

**Die Rolle von G_{12/13}-gekoppelter Signaltransduktion in Makrophagen und
ihre Bedeutung im murinen Immunsystem unter basalen Bedingungen
und bei Entzündungsprozessen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

Myriam Carola Grimm, geb. Jantzon

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2015

(D30)

vom Fachbereich 14 der

Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Michael Karas

Gutachter: Prof. Dr. Walter E. Müller

Prof. Dr. Nina Wettschureck

Datum der Disputation:

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Entwicklung und Funktion von Makrophagen im Immunsystem	1
1.1.1	Residente Gewebemakrophagen: Stabilisierung des Immunsystems und Initiator für Immunreaktionen.....	1
1.1.2	Aktivierung und Polarisierung von Makrophagen	4
1.2	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren im Immunsystem	4
1.2.1	G _{12/13} -gekoppelte Signalvermittlung im Immunsystem	7
1.2.1.1	Bedeutung von G _{12/13} für die Bewegung von Immunzellen	8
1.2.1.2	Modulation des Zytoskeletts von Immunzellen durch Rho-GTPasen	9
1.2.1.3	Bedeutung von G _{12/13} für die Transkription in Immunzellen.....	14
1.3	Makrophagen in der Entstehung und Progression von Atherosklerose	15
1.3.1	Rolle von Lymphozyten in der Entwicklung einer Atherosklerose.....	19
1.3.2	Strategien zur Therapie der Atherosklerose	20
2	Material	21
2.1	Puffer und Medien	31
2.1.1	Allgemein verwendete Puffer	31
2.1.2	Puffer für Western Blot.....	31
2.1.3	Puffer für die Zellkultur und Isolierung von primären Zellen.....	34
2.1.4	Medien für die Zellkultur	35
2.1.5	Lösungen zur Verwendung in der Histologie	35
3	Methoden	37
3.1	Mauslinien- und zucht.....	37
3.2	Tierhaltung	38
3.3	Tierexperimentelle Methoden	39
3.3.1	Gewinnung von Plasma aus Mausblut	39
3.3.2	Isolierung von Leukozyten aus murinem Vollblut.....	39
3.3.3	Isolierung von Leukozyten aus den Lymphknoten.....	39
3.3.4	Isolierung von Leukozyten aus der Lunge	40
3.3.5	Isolierung von Leukozyten aus der Milz	40
3.3.6	Isolierung von Makrophagen aus dem Peritoneum der Maus	40
3.3.7	Thioglycollat-induzierte Peritonitis	41

3.3.8	Gewinnung von peritonealer Flüssigkeit zur Kultivierung primärer Zellen.....	41
3.3.9	Transfer residenter peritonealer Zellen in atherosklerotische LDLR ^{-/-} Tiere.....	42
3.3.10	Rekrutierung fluoreszent markierter Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen.....	42
3.3.11	Isolierung atherosklerotischer muriner Aorten und Herzen.....	42
3.3.11.1	Präparation des Herzens	43
3.3.11.2	Präparation der Aorta.....	43
3.3.12	Isolierung von murinem Knochenmark zur Differenzierung in Makrophagen....	43
3.3.13	Induzierung von Schaumzellen aus Knochenmarksmakrophagen	44
3.4	Durchflusszytometrische Methoden	45
3.4.1	Bestimmung der Zellzahl in der Zählkammer nach Neubauer	45
3.4.2	Analyse und Sortierung von Leukozyten im Durchflußzytometer	46
3.4.3	Isolierung myeloider Blutzellen zur Sortierung am Durchflusszytometer	46
3.4.4	Isolierung residenter peritonealer Makrophagen zur Sortierung am Durchflusszytometer	48
3.4.5	Isolierung von myeloiden Zellen aus atherosklerotischen Plaques der Aorta	49
3.4.6	Anreicherung residenter peritonealer Makrophagen durch magnetische Zellsortierung (MACS)	50
3.4.7	Analyse der Produktion von TNF α in residenten peritonealen Makrophagen ...	51
3.4.8	Analyse der Morphologie primärer Zellen	51
3.4.9	2D Migration peritonealer Makrophagen (Videomikroskopie)	51
3.4.10	Einzelzell-Isolierung und Analyse residenter peritonealer Makrophagen	52
3.5	Histologische Methoden	54
3.5.1	Vorbereitung von Organen für Gefrierschnitte.....	54
3.5.2	Standard-Immunhistochemie an Gefrierschnitten (IHCfr).....	54
3.5.3	Oil-Red-O (ORO)-Färbung.....	55
3.5.3.1	Quantifizierung der ORO-Lipidfärbung.....	55
3.5.4	Nachweis natürlicher Antikörper (IgM) in der Aortenwurzel.....	56
3.6	Proteinbiochemische Methoden.....	56
3.6.1	ELISA	56
3.6.1.1	Bestimmung der Titer natürlicher Antikörper und oxidations-spezifischer Epitope im Maus-Plasma.....	56
3.6.1.2	IgM-Gesamtgehalt im Plasma	56

3.6.1.3	Analyse der Titer für IgG, MDA-LDL, CuOx-LDL und AB1-2 (anti-T15/E06) im Plasma	57
3.6.1.4	Bestimmung von aktiviertem RhoA/Rac1 im Lysat primärer Zellen	58
3.6.2	Bestimmung von Cholesterol in Plasma.....	58
3.6.3	Western Blot	59
3.6.4	Analyse von S1P mit LC-MS/MS	59
3.7	In vitro Methoden	60
3.7.1	Isolierung von RNA aus primären Mauszellen	60
3.7.2	Synthese von cDNA aus RNA.....	60
3.7.3	qRT-PCR.....	60
3.8	Statistik.....	62
4	Ziel der Arbeit.....	63
5	Ergebnisse	64
5.1	Bewertung der Lys-G α_{12} /G α_{13} .KO-Tiere	64
5.2	Beschreibung der Makrophagen-spezifischen Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Linie.....	64
5.3	Rekombinationseffizienz myeloider Zellen unter LysMCre-Aktivität	64
5.4	Makrophagen-spezifischer Verlust von G $\alpha_{12/13}$ führt zum Anstieg peritonealer Makrophagen	67
5.5	Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Tiere weisen erhöhte Zahl inflammatorischer peritonealer Makrophagen auf.....	69
5.6	Residente peritoneale Makrophagen des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO unterscheiden sich morphologisch und zytologisch von der Kontrolle	70
5.7	Makrophagen aus Knochenmark des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Linie zeigen auch morphologische und zytologische Besonderheiten.....	72
5.8	Reduzierte Beweglichkeit und Migration von Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Makrophagen des Peritoneums	74
5.9	Funktionelle Konsequenzen des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO: das angeborene Immunsystems bleibt intakt	75
5.10	Residente peritoneale Makrophagen in Lys-G α_{12} /G α_{13} .KO-Tieren exprimieren mehr inflammatorischer Gene	77
5.11	Knochenmarks-Makrophagen aus Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Tieren exprimieren auch verstärkt inflammatorische Gene	80
5.12	Mechanismus der G $\alpha_{12/13}$ -kontrollierten Expression inflammatorischer Gene in differenzierten Makrophagen	81
5.13	Untersuchung von G $\alpha_{12/13}$ -gekoppelten Rezeptoren in peritonealen Makrophagen ...	84

5.14	G _{12/13} -gekoppelter Rezeptor S1P ₂ reguliert die proinflammatorische Genaktivität in residenten peritonealen Makrophagen	85
5.15	Makrophagen dienen als S1P-Produzenten im Peritoneum	86
5.16	Erhöhte T- und B-Zellzahl im Peritoneum der Lys-Gα ₁₂ /Gα ₁₃ -KO-Tiere	87
5.17	Erhöhte B-Zellzahl im Peritoneum des Lys-Gα ₁₂ /Gα ₁₃ -KO führt zu erhöhten Konzentrationen natürlich produzierter Antikörper	88
5.17.1	Tiere mit Makrophagen-spezifischem Gα _{12/13} -KO sind vor Atherosklerose geschützt	91
5.17.2	Makrophagen aus der Aorta des Lys-Gα ₁₂ /Gα ₁₃ ;Ldlr ^{-/-} -KO exprimieren verstärkt antiinflammatorische Gene	93
5.17.3	Rekrutierung von Makrophagen des Lys-Gα ₁₂ /Gα ₁₃ -KO nicht verringert	95
5.17.4	Untersuchungen von Schaumzellen des Lys-Gα ₁₂ /Gα ₁₃ -KO	96
5.17.5	Natürliche Antikörper schützen Lys-Gα ₁₂ /Gα ₁₃ ;Ldlr ^{-/-} -KO vor Atherosklerose	98
5.17.6	Atherosklerose-Prävention von Ldlr ^{-/-} -KO-Tieren durch Therapie mit peritonealen Zellen	98
6	Diskussion	100
6.1	Regulation des Zytoskeletts in Makrophagen durch G _{12/13}	100
6.2	Verlust von Gα _{12/13} in Makrophagen führt zu veränderter Genexpression	101
6.3	Funktionelle Konsequenzen des Lys-Gα ₁₂ /Gα ₁₃ -KO in Makrophagen	106
6.3.1	Funktionelle Konsequenzen des Lys-Gα ₁₂ /Gα ₁₃ -KO für das Immunsystem	107
6.3.2	Lys-Gα ₁₂ /Gα ₁₃ -KO-Mäuse sind weniger anfällig für Atherosklerose	110
7	Zusammenfassung	114
8	Literatur	117
9	Anhang	131
9.1	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	131
9.2	Abbildungsverzeichnis	134
9.3	Publikationen	136
9.4	Danksagung	137
10	Lebenslauf	138

1 Einleitung

1.1 Entwicklung und Funktion von Makrophagen im Immunsystem

Als Zellen des angeborenen Immunsystems erfüllen Makrophagen eine Vielzahl von Funktionen. In erster Linie sind sie an der Abwehr von Pathogenen und der Initiierung einer adaptiven Immunantwort beteiligt (Murray und Wynn 2011). Bei genauerem Hinsehen aber wird deutlich, dass Makrophagen auch in anderen Prozessen von großer Bedeutung sind. Sie spielen während der Entwicklung des Organismus und in der Aufrechterhaltung der Homöostase in verschiedensten Geweben eine wichtige Rolle. Darüber hinaus sind Makrophagen an der Entstehung und Progression von Erkrankungen wie Atherosklerose und Multipler Sklerose beteiligt (Wynn, Chawla et al. 2013). Um unter physiologischen wie auch pathophysiologischen Bedingungen regulierend in das Immunsystem eingreifen zu können, haben Makrophagen eine enorme Diversität entwickelt. Diese sehr heterogene und plastische Population von Immunzellen (Gordon und Taylor 2005) entsteht aus Stammzellen im Rahmen der definitiven Hämatopoese (Uderhardt, Herrmann et al. 2012). Die Vorläuferzellen der Makrophagen, die Monozyten, existieren unter anderem im Knochenmark, im Blut und in der Milz (Geissmann, Manz et al. 2010). Von dort können sie sowohl zu Entzündungsherden als auch in naive Gewebe für die Differenzierung in residente Makrophagen rekrutiert werden (Geissmann, Jung et al. 2003). Inflammatorische Monozyten reifen zu Makrophagen heran, locken weitere Monozyten und neutrophile Granulozyten aus peripheren Organen und dem Blut an und treiben die Auflösung der Entzündung voran (Gordon und Taylor 2005).

1.1.1 Residente Gewebemakrophagen: Stabilisierung des Immunsystems und Initiator für Immunreaktionen

Zusätzlich zu rekrutierten Makrophagen, die aus Monozyten des Knochenmarks differenzieren, existiert eine weitere, ebenfalls sehr heterogene Population residenter Makrophagen: Diese Immunzellen haben ihren Ursprung jedoch in Stammzellen des embryonalen Dottersacks (Perdiguero, Klapproth et al. 2014). Aus diesen Vorläuferzellen entwickeln sich im sehr frühen Embryonalstadium direkt primitive

Makrophagen, die dann im Nervensystem, in der Haut, der Lunge und in serösen Organen wie dem Peritoneum sesshaft werden (Davies, Jenkins et al. 2013). Diese residenten Gewebemakrophagen können durch ein gewisses Maß an Selbsterneuerung weitgehend unabhängig vom Knochenmark und zirkulierenden Monozyten ihre Population aufrechterhalten (Nelson und Boyden 1963). Insbesondere nach akuten Entzündungen proliferieren residente Makrophagen stark und erhalten somit ihre Population im Gewebe aufrecht (Davies, Rosas et al. 2011). Ob residente Makrophagen sich jedoch auch aus Monozyten entwickeln können ist bisher ungeklärt. Ihre Eigenschaften und Aufgaben als Immunzellen sind sehr vom umgebenden Gewebe und der mikroanatomischen Nische abhängig (Dahlof 2010). So sind residente peritoneale Makrophagen (rpMP) im gesunden Bauchraum für die Stabilität des peritonealen Milieus zuständig. Um das zu gewährleisten, entfernen sie beispielsweise darin befindliche absterbende Zellen (Uderhardt, Herrmann et al. 2012). Werden die rpMP jedoch im Rahmen einer Peritonitis aktiviert, lösen sie zwar durch Erkennung von mikrobiellen Sequenzen die Immunantwort aus, ziehen sich dann aber in drainierende Lymphknoten zurück (Barth, Hendrzak et al. 1995) und zeigen verstärkte Adhärenz an mesothelialen Geweben wie dem Peritoneum selbst (Bellingan, Xu et al. 2002). Dieses als „disappearance reaction“ beschriebene Phänomen wurde erstmal durch Nelson und Boyden beschrieben (Nelson und Boyden 1963). Es führt dazu, dass sich rpMP im Verlauf einer Immunreaktion dort kaum aufhalten. Stattdessen befinden sich im Peritoneum zu diesem Zeitpunkt Makrophagen, die sich aus inflammatorischen Monozyten des Knochenmarks entwickeln. Deren Vorläuferzellen lassen sich durch die Existenz des entzündungsrelevanten Oberflächenmoleküls Ly6C im Peritoneum

Immungelöst ist, können auch rpMP dort wieder aufgefunden werden (Davies, Rosas et al. 2011). Dies ist vermutlich dadurch zu erklären, dass ihre Fähigkeit der Adhärenz nun reduziert ist. Die rpMP, die sich durch eine sehr starke Expression der Oberflächenmarker CD11b und F4/80 auszeichnen, lassen sich wieder zahlreich aus dem Peritoneum isolieren.

Die beschriebene Entwicklung und Funktion der verschiedenen Populationen von Makrophagen im Organismus ist in Abb. 1.1 zusammengefasst dargestellt.

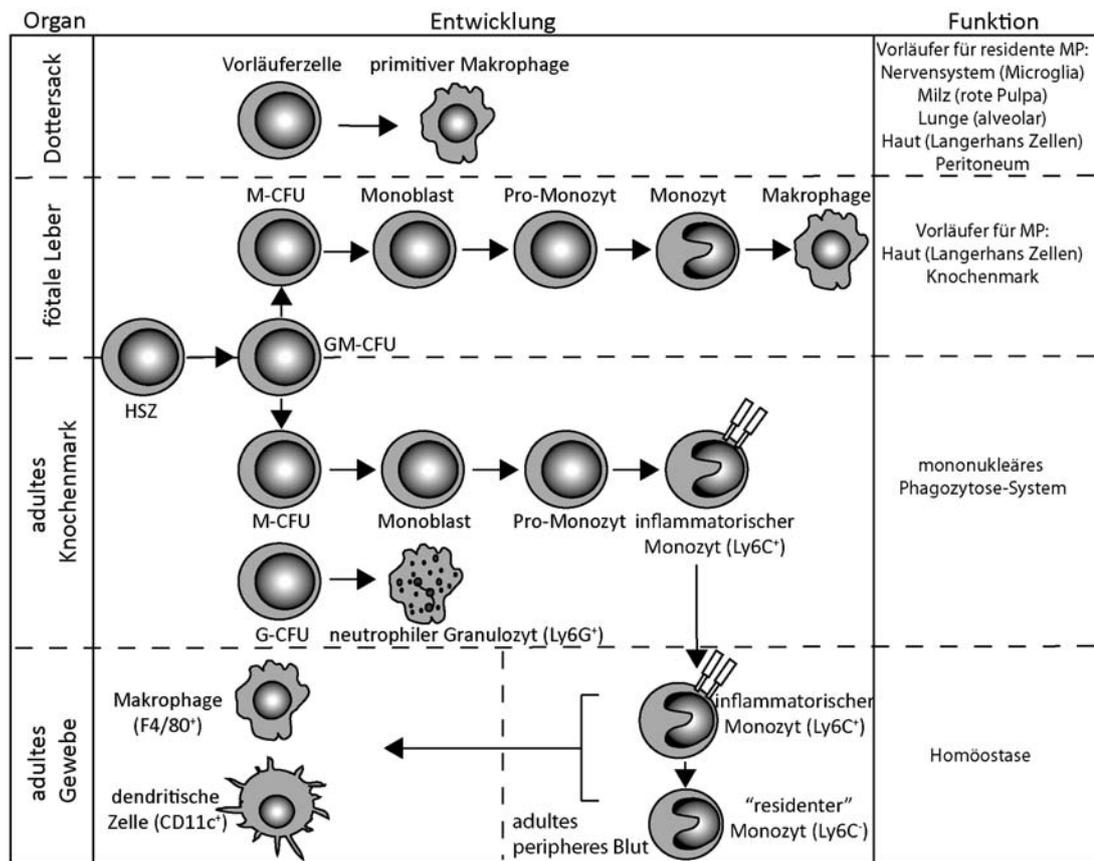


Abb. 1.1 Entwicklung und Funktion von Makrophagen im Immunsystem

In verschiedenen Organen entstehen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien aus hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) die Vorläuferzellen für die verschiedenen Populationen myeloider Zellen. Aus diesen so genannten „Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-formierenden Einheiten“ (GM-CFU) bilden sich dann „Makrophagen-Kolonie-formierende Einheiten“ (M-CFU) und „Granulozyten-Kolonie-formierende Einheiten“ (G-CFU). Daraus entwickeln sich in mehreren Schritten Monozyten und neutrophile Granulozyten. Die Monozyten können im Folgenden zu Makrophagen differenzieren. Abbildung ist modifiziert nach Gordon und Taylor 2005 sowie nach Davies, Jenkins et al. 2013.

1.1.2 Aktivierung und Polarisierung von Makrophagen

Die Plastizität von Makrophagen spiegelt sich in den verschiedensten Möglichkeiten der Aktivierung und der damit verbundenen Polarisierung wieder. Der Begriff der Aktivierung wurde durch Mackaness (Smith, Trogan et al. 1995) eingeführt. Später wurden die unterschiedlichen Phänotypen von Makrophagen in Zusammenhang mit der Produktion spezifischer Cytokine durch unterschiedlich aktivierte T-Lymphozyten gebracht (Febbraio, Podrez et al. 2000). So wurde eine Immunantwort als „Th1“ bezeichnet, wenn zuvor Makrophagen durch $\text{INF-}\gamma$ aus T_{H1} -Zellen aktiviert wurden. War die Immunantwort jedoch durch IL-4 aus T_{H2} -Zellen vermittelt, sprach man bei dieser Form der Immunreaktion von „Th2“ oder einer „alternativen“ Aktivierung (Zhu, Owen et al. 2010). Je nach Stimulus wurden in den Makrophagen charakteristische Marker bestimmt. So wurde bei „Th1“-assoziierten Makrophagen die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) (Bhatia, Yun et al. 2007) gemessen und in „Th2“-Makrophagen die Existenz von Arginase als Merkmal der Aktivierung nachgewiesen (Tabas 2010). Auf der Basis dieser Befunde entstanden die beiden Kategorien „M1“ und „M2“ der Polarisierung von Makrophagen (Swirski, Libby et al. 2007). Dieses Modell wurde von Mantovani et al. durch die Integration einer Vielzahl von Cytokinen als Stimulantien für Makrophagen erweitert (Mantovani, Sica et al. 2004). Diese Einteilungen beruhen überwiegend auf Erkenntnissen von *in vitro* differenzierten Makrophagen. Die Polarisierung von Makrophagen *in vivo* sollte jedoch als dynamisch angesehen werden, da im Organismus häufig unterschiedlich aktivierte Makrophagen in der gleichen Umgebung gemeinsam existieren (Sica und Mantovani 2012). Dadurch kann es zu einem fließenden Übergang zwischen den so genannten proinflammatorischen „M1“-Makrophagen und den als antiinflammatorisch bezeichneten „M2“-Makrophagen kommen.

1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren im Immunsystem

Bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) handelt es sich um ubiquitär exprimierte transmembrane Rezeptoren, die in allen Zellen des Säugerorganismus sowohl in physiologische als auch in pathophysiologische Prozesse involviert sind.

Viele dieser Rezeptoren sind für die Wahrnehmung und Verarbeitung sensorischer Informationen verantwortlich. Andere GPCR haben wichtige Funktionen im Nervensystem, bei Stoffwechselprozessen und beeinflussen die Zellen in ihrer Entwicklung (Wettschureck und Offermanns 2005). Auch im Immunsystem ist eine Vielzahl von GPCR exprimiert. Deren wesentliche Aufgabe ist hier, die verschiedenen Populationen von Leukozyten und Lymphozyten zu dirigieren. Die im Immunsystem vorhandenen GPCR reagieren auf Signale von Chemokinen (Graler und Goetzl 2002, Olson und Ley 2002) und Lysophospholipiden (Graler und Goetzl 2002). Auch Substanzen wie Leukotriene und Katecholamine, die im Rahmen von entzündlichen Reaktionen im Organismus freigesetzt werden, können GPCR stimulieren (Lombardi, Kavelaars et al. 2002). Für viele GPCR ist der funktionelle endogene Ligand jedoch nach wie vor unbekannt.

Bei der Signaltransduktion über GPCR handelt es sich um ein vielseitiges und komplexes System (Wettschureck und Offermanns 2005). Die wesentlichen Module darin sind Rezeptor, heterotrimeres G-Protein und Effektor (Abb. 1.2). Die Bindung eines geeigneten Liganden an einen GPCR führt zur Aktivierung von mindestens einem G-Protein. Diese sind aus 3 verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt. Die α -Untereinheit, die im inaktiven Zustand Guanosindiphosphat (GDP) bindet, ist mit einem Komplex aus einer β - und γ -Untereinheit zu einem heterotrimeren G-Protein assoziiert. Durch die Interaktion des GPCRs mit einem G-Protein kommt es an der α -Untereinheit des G-Proteins zum Austausch des GDP gegen Guanosintriphosphat (GTP). Die nun aktivierte, an GTP-gebundene α -Untereinheit dissoziiert vom Rezeptor und verliert darüber hinaus ihren Kontakt zum $\beta\gamma$ -Komplex. Sowohl die α -Untereinheit als auch der Komplex aus β - und γ -Untereinheit können nun unabhängig voneinander untergeordnete Effektormoleküle beeinflussen.

Sobald das Molekül GTP durch die GTPase-Aktivität der aktivierten α -Untereinheit wieder in GDP hydrolysiert wird, endet die Signalweiterleitung. Eine Verstärkung dieser enzymatischen Aktivität können so genannte „regulators of G- protein signaling“ (RGS) erzielen (Hollinger und Hepler 2002). Die Aktivität von RGS-Proteinen kann also die

Transduktion von G-Protein-gekoppelten Signalwegen frühzeitig terminieren. Die inaktive GDP-gebundene α -Untereinheit formiert sich daraufhin gemeinsam mit dem $\beta\gamma$ -Komplex wieder zu einem heterotrimeren G-Protein wie vor der Aktivierung des GPCRs durch einen Liganden (Abb. 1.2).

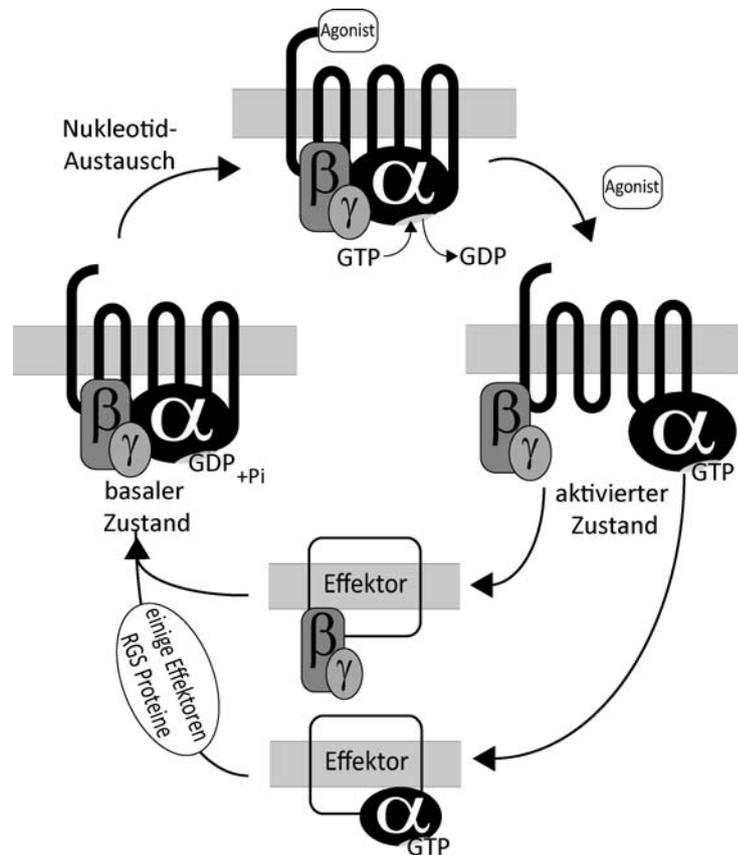


Abb. 1.2 Prinzip der G-Protein-gekoppelten Signaltransduktion

Durch die Bindung eines geeigneten Liganden an die transmembrane Domäne des G-Protein-gekoppelten Rezeptors kommt es an der α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins zum Austausch von GDP gegen GTP. Dadurch wird die Untereinheit in den aktivierten Zustand überführt. GTP-G α und G $\beta\gamma$ dissoziieren und modulieren die Funktion untergeordneter Effektormoleküle. Nach der Hydrolyse von GTP, die von sogenannten RGS-Proteinen beschleunigt werden kann, formieren sich die Untereinheiten des G-Proteins wieder im ursprünglichen Zustand. Abbildung ist modifiziert nach Wettschureck & Offermanns 2005.

Neben dieser G-Protein-abhängigen Steuerung der Signalweiterleitung können auch G-Protein-unabhängige Mechanismen die Signaltransduktion regulieren. Diese greifen ein, um bei einer dauerhaft hohen Konzentration von Agonisten eine Überaktivität der

GPCR zu verhindern. Bereits kurz nach der Bindung eines Liganden wird der Rezeptor von GPCR-Kinasen (GRK) am cytoplasmatischen Bereich des Rezeptors phosphoryliert. Daraufhin kann das ubiquitär exprimierte Molekül β -Arrestin an den Rezeptor binden (Luttrell und Lefkowitz 2002). Dadurch wird der Prozess der Internalisierung des Rezeptors durch Endozytose eingeleitet. Im Folgenden wird der Rezeptor dann entweder wieder in die Zellmembran integriert oder vollständig abgebaut (Pierce und Lefkowitz 2001). Durch die Regulation der Dichte von GPCR kann die G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion effizient gesteuert und die Entwicklung von Toleranzmechanismen verhindert werden.

Die grundlegende Funktion eines G-Proteins wird durch die α -Untereinheit definiert. Man unterscheidet 4 verschiedene Familien von G-Proteinen: G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ und $G_{12/13}$. Ihre α -Untereinheiten werden entsprechend als $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_{12/13}$ bezeichnet. Viele Chemokine im Immunsystem binden überwiegend an GPCR, die an G-Proteine der Familie G_i gekoppelt sind (Kunkel und Butcher 2002). Die so von Chemokinen vermittelten Signale gewährleisten, dass Lymphozyten und Leukozyten gezielt zu Entzündungsherden oder lymphatischen Organen migrieren können (Spangrude, Sacchi et al. 1985). Neben dieser essentiellen Rolle der G_i -vermittelten Signaltransduktion spielen aber auch $G_{12/13}$ -vermittelte Effekte eine wichtige Rolle in der Regulation von Immunzellen.

1.2.1 $G_{12/13}$ -gekoppelte Signalvermittlung im Immunsystem

Die G-Protein-Familie $G_{12/13}$ besteht aus den beiden G-Proteinen G_{12} und G_{13} und ist ubiquitär im Organismus exprimiert. G-Proteine innerhalb einer Familie zeichnen sich häufig durch strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten aus. Die α -Untereinheiten der G-Proteine G_{12} und G_{13} , $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$, stimmen zu 67% in ihrer Aminosäuresequenz überein (Wettschureck und Offermanns 2005). Es ist bekannt, dass G-Proteine von GPCR stimuliert werden können, die unterschiedlich gekoppelt sind. So werden die G-Proteine G_{12} und G_{13} häufig von Rezeptoren stimuliert, die auch an die G-Proteine G_q und G_{11} gekoppelt sind (Dhanasekaran und Dermott 1996). Das Molekül Sphingosin-1-Phosphat (S1P) kann durch Bindung an den Rezeptoren $S1P_{1-5}$ zur Aktivierung der G-

Proteine G_{12} und G_{13} , aber auch von G_q und G_i führen (Takabe, Paugh et al. 2008). Auch die Lysophosphatidsäure (LPA), ein gut untersuchter Agonist an den $G_{12/13}$ -gekoppelten Rezeptoren LPA_{1+2} , kann Signale über die G-Proteine G_q und G_i weiterleiten (Chun, Goetzl et al. 2002).

Im Rahmen der $G_{12/13}$ -gekoppelten Signaltransduktion kann eine Vielzahl von physiologischen Prozessen reguliert werden. $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ können in die Funktion von Cadherinen eingreifen und so den Kontakt von benachbarten Zellen eines Gewebes verändern (Meigs, Fedor-Chaikin et al. 2002). Außerdem wurde beschrieben, dass die Signalweiterleitung über $G_{12/13}$ zur Aktivierung von Ionenkanälen, Enzymen und Hitzeschockproteinen führen kann (Kurose 2003). Darüber hinaus spielt $G_{12/13}$ eine wichtige Rolle in der Steuerung von Phagozytose und Sekretion von Immunzellen (Etienne-Manneville und Hall 2002). Immer größer scheint auch die Bedeutung von $G_{12/13}$ in Bezug auf nukleäre Signalprozesse zu werden. Für verschiedene Zelltypen konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung von $G_{12/13}$ -gekoppelten Rezeptoren zur Regulation der Genexpression führen kann (Brown, Del Re et al. 2006). Die wichtigste Funktion von $G_{12/13}$ stellt jedoch die Regulation des Zytoskeletts dar. Insbesondere für Zellen des Immunsystems ist die Steuerung von Adhäsion, Polarisierung und Migration essentiell (Laudanna, Campbell et al. 1996).

1.2.1.1 Bedeutung von $G_{12/13}$ für die Bewegung von Immunzellen

Das wichtigste Effektormolekül von $G_{12/13}$ für die Regulation des Zytoskeletts ist die kleine GTPase RhoA (Buhl, Johnson et al. 1995). Die Aktivierung von RhoA durch die α -Untereinheiten $G\alpha_{12/13}$ wird durch Rho-spezifische Guaninnukleotidaustauschfaktoren (RhoGEF) vermittelt (Fukuhara, Chikumi et al. 2001). Im Säugerorganismus zählen zu diesen RhoGEF-Proteinen die Faktoren PDZ-RhoGEF und LARG („leukaemia-associated RhoGEF“). $G\alpha_{13}$ stimuliert zusätzlich noch ein weiteres RhoGEF, das Protein p115-RhoGEF (Worzfeld, Wettschreck et al. 2008). Alle RhoGEF Proteine tragen eine RGS-Domäne und können somit in die G-Protein-vermittelte Signalweiterleitung eingreifen.

Ein zellspezifischer Verlust der beiden Untereinheiten $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ in B- und T-Lymphozyten verändert deren Polarisierung und Wanderungsverhalten (Rieken,

Sassmann et al. 2006, Herroeder, Reichardt et al. 2009). Auch in neutrophilen Granulozyten trägt die $G_{12/13}$ -vermittelte Signalkaskade zur gerichteten Fortbewegung bei. Die Aktivierung von $G_{12/13}$ hilft diesen Zellen eine Orientierung in eine dem Signalmolekül abgewandte Richtung zu finden (Xu, Wang et al. 2003). Diese Strukturveränderungen der Zellen gehen wesentlich mit der Organisation des Zytoskeletts einher. Für Makrophagen gibt es jedoch keine konkreten Daten zur Bedeutung der G-Proteine $G_{12/13}$ und ihrer Signalweiterleitung. Bisher wurde nur die Rolle des Effektors RhoA in Makrophagen untersucht. Die Behandlung von differenzierten Makrophagen mit dem Toxin C3-Exoenzym aus *Clostridium botulinum*, einem RhoA Inhibitor, kann die Transmigration der Leukozyten durch Endothelzellen unterbinden (Worthylake, Lemoine et al. 2001). Die so genannte Fähigkeit zur „tail retraction“ ist durch das C3-Exoenzym massiv eingeschränkt. Die Makrophagen können ihre Filopodien auf Grund von gesteigerter Adhäsion nicht mehr lösen. Diese Befunde konnten mit Hilfe von dominant überexprimiertem RhoA in Makrophagen bestätigt werden (Honing, van den Berg et al. 2004). Die Zellen, die übermäßig viel RhoA produzieren, weisen eine verstärkte Migration durch Endothelzellen auf. Diese Untersuchungen zeigen, wie essentiell RhoA für die normale Funktion der Immunzellen ist. Die Aktivierung der GTPase RhoA kann neben $G_{12/13}$ aber auch durch zahlreiche andere Signalwege erfolgen (Buchsbaum 2007). So führt beispielsweise die Bindung des Semaphorins A39R an das Plexin C1 in dendritischen Zellen zur Aktivierung von RhoA (Kruger, Aurandt et al. 2005). Dadurch verändert sich das Migrationsverhalten dieser Immunzellen. Auch Integrine können die Aktivität von RhoA regulieren und so in die Struktur des Zytoskeletts eingreifen (Gakidis, Cullere et al. 2004). Die Bedeutung von $G_{12/13}$ -vermittelter Aktivierung von RhoA für diese Prozesse in Makrophagen ist bisher unklar.

1.2.1.2 Modulation des Zytoskeletts von Immunzellen durch Rho-GTPasen

Die GTPase RhoA gehört zur Rho-Familie der monomeren Guaninnukleotid-bindenden Proteine (Rho-GTPase). Dieser Proteingruppe gehören neben den zwei weiteren Isoformen RhoB und RhoC auch die GTPasen Rac1, Rac2 und Cdc42 an. Im inaktivierten Zustand binden Rho-GTPasen an ein Molekül GDP. Mit Hilfe von RhoGEF wird das GDP

gegen ein Molekül GTP ausgetauscht, was die Rho-GTPase in den aktivierten Zustand überführt. Am Beispiel des p115-RhoGEF konnte dieser Mechanismus im Rahmen der $G_{12/13}$ -vermittelten Signalweiterleitung bewiesen werden (Hart, Jiang et al. 1998). Um das Zytoskelett gezielt modulieren zu können, interagieren die Rho-GTPasen mit untergeordneten Effektormolekülen. So phosphoryliert RhoA die Rho-Kinase (ROCK) und steuert damit die Kontraktionsfähigkeit von Zellen (Abb. 1.3). Aktiviertes ROCK hemmt dann das Enzym „myosin light chain phosphatase“ (MLCP). Dadurch wird die Phosphorylierung der Myosinketten gefördert. Durch die vermehrte Phosphorylierung des Myosins kommt es zur vermehrten Bindung an Aktin-Filamente, was eine verstärkte Kontraktion des Zytoskeletts zur Folge hat (Kimura, Ito et al. 1996). ROCK kann durch eine Aktivierung der „myosin light chain kinase“ (MLCK) auch direkt die Myosinaktivität beeinflussen (Amano, Ito et al. 1996). Durch die Hemmung von ROCK mit der Substanz Y27632 konnte gezeigt werden, dass auch in Leukozyten die Signaltransduktion von $G_{12/13}$ über RhoA zum untergeordneten Effektorprotein ROCK stattfindet (Worthylake, Lemoine et al. 2001). Ist das Gleichgewicht zwischen $G_{12/13}$, RhoGEFs und RhoA jedoch gestört, hat dies insbesondere im Immunsystem schwerwiegende Folgen. Dies haben Untersuchungen am p115-RhoGEF, das ausschließlich in hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird, gezeigt. Lymphozyten von Mäusen, denen p115-RhoGEF fehlt, weisen eine verringerte Proliferation sowie eine reduzierte Beweglichkeit auf (Girkontaite, Missy et al. 2001). Auch in neutrophilen Granulozyten konnte die Bedeutung von p115-RhoGEF für eine funktionierende Migration und Adhäsion nachgewiesen werden (Francis, Shen et al. 2006). Die Aktivierung des RhoA-Effektors ROCK kann neben der Hemmung der MLCP auch zur Stimulation der LIM-Kinase (LIMK) führen (Maekawa, Ishizaki et al. 1999). Dieses Enzym hemmt wiederum Cofilin und somit den Abbau von Aktinfilamenten (Abb. 1.3). Dadurch kann ein kontrahiertes Zytoskelett zusätzlich stabilisiert werden (Burrige und Wennerberg 2004). RhoA kann aber auch über die Stimulation des „mammalian homolog of diaphanous“ (mDia) in die Organisation des Zytoskeletts eingreifen (Watanabe, Kato et al. 1999). Dieses Protein, das zur Familie der Formine

gehört, fördert die direkte Polymersierung von Aktin und ist ebenfalls maßgeblich an der Kontraktion von Zellen beteiligt (Li und Higgs 2003).

