mit und ohne HLH zu bestimmen. JAM-C wird unter anderem auf Thrombozyten und Herzmuskelzellen exprimiert (Santoso et al., 2002; Arrate et al., 2001). Dabei ist bemerkenswert, dass diese Gewebespezifität nur für JAM-C und nicht für die anderen Mitglieder der JAM-Familie festgestellt werden konnte.

Vorarbeiten von Phillips et al. (2002) legen nahe, dass zwischen der gestörten Kardiogenese beim HLH und JAM-C ein ursächlicher Zusammenhang bestehen könnte. Dies wurde im Jahr 2002 zum ersten Mal in der gemeinsamen Lokalisation auf Chromosom 11q nachgewiesen (Phillips et al., 2002).

Auf dieser Grundlage ergibt sich die Hypothese, dass im Zusammenhang mit der Deletion auf Chromosom 11q und damit dem Vorhandensein des HLH auch die entsprechende Basensequenz des JAM-C verändert oder nicht mehr vorhanden sein könne. Des Weiteren wäre damit als Konsequenz auch die Expression von JAM-C auf den Thrombozyten verringert oder gar nicht vorhanden.

Untersuchungen an einem großen Kollektiv von Patienten mit HLH (n = 32) zeigen, dass in dieser Patientengruppe die Expression des Kollagenrezeptors GPIa/IIa in beiden Gruppen vergleichbar ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Expression des JAM-C bei Kindern mit 1618±627 Molekülen auf der Oberfläche von Thrombozyten der Expression des JAM-C bei Erwachsenen mit 1594±303 Molekülen (Santoso et al., 2002) entspricht. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression von JAM-C auf Thrombozyten tatsächlich im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt ist. Das würde erklären, dass die vollständige Expression des JAM-C bereits bei Geburt vorhanden ist und sich im Laufe des Lebens nicht verändert. Der Zusammenhang wird damit zum ersten Mal in dieser Form dargestellt.

Ein vermuteter Zusammenhang besteht auf der genetischen Relevanz einer Chromosom 11q-Deletion bei diesen Patienten, da JAM-C ebenfalls auf 11q (Palmeri et al., 2000; Santoso et al., 2002) lokalisiert ist. Gezielte Untersuchungen mit Hilfe der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) von HLH-Patienten auf Punktmutationen und Deletionen im Bereich dieses chromosomalen Abschnitts erbrachten keine eindeutigen Ergebnisse (Phillips et al., 2002). Möglicherweise sind die zur Verfügung stehenden, in diesem Zusammenhang bekannten Basensequenzen unvollständig, oder die Untersuchungen konnten nur die am wahrscheinlichsten in Frage kommenden Abschnitte testen. Insgesamt handelt es sich um aufwändige Verfahren, deren Grundlage auf einer schon bekannten Basensequenz beruht.

Es scheint von großer Bedeutung zu sein, ob es sich dabei um eine hemizygote Deletion handeln kann. Es konnte gezeigt werden, dass bei Kindern mit Paris-Trousseau-Syndrom durch eine hemizygote Deletion des kurzen Arms des

Chromosoms 11 und den dadurch entstandenen hemizygoten Verlust von Fli-1 die Megakaryopoese gestört werden kann (Hart et al., 2000). Das Fli-1 Gen befindet sich ebenso wie JAM-C auf dem Chromosom 11q und ist an der Expression von megakaryozyten-spezifischen Genen beteiligt (Favier et al., 1993; van Geet et al., 1993; Breton-Gorius et al., 1995; Lemarchandel et al., 1998; Favier et al., 2003). Durch die hemizygote Deletion von Fli-1 wird die Differenzierung innerhalb der Megakaryopoese teilweise verhindert, was innerhalb des Paris-Trousseau-Syndroms die Trennung von zwei Subpopulationen innerhalb dieser Differenzierung erklären würde (Raslova et al., 2004; Shivdasani, 2004). Damit konnte gezeigt werden, welche Rolle der monoallelen Expression eines Genes zukommt. Für die Differenzierung zahlreicher Merkmale ist das Vorhandensein eines vollständigen Chromosomensatzes relevant. Das lässt vermuten, dass der Mechanismus der hemizygoten Deletion auch bei anderen kongenitalen oder erworbenen genetischen Erkrankungen eine Rolle spielt.

Demnach ist es sehr wahrscheinlich, dass auch eine hemizygote Deletion in diesem chromosomalen Abschnitt ausreichen würde um die Expression von JAM-C zu verringern.

Der Vergleichsparameter GPIa/IIa wird nicht auf Chromosom 11, sondern auf Chromosom 5q23 codiert und ist daher ein geeigneter Kontrollparameter.

Aus den getroffenen Beobachtungen lassen sich einige weitere Schlussfolgerungen ableiten. Bislang gibt es noch wenige Arbeiten zu diesem Thema, aber es scheint sehr wahrscheinlich zu sein, dass Deletionen und möglicherweise auch Punktmutationen an einem Chromosom ausreichen um Beeinträchtigungen unter anderem der Differenzierung von Herzmuskelzellen bewirken zu können.

Ein Beispiel ist das Jacobsen-Syndrom, das 1973 zum ersten Mal beschrieben wurde (Jacobsen et al., 1973). Seine Ursache ist eine Deletion auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11. Abhängig vom Ausmaß der Deletion variiert der Schweregrad des Phänotyps, einschließlich der multiplen Dysmorphien, der angeborenen Herzfehler und einer Thrombozytopenie vom Typ Paris-Trousseau. Die Intelligenz reicht von normal bis zu moderater geistiger Retardierung.

Bei den Dysmorphien finden sich häufig auch Anomalien der Augen, des Magen-Darm-Traktes und des Urogenitalsystems, sowie Minderwuchs und verzögerte Entwicklung der Fein- und Grobmotorik (Jones et. al., 2000; Megarbane et al., 2002; Wenger et al., 2006). Von Grossfeld et al. wurde 2004 erstmalig ein Zusammenhang zwischen dem Paris-Trousseau-Syndrom (Favier et al., 1993) und dem Jacobsen-Syndrom beschrieben. Während die anfänglich verringerte Thrombozytenzahl sich im Laufe der Zeit normalisieren kann, bleibt die Funktionsstörung der Thrombozyten bestehen. Die Patienten haben deshalb lebenslang eine deutlich erhöhte Blutungsneigung.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lassen sich quantitativ JAM-C Moleküle auf der Oberfläche von Thrombozyten messen. Diese Methode könnte als Screening unter anderem für das HLH fungieren, da es sich um eine wenig invasive Methode handelt, die relativ einfach in den klinischen Alltag zu integrieren wäre und deutlich weniger kostenaufwändig und zeitintensiv als z.B. die FISH-Methode ist.

Falls bei den Patienten eine Thrombozytopenie vorliegen sollte, wäre es sinnvoll auch die Morphologie der Thrombozyten zu untersuchen. Es könnte damit möglicherweise auf ein Paris-Trousseau-Syndrom geschlossen werden. Geklärt werden könnte noch, ob es sich dabei um ein Krankheitsbild mit unterschiedlichen Ausprägungen handelt oder die jetzige Einteilung in zwei unterschiedliche Krankheitsbilder weiter bestehen bleibt. Die Untersuchungsergebnisse helfen die Krankheitsursachen weiter zu erforschen. Daraus könnten sich mögliche therapeutische Ansätze ableiten.

Trotz eines positiven Votums der Gießener Ethik-Komission hat die Europäische Selbsthilfegruppe für Eltern von Kindern mit dem Jacobsen-Syndrom keine Empfehlung für die weitere Analyse dieser Kinder ausgesprochen, so dass daher eine gezielte Analyse in diesem Kollektiv nicht durchgeführt werden konnte. Es wäre zu erwarten, dass bei den Kindern, bei denen eine Deletion des Abschnittes von 11q - in dem sich auch JAM-C befindet - vorliegt, die Expression auf Thrombozyten verringert wäre. Wiederum wäre es möglich, dass die HLH-Patienten, bei denen die JAM-C-Expression signifikant verringert

ist, auf diese Deletion hin untersucht werden könnten. Dieses wäre durch das Europäische 11q-Netzwerk (www.11q.org) möglich.

Aus zwei Blutproben von Patienten mit dem Paris-Trousseau-Syndrom, die freundlicherweise von Dr. R. Favier (Paris) zur Verfügung gestellt worden waren, wurden die Thrombozyten isoliert und die Expression von JAM-C im Durchflusszytometer gemessen. Die Expression war vergleichbar mit der Kontrollgruppe, so dass sich hieraus kein direkter Zusammenhang zum Jacobsen-Syndrom ableiten lässt.

In zukünftigen Arbeiten sollte der Frage nachgegangen werden, ob bei den HLH-Patienten in Giessen weitere anamnestische Angaben zu erheben sind, die auf einen Zusammenhang zum Jacobsen-Syndrom und oder auf das Paris-Trousseau-Syndrom schließen lassen. Weiterhin wäre es von Bedeutung eine gezielte chromosomale Analyse durchzuführen, denn möglicherweise könnte damit die Vermutung nach einer hemizygoten Deletion bei 11q im Bezug auf JAM-C bestätigt werden. Außerdem ist noch zu klären, wo genau der Zusammenhang zwischen dem Jacobsen-Syndrom und dem Paris-Trousseau-Syndrom liegen könnte. Allerdings wäre auch hier die Mitarbeit der betroffenen Familien von großer Bedeutung, da es sich insgesamt um seltene Erkrankungen handelt. Dabei könnte eine Untersuchung am Durchflusszytometer im Bezug auf die Expression von JAM-C einen Ausgangspunkt für weitere deutlich aufwändigere Verfahren liefern.

Insgesamt steht man erst am Beginn von genaueren Untersuchungen, die zukünftig möglicherweise auch zu therapeutischen Zwecken genutzt werden könnten.

4.2 Vorstudien zur Promotorregion des JAM-C-Gens

Neben der genetischen Variabilität war es Ziel der vorliegenden Arbeit, durch Eingrenzung der Promotorregion die Grundlage dafür zu schaffen, mögliche re-

gulatorische Einflüsse einer erhöhten oder erniedrigten Expression von JAM-C zu untersuchen. Da JAM-C eine Bedeutung bei der Adhäsion an Endothel zukommt, ist es denkbar, dass in bestimmten (patho-)physiologischen Situationen die Expression auf der Endothelzelloberfläche herauf- oder herunterreguliert wird. Tatsächlich wurde mittlerweile eine entscheidende Beobachtung von Keiper et al. (2005) publiziert, die zeigen konnten, dass oxLDL die Expression von JAM-C auf dem Endothel erhöht.

Bei Patienten mit erhöhten LDL-Werten ist bekannt, dass das Risiko an arteriosklerotischen Gefäßveränderungen zu erkranken deutlich erhöht ist. Da durch oxLDL die Expression von JAM-C erhöht wird, könnte damit auch die zunehmende Entzündung bei Arteriosklerose erklärt werden, da wiederum die Transmigration und Anheftung von neutrophilen Granulozyten unter anderem durch JAM-C vermittelt werden. In diesem Zusammenhang wäre es möglich, dass die zukünftige medikamentöse Behandlung bei diesen Patienten JAM-C als Zielrezeptor zur Antagonisierung der Interaktionen zwischen Endothelzellen und Granulozyten nutzen könnte. Weiterhin konnten Untersuchungen zeigen, dass in arteriosklerotischen Gefäßen eine erhöhte Expression von JAM-C zu finden ist. Auch diese Befunde deuten daraufhin, dass JAM-C eine wichtige Rolle in der Entstehung der Arteriosklerose zukommt.

Daneben ist es denkbar, dass die Regulation von JAM-C als spezifischem Interaktionspartner für leukozytäre Oberflächenrezeptoren, wie etwa Mac-1 (Santoso et al., 2002), dazu beiträgt, dass spezielle Subpopulationen weißer Zellen bevorzugt aus dem Blutgefäß auswandern oder nicht auswandern können. Über die Interaktion von JAM-C und Mac-1 wird die Transmigration von neutrophilen Granulozyten über die Barriere des Endothels hinweg vermittelt (Chavakis et al., 2004; Aurrand-Lions et al., 2005). Diese spielen bei akuten nichtinfektiösen aber auch bei bakteriellen Entzündungen eine entscheidende Rolle. β2-Integrine wie Mac-1 vermitteln aber auch den Einstrom von Makrophagen und über JAM-C den von neutrophilen Granulozyten. Dies konnte bei Kindern mit einseitiger Uretherobstruktion gezeigt werden (Lange-Sperandino et al., 2006). Demnach könnte die Blockade von JAM-C und Mac-1 unter anderem einen synergistischen renoprotektiven Effekt haben.

Im Gegensatz dazu konnte nicht gezeigt werden, dass auch eosinophile oder basophile Granulozyten an diesem Prozess beteiligt sind.