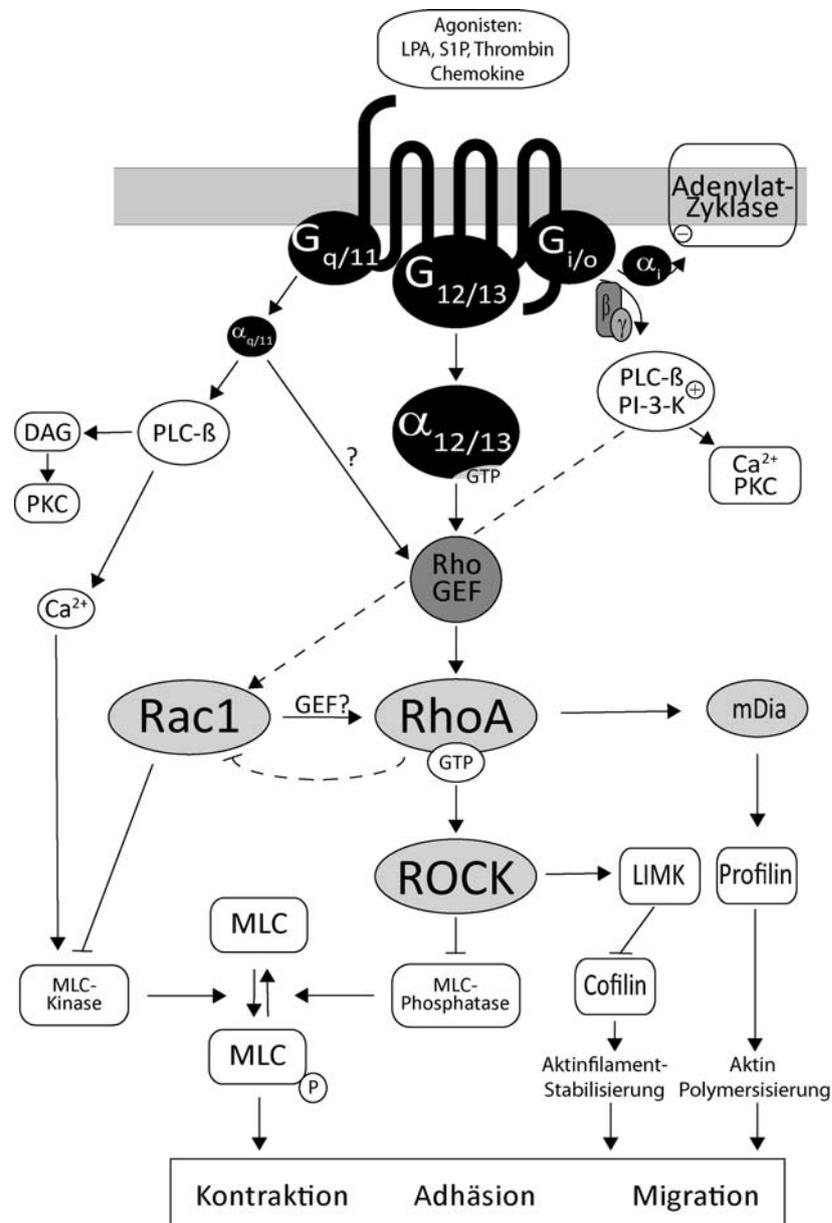


Abb. 1.3 Regulation des Zytoskeletts durch $G_{12/13}$ -gekoppelte Signaltransduktion und Interaktion zu $G_{q/11}$ - und $G_{i/o}$ -gekoppelter Signalweiterleitung

Durch die Bindung eines für $G_{12/13}$ -gekoppelte Rezeptoren spezifischen Agonisten an die transmembrane Domäne des GPCRs kann die aktivierte α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins das zentrale Effektormolekül RhoA aktivieren. Viele $G_{12/13}$ -gekoppelte Rezeptoren können ihre Signale auch über $G_{q/11}$ -sowie über $G_{i/o}$ -gekoppelte Rezeptoren weiterleiten. RhoA kann durch die Interaktion der G-Protein-gekoppelten Signalvermittlung

reguliert werden und so die Struktur des Zytoskeletts, die Adhäsion und Migration der Zellen beeinflussen. Abbildung ist modifiziert nach Wettschureck & Offermanns 2005 und Worzfeld, Wettschureck et al. 2008.

Auch die Rho-GTPase Rac spielt in der Regulation des Zytoskeletts eine wichtige Rolle. Im Immunsystem sind von diesem Effektormolekül die Isoformen Rac1 und Rac2 exprimiert (Etienne-Manneville und Hall 2002). Rac kann durch die Aktivierung der untergeordneten Proteine PAK („p21-activated kinase“), mDia2 und des so genannten ARP2/3-Komplexes („actin-related protein-2/3 complex“) die Polymerisierung von Aktin in der Zelle fördern (Heasman und Ridley 2008). Damit trägt es dazu bei, dass sich am vorderen Rand von migrierenden Leukozyten dünne, blattförmige Zell- ausstülpungen, so genannte Lamellipodien, ausbilden (Ridley und Hall 1992). Die Bedeutung von Rac1 für die Polarisierung in Richtung eines Lockstoffes konnte in Studien an neutrophilen Granulozyten bewiesen werden (Sun, Downey et al. 2004). Für Makrophagen scheint Rac1 zwar wichtig für die Bildung von Lamellipodien zu sein, stellt aber keinen essentiellen Faktor für ein normales Migrationsverhalten dar (Wells, Walmsley et al. 2004). Mit Hilfe von Rac1 werden also die Zellmorphologie und die Orientierung myeloider Zellen reguliert (Wheeler, Wells et al. 2006).

Immunzellen können gezielt zu Entzündungsherden migrieren. Diese chemotaktischen Eigenschaften werden auch von der Rho-GTPase Cdc42 („cell division control protein 42 homolog“) kontrolliert. Sie stimuliert die Bildung von dünnen, aktinreichen Zellfortsätzen, den so genannten Filopodien (Kozma, Ahmed et al. 1995). Vermutlich wird dieser Prozess durch die Aktivierung der Proteine WASP („Wiskott-Aldrich syndrome protein“) und IRSp53 („insulin rezeptor substrate p53“) reguliert (Krugmann, Jordens et al. 2001). Dadurch kann wiederum der ARP2/3-Komplex stimuliert werden und für die Polymersisierung von Aktin sorgen (Eden, Rohatgi et al. 2002). Filopodien entstehen vorwiegend am vorderen Rand einer migrierenden Zelle. Sie unterstützen die Immunzellen dabei, ihre Umgebung zu erkunden (Heasman und Ridley 2008). Als Reaktion auf externe Stimulantien können Zellen dann ihre Orientierung verändern. Auch in diesem Prozess spielt die Rho-GTPase Cdc42 eine wesentliche Rolle. Sie kann durch die Stimulation der Proteine PAR3 und PAR6 („partitioning-defective-3/6“) sowie

der atypischen Proteinkinase C (α PKC) die Polarität der Zellen beeinflussen (Macara 2004). In Monozyten und Makrophagen konnte gezeigt werden, dass die Rho-GTPase Cdc42 essentiell für die Chemokin-abhängige Transmigration ist (Weber, Klickstein et al. 1998).

Nur durch die Koordination der verschiedenen Rho-GTPasen kann das Zytoskelett von Immunzellen effizient moduliert werden. Dabei spielt die Interaktion der Mitglieder der Rho-Familie eine wichtige Rolle für die Aktivität der Zellen und die Weiterleitung von Signalen in den Zellen (Guilluy, Garcia-Mata et al. 2011). So haben besonders die beiden Rho-GTPasen RhoA und Rac1 ein antagonistisches Verhältnis zueinander. In Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass Rac1 nicht nur einen direkten inhibierenden Effekt auf RhoA hat, sondern auch die Rho-vermittelte Signaltransduktion negativ beeinflusst (Sander, ten Klooster et al. 1999). Außerdem ergibt sich aus dieser Untersuchung, dass RhoA auch Rac1 regulieren kann. In einer Studie an HeLa-Zellen wurde ein möglicher Mechanismus des inhibierenden Effekts von Rac1 auf RhoA beschrieben (Nimnual, Taylor et al. 2003). Darin konnte gezeigt werden, dass Rac1 die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) verursacht. Damit führt es zur Aktivierung von p190RhoGAP. Dieses Effektormolekül kann im Folgenden direkt die kleine GTPase RhoA inhibieren. Ein ähnliches Modell des Antagonismus zwischen RhoA und Rac1 wurde in neutrophilen Granulozyten entwickelt (Xu, Wang et al. 2003). Die Aktivierung von GPCR führt in diesen Zellen zur Aktivierung unterschiedlicher G-Proteine. Am vorderen Rand der Zellen, der in Richtung Chemokin weist, werden über eine G_i -gekoppelte Signalweiterleitung Rac und Cdc42 aktiviert. Es kommt zur Bildung von Aktinpolymeren, die wichtige Bestandteile von Zellfortsätzen sind. Darüber hinaus wird durch die beiden aktivierten GTPasen Rac1 und Cdc42 an der Zellfront RhoA inhibiert (Guilluy, Garcia-Mata et al. 2011). Im Gegensatz dazu wird am hinteren Rand der Zellen die Aktivierung von RhoA über $G_{12/13}$ gefördert. Es bilden sich kontraktile Einheiten aus Aktin und Myosin. Diese tragen zur Fähigkeit der so genannten „tail retraction“ der Leukozyten bei (Guilluy, Garcia-Mata et al. 2011). Hier kann RhoA wiederum durch die Stimulation von ROCK die GTPase Rac1 inhibieren. Dadurch wird die Bildung unzweckmäßiger Zellfortsätze unterdrückt (Ohta, Hartwig et al. 2006).

Durch dieses ausbalancierte Zusammenspiel der GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 wird gewährleistet, dass die Zellen des Immunsystems adäquat adherieren, polarisieren und migrieren können.

1.2.1.3 Bedeutung von G_{12/13} für die Transkription in Immunzellen

Neben der essentiellen Funktion von G_{12/13} in der Regulierung des Zytoskeletts gibt es eine immer stärkere Evidenz für eine ebenso essentielle Bedeutung in der Steuerung transkriptioneller Prozesse. In glatten Muskelzellen des Gefäßsystems kann G_{12/13} den muskelspezifischen Transkriptionsfaktor SRF („serum response factor“) regulieren (Althoff, Albarran Juarez et al. 2012). In Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass G_{12/13} und das Effektormolekül RhoA positiv in die Regulation der „Nuclear factor kappa B“ (NF-κB)-abhängigen Genexpression eingreifen können (Sivaraj, Takefuji et al. 2013). Auch für Immunzellen wurde nachgewiesen, dass RhoA darin die Genexpression durch NF-κB beeinflussen kann. RhoA phosphoryliert das inhibitorische Protein für NF-κB (IκB) und macht damit den Transfer von NF-κB in den Kern und somit die Genexpression möglich (Barroga, Stevenson et al. 1995). In humanen neutrophilen Granulozyten wurde jedoch ein hemmender Effekt von RhoA auf die Induktion der Produktion von Chemokinen durch NF-κB gefunden (Fessler, Arndt et al. 2007). Die Rolle von G_{12/13} bei der Vermittlung dieses RhoA-vermittelten Prozesses ist nicht geklärt. Durch die Regulation der Genexpression durch G_{12/13} kann auch die Proliferation von Zellen beeinflusst werden. G_{12/13} wurde daher schon mehrfach mit der Entstehung von Tumoren assoziiert (Xu, Voyno-Yasenetskaya et al. 1994). In B-Zellen konnte gezeigt werden, dass der G_{12/13}-gekoppelte Rezeptor S1P₂ für das Wachstum und die Verteilung der Leukozyten im Lymphknoten verantwortlich ist (Muppidi, Schmitz et al. 2014). Mutationen in den Genen, die für Gα₁₃ oder für S1P₂ codieren, führen zu massiven B-Zell-Lymphomen.

Eine Vielzahl von Analysen zur G_{12/13}-gekoppelten Signaltransduktion konnte in den verschiedenen Immunzell-Populationen bereits wichtige Prozesse aufklären. Dennoch gibt es in diesem komplexen System der zellulären Kommunikation noch offene

Fragen. Bei der Beantwortung dieser Fragestellungen ist es besonders wichtig, immer auch den physiologischen Kontext mit einzubeziehen.

1.3 Makrophagen in der Entstehung und Progression von Atherosklerose

Bei der Atherosklerose handelt es sich um eine Erkrankung des Gefäßsystems. Sie entwickelt sich durch eine gestörte Balance des Fettstoffwechsels und durch eine dadurch ausgelöste Immunantwort. Die entstehende chronische Entzündung führt unter anderem zur Ausbildung von atherosklerotischen Plaques in Arterien. Diese Plaques verengen und versteifen die Gefäße und schränken somit nicht nur die Blutversorgung in der Peripherie sondern auch die Regulierbarkeit des Blutflusses ein. Außerdem sind die Gefäße, die atherosklerotische Läsionen enthalten, besonders anfällig für Verletzungen und die Entwicklung von Thromben. Dadurch kann es zu massiven Beschwerden des Herz-Kreislauf-Systems wie Angiopathien, Infarkten und Embolien kommen. Die Atherosklerose stellt als Herz-Kreislauf-Erkrankung eine der vorherrschenden Todesursachen in Industrieländern dar (Dahlof 2010).

Eine wesentliche Rolle in der Entstehung und fortschreitenden Entwicklung der Atherosklerose spielen die Zellen des angeborenen Immunsystems. Insbesondere tragen die verschiedenen Populationen von Makrophagen zum charakteristischen Krankheitsbild bei, wie in Abb. 1.4 als Übersicht dargestellt ist. Eine existierende Hypercholesterolämie, also eine erhöhte Konzentration von Cholesterol im Blut, führt zum einen zur verstärkten Proliferation hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark (Yvan-Charvet, Welch et al. 2008). Die Folge ist eine Monozytose. Zum anderen werden vermehrt Partikel, die das Cholesterol transportieren, gebildet. Dabei handelt es sich beispielsweise um „low density Lipoproteine“ (LDL). Diese LDL-Proteine können durch aktivierte Endothelzellen, die das Gefäß auskleiden, in den Bereich der Intima dringen. Dort unterliegen sie häufig oxidativen Prozessen (Skalen, Gustafsson et al. 2002). Es entstehen dabei neben „oxidiertem LDL“ (oxLDL) auch andere Oxidationsprodukte (Yla-Herttuala, Palinski et al. 1989).

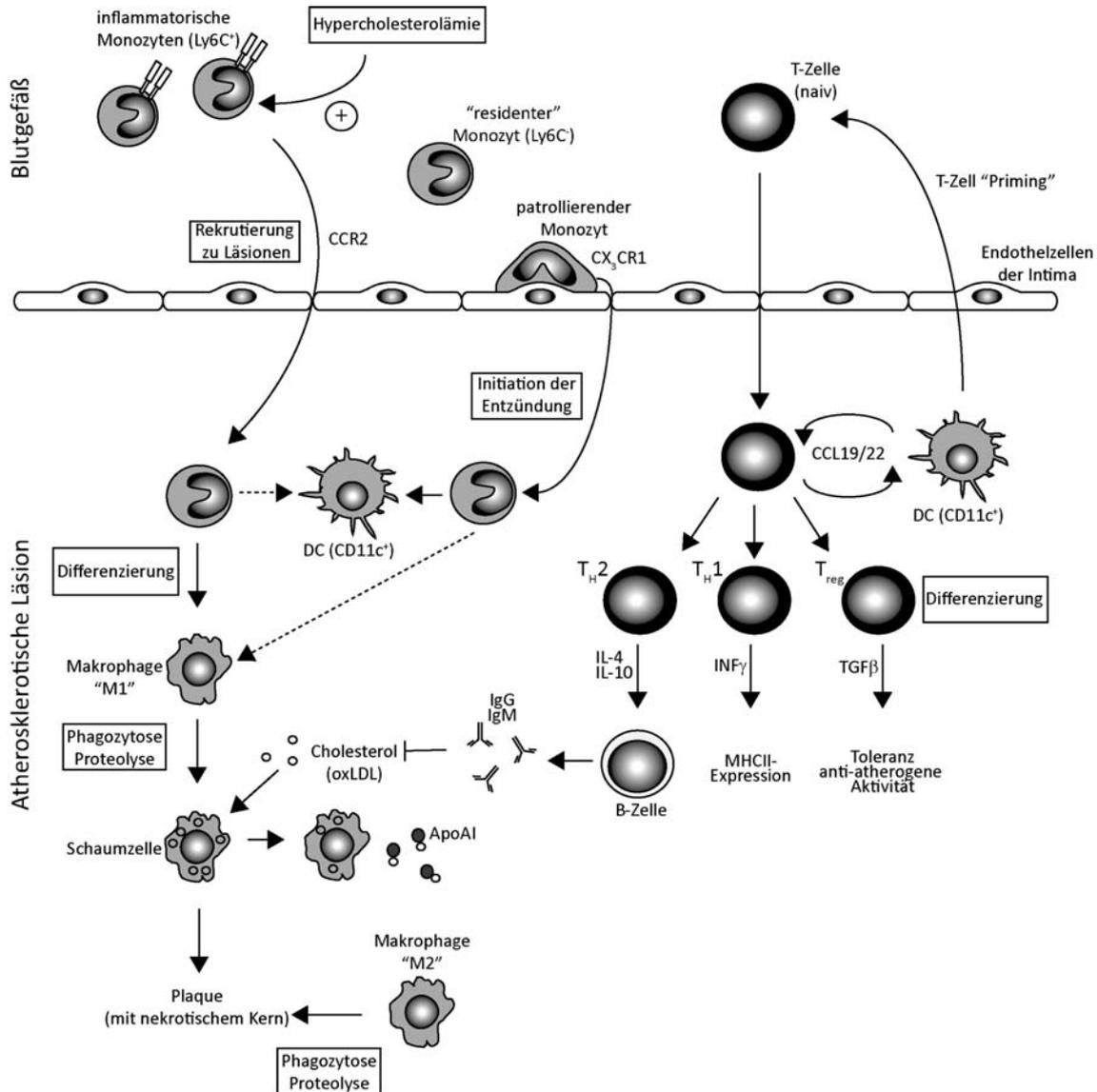


Abb. 1.4 Bedeutung verschiedener Immunzellen bei der Entstehung einer Atherosklerose

Ein erhöhter Spiegel von Cholesterin im Blut fördert die Entstehung einer Atherosklerose. Die Zellen des angeborenen Immunsystems (Monozyten, Makrophagen) und die Zellen des erworbenen Immunsystems (T- und B-Zellen) tragen zu der Entwicklung und Progression der Atherosklerose bei. Inflammatorische Monozyten (Ly6C⁺) werden durch die Intima in das Gefäß zu atheroskleroseanfälligen Regionen gelockt. Dort differenzieren sie zu Makrophagen und bilden durch die Aufnahme von Cholesterin die charakteristischen Schaumzellen. Durch die entstehende Entzündung werden wichtige Chemokine aktivierter T-Zellen freigesetzt, die wiederum zur Aktivierung von B-Zellen führen oder zur Entwicklung einer immunologischen Toleranz beitragen. Abbildung ist modifiziert (Weber, Zerneck et al. 2008).

Besonders in Bereichen von Gefäßverzweigungen und der inneren Krümmung von großen Arterien wie der Aorta kommt es zur Akkumulation von LDL-Partikeln (Zand, Hoffman et al. 1999). Diese Prozesse führen wiederum zur verstärkten Aktivierung der Endothelzellen. Damit einher geht die Produktion von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen, die wiederum zirkulierende myeloide Zellen anlocken und aktivieren. Dazu zählen in besonderem Maße proinflammatorische Monozyten ($Ly6C^{hi}$), die durch eine hohe Präsenz des CC-Chemokin-Rezeptor 2 (CCR2) charakterisiert sind (Swirski, Libby et al. 2007). Durch diese initialen Entzündungsreaktionen nehmen die rekrutierten Monozyten zunächst Kontakt mit dem Endothel auf. Dann dringen sie gezielt in die Intima des Gefäßes ein (Mestas und Ley 2008), wo sie durch ausreichende Konzentration von M-CSF („macrophage colony-stimulating factor“) zu „M1“- Makrophagen differenzieren (Smith, Trogan et al. 1995). Reife Makrophagen erkennen oxLDL über „Pattern recognition Rezeptoren“ (PRR) und phagozytieren diese Partikel (Miller, Choi et al. 2011). Außerdem können Makrophagen auch über so genannte „Scavenger-Rezeptoren“ (SR), wie beispielsweise dem Oberflächenmolekül CD36, oxidiertes LDL binden und internalisieren (Febbraio, Podrez et al. 2000). Die Makrophagen, die so Lipide aufgenommen haben, entwickeln sich zu so genannten Schaumzellen. Sie gestalten maßgeblich die Struktur von frühen atherosklerotischen Läsionen, die man auch als „fatty streaks“ bezeichnet (Woollard und Geissmann 2010). Durch die Akkumulation von Schaumzellen werden andere Immunzellen wie dendritische Zellen und Lymphozyten rekrutiert. Die differenzierten Makrophagen sezernieren dazu Cytokine, Wachstumsfaktoren und matrix-degradierende Proteasen (Chinetti-Gbaguidi, Colin et al. 2015). Mit Hilfe der Proteasen wird die extrazelluläre Matrix in ihrer Struktur verändert. Dadurch verlieren die Zellen der Gefäßwand, an der sich die Läsion angesiedelt hat, den Kontakt zueinander. Die glatten Muskelzellen der Media beginnen zu proliferieren und dringen in die Intima ein. Außerdem kommt zur verstärkten Aktivierung von Fibroblasten in der Adventitia. Beide Zelltypen produzieren Kollagen, das sich am Rand der Läsion ablagert. Dort trägt es zur Bildung einer fibrösen Kappe aus glatten Muskelzellen und Endothelzellen bei, die sich über den wachsenden Plaque legt (Rekhter 1999). Die Folge der reifenden Plaques ist eine

unregelmäßige Verdickung der Intima, die zur Verengung der Gefäße führt. Aufgrund der weiter wachsenden Plaques wird auch die Bildung von neuen Blutkapillaren angeregt. Zirkulierende Leukozyten finden dadurch kontinuierlichen Zugang zum Plaque und immer mehr Schaumzellen können entstehen. Das verstärkt zusätzlich das Wachstum der Plaques (Woollard und Geissmann 2010).

Als Folge der Anreicherung von Lipiden können Makrophagen allerdings auch deren Efflux kontrollieren. Dazu synthetisieren sie unter anderem Proteine der „ATP-Binding cassette“-Familie wie ABCA1 und ABCG1. Diese sind in der Plasmamembran lokalisiert, wo sie den Abtransport von freiem Cholesterol aus den Lysosomen der Makrophagen in den extrazellulären Raum regulieren (Gelissen, Harris et al. 2006). Dort kann das Cholesterol dann von Lipidakzeptoren wie dem Apolipoprotein A1 (ApoA1) gebunden werden. Allerdings kann eine zu hohe Konzentration an freiem Cholesterol auch toxische Wirkungen auf die Schaumzellen haben. Neben der Entstehung von Cholesterol-Kristallen in den Zellen, schädigt es das endoplasmatische Retikulum (Feng, Yao et al. 2003). Darüber hinaus kommt es durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zur verstärkten Expression proinflammatorischer Gene (Zhu, Owen et al. 2010). All diese Faktoren führen letztlich zum Absterben der Schaumzellen und zur Bildung eines nekrotischen Kerns innerhalb der Läsion. Apoptotische Schaumzellen können zu Beginn einer Atherosklerose noch durch anti-inflammatorische Makrophagen unschädlich gemacht werden (Bhatia, Yun et al. 2007). Allerdings sterben auch diese „M2“-Makrophagen im Verlauf einer fortschreitenden Atherosklerose. Dies führt zur Bildung eines sekundären nekrotischen Zentrums innerhalb der Läsion (Tabas 2010). In diesem Bereich wird der Plaque dann besonders fragil. Am Rand des nekrotischen Kerns produzieren intakte Makrophagen weiterhin Proteasen und schwächen den Bereich zusätzlich. Besonders die fibröse Kappe ist vom Abbau durch Proteasen betroffen (Galis, Sukhova et al. 1994). Sie wird in den destabilisierten Plaques immer dünner und verletzlicher. Nicht selten kommt es zum Aufreißen der Kappe (Lee und Libby 1997). In der Folge kann der Plaque abreißen und zu einer schweren Thrombose führen (Moore und Tabas 2011).

1.3.1 Rolle von Lymphozyten in der Entwicklung einer Atherosklerose

Neben Makrophagen spielen auch T- und B-Lymphozyten eine entscheidende Rolle im Verlauf einer Atherosklerose (Abb. 1.4). Reife dendritische Zellen (DC) in der Gefäßwand von Arterien dienen als Antigen-präsentierende Zellen (APC) und sezernieren in Reaktion auf atherogene Stimuli Chemokine wie CCL19 und CCL22 (Shortman und Naik 2007). Damit locken sie vermehrt $CD4^+$ T-Zellen an (Niessner, Sato et al. 2006). Obwohl die Anzahl von rekrutierten T-Zellen deutlich unter der von Makrophagen liegt (Hansson und Hermansson 2011) ist ihr Anteil an produzierten pro-atherogenen Cytokinen wie $IFN\gamma$ nicht zu unterschätzen (Tellides, Tereb et al. 2000). Die T-Zellen vertärken so die vaskuläre Entzündung und beeinflussen die Toleranz des Immunsystems gegenüber körpereigenen Antigenen. Allerdings können über Signale von unreifen DC auch atheroprotective regulatorische T-Zellen (T_{reg}) zur Läsion geleitet werden. Diese produzieren verstärkt das Cytokin IL-10, das bereits als schützender Faktor in der Entstehung der Atherosklerose nachgewiesen wurde (Mallat, Besnard et al. 1999).

Auch die verschiedenen Populationen von B-Lymphozyten haben unterschiedliche Bedeutung im Rahmen der Atherosklerose. Konventionelle B2 B-Zellen tragen zur Pathogenese bei (Kyaw, Tay et al. 2010). Die Entfernung dieser B-Zellen schützt vor einer sich entwickelnden Atherosklerose (Tsiantoulas, Diehl et al. 2014). Der hier zu Grunde liegende Mechanismus ist allerdings noch unklar. Es wird vermutet, dass B2 B-Zellen die Differenzierung von $CD4^+$ T-Zellen in T_H1 T-Zellen fördern (Ait-Oufella, Herbin et al. 2010). Diese T-Zellen produzieren verstärkt $IFN\gamma$ und könnten dadurch indirekt zur Entwicklung einer Atherosklerose beitragen. Für eine andere Population von B-Zellen konnte jedoch gezeigt werden, dass sie die Atheroskleroserate reduzieren (Kyaw, Tay et al. 2011). Diese B1 B-Zellen befinden sich in der Milz und in serösen Geweben wie dem Peritoneum. Sie haben die Fähigkeit, unabhängig von einer T-Zell-vermittelten Immunreaktion, Antikörper vom Typ IgM (Immunglobulin M) zu produzieren (Tumang, Hastings et al. 2004). Diese Antikörper können fremde und körpereigene Antigene erkennen. Der Subtyp B1a dieser B-Zellen produziert spontan natürliche IgM-Antikörper, die unter physiologischen Bedingungen in großer Menge im

Serum nachweisbar sind (Haas, Poe et al. 2005). B1b B-Zellen hingegen produzieren Antikörper erst nach der Interaktion mit Antigen-spezifischen Zellen (Alugupalli 2008). Der Mechanismus, der der atheroprotektiven Wirkung von B1a B-Zellen zugrunde liegt, wurde am Beispiel des natürlichen IgM-Antikörpers T15/E06 aufgeklärt. (Shaw, Horkko et al. 2000). Dieser Antikörper kann oxLDL im Serum und in der atherosklerotischen Läsion binden (Palinski, Horkko et al. 1996). Auch Phospholipide, die sich auf apoptotischen Zellen befinden, können durch diesen Antikörper erkannt werden. Dadurch wird die Entfernung dieser Zellen in der Läsion initiiert (Chou, Fogelstrand et al. 2009). Durch die Bindung und Neutralisierung von oxLDL reduziert T15/E06 auch die Aufnahme dieses Oxidationsprodukts in Makrophagen (Horkko, Bird et al. 1999). Die Bildung von Schaumzellen wird unterbunden. Über die Produktion von Antikörpern hinaus sezernieren B1a B-Zellen auch antiinflammatorische Cytokine wie IL-10 und tragen dazu bei, dass sowohl bereits aktivierte Makrophagen als auch cytotoxische CD4⁺ T-Zellen weniger entzündungsrelevante Cytokine produzieren (Fiorentino, Zlotnik et al. 1991) und dadurch das Fortschreiten einer Atherosklerose reduziert werden kann.

1.3.2 Strategien zur Therapie der Atherosklerose

Viele verschiedene Immunzellpopulationen sind an der Entstehung und Progression der Atherosklerose beteiligt. Dies führt zu einer sehr komplexen chronischen Gefäßentzündung. Allerdings entstehen dadurch auch diverse Möglichkeiten der Therapie. Der klassische therapeutische Ansatz beschränkt sich auf die Senkung des Cholesterolgehaltes im Blut durch einen gesunden Lebensstil und lipidsenkende Medikamente. Dazu bietet die Modulierung des Immunsystems eine interessante Alternative (Moore und Tabas 2011). Durch eine verringerte Rekrutierung von Makrophagen (Mestas und Ley 2008) oder durch den verstärkten Efflux von Cholesterol aus Makrophagen in fortgeschrittenen Läsionen (Westerterp, Bochem et al. 2014) kann die Entwicklung der Atherosklerose eingedämmt werden. Für einige Therapieansätze, die bereits vielversprechend im murinen System getestet wurden, existieren bereits klinische Studien. Es wird überprüft, ob sich auch im humanen Organismus präventive Effekte erzielen lassen (Moore und Tabas 2011).

2 Material

Tabelle 2.1 Allgemein verwendete Reagenzien und Chemikalien

Substanz	Hersteller
Agarose	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Beta-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion V	Serva, Heidelberg
Bovines Serumalbumin (BSA), Endotoxin/Fettsäure-frei	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Brewer's Thioglykollat (TG)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Calceinacetoxymethylester (Calcein AM)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
Dextransodiumsulfat (DSS)	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
Fötale Kälberserum (FBS)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Erythrozyten-Lysispuffer	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethanol _{absolut}	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt
Glucose-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Heparin-Natrium	Ratiopharm, Ulm
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
Ketamin (Hydrochlorid), 10%	Serumwerk Bernburg, Bernburg
Methanol	Roth, Karlsruhe

Substanz	Hersteller
Natriumazid (NaN_3)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Natriumpyrophosphat	AppliChem, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Sso-Fast Eva Green Supermix low ROX (2-fach)	BioRad, Hercules, USA
Tris-HCl	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	Merck Millipore, Darmstadt
Trockenmilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Tween 20	AppliChem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	Roth, Karlsruhe
Xylazin, 2%	Serumwerk Bernburg, Bernburg
Xylol	Roth, Karlsruhe

Tabelle 2.2 Reagenzien zur Verwendung in der Zellkultur

Substanz	Hersteller
β -Mercaptoethanol	Gibco, Carlsbad, USA
Dulbecco's modified eagle medium/nutrient mixture F-12 (DMEM-F12)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS)	Invitrogen, Carlsbad, USA
L-Glutamin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF), murin, rekombinant	Peptotech, Rocky Hill, USA

Substanz	Hersteller
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Carlsbad, USA
RPMI 1640	Invitrogen, Carlsbad, USA

Tabelle 2.3 Reagenzien zur Stimulation primärer Zellen

Substanz	Hersteller
acetyliertes Lipoprotein (acLDL)	Biomedical Technologies Inc., Stroughton, USA
Apolipoprotein A1 (ApoA1)	Biomedical Technologies Inc., Stroughton, USA
AR-C118925 (P2Y ₂ -Antagonist)	Christa E. Müller, Bonn
BQ-788 (ET _B -Antagonist)	BioTrend, Zürich, Schweiz
Cay-10444 (S1P ₃ -Antagonist)	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
C3-Exoenzym (C3, Rho-Inhibitor)	Cytoskeleton, Denver, USA
CCG-203971 (SRE-Inhibitor)	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
JTE-013 (S1P ₂ -Antagonist)	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Ki16425 (LPA _{1/3} -Antagonist)	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Komplement-Komponente 5a (C5a)	Peprtech, Rocky Hill, USA
Lysophosphatidsäure (LPA)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Monensin	ebioscience, San Diego, USA
MRS 2578 (P2Y ₆ -Antagonist)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
NSC 23766 (Rac1-Inhibitor)	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Ro106-9920 (NF-κB-Inhibitor)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Sphingosin-1-Phosphat (S1P)	Enzo Life Science, USA
SQ29,548 (TP-Antagonist)	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
TcY-NH2 (PAR ₄ -Antagonist)	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNFα)	Peprtech, Rocky Hill, USA
Y-27632 (ROCK-Inhibitor)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

Tabelle 2.4 Enzyme zum Aufschluß von Organen

Enzym	Hersteller
Collagenase I	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Collagenase II	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Collagenase XI	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
DNAseI	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Elastase	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

Tabelle 2.5 Primäre Antikörper

ELISA: Enzym-gebundener immunabsorbierender Assay; FACS: Durchflusszytometer; IHCfr: Immunhistochemie an Gefrierschnitten; WB: Western Blot

Antigen	Klon	Hersteller	Verwendung (Verdünnung)
CD45	30-F11	ebioscience, San Diego, USA	FACS (1:100)
CD11b	M1/70	ebioscience, San Diego, USA	FACS (1:100)
CD11c	N418	BD Biosciences, Heidelberg	FACS (1:100)
Ly6G	1A8	Biolegend, San Diego, USA	FACS (1:100)
Ly6C	HK1.4	Biolegend, San Diego, USA	FACS (1:100)
F4/80	A3-1	Abd Serotec, Kidlington, UK	FACS (1:100)
	BM8	ebioscience, San Diego, USA	FACS (1:100)
B220/CD45R	RA3-6B2	BD Biosciences, Heidelberg	FACS (1:100)
B220/CD45R Beads	-	Miltenyi, Bergisch-Gladbach	MACS (1:10)
CD19	ID3	ebioscience, San Diego, USA	FACS (1:100)
CD4	RM4-5	ebioscience, San Diego, USA	FACS (1:100)
CD5/Ly-1	53-7.3	BD Biosciences, Heidelberg	FACS (1:100)
CD8	53-6.7	BD Biosciences, Heidelberg	FACS (1:100)
TCR β	H57-597	Biolegend, San Diego, USA	FACS (1:100)

Antigen	Klon	Hersteller	Verwendung (Verdünnung)
CD43	S7	BD Biosciences, Heidelberg	FACS (1:100)
TNF α	MP6-XT22	BD Biosciences, Heidelberg	FACS (1:100)
Annexin V (AnV)	-	BD Biosciences, Heidelberg	FACS (1:100)
7-AAD	-	BD Biosciences, Heidelberg	FACS (1:100)
G α_{13} (c-terminal)	C-13	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA	WB (1:300)
pNF- κ B p65	93H1	Cell Signalling, Danvers, USA	WB (1:1000)
α -tubulin	DM1A	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA	WB (1:3000)
GAPDH	14C10	Cell Signalling, Danvers, USA	WB (1:1000)
CD68	FA-11	Abd Serotec, Kidlington, UK	IHCfr (1:100)
AB1-2 (biotinyliert)	HB-33	BioXCell, West Lebanon, USA	IHCfr (0,3mg/ml)
AB1-2	HB-33	ATCC, Manassas, USA	ELISA (2 μ g/ml)
DAPI	-	Invitrogen, Carlsbad, USA	IHCfr (1:10000)

Tabelle 2.6 Sekundäre Antikörper und Isotyp-Kontrollen

ELISA: Enzym-gebundener immunabsorbierender Assay; FACS: Durchflusszytometer; IHCfr: Immunhistochemie an Gefrierschnitten; WB: Western Blot

Spender/Reaktivität	Markierung	Hersteller	Verwendung (Verdünnung)
Esel anti-Kaninchen	Alexa-Fluor594	Invitrogen, Carlsbad, USA	IHCfr (1:200)
Ziege anti-Kaninchen IgG	Meerrettich-Peroxidase (HRP)	NEB, Ipswich, USA	WB (1:3000)
Pferd anti-Maus IgG	Meerrettich-Peroxidase (HRP)	NEB, Ipswich, USA	WB (1:3000)
Streptavidin	PE-Cy7	Biolegend, San Diego, USA	FACS (1:100)
Ziege anti-Maus IgG (γ -Ketten spezifisch)	Alkalische Phosphatase (AP)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA	ELISA (1:20000)

Spender/Reaktivität	Markierung	Hersteller	Verwendung (Verdünnung)
Ziege anti-Maus IgM (μ -Ketten spezifisch)	Pur	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA	ELISA (1:20000)
Ziege anti-Maus IgM (μ -Ketten spezifisch)	Alkalische Phosphatase (AP)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA	ELISA (1:20000)
Maus IgM, κ	pur	Biolegend, San Diego, USA	ELISA (0,78-50ng/ml)

Tabelle 2.7 Reagenzien zur Verwendung in histologischen Analysen

Substanz	Hersteller
Fluoromount W (Einbettmedium)	Serva, Heidelberg
Hämatoxylin-Lösung	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Kaiser's Glycerolgelatine	Merck Millipore, Darmstadt
Oil-Red-O (ORO)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Pertex (Einbettmedium)	Mediate, Orlando, USA
Tissue-Tek O.C.T (Einbettmedium)	Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Ziegenserum (NGS)	Dako, Hamburg

Tabelle 2.8 Reagenzien für Western Blot

Substanz	Hersteller
Acrylamide/Bisacrylamid Lösung (29:1), 30% w/v	Serva, Heidelberg
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Immobilon Western Chemilumineszenz HRP Substrate (ECL)	Merck Millipore, Darmstadt
Leupeptin-Hemisulfat	AppliChem, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	AppliChem, Darmstadt
Pageruler Plus	Thermo Scientific, Waltham, USA
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	AppliChem, Darmstadt

Tabelle 2.9 Verwendete Komplett-Sets (Kits)

Kit-Name	Hersteller
Cholesterol Assay (CHOD-PAP-Methode)	Biolabo, Maizy, Frankreich
DC Protein Assay	BioRad, Hercules, USA
Fixation & Permeabilization Buffer Kit	ebioscience, San Diego, USA
Lumiphos Plus Kit	Lumigen, Southfield, USA
Ovation Pico WTA V2 PreAmp Kit	NuGene, San Carlos, USA
Protein Biotinylation Kit	Roche, Penzberg
Protoscript II Reverse Transkriptase Kit	NEB, Ipswich, USA
Rac1 Activation Assay Biochem Kit (kalorimetrisch basierte Messung)	Cytoskeleton, Denver, USA
RhoA Activation Assay Biochem Kit (kalorimetrisch basierte Messung)	Cytoskeleton, Denver, USA
RNAesy Micro RNA-Isolations Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
RNAesy Plus Mini RNA-Isolations Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
Single-Cell to C _t Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
Vectastatin Elite ABC Peroxidase Kit Standard	Enzo Life Science, Farmingdale, USA
Vectastatin DAB Substrat Kit	Enzo Life Science, Farmingdale, USA

Tabelle 2.10 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Bakterienschale mit Nocken, 10cm	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
C1-Chip 5-10µm	Fluidigm, South San Francisco, USA
Cryomold Medium, 15 x 15 x 5mm (Einbetttschälchen)	Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Deckgläser 22 x 22mm	Thermo Scientific, Waltham, USA
Deckgläser 24 x 60mm	Thermo Scientific, Waltham, USA
Dynamic Array IFC (96.96)	Fluidigm, South San Francisco, USA

Name	Hersteller
Einmalpipetten für die Zellkultur (5ml-25ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Faltenfilter	Roth, Karlsruhe
Glas-Pasteurpipetten	Karl Hecht, Sondheim
Kanülen 21G/27G	Henke-Sass Wolf, Tuttlingen
Klingen für Crytom-Schnitte (Leica 819)	Leica, Wetzlar
MACS MS Separationssäulen	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Medizinischer Röntgenfilm Fujifilm Super RX	Fujifilm, Minato, Japan
Microvette 100 K3E	Sarstedt, Nümbrecht
Migrationskammer (2D) "µ-slide", ibidi-treat	ibidi, Martinsried
Minicap 10µl, Kapillarpipette	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Minicap 20µl (heparinisiert), Kapillarpipette	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Multiply-µ-Strip, Reaktionsgefäße (0,2ml) für PCR/cDNA	Sarstedt, Nümbrecht
Multi-Well Platte (6-fach) für Suspensionskultur	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Multi-Well Platte (96-fach), mit Flachboden	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Multi-Well Platte für ELISA (96-fach), mit Rundboden	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Multi-Well Platte (96-fach), weiß, für qRT-PCR	Steinbrenner, Wiesenbach
Nitrozellulosemembran Whatman Protran 0,45µm	Thermo Scientific, Waltham, USA
Objektträger SuperFrost	Thermo Scientific, Waltham, USA
Omnifix Spritzen (1ml-25ml)	Braun, Melsungen
Parafilm M	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

Name	Hersteller
Pipettenspitzen (10µl/200µl/1000µl)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Reaktionsgefäße (1,5ml/2ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhre (15ml/50ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Rundbodenröhre für Durchflußzytometrie	BD Biosciences, Heidelberg
Sterilfilter MinisartPlus (Porengröße 0,2µm)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Zellkulturplatten 35x10mm	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Zellschaber (16cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellsiebe (Porengröße: 70µm)	BD Biosciences, Heidelberg

Tabelle 2.11 Laborgeräte

Name	Hersteller
Analytische Feinwaage „Pioneer“	Ohaus, Nänikon, Schweiz
AXIO Scope A1 Durchlichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen
BioMark	Fluidigm, South San Francisco, USA
C1 Single-Cell Autoprep System	Fluidigm, South San Francisco, USA
Cryotom CM3050 S	Leica, Wetzlar
FACS Cantoll	BD Bioscience, Heidelberg
FACS JSAN junior	Bay Bioscience, Kobe, Japan
Flex Cycler, PCR-Gerät	Analytik Jena, Jena
HeraCell 150i CO ₂ -Inkubator	Thermo Scientific, Waltham, USA
Live cell imaging system IX81	Olympus, Tokio, Japan
Light Cycler 480 II, qRT-PCR-Gerät	Roche, Penzberg
Luminometer, Plattenlesegerät	Thermo Scientific, Waltham, USA
M165 FC Stereomikroskop	Leica, Wetzlar
Milli-Q Integral Wasserfiltersystem	Merck Millipore, Darmstadt

Name	Hersteller
Nanodrop ND1000 Spektrophotometer	PeqLab, Erlangen
Neubauer-Zählkammer	Karl Hecht, Sondheim
pH-Meter	Hanna, Kehl
Sicherheitswerkbank Safe 2020	Thermo Scientific, Waltham, USA
SP5 Konfokalmikroskop	Leica, Wetzlar
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortexer	Thermo Scientific, Waltham, USA
Western Blot Gelkammer und Transferapparatur	BioRad, Hercules, USA
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 2.12 Software

Programm	Hersteller
Adobe Illustrator CS4	Adobe, San Jose, USA
Corel Draw	Corel, München
End Note X7	Thomson Reuters, New York, USA
FACS Diva (Version 6.1.2)	BD Bioscience, Heidelberg
FlowJo (Version 10)	FlowJo, Ashland, USA
Fluidigm Real Time PCR Analysis Software (Version 3)	Fluidigm, South San Francisco, USA
GraphPadPrism 5	GraphPad Software, La Jolla, USA
ImageJ	NIH, Bethesda, USA
Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmond, USA
NCBI Blast	NIH, Bethesda, USA
ProbeFinder	Roche, Penzberg

2.1 Puffer und Medien

Die hier verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem, Merck Millipore, Sigma-Aldrich und Roth bezogen. Das verwendete destillierte Wasser für die Herstellung der Puffer wurde zuvor über eine „Milli-Q“-Wasseranlage gefiltert.