Unveröffentlichte Daten zeigen weiterhin, dass JAM-C auch an der vaskulären Permeabilität und Angiogenese beteiligt ist, und dass durch die Inhibition von JAM-C die Neovaskularisierung reduziert wurde. Damit könnte sich ein weiterer möglicher Angriffspunkt zur medikamentösen Therapie unter anderem bei Tumoren ergeben, deren Wachstum durch die damit induzierte Hypoxie gebremst werden könnte.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Promotorregion für JAM-C in der Region von 1337 bp vor dem ersten Exon des JAM-C identifiziert werden. Für diesen Abschnitt ließ sich die höchste Reportergentranskription messen, nachdem der Abschnitt in den pMLuc-3 Vektor kloniert und in ECV-304 Zellen transfiziert worden war. Stimulationsexperimente an diesem Abschnitt mit TPA konnten zeigen, dass die Aktivität des JAM-C-Promotors gesteigert werden kann. Es wäre somit denkbar, dass diese durch andere Substanzen auch verringert werden könnte. H_2O_2 hatte keinen Effekt auf die Aktivität des Promotors.

In der Promotorregion befinden sich einige interessante Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren.

Die Faktoren, die auf die Kardiogenese einwirken, sind im Einzelnen noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine wichtige Rolle scheinen die Transkriptionsfaktoren Nkx2-5 und GATA 1-6, insbesondere GATA-4, zu spielen. Sie sind besonders für die frühen präkardialen Zellen für die Herzentwicklung von essentieller Wichtigkeit (Durocher et al., 1997). Die Entwicklung von embryonalen Stammzellen zu Kardiomyozyten wird unter anderem durch TGF-β, IGF FGF und Erythropoetin beeinflusst und reguliert. Diese Wachstumsfaktoren binden an die jeweiligen Rezeptoren und induzieren die Bildung von herzspezifischen Transkriptionsfaktoren, wie GATA-Proteine und Nkx2-5 (Sachinidis et al., 2002; Sachinidis et al., 2003).

Interessanterweise befinden sich Nkx2-5 und GATA-3 in der Region des putativen JAM-C-Promotors. Da die speziellen Zusammenhänge im Bezug auf die Kardiogenese noch nicht vollständig geklärt sind, ergeben sich aufgrund der engen Lokalisation weitere Ansatzpunkte für zukünftige Arbeiten. Einerseits ist es denkbar, die Funktion der einzelnen Transkriptionsfaktoren weiter zu erforschen. Andererseits könnte versucht werden einen Zusammenhang auch zur Hämatopoese herzustellen. Da GATA-3 teilweise die identische Basenabfolge wie GATA-1 enthält, ist davon auszugehen, dass hier möglicherweise ähnliche Funktionsbereiche abgedeckt werden. Denkbar wäre eine direkte Interaktion über den C-terminalen zinc finger, da mit dieser Aktivierung herzspezifische Promotoren (Durocher et al., 1997) in Gang gesetzt werden. Es bleibt zu klären, wie genau diese enge Lokalisation Einfluss auf JAM-C nimmt, und durch welche Einflussfaktoren eine Störung oder Änderung herbeigeführt werden kann.

Die Ergebnisse der Übereinstimmung der Basensequenz der Transkriptionsfaktoren in der putativen Promotorregion mit der Sequenz der Datenbank zeigen, dass es bei Nkx2-5 eine vollständige und bei GATA-3 eine neunzigprozentige Übereinstimmung gibt. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass diese beiden Transkriptionsfaktoren auf Grund der engen Lokalisation auf Chromosom 11q25 zu JAM-C eine Funktionseinheit darstellen. So besteht auch darin ein möglicher Zusammenhang zwischen JAM-C und der präkardialen Herzentwicklung.

Anlass für weitere Ansatzpunkte ergeben sich daraus, dass die Möglichkeit bestehen könnte, hier neue therapeutische Strategien zur Regeneration von geschädigtem Herzmuskelgewebe zu entwickeln. Bislang konnte gezeigt werden, dass sich Kardiomyozyten sowohl aus embryonalen als auch aus adulten Stammzellen differenzieren können. Schwierigkeiten könnten darin bestehen, dass diese Differenzierung nur in eine Richtung voranschreiten kann. Bislang ist es noch nicht möglich, dass differenzierte Kardiomyozyten wieder in den Kreislauf der erneuten Differenzierung eintreten können (Gulbins et al., 2002; Passier et al., 2005).

Die Ergebnisse der Vorstudien sind die Grundlage für eine detaillierte Untersuchung der Regulation von JAM-C. Daraus könnten sich weitere Fragestellungen für zukünftige Projekte ergeben. Bislang sind die Signale, welche JAM-C und dessen Funktion beeinflussen, weitestgehend unbekannt. Es konnte gezeigt werden, dass bei Entzündungen, – bislang wurden Haut, Pankreas, Gefäße und Peritoneum untersucht –, ebenso bei der Neovaskularisation sowie bei der Kontraktilität der Endothelzellen JAM-C eine Schlüsselrolle zukommt. Es bleibt abzuwarten welche molekularen Mechanismen zur Steuerung beitragen. Es kann davon ausgegangen werden, dass über JAM-C protektive Effekte zu verzeichnen sein werden, die zukünftig weitere therapeutische Ansatzpunkte liefern könnten.

5 Zusammenfassung

JAM-C ist ein Mitglied der Familie der Junctional Adhesion Molecules (JAM) und wurde 2002 charakterisiert (Santoso et al., 2002). Es ist in der Lage, homophile (JAM-C/JAM-C) und heterophile (JAM-C/CD11b) Interaktionen einzugehen. Dadurch vermittelt es unter anderem Thrombozyten-Leukozyten-Interaktionen, die bei Stress, entzündlichen Prozessen und Infektionen von Bedeutung sind.

Phillips et al. mutmaßten 2002, dass eine Verbindung zwischen der Expression von JAM-C und dem Auftreten des hypoplastischen Linksherzsyndroms (HLH) bestehen könnte, aufgrund der gemeinsamen Lokalisation auf Chromosom 11q25 und der kardialen Expression von JAM-C in den geweblichen Strukturen während der Embryonalperiode, welche durch geringe chromosomale Veränderungen stark beeinflusst werden könnten.

Bei Kindern mit HLH kommt es gehäuft zu Thrombozytopenien, angeborenen Herzfehlern, ophtalmologischen, gastrointestinalen und urogenitalen Abnormalitäten.

In der hier vorgelegten Arbeit wurde zunächst die Expression von JAM-C auf der Oberfläche von Thrombozyten bei Kindern in einem Normalkollektiv untersucht. Sie entspricht mit 1618±627 Molekülen pro Zelle der Antigendichte auf Thrombozyten Erwachsener. Ein großes Kollektiv an Kindern mit HLH (n = 32) wurde ebenfalls auf die Expression von JAM-C untersucht und zeigte eine signifikant geringere Expression (1618 vs. 1285, p = 0,028). Eine Vergleichsmessung der Expression des Kollagenrezeptors GPIa/IIa zeigte keine Unterschiede zwischen Kindern mit HLH und der Kontrollgruppe.

Im Weiteren wurde die Promotorregion von JAM-C durch Klonierungsexperimente auf eine Region von 1337 bp vor dem 1. Exon eingegrenzt. In diese Region fallen putative Bindungsstellungen für Transkriptionsfaktoren, denen eine wichtige Rolle bei der Kardiogenese zukommt (Nkx2-5 und GATA-3).

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen der Expression von JAM-C und der Kardiogenese möglich ist.

6 Summary

JAM-C belongs to the family of Junctional Adhesion Molecules (JAM) and was characterized in 2002 (Sanctoso et al., 2002). It is able to form homophilic (JAM-C/JAM-C) and heterophilic (JAM-C/CD11b) interactions. Thereby it mediates amongst others thrombocyte-leucocyte interactions which are important in stress, inflammatory processes and infections.

In 2002 Phillips et al. postulated a possible link between the expression of JAM-C and the occurrence of the hypoplastic left heart syndrome (HLH) due to the common localisation in chromosome 11q25 and the cardial expression of JAM-C in the tissue structures during the embryonic phase which could be influenced by minor chromosomal changes.

In children with HLH thrombocytopenia, congenital heart failures, ophtalmological, gastrointestinal, and urogenital abnormalities are often observed.

In this study the expression of JAM-C on the surface of thrombocytes was checked in a normal collective of children first. It corresponds with 1618±627 molecules per cell to the antigen concentration on thrombocytes in adults. A large collective of children with HLH (n = 32) was checked for the expression of JAM-C as well and showed a significant lower expression (1618 vs. 1285, p = 0.028). In a comparative test measuring the expression of the collagen receptor GPIa/IIa no difference between children with HLH and the control group was seen.

The promotor region of JAM-C could be limited to a region of 1337 bp before the first exon. In this region putative binding sites for transcription factors which have an important role in cardiogenesis (Nkx2-5 and GATA-3) are located.

These results indicate a possible relation between the expression of JAM-C and cardiogenesis.

7 Literaturverzeichnis

Anderson JM, Stevenson BR, Jesaitis LA, Goodenough DA, Mooseker MS: Characterization of ZO-1, a protein component of the tight junction from mouse liver and Madin-Darby canine kidney cells, 1988, *J Cell Biol*, 106:1141-1149

Arcei RJ, King AA, Simon MC, Orkin SH, Wilson DB: Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart, 1993, *Mol Cell Biol*, 13:2235-2246

Arrate MP, Rodriguez JM, Tran TM, Brock TA, Cunningham SA: Cloning of human junctional adhesion molecule 3 (JAM3) and its identification as the JAM2 counterreceptor, 2001, *J Biol Chem*, 276:45826-45832

Aurrand-Lions M, Duncan L, Ballestream C, Imhof B: JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells, 2001, *J Biol Chem,*276:2733-2741

Aurrand-Lions M, Johnson-Leger C, Wong C, du Pasquier L, Imhof B: Heterogenity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members, 2001, *Blood*, 98:3699-3707

Aurrand-Lions M, Lamagna C, Dangerfield JP, Wang S, Herrera P, Nourshargh S, Imhof B: Junctional adhesion molecule-C regulates the early influx of leucozytes into tissues during inflammation, 2005, *Eur J Immunol*, 174:6406-6415

Babinska A, Kedees MH, Athar H, Ahmed T, Batuman O, Ehrlich YH, Hussain MM, Kornecki E: F11-receptor (F11R/JAM) mediates platelet adhesion to endothelial cells: role in inflammatory thrombosis, 2002a, *Thromb Haemost*, 88:843-850

Babinska A, Kedees MH, Athar H, Sobocki T, Sobocka MB, Ahmed T, Ehrlich YH, Hussain MM, Kornecki E: Two regions of the human platelet F11-receptor (F11R) are critical for plateletaggregation, potentiation and adhesion, 2002b, *Thromb Haemost*, 87:712-721

Barlay AN, Brown MH, Law SKA, McKnight AJ, Tomlinson MG, van der Merwe PA: The Leucozyte Antigen Factsbook,1997, London, *Academic Press*

Bazzoni G: The family of junctional adhesion molecules, 2003, *Curr Opin Cell Biol*, 15:525-530

Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Orsenigo F, Cordenonsi M, Citi S, Dejana E: Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin, 2000b, *J Biol Chem*, 275:20520-20526

Bazzoni G, Tonetti P, Manzi L, Cera MR, Balconi G, Dejana E: Expression of junctional adhesion molecule-A prevents spontaneous and random motility, 2005, *J Cell Sci*, 118:623-632

Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Mueller F, Nelboeck P, Schmid G, Bartfai T, Dejana E, Brockhaus M: Homophilic interaction of junctional adhesion molecule, 2000a, *J Biol Chem*, 275:30970-30976

Boettner B, Govek EE, Cross J, van Aelst L: The junctional multidomain protein AF-6 is a binding partner of the Rap1A GTPase and associates with the actin cytosceletal regulator profiling, 2000, *Proc Nat Acad Sci USA*, 97:9064-9069

Breton-Gorius J, Favier R, Guichard J, Cherif D, Berger R, Debili N, Vainchenker W, Douray L: A new congenital dysmegakaryopoetic thrombocytopenia (Paris-Trousseau) associated with giant platelet alpha-granules and chromosome 11 deletion at 11q23, 1995, *Blood*, 85:1805-1814

Brewer AC, Alexandrovich A, Mjaatvedt CH, Shah AM, Paticut RK, Pizzey JA: GATA factors lie upstream of Nkx 2.5 in the transcriptional regulatory cascade that effects cardiogenesis, 2005, *Stem Cell Dev*, 14:425-439

Brown CO 3rd, Chi X, Garcia-Gras E, Shirai M, Feng XH, Schwartz RJ: The cardiac determination factor, Nkx 2.5, is activated by mutual cofactors GATA-4 and Smad 1/4 via a novel upstream enhancer, 2004, *J Biol Chem*, 279:10659-10669

Butcher EC, Picker LJ: Lymphocyte homing and homeostasis, 1996, *Science* 272:60-66

Carlos TM, Harlan JM: Leukocyte-endothelial adhesion molecules, 1994, *Blood*, 84:2068-2101