2.1.1 Allgemein verwendete Puffer

PBS

NaCl	137mM
KCl	2,7mM
Na ₂ HPO ₄	10mM
KH ₂ PO ₄	2mM
pH 7,4	

PBST

PBS	+ 0,1% Triton-X
-----	-----------------

TAE

Tris-HCl	40mM
EDTA	1mM

2.1.2 Puffer für Western Blot

TBS

Tris	10mM
NaCl	150mM

in PBS, pH 7,4

TBST

TBS + 0,1% Tween 20

pH 7,5

Elektrophoresepuffer (5-fach)

Tris 151,4g

Glycine 720g

SDS 50g

pH 8,5

Mit destilliertem Wasser auf 10l auffüllen und bei RT lagern

Sammelgelpuffer

Tris 30,4g

SDS (20%) 10ml

pH 6,8

Mit destilliertem Wasser auf 1l auffüllen und bei RT lagern

Trenngelpuffer

Tris 90,8g

SDS (20%) 10ml

pH 8,8

Mit destilliertem Wasser auf 1l auffüllen und bei RT lagern

SDS PAGE Sammelgel (6%), für 1 Gel

Sammelgelpuffer 1,25ml

30% w/v Acrylamid/bisacrylamid 500µl

12,5% APS 30µl

TEMED 3µl

dest. H₂O 750µl

SDS PAGE Trenngel (10%), für 1 Gel

Trenngelpuffer	2,5ml
30% w/v Acrylamid/Bisacrylamid	1,7ml
12,5% APS	40µl
TEMED	4µl
dest. H ₂ O	900µl

Transferpuffer (Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membran)

Tris	25mM
Glycin	192mM
Methanol	20%

Triton-X-Puffer (Lysieren von Zellen für Western Blot)

Tris-HCl (pH 7,5)	20mM
NaCl	150mM
EDTA	1mM
EGTA	1mM
Triton-X	1%
Natriumpyrophosphat	2,5mM
Beta-Glycerophosphat	1mM
Na ₃ VO ₄	1mM
Leupeptin	1µg/ml

Blockierlösung

BSA (Fraktion V)	5%
NaN ₃	0,1%
in TBS/Phenolrot (1:10)	

Lämmli (4-fach)

1M Tris pH 6,8	40ml
20% SDS	40ml
0.5M EDTA	3.25ml
H ₂ O	6ml
100% Glycerol	40ml
β-Mercaptoethanol	8ml
Bromphenolblau	40mg

2.1.3 Puffer für die Zellkultur und Isolierung von primären Zellen**Säulenpuffer** (Isolierung von Leukozyten; FACS-Puffer)

EDTA	2mM
BSA	0,5%

in PBS, pH 7,4

Sterilisierung durch Filtration (0,16µm), Lagerung bei 4°C

Cell Stripper (Ablösen adhärenter Makrophagen)

EDTA	3mM
Glucose-Monohydrat	10mM

in PBS, pH 7,4

Sterilisierung durch Filtration (0,16µm), Lagerung bei 4°C

2.1.4 Medien für die Zellkultur

DMEM-F12 (Kultivierung primärer Makrophagen)

DMEM-F12 (1:1) mit Phenol

+ L-Glutamin	10mM
+ β -Mercaptoethanol	50 μ M
+ Penicillin-Streptomycin	100U/500ml

DMEM-F12-10 complete (Differenzierung von Makrophagen aus Knochenmark)

DMEM-F12 (1:1) mit Phenol

+ L-Glutamin	10mM
+ β -Mercaptoethanol	50 μ M
+ Penicillin-Streptomycin	100U/500ml
+ FBS	10%
+ M-CSF	100U/ml

2.1.5 Lösungen zur Verwendung in der Histologie

Fixierungspuffer (Präparation von atherosklerotischen Aorten/Herzen)

PFA	4%
EDTA	20mM
Saccharose	5%

in PBS, pH 7,4

3 Methoden

3.1 Mauslinien- und zucht

Makrophagen-spezifisch $G\alpha_{12/13}$ -defiziente Mäuse (Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO: LysM-Cre^{+/-}; Gna13^{fl/fl}; Gna12^{-/-}) und entsprechende Kontrolltiere (Kontrolle: LysM-Cre^{-/-}; Gna13^{fl/fl}; Gna12^{wt/wt}) wurden durch die Verpaarung von LysM-Cre^{+/-}-Mäusen (Clausen, Burkhardt et al. 1999) mit Gna13^{fl/fl}; Gna12^{-/-}-Mäusen (Moers, Nieswandt et al. 2003) gezüchtet. Die verwendeten Tiere hatten alle einen genetischen C57Bl6/N Hintergrund. Zur eindeutigen Identifizierung wurden die Tiere mit den folgenden Primersequenzen genotypisiert:

LysMCre-PCR:

5'-ctt-ggg-ctg-cca-gaa-ttt-ctc-3'; 5'-ccc-aga-aat-gcc-aga-tta-cg-3'

$G\alpha_{12}$ -PCR:

5'-gtg-ctc-atc-ctt-cct-ggt-ttc-c-3'; 5'-cgg-gtc-gcc-ctt-gaa-atc-tgg-3';

5'-ggc-tgc-taa-agc-gca-tgc-tcc-3'

$G\alpha_{13}$ flox-PCR:

5'-gca-ctc-tta-cag-act-ccc-ac-3'; 5'-gcc-aca-gag-gga-ttc-agc-ac-3'

Für Experimente im Rahmen der Atherosklerose wurden die $G\alpha_{12/13}$ -defizienten Mäuse mit Tieren verpaart, die keinen Rezeptor mehr für „low density Lipoproteine“ (Ldlr^{-/-}) exprimieren (Ishibashi, Brown et al. 1993). So wurde ein Atherosklerose-fähiger genetischer Hintergrund generiert. Die Linie wurde im Folgenden als „Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13};Ldlr^{-/-}$ “ bezeichnet. Die Existenz des Ldlr wurde durch PCR mit folgenden Primern nachgewiesen:

Ldlr-PCR:

5'-tcc-atc-ttg-ttc-aat-ggc-cga-tc-3'; 5'-cca-tat-gca-tcc-cca-gtc-tt-3';

5'-gcg-atg-gat-aca-ctc-act-gc-3'

Zur Analyse der LysMCre-Rekombinationseffizienz sowie für Experimente mit endogen fluoreszenten Makrophagen wurde in einigen Fällen die doppelt fluoreszente Reporterlinie $Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)LoxP}/J$ (Jackson Lab stock 007576) eingekreuzt. Diese neu generierte Reporterlinie wurde im Folgenden als „LysMCre-dTom“-Linie bezeichnet. Folgende Primer dienten zum Genotypisieren:

Tomato-EGFP-PCR:

5'-ctc-tgc-tgc-ctc-ctg-gct-tct-3'; 5'-cga-ggc-gga-tca-caa-gca-ata-3';

5'-tca-atg-ggc-ggg-ggt-cgt-t-3'

In einigen Experimenten wurden zusätzlich C57Bl/6N-Mäuse verwendet. Diese Tiere werden im Folgenden als „Wildtypen“ (WT) bezeichnet.

3.2 Tierhaltung

Alle verwendeten Tiere wurden gemäß geltenden Bestimmungen unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten. Die Tiere erhielten Wasser und Futter *ad libitum*.

Mäuse, die für die Induktion von Atherosklerose bestimmt waren, wurden für den angegebenen Zeitraum auf Hochfettdiät (HFD) gehalten. Dieses Futter enthielt 1,5% Cholesterin und 21% Butterfett. Die Tiere wurden wöchentlich gewogen.

Die Durchführung aller Experimente erfolgte wie vom Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt.

3.3 Tierexperimentelle Methoden

3.3.1 Gewinnung von Plasma aus Mausblut

Zur Entnahme von Vollblut wurde den Mäusen mit einer sterilen Kanüle (27G) Blut aus dem bukkalen Venenplexus entnommen. Das Blut wurde in einer EDTA-K Microvette gesammelt und auf Eis gekühlt. Die Entnahme von Blut aus Tieren für atherosklerotische Untersuchungen erfolgte im Rahmen des finalen Experimentes nach 16 Wochen HFD. Diesen Tiere, die mit Ketamin (120mg/kg) und Xylazin (16mg/kg) narkotisiert waren, wurde über die *Vena cava* Blut entnommen. Die Proben wurden für 10min bei 2700g und 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert. Das so gewonnene Plasma wurde bei -80°C aufbewahrt.

3.3.2 Isolierung von Leukozyten aus murinem Vollblut

Zur Entnahme von Vollblut wurde den Mäusen mit einer sterilen Kanüle (27G) Blut aus dem bukkalen Venenplexus entnommen. Um die Koagulation des Blutes zu verhindern wurden 30µl EDTA (0,5M) in das Reaktionsgefäß vorgelegt.

Die Blutprobe wurde für 10min bei RT mit 1ml Erythrozyten-Lysispuffer inkubiert und dabei mehrmals invertiert bis die Lösung klar wurde. Nach erfolgter Erylyse wurde die Probe für 2min bei 400g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die sedimentierten Leukozyten in 1ml Säulenpuffer resuspendiert. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer.

3.3.3 Isolierung von Leukozyten aus den Lymphknoten

Zur Gewinnung von Leukozyten aus den inguinalen und axillären Lymphknoten wurden die mit CO₂ tief narkotisierten Mäuse durch Genickbruch getötet und die Lymphknoten nach einem Längsschnitt der Haut und einer anschließenden Trennung dieser vom Abdomen entnommen. Das die Lymphknoten umgebende Fettgewebe wurde vorsichtig mit einer Pinzette entfernt. Die frisch isolierten Lymphknoten wurden auf einem Zellsieb (70µm) durch Zerdrücken mit Hilfe eines Spritzenstempels vereinzelt. Die Zellen wurden in 5ml Säulenpuffer gewaschen und für 5min bei 400g und 4°C

zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Leukozyten in 1ml Säulenpuffer resuspendiert. Die Zellzahl wurde durch die Zählung in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.3.4 Isolierung von Leukozyten aus der Lunge

Die Gewinnung von primären Leukozyten aus der Lunge erfolgte an durch CO₂ tief narkotisierten und durch Genickbruch getöteten Mäusen nach Perfusion der Lunge mit PBS über den rechten Herzventrikel. Die entnommenen Lungen wurden in sehr kleine Stücke geschnitten und mit Collagenase II (1mg/ml) und DNase (5U/ml) in RPMI-Medium für 2h bei 37°C verdaut. Die vollständig verdauten Lungen wurden über ein Zellsieb (70µm) gefiltert, in 5ml PBS gewaschen und anschließend in 1ml Säulenpuffer resuspendiert. Die Zellzahl wurde durch die Zählung in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.3.5 Isolierung von Leukozyten aus der Milz

Zur Gewinnung von Leukozyten aus der Milz wurden die Mäuse mit CO₂ tief narkotisiert und durch Genickbruch getötet. Die Milz wurde aus dem eröffneten Peritoneum entnommen. Die frisch isolierte Milz wurde auf einem Zellsieb (70µm) mit einer stumpfen Schere zerkleinert und durch Zerdrücken mit Hilfe eines Spritzenstempels vereinzelt. Die Zellen wurden in 5ml Säulenpuffer gewaschen und für 7min bei 400g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Probe für 3min bei RT mit 1ml Erythrozyten-Lysispuffer inkubiert und dabei mehrmals invertiert. Nach der Erylyse wurde die Probe für 5min bei 400g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die sedimentierten Leukozyten in 1ml Säulenpuffer resuspendiert und in der Neubauer-Zählkammer gezählt.

3.3.6 Isolierung von Makrophagen aus dem Peritoneum der Maus

Zur Gewinnung von Makrophagen aus dem Peritoneum (rpMP) wurde die Maus tief mit CO₂ narkotisiert und durch anschließenden Genickbruch getötet. Am desinfizierten Abdomen wurde vorsichtig ein kleines Loch in die Haut der Maus geschnitten und diese durch Spreizen einer stumpfen Schere vom Peritoneum der Maus abgetrennt.

Über eine Kanüle (20G) wurden 12ml PBS + 2mM EDTA *i.p.* appliziert. Das Peritoneum wurde anschließend massiert, die Spritze verblieb dabei im Peritoneum. Zur Entnahme der Flüssigkeit wurde die Spritze so gedreht, dass der Schliff der Kanüle nach unten zeigte. Das Exsudat (~10ml) wurde nach Entfernen der Kanüle aus der Spritze entnommen und für 10min bei 400g und 4°C zentrifugiert. Die sedimentierten Makrophagen wurden in 1ml Säulenpuffer resuspendiert und in der Neubauer-Zählkammer deren Zahl ermittelt.

3.3.7 Thioglycollat-induzierte Peritonitis

Zur Anreicherung von Leukozyten im Peritoneum der Maus wurde eine Peritonitis durch Brewer's Thioglycollat (TG) induziert. Dazu wurde jeder Maus eine einmalige Dosis (1ml) von 3% TG *i.p.* appliziert.

Die Isolierung der unterschiedlichen Leukozytenpopulationen erfolgte wie in Kapitel 3.3.6 beschrieben nach Inkubtion mit TG für 24h (neutrophile Granulozyten und Monozyten) und für 96h (rekrutierte Makrophagen).

3.3.8 Gewinnung von peritonealer Flüssigkeit zur Kultivierung primärer Zellen

Die Inkubation primärer Zellen *ex vivo* erfolgte in einigen Experimenten mit durch peritonealer Flüssigkeit angereichertem Medium. Zur Gewinnung dieser Flüssigkeit wurden die Mäuse tief mit CO₂ narkotisiert und durch anschließenden Genickbruch getötet. Pro Maus wurden 3ml DMEM-F12 (ohne FBS) *i.p.* injiziert und nach einer sanften Massage des Peritoneums die gesamte Flüssigkeit mit der gleichen Spritze vorsichtig entnommen. Zur Entfernung von Zellen aus der Peritonealflüssigkeit wurde die Probe für 10min bei 4000g und 4°C zentrifugiert und der unverdünnte Überstand als Medium verwendet.

Um möglichst geringe Volumina an DMEM-F12 einsetzen zu können und somit einen möglichst konzentrierten Überstand zu erhalten, wurden für die Gewinnung peritonealer Flüssigkeit Mäuse im Alter von 3-5 Wochen verwendet.

3.3.9 Transfer residenter peritonealer Zellen in atherosklerotische LDLR^{-/-} Tiere

Zum Transfer von peritonealen Zellen wurde peritoneales Exsudat für 10min bei 400g und 4°C zentrifugiert und in 200µl PBS resuspendiert. Die gesamten peritonealen Zellen eines Spendertieres wurden anschließend *i.p.* in jeweils ein Ldlr^{-/-}-Empfängertier auf HFD injiziert. Alle 3 Wochen wurde der Transfer von peritonealen Zellen eines neuen Spendertieres in die gleiche Empfängermaus wiederholt. Nach 12 Wochen wurden die Empfängertiere nach Protokoll getötet und der Grad der Atherosklerose (siehe Kapitel 3.5.3.1) bestimmt.

3.3.10 Rekrutierung fluoreszent markierter Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen

Zur Untersuchung der Migrationseigenschaften von Makrophagen im Verlauf einer Atherosklerose wurde ein so genannter „adoptiver Transfer“ (adTF) durchgeführt. Dazu wurden zunächst mit Hilfe einer TG-induzierten Peritonitis (Kapitel 3.3.7) in Spendertieren Monozyten und Makrophagen im Peritoneum angereichert. Nach 24h wurden die Monozyten und Makrophagen durch Lavage isoliert, in Säulenpuffer mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml resuspendiert und mit 1µg/ml Calcein-AM für 20min im 37°C warmen Wasserbad gefärbt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Säulenpuffer gewaschen und auf eine Zellkonzentration von 2×10^7 Zellen/ml mit PBS eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 2×10^6 Zellen in 100µl PBS *i.v.* in Empfängertiere appliziert, die bereits für 8 Wochen auf HFD gehalten wurden. Nach 48h wurden die Rezipienten mit Ketamin (120mg/kg) und Xylazin (16mg/kg) betäubt, mit PBS und 4% PFA perfundiert und die Herzen nach Protokoll (Kapitel 3.3.11) entnommen und präpariert. Von den gefrorenen Aortenklappen wurden 10µm dicke serielle Gefrierschnitte angefertigt und auf eingewanderte Calcein-AM-gefärbte Makrophagen hin untersucht. Die Anzahl der rekrutierten Makrophagen wurde auf die Fläche der atherosklerotischen Läsion bezogen.

3.3.11 Isolierung atherosklerotischer muriner Aorten und Herzen

Die mit Ketamin (120mg/kg) und Xylazin (16mg/kg) narkotisierten Mäuse wurden mit 20ml PBS über den linken Ventrikel perfundiert und anschließend mit 20ml

Fixierungspuffer fixiert. Im dann toten Tier wurden das Herz und die Aorta freigelegt und separat voneinander entnommen. Dabei wurde die Aorta oberhalb des Sinus vom Herzen getrennt. Herz und Aorta wurden über Nacht bei 4°C in Fixationslösung weiter fixiert.

3.3.11.1 Präparation des Herzens

Das fixierte Herz wurde in 30% Saccharose überführt und über Nacht bei 4°C entwässert. Im Anschluss wurde das Herz in PBS gewaschen und in Tissue-Tek O.C.T eingebettet. Dafür wurde die Herzspitze abgeschnitten und das Herz so ausgerichtet, dass die Wurzel der Aorta parallel zur Schnittfläche positioniert war. Die so eingebetteten Herzen wurden bei -80°C für mindestens 24h eingefroren. Von der Aortenwurzel wurden 8µm dicke serielle Gefrierschnitte angefertigt.

3.3.11.2 Präparation der Aorta

Die fixierte Aorta wurde mit PBS gewaschen und von der Adventitia getrennt. Die so freigelegte Aorta wurde longitudinal aufgeschnitten, mit ihrer Innenseite nach unten auf einer mit Kunstharz ausgegossenen Petrischale mit Minutiennadeln fixiert und in PBS bis zur Färbung mit Oil-Red-O aufbewahrt.

3.3.12 Isolierung von murinem Knochenmark zur Differenzierung in Makrophagen

Zur Gewinnung von Knochenmark wurde die Maus zunächst in CO₂ tief narkotisiert und durch Genickbruch getötet. Beide Hinterbeine wurden vom Körper der Maus abgetrennt und in PBS gewaschen, anschließend in 70% Ethanol desinfiziert. Durch Bewegen der Gelenke wurden Femur und Tibia voneinander getrennt. Nach dem Entfernen von Muskel- und Hautresten, wurden die Knochen erneut in Säulenpuffer gewaschen. Um anschließend das Knochenmark zu isolieren, wurden die Enden der Knochen abgeschnitten und mit Hilfe einer Spritze und einer Kanüle (27G) 1-2ml Säulenpuffer durch den Knochen gespült. Das gesammelte Knochenmark einer Maus wurde in insgesamt 5ml Säulenpuffer resuspendiert. Die durch ein Zellsieb (70µm) vereinzelt Zellen wurden für 10min bei 400g und Raumtemperatur sedimentiert und auf eine Zelldichte von 1x10⁶/ml in Medium (DMEM/F12-10 complete; 100U/ml M-

CSF) verdünnt. Zur Ausdifferenzierung des Knochenmarks in Makrophagen wurden die Zellen für 7 Tage in Suspensions-Zellkulturschalen kultiviert. Nach 3 Tagen wurde frisches Medium (DMEM/F12-10 complete; 100U/ml M-CSF) vom halben Volumen des verwendeten Kulturvolumens zugesetzt.

Nach abgeschlossener Differenzierung der Knochenmark-Makrophagen (kmMP) wurden die Zellen zunächst in PBS gewaschen. Durch die folgende Inkubation für 10min bei 37°C in Cell Stripper wurden die Zellen nicht-enzymatisch von der Zellkulturschale abgelöst. Durch anschließendes Spülen mit PBS wurden die Zellen resuspendiert und konnten für Folgeexperimente eingesetzt werden.

3.3.13 Induzierung von Schaumzellen aus Knochenmarksmakrophagen

Zur Bildung von Schaumzellen wurden zunächst Makrophagen aus Knochenmark nach dem Protokoll, wie in Kapitel 3.3.12 beschrieben, differenziert. Nach 7 Tagen im Differenzierungsmedium wurden die Makrophagen bei einer Dichte von 4×10^5 /ml auf Deckgläsern in einer Multiwellplatte für 24h ohne M-CSF kultiviert. Danach wurde den Makrophagen acetyliertes „low-density Lipoprotein“ (acLDL; 50µg/ml) in Serum-freiem Medium für weitere 24h hinzugefügt. Durch die Aufnahme des acLDL in die differenzierten Makrophagen entstanden die zu untersuchenden Schaumzellen.

Zur Untersuchung des Efflux von Lipiden aus Makrophagen, wurden diese im Anschluss an die Schaumzellbildung zweimal in PBS gewaschen und Apolipoprotein A1 (ApoA1; 20µg/ml) in Serum-freiem Medium für weitere 24h dazugegeben. Dieses Protein dient dem Abtransport von Lipiden und unterstützt den Abbau von Schaumzellen.

Zur histologischen Analyse der Schaumzellen wurden diese im Anschluss an die Behandlung mit ORO zum Nachweis von Lipiden gefärbt. Dazu wurden die auf den Deckgläsern gewachsenen Makrophagen zunächst zweimal in PBS gewaschen, im Folgenden für 10min mit 4% PFA fixiert und erneut für 1min in PBS gewaschen. Anschließend wurde für 30s in 60% Isopropanol gewaschen und die Schaumzellen daraufhin für 10min bei 37°C mit ORO-Arbeitslösung inkubiert. Die Färbelösung wurde danach für 30s mit 60% Isopropanol gewaschen und die Zellen abschließend 3x in

PBS gespült. Die Deckgläschen wurden vorsichtig mit einer Pinzette aus der Multiwellplatte entnommen, überschüssiges PBS wurde abgetupft und die Zellen wurden in flüssiger Kaiser's Glyceringelatine auf Objektträger eingebettet.

Mit Hilfe des Durchlichtmikroskops wurden Aufnahmen der ORO-gefärbten Schaumzellen gemacht und diese mit ImageJ quantifiziert.

3.4 Durchflusszytometrische Methoden

Die Durchflusszytometrie oder auch „Fluorescence Activated Cell Sorting“ (FACS) genannte Methode macht es möglich, eine quantitative Bestimmung sowohl von Oberflächenmolekülen als auch von intrazellulären Proteinen in Zellsuspensionen durchzuführen. Dazu werden die Zellen, die zuvor mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt wurden, einzeln an einem fokussierten Laser vorbeigeführt. Dabei trifft der Strahl der Lichtquelle im rechten Winkel auf jede einzelne Zelle. Dadurch entstehen zunächst das Vorwärtsstreulicht, auch als „Forward scatter“ (FSC) bekannt, und das Seitwärtsstreulicht, dass auch als „Side Scatter“ (SSC) bezeichnet wird. Der FSC beschreibt die Zellgröße, wohingegen der SSC mit der Struktur der Zelle korreliert. Über diese beiden Maße kann man bereits Informationen zur Beschaffenheit der Zellen erhalten. Außerdem wird das Lichtsignal, das durch die Anregung der an die Antikörper konjugierten Fluoreszenzfarbstoffe freigesetzt wird, über verschiedene Filter detektiert. Die gemessenen Parameter geben Auskunft darüber, aus welchen Zelltypen eine bestimmte Zellsuspension zusammengesetzt ist.

3.4.1 Bestimmung der Zellzahl in der Zählkammer nach Neubauer

Die Bestimmung der Zellzahl einer Einzelzellsuspension erfolgte in der Neubauer-Zählkammer. Dazu wurden die Zellen 1:100 in PBS verdünnt und von dieser Verdünnung 10µl in die Zählkammer appliziert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden alle 4 großen Zählquadrate gezählt und die Summe der Zellen ermittelt.

Mit Hilfe folgender Formel wurde die Zellzahl der Suspension bestimmt:

(Summe der gezählten Zellen:4) x Verdünnungsfaktor (100) x 10^4 = Zellzahl/ml

3.4.2 Analyse und Sortierung von Leukozyten im Durchflußzytometer

Frisch isolierte Leukozyten (1×10^6) wurden in einem Volumen von 100 μ l Säulenpuffer für die Messung im Durchflußzytometer gefärbt. Die Zellzahl wurde zuvor lichtmikroskopisch in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Die Proben wurden zunächst für 10min bei RT mit 1 μ l Fc-Block blockiert und dann die entsprechenden Antikörper für Oberflächenantigene im Verhältnis 1:100 dazugegeben. Die Proben wurden für 20min bei 4°C im Dunkeln gefärbt. Die Leukozyten wurden in 2ml PBS/Säulenpuffer gewaschen und für 5min bei 400g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 μ l PBS/Säulenpuffer gelöst und die Leukozyten im Durchflußzytometer Canto II gemessen und anschließend mit der Software FACS Diva oder FlowJo analysiert.

Die Färbung von intrazellulären Antigenen erfolgte nach Fixierung der Leukozyten mit Hilfe des „Fixation & Permeabilization Buffer Kit“ nach Herstellerprotokoll. Die Markierung von Oberflächenmarkern dieser Zellen erfolgte vor der Fixierung.

Um Leukozyten am Durchflußzytometer JSAN junior zu sortieren, wurden die gefärbten Zellen mit Hilfe eines Zellsiebs (70 μ m) vereinzelt und die Zellsuspension in Säulenpuffer auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden in Reaktionsgefäße mit Säulenpuffer hinein sortiert. Die Reinheit der sortierten Leukozyten wurde im Anschluss an die Sortierung im Durchflußzytometer Canto II getestet. Proben mit einer Reinheit von >95% haben die Qualitätskontrolle passiert und wurden für Folgeexperimente verwendet.

Die Analyse der Daten erfolgte mit den Programmen FACS Diva und FlowJo.

3.4.3 Isolierung myeloider Blutzellen zur Sortierung am Durchflußzytometer

Um Monozyten und neutrophile Granulozyten aus murinem Vollblut zur Sortierung am Durchflußzytometer aufzureinigen, wurden die Blutproben nach Entnahme in EDTA (0,5M) in 1ml 2% Dextransulfat gegeben und anschließend mit 2% Dextransulfat auf 10ml aufgefüllt. Nach einmaligem Invertieren der Probe wurde diese für 30min bei RT ruhig stehend inkubiert. Dadurch setzten sich absterbende Erythrozyten am Boden ab.

Anschließend wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und für 5min bei 400g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 3ml Erythrozyten-Lysispuffer gelöst und bei Raumtemperatur inkubiert bis das Blut nicht mehr trüb war – maximal jedoch für 10min. Die lysierte Probe wurde für 5min bei 400g zentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Das resultierende weiße Pellet wurde in 200 μ l Säulenpuffer gelöst und für die FACS-Sortierung mit Antikörpern gegen CD11b und Ly6G gefärbt.

Die nach einer standardisierten Gating-Strategie sortierten CD11b⁺, Ly6G⁻-Monozyten, sowie die CD11b⁺, Ly6G⁺-neutrophile Granulozyten (Abb. 3.1) wurden im Verlauf der Sortierung in getrennten Reaktionsgefäßen, die Säulenpuffer enthielten, gesammelt. Zur Isolierung von RNA aus den zu sortierenden Zellen wurden diese direkt in Lysis-Puffer (RLT+ β -Mercaptoethanol; RNAesy Micro Kit) gesammelt. Anschließend wurden die Lysate entweder bei -80°C konserviert oder unmittelbar zur Isolierung von RNA eingesetzt.

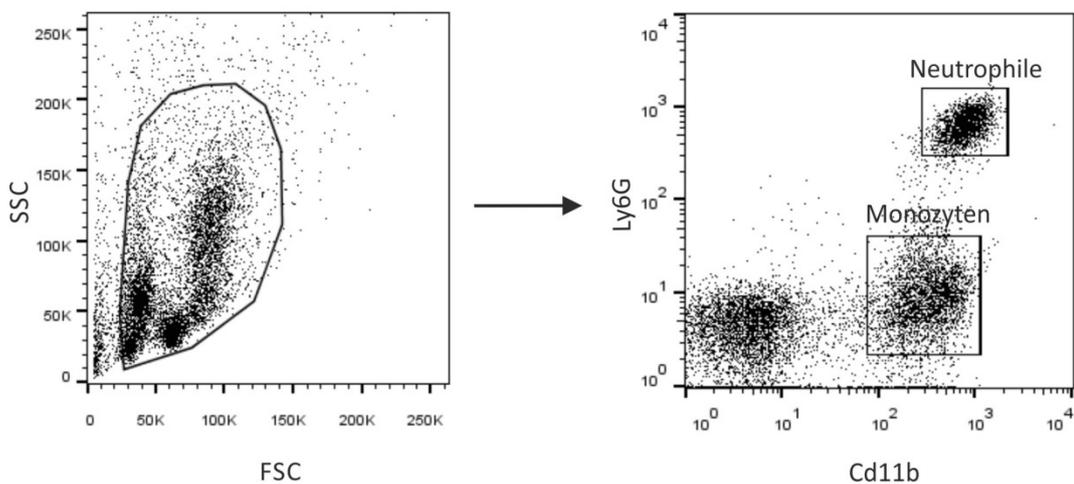


Abb. 3.1 Exemplarischer Dot Plot mit Gating-Strategie zur Isolierung von myeloiden Zellen aus Mausblut

Myeloide Zellen wurden aus frischem murinem Blut isoliert. Nach dem Gating auf Zellen mit dem charakteristischen „Side Scatter“ (SSC) und „Forward Scatter“ (FSC) für myeloide Zellen (linker Dot Plot) wurden Monozyten als CD11b⁺, Ly6G⁻ Zellen und neutrophile Granulozyten (Neutrophile) als CD11b⁺, Ly6G⁺ Zellen identifiziert (rechter Dot Plot).

3.4.4 Isolierung residenter peritonealer Makrophagen zur Sortierung am Durchflusszytometer

Zur Isolierung einer reinen Makrophagenpopulation aus dem Peritoneum wurden die frisch aus der Maus entnommenen residenten peritonealen Zellen wie in Kapitel 3.3.6 beschrieben aufgereinigt und anschließend für die Sortierung am Durchflusszytometer mit Antikörpern gegen CD11b und F4/80 gefärbt. Die nach einer standardisierten Gating-Strategie (Abb. 3.2) sortierten $CD11b^+$, $F4/80^+$ rpMP wurden im Verlauf der Sortierung in Reaktionsgefäße, die Säulenpuffer enthielten, gesammelt.

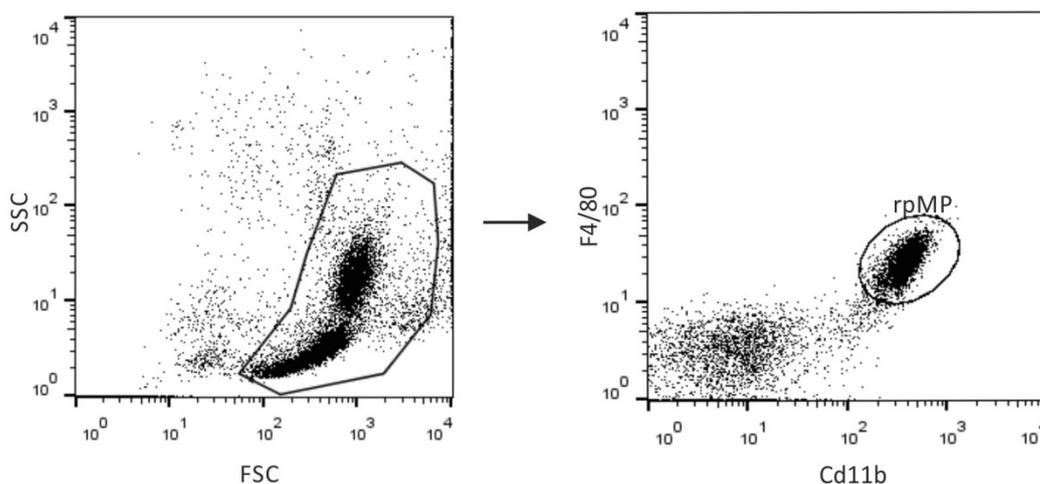


Abb. 3.2 *Exemplarischer Dot Plot mit Gating-Strategie zur Isolierung residenter peritonealer Makrophagen*

Residente peritoneale Makrophagen (rpMP) wurden aus frisch isolierter peritonealer Flüssigkeit isoliert. Nach dem Gating auf Zellen mit dem charakteristischen „Side Scatter“ (SSC) und „Forward Scatter“ (FSC) rpMP (linker Dot Plot) wurden die Makrophagen als $CD11b^+$, $F4/80^+$ Zellen identifiziert (rechter Dot Plot).

Um frisch sortierte rpMP weiter zu kultivieren, wurden jeweils $0,5 \times 10^6$ Zellen in DMEM-F12-10 Medium resuspendiert und in Suspensionskulturplatten ausgesät. Nach 2-4h in Kultur bei 37°C und 5% CO_2 waren die Makrophagen adhärent und das Medium konnte gewechselt werden. Die Inkubation mit Wachstumsfaktoren, Agonisten und Antagonisten erfolgte wie angegeben für eine Dauer von 4-24h.