Chavakis T, Preissner K, Santoso S: Leukocyte trans-endothelial migration: JAM`s add new pieces to the puzzle, 2003, *Thromb Haemost*, 89:13-7

Chavakis T, Keiper T, Matz-Westphal R, Hersemeier K, Sachs UJ, Nawroth PP, Preissner KT, Santoso S: The Junctional Adhesion Molecule C promotes neutrophil transendothelial migration in vitro and in vivo, 2004, *J Biol Chem*, 279:55602-55608

Chretien I, Marcuz A, Courtet M: CTX, a Xenopus thymocyte receptor, defines a molecular family conserved throughout vertebrates, 1998, *Eur J Immunol*, 28:4094-4104

Citi S, Sabanay H, Jakes R, Geiger B, Kendrick-Jones J: Cingulin, a new peripheral component of tight junctions, 1988, *Nature*, 333:272-276

Cunningham SA, Rodriguez JM, Arrate MP, Tran TM, Brock TA: JAM-2 interacts with alpha4beta1. Facilitation by JAM-3, 2002, *J Biol Chem*, 277:27589-27592

Cunningham SA, Arrate MP, Rodriguez JM, Bjerke RJ, Vanderslice P, Morris AP, Brock TA: A novel protein with homology to the junctional adhesion molecule: Characterisation of leukocyte interactions, 2000, *J Biol Chem*, 275:34750-34756

Del Maschio A, de Luigi A, Martin-Padua I, Brockhaus M, Bartfai T, Fruscella P, Adorini L, Martino G, Furlan R, De Simoni MG, Dejana E: Leukocyte recruitment in the cerebrospinal fluid of mice with experimental meningitis is inhibited by an antibody to junctional adhesion molecule (JAM), 1999, *J Exp Med*, 190:1351-1356

Du Pasquier L, Courtet M, Chretien I: Duplication and MHC linkage of the CTX family of genes in Xenopus and in mammals,1999, *Eur J Immunol*, 29:1729-1739

Durocher D, Charron F, Warren R, Schwartz R, Nemer M: The cardiac transcription factors Nkx 2-5 and GATA-4 are mutual cofactors,1997, *EMBO J*,18:5687-5696

Ebnet K, Suzuki A, Ohno S, Vestweber D: Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? 2004, *J Cell Sci*, 117:19-29

Ebnet K, Schulz CU, Meyer zu Brickwedde MK, Pendl GG, Vestweber D: Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 und ZO-1, 2000, *J Biol Chem*, 275:27979-27988

Ebnet K, Suzuki A, Horikoshi Y, Hirose T, Meyer zu Brickwedde MK, Ohno S, Vestweber D: The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM), 2001, *EMBO J*, 20:3738-3748

Ebnet K, Aurrand-Lions M, Kuhn A, Kiefer F, Butz S, Zander K, Meyer zu Brickwedde MK, Suzuki A, Imhof BA, Vestweber D:The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity, 2003, *J Cell Sci*, 116:3879-3891

Fanning AS, Jemeson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM: The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane proteine occludin and the actin cytoskeleton, 1998, *J Biol Chem*, 273:29745-29753

Favier R, Jondeau K, Boutard P, Grossfeld P, Reinert P, Jones C, Bertoni F, Cramer EM: Paris-Trousseau syndrome: clinical, hematological, molecular data of ten new cases, 2003, *Thromb Haemost*, 90:893-897

Favier R, Douay L, Esteva B, Portoni MF, Gaulard P, Lecompte T, Perot C, Adam M, Lecrubier C, van den Akker J: A novel genetic thrombocytopenia (Paris-Trousseau) associated with platelet inclusions, dysmegakaryopoiesis and chromosomal deletion at 11q23, 1993, *C R Acad Sci III*, 316:698-701

Fu YH, Marzluf GA: Nit-2, the major nitrogen regulatory gene of neurosora crassa, encodes a protein with a putative zinc finger DNA binding domain,1990, *Mol Cell Biol*, 10:1056-1065

Furuse M, Fujita K, Hiragi T, Fujimoto K, Tsukita S: Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at the tight junctions with no sequence similarity to occludin, 1998, *J Cell Biol*, 141:1539-50

Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S: Occludin, a novel integral membrane protein localizing at tight junction,1993, *J Cell Biol*, 123:1777-1788

Gliki G, Ebnet K, Aurrand-Lions M, Imhof BA, Adams RH: Spermatid differentiation requires the assembly of a cell polarity complex downstream of the junctional adhesion molecule-C, 2004, *Nature*, 431:320-324

Grépin C, Nemer G, Nemer M: Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 trancription factor, 1997, *Development*, 124:2387-2395

Grépin C, Robitaille L, Antakly T, Nemer M: Inhibition of transcription factor GATA-4 expression blocks in vitro cardiac muscle differentiation, 1995, *Mol Cell Biol*, 15:4095-4102

Grossfeld P, Mattina T, Lai Z, Favier R, Jones KL, Cotter F, Jones C: The 11q terminal deletion disorder: A prospective study of 110 cases, 2004, *Am J Med*, 129A:51-61

Gulbins H, Meisner BM, Reichenspurner H, Reichart B: Cell transplantation – a potential therapy for cardiac repair in the future? 2002, *Heart Surg Forum*, 5:28-34

Hamazaki Y, Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S: Multi PDZ domain protein 1 (MUPP-1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule, 2002, *J Biol Chem*, 277:455-461

Hart A, Melet F, Grossfeld P, Chien K, Jones C, Tunnacliffe A, Favier R, Bernstein A: Fli-1 is required for murine vascular and megakaryocytic development and is hemizygously deleted in patients with thrombocytopenia, 2000, *Immunity*, 13:167-177

Hirabayashi S, Tajima M, Yao I, Nishimura W, Mori H, Hata Y: JAM-4, a junctional adhesion molecule interacting with Tight Junction Protein, MAGI-1, 2003, *Mol Cell Biol*, 23:4267-4282

Ide N, Hata Y, Nishioka H, Hirao K, Yao I, Deguchi M, Mizoguchi A, Nishimori H, Tokino T, Nakamura Y, Takai Y: Localization of membrane-associated guanylate kinase (MAGI-1)/BAI-associated protein (BAP) 1 at tight junctions of epithelial cells, 1999, *Oncogene*, 18:7810-7815

Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Ozaki H, Kita T, Tsukita S: Junctional Adhesion Molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junction, 2001, *J Cell Biol*, 154:491-497

Izumi Y, Hirose T, Tamai Y, Hirai S, Nagashima Y, Fujimoto T, Tabuse Y, Kemphues KJ, Ohno S: An atypical PKC directly associates and co-localizes at the epithelial tight junction with ASIP, a mammalian homologue of Caenorhabditis elegans polarity protein PAR-3, 1998, *J Cell Biol*, 143:95-106

Jacobsen P, Hange M, Henningsen K, Hobolth N, Mikkelsen M, Philip J: An (11;21) translocation in four generations with chromosome 11 abnormalities in the offspring. A clinical, cytogenetical, and gene marker study, 1973*, Hum Hered,* 23:568-85

Jiang YM, Evens T: The Xenopus GATA-4/5/6 genes are associated with cardiac specification and can regulate cardiac-specific transcription during embryogenesis, 1996, *Dev Biol*, 174:258-270

Jones C, Müllenbach R, Grossfeld P, Auer R, Favier R, Chien K, James M, Tunacliffe A, Cotter F: Co-localization of CCG-repeats and chromosome deletion breakpoints in Jacobsen syndrome: Evidence for a common mechanism of chromosome breakage, 2000, *Hum Mol Genet*, 9:1201-1208

Johnson-Leger CA, Aurrand-Lions M, Beltraminelli N, Fasen N, Imhof BA: Junctional adhesion molecule-2 (JAM-2) promotes lymphocyte transendothelial migration, 2002, *Blood*, 100:2476-2486

Keiper T, Santoso S, Nawroth PP, Orlova V, Chavakis T: The role of junctional adhesion molecules in cell-cell interactions, 2005a, *Histol Histopathol*, 20:197-203

Keiper T, Al-Fakhri N, Chavakis E, Athanasopoulos AN, Isermann B, Herzog S, Saffrich R, Hersemeyer K, Bohle RM, Haendeler J, Preissner KT, Santoso S, Chavakis T: The role of junctional adhesion molecule-C (JAM-C) in oxidized LDL-mediated leukocyte recruitment, 2005b, *FASEB J*, 19:2078-2080

Kelley C, Blumberg H, Zon LI, Evans T: GATA-4 a novel transcription factor expressed in endocardium of the developing heart, 1993*, Development*, 118:817-827

Kornecki E, Naik UP, Sobocka M, Ehrlich YH: Mechanisms of stimulation and inhibition of platelet activation by monoclonal antibodies, 1995, In: Leukocyte Typing, Vol V, Schlossmann SF et al., eds. *Oxford University Press*, 1241-1243

Kornecki E, Walkowiak B, Naik UP, Ehrlich YH: Activation of human platelets by a stimulatory monoclonal antibody, 1990, *J Biol Chem*, 265:10042-10048

Kostrewa D, Brockhaus M, d´Acry A, Dale GE, Nelboeck P, Schmid G, Mueller F, Bazzoni G, Dejana E, Bartfai T: X-ray structure of junctional adhesion molecule: structural basis for homophilic adhesion via a novel dimerization motif, 2001, *EMBO J*, 20:4391-4398

Lamagna C, Hodivala-Dilke KM, Imhof BA, Aurran-Lions M: Antibody against junctional adhesion molecule-C inhibits angiogenesis and tumor growth, 2005, *Cancer Res*, 65:5703-5710

Lange-Sperandino B, Schimpgen K, Rodenbeck B, Chavakis T, Bierhaus A, Nawroth P, Thornhill B, Schaefer F, Chevalier RL: District roles of Mac-1 and its counterreceptors in neonatal obstructive nephropathy, 2006, *Kidney Int*, 69:81-88

Lemarchandel V, Ghysdael J, Mignotte V, Rahuel C, Romeo PH: GATA and Ets cis-acting sequences mediate megakaryocyte-specific expression, 1993, *Mol Cell Biol*, 13:668-676

Lemmers C, Medina E, Delgrossi MH, Michel D, Arsanto JP, le Bivic A: hINADl/PATJ, a homolog of discs lost, interacts with crumbs and localizes to tight junctions in human epithelial cells, 2002, *J Biol Chem*, 277:25408-25415

Liang TW, deMarco RA, Mrsny RJ, Gurney A, Gray A, Hooley J, Aaron HL, Huang A, Klassen T, Tumas DB, Fong S: Characterization of huJAM: evidence for involvement in cell-cell contact and tight junction regulation, 2000, *Am J Physiol Cell Physiol*, 279:1733-1734

Liang TW, Chiu HH, Gurney A, Sidle A, Tumas DB, Schow P, Foster J, Klassen T, Dennis K, DeMarco RA, Pham T, Frantz G, Fong S: Vascular endothelial-junctional adhesion molecule (VE-JAM)/JAM-2 interacts with T, NK, and dendritic cells through JAM-3, 2002, *J Immunol*, 168:1618-1626

Liu Y, Nusart A, Schell TJ, Reaves Tam Walsh S, Pochet M, Parkos CA: Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia, 2000, *J Cell Sci*, 113:2363-2374

Ludwig RJ, Zollner TM, Santoso S, Hardt K, Gille J, Baatz H, Johann PS, Pfeffer J, Radeke HH, Kaufmann R, Boehncke WH, Podda M: JAM-B and JAM-C contribute to leukocyte extravasation to the skin and mediate cutaneous inflammation, 2005, *J Invest Dermatol*, 125:969-976

Lyons I, Parsons LM, Hartley L, Li R, Andrews JE, Robb L, Harvey RP: Myogenic and morphogenic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5, 1995, *Devolopment,* 9:1654-1666

Mandell KJ, Holley GP, Parkos CA, Edelhauser HF: Antibody blockade of junctional adhesion molecule-A in rabbit corneal endothelial tight junctions produces corneal swelling, 2006, *Invest Ophtalmol Vis Sci*, 47:2408-2416

Mandell KJ, Parkos CA: The JAM family of proteins, 2005, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57:857-867

Martin-Padua I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E: Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration, 1998, *J Bio Cell*, 142:117-127

Mc Ever RP: Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during haemostasis and inflammation, 2001, *Thromb Haemost*, 86:746-756

Megarbane A, Bejjani BA, Shaffer G, Jambart S, Souraty N, Kasherk CD, Le Merrer M: Craniofacial anomalies, deafness, brachydactyly, short sture and moderate mental retardation due to a cryptic 6p;11q translocation, 2002, *Am J Med Genet*, 108:69-74

Merika M, Orkin SH: Functional surgery and physical interactions of the erythroid transcription factor gata-1 with the kruppel family proteins sp1 and eklf, 1995, *Mol Cell Biol*, 15:2437-2447

Mirza M, Hreisson J, Strand ML, Hovatta O, Soder O, Philipson L, Pettersson RF, Sollerbrant K: Coxsackievirus and adenovirusreceptor (CAR) is expressed in male germ cells and form a complex with the differentiation factor JAM-C in mouse testis, 2006, *Exp Cell Res*, 312:817-830