Für die Verwendung dieser Zellen in qRT-PCR-Experimenten wurden die Zellen in Säulenpuffer gesammelt und für 5min bei 400g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Lysis-Puffer (RLT+β-Mercaptoethanol; RNAesy Micro Kit) resuspendiert und das Lysat entweder bei -80°C konserviert oder unmittelbar zur Isolierung von RNA eingesetzt.

3.4.5 Isolierung von myeloiden Zellen aus atherosklerotischen Plaques der Aorta

Die mit Ketamin (120mg/kg) und Xylazin (16mg/kg) narkotisierten Mäuse wurden mit 12ml PBS + Heparin (20U/ml) über den linken Ventrikel perfundiert. In den dann toten Tieren wurden Herz und Aorta freigelegt und die Aorta oberhalb des Sinus vom Herzen getrennt. Die Aorta wurde in PBS auf Eis aufbewahrt.

Zur Isolierung der Zellen aus der Aorta wurde diese in zwei Schritten verdaut. Zunächst wurde die intakte, ganze Aorta in 1ml PBS + 312,5U/ml Collagenase II und 5,6U/ml Elastase für 5min bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde die Adventitia entfernt, die Aorta in eiskaltem PBS gewaschen und für einen weiteren Verdau in 1ml PBS + 125U/ml Collagenase XI + 60U/ml Hyaluronidase I + 60U/ml DNase I und 450U/ml Collagenase I überführt. Um den Verdau des Gewebes zu erleichtern, wurde die Aorta dafür in kleine Stücke zerschnitten und für 40-60min bei 37°C schüttelnd inkubiert.

Die entstandene Zellsuspension wurde über ein Zellsieb (70µm) gefiltert und 1x in Säulenpuffer gewaschen. Die Zellen wurden für 5min bei 400g und 4°C sedimentiert und in 100µl Säulenpuffer für die Oberflächenmarker CD45, CD11c, CD11b und Ly6G gefärbt. Nach einem erneuten Waschschrift in Säulenpuffer wurden die Zellen zur Verwendung im Durchflußzytometer-Sorter JSAN junior in 1ml Säulenpuffer gelöst und über ein Zellsieb (70µm) vereinzelt. Alle CD45⁺, CD11b⁺/c⁺, Ly6G⁻ Zellen wurden als aortale Makrophagen (aoMP) aus der Suspension heraussortiert (Abb. 3.3).

Für die Verwendung dieser Zellen in qRT-PCR-Experimenten wurden die Zellen direkt in Lysis-Puffer (RLT+β-Mercaptoethanol; RNAesy Micro Kit) gesammelt. Anschließend wurden die Lysate entweder bei -80°C konserviert oder unmittelbar zur Isolierung von RNA eingesetzt.

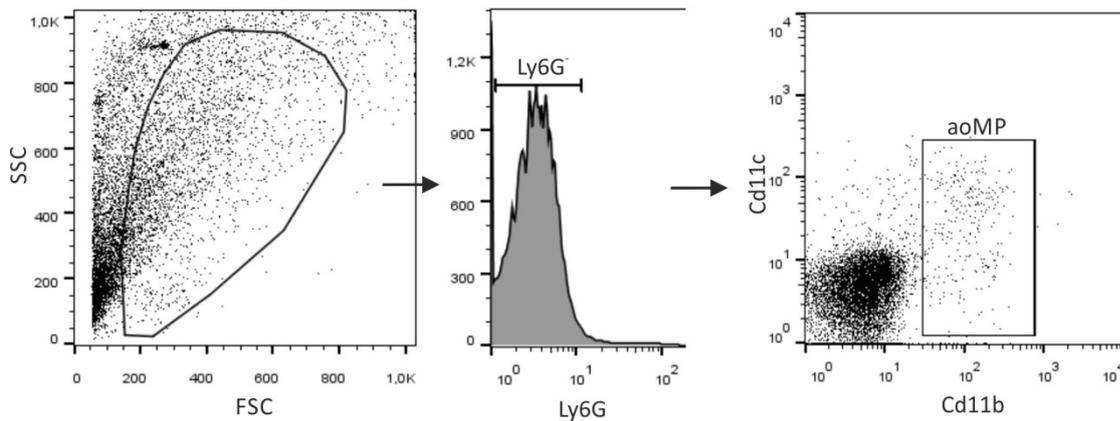


Abb. 3.3 Exemplarischer Dot Plot mit Gating-Strategie zur Isolierung von Makrophagen aus der Aorta

Aortale Makrophagen (aoMP) wurden aus frisch isolierten Aorten isoliert. Nach dem Gating auf Zellen mit dem charakteristischen „Side Scatter“ (SSC) und „Forward Scatter“ (FSC) rpMP (linker Dot Plot) wurden die CD45⁺ Makrophagen als Ly6G⁻ (mittlerer Dot Plot) und CD11b⁺/c⁺ (rechter Dot Plot) identifiziert.

3.4.6 Anreicherung residenter peritonealer Makrophagen durch magnetische Zellsortierung (MACS)

Um rpMP anzureichern und sie gleichzeitig von peritonealen B-Zellen abzutrennen wurden CD45R/B220 Microbeads nach Herstellerangaben verwendet. Bei Microbeads handelt es sich um mit Antikörpern konjugierte magnetische Partikel, die Zellen durch Bindung an Oberflächenantigene markieren. Die Separierung der markierten Zellen erfolgt dann über eine Säule in einem magnetischen Feld. Zur Negativselektion von rpMP wurden 1×10^7 peritoneale Zellen nach Isolierung durch Lavage mit 10 μ l CD45R/B220 Microbeads für 15min bei 4°C inkubiert. Die nun markierten B-Zellen wurden mit Hilfe eines Magneten von unmarkierten Makrophagen getrennt und durch Waschen der magnetischen Säule mit Säulenpuffer wurden die rpMP herausgespült.

3.4.7 Analyse der Produktion von TNF α in residenten peritonealen Makrophagen

Frisch isolierte rpMP wurden zunächst in einer Konzentration von 1×10^6 in 6-well Suspensionsplatten ausgesät und 4h bis zur Adhärenz bei 37°C und 5% CO₂ in DMEM-F12-10 complete Medium kultiviert. Die Zellen wurden daraufhin für weitere 4h mit Lipopolysacchariden (LPS; 1 μ g/ml) stimuliert. Um die Sekretion der Zellen über den Golgi-Apparat und die damit verbundene Ausschüttung von nun produziertem TNF α zu blockieren, wurde das Medium mit Monensin (2 μ M) angereichert. Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen mit 1ml PBS gewaschen und mit Cell Stripper von der Zellkulturschale abgelöst. Nach dem Waschen in 1ml PBS wurden die Zellen für die Analyse im Durchflusszytometer resuspendiert und gefärbt.

3.4.8 Analyse der Morphologie primärer Zellen

Die morphologische Charakterisierung primärer Zellen erfolgte anhand der Vermessung des Zelldurchmessers sowie die Bestimmung der Anzahl und Länge von Zellfortsätzen mit Hilfe der Analysesoftware ImageJ. Alle Filopodien, die länger als der maximale Durchmesser des Zellkörpers waren, wurden als "lang" eingestuft und nach diesem Kriterium quantifiziert. Pro Bedingung wurden 3-5 Sichtfelder systematisch analysiert.

3.4.9 2D Migration peritonealer Makrophagen (Videomikroskopie)

Zur Untersuchung des chemotaktischen Verhaltens peritonealer Makrophagen wurden diese nach Protokoll (siehe Kapitel 3.3.6) isoliert und in Medium (DMEM/F12-10) resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension, die 1×10^7 Zellen/ml enthielt, wurden jeweils 6 μ l in eine Beobachtungseinheit einer 2D-Migrationskammer nach Anleitung des Herstellers gefüllt. Nach 24h wurde den adhärenz gewordenen Zellen in der Migrationskammer das Serum für 16h entzogen. Dazu wurde das Medium (DMEM-F12-10) durch serumfreies Medium (DMEM-F12) ausgetauscht. Anschließend erfolgte das Befüllen eines der Reservoirs mit einer chemotaktisch wirksamen Substanz. Innerhalb der Beobachtungseinheit entstand durch Diffusion ein stabiler, konzentrationsabhängiger Gradient der entsprechenden Substanz.

Die Beobachtung der chemotaktisch stimulierten Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 16h bei 37°C und 5% CO₂ mit Hilfe des „Live cell imaging system IX81“. Dabei wurden im Abstand von 5min jeweils 3 Bilder in jeder Beobachtungseinheit mit einer 16-fachen Vergrößerung aufgenommen und diese zur Auswertung als Bilderstapel gespeichert. Mit Hilfe der Software ImageJ und den Plugins „Manual Tracking“ und „Chemotaxis and Migration Tool“ wurde nach Anleitung des Herstellers ibidi die Migration der Makrophagen analysiert. Die Darstellung der Migration einzelner Zellen erfolgte in so genannten „Migration Plots“.

3.4.10 Einzelzell-Isolierung und Analyse residenter peritonealer Makrophagen

Die Isolierung einzelner, frisch isolierter rpMP erfolgte mit Hilfe des Systems „C1“ von Fluidigm. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der hydraulischen Lenkung winziger Flüssigkeitsmengen und zählt somit zu den so genannten „Microfluidics“-Technologien. Dadurch wird es möglich, aus einer Zellsuspension einzelne Zellen in einzelnen Reaktionskammern zu isolieren und diese dann zu RNA und cDNA zu verarbeiten. Insgesamt können pro „C1“-Chip (5-10µm) 96 einzelne Zellen prozessiert werden. Durch die Zugabe von verschiedenen Reagenzien (Single Cell to C₁ Kit) nach Protokoll des Herstellers konnten die Zellen separat lysiert und die RNA jeder einzelnen Zelle isoliert werden. Durch die Zugabe von Primern für ausgewählte Gene (Delta Gene Assay Primer aus Tabelle 3.1, finale Konzentration entspricht 500nM) konnte die RNA der Zellen gezielt amplifiziert und daraus cDNA synthetisiert werden. Diese Prozesse wurden alle auf dem „C1“-Chip durchgeführt, der sich dafür im Gerät „C1“ befand.

Zur Analyse der Genprodukte der zuvor vereinzelter Zellen wurde die produzierte cDNA für eine sich anschließende qRT-PCR auf einen weiteren Chip, den so genannten „Dynamic Array IFC“ (96.96) gegeben. Nach Zugabe der Delta Gene Assay Primer (Tabelle 3.1, finale Konzentration entspricht 500nM) für die bereits vervielfältigten Gene und der Substanz „Sso-Fast EvaGreen“ (2-fach) nach Herstelleranleitung konnte dann eine qRT-PCR in einem Maßstab von 96 Proben (cDNA) zu 96 Genen (Delta Gene Assays) durchgeführt werden. Die Reaktion dieses Hochdurchsatz-Assays fand im so genannten „BioMark“ statt, einem RT-PCR-Gerät. Die Auswertung der Genexpressions-

analyse erfolgte mit Hilfe der Software Fluidigm Real Time PCR Analysis Software Version 3.

Die Identifikation der einzelnen Zellen als rpMP erfolgte durch die Analyse der Gene für CD11b (*Itgam*) und F4/80 (*Emr1*). Als so genannte „house keeping“- Gene wurden *HPRT* und β -actin (*Actb*) getestet.

Tabelle 3.1 Delta Gene Assay Primer

Gen	Sequenz (vorwärts; 5'→3')	Sequenz (rückwärts; 5'→3')
<i>Actb</i>	ccctaaggccaaccgtgaaa	cagcctggatggctacgtac
<i>Adra1a</i>	gagaagaaagccgccaagac	gtggcttgaaattcggaagaa
<i>Agtr1a</i>	taactcacagcaaccctcca	tctgggttgagttggtctca
<i>Ednr</i>	cataggacctgcatgctcaac	aaagagccaccagtccttca
<i>Ednrb</i>	ccctttcagaaaacagccttca	gcggcaagcagaagtagaaa
<i>Emr1</i>	acagctgtacctgtcaacca	acgtctcgagtcacacattca
<i>F2r</i>	gcggtcccttgctgtctt	tcaccgtagcatctgtcctct
<i>F2r13</i>	tgatgtagagagtaccaggggaa	tactgtcgttggcacagaa
<i>Gpr132</i>	cctgtgctgcctcagga	ccttgtgaaggaggctctg
<i>Hprt</i>	cagtacagccccaaaatggta	agtctggcctgtatccaaca
<i>Itgam</i>	aagcagctgaatgggaggac	gcccattggttttgtgaaaca
<i>Lpar1</i>	agttctggaccaggaggaa	ccggagtccagcagacaataa
<i>Lpar2</i>	gggtctcagtcctgcttcaa	aagccgatggctctcgttgta
<i>Lpar3</i>	cgagggcatgcgacag	gtcatagtgacactcattcatggt
<i>Lpar4</i>	agtgcgagttgccagtttac	cagacgatcagagagttcctca
<i>P2ry2</i>	gagcatcctcaccacctcaa	ggtgctattccagggttcca
<i>P2ry6</i>	ccaaatctggcacttctccta	ctgcctgtcagcctttccta
<i>S1pr2</i>	tgctttgccacccttaact	cagcacctccctccgaag
<i>S1pr3</i>	gccctagacgggagtctta	actgcgggaagagtggtgaaa

Gen	Sequenz (vorwärts; 5'→3')	Sequenz (rückwärts; 5'→3')
<i>Smo</i>	aggcagccagcaagatcaa	ggatgatgagcacaagccaaa
<i>Tbxa2r</i>	ttcagctcgtgggcatca	caggtggtgtctgcaaaaa

3.5 Histologische Methoden

3.5.1 Vorbereitung von Organen für Gefrierschnitte

Zur histologischen Analyse von Organen wurden diese aus toten Tieren, die zuvor mit PBS und 4% PFA perfundiert wurden, entnommen. Die isolierten Organe wurden über Nacht in 4% PFA und für weitere 24h in 30% Sucrose inkubiert. Die Organe wurden zum Schutz des Gewebes in Tissue-Tek O.C.T eingebettet und über Nacht bei mindestens -20°C tiefgefroren. Anschließend wurden die Organe am Cryotom in 8µm dünne Scheiben geschnitten und auf Adhäsionsobjektträgern gesammelt. Die histologischen Schnitte wurden ebenfalls bei -20°C gelagert.

3.5.2 Standard-Immunhistochemie an Gefrierschnitten (IHCfr)

Zur Färbung der Gefrierschnitte, wurden diese zunächst für 10min bei RT getrocknet und für weitere 10min in 4% PFA fixiert. Die Schnitte wurden zweimal in eiskaltem 50mM Glycin in PBS und 1x in PBS für jeweils 5min gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte in 0,1% Triton X-100 in PBS für 10min permeabilisiert und für weitere 30min in 4% Kälberserum (FBS) die unspezifischen Bindungen blockiert. Bei 4°C und über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper in einer Konzentration von 1:100 in 0,1% Triton X-100 in PBS und 2% FBS. Die Schnitte wurden dann 3x in PBS mit 1% Kälberserum gewaschen und für 1h mit einem geeigneten Zweitantikörper (1:200) in PBS mit 1% Kälberserum bei RT inkubiert. Schließlich wurden die Kerne der Zellen noch mit DAPI (1:10.000) für 20min bei RT angefärbt und die Schnitte erneut 3x in PBS gewaschen. Ab der Inkubation mit dem Zweitantikörper, der an einen fluoreszenten Farbstoff gekoppelt ist, wurden die Schnitte lichtgeschützt bearbeitet. Die so prozessierten Gefrierschnitte wurden zur Konservierung mit dem Einbettmedium

Fluomount W eingedeckelt und über Nacht bei 4°C getrocknet und ebenfalls bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Mit Hilfe eines SP5 Konfokalmikroskops konnten Bilder der fluoreszent gefärbten Gewebeschnitte aufgenommen werden. Die Quantifizierung erfolgte jeweils an 3-5 zufällig ausgewählten Regionen pro Schnitt. Darin wurden die fluoreszenten Zellen gezählt und für das gesamte Sichtfeld mit Hilfe der Analysesoftware ImageJ berechnet.

3.5.3 Oil-Red-O (ORO)-Färbung

Zur Analyse der Lipide in atherosklerotischen Plaques wurden die Aortenwurzel und die Aorta mit ORO-Lösung gefärbt. Die Gefrierschnitte der Aortenwurzel wurden hierfür zunächst aufgetaut und für 10min bei RT getrocknet.

Für die ORO-Färbung wurde das Gewebe für 1min in 60% Isopropanol inkubiert und anschließend für 15 min mit der ORO-Arbeitslösung gefärbt. Überschüssige Färbelösung wurde durch kurzes Spülen mit 60% Isopropanol entfernt. Es folgte ein weiterer Waschschrift in 60% Isopropanol für 10min. Durch Spülen in entionisiertem Wasser wurde der Isopropanol schließlich ausgewaschen und die Gewebe in flüssiger Kaiser's Glycerolgelatine auf einem Objektträger eingebettet. Die Aorta wurde mit ihrer Innenseite nach oben orientiert.

3.5.3.1 Quantifizierung der ORO-Lipidfärbung

Zur Analyse der Größe der atherosklerotischen Läsionen in der Aorta und in der Aortenwurzel wurden zunächst mit Hilfe eines Mikroskops einzelne Fotos gemacht (20-fach Vergrößerung) und daran die Gesamtfläche der Aorta bzw. der Wurzel und die Gesamtfläche der ORO-gefärbten Plaques mit Hilfe von ImageJ vermessen. Die Vermessung der Läsionen im Sinus erfolgte nur an seriellen Schnitten, in denen alle 3 Aortenklappen sichtbar waren. Die Größe der Läsionen wurde als Anteil der Gesamtfläche der Aorta bzw. der Aortenwurzel dargestellt.

3.5.4 Nachweis natürlicher Antikörper (IgM) in der Aortenwurzel

Die immunhistochemische Färbung natürlicher Antikörper vom Typ Immunglobulin M (IgM) in der Aortenwurzel atherosklerotischer Mäuse erfolgte an Gefrierschnitten. Diese wurden nach dem Auftauen in eiskaltem Methanol für 10min bei -20°C fixiert. Zur Reduktion von unspezifischen Färbereaktionen wurde in den Gewebeschnitten die endogene Peroxidase durch Inkubation in 1% H₂O₂ in PBS/Methanol (1:1) für 5min blockiert. Die so vorbereiteten Schnitte wurden über Nacht mit einem biotinylierten anti-mouse T15/AB1-2 Antikörper bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen der Schnitte in PBS für 3x 5min erfolgte die Inkubation mit dem nach Protokoll angesetzten ABC-Reagenz. Die abschließende Reaktion mit Diaminobenzidin (DAB) erfolgte ebenfalls nach Protokoll. Nach 3min wurde die Färbung durch Waschen der Schnitte in Leitungswasser abgebrochen. Die Schnitte wurden anschließend direkt für 30s in Hämatoxylin gefärbt, um so die Zellkerne im Gewebe sichtbar zu machen. Die in 70-96% Ethanol entwässerten Schnitte wurden mit dem Einbettmedium Pertex eingedeckelt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

3.6 Proteinbiochemische Methoden

3.6.1 ELISA

3.6.1.1 Bestimmung der Titer natürlicher Antikörper und oxidations-spezifischer Epitope im Maus-Plasma

Der Gehalt natürlicher Antikörper in murinem Plasma wurde mit Hilfe eines chemilumineszenten „Enzym-linked Immunosorbent assay“ (ELISA) in Anlehnung an eine bereits beschriebene Methode (Chou, Fogelstrand et al. 2009) gemessen.

3.6.1.2 IgM-Gesamtgehalt im Plasma

Zunächst wurden für ELISA geeignete Multiwell-Platten mit jeweils 40µl eines µ-Ketten spezifischen Ziege-anti-Maus IgM (2µg/ml) über Nacht bei 4°C beschichtet. Nachdem dieser Bindungsantikörper mit PBS gewaschen wurde, folgte die Blockierung unspezifischer Bindestellen durch die Inkubation mit 1% BSA-TBS für 1h bei RT. Bevor im Anschluss die Plasmaproben in Triplikaten aufgetragen wurden, wurde erneut mit

PBS gewaschen. Zur Erstellung der Standardkurve wurde zunächst eine Verdünnungsreihe des Maus-IgM-Isotypen angesetzt. Dazu wurde der Isotyp mit einer Ausgangskonzentration von 50ng/ml in 7 Schritten jeweils 2-fach bis 0,78125ng/ml verdünnt und in Duplikaten aufgetragen. Proben und Isotyp-Verdünnungen wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur späteren Detektion des gebundenen IgMs der Plasmaproben wurde nach einem weiteren Waschschrift mit PBS 40µl des Sekundärantikörpers (µ-Ketten spezifischer Ziege anti-Maus IgM; AP-markiert) in einer Verdünnung von 1:20.000 in 1% BSA-TBS auf die Proben gegeben und für weitere 2h bei RT inkubiert. Daraufhin wurden die Proben mit TBS gewaschen und für 1h im Dunkeln mit jeweils 25µl des 33%igen Lumiphos Plus Reagenz bei Raumtemperatur gelagert. Das durch die Reaktion der alkalischen Phosphatase entstandene chemilumineszente Signal wurde in einem Plattenlesegerät für Multiwell-Platten gemessen und als relative Einheiten angegeben. An Hand der gemessenen Standardwerte konnte die Menge natürlicher Antikörper in den Plasmaproben berechnet werden.

3.6.1.3 Analyse der Titer für IgG, MDA-LDL, CuOx-LDL und AB1-2 (anti-T15/E06) im Plasma

Die Durchführung des ELISA für oxidations-spezifische Epitope erfolgte wie in der Literatur beschrieben (Binder, Horkko et al. 2003). Die verwendeten Antigene zur Bindung der Antikörper gegen MDA-LDL und CuOx-LDL wurden aus humanem LDL generiert (Yla-Herttuala, Palinski et al. 1989) und nach standardisierten Bedingungen im Labor von Prof. Christoph J. Binder am Institut für medizinische und klinische Labordiagnostik der Medizinischen Universität Wien, Österreich, hergestellt. Mit einer Konzentration von 5µg/ml wurde sie in eine ELISA-geeignete 96-Multiwell-Platte vorgelegt. Als Bindeantikörper für das Epitop T15/E06 wurde der gereinigte Antikörper AB1-2 (HB33) mit einer Konzentration von 2µg/ml eingesetzt. Die Beschichtung mit den Bindeantikörpern erfolgte über Nacht bei 4°C. Zur Detektion der gebundenen Antikörper wurden die Sekundärantikörper (µ-Ketten spezifischer Ziege anti-Maus IgM; γ-Ketten spezifischer Ziege anti-Maus IgG; AP-markiert) in einer Verdünnung von 1:20.000 in 1%BSA-TBS/EDTA verwendet. Die umgesetzte alkalische Phosphatase

wurde wie oben beschrieben gemessen und die Konzentration der Titer durch Bezug auf die Positivkontrolle ermittelt.

Die Bestimmung der Plasma-Titer sowie die Herstellung der spezifischen LDL-Antigene wurden von Frau Maria Oszvar Kozma im Labor von Prof. Christoph J. Binder am Institut für medizinische und klinische Labordiagnostik der Medizinischen Universität Wien, Österreich, durchgeführt.

3.6.1.4 Bestimmung von aktiviertem RhoA/Rac1 im Lysat primärer Zellen

Um aktiviertes RhoA/Rac1 in rpMP und in kmMP mit Hilfe des absorptions-basierten RhoA/Rac1 G-LISAs zu bestimmen, wurden die adherenten Zellen zunächst bei einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ /ml für 18h in Serum-freiem Medium kultiviert. Auf einer auf 37°C erwärmten Platte wurden die Kulturschalen einzeln zunächst 1min inkubiert um anschließend für 1min entweder mit 10% FBS oder $0,1\mu\text{M}$ Lysophosphatidsäure (LPA) stimuliert zu werden. Die Zellen wurden nach Anleitung des Herstellers lysiert und geerntet. Das durch Zentrifugation geklärte Lysat wurde umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren und später bei -80°C gelagert oder direkt zur Durchführung der G-LISAs nach Herstelleranleitung verwendet.

3.6.2 Bestimmung von Cholesterol in Plasma

Die Bestimmung des Gesamtgehaltes von Cholesterol in Tieren, die auf HFD gehalten wurden, erfolgte an Plasma. Dazu wurde das Kit „Cholesterol Assay“ nach der CHOD-PAP-Methode nach Herstellerangaben eingesetzt. Bei dieser Methode wird das Cholesterol durch das Enzym Cholesterol-Oxidase (CHOD) umgesetzt, wobei Wasserstoffperoxid entsteht. Dadurch kann im Folgenden aus Phenol und der Substanz 4-Aminophenazon (PAP) im Rahmen einer katalytischen Reaktion ein roter Farbstoff entstehen, dessen Intensität ein Maß für die umgesetzte Cholesterolmenge darstellt. Die Vermessung der Farbstoffstärke erfolgte mit einem Plattenlesegerät für Multitwell-Platten bei einer Wellenlänge von 546nm.

3.6.3 Western Blot

Primäre Zellen wurden bei einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ /ml in 100µl Triton-X Lysis Puffer mit PMSF (1mM) auf Eis resuspendiert und anschließend für 10min bei 4°C homogenisiert. Zur Entfernung von nicht-homogenisiertem Gewebe und Zellkernen, wurden die Proben für 10min bei 4°C und 14.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C aufbewahrt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde frisch isolierter Überstand verwendet. Gleiche Proteinmengen wurden dann zur Elektrophorese auf 10% SDS-Page-Gele aufgetragen und mit Hilfe eines Semi-Dry-Verfahrens in Transferpuffer auf Nitrozellulose-Membranen übertragen. Zur Blockierung unspezifischer Bindestellen wurde die Membran für 2h in 5% Trockenmilchpulver in TBST inkubiert. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte über Nacht bei 4°C entweder in 5% Trockenmilchpulver oder Blockierlösung. Nach drei zehnminütigen Waschschritten der Membran in TBST wurde die Membran für 1 h bei RT mit einem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper (1:3000) in 5% Trockenmilchpulver in TBST inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal in TBST gewaschen. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde die Membran mit besonders sensitivem ECL-Substrat nach Angaben des Herstellers behandelt und die chemilumineszente Reaktion durch Auflegen eines medizinischen Röntgenfilms gezeigt.

Die Quantifizierung der Bandenintensitäten erfolgte mit der Software ImageJ.

3.6.4 Analyse von S1P mit LC-MS/MS

Die Bestimmung des Gehaltes von S1P in peritonealer Flüssigkeit oder Überständen von kultivierten Makrophagen erfolgte mit Hilfe von flüssigchromatographischer Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) wie beschrieben (Schmidt, Schmidt et al. 2006). Die Analysen wurden von Frau Dr. Nerea Ferreiros Bouzas im Labor von Prof. Geisslinger am Institut für klinische Pharmakologie des Klinikums der Goethe-Universität, Frankfurt am Main, durchgeführt.

3.7 In vitro Methoden

3.7.1 Isolierung von RNA aus primären Mauszellen

Zur Isolierung von RNA wurden die Zellen für 5min bei 400g und 4°C zentrifugiert und in RLT+ β -Mercaptoethanol lysiert. Anschließend wurden die Zellen entweder bei -80°C konserviert oder unmittelbar zur Isolierung von RNA eingesetzt. Hierfür wurde bei geringen Mengen bis zu $0,5 \times 10^6$ Zellen das RNAesy Micro-Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Für größere Zellmengen wurde das RNAesy Plus Mini-Kit verwendet. Es erfolgte in jedem Fall ein DNase-Verdau auf der Säule nach Protokoll des Kits.

3.7.2 Synthese von cDNA aus RNA

Isolierte RNA wurde mit Hilfe des ProtoScriptII Reverse Transcription Kit nach Protokoll des Herstellers in cDNA umgeschrieben.

RNA aus primären myeloiden Zellen der Aorta wurde zunächst unspezifisch präamplifiziert und anschließend in cDNA transkribiert. Dies erfolgte mit Hilfe des Ovation Pico WTA System V2 Kit nach Herstellerangaben.

3.7.3 qRT-PCR

Zur Genexpressionsanalyse wurde das LightCycler 480 II Probes Master System verwendet. Alle Primer zur Detektion muriner Gene und die dazu gehörigen Probes aus der „Universal Probe Library“ wurden online über Primer-BLAST und das „Assay Design Center“ mit Hilfe der Software „ProbeFinder“ ermittelt und sind in der Tabelle 3.2 aufgelistet. Für jede quantitative Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) wurden 3ng cDNA eingesetzt und ein Standard-PCR-Programm mit 55 Zyklen gefahren. Die gezeigten Daten wurden auf die Expression von β -actin (*Actb*) oder *Gusb* normalisiert. Die Basalwerte wurden auf einen Wert von 1 gesetzt.

Tabelle 3.2 Primer für qRT-PCR

Gen	Sequenz (vorwärts; 5'→3')	Sequenz (rückwärts; 5'→3')	Probe
<i>Abca1</i>	tcctgaagctgaccaaggac	agccctgcatgaacctt	66
<i>Abcg</i>	tctttgatgagcccaccagt	gggccagtctttcatca	38
<i>Actb</i>	ctaaggccaaccgtgaaaag	accagaggcatacagggaca	64
<i>Arg1</i>	gaatctgcatgggcaacc	gaatcctggtacatctgggaac	2
<i>CCI3</i>	caagtcttctcagccata	ggaatcttccggctgtagg	40
<i>CCI4</i>	cctctctctcttctgctgt	ggagggtcagagccatt	1
<i>CCI5</i>	tgcaaggactctgagacagc	gagtgggtgccgagccata	110
<i>CD36</i>	ttgtacctatactgtggctaaatgaga	cttgtgtttgaacatttctgctt	9
<i>CD80</i>	tcgtctttcacaagtgtcttcag	ttgccagtagattcggcttc	91
<i>CD86</i>	gaagccgaatcagcctagc	cagcgttactatcccgtct	107
<i>Chi3l3</i>	aagaacactgagctaaaaactctct	gagaccatggcactgaacg	88
<i>CXCL9</i>	ttcttttctcttgggcatc	tgagggtattgtagtggatcg	1
<i>CXCL10</i>	gctgccgtcattttctgc	tctcactggcccgtcatc	3
<i>CXCL11</i>	aagcaagctgcctcataat	gtcagggtcctggcacagag	100
<i>FCGR1</i>	tgtggcttctaacaactctgct	acagccttgggtggcattaac	60
<i>FCGR2b</i>	catctggactggagccaac	cctcagttttggcagcttct	66
<i>FCGR3</i>	tcaccatcactgtccaagacc	actaggagagaaagcagtgtggt	88
<i>Gna12</i>	gcacttcccagatttcaagg	caccaggtagcgtggac	19
<i>Gna13</i>	aagttgatggcatttgatacc	cactcagctccaccatcc	46
<i>Gusb</i>	ctctggtggccttacctgat	tcagttgtgtcacctcacct	42
<i>H2-EB1</i>	cggggctgttcatctacttc	cagccttgttacttcatctcagc	41
<i>Il1b</i>	tgtaatgaaagacggcacacc	tcttctttgggtattgcttgg	78
<i>Il6</i>	tgatggatgctaccaaactgg	ttcatgtactccaggtagctatgg	6
<i>Il10</i>	cagagccacatgctcctaga	tgtccagctggcctttgtt	41

Gen	Sequenz (vorwärts; 5'→3')	Sequenz (rückwärts; 5'→3')	Probe
<i>Il12b</i>	ttgctggtgtctccactcat	gggagtccagtccacctctac	78
<i>Il23a</i>	caccagcgggacatatgaat	gttgccttgagtccttgagg	47
<i>Infg</i>	ggaggaactggcaaaaggat	ttcaagactcaaagagtctgagg	21
<i>Itgal</i>	ccccagacttttgctactgg	cgtgtgtccagtttagctc	78
<i>Itgam</i>	caatagccagcctcagtc	gagcccaggggagaagtg	76
<i>Itgax</i>	gagccagaactccaactg	tcaggaacacgatgtcttg	18
<i>Itgb2</i>	ctggtgccagaagctgaac	gtgtcacagcgcaaggagt	2
<i>Mrc1</i>	ccacagcattgaggagttg	acagctcatcattggctca	7
<i>Msr1</i>	ggagtgtaggcggatcaaga	ggagatgatagtagggtgctctg	26
<i>Nos2</i>	tggccaccaagctgaact	ttcatgataacgtttctggctct	68
<i>Ptgs2</i>	gggagtctggaacattgtgaa	gtgcacattgtaagtaggtggact	4
<i>Scarb1</i>	gcccacatctgccaact	tcctgggagcccttttact	2
<i>Sell</i>	tgcagagagaccagcaag	cagaccacagcttcaggat	45
<i>Sphk1</i>	gacctggctatggaaccagt	tcagcagcaccagcactc	32
<i>Sphk2</i>	ctgtcaggggaccaggaa	ccaaagggattgaccaatatg	64
<i>Tnfa</i>	tcttctcattcctgcttgagg	ggctctgggcatagaactga	49

3.8 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) dargestellt. Zum Vergleich zwischen zwei unterschiedlichen Gruppen von Daten wurde mit dem Student'schen T-Test für unverbundene Stichproben die Signifikanz ermittelt. Zum Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde durch Anwendung der ANOVA und dem anschließenden Bonferroni post hoc Test die Signifikanz überprüft.

Die Anzahl von unabhängigen Experimenten oder Tieren pro Gruppe wird mit „n“ beschrieben. Die angegebenen p-Werte sind wie folgt notiert: $p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$.

4 Ziel der Arbeit

Die Funktion der $G_{12/13}$ -gekoppelten Rezeptoren wurde bereits in vielen Zelltypen, wie beispielsweise Endothelzellen oder glatten Muskelzellen, beforscht. Für Makrophagen, in denen bisher vor allen Dingen die Rolle der G_i -gekoppelten Chemokinrezeptoren untersucht worden ist, gibt es nur wenige Informationen zur Rolle der $G_{12/13}$ -vermittelten Signaltransduktion. Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es daher, die Bedeutung der $G_{12/13}$ -gekoppelten Rezeptoren speziell in Makrophagen zu verstehen. Dazu soll eine Mauslinie, die ausschließlich in myeloiden Zellen $G\alpha_{12/13}$ -defizient ist, generiert werden. Für eine umfassende Untersuchung dieser Tiere sollen sowohl physiologische als auch pathophysiologische Modelle herangezogen werden. Darüber hinaus ist es auch Ziel dieser Arbeit, die Mechanismen der $G_{12/13}$ -vermittelten Signaltransduktion durch *in vitro* Versuche an primären Makrophagen aufzuklären.

5 Ergebnisse

5.1 Bewertung der Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Tiere

Zur Untersuchung der Rolle von G $_{12/13}$ in myeloiden Zellen wurden durch die Kreuzung von Gna13^{fl/fl} und Gna12^{-/-}-Mäusen mit Tieren der LysMCre-Linie (Clausen, Burkhardt et al. 1999) zellspezifische G α_{12} /G α_{13} -KO-Tiere (DKO) generiert. Die Tiere dieser Makrophagen-spezifischen Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Linie waren lebensfähig und fertil und wurden nach einer normalen Mendel'schen-Verteilung geboren. Sie zeigten keine offensichtlichen Auffälligkeiten im äußeren Erscheinungsbild. Die Morphologie der Organe war ebenfalls unauffällig.

5.2 Beschreibung der Makrophagen-spezifischen Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Linie

Die hier verwendete, konstitutiv aktive LysMCre-Linie kann genetische Sequenzen, die von einer loxP-Sequenz flankiert werden, rekombinieren, sobald das Gen *M Lysoszym* (LysM) exprimiert wird (Clausen, Burkhardt et al. 1999). Hierbei handelt es sich um ein Gen, das ausschließlich in myeloiden Zellen und deren Vorläufern aktiv ist. Diese Cre-Linie wird bereits seit langem erfolgreich in Untersuchungen zu myeloiden Zellen verwendet. Somit handelt es sich bei dieser Cre-Linie um ein ideales Werkzeug zur Analyse von bestimmten Genen in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen.

5.3 Rekombinationseffizienz myeloider Zellen unter LysMCre-Aktivität

Zu Beginn dieser Studie wurde die Effizienz der Rekombination in den verschiedenen myeloiden Zellen untersucht. Um in neutrophilen Granulozyten, in Monozyten und Makrophagen aus unterschiedlichen Organen und aus unterschiedlichen Differenzierungsstadien den Grad der Rekombination ermitteln zu können, wurde eine weitere Mauslinie generiert. Dazu wurde die Linie der LysMCre mit der doppelt fluoreszenten Reporterlinie *Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo}/J* gekreuzt. Die durchflusszytometrische Untersuchung von Proben der Tiere dieser LysMCre-dTom-Linie ermöglichte es, innerhalb aller Subpopulationen myeloider Zellen den Anteil der rekombinierten, grün fluoreszierenden Zellen zu bestimmen (Abb. 5.1). Zur Detektion

dieser EGFP⁺ Zellen wurde eine bestimmte Gating-Strategie verwendet. Diese ist in Abb. 5.1 A am Beispiel von differenzierten Knochenmarksmakrophagen (kmMP) dargestellt.

Die Analyse der Rekombinationseffizienz ergab, dass neutrophile Granulozyten aus dem Blut mit 89-91% weitgehend rekombiniert waren. Monozyten und Makrophagen rekombinierten dagegen eher inhomogen. In undifferenzierten CD11b⁺Ly6C⁻Ly6G⁻ Monozyten aus dem Blut konnte eine Rekombinationsrate von 43% festgestellt werden. Bei der Differenzierung von kmMP wurde festgestellt, dass die Rekombinationseffizienz direkt mit der Kultivierungszeit in M-CSF-haltigem Medium und damit dem Reifegrad der kmMP zusammenhing. Nach drei Tagen Differenzierungszeit in der Zellkultur zeigten die noch unreifen Makrophagen eine Rekombination von 32%, nach 5 Tagen bereits eine Rate von 48%. Nach abgeschlossener Differenzierungszeit von 7 Tagen waren 64% der kmMP erfolgreich rekombiniert. Residente Makrophagen des Peritoneums (rpMP) stellten sich mit 92-97% als sehr gut rekombinierte Zellpopulation heraus (Abb. 5.1 B).