Moog-Lutz C, Cavé-Riant F, Guibal FC, Breau MA, Di Gioia Y, Courand PO, Cayre YE, Bourdoulous S, Lutz P: JAM-L, a novel protein with characteristics of a junctional adhesion molecule, is induced during diffentiation of myeloid leukemia cells, 2003, *Blood*, 102:3371-3378

Mori H, Hirabayashi S, Shirasawa M, Sugimura H, Hata Y: JAM4 enhances hepatocyte growthfactor-mediated branching and scattering of Madin-Darby canine kidney cells, 2004, *Genes Cells*, 9:811-819

Morris AP, Tawil A, Berkova Z, Wible L, Smith CW, Cunningham SA: Junctional Adhesion Molecules (JAMs) are differentially expressed in fibroblasts and co-localize with ZO-1 to adherens-like junctions, 2006, *Cell Commun Adhes*, 13:233-247

Muller WA: Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response, 2003, *Trends Immunol*, 24:327-334

Naik UP, Ehrlich YH, Kornecki E: Mechanisms of platelet activation by a stimulatory antibody: cross-linking of a novel platelet receptor for monoclonal antibody F11 with the FC gamma RII receptor, 1995, *Biochem J*, 310:155-162

Novagen (2003): Produktinformation pMLuc-3 AccepTor Vektor™

Osada H, Grutz G, Axelson H, Forster A, Rabbitts TH: Association of erythroid transcription factors: complexes involving the lim protein rbtn2 and the zinc-finger protein gata1, 1995, *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:9585-9589

Ostermann G, Weber KS, Zernecke A, Schroeder A, Weber C : JAM-1 is a ligand of the beta (2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes, 2002, *Nat Immunol*, 3:151-158

Ozaki H, Ishii K, Horiuchib H, Arai H, Kawamoto T, Okawa K, Iwamutsu A, Kita T: Cutting edge: Combined treatment of TNF-α and IFN-γ causes redistribution of junctional adhesion molecule in human endothelial cells, 1999, *J immunol*, 163:553-557

Palmeri D, van Zante A, Huang CC, Hemmerich S, Rosen SD: Vascular endothelial junction-associated molecule, a novel member of the immunglobulin superfamily, is localized to intercellular boundaries of endothelial cells, 2000, *J Biol Chem*, 275:19139-19145

Passier R, Mummery C: Cardiomyocyte differentiation from embryonic and adult stem cells, 2005, *Curr Opin Biotechnol*, 16:498-502

Phillips HM, Renforth GL, Spalluto C, Hearn T, Curtis AR, Craven L, Havarani B, Clement-Jones M, English C, Stumper O, Salmon T, Hutchinson S, Jackson MS, Wilson DI: Narrowing the critical region within 11q24-qter for Hypoplastic Left Heart and identification of a candidate gene, JAM3, expressed during cardiogenesis, 2002, *Genomics*, 79:475-478

Promega (1999): Produktinformation pGEM-T® Easy Vektor

Prota AE, Campbell JA, Schelling P, Forrest JC, Watson MJ, Peters TR, Aurrand-Lions M, Imhof BA, Dermody TS, Stehle T: Crystal structure of human junctional adhesion 1: implications for reovirus binding, 2003, *Proc Nat Acad Sci USA*, 100:5366-5371

Raslova H, Komura E, Le Couedic JP, Larbret F, Debili N, Feunteun J, Danos O, Albaqli O, Vainchenker W, Favier R: Fli-1 monoallelic expression combined with its hemizygous loss underlies Paris-Trousseau/Jacobsen thrombozytopenia, 2004, *J Clin Invest*, 114:77-84

Reed: www.fruitfly.org, letzter Zugriff 2002

Roh MH, Makarova O, Liu CJ, Shin K, Lee S, Laurinec S, Goyal M, Wiggins R, Margolis B: The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost, 2002, *J Cell Biol*, 157:161-172

Sachinidis A, Kolossov E, Fleischmann BK, Hescheler J: Generation of cardiomyocytes from embryonic stem cells experimental studies, 2002, *Herz*, 27:589-597

Sachinidis A, Fleischmann BK, Kolossov E, Wartenberg M, Sauer H, Hescheler J: Cardiac specific differentiation of mouse embryonic sterm cells, 2003, *Cardio Vasc Res*, 58:278-291

Sachs UJ, Chavakis T, Fung L, Lohrenz A, Bux J, Ruf A, Santoso S: Human alloantibody anti-Mart interferes with Mac-1 dependent leukocyte adhesion, 2004, *Blood*, 104:727-34

Santoso S, Lohmeyer J, Rennich H, Clementson KJ, Mueller-Eckhardt C: Platelet surface antigens: analysis by monoclonal antibodies, 1984, *Blut*, 48:161-170

Santoso S, Kalb R, Walka M, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C, Newman P: The human platelet alloantigen Br^a and Br^b are associated with a single amino acid polymorphism on glycoprotein Ia (integrin subunit α2), 1993, *J Clin Invest*, 92:2427-2432

Santoso S, Orlova VV, Song K, Sachs UJH, Andrei-Selmer CL, Chavakis T: The homophilic binding of junctional adhesion molecule-C mediates tumor cell-endothelial cell interactions, 2005, *J Biol Chem*, 280:36326-36333

Santoso S, Sachs UJH, Kroll H, Linder M, Ruf A, Preissner KL, Chavakis T: The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte Integrin Mac-1, 2002, *J Exp Med*, 196:679-691

Shivdasani RA: Lonely in Paris: when one gene copy isn`t enough, 2004, *J Clin Invest*, 114:17-19

Simon DI, Chen CP, Xu H, Li CQ, Dong JF, McIntire LV, Ballantyne CM, Zhang L, Furman MI, Berndt MC, Lopez JA: Platelet glycoprotein Ibα is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18), 2000, *J Exp Med*, 192:193-204

Simsek S, van der Schoot CE, Daams M, Huisekes E, Clay M, McCullough J, van Dalen C, Stroncek D, von dem Borne AE: Molecular characterization of antigenic polymorphisms (Ond^a and $Mart^a$) of the β2 family recognized by human leukocyte antisera, 1996, *Blood*, 88:1350-1358

Sobocka MB, Sobocki T, Babinska A, Hartwig JH, Li M, Ehrlich YH, Kornecki E: Signaling pathways of the F11 receptor (F11R; a.k.a. JAM-1, JAM-A) in human platelets: F11R dimerization, phosphorylation and complex formation with the integrin GPIIIa, 2004, *J Recept Transduct Res*, 24:85-105