Um eine unspezifische Rekombination in anderen Zellen des Immunsystems auszuschließen, wurden auch B- und T-Zellpopulationen der Reportertiere auf EGFP⁺ Zellen hin überprüft. Lediglich in CD19⁺ B-Zellen des Peritoneums konnte eine minimale Rekombination von 0,5% festgestellt werden (Abb. 5.1 C).

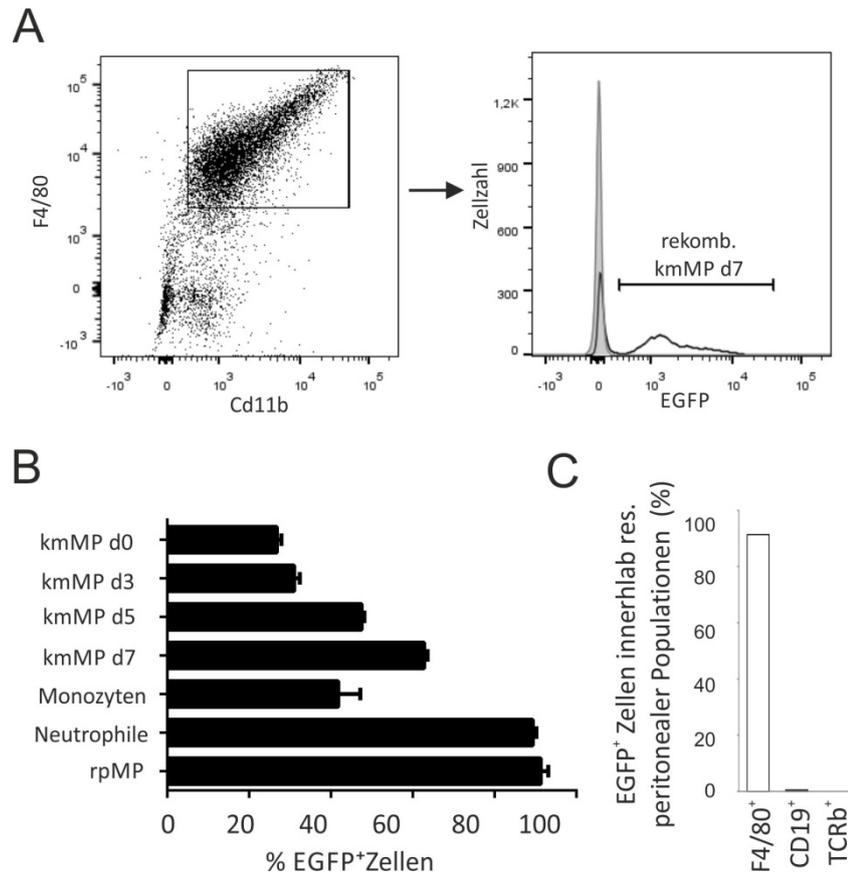


Abb. 5.1 Rekombinationseffizienz myeloider Zellen des *LysMCre-dTom-Reporters*

A: Dot Plot und Histogramm zeigen die Gating-Strategie zur Ermittlung der Rekombinationsrate des *LysMCre-dTom-Reporters* am Beispiel von kmMP, die für 7 Tage in M-CSF differenziert wurden. **B:** Anteil der rekombinierten, grün fluoreszierenden myeloiden Zellen: kmMP, die aus Knochenmark für bis zu 7 Tage (d0-d7) differenziert wurden; Monozyten und neutrophile Granulozyten (Neutrophile) aus Blut; rpMP. **C:** Anteil der rekombinierten, grün fluoreszierenden Zellen des Peritoneums: Makrophagen (F4/80⁺), B-Zellen (CD19⁺), T-Zellen (TCRβ⁺).

Cre⁻: grauer Peak; Cre⁺: weißer Peak; Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM; n=2-3.

Um zu untersuchen, wie effizient die *LysMCre* im *Lys-Gα₁₂/Gα₁₃-KO* rekombinierte, wurde die Proteinmenge für *Gα₁₃* in myeloiden Zellen aus unterschiedlichen Organen mit Hilfe von Western Blot ermittelt (Abb. 5.2). Die Detektion der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) diente hierbei zur Kontrolle der Proteinmengen. In neutrophilen Granulozyten führte die Rekombination des loxP-flankierten Gens für

$G\alpha_{13}$ zum vollständigen Verlust des Proteins $G\alpha_{13}$ (Abb. 5.2 A). Dies konnte auch für kmMP beobachtet werden (Abb. 5.2 C). In Monozyten aus Blut ließ sich noch ein Teil des Proteins $G\alpha_{13}$ nachweisen (Abb. 5.2 B). Die Analyse von rpMP ergab, dass in diesen Zellen des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO nur noch eine sehr geringe Menge des Proteins $G\alpha_{13}$ transkribiert wurde (Abb. 5.2 D). Diese Daten konnten zeigen, dass der Verlust des Gens für $G\alpha_{13}$ durch die Rekombination der LysMCre auch weitgehend zum Verlust des Proteins $G\alpha_{13}$ in den unterschiedlichen Immunzellpopulationen führte.

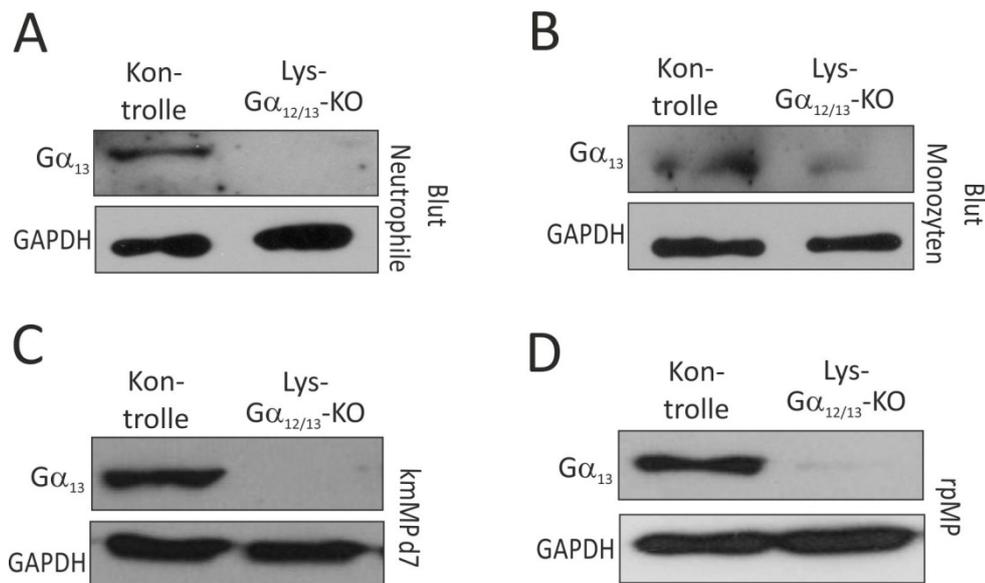


Abb. 5.2 Proteinmengen für $G\alpha_{13}$ in myeloiden Zellen des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO

A-D: Western Blot für $G\alpha_{13}$ und GAPDH in neutrophilen Granulozyten aus Blut (**A**), in Monozyten aus Blut (**B**), in kmMP, die für 7 Tage mit M-CSF differenziert wurden (**C**) und in rpMP (**D**).

5.4 Makrophagen-spezifischer Verlust von $G\alpha_{12/13}$ führt zum Anstieg peritonealer Makrophagen

Die durchflusszytometrische Untersuchung myeloider Zellen aus Blut, Knochenmark und der Milz zeigte, dass es in diesen Organen keine Unterschiede in der Anzahl der $CD45^+$ Gesamtleukozyten gab (Abb. 5.3 A-C). Auch die Zahl der Monozyten ($CD11b^+$, $Ly6G^-$) und der neutrophilen Granulozyten ($CD11b^+$, $Ly6G^+$) war in diesen Kompartimenten sehr ähnlich (Abb. 5.3 A-C).

In histologischen Präparaten der Leber von Lys-Ga₁₂/Ga₁₃-KO-Tieren konnte allerdings eine leicht erhöhte Anzahl an CD68⁺ Makrophagen festgestellt werden (Abb. 5.3 D). Auch die Lungen dieser Tiere enthielten tendenziell mehr F4/80⁺ Zellen (Abb. 5.3 E). Insbesondere aber bei der Untersuchung des Peritoneums wurden signifikant gestiegene Zahlen für CD11b⁺ Makrophagen nachgewiesen (Abb. 5.3 F).

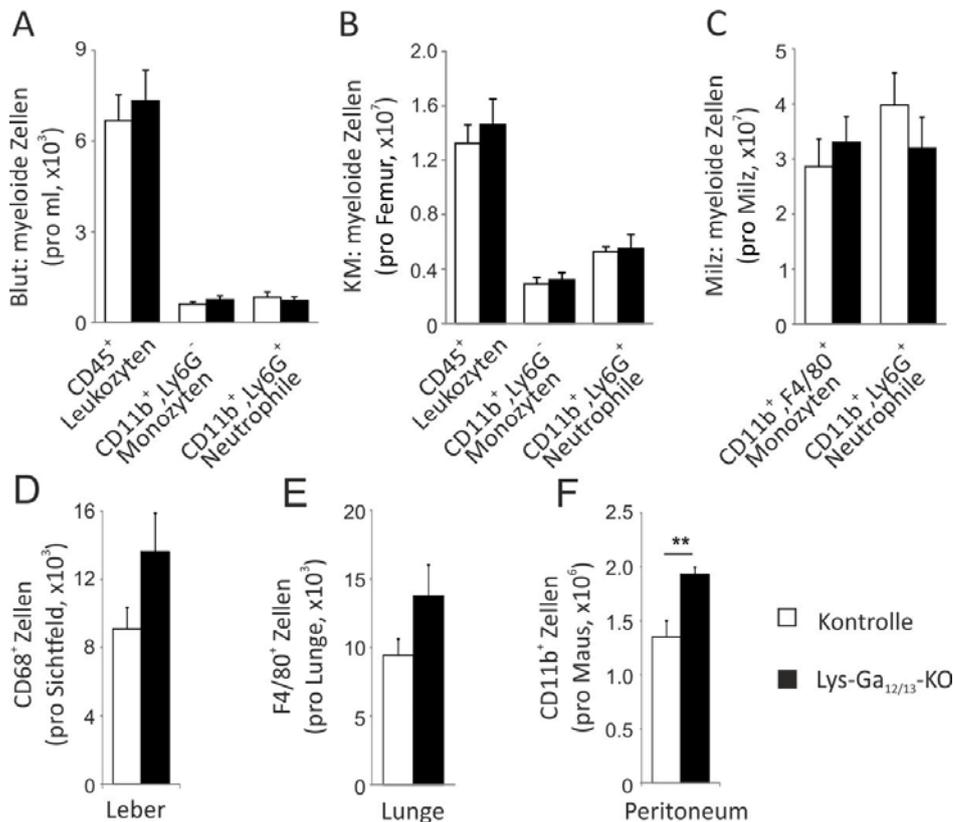


Abb. 5.3 Basale Untersuchung myeloider Zellen in Lys-Ga₁₂/Ga₁₃-KO-Tieren

A-C: Durchflußzytometrische Analyse myeloider Zellen im Blut (**A**), im Knochenmark (**B**) und in der Milz (**C**). **D:** Immunhistochemische Analyse aller CD68⁺ Zellen der Leber. **E:** Durchflußzytometrische Analyse von CD11b⁺, F4/80⁺ Zellen verdauter Lungen. **F:** Durchflußzytometrische Analyse von CD11b⁺, F4/80⁺ Zellen in peritonealer Flüssigkeit.

Kontrolle: weiß; Lys-Ga₁₂/Ga₁₃-KO: schwarz. n=6-12; Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM; n=2-3; p<0,01**.

Ob die erhöhte Anzahl peritonealer Makrophagen mit verringerter Apoptose in Verbindung gebracht werden konnte, wurde auch untersucht. Zur Bestimmung der

Apoptoserate wurden peritoneale Zellen mit Antikörpern gegen zwei wichtige Marker für Zelltod, Annexin V und 7-AAD, gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Es konnte innerhalb der CD11b⁺ Population ein Trend zwischen Lys-Gα₁₂/Gα₁₃-KO und Kontrolle in Bezug auf reduzierten programmierten Zelltod in Zellen des DKO entdeckt werden (Abb. 5.4).

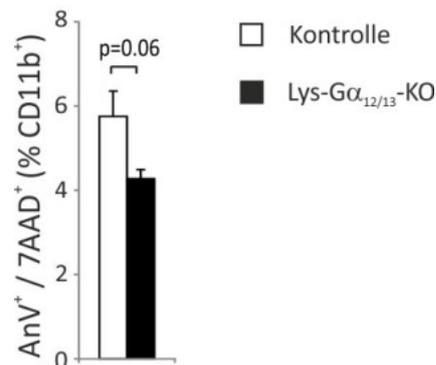


Abb. 5.4 Untersuchung von rpMP des Lys-Gα₁₂/Gα₁₃-KO auf Apoptose

Anteil (%) der AnnexinV⁺ (AnV), 7AAD⁺, CD11b⁺ rpMP wurden als apoptotische Zellen identifiziert.

Kontrolle: weiß; Lys-Gα₁₂/Gα₁₃-KO: schwarz; Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM; n=4.

5.5 Lys-Gα₁₂/Gα₁₃-KO-Tiere weisen erhöhte Zahl inflammatorischer peritonealer Makrophagen auf

Bereits im Rahmen der basalen Charakterisierung der Makrophagenpopulationen in der Lys-Gα₁₂/Gα₁₃-KO-Linie wurde in Gα_{12/13}-defizienten Tieren eine erhöhte Anzahl von CD11b⁺ Makrophagen im Peritoneum festgestellt. Im Folgenden sollten diese Zellen genauer beschrieben werden. Durch Untersuchungen peritonealer Zellen am Durchflußzytometer wurde erkannt, dass sich im Lys-Gα₁₂/Gα₁₃-KO signifikant mehr Ly6C⁺ Monozyten befanden (Abb. 5.5 B). In noch stärkerem Maße stieg die Anzahl an Makrophagen, die als CD11c⁻, Ly6C⁻, CD11b^{int} und F4/80^{low} Zellen identifiziert wurden (Abb. 5.5 B). Diese besondere Gruppe von Makrophagen wurde bereits als „small peritoneal macrophages“ (SPM) beschrieben (Ghosn, Cassado et al. 2010).

SPM entstehen aus Blut-Monozyten und sind wesentlich kleiner als die so genannten „large peritoneal macrophages“ (LPM) (Abb. 5.5 A). LPM haben ihren Ursprung im embryonalen Dottersack und entstehen damit unabhängig von Monozyten aus Knochenmark. Sie machen 90% aller peritonealen Makrophagen aus und zeichnen sich durch die Expression von $CD11b^{hi}$ und $F4/80^{hi}$ aus (Ghosn, Cassado et al. 2010). Die Anzahl der LPM in $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO und Kontrolle war ähnlich (Abb. 5.5 B).

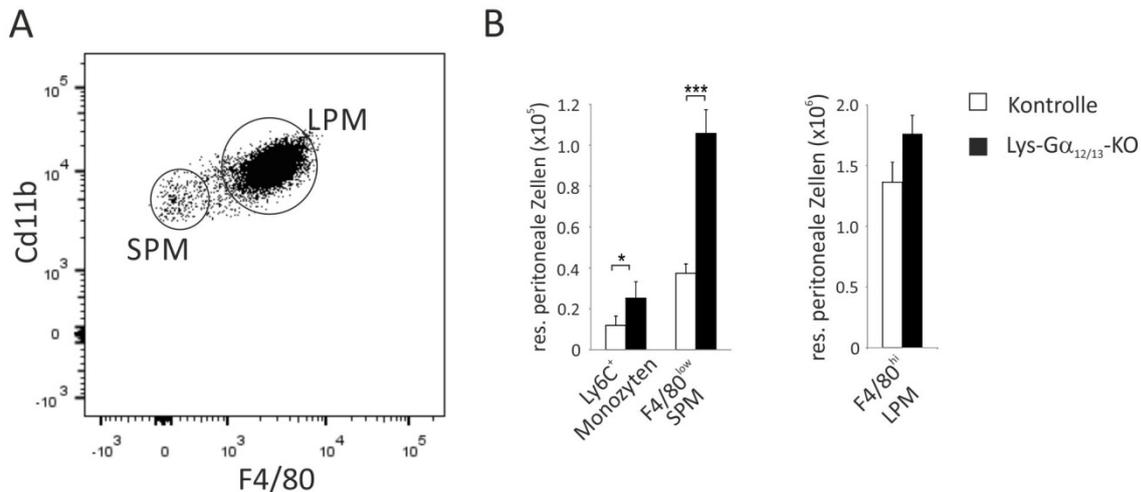


Abb. 5.5 Analyse peritonealer Makrophagenpopulationen des $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO

A: Dot Plot für SPM, die als $CD11b^{int}$, $F4/80^{low}$ Zellen identifiziert wurden und für LPM, die als $CD11b^{high}$, $F4/80^{high}$ Zellen identifiziert wurden. **B:** Durchflusszytometrische Analyse der peritonealen Monozyten und Makrophagen des $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO: $Ly6C^+$ inflammatorische Monozyten; $F4/80^{low}$ SPM; $F4/80^{high}$ LPM.

Kontrolle: weiß; $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO: schwarz. n=6-12; Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; n=5-8; $p < 0,05^*$; $p < 0,001^{***}$.

5.6 Residente peritoneale Makrophagen des $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO unterscheiden sich morphologisch und zytologisch von der Kontrolle

Der gleichzeitige Verlust der α -Untereinheiten der G-Proteine $G_{12/13}$ in Makrophagen führte in besonderem Maße in der Population der rpMP zu Veränderungen der Zellmorphologie (Abb. 5.6). Mikroskopische Aufnahmen zeigten in Zellen des $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO stark verlängerte und verzweigte Filopodien (Abb. 5.6 C). Dadurch war der Durchmesser der rpMP signifikant erhöht (Abb. 5.6 B). Diese Eigenschaften waren

bereits unmittelbar nach der Adhärenz der rpMP zu erkennen und traten in über 60% der rpMP des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO auf (Abb. 5.6 D). Die Kontrollzellen zeigten dagegen einen eher abgerundeten Phänotyp mit kurzen Filopodien (Abb. 5.6 C).

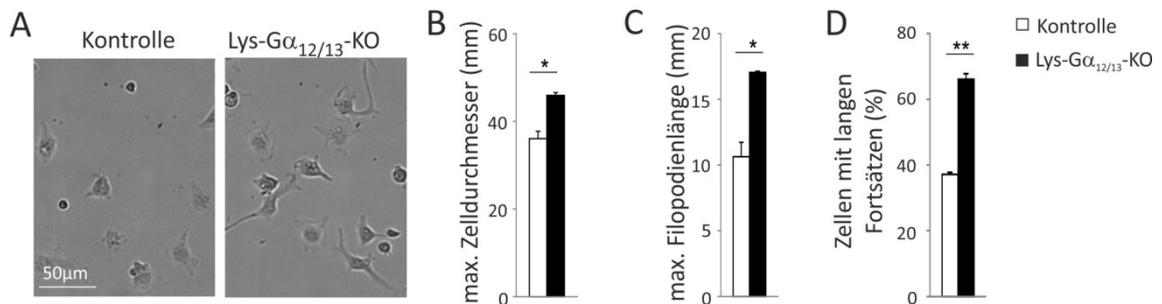


Abb. 5.6 Morphologische Untersuchung von rpMP des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO

A: Mikroskopische Aufnahme von rpMP aus Kontrolle und Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO nach 16h Kultur mit 10% FBS. **B-D:** Statistische Auswertung des Zelldurchmessers (**B**), der maximalen Filopodienlänge (**C**) und dem Anteil rpMP mit langen Fortsätzen (% der Fortsätze, die länger als der Zellkörper waren) (**D**).

Kontrolle: weiß; Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO: schwarz. $n=4$; Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; $n=5-8$; $p<0,05^*$; $p<0,01^{**}$.

Der $G_{12/13}$ -Effektor RhoA ist ein zentraler Regulator der Zellmorphologie. Er trägt maßgeblich dazu bei, dass Zellen ihre Fortsätze regulieren können und ermöglicht die Migration von Lymphozyten und das Wachstum von Neuronen (Etienne-Manneville und Hall 2002). Daher wurde untersucht, ob eine gestörte Aktivierung von RhoA der veränderten Morphologie $G\alpha_{12/13}$ -defizienter rpMP zugrunde liegen könnte. Dazu wurde in Makrophagen aus unstimulierten Kulturbedingungen und nach Stimulation der Anteil an aktivem, GTP-gebundenen RhoA mit Hilfe eines G-LISA ermittelt. Diese Untersuchung ergab, dass bereits in naiven rpMP des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO signifikant weniger RhoA aktiviert werden konnte (Abb. 5.7 A). Auch nach Stimulation mit Lysophosphatidsäure (LPA), einem Agonisten an $G_{12/13}$ -gekoppelten Rezeptoren, zeigte sich in den $G\alpha_{12/13}$ -defizienten rpMP eine reduzierte RhoA-Aktivierung. Selbst die Reaktion auf Serum, welches natürlicherweise LPA und andere potentielle $G_{12/13}$ -Aktivatoren enthält, war nahezu aufgehoben (Abb. 5.7 A).

Der Zusammenhang zwischen dem ausgeprägten Phänotyp von Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Makrophagen und fehlender RhoA-Aktivierung konnte in einem weiteren Experiment morphologisch untermauert werden. Nach Zugabe des C3-Exoenzyms aus *Chlostridium botulinum*, welches RhoA selektiv ribosyliert und somit inaktiviert, konnte in rpMP von Kontrolltieren gezeigt werden, dass diese kurz nach der Blockade von RhoA verlängerte und verzweigte Filopodien zeigten (Abb. 5.7 B). Somit ähnelten sie sehr stark den Zellen, die aus dem Peritoneum des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO isoliert wurden. Hiermit konnte bestätigt werden, dass einer der Schlüsseffektoren von G $\alpha_{12/13}$, die kleine GTPase RhoA, in der Struktur von Makrophagen eine wesentliche Rolle spielte.

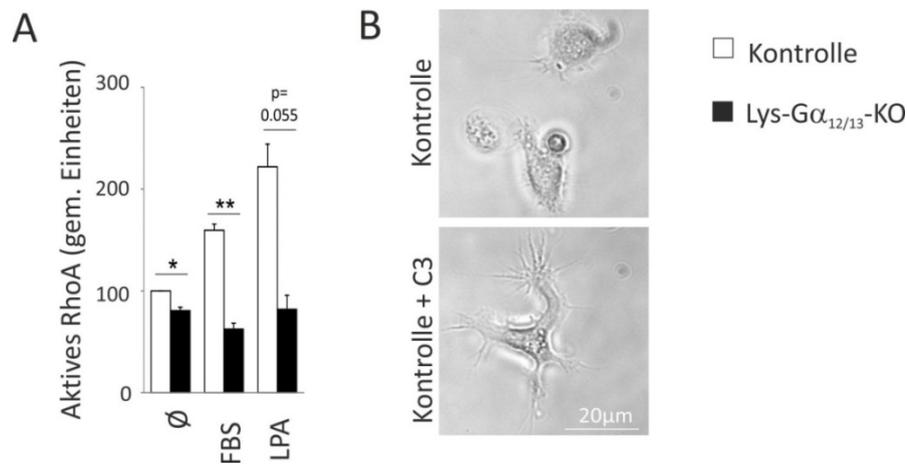


Abb. 5.7 Untersuchung des Signalmoleküls RhoA in rpMP des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO

A: Aktiviertes RhoA nach 18h Serumentzug ohne Agonist (\emptyset), nach Zugabe von 10% FBS oder LPA (0,1 μ M) für jeweils 1 Minute; Messungen erfolgten mit Hilfe eines G-LISA **B:** Morphologische Veränderungen von rpMP der Kontrolle nach Zugabe des RhoA-Inhibitor C3-Exoenzyme (C3; 0,5 μ g/ml; 4h Inkubation).

Kontrolle: weiß; Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO: schwarz; Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; n= 3-4; p<0,05*; p<0,01**.

5.7 Makrophagen aus Knochenmark des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Linie zeigen auch morphologische und zytologische Besonderheiten

Bisher waren Makrophagen des Peritoneums der Hauptbestandteil dieser Studie an Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Mäusen. Sie unterscheiden sich jedoch maßgeblich von Monozyten

und Makrophagen, die im Organismus Entzündungsprozesse regulieren. Aus diesem Grund sollte auch untersucht werden, welchen Einfluss der Verlust von $G\alpha_{12/13}$ in myeloiden Zellen anderer Organe hatte. Dazu wurden als Modellsystem kmMP von $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO und Kontrolltieren gezüchtet und im Vergleich zu rpMP analysiert (Abb. 5.8). Die morphologische Untersuchung ergab, dass ähnlich wie rpMP, auch die kmMP von $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO-Tieren eine signifikant vermehrte Zahl an langen Filopodien aufwies (Abb. 5.8 C) und dadurch der Durchmesser der Zellen signifikant erhöht war (Abb. 5.8 B). Der Anteil der Zellen mit den beschriebenen Eigenschaften war ebenfalls wesentlich höher (Abb. 5.8 D). Diese phänotypischen Merkmale waren erst nach vollständiger Differenzierung des Knochenmarks, also nach 7 Tagen Kultivierung in M-CSF-haltigem Medium, voll ausgeprägt (Abb. 5.8 A).

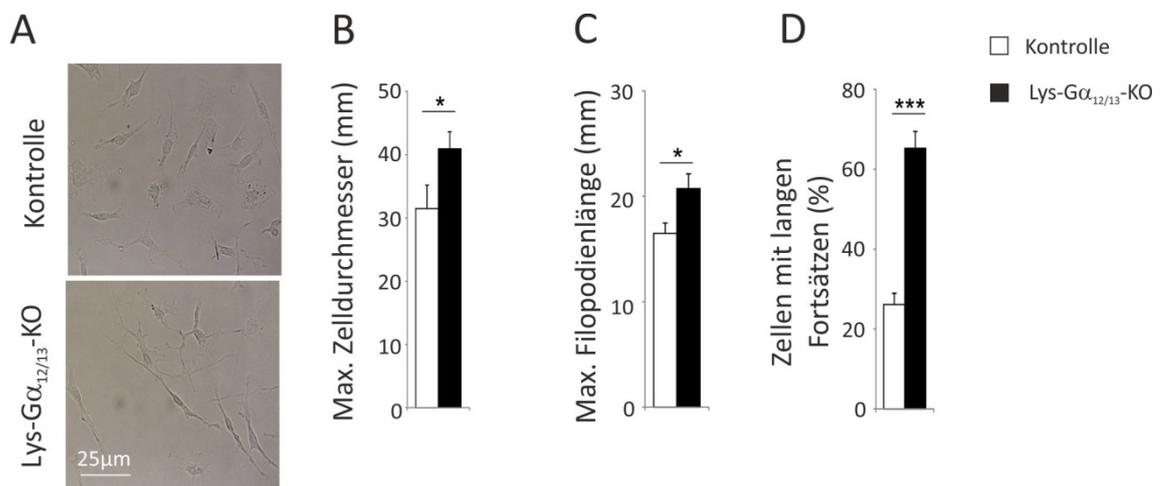


Abb. 5.8 Morphologische Untersuchung von kmMP des $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO

A: Mikroskopische Aufnahmen von ausdifferenzierten kmMP aus Kontrolle und $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO in Kultur mit 10% FBS. **B:** Statistische Auswertung des Zelldurchmessers (μm). **C:** Bestimmung der Filopodienlänge (μm). **D:** Anteil an kmMP mit langen Fortsätzen (% der Fortsätze, die länger als der Zellkörper waren).

Kontrolle: weiß; $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO: schwarz. $n=4$; Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; $n=5-8$; $p < 0,05^*$; $p < 0,001^{***}$.

Kontrolle: weiß; Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO: schwarz; Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; n=5; p<0,05*; p<0,01**.

5.9 Funktionelle Konsequenzen des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO: das angeborene Immunsystems bleibt intakt

In den Makrophagen des Peritoneums wurde nachgewiesen, dass ein Fehlen der α -Untereinheiten der G-Proteine G $_{12/13}$ zu einer besonderen Morphologie führte und sich der Anteil bestimmter Populationen veränderte. Ob sich daraus auch Konsequenzen für die Funktionen der Immunzellen ergaben, sollte in einer Studie an rpMP herausgefunden werden. Diese Makrophagenpopulation erkennt eine entstehende Entzündung im Peritoneum, lockt daraufhin periphere neutrophile Granulozyten und proinflammatorische Monozyten und Makrophagen an (Davies, Jenkins et al. 2013). Die Rekrutierung dieser einzelnen Immunzellpopulationen in ein mit Thioglycollat (TG) stimuliertes Peritoneum verlief im Vergleich zwischen dem Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO und der Kontrolle zu allen untersuchten Zeitpunkten sehr ähnlich (Abb. 5.10).

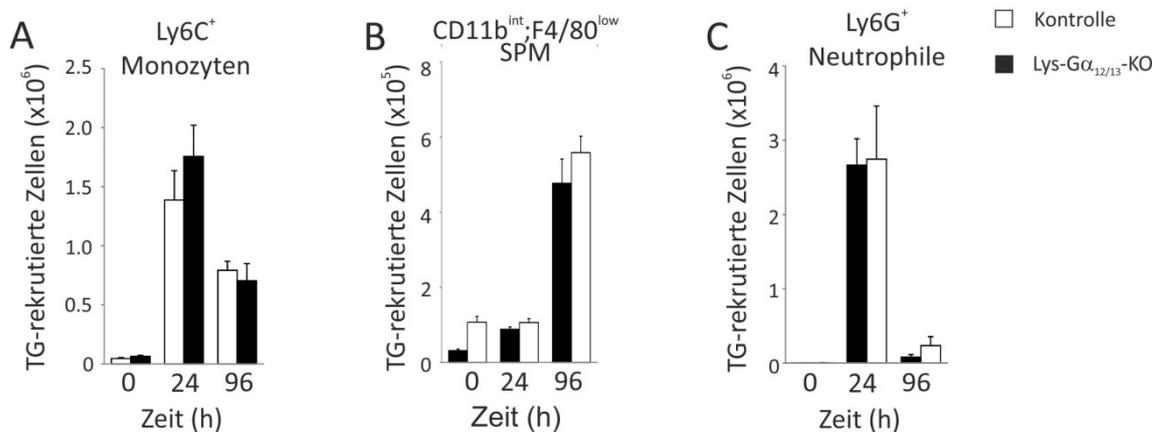


Abb. 5.10 Funktionelle Konsequenzen des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO für das Immunsystem

A-C: Durchflusszytometrische Analyse der Zusammensetzung peritonealer Zellpopulationen vor und nach TG-induzierter Peritonitis 24h und 96h: Ly6C⁺ inflammatorische Monozyten (A); CD11b^{int}; F4/80^{low} SPM (B); Ly6G⁺ neutrophile Granulozyten (C).

Kontrolle: weiß; Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO: schwarz; Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; n=5-8; p<0,05*; p<0,01**.

Bereits nach kurzer Zeit kam es zu einem massiven Anstieg von Ly6C⁺ Monozyten (Abb. 5.10 A) und Ly6G⁺ neutrophilen Granulozyten (Abb. 5.10 C). Die Anzahl der residenten Makrophagen vom Typ SPM stieg nach 96h stark an (Abb. 5.10 B).

Um zu überprüfen, ob Tiere mit einem Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO eine gestörte Immunantwort auf bakterielle Stimulationen im Peritoneum hatten, wurden isolierte rpMP direkt mit LPS, einem Molekül aus der Zellwand gram-negativer Bakterien, stimuliert. Es zeigte sich in der Analyse der qRT-PCR, dass in Makrophagen der Kontrolle und des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO die Expression entzündungsrelevanter Gene in gleichem Maße anstieg (Abb. 5.11). Die Abwesenheit von G $\alpha_{12/13}$ führte also zu keiner Störung der Reaktion auf bakterielle Antigene.

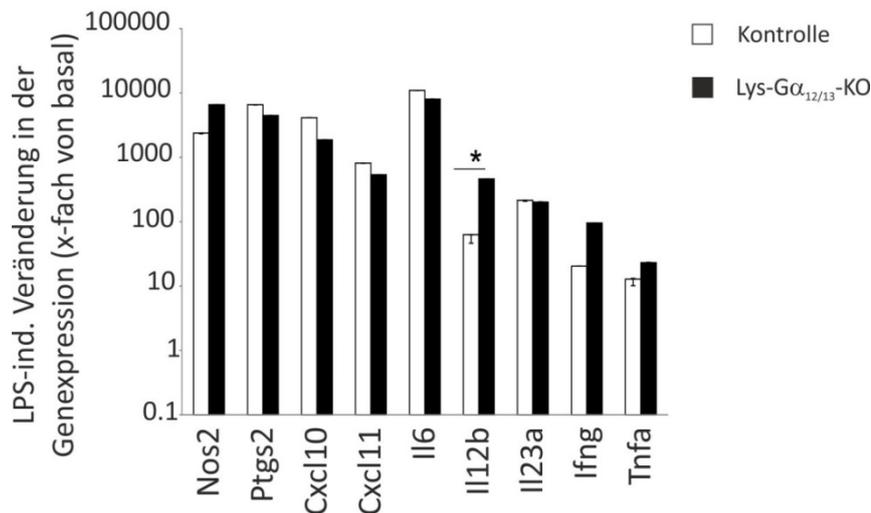


Abb. 5.11 Expressionsanalyse in rpMP nach Stimulation mit LPS

qRT-PCR Analyse von LPS-induzierten Veränderungen in rpMP; Daten sind normalisiert auf β -actin und dargestellt als X-facher Anstieg im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Daten sind dargestellt als Antilog-Werte des Mittelwerts der $\Delta\Delta$ ct Werte \pm Antilog-Werte der Grenzen des 95% Konfidenzintervalls.

Kontrolle: weiß; Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO: schwarz; Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; n=3; p<0,05*; p<0,01**.

5.10 Residente peritoneale Makrophagen in Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Tieren exprimieren mehr inflammatorischer Gene

Die Existenz der G-Proteine G_{12/13} hat für die zelluläre Morphologie vieler Zellen eine große Bedeutung (Buhl, Johnson et al. 1995). In der hier vorliegenden Studie konnte dies auch für Makrophagen nachgewiesen werden (Abb. 5.6). Aus früheren Studien ist allerdings bekannt, dass G_{12/13} sich auch an der Regulierung von Genen beteiligt (Althoff, Albarran Juarez et al. 2012, Sivaraj, Takefuji et al. 2013) und somit weitreichendere funktionelle Konsequenzen für die Zelle hat.

In peritonealen Makrophagen wurde daher getestet, ob sich der spezifische Verlust von G $\alpha_{12/13}$ auch auf der Ebene der Genexpression bemerkbar machte. Dazu wurde RNA aus naiven rpMP isoliert und die Expression von Markergenen der Makrophagen-differenzierung und -aktivierung analysiert (Abb. 5.12). Tatsächlich konnte in den als quieszent geltenden Makrophagen des Peritoneums ein eindeutiger Anstieg inflammatorischer Gene im Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO festgestellt werden. So zeigten vor allem die Gene *H2-Eb1*, *Nos2* und *Ptgs2* (codiert für Cyclooxygenase 2) signifikante Veränderungen im Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO. Es handelte sich hierbei um charakteristische Gene in „M1“-Makrophagen. *H2-Eb1* codiert für den „major histocompatibility complex“ (MHC-II) und ist unerlässlich für die Antigenpräsentation auf Makrophagen (Pai, Askew et al. 2002). Der Marker *Nos2* ist das Gen für die Stickstoffmonoxid-Synthase Subtyp 2. Dieses Protein ist an der Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) beteiligt, was Makrophagen zur Abtötung von Bakterien verwenden (Biswas und Mantovani 2012). Die Cyclooxygenase 2 ist essentiell für die Synthese von Prostaglandinen und trägt damit zur Vermittlung der Immunantwort bei (Williams und Shacter 1997). Auch die Expression der untersuchten Gene für Chemokine wie *Ccl3*, *Ccl4*, *Cxcl10* und Cytokine wie *Il-6*, *Il-10* und *Il-23a* war im Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO deutlich angestiegen. Die signifikant verstärkte Expression von Entzündungsmarkern wie *Ifng* und *Tnfa* zeigte zusätzlich, welchen Einfluss G $\alpha_{12/13}$ auf proinflammatorische Genexpression in Makrophagen hatte.

Dieser Effekt von $G\alpha_{12/13}$ schien spezifisch zu sein, denn die Expression von Genen, die beispielsweise für die Adhäsion von myeloiden Zellen essentiell sind, waren in $G\alpha_{12/13}$ -defizienten Zellen unverändert.

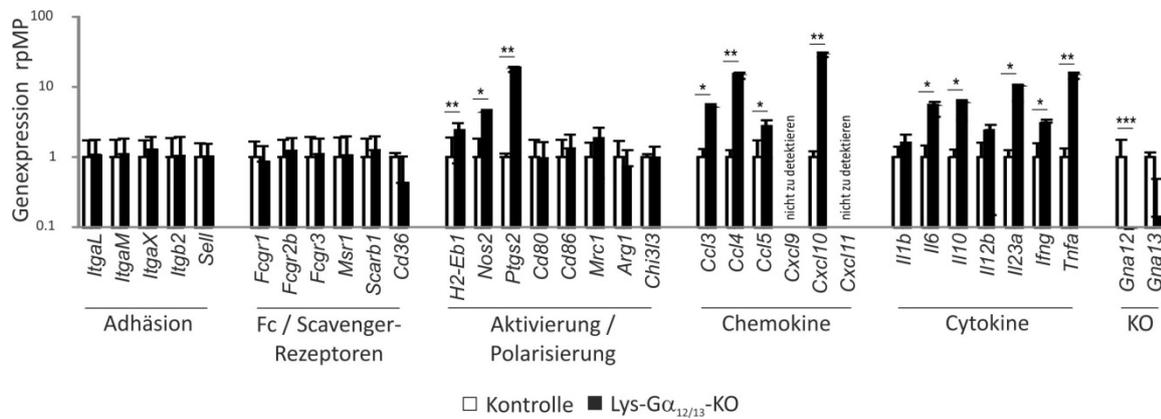


Abb. 5.12 Expressionsanalyse in rpMP des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO

Analyse der Genexpression in Durchflusszytometer-sortierten rpMP. Alle Daten wurden normalisiert auf β -actin und die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt. Daten sind dargestellt als Antilog-Werte des Mittelwerts der $\Delta\Delta$ ct Werte \pm Antilog-Werte der Grenzen des 95% Konfidenzintervalls.