Sobocka MB, Sobocki T, Bauerjee P, Weiss C, Rushbrook JI, Norni AJ, Hartwig J, Salifu MO, Markell MS, Babinska A, Ehrlich YH, Kornecki E: Cloning of the human platelet F11 receptor: a cell adhesion molecule member of the immunglobulin superfamily involved in platelet aggregation, 2000, *Blood*, 95:2600-2609

Songyang Z, Fanning AS, Fu C, Xu J, Marfatia SM, Chisti AH, Crompton A, Chan AC, Anderson JM, Cantley LC: Recognition of unique carboxy-terminal motifs by distinct PDZ domains, 1997, *Science*, 275:73-77

Springer TA: Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration, 1995, *Ann Rev Physiol*, 57:827-872

Tajima M, Hirabayashi S, Yao I, Shirasaura M, Osuga J, Ishibashi S, Fujita T, Hata Y: Roles of immunglobulin-like loops of junctional adhesion molecule 4; involvement in the subcellular localization and the cell adhesion, 2003, *Genes Cells*, 8:759-768

Takai Y, Nakanishi H: Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions, 2003, *J Cell Sci*, 116:17-27

Tsukita S, Furuse M, Itoh M: Multifunctional strands in tight junctions, 2001, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2:285-293

Van Geet C, Freson K: The production of platelets, Thrombosis fundamental and clinical aspects, 2003, *Leuven University Press*

Vonlaufen A, Aurrand-Lions M, Pastor C, Lamagna C, Hadenque A, Imhof B, Frossard JL: The role of junctional adhesion molecule-C (JAM-C) in acute pancreatitis, 2006, *J Pathol*, 209:540-548

Walters M, Martin DI: Functional erythroid promotors created by interaction of the transcription factor GATA-1 with CACCC and AP-1/NFE-2 elements, 1992, *Proc Nat Acad Sci USA*, 89:10444-10448

Wang F, Naik UP, Ehrlich YH, Osada S, Ohno S, Kornecki E: Stimulatory antibody induced activation and selective translocation of protein kinase C isoenzymes in human platelets, 1995, *Biochem J*, 311:401-406

Weiss MJ, Yu CN, Orkin SH: Erythroid-cell-specific properties of transcription factor GATA-1 revealed by phenotypic rescue of a gene-targeted cell-line, 1997, *Mol Cell Biol*, 17:1642-1651

Wenger SL, Grossfeld PD, Siu BL, Coad JE, Keller FG, Hummel M: Molecular characterization of a 11q intestinal deletion in a patient with the clinical features of Jacobsen syndrome, 2006, *Am J Med Genet A*, 140:704-708

Williams AF, Barclay AN: The Ig-superfamily-domains for cell surface recognition, 1988, *Ann Rev Immunol*, 6:381-405

Williams LA, Martin-Padua I, Dejana E, Hogg N, Simmons DL: Identification and characterisation of human Junctional Adhesion Molecule (JAM), 1999, *Mol Immunol*, 36:1175-1188

Yamamoto T, Harada N, Kano K, Taya S, Canaani E, Matsuura Y, Mizoguchi A, Ide C, Kaibuchi K: The Ras target AF-6 interacts with ZO-1 and serves as a peripheral component of tight junctions in epithelial cells, 1997, *J Cell Biol*, 139:785-795

Zen K, Babbin BA, Liu Y, Whelan JB, Nusrat A, Parkos CA: JAM-C is a component of desmosoms and a ligand for CD11b/CD18-mediated transepithelial migration, 2004, *Mol Biol Cell*, 15:3926-3937

Zen K, Liu Y, McCall IC, Wu T, Lee W, Babbin BA, Nusrat A, Parkos CA: Neutrophil migration across tight junctions is mediated by adhesive interactions between epithelial coxsackie and adenovirus receptor and a junctional adhesion molecule-like protein on neutrophils, 2005, *Mol Biol Cell*, 16:2694-2703

8 Danksagung

Sehr herzlich danken möchte ich meinem Betreuer, Herrn Dr. med. Ulrich Sachs, für die großzügige Überlassung des Themas, die vielen hilfreichen Diskussionen und letztendlich für die umsichtige Betreuung und Unterstützung während des Promotionsvorhabens.
Herrn Dr. rer. nat. Sentot Santoso möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen, da er einen großen Teil der molekularbiologischen Arbeit maßgeblich betreut hat. Er stand mir jederzeit als Ansprechpartner zur Verfügung, die vielen kritischen Diskussionen und Ratschläge haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Dem Leiter des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, Herrn Prof. Dr. med. Gregor Bein, danke ich für die immerwährende Unterstützung.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. med. Hartmut Kroll für seine immer währende Loyalität danken.

Ein besonderes Dankeschön gilt Frau Silke Werth und Frau Heike Berghöfer für ihre kompetente Einarbeitung und freundliche Unterstützung, da ohne ihre Hilfe die Durchführung zahlreicher Versuche nur schwer möglich gewesen wäre. Im gleichen Sinne danke ich Frau Olga Eva und Frau Uta Schellenberg, die mir bei den Sequenzierungen geholfen haben.

Allen Mitarbeitern und Mitdoktoranden danke ich an dieser Stelle für das schöne Arbeitsverhältnis, die gegenseitige Unterstützung und das nette menschliche Miteinander.

Zu guter Letzt natürlich ein herzlicher Dank an meine Eltern, Prof. Dr. Dr. Helge Böhnel und Dipl.-Psych. Elsbeth Böhnel-Rösch, die mir letztendlich das Studium und die Promotion ermöglichten und mir in jeder Lebenslage ein großer Rückhalt sind.

9 Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

10 Curriculum vitae

Ruth Kathrin Böhnel Birkenweg 2a
37120 Bovenden

Persönliche Angaben

Geburtsdatum	18.11.1980
Geburtsort:	Göttingen
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1987-1992	Freie Waldorfschule Göttingen
1992-2000	Europaschule Theodor-Heuss-Gymnasium Göttingen
2000	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Universitäre Ausbildung

2000-2005	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
2002	Ärztliche Vorprüfung Beginn der experimentellen Arbeiten am Institut für Klinische Immunologie und Transfusionmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
2003	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2005	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2005-2006	Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg
2005-2006	Praktisches Jahr 1. Tertial: Gynäkologie, Klinikum Kassel 2. Tertial: Innere Medizin, Deutsches-Rotes-Kreuz-Krankenhaus, Kassel 3. Tertial: Chirurgie, Deutsches-Rotes-Kreuz-Krankenhaus, Kassel
2006	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
18.11.2006	Approbation als Ärztin