Kontrolle: weiß; Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO: schwarz; n=5; p<0,05*; p<0,01**.

Die meisten Gene, die im Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO eine veränderte Expression zeigten, sind NF- κ B-regulierte Gene. Um zu überprüfen, ob rpMP des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO ein höheres Maß an aktiviertem NF- κ B aufwies, wurden Lysate von naiven rpMP im Western Blot auf die Existenz von aktivem p65 hin getestet (Abb. 5.13). Bei p65 handelt es sich um eines der Mitglieder der NF- κ B Proteinfamilie, das als Dimer an DNA binden kann und so die Transkription beeinflusst (Napetschnig und Wu 2013). Tatsächlich zeigte sich in den Kontrollen eine weniger starke Phosphorylierung im Bereich des aktivierten Serin-Restes 536 von p65 als im Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO. Dies war ein Beweis dafür, dass $G\alpha_{12/13}$ die Genexpression in Makrophagen über NF- κ B steuern konnte.

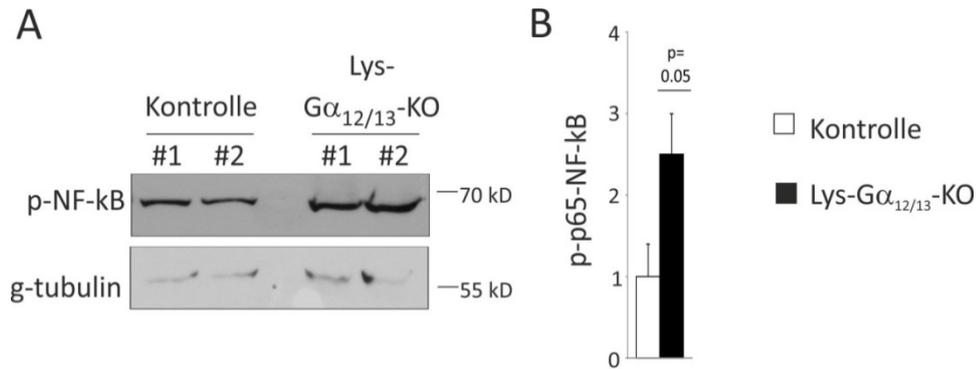


Abb. 5.13 Analyse von rpMP auf phosphoryliertes NF-κB (p65)

A: Western Blot für p-NF-κB (p65) und γ-Tubulin mit Lysaten von durchflusszytometrisch sortierten rpMP. **B:** Quantifizierung der Bandenintensität durch Normalisierung auf γ-Tubulin; Kontrolle wurde auf „1“ gesetzt.

Kontrolle: weiß; Lys-Gα₁₂/Gα₁₃-KO: schwarz; n=3.

Die Aktivierung der rpMP des Lys-Gα₁₂/Gα₁₃-KO konnte zusätzlich zur Genexpression auch auf Proteinebene demonstriert werden. So produzierten die frisch isolierte rpMP des Lys-Gα₁₂/Gα₁₃-KO signifikant mehr TNFα (Abb. 5.14 A). Außerdem konnte durch eine *ex vivo* Stimulation naiver Kontrollmakrophagen mit peritonealer Flüssigkeit aus Tieren des Lys-Gα₁₂/Gα₁₃-KO die Induktion inflammatorischer Gene wie *Il-6*, *Tnfa* und *Ptgs2* erzielt werden. Die genetisch stärker aktivierten Makrophagen des Lys-Gα₁₂/Gα₁₃-KO schienen also auch für ein entzündetes Milieu im Peritoneum verantwortlich zu sein (Abb. 5.14 B).

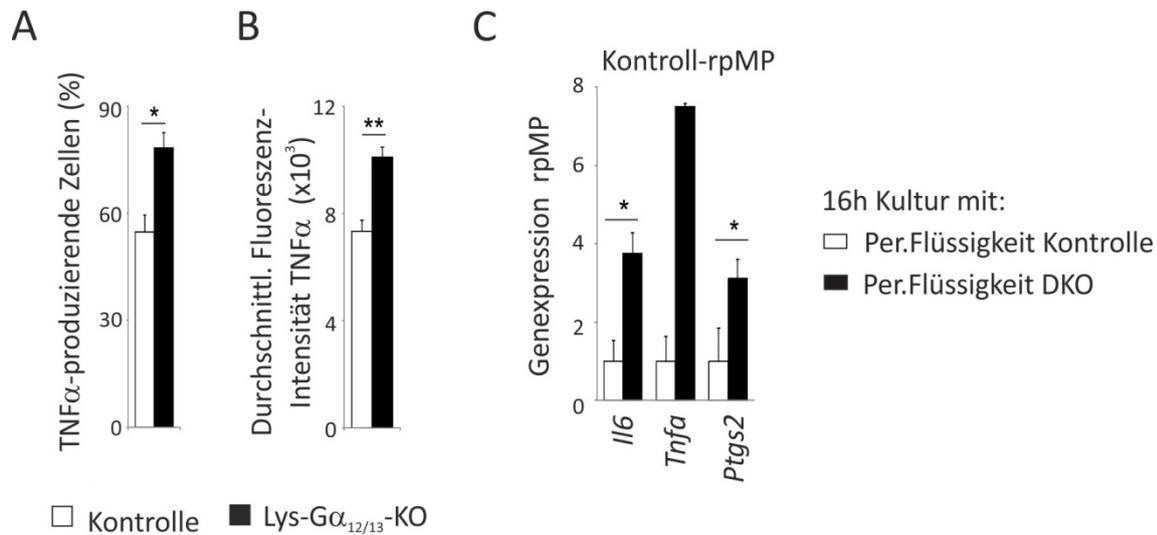


Abb. 5.14 Analyse des Mikromilieus im Peritoneum von Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Mäusen

A: Durchflusszytometrische Analyse der TNF α -Produktion in rpMP (%). **B:** Bestimmung der durchschnittlichen Intensität der gemessenen Fluoreszenz für TNF α in rpMP. **C:** Genexpressionsanalyse (qRT-PCR) in Kontroll-rpMP nach Kultur in Peritonealflüssigkeit aus Kontrolltieren oder Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Tieren für 16 Stunden. Alle Daten wurden normalisiert auf β -actin und die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt.

Kontrolle: weiß; Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO: schwarz; Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; n=3-4; p<0,05*; p<0,01**.

5.11 Knochenmarks-Makrophagen aus Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Tieren exprimieren auch verstärkt inflammatorische Gene

Ähnlich wie bereits in den Makrophagen des Peritoneums festgestellt wurde, konnte auch in kmMP gezeigt werden, dass der Verlust von G $\alpha_{12/13}$ zu einer verstärkten Aktivierung entzündungsrelevanter Gene führte (Abb. 5.15). Die Analyse wurde an kmMP durchgeführt, die 7 Tage in Medium mit M-CSF ausdifferenziert wurden. Im Vergleich zu den regulierten Genen in rpMP zeichneten sich in kmMP folgende Gene als besonders stark beeinflusst ab: Signifikante Unterschiede in der Expression von *Nos2* und *Chi3l3/Ym1* im Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO sprechen für eine erhöhte Aktivierung der kmMP (Mantovani, Sica et al. 2004). Auch diverse Gene, die für Chemokine wie *Cxcl9*, *Cxcl10* und *Cxcl11* kodieren, waren signifikant im Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO erhöht. Bei der

Untersuchung der Cytokine konnte lediglich für das Gen *Il-10* eine signifikant unterschiedliche Expression festgestellt werden. Für *Il-6*, *Il12b* und *Ifng* waren jedoch Trends im Unterschied zwischen Kontrolle und Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO zu beobachten.

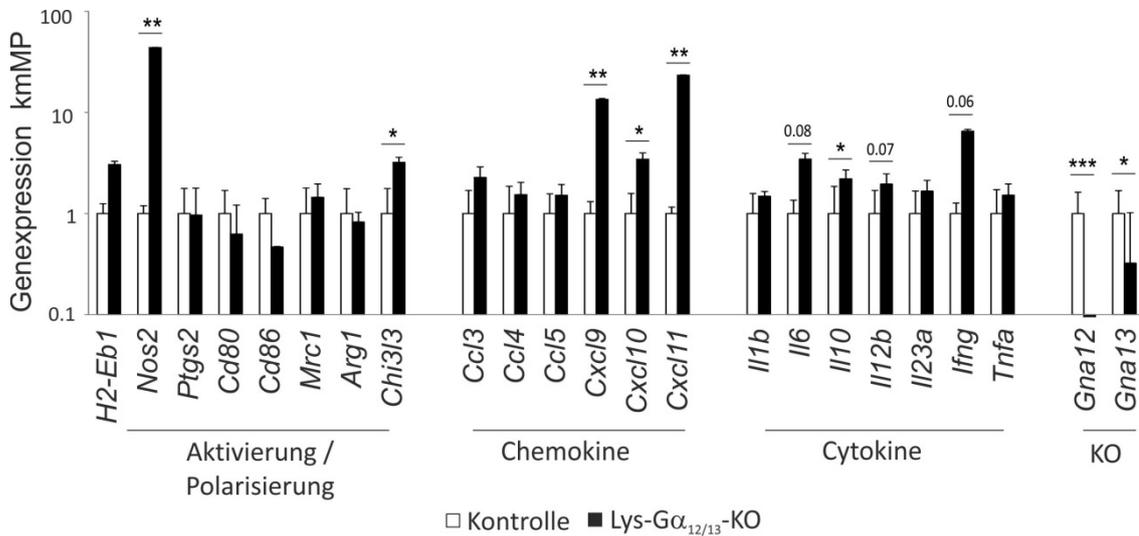


Abb. 5.15 Expressionsanalyse in kmMP des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO

Analyse der Genexpression in ausdifferenzierten kmMP. Alle Daten wurden normalisiert auf β -actin und die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt. Daten sind dargestellt als Antilog-Werte des Mittelwerts der $\Delta\Delta$ ct Werte \pm Antilog-Werte der Grenzen des 95% Konfidenzintervalls.

Kontrolle: weiß; Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO: schwarz; n=8-10; p<0,05*; p<0,01**;
p<0,001***.

5.12 Mechanismus der $G_{12/13}$ -kontrollierten Expression inflammatorischer Gene in differenzierten Makrophagen

Zur Untersuchung des molekularen Mechanismus der $G_{12/13}$ -gesteuerten Genexpression wurden *in vitro* differenzierte kmMP als Modellsystem herangezogen. Da bereits in Makrophagen des Peritoneums gezeigt werden konnte (siehe Abb. 5.7), dass RhoA eine wichtige Rolle bei der $G_{12/13}$ -vermittelten Aktivierung entzündungsrelevanter Gene spielen könnte, sollte diese Frage auch für kmMP beantwortet werden.

Als wichtige Faktoren in der Signalvermittlung von $G_{12/13}$ sind RhoA und ROCK beschrieben (Higuchi, Otsu et al. 2003, Burrige und Wennerberg 2004). Die Funktion dieser zwei wesentlichen $G_{12/13}$ -Effektoren wurde untersucht, indem reife kmMP vor der Isolierung ihrer RNA mit entsprechenden Inhibitoren behandelt wurden (Abb. 5.16 A). In Zellen aus Kontrolltieren wurde die Aktivierung von RhoA durch die Zugabe von C3-Exoenzym blockiert. Der Effekt von ROCK wurde in Kontrollzellen durch die Substanz Y-27632 effizient unterbunden. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass durch die Inhibition des $G_{12/13}$ -Signalweges über ROCK in kmMP von Kontrolltieren die Signatur der Genexpression des Lys- G_{12}/G_{13} -KO für die ausgewählten Gene *Nos2*, *Cxcl11* und *Ifng* imitiert wurde (Abb. 5.16 A). Eine wesentlich stärkere Reaktion konnte jedoch durch die Blockierung von RhoA beobachtet werden. Die Aktivität der Gene, die bereits durch die Behandlung mit ROCK beeinflusst wurden, stieg durch die Zugabe von C3-Exoenzym im Falle von *Ifng* um das 50-fache an. Für *Cxcl11* war eine Steigerung um das 100-fache zu sehen, das Gen *Nos2* zeigte sogar einen Anstieg um das 1000-fache in Bezug zum normalisierten Basalwert unstimulierter Makrophagen. In einem weiterführenden Experiment wurde an kmMP des Lys- G_{12}/G_{13} -KO getestet, ob eine Normalisierung der proinflammatorischen Genexpression in kmMP des Lys- G_{12}/G_{13} -KO möglich ist. Viele der Gene, die im Lys- G_{12}/G_{13} -KO exprimiert wurden, werden durch NF- κ B reguliert. Daher wurden die Zellen des DKO mit Ro106-9920, einem Inhibitor für NF- κ B, inkubiert und der Effekt auf die Genexpression analysiert. Tatsächlich führte die Blockade von NF- κ B im Trend zu einer Reduktion der Expression von *Nos2* (Abb. 5.16 A). Signifikant konnten dagegen die Gene *Cxcl11* und *Ifng* herunterreguliert werden. Dass der Verlust von $G_{12/13}$ sich in herabgesetzter Aktivierung von RhoA niederschlug und gleichzeitig NF- κ B-vermittelte Gentranskription verstärkt wurde, konnte nun auch an kmMP gezeigt werden.

Zur weiteren Aufklärung des Mechanismus wurde in kmMP auch noch die Bedeutung der GTPase Rac1 untersucht (Abb. 5.16). Es ist aus der Literatur bekannt, dass RhoA und Rac1 sich gegenseitig inhibieren können (Guilluy, Garcia-Mata et al. 2011). Rac1 ist wiederum als bekannter Aktivator von NF- κ B beschrieben (Brown, Del Re et al. 2006). Ob also auch ein Zusammenhang zwischen reduziertem RhoA, der gleichzeitig

festgestellten verstärkten Rac1-Aktivierung (Abb. 5.16 B) und der erhöhten Expression NF- κ B-abhängiger Gene besteht, sollte überprüft werden. Dazu wurden Zellen des DKO mit einem Rac1-Inhibitor, der Substanz NSC23766, behandelt (Abb. 5.16 A). Die Ergebnisse der qRT-PCR an kmMP aus Tieren des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO zeigten eine signifikante Reduktion für *Nos2* und *Ifng* auf die gemessene Menge in kmMP aus Kontrolltieren (Abb. 5.16 A). Für das Gen *Cxcl11* konnte nur ein geringer Effekt durch die Blockade von Rac1 vermerkt werden. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass Rac1 in Makrophagen an der Initiierung von NF- κ B-vermittelter Gentranskription indirekt beteiligt gewesen sein könnte.

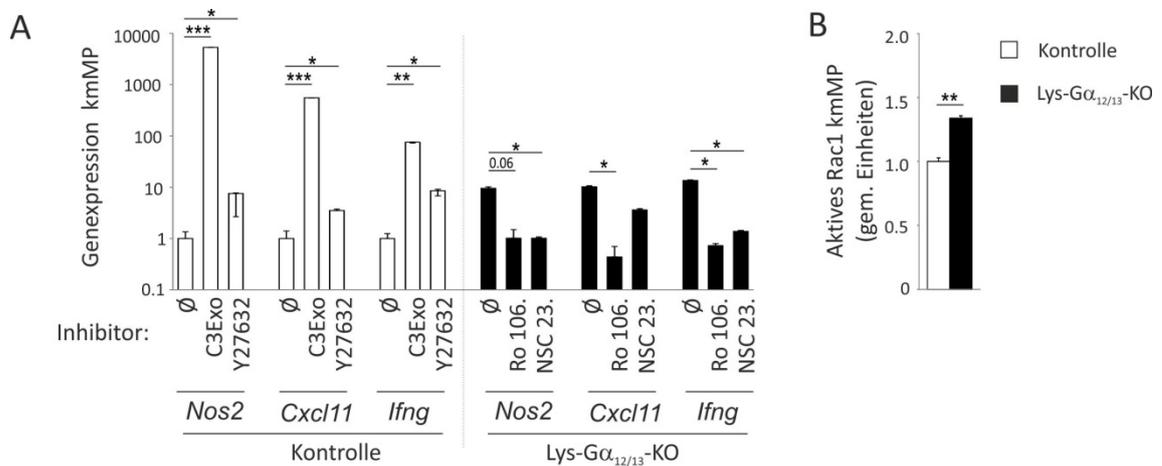


Abb. 5.16 Untersuchung $G_{12/13}$ -relevanter Signalmoleküle in kmMP

A: qRT-PCR Analyse der Genexpression in kmMP der Kontrolle nach der Behandlung mit dem RhoA-Inhibitor C3-Exoenzyme (C3Exo; 0,5 μ g/ml); dem ROCK-Inhibitor Y27632 (1 μ M); weiße Balken links; und in kmMP des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO mit dem NF- κ B-Inhibitor Ro 106-9920 (Ro 106.; 1 μ M) und dem Rac1-Inhibitor NSC23766 (NSC23.; 100 μ M); schwarze Balken rechts. **B:** ELISA-basierte Messung der basalen Rac1-Aktivität in kmMP.

Alle Daten wurden normalisiert auf β -actin und die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt. Daten sind dargestellt als Antilog-Werte des Mittelwerts der $\Delta\Delta$ ct Werte \pm Antilog-Werte der Grenzen des 95% Konfidenzintervalls. Kontrolle: weiß; Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO: schwarz; Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; n=3-4; p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***.

5.13 Untersuchung von G_{12/13}-gekoppelten Rezeptoren in peritonealen Makrophagen

Die Befunde zur erhöhten Genexpression in Makrophagen des Lys-Gα₁₂/Gα₁₃-KO führten zu der Frage, welche konkreten Rezeptoren für diesen Effekt verantwortlich gewesen sein könnten. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden einzelne rpMP aus WT-Tieren auf insgesamt 18 potentielle G_{12/13}-gekoppelte Rezeptoren hin überprüft (Abb. 5.17). Diese Untersuchung ergab, dass alle der analysierten rpMP den G-Protein-gekoppelten Rezeptor CD97, den Endothelin-1-Rezeptorsubtyp B (codiert durch *Endrb*) und den Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptorsubtyp 2 (S1P₂) exprimierten. Neben dieser sehr homogenen Expression zeigten andere Rezeptoren eine eher heterogene Ausprägung. Dazu zählte unter anderem der PAR₄-Rezeptor für Thrombin, (codiert durch das Gen *F2rl3*), der LPA-Rezeptorsubtyp 1 und die beiden purinergen Rezeptoren P2Y₂ und P2Y₆. Andere Rezeptoren, wie beispielsweise der Thrombin-Rezeptor PAR₁ (codiert durch das Gen *F2R*), der Thromboxan-A2-Rezeptor (codiert durch das Gen *Tbxa2r*) oder auch der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptorsubtyp 3 (S1P₃) konnten in den untersuchten rpMP nicht nachgewiesen werden.

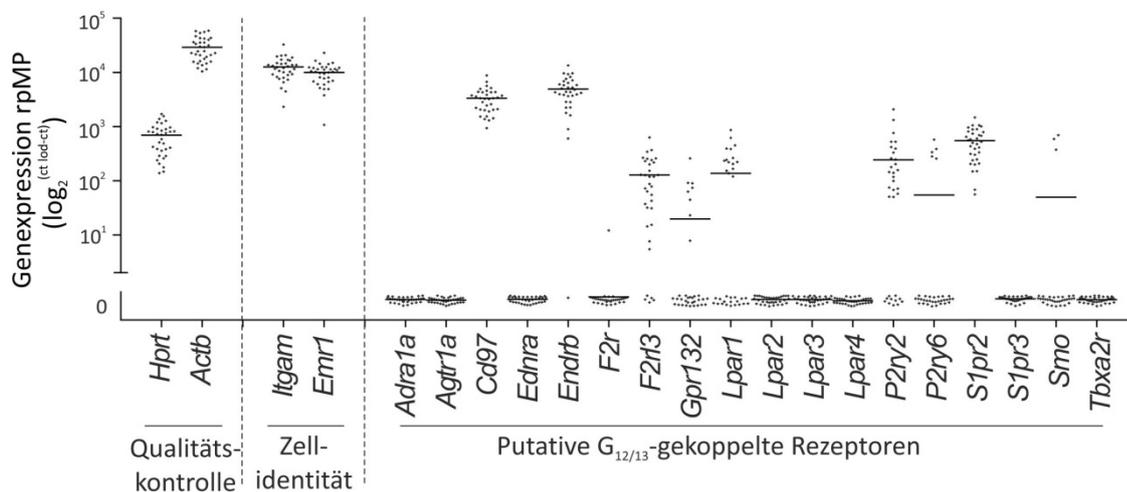


Abb. 5.17 Untersuchung von G_{12/13}-gekoppelten Rezeptoren in rpMP

Expressionsanalyse für G_{12/13}-gekoppelte Rezeptoren in 38 einzelnen rpMP von WT-Tieren. Daten sind dargestellt als log₂-Werte^{(Detektionslimit (lod)ct-gemessenen ct)} mit einem gesetzten lod ct-Wert von 27; Werte von Genen, die

nicht exprimiert wurden, wurden um „0“ gesetzt um die graphische Darstellung der Zellzahl zu gewährleisten.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde im nächsten Schritt untersucht, welche dieser $G_{12/13}$ -gekoppelten Rezeptoren an der Regulation von NF- κ B-abhängigen Genen in rpMP verantwortlich gewesen sein könnten.

5.14 $G_{12/13}$ -gekoppelter Rezeptor $S1P_2$ reguliert die proinflammatorische Genaktivität in residenten peritonealen Makrophagen

Um die Relevanz der einzelnen exprimierten Rezeptoren zu überprüfen, wurden diese mit spezifischen Antagonisten blockiert und die Konsequenz auf der Ebene der Genexpression ermittelt (Abb. 5.18 A). Dazu wurden erneut rpMP aus WT-Tieren verwendet. Diese wurden nach dem Sortieren im Durchflusszytometer in Kultur mit peritonealer Flüssigkeit genommen und für 16 Stunden mit den entsprechenden Antagonisten stimuliert. Sowohl durch die Inhibierung der Rezeptoren ET_B , PAR_4 , $LPA_{1/3}$ als auch die Blockade der Rezeptoren $P2Y_2$, $P2Y_6$ und Thromboxan A_2 konnte kein Effekt in Bezug auf verstärkte Expression entzündlicher Gene wie *Il-6*, *Tnfa*, *Ptgs2* oder *Cxcl10* erzielt werden. Allerdings konnten diese charakteristischen Marker durch die Hemmung des $G_{12/13}$ -gekoppelten Rezeptors $S1P_2$ mit Hilfe der Substanz JTE-013 äußerst signifikant induziert werden und somit das Verhalten der für $G_{\alpha_{12/13}}$ -defiziente Makrophagen nachgeahmt werden. Das gleiche Phänomen konnte auch unter Kulturbedingungen mit normalem Medium beobachtet werden (Abb. 5.18 B). Die Zugabe von $S1P$ zum Medium veränderte die Genexpression allerdings nicht. Das wies darauf hin, dass rpMP ihren $S1P$ -Rezeptor möglicherweise durch einen autokrinen Mechanismus stimuliert haben. Daher war es interessant die $S1P$ -Produktion in Makrophagen zu prüfen.

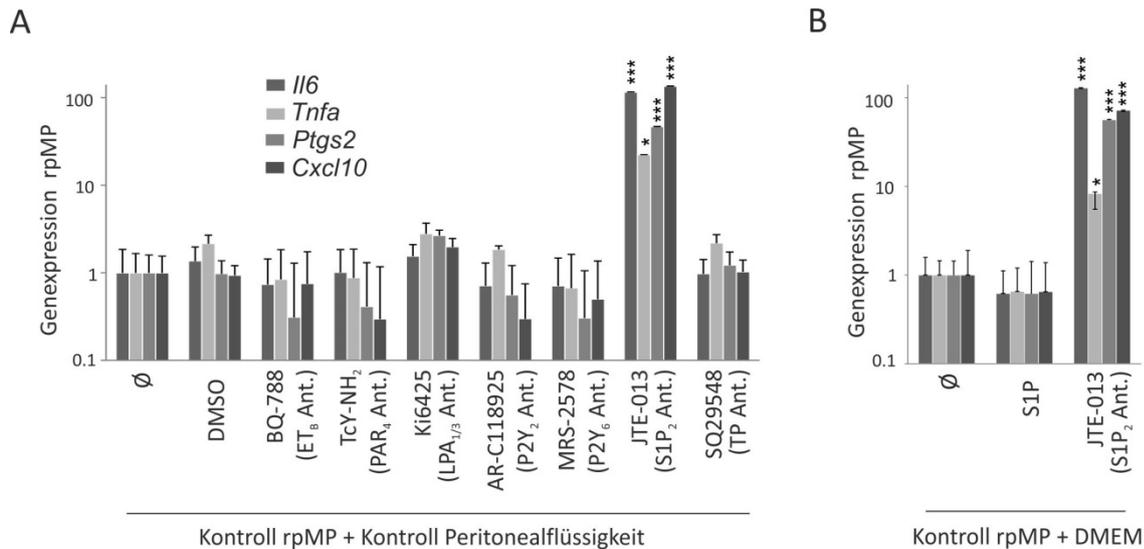


Abb. 5.18 Analyse der Relevanz von $G_{12/13}$ -gekoppelten Rezeptoren in rpMP

A: Genexpressionsanalyse in sortierten rpMP der Kontrolle, die 16h in peritonealer Flüssigkeit kultiviert wurden und mit Antagonisten (Ant.) für die exprimierten $G_{12/13}$ -gekoppelten Rezeptoren stimuliert wurden: BQ-788 (ET_B-Ant.; 1 μ M); TcY-NH₂ (Par₄-Ant.; 30 μ M); Ki6425 (LPA_{1/3}-Ant.; 10 μ M); AR-C118925 (P2Y₂-Ant.; 1 μ M); MRS-2578 (P2Y₆-Ant.; 1 μ M); JTE-013 (S1P₂-Ant.; 1 μ M); SQ29,548 (TP-Ant.; 1 μ M). DMSO wurde als Kontrolle verwendet. **B:** Genexpressionsanalyse in rpMP in Kultur mit Medium und den wie in A angegebenen Antagonisten.

Alle Daten wurden normalisiert auf β -actin und die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt. Daten sind dargestellt als Antilog-Werte des Mittelwerts der $\Delta\Delta\Delta$ Werte \pm Antilog-Werte der Grenzen des 95% Konfidenzintervalls.

Kontrolle: weiß; Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO: schwarz; n=3-5; p<0,05*; p<0,001***.

5.15 Makrophagen dienen als S1P-Produzenten im Peritoneum

Um diese Hypothese zu testen, wurde die Expression der *Sphingosin-Kinase 1* und 2 (*Sphk1/2*) getestet. Im Gegensatz zu Monozyten zeigten rpMP diese beiden Enzyme (Abb. 5.19 A). Da rpMP in der Lage sind S1P zu produzieren, wurde frisch isolierte peritoneale Flüssigkeit von Tieren des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO und von Kontrollen auf die Substanz S1P hin untersucht (Abb. 5.19 B). In beiden Proben konnte S1P in Mengen von 10-25ng/ml, was einer Konzentration von 26-65nM entsprach, nachgewiesen werden. Dabei existierten keine merklichen Unterschiede zwischen dem DKO und der

Kontrolle. Diese gerinen Mengen an S1P waren durchaus physiologisch. Es ist bekannt, dass zwischen dem Gefäßsystem, der interstitiellen Flüssigkeit und den Organen ein starkes Gefälle der S1P-Konzentration existiert (Hla, Venkataraman et al. 2008).

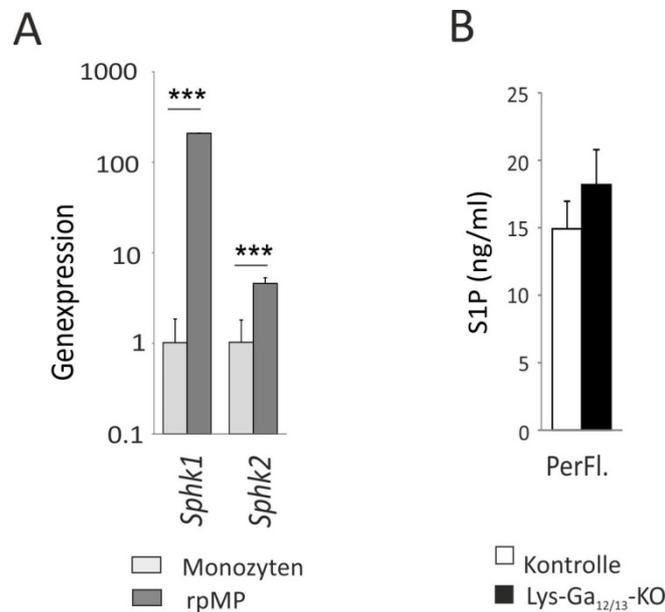


Abb. 5.19 Untersuchung auf Sphingosinkinase-Expression und S1P-Produktion im Peritoneum von Lys-Gα₁₂/Gα₁₃-KO-Mäusen

A: Ergebnisse einer qRT-PCR für die Expression der *Sphingosinkinasen 1 und 2* (*Sphk1/2*) in Monozyten aus dem Blut und in rpMP. Daten wurden normalisiert auf *β-actin* und die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt. **B:** Nachweis von S1P (ng/ml) in frisch isolierter peritonealer Flüssigkeit (PerFl.). Die Ermittlung der S1P-Konzentrationen erfolgte mit Hilfe von LC-MS/MS (Schmidt, Schmidt et al. 2006).

Kontrolle: weiß; Lys-Gα₁₂/Gα₁₃-KO: schwarz; n=3-5; Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM; p<0,001***.

5.16 Erhöhte T- und B-Zellzahl im Peritoneum der Lys-Gα₁₂/Gα₁₃-KO-Tiere

Bei der genauen Untersuchung des Peritoneums von Kontrollen und Lys-Gα₁₂/Gα₁₃-KO wurden neben einer erhöhten Zahl von residenten Makrophagen auch mehr T-Lymphozyten, sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen, gefunden (Abb. 5.20 A). In besonderem Maße wurde jedoch eine erhöhte Anzahl von B-Zellen im Bereich des Peritoneums von Lys-Gα₁₂/Gα₁₃-KO-Tieren festgestellt (Abb. 5.20 A).

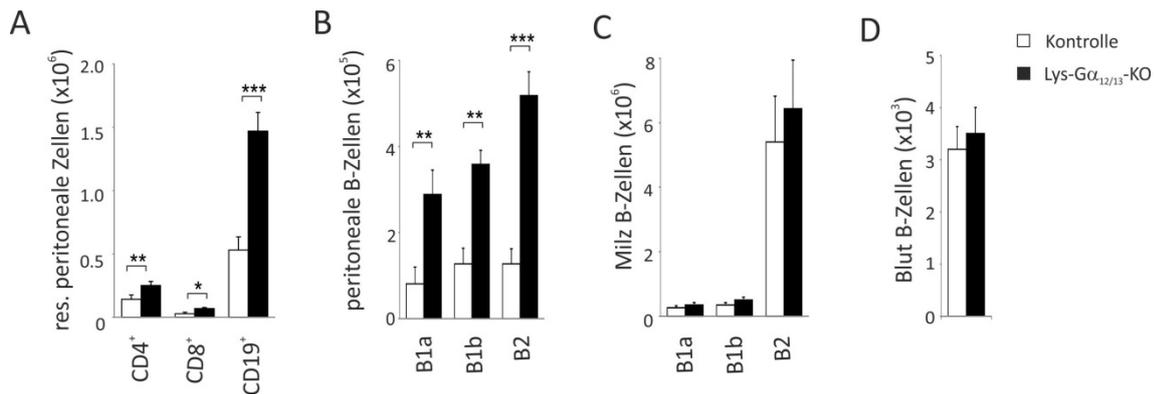


Abb. 5.20 Analyse von Lymphozyten im Peritoneum des Lys-Gα₁₂/Gα₁₃-KO

A: Durchflusszytometrische Analyse von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, sowie von CD19⁺ B-Zellen des Peritoneums. **B:** Durchflusszytometrische Analyse verschiedener Subpopulationen peritonealer B-Zellen: B1a B-Zellen (CD19⁺, CD43⁺, CD5⁺); B1b B-Zellen (CD19⁺, CD43⁺, CD5⁻); B2 B-Zellen (CD19⁺, CD43⁻, CD5⁻). **C+D:** Durchflusszytometrische Analyse verschiedener Subpopulationen von B-Zellen der Milz (**C**) und im Blut (**D**).

Kontrolle: weiß; Lys-Gα₁₂/Gα₁₃-KO: schwarz; n=9-12; Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM; p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***.

Innerhalb der B1 B-Zellen des Peritoneums wurden die Subtypen B1a und B1b quantitativ durch Messungen am Durchflußzytometer bestimmt (Abb. 5.20 B). Es konnte gezeigt werden, dass beide B1 B-Zellarten im Peritoneum der Lys-Gα₁₂/Gα₁₃-KO-Tiere signifikant häufiger vorkamen als im Vergleich zu Kontrolltieren. Auch ein Anstieg an konventionellen B2 B-Zellen, die ihren Ursprung in der Milz haben, konnte im Peritoneum von Lys-Gα₁₂/Gα₁₃-KO-Tieren verzeichnet werden. Die Veränderung der Zusammensetzung der Zellen im Peritoneum schien spezifisch zu sein, denn die Untersuchung von B-Zellen in Milz und Blut von Kontrollen und DKO wies keinerlei Unterschiede in den unterschiedlichen B-Zell-Subtypen auf (Abb. 5.20 C+D).

5.17 Erhöhte B-Zellzahl im Peritoneum des Lys-Gα₁₂/Gα₁₃-KO führt zu erhöhten Konzentrationen natürlich produzierter Antikörper

Ein wesentliches Merkmal peritonealer B1 B-Zellen ist ihre Fähigkeit, unter physiologischen Bedingungen spontan natürliche Antikörper (nAK) zu produzieren.

Diese gelangen dann über den Peritonealraum ins Blut (Perry, Bender et al. 2012). Die Reaktivität der natürlichen IgM-Antikörper richtet sich zum einen gegen fremde, zum anderen aber auch gegen körpereigene Antigene, wie beispielsweise atherogene oxidierte Lipoproteine.

Aus diesem Grund sollte nun in den Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Tieren überprüft werden, wie sich der Anstieg der B1 B-Zellen im Peritoneum auf die Existenz von natürlichen IgM-Antikörpern auswirkte. Dazu wurden den Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Tieren und entsprechenden Kontrolltieren Blut entnommen, daraus Plasma gewonnen und darin die Konzentration der natürlichen Antikörper bestimmt (Abb. 5.21). In Proben des DKO konnten signifikant erhöhte Titer für Antikörper gegen Malondialdehyd-oxidiertes LDL (MDA-LDL) (Abb. 5.21 A) und Kupfer-oxidiertes LDL (CuOxLDL) gemessen werden (Abb. 5.21 B). Auch der als besonders gefäßschützend bekannte natürliche anti-Phosphorylcholin IgM-Antikörper T15/E06 war in einer signifikant erhöhten Konzentration im Plasma von Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Tieren zu detektieren (Abb. 5.21 D). Diese veränderten Titer resultierten ebenfalls in einem Anstieg der IgM-Gesamtmenge im Plasma (Abb. 5.21 C).

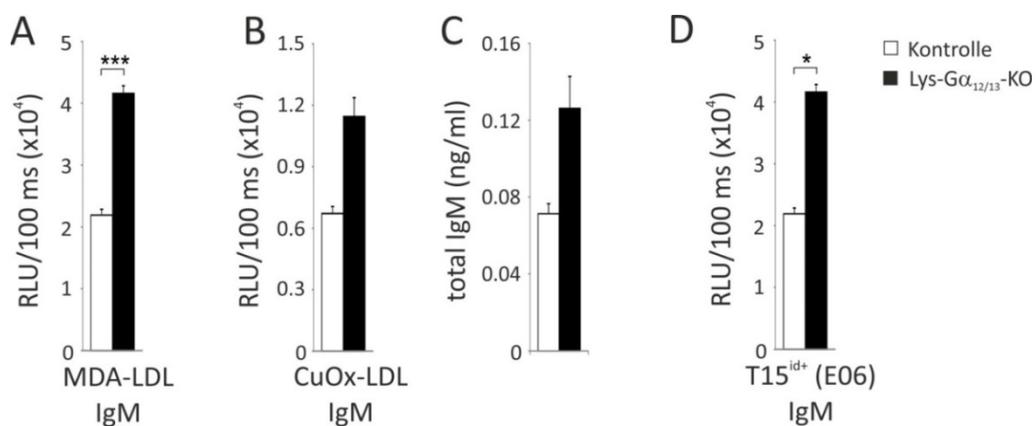


Abb. 5.21 Messung natürlicher IgM-Antikörper im Plasma des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO

A-D: Titerbestimmung von IgM-Antikörpern gegen Malondialdehyd-oxidiertes LDL (MDA-LDL) (A); gegen Kupfer-oxidiertes-LDL (CuOx-LDL) (B); gesamten IgM in Mausplasma (C); gegen den Antikörper T15/E06 (D). Die Konzentrationsbestimmungen erfolgten mit Hilfe von ELISA.

Kontrolle: weiß; Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO: schwarz; n=9-12; Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; n=8; p<0,05*; p<0,001***.

In Messungen der Konzentrationen für IgG-Antikörper im Plasma konnten keine wesentlichen Veränderungen zwischen Proben der Kontrollen und des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO festgestellt werden (Abb. 5.22).

In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass diese natürlichen IgM-Antikörper sowohl die Entstehung als auch das Voranschreiten von Atherosklerose reduzieren (Shaw, Horkko et al. 2000, Binder, Horkko et al. 2003, Chou, Fogelstrand et al. 2009). Diese Eigenschaften machen die B1 B-Zellen und die natürlichen Antikörper zu einem interessanten Ziel in der Therapie von Erkrankungen des Gefäßsystems.

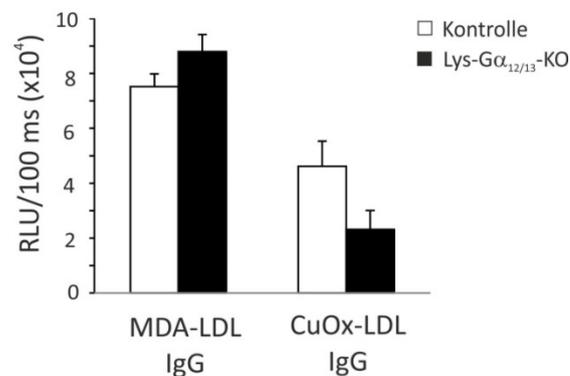


Abb. 5.22 Bestimmung der Titer für IgG-Antikörper im Plasma des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO

Titerbestimmung von IgG-Antikörpern gegen MDA-LDL (links) und gegen CuOx-LDL (rechts). Die Konzentrationsbestimmungen erfolgten mit Hilfe von ELISA.

Kontrolle: weiß; Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO: schwarz; n=9-12; Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; n=8.

5.17.1 Tiere mit Makrophagen-spezifischem $G\alpha_{12/13}$ -KO sind vor Atherosklerose geschützt

Der Nachweis der verstärkten Produktion natürlicher, protektiver Antikörper im Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO als eine immunologische Reaktion auf das basal entzündliche Peritoneum könnte sich in der Tat indirekt positiv auf die Entwicklung einer Atherosklerose auswirken. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO Mäuse mit Tieren aus der Ldlr-defizienten Linie gekreuzt. Diese sind ohne den Rezeptor für LDL besonders anfällig für die Entwicklung einer Atherosklerose. Die neu gezüchtete Linie Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13};Ldlr^{-/-}$ wurde für 12-16 Wochen auf einer Hochfetttdiät (HFD) mit 21% Butterfett und 1,5% Cholesterol gehalten. In diesem Zeitraum nahmen die Kontrollen und die Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13};Ldlr^{-/-}$ -KO gleich viel an Körpergewicht zu (Abb. 5.23 A). Auch die Konzentration von Cholesterol im Blut war im Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13};Ldlr^{-/-}$ -KO und der Kontrolle vergleichbar hoch (Abb. 5.23 B).

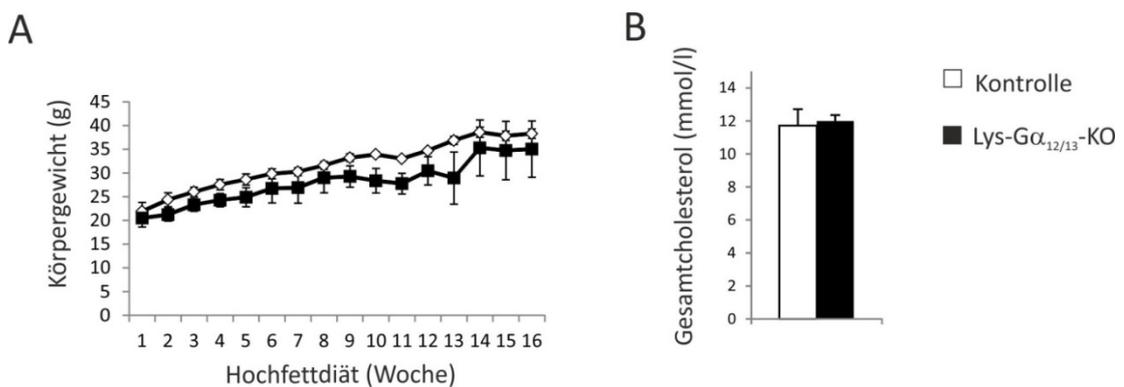


Abb. 5.23 Basale Analyse der Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13};Ldlr^{-/-}$ -Tiere unter Hochfetttdiät

A: Gewichtsentwicklung von Tieren der Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13};Ldlr^{-/-}$ -Linie und altersgleichen Kontrolltieren, die für 16 Wochen auf HFD gehalten wurden.
B: Gesamtcholesterolgehalt (mmol/l) im Plasma von Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13};Ldlr^{-/-}$ -Tieren und dazugehörigen Kontrollen nach 16 Wochen HFD.

Kontrolle: weiß; Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13};Ldlr^{-/-}$:schwarz; Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; n=5.

Zur Untersuchung des Schweregrades der Atherosklerose nach 16 Wochen HFD, wurden die Hauptschlagader und die Aortenwurzel zunächst mit Oil-Red-O (ORO),

einem Farbstoff für Lipide, gefärbt. Die lipidreichen Ablagerungen in allen Abschnitten der Aorta, besonders aber im abdominalen Bereich, waren im $\text{Lys-G}\alpha_{12}/\text{G}\alpha_{13};\text{Ldlr}^{-/-}$ -KO deutlich reduziert (Abb. 5.24 A). Die Plaqueanzahl und -größe in der Aortenwurzel waren im $\text{G}\alpha_{12}/\text{G}\alpha_{13};\text{Ldlr}^{-/-}$ -KO ebenfalls verringert (Abb. 5.24 B). Die Tiere des $\text{Lys-G}\alpha_{12}/\text{G}\alpha_{13};\text{Ldlr}^{-/-}$ -KO waren also weitgehend vor einer Atherosklerose geschützt.

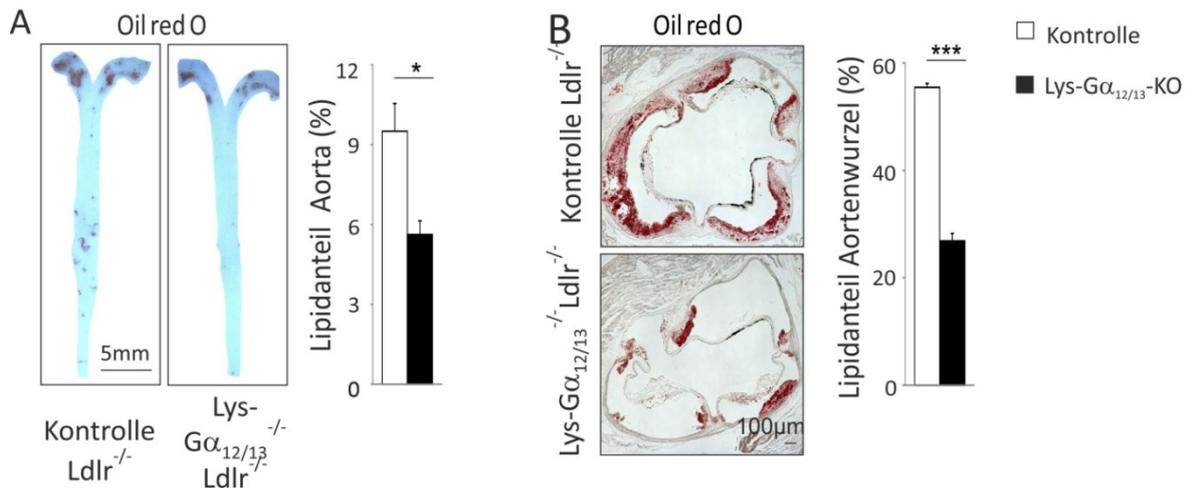


Abb. 5.24 Analyse der Atherosklerose in $\text{Lys-G}\alpha_{12}/\text{G}\alpha_{13};\text{Ldlr}^{-/-}$ -KO-Tieren

A: Oil-Red-O-Färbung (ORO) der gesamten Aorta und Quantifizierung nach 16 Wochen HFD. **B:** ORO-Färbung der Aortenklappen und Quantifizierung nach 16 Wochen HFD.

Kontrolle: weiß; $\text{Lys-G}\alpha_{12}/\text{G}\alpha_{13};\text{Ldlr}^{-/-}$ -KO: schwarz; Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; 2 unabhängige Experimente mit je $n=6-8$; $p<0,05^*$; $p<0,001^{***}$.

Obwohl in den Tieren des $\text{Lys-G}\alpha_{12}/\text{G}\alpha_{13};\text{Ldlr}^{-/-}$ -KO weniger atherosklerotische Ablagerungen zu sehen waren, konnten keine Unterschiede in der grundlegenden Zusammensetzung der Plaques bemerkt werden. Mit Hilfe einer immun-histochemischen Färbung für CD68^+ Makrophagen wurden in Bezug auf alle Zellen eines Plaques ähnlich viele Makrophagen in Tieren aus der Kontroll- und der $\text{Lys-G}\alpha_{12}/\text{G}\alpha_{13};\text{Ldlr}^{-/-}$ -KO-Gruppe gefunden (Abb. 5.25).

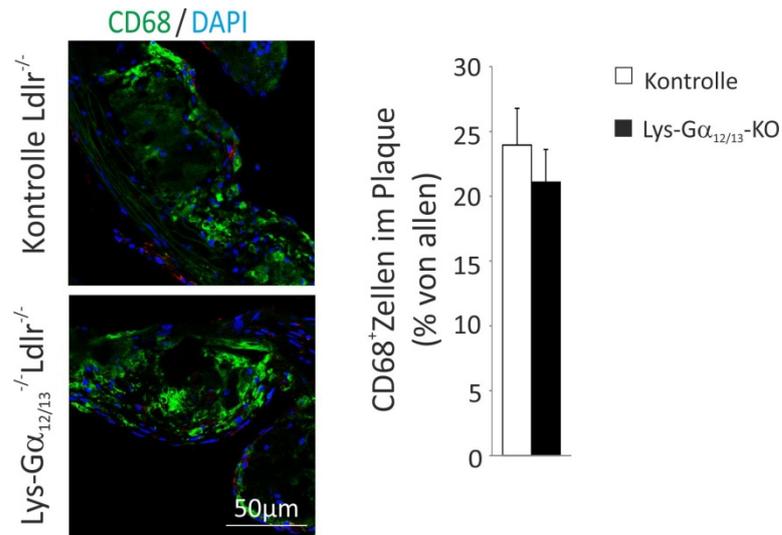


Abb. 5.25 Zusammensetzung atherosklerotischer Läsionen im $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13};Ldlr^{-/-}$

A: Immunhistochemische Untersuchung und Quantifizierung der Anzahl an $CD68^+$ Makrophagen (grün) in Bezug auf alle Zellen (blaue Kernfärbung) in Läsionen der Aortenklappen nach 16 Wochen HFD.

Kontrolle: weiß; $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13};Ldlr^{-/-}$ -KO: schwarz; Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; n=5-6.

5.17.2 Makrophagen aus der Aorta des $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13};Ldlr^{-/-}$ -KO exprimieren verstärkt antiinflammatorische Gene

Wie in den Makrophagen des $G\alpha_{12}/G\alpha_{13};Ldlr^{-/-}$ -KO eine veränderte Genexpression zum Schutz vor Atherosklerose beigetragen haben könnte, wurde im Folgenden untersucht. Dazu wurden aus den Tieren des $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13};Ldlr^{-/-}$ -KO und der Kontrollgruppe, nachdem sie für 12 Wochen mit HFD gefüttert wurden, die Aorten entnommen und die Leukozyten durch enzymatischen Verdau herausgelöst. Aus den am Durchflussszometer sortierten aortalen Makrophagen (aoMP) wurde RNA isoliert und in einem qRT-PCR Experiment die Aktivität bestimmter Gene ermittelt.

Dabei wurde festgestellt, dass Makrophagen, die aus atherosklerotischen $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13};Ldlr^{-/-}$ -KO-Tieren stammten, deutlich weniger entzündungsassoziierte Gene exprimierten. Zu den in dieser Studie entdeckten Unterschieden zwischen den

Makrophagen von $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13};Ldlr^{-/-}$ -KO und Kontrollmäusen sind besonders die Veränderungen in Genen wie *Cd86*, *Ccl4*, *Ccl5* und auch *Tnfa* zu erwähnen (Abb. 5.26). Sie zeigten eine recht deutliche Reduktion in ihrer Expression. Im Gegensatz dazu waren viele Gene, die für antientzündliche Eigenschaften in Makrophagen verantwortlich sind, verstärkt aktiviert. Hierzu zählten die signifikant veränderten Gene *Arg1* und *Chi3l3* (codiert für Ym1). *Abca1*, ein Marker mit wichtiger Bedeutung für die Regulierung des Cholesterol-Transports (Gelissen, Harris et al. 2006), war ebenfalls signifikant stärker im $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13};Ldlr^{-/-}$ -KO exprimiert. Ein weiteres wichtiges Gen in Bezug auf den Cholesterol-Haushalt in Makrophagen ist *Abcg1*, das allerdings nur in der Tendenz höher im $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13};Ldlr^{-/-}$ -KO exprimiert war.

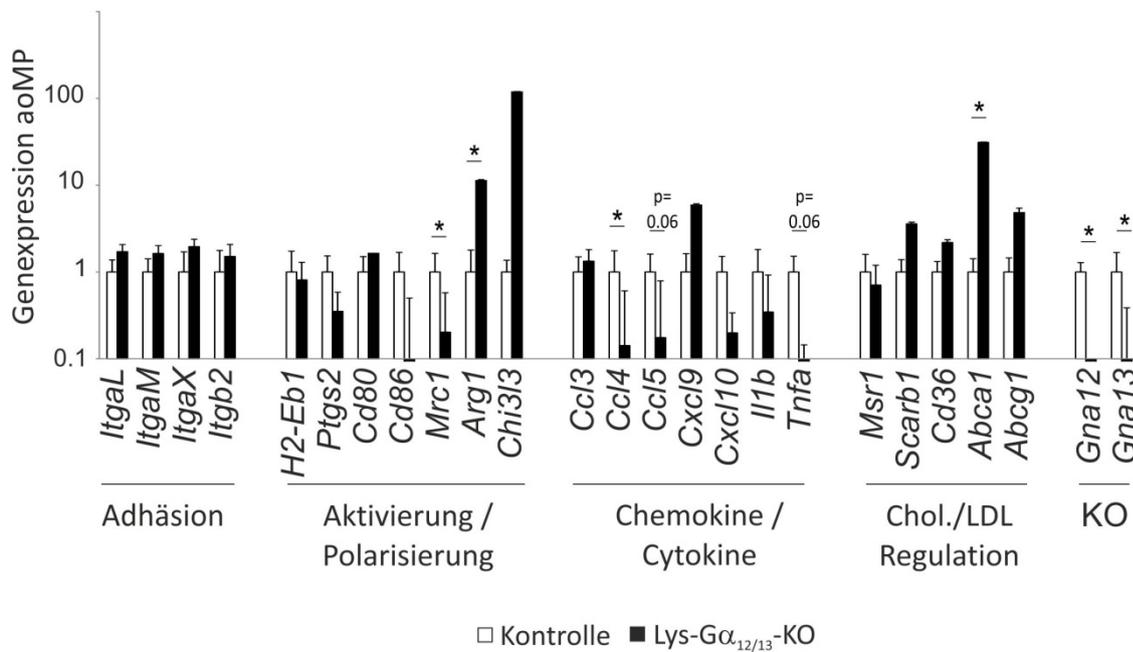


Abb. 5.26 Expressionsanalyse in aoMP des $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13};Ldlr^{-/-}$

Analyse der Genexpression in aoMP mit qRT-PCR. Alle Daten wurden normalisiert auf β -actin und die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt. Daten sind dargestellt als Antilog-Werte des Mittelwerts der $\Delta\Delta$ ct Werte \pm Antilog-Werte der Grenzen des 95% Konfidenzintervalls.

Kontrolle: weiß; $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13};Ldlr^{-/-}$ -KO: schwarz; n=6; p<0,05*.

5.17.3 Rekrutierung von Makrophagen des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO nicht verringert

Ob die reduzierte Anfälligkeit des Lys-G α_{12} /G α_{13} ;Ldlr^{-/-}-KO für Atherosklerose mit dem zu Beginn dieser Studie beschriebenen Migrationsdefekt in residenten Makrophagen zusammenhing, wurde mit einem „adoptiven Transfer“ (adTF) beantwortet. Für diesen Versuch wurden aus dem Peritoneum von Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Tieren und dazugehörigen Kontrollen durch TG-angereicherte Makrophagen geerntet und *ex vivo* mit dem grünen Fluoreszenz-Farbstoff Calcein gefärbt. Diese Zellen wurden dann intravenös in Ldlr^{-/-}-Empfängertiere appliziert. Zum Zeitpunkt der Injektion hatten diese Tiere bereits für 8 Wochen HFD erhalten. Nach weiteren 48 Stunden HFD wurden die Rezipienten getötet und die Aortenwurzeln auf eingewanderte, grün-fluoreszierende Makrophagen hin abgesucht. In Tieren, die G $\alpha_{12/13}$ -defiziente Makrophagen erhalten hatten, wurden ähnlich viele Calcein-gefärbte Makrophagen detektiert wie in Tieren, denen Kontroll-Makrophagen injiziert wurden (Abb. 5.27 B). Die Rekrutierung von Makrophagen in atherosklerotische Plaques schien also durch den zellspezifischen Verlust von G $\alpha_{12/13}$ nicht negativ beeinflusst gewesen zu sein.

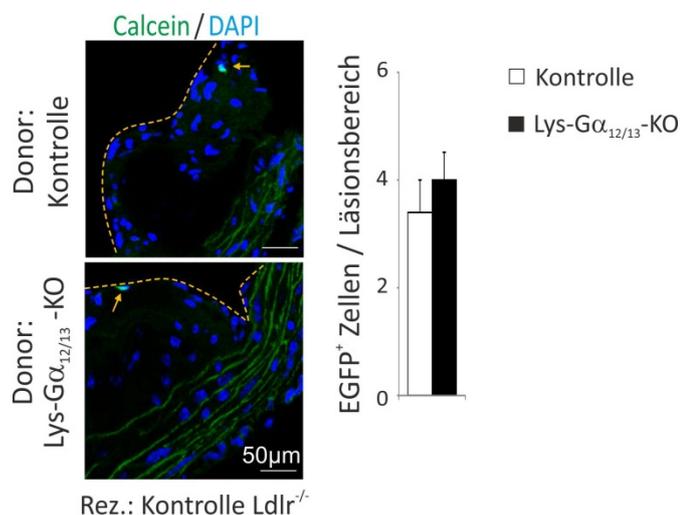


Abb. 5.27 Rekrutierung von Makrophagen in atherosklerotische Läsionen

B: Immunhistochemische Untersuchung und Quantifizierung der Rekrutierung von TG-induzierten, mit Calcein gefärbten, peritonealen Makrophagen (grün) aus Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO und Kontrollen 48h nach adTF *i.v.* in Ldlr^{-/-}-KO-Tiere. In allen Zellen der Läsion wurde zusätzlich der Kern gefärbt (blau).

Kontrolle: weiß; Lys- α_{12}/α_{13} ;Ldlr^{-/-}-KO: schwarz; Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; n=5-6.

5.17.4 Untersuchungen von Schaumzellen des Lys- α_{12}/α_{13} -KO

Die protektive Wirkung der Makrophagen des Lys- α_{12}/α_{13} ;Ldlr^{-/-}-KO könnte mit der Genexpression und Entwicklung der Schaumzellen während der Entstehung der Atherosklerose zusammenhängen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden differenzierte kmMP mit acetyliertem „low density Lipoprotein“ (acLDL) stimuliert und damit in Schaumzellen umgewandelt. Dadurch sollte die Entzündungsreaktion atherosklerotischer Makrophagen *in vitro* imitiert werden. Zunächst wurde in den Zellen die Aktivität entzündungsrelevanter Gene bestimmt. Leider konnte nur für die beiden Gene *Nos2* und *Cxcl11* ein tendenzieller Effekt beobachtet werden (Abb. 5.28).

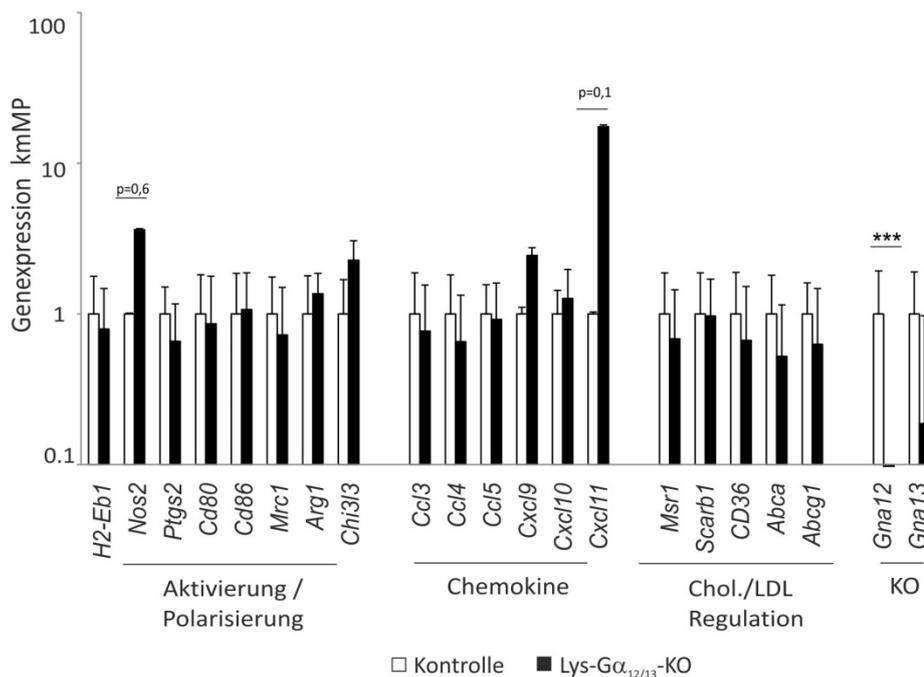


Abb. 5.28 Expressionsanalyse in Schaumzellen des Lys- α_{12}/α_{13} -KO

Analyse der Genexpression in Schaumzellen. Daten wurden normalisiert auf β -actin; Kontrolle wurde auf 1 gesetzt. Daten sind dargestellt als Antilog-Werte des Mittelwerts der $\Delta\Delta$ ct Werte \pm Antilog-Werte der Grenzen des 95% Konfidenzintervalls. Kontrolle: weiß; Lys- α_{12}/α_{13} -KO: schwarz; n=5.

Allerdings waren diese beiden Gene in Zellen des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO im Gegensatz zu den *in vivo* Befunden stärker aktiviert als in Kontrollzellen. Eine veränderte Genexpression für *Abca1* und *Abcg1* konnte in den untersuchten Schaumzellen auch nicht festgestellt werden.

Die Entwicklung der Schaumzellen wies jedoch ebenfalls keine großen Unterschiede zwischen Zellen des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO und den Kontrollen auf. Selbst die Zugabe von Apolipoprotein A1 (ApoA1), das den Efflux von zuvor aufgenommenem Cholesterol vermittelt, bewirkte unter *in vitro* Bedingungen im DKO und in der Kontrolle einen ähnlichen Effekt (Abb. 5.29). Der atheroprotektive Effekt, der im Lys-G α_{12} /G α_{13} ;Ldlr^{-/-}-KO zu beobachten war, schien also nicht direkt mit G $\alpha_{12/13}$ -defizienten Schaumzellen zusammenzuhängen.

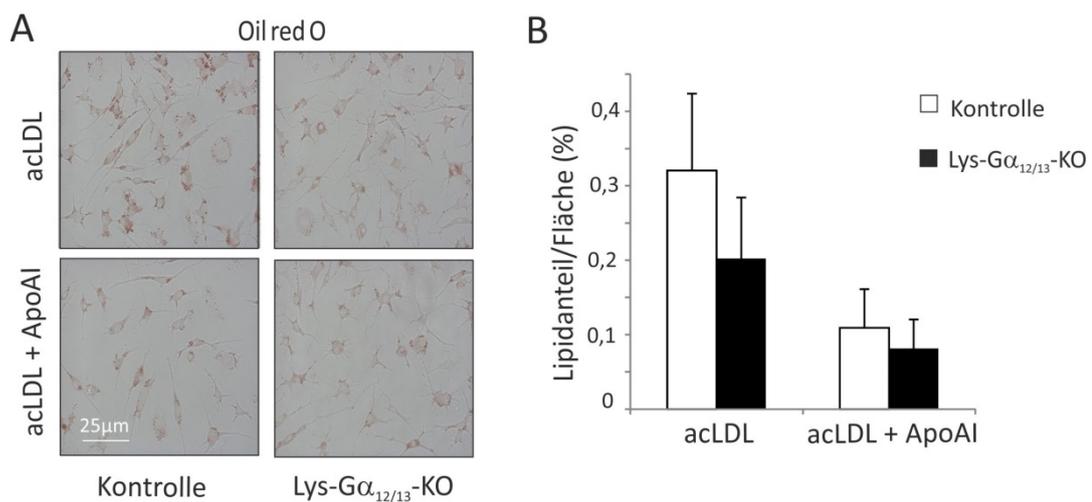


Abb. 5.29 Analyse von Schaumzellen des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO

A: Oil-Red-O-Färbung (ORO) von Schaumzellen des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO und der Kontrolle nach Zugabe von aCLDL und ApoA1 **B:** Quantifizierung der ORO-Färbung aus A.

Kontrolle: weiß; Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO: schwarz; Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; n=3-4.

5.17.5 Natürliche Antikörper schützen $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13};Ldlr^{-/-}$ -KO vor Atherosklerose

In wie weit die Existenz der atheroprotektiven natürlichen Antikörper (siehe Abb. 5.21) hier eine Rolle gespielt haben könnte, wurde an histologischen Proben der Aortenwurzel untersucht. Die darin existierenden atherosklerotischen Läsionen der $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13};Ldlr^{-/-}$ -KO-Tiere wiesen ein höheres Vorkommen des natürlichen IgM-Antikörpers T15/E06 auf, wie die immunhistochemische Färbung mit einem spezifischen Antikörper nachweisen konnte (Abb. 5.30).

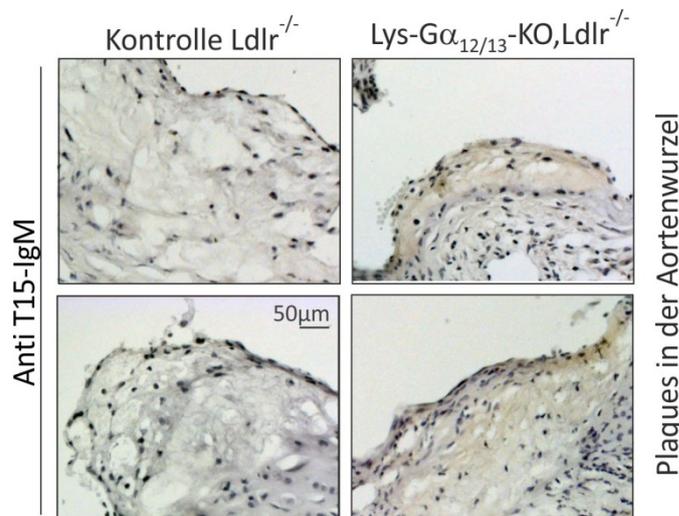


Abb. 5.30 Analyse atherosklerotischer Läsionen des $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13};Ldlr^{-/-}$ -KO auf natürliche, atheroprotektive Antikörper

Immunhistochemischer Nachweis von natürlichen IgM-Antikörpern vom Typ T15/E06 in Läsionen der Aortenwurzel nach 16 Wochen HFD.

Der verwendete Antikörper wurde biotinyliert; n=3-4.

5.17.6 Atherosklerose-Prävention von $Ldlr^{-/-}$ -KO-Tieren durch Therapie mit peritonealen Zellen

Die potentiell schützende Wirkung natürlicher Antikörper konnte bereits im Vergleich von $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13};Ldlr^{-/-}$ -KO mit ihren Kontrollen gezeigt werden (Abb. 5.30). Ob dieser Effekt jedoch auch einen therapeutischen Nutzen hatte, wurde durch den Transfer peritonealer Zellen aus $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO-Tieren in $Ldlr^{-/-}$ -KO-Tiere überprüft (Abb. 5.31). Während der Fütterung der Rezipienten mit HFD für 12 Wochen wurde der

Transfer der Zellen des Peritoneums viermal wiederholt (Abb. 5.31 A). Die Analyse der atherosklerotischen Läsionen nach Versuchsende wies tatsächlich eine reduzierte Atheroskleroserate in den Tieren auf, die Zellen des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO erhalten hatten (Abb. 5.31 B). Darüber hinaus konnte auch der Anteil an natürlichen Antikörpern vom Typ T15/E06 in den Läsionen der Aortenwurzel nachgewiesen werden, die zuvor mit peritonealen Zellen aus Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Tieren therapiert wurden (Abb. 5.31 C).

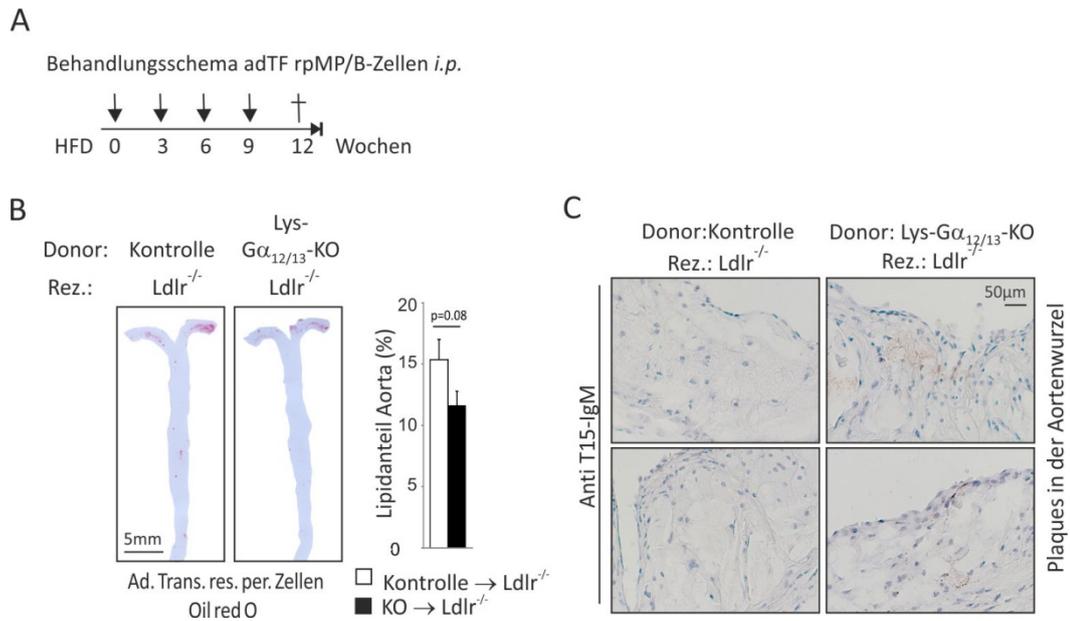


Abb. 5.31 Analyse der Atherosklerose in Ldlr $^{-/-}$ -KO-Tieren nach adoptivem Transfer von peritonealen Zellen aus Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO und Kontrollen

A: ORO-Färbung der gesamten Aorta und Quantifizierung nach adTF *i.p.* von peritonealen Zellen aus Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO und Kontrollen und gleichzeitiger Fütterung für 12 Wochen mit HFD. **B:** Immunhistochemische Untersuchung von Läsionen der Aortenwurzel (aus A) auf die Existenz der natürlichen IgM-Antikörper vom Typ T15/E06.

Kontrolle: weiß; Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO: schwarz; Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM; Der verwendete Antikörper wurde biotinyliert. n=6-7.

6 Diskussion

6.1 Regulation des Zytoskeletts in Makrophagen durch $G_{12/13}$

Die Bedeutung der ubiquitär exprimierten G-Proteine $G_{12/13}$ ist in Immunzellen noch nicht vollständig aufgeklärt. Für Zellen des erworbenen Immunsystems konnte gezeigt werden, dass $G_{12/13}$ eine essentielle Bedeutung für die Polarisierung, Motilität und Proliferation von Lymphozyten hat (Rieken, Sassmann et al. 2006, Herroeder, Reichardt et al. 2009, Muppidi, Schmitz et al. 2014). Untersuchungen an Zellen des angeborenen Immunsystems liegen nur für neutrophile Granulozyten vor. Eine *in vitro* Studie zu den beiden α -Untereinheiten von $G_{12/13}$ zeigte, dass sie essentiell für die Organisation und Orientierung des Zellskeletts sind. Durch die Aktivierung von $G\alpha_{12/13}$ werden in neutrophilen Granulozyten die in der Signalkaskade folgende kleine GTPase RhoA, ROCK und Myosin II aktiviert. Sobald die Immunzellen diese Aktivierung erfahren, zeigen sie an ihrer Zellfront eine höhere Sensitivität für zellanlockende Stimulantien (Xu, Wang et al. 2003). Für andere myeloide Zellen gibt es nur für Monozyten Hinweise darauf, dass die Signalvermittlung über $G_{12/13}$ -gekoppelte Rezeptoren wichtig für deren Migration ist (Honing, van den Berg et al. 2004). Bisher existieren jedoch keine *in vivo* Untersuchungen, die die Rolle von $G_{12/13}$ als wichtigen Regulator für das Zytoskelett von Makrophagen beweisen. Bei der morphologischen Untersuchung der Makrophagen der Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO-Mäusen konnten diesbezüglich interessante Beobachtungen gemacht werden: Der Verlust von $G\alpha_{12/13}$ führt insbesondere in rpMP und kmMP zur Verlängerung der Filopodien und damit auch zur signifikanten Vergrößerung des Zelldurchmessers. Das kontrollierte Zurückziehen dieser Zellfortsätze scheint auch reduziert zu sein und spiegelt somit die Befunde, die schon für $G\alpha_{12/13}$ -defiziente Neurone gemacht wurden (Nurnberg, Brauer et al. 2008), wieder. Durch die Zugabe des RhoA-Inhibitors C3-Exoenzym zu Makrophagen konnten diese Merkmale auch beobachtet werden (Rotsch, Rohrbeck et al. 2012). Der Verlust der $G\alpha_{12/13}$ -vermittelten RhoA Aktivierung scheint also dem Phänotyp der hier untersuchten Makrophagen des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO zugrunde zu liegen.

Die Organisation des zellulären Skeletts der Makrophagen ist neben ihrer Rolle für die Morphologie auch ein wesentlicher Faktor in Bezug auf deren Fortbewegung. Besonders Zellen des Immunsystems sind auf eine intakte Migrationsfähigkeit angewiesen. Sie müssen aus der Zirkulation des Blutgefäßsystems oder innerhalb eines bestimmten Organs zu Orten der Inflammation gelangen um dort die Immunantwort regulieren zu können (Nourshargh, Hordijk et al. 2010). Für die Migration von T-Zellen konnte die Bedeutung von $G\alpha_{12/13}$ bereits nachgewiesen werden (Herroeder, Reichardt et al. 2009) und auch in bestimmten B-Zell-Populationen der Milz wurde beschrieben, wie wichtig $G\alpha_{12/13}$ für die Wanderung dieser Zellen ist (Rieken, Sassmann et al. 2006). Bei der Analyse der $G\alpha_{12/13}$ -defizienten Makrophagen hinsichtlich ihrer Bewegungsfähigkeit ist ein ähnliches Phänomen zu sehen. Unter basalen Bedingungen zeigen die Makrophagen eine eingeschränkte Migrationsfähigkeit, nach der Behandlung mit LPS und C5a ist diese Einschränkung jedoch aufgehoben. Es ist wahrscheinlich, dass durch diese starke Aktivierung andere Signalkaskaden ausgelöst werden, die wiederum den Verlust von $G\alpha_{12/13}$ kompensieren können. In neutrophilen Granulozyten, die einen Verlust des Rho GEF Lsc aufwiesen, konnte bewiesen werden, dass eine Überstimulation eine fehlerhafte Migration ausgleichen kann (Francis, Shen et al. 2006).

6.2 Verlust von $G\alpha_{12/13}$ in Makrophagen führt zu veränderter Genexpression

Über die Rolle von $G_{12/13}$ als elementarer Regulator des Zytoskeletts hinaus, wurde den beiden G-Proteinen G_{12} und G_{13} schon mehrfach eine wichtige Bedeutung in der Transkriptionskontrolle zugeschrieben. So ist bekannt, dass durch die Aktivierung von $G_{12/13}$ -gekoppelten Rezeptoren der glatten Muskulatur die Expression von Genen, die vom „serum response factor“ (SRF) und „myocardin-related transcription factor“ (MRTF) abhängig sind, angetrieben wird (Althoff, Albarran Juarez et al. 2012). Darüber hinaus konnte auch in myokardialen Herzzellen (Takefuji, Wirth et al. 2012) sowie in Endothelzellen (Sivaraj, Takefuji et al. 2013) die Bedeutung von $G\alpha_{12/13}$ -abhängiger Genregulation belegt werden. Die Arbeit zeigt außerdem, dass $G\alpha_{12/13}$ und die kleine GTPase RhoA besonders in murinen Endothelien einen positiven Einfluss auf die NF- κ B-regulierte Genexpression haben kann. Allerdings existieren auch Studien, die das

Gegenteil belegen und $G\alpha_{12/13}$ einen negativen regulatorischen Effekt in Tumorzellen zuweisen (Rattan, Giri et al. 2003). Es ist also möglich, dass der Effekt von RhoA auf NF- κ B nicht nur vom Zelltyp sondern auch vom Aktivierungsstatus der Zelle abhängt, wie bereits in humanen neutrophilen Granulozyten festgestellt werden konnte (Fessler, Arndt et al. 2007). Interessanterweise konnte nun in der hier vorliegenden Arbeit belegt werden, dass $G\alpha_{12/13}$ auch in Makrophagen die Genregulation beeinflusst. Die als äußerst quieszent geltenden Makrophagen des Peritoneums stellen sich in Tieren mit Makrophagen-spezifischem $G\alpha_{12/13}$ -KO als besonders aktiviert heraus. Die Untersuchungen zur Genexpression zeigen, dass der Verlust von $G\alpha_{12/13}$ zu einer starken Ausprägung entzündungsspezifischer Gene wie *H2-Eb1*, *Nos2* und *Cyclooxygenase 2* führt. Auch die verstärkte Produktion von Chemokinen wie TNF α in den peritonealen Makrophagen des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO weist auf eine verstärkte Aktivierung hin. Darüber hinaus kann auch in Makrophagen, die aus Knochenmark differenziert wurden, ein ähnlicher Effekt durch das Fehlen der α -Untereinheiten der beiden G-Proteine $G_{12/13}$ nachgewiesen werden. Besonders deutlich aktiviert sind hier die Gene für proinflammatorische Chemokine wie *Cxcl9*, *Cxcl10* und *Cxcl11*. Bei der Analyse der aktivierten Gene im Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO wird deutlich, dass die meisten durch NF- κ B kontrolliert werden. Eine verstärkte Phosphorylierung der NF- κ B-Komponente p65 in peritonealen $G\alpha_{12/13}$ -defizienten Makrophagen weist ebenfalls auf eine erhöhte Aktivität von NF- κ B hin. Durch die Behandlung von Makrophagen des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO mit Inhibitoren für NF- κ B kann die Expression entzündlicher Gene weitgehend normalisiert werden. Die mechanistische Verbindung zwischen fehlender $G\alpha_{12/13}$ -Aktivität einerseits und der Kontrolle der Genexpression durch NF- κ B andererseits, wurde durch diese *in vitro* Experimente an Makrophagen hergestellt.

Die Hemmung sowohl von RhoA als auch von ROCK in Zellen von Kontrolltieren führt zur Ausprägung eines Phänotyps, der dem des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO in Bezug auf die Genaktivität gleicht. Ein Verbindungsglied zwischen reduzierter $G\alpha_{12/13}$ -vermittelter RhoA-Aktivierung und vermehrter NF- κ B-Aktivität könnte die kleine GTPase Rac1 sein (Sander, ten Klooster et al. 1999). Über Rac1 ist bekannt, dass es NF- κ B direkt aktivieren kann und somit zur Steuerung der Genaktivität beiträgt (Higuchi, Otsu et al.

2003). Es wird vermutet, dass Rac1 durch die Induktion von ROS zur Aktivierung von NF- κ B führen könnte (Sulciner, Irani et al. 1996). In myeloiden Zellen konnte durch die Aktivierung von „Toll-like Rezeptoren“ (TLR) Rac1 rekrutiert werden. Die folgende Aktivierung von Proteinkinasen durch Rac1 könnte darin zur Phosphorylierung von p65 und somit zur Stimulation NF- κ B-vermittelter Genexpression geführt haben (Arbibe, Mira et al. 2000). Die Experimente an Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Makrophagen zeigen bereits unter basalen Bedingungen eine erhöhte Aktivität von Rac1. Durch die Behandlung dieser Makrophagen mit dem Rac1-Inhibitor NSC23766 kann die zuvor beschriebene Expression inflammatorischer Gene im Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO bis auf das Maß in Zellen der Kontrolle herunter reguliert werden. Gerät also das Gleichgewicht zwischen der Aktivierung von RhoA und der Hemmung von Rac1 wie im Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO außer Kontrolle, kommt es zur Fehlregulation von NF- κ B. Die beiden G-Proteine G $_{12/13}$ sind durch ihre Fähigkeit, RhoA zu aktivieren und dadurch Rac1 zu inhibieren, was wiederum zu einer Blockade von NF- κ B führen kann, maßgeblich und unmittelbar an der Regulation der Genaktivität sowohl in residenten wie auch in rekrutierten Makrophagen beteiligt.

Mit Bezug auf den Mechanismus, der am Anfang der Signalkaskade die Aktivität von G $_{12/13}$ reguliert, wurde S1P $_2$ als potentieller Rezeptor in residenten Makrophagen des Peritoneums identifiziert. Die Hemmung dieses Rezeptors führt, wie auch der Verlust von G $\alpha_{12/13}$, in Makrophagen zur Aktivierung entzündungsrelevanter Gene. Obwohl S1P $_2$ als G $_{12/13}$ -gekoppelter Rezeptor bekannt ist und RhoA aktivieren kann, wurde S1P $_2$ auch mit der Signaltransduktion über G $_i$ und G $_{q/11}$ in Verbindung gebracht (Obinata und Hla 2012). Allerdings weisen die Befunde der vorliegenden Arbeit eher auf einen G $_{12/13}$ -abhängigen Mechanismus hin. Ein Zusammenhang zwischen S1P $_2$ und der diskutierten Aktivierung von RhoA durch G $_{12/13}$ -gekoppelte Rezeptoren konnte bereits mit Hilfe einer Studie mit Überexpressionsvektoren in einer Ovarialzelllinie gezeigt werden (Sugimoto, Takuwa et al. 2003). Darin wird belegt, dass die Aktivierung des Rezeptors S1P $_2$ durch S1P über die nachgeschaltete Aktivierung von RhoA, allerdings nicht mit Hilfe von ROCK, direkt zur Inhibierung von Rac1 führt. Im physiologischen Kontext wird weiter beschrieben, dass dieses S1P $_2$ -vermittelte Signal unter anderem in Makro-

phagen zur Inhibition von Migrationsprozessen führt (Michaud, Im et al. 2010). Allerdings wurden dazu Mäuse verwendet, die einen globalen Defekt für die Expression von S1P₂ aufweisen. Diese Effekte wurden im Zusammenhang mit der spezifischen Defizienz für G $\alpha_{12/13}$ in den Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO nicht beobachtet.

Die S1P₂-vermittelte Suppression der Genexpression scheint ein autokriner Effekt zu sein, da die Blockade von S1P₂ auch in Anwesenheit von exogenen Agonisten enthemmend wirkt. Die Kultivierung der Makrophagen von Kontrolle und Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO in peritonealer Flüssigkeit oder in Medium erzielt eine ähnlich stark unterdrückte Genaktivität, die selbst durch die Zugabe von S1P zum Medium nicht weiter reduziert werden kann. Die Untersuchungen an peritonealer Flüssigkeit zeigen, dass Makrophagen unabhängig von der Existenz der G-Proteine G $_{12/13}$ S1P produzieren. Welchen Anteil andere Zellen des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO zur Produktion von S1P beitragen, wurde jedoch nicht untersucht. Der Verlust der α -Untereinheiten G $\alpha_{12/13}$ in Makrophagen des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO hat aber zur Folge, dass der Ligand S1P über den G $_{12/13}$ -gekoppelten Rezeptor S1P₂ keine Signale mehr weiterleiten kann. S1P ist aber auch der Agonist für vier weitere S1P-Rezeptoren. Der Rezeptor S1P₁ koppelt überwiegend an G-Proteine vom Typ G $_{i/o}$. Die Rezeptoren S1P₃₋₅ können wie auch S1P₂ neben G $_{12/13}$ über G $_{i/o}$ und G $_{q/11}$ Signalkaskaden aktivieren (Chun, Hla et al. 2010). S1P₃ konnte in den hier untersuchten rpMP nicht nachgewiesen werden. Die Expression von S1P₄₊₅ wurde nicht überprüft, allerdings ist bekannt, dass diese beiden Rezeptoren nicht in Makrophagen vorkommen (Blaho und Hla 2014). Somit konnte im Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO die defekte Signalübertragung über den G $_{12/13}$ -gekoppelten Rezeptor S1P₂ wahrscheinlich nicht durch einen anderen S1P-bindenden Rezeptor kompensiert werden.

Ob es sich bei S1P₂ jedoch um den einzig relevanten Rezeptor im Zusammenhang mit der Kontrolle der Quieszenz in residenten Makrophagen handelt, ist nicht bekannt. Es ist durchaus möglich, dass auch andere G $_{12/13}$ -gekoppelten Rezeptoren die Genexpression in Makrophagen beeinflussen. Da für viele dieser Rezeptoren aber keine spezifischen Antagonisten existieren, konnten sie hier nicht getestet werden.

Die Befunde der hier untersuchten Signalkaskade, die durch die Stimulation des $G_{12/13}$ -gekoppelten Rezeptors $S1P_2$ das Effektormolekül RhoA aktiviert und so die NF- κ B-vermittelte Genexpression steuern kann, sind in Abb. 6.1 zusammengefasst dargestellt.

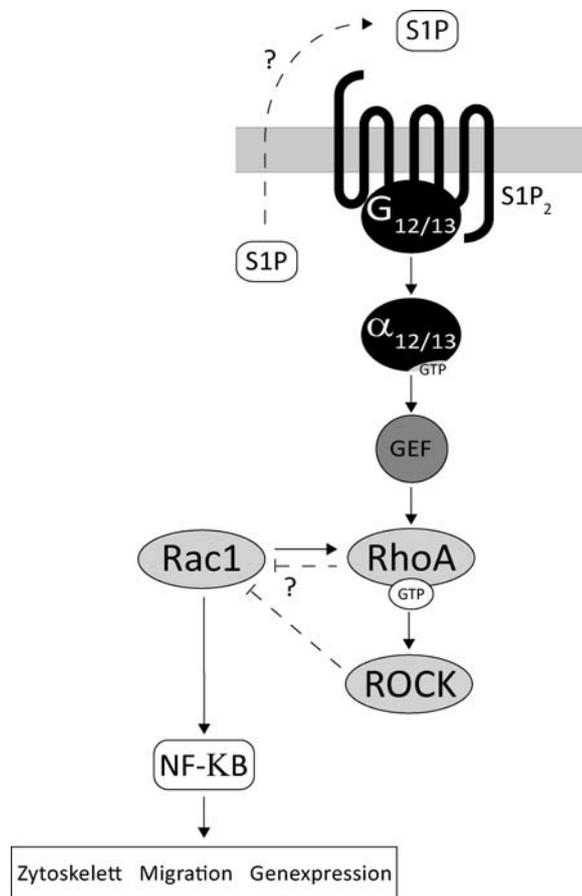


Abb. 6.1 Modell der $S1P_2/G_{12/13}/RhoA$ vermittelten Signaltransduktion in residenten Makrophagen

Das in Makrophagen produzierte Signalmolekül S1P aktiviert den $G_{12/13}$ -gekoppelten Rezeptor $S1P_2$. Daraufhin kommt es zur Aktivierung der α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins und im Folgenden wird das Effektormolekül RhoA mit Hilfe des Austauschfaktors GEF in den aktivierten Zustand überführt. RhoA wiederum leitet das Signal weiter über ROCK. Die GTPase Rac1 kann entweder indirekt über ROCK oder direkt über RhoA gehemmt werden. Wird die Aktivität von Rac1 unterdrückt, kann diese GTPase nicht in die NF- κ B-vermittelte Genexpression eingreifen. Im Falle des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO kann durch die fehlende Signalweiterleitung über RhoA keine Inhibition von Rac1 stattfinden und Rac1 kann ungehindert die NF- κ B-vermittelte Genexpression induzieren. Es ist auch möglich, dass die GTPase RhoA direkt mit der GTPase Rac1 interagiert und eine gegenseitige Regulation stattfindet.

6.3 Funktionelle Konsequenzen des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO in Makrophagen

Offensichtlich verändern sich Makrophagen des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO stark in ihrer Morphologie und in ihrer Genexpression. Um zu untersuchen, was dieser Phänotyp für Folgen für die Funktion der Makrophagen haben könnte, wurden Experimente mit Bezug auf die Immunantwort dieser Zellen durchgeführt. Bei der Stimulation von rpMP mit LPS *in vitro* wurden zwischen Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO und Kontrolle auf Genexpressionsebene keine Unterschiede gefunden. Die generelle Reaktion auf pathogene Stimuli scheint also im Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO nicht beeinträchtigt zu sein. Bei der Untersuchung zur Zusammensetzung peritonealer Zellen wurden interessante Beobachtungen gemacht: Der DKO zeigt eine starke Erhöhung von inflammatorischen Monozyten und SPM im Bauchraum. Residente peritoneale Makrophagen machen normalerweise etwa 60% aller Immunzellen im Peritoneum aus. Unter homöostatischen Bedingungen befinden sich fast ausschließlich als LPM beschriebene Immunzellen im Peritonealraum (Ghosn, Cassado et al. 2010). Diese Population ist allerdings während einer Peritonitis nicht zu detektieren (Barth, Hendrzak et al. 1995). Das hängt zum einen mit einer verstärkten Adhärenz der LPM an Mesothelien zusammen und zum anderen mit einer erhöhten Auswanderungsrate aus dem Peritoneum in drainierende Lymphknoten während der Entzündung (Bellingan, Xu et al. 2002). Im Rahmen einer Peritonitis findet man dann anstatt der LPM überwiegend als SPM bezeichnete Zellen. Bei der detaillierten Analyse des Peritoneums in Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Mäusen konnte festgestellt werden, dass dieser Typ Makrophagen, der in unstimulierten Mäusen des C57BL/6-Stamms (WT) etwa 10% aller peritonealen Makrophagen ausmacht, bereits unter basalen Bedingungen stark erhöht ist. Die leicht reduzierte Apoptose in Makrophagen des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO kann als Grund für die vermehrte Zellzahl allerdings nicht ganz ausgeschlossen werden.

Diese Befunde machen deutlich, dass der Verlust von G $\alpha_{12/13}$ in Makrophagen nicht nur zu einer veränderten Morphologie der Zellen führt, sondern auch deren Zusammensetzung im Bauchraum verändert. Die funktionellen Konsequenzen dieser Veränderungen in G $\alpha_{12/13}$ -defizienten Makrophagen wurden anhand der Peritonealflüssigkeit untersucht. Dazu wurden Makrophagen aus Kontrolltieren mit der

peritonealen Flüssigkeit aus Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Mäusen stimuliert. Dies führt zu einer vermehrten Expression von Entzündungsmarkern wie *Tnfa*. Die Peritonealflüssigkeit der Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Tiere scheint also proinflammatorische Eigenschaften zu besitzen und könnte somit zur Entstehung eines entzündlichen Milieus im Bauchraum beigetragen haben.

Am Modell der Peritonitis wurde untersucht, wie die bereits basal entzündeten Makrophagen des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO reagieren, wenn eine weitere Entzündung im Peritoneum induziert wird. Es wurde dabei keine unterschiedliche Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten in den Bauchraum festgestellt. Dies kann partiell dadurch erklärt werden, dass die Rekombinationseffizienz in Tieren des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO vom Differenzierungsgrad und der Aktivierung der Immunzellen abhängt (Keshav, Chung et al. 1991). So konnte auch in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass Monozyten erst nach vollständiger Reifung in Makrophagen eine effiziente Rekombination aufweisen. Somit prägen sie also erst zu einem späten Zeitpunkt in ihrer Entwicklung den eigentlichen Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Phänotyp aus und können daher regulär als inflammatorische Monozyten rekrutiert werden. Neutrophile Granulozyten hingegen zeigen dauerhaft eine sehr gute Rate der vollständigen Aktivität des LysM-Cre-Konstrukts. Da die Rekrutierung im Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO und in Kontrolltieren jedoch gleich verläuft, ist der Verlust von G $\alpha_{12/13}$ in neutrophilen Granulozyten offensichtlich nicht ausschlaggebend für die primäre Immunantwort.

6.3.1 Funktionelle Konsequenzen des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO für das Immunsystem

Die gezielte Entfernung der beiden α -Untereinheiten der G-Proteine G $_{12/13}$ in myeloiden Zellen und die damit verbundenen Veränderungen morphologischer und transkriptioneller Natur scheinen in betroffenen Organen wie dem Peritoneum auch einen Einfluss auf nicht-myeloide Immunzellen zu haben. Dazu zählen sowohl T-Lymphozyten als auch peritoneale B-Zellen, die wie erwartet nicht durch die LysM-Cre-Rekombination beeinflusst sind. Die Populationen dieser beiden Zelltypen des adaptiven Immunsystems sind ausschließlich im Bauchraum der Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Tiere erhöht. Das entzündliche Milieu, das durch die veränderte Genaktivität im Lys-

$G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO entstanden ist, führt vermutlich indirekt dazu, dass T-Lymphozyten angelockt werden – im gesunden Peritoneum findet man von dieser Zellpopulation gewöhnlich nur sehr wenige Zellen.

B-Zellen hingegen befinden sich dort unter homöostatischen Bedingungen bereits zu etwa 40%. Bei diesen residenten, peritonealen B-Zellen handelt es sich um eine organspezifische Population, den als B1 B-Zellen bezeichneten Immunzellen. Im Vergleich zu konventionellen B-Zellen des Typs B2, die ihren Ursprung in der adulten Milz haben, zeichnen sich B1 B-Zellen durch bestimmte Oberflächenmarker, eine andere Morphologie und, besonders wichtig für B-Zellen im Allgemeinen, ein anderes Spektrum an potentiell produzierbaren Antikörpern aus (Hayakawa und Hardy 2000). B1 B-Zellen sezernieren Immunglobuline (Hayakawa, Asano et al. 1999) und natürliche Antikörper gegen endogene Antigene ins Serum, die eine wichtige Barriere gegen Pathogenen darstellen (Baumgarth 2011). Innerhalb der B1 B-Zellen werden zwei Subtypen unterschieden: B1a B-Zellen, die durch die Existenz des Oberflächenmarkers CD5 zu charakterisieren sind und B1b B-Zellen, die sich als CD5-negative Zellen auszeichnen. B1a B-Zellen produzieren bereits in naiven Tieren natürliche Antikörper, wohingegen B1b B-Zellen adaptiv auf Entzündungen reagieren (Haas, Poe et al. 2005). Beide Populationen an B1 B-Zellen, aber auch B2 B-Zellen, sind im Peritoneum des $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO stärker vertreten als in der Kontrolle. Die Frage, ob es einen Einfluss der peritonealen Makrophagen auf die im gleichen Organ lokalisierten B1-Zellen gibt, führt zu einer Studie, die Interleukin 6 (IL-6) als Bindeglied in der Kommunikation dieser beiden Zelltypen im Bauchraum identifiziert hat (Thies, Laurindo et al. 2013). Das von Makrophagen des Peritoneums produzierte IL-6 führt dort zu erhöhter Proliferation und verlängerter Lebenszeit peritonealer B1 B-Zellen *in vitro*. In der Genexpressionsanalyse der $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO-Makrophagen des Peritoneums wurde auch signifikant mehr *Il6* gemessen. Ob die erhöhte Genaktivität auch zur verstärkten Produktion des Interleukins führt, wurde nicht untersucht. Es kann vermutet werden, dass die aktivierten peritonealen Makrophagen des $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO sowohl einen direkten Effekt durch IL-6, als auch eine indirekte Wirkung durch eine allgemein verstärkte Immunantwort und Antigenpräsentation auf die peritonealen B-Zellen erzielen. Ob die

Anreicherung von B1 B-Zellen speziell im Bauchraum auch zur vermehrten Produktion natürlicher Antikörper führt, wurde in einer Messung für IgM im Plasma ermittelt. Tiere des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO zeigen einen doppelt so hohen Titer dieser Antikörper in ihrem Blut wie Tiere aus der Kontrollgruppe. Ob die ebenfalls gestiegene Zahl an B2 B-Zellen, die als proatherogene B-Zell-Population beschrieben ist (Ait-Oufella, Herbin et al. 2010, Kyaw, Tay et al. 2010) zur erhöhten Konzentration der von diesen B-Zellen produzierten IgG- und IgE-Antikörpern führt, wurde nur in Bezug auf IgG-Immunglobuline hin untersucht. Im Plasma von Lys-G α_{12} /G α_{13} -KOs und Tieren der Kontrollgruppe, wurden gleiche Mengen IgG gemessen. Somit konnte kein Anstieg der Antikörper, die ein Risiko für die Entstehung einer Atherosklerose darstellen können (Tsiantoulas, Diehl et al. 2014), festgestellt werden. Ohnehin ist die Bedeutung der B2 B-Zellen im Peritoneum von geringerer Bedeutung als in der Milz, wo sie als Teil des angepassten Immunsystems Antikörper gegen spezifische Antigene produzieren (Cerutti, Cols et al. 2013). Die Untersuchung der Milz-spezifischen B-Zell-Populationen im Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO ergibt keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. B1a B-Zellen scheinen einen weitaus größeren Anteil an der Produktion natürlicher Antikörper im Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO zu haben als B2 B-Zellen.

Die IgM-Immunglobuline, die von B1a B-Zellen hergestellt werden, erkennen und binden neben pathogenen Strukturen von Bakterien auch so genannte proatherogene LDL-Lipoproteine (Chou, Fogelstrand et al. 2009). Diese Eigenschaft führt dazu, dass B1a B-Zellen eine atheroprotektive Wirkung haben. Dies konnte in Beobachtungen an Atherosklerose-anfälligen Ldlr^{-/-}-Mäusen nachgewiesen werden (Lewis, Malik et al. 2009). Die natürlichen Antikörper existieren nicht nur im Peritoneum und Plasma, sondern lagern sich auch unterhalb der Intima im Gefäß ab. Somit bieten sie einen lokalen Schutz vor einer fortschreitenden Gefäßentzündung (Kyaw, Tay et al. 2011). Lipoproteine sind recht instabil und werden besonders in atherosklerotischen Läsionen häufig oxidiert (Yla-Herttuala, Palinski et al. 1989). Dabei kann es zur kovalenten Bindung von Aldehyden, die aus der Degradierung von ungesättigten Fettsäuren stammen, kommen. Ein Beispiel ist die Bindung von Malondialdehyd (MDA) an LDL (Haberland, Fong et al. 1988). Natürliche Antikörper können auch das oxidierte Epitop

MDA-LDL erkennen und dadurch vor Atherosklerose schützen (Chou, Fogelstrand et al. 2009). Im Plasma aus naiven Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Tieren konnten Antikörper gegen MDA-LDL gefunden werden. Ihr Titer ist im Vergleich zu Kontrolltieren doppelt so hoch. Auch die Konzentration an natürlichen Antikörpern, die *in vitro* hergestelltes, durch Kupfer oxidiertes LDL (CuOxLDL) erkennen, ist ähnlich hoch. Allerdings ist die Entstehung und Bedeutung des CuOxLDL *in vivo* umstritten (Itabe 2003). Im Rahmen der Atherosklerose spielt darüber hinaus das Immunglobulin anti-Phosphorylcholin T15/E06 eine wichtige Rolle. Dieser Antikörper wird ausschließlich von CD5⁺ B1a B-Zellen produziert (Masmoudi, Mota-Santos et al. 1990). Zunächst wurde er nur mit der Immunreaktion auf *S. pneumoniae* in Zusammenhang gebracht (Briles, Forman et al. 1982). Allerdings hat T15/E06 auch einen positiven Einfluss auf die Progression von Atherosklerose (Shaw, Horkko et al. 2000). In Makrophagen blockiert T15/E06 die Aufnahme von oxLDL über den Oberflächen-marker CD36 (Boullier, Gillotte et al. 2000) und verhindert so die Bildung von Schaumzellen. Auch dieser spezifische atheroprotektive Antikörper wurde im Plasma des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO vermehrt vorgefunden. Welcher Anteil der natürlichen Antikörper gegen oxidierte Lipoproteine auf die Sezernierung durch reife B1 B-Zellen in der Milz fällt, bleibt in der vorliegenden Studie ungeklärt. Dieser Zelltyp, der auch als starker IgM-Produzent gilt (Won und Kearney 2002), ist zu gleichen Zahlen im Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO und der Kontrolle repräsentiert. Es ist also durchaus möglich, dass hauptsächlich die peritonealen B1 B-Zellen für die erhöhte Produktion der natürlichen Antikörper verantwortlich sind.

6.3.2 Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Mäuse sind weniger anfällig für Atherosklerose

Die erhöhte Anzahl peritonealer B1a B-Zellen und die gesteigerten Mengen an atheroprotektiven Antikörpern im Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO führte zu der Frage, wie anfällig diese Tiere für Atherosklerose sind. Es zeigte sich, dass die Tiere des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe deutlich vor Atherosklerose geschützt sind. In Plaques der Aortenwurzel konnten sogar Ablagerungen des natürlichen Antikörpers T15/E06 mit dem spezifischen Antikörper AB1-2 nachgewiesen werden. Die Tiere des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO scheinen also über die erhöhten Plasmatiter der natürlichen Antikörper hinaus, auch mehr T15/E06-Antikörper in den Läsionen zu akkumulieren.

Dadurch könnte ein zusätzlicher, sehr lokaler atheroprotektiver Effekt zustande gekommen sein (Shaw, Horkko et al. 2000).

Diese Vermutung wird durch die therapeutische Behandlung atherosklerotischer Tiere mit peritonealen Zellen gestützt. Der Langzeit-Transfer peritonealer Zellen von $G\alpha_{12/13}$ -defizienten Tieren in $Ldlr^{-/-}$ -Kontrolltiere erhöht die Menge an protektivem T15/E06 im Plaque und reduziert die Plaquegröße. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die Veränderung des peritonealen Milieus, die Expansion der lokalen B1 B-Zellpopulation und der Schutz vor Atherosklerose kausal miteinander verbunden sind.

In einem angeschlossenen Kontrollexperiment mit transferierten Makrophagen wurde ausgeschlossen, dass der zu Beginn der Studie beobachtete Phänotyp der beeinträchtigten Migrationsfähigkeit zu dieser Pathophysiologie beiträgt. Dies wird durch den Befund, dass die relative Anzahl an Makrophagen innerhalb der atherosklerotischen Plaques zwischen beiden Genotypen nicht unterschiedlich ist, unterstützt. Es kann also vermutet werden, dass durch eine primäre, lokal begrenzte Entzündung des Bauchraums eine weitere Erkrankung verhindert werden kann.

Es ist unklar, ob die reduzierte Expression entzündlicher Gene in $G\alpha_{12/13}$ -defizienten aoMP die Ursache oder Folge der verminderten Atherosklerose ist. Die verringerte Genaktivität entzündungsrelevanter Gene einerseits und die verstärkte Genaktivität antiinflammatorischer Gene andererseits unterstützen den Befund einer gewissen Protektion vor Atherosklerose. Die basal hohe NF- κ B-Aktivität in residenten Makrophagen scheint keinen negativen Einfluss während der Atherogenese auszuüben. Die Makrophagen könnten sogar selbst dazu beigetragen haben, dass der Effekt der gefäßschützenden B1a B-Zellen noch verstärkt wird. Die Expressionsanalyse der aoMP ergab, dass die Gene für *Abca1* und *Abcg1*, die für den Efflux von Cholesterol aus Makrophagen verantwortlich sind (Gelissen, Harris et al. 2006), im $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO erhöht exprimiert werden. Auch der bereits bewiesene, direkte Einfluss dieser beiden Gene auf die Aktivierung antientzündlicher Gene (Yvan-Charvet, Welch et al. 2008) im Kontext von Gefäßerkrankungen (Westerterp, Murphy et al. 2013) könnte indirekt zu einer Verbesserung der Atherosklerose im $Lys-G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO geführt

haben. Ob jedoch *Abca1* einer direkten Regulierung durch $G_{12/13}$ -vermittelte Signaltransduktion unterliegt und somit einen unmittelbaren Einfluss auf den Cholesterolfstoffwechsel oder die Genexpression in Makrophagen hat, konnte nicht festgestellt werden (Zhou, Mei et al. 2012). Die Behandlung von kmMP mit acLDL führt zu keiner messbaren Veränderung bei der Entwicklung der Schaumzellen und in der Aktivität der Gene *Abca1* und *Abcg1*. Die insgesamt reduzierte Entzündung im Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO unter HFD könnte also vermutlich sekundär zu einem antiinflammatorischen Phänotyp in Makrophagen geführt haben und damit nachhaltig die Entstehung einer Atherosklerose verhindert haben.

Zur Erklärung der reduzierten Atherosklerose im Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO könnte auch beitragen, dass die Defizienz des $S1P_2$ -Rezeptors zum Schutz vor Atherosklerose führen kann (Wang, Okamoto et al. 2010). Dies wurde an Tieren mit einem globalen Defekt für die Expression von $S1P_2$ nachgewiesen. Aber eine Knochenmarkstransplantation zeigt, dass offensichtlich speziell die $S1P_2$ -defizienten Makrophagen einen wesentlichen Teil in Bezug auf die Atheroprotektion beitragen. Dieser Befund kann ähnlich wie in der hier vorliegenden Arbeit dadurch gestützt werden, dass in $S1P_2$ -defizienten Makrophagen Gene wie *Abca1* stark exprimiert sind. Dadurch kann der atherogene Cholesterolfstoffwechsel positiv beeinflusst werden. Diese Erkenntnis führte bereits zu der Vermutung, dass der $G_{12/13}$ -gekoppelte Rezeptor $S1P_2$ als vielversprechendes Target in der Therapie der Atherosklerose dienen könnte (Takuwa, Okamoto et al. 2008).

Die Bedeutung des Peritoneums als immunologische Nische, die im Laufe der Untersuchungen am Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO sichtbar wurde, hat ebenfalls Potential als Grundlage für die Entwicklung neuer Therapiestrategien. Eine Studie konnte bereits zeigen, dass die intraperitoneale Immunisierung von Mäusen mit Peptiden, die die Struktur oxidierter Lipoproteine nachahmen, zum Anstieg natürlicher Antikörper im Plasma führt (Amir, Hartvigsen et al. 2012). Bei der Entwicklung einer Impfung gegen Atherosklerose beim Menschen würde neben dem immunogenen Peptid selbst auch die Applikationsart eine wichtige Rolle spielen (Libby, Lichtman et al. 2013). Für die

atheroprotektive Behandlung eines Patienten wäre daher aus hygienischen Gründen höchstens eine einmalige, aber gezielte Stimulation des Peritoneums vorstellbar.

7 Zusammenfassung

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) sind im Immunsystem essentiell für die Verarbeitung von Signalen, die von Chemokinen, Lipiden und anderen Botenstoffen ausgehen. Ihre Existenz gewährleistet, dass Leukozyten sowohl unter physiologischen als auch unter pathophysiologischen Umständen ihren Funktionen als Immunzellen nachkommen können. Grundlegend wichtig für das angeborene Immunsystem sind die GPCR, die die Weiterleitung ihrer Signale über G-Proteine vom Typ G_i vermitteln. Die Migration, Adhäsion und Differenzierung von Leukozyten wird jedoch auch maßgeblich durch $G_{12/13}$ -gekoppelte Rezeptoren reguliert, wobei die kleine GTPase RhoA als Effektormolekül eine wichtige Rolle spielt. Die Bedeutung der $G_{12/13}$ -gekoppelten Signaltransduktion in Makrophagen ist allerdings weitgehend unverstanden. Mit Hilfe einer Mauslinie, in der speziell und ausschließlich in myeloiden Zellen die beiden G-Protein-Untereinheiten $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ durch ein konstitutiv aktives Cre-Rekombinase-System inaktiviert wurden (Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO), sollte nun die Funktion und der genaue Mechanismus des $G_{12/13}$ -gekoppelten Signalweges in Monozyten und Makrophagen aufgeklärt werden und somit neue Erkenntnisse zur Rolle der GPCR im Immunsystem gewonnen werden.

Eine erste Untersuchung der peripheren Immunzellpopulationen des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO ergab, dass residente Gewebemakrophagen, im Speziellen die des Peritoneums, in ihrer Anzahl erhöht sind. In einer vertieften Analyse der residenten peritonealen Makrophagen (rpMP) konnte gezeigt werden, dass der Verlust von $G\alpha_{12/13}$ zu Veränderung im Zytoskelett der Makrophagen führt. Die Zellen entwickeln einen Phänotyp mit besonders langen und verzweigten Filopodien und zeigen Einschränkungen in ihrer basalen Beweglichkeit.

Über diesen morphologischen Befund hinaus, konnte in einer Studie zur Genexpression in diesen Zellen festgestellt werden, dass $G\alpha_{12/13}$ -defiziente Makrophagen verstärkt proinflammatorische Gene wie *Nos2*, die *Cyclooxygenase 2* aber auch verschiedene Chemokine wie *Cxcl10* oder Cytokine wie *Il-6* oder *Tnfa* exprimieren. Ein ähnlicher Phänotyp in Bezug auf Morphologie und Genexpression wurde bei der

Untersuchung von Makrophagen, die aus Knochenmark des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO generiert wurden, beobachtet.

Als vermutlich verantwortlicher G $_{12/13}$ -gekoppelter Rezeptor konnte der S1P-Rezeptor-subtyp 2 (S1P $_2$) identifiziert werden. Mit Hilfe von Inhibitoren für die G $_{12/13}$ -gekoppelte Signaltransduktionskaskade konnte gezeigt werden, dass über die kleine GTPase RhoA die NF- κ B-abhängige Genaktivität reguliert werden kann. Vermutlich aktiviert RhoA dazu die Rho Kinase ROCK, die wiederum das untergeordnete Effektormolekül Rac1 hemmen kann. Im Falle des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO führt eine reduzierte Aktivierung von RhoA insgesamt zu einer eingeschränkten Hemmung dieses Signalweges und im Folgenden zu einer außer Kontrolle geratenen Induktion entzündungsrelevanter Gene und damit einhergehend auch zu einer Veränderung des Milieus in der Bauchhöhle dieser Tiere.

Obwohl die Immunantwort in diesen Tieren auf klassische Pathogene wie Lipopolysaccharide (LPS) unverändert ist, konnte ein Anstieg an peritonealen B-Zellen festgestellt werden. Diese B-Zellen, insbesondere B1 B-Zellen, sind als wichtige Produzenten von natürlichen Antikörpern gegen endogene Pathogene bekannt. Die Analyse von Plasma aus Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Mäusen ergab einen erhöhten Titer für natürliche Antikörper wie beispielsweise gegen oxidierte Formen von atherogenen Lipoproteinen. Diese Erkenntnis führte zu der Frage, ob die ursprünglich proinflammatorischen Veränderungen der peritonealen Makrophagen einen indirekten, positiven Einfluss auf die Entwicklung einer Atherosklerose haben können. Interessanterweise sind die Tiere des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO signifikant vor Atherosklerose geschützt und die Existenz der natürlichen Antikörper in atherosklerotischen Läsionen wird als Hinweis für ihre protektive Rolle im Krankheitsverlauf angesehen. In einem therapeutischen Ansatz mit peritonealen Zellen konnte in Atherosklerose-gefährdeten Tieren die Progression dieser Gefäßerkrankung eingedämmt werden.

Die hier durchgeführte Studie hat durch *in vitro* und *in vivo* Versuche mit Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO-Mäusen dazu beitragen, das Verständnis der Rolle der G $_{12/13}$ -gekoppelten Signaltransduktion im Immunsystem zu verbessern.

Die Komplexität der verschiedenen Funktionen einzelner Effektormoleküle einerseits und die Interaktionen unterschiedlicher Immunzellpopulationen andererseits lassen jedoch vermuten, dass noch weitreichende Untersuchungen an GPCR und G-Proteinen nötig sind, um diese für den Organismus bedeutsamen Informationssysteme vollständig zu verstehen und weiter therapeutisch nutzbar zu machen.

8 Literatur

- Ait-Oufella, H., et al. (2010). "B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice." J Exp Med **207**(8): 1579-1587.
- Althoff, T. F., et al. (2012). "Procontractile G protein-mediated signaling pathways antagonistically regulate smooth muscle differentiation in vascular remodeling." J Exp Med **209**(12): 2277-2290.
- Alugupalli, K. R. (2008). "A distinct role for B1b lymphocytes in T cell-independent immunity." Curr Top Microbiol Immunol **319**: 105-130.
- Amano, M., et al. (1996). "Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase)." J Biol Chem **271**(34): 20246-20249.
- Amir, S., et al. (2012). "Peptide mimotopes of malondialdehyde epitopes for clinical applications in cardiovascular disease." J Lipid Res **53**(7): 1316-1326.
- Arbibe, L., et al. (2000). "Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway." Nat Immunol **1**(6): 533-540.
- Barroga, C. F., et al. (1995). "Constitutive phosphorylation of I kappa B alpha by casein kinase II." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(17): 7637-7641.
- Barth, M. W., et al. (1995). "Review of the macrophage disappearance reaction." J Leukoc Biol **57**(3): 361-367.
- Baumgarth, N. (2011). "The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions." Nat Rev Immunol **11**(1): 34-46.
- Bellingan, G. J., et al. (2002). "Adhesion molecule-dependent mechanisms regulate the rate of macrophage clearance during the resolution of peritoneal inflammation." J Exp Med **196**(11): 1515-1521.
- Bhatia, V. K., et al. (2007). "Complement C1q reduces early atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice." Am J Pathol **170**(1): 416-426.

Binder, C. J., et al. (2003). "Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between *Streptococcus pneumoniae* and oxidized LDL." Nat Med **9**(6): 736-743

Biswas, S. K. und A. Mantovani (2012). "Orchestration of metabolism by macrophages." Cell Metab **15**(4): 432-437.

Blaho, V. A. und T. Hla (2014). "An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors." J Lipid Res **55**(8): 1596-1608.

Boullier, A., et al. (2000). "The binding of oxidized low density lipoprotein to mouse CD36 is mediated in part by oxidized phospholipids that are associated with both the lipid and protein moieties of the lipoprotein." J Biol Chem **275**(13): 9163-9169.

Briles, D. E., et al. (1982). "Anti-phosphorylcholine antibodies of the T15 idio type are optimally protective against *Streptococcus pneumoniae*." J Exp Med **156**(4): 1177-1185.

Brown, J. H., et al. (2006). "The Rac and Rho hall of fame: a decade of hypertrophic signaling hits." Circ Res **98**(6): 730-742.

Buchsbaum, R. J. (2007). "Rho activation at a glance." J Cell Sci **120**(Pt 7): 1149-1152.

Buhl, A. M., et al. (1995). "G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly." J Biol Chem **270**(42): 24631-24634.

BurrIDGE, K. und K. Wennerberg (2004). "Rho and Rac take center stage." Cell **116**(2): 167-179.

Cerutti, A., et al. (2013). "Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes." Nat Rev Immunol **13**(2): 118-132.

Chinetti-Gbaguidi, G., et al. (2015). "Macrophage subsets in atherosclerosis." Nat Rev Cardiol **12**(1): 10-17.

- Chou, M. Y., et al. (2009). "Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans." J Clin Invest **119**(5): 1335-1349.
- Chun, J., et al. (2002). "International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature." Pharmacol Rev **54**(2): 265-269.
- Chun, J., et al. (2010). "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature." Pharmacol Rev **62**(4): 579-587.
- Clausen, B. E., et al. (1999). "Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice." Transgenic Res **8**(4): 265-277.
- Dahlof, B. (2010). "Cardiovascular disease risk factors: epidemiology and risk assessment." Am J Cardiol **105**(1 Suppl): 3A-9A.
- Davies, L. C., et al. (2013). "Tissue-resident macrophages." Nat Immunol **14**(10): 986-995.
- Davies, L. C., et al. (2011). "A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage populations after acute inflammation." Eur J Immunol **41**(8): 2155-2164.
- Dhanasekaran, N. und J. M. Dermott (1996). "Signaling by the G12 class of G proteins." Cell Signal **8**(4): 235-245.
- Eden, S., et al. (2002). "Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck." Nature **418**(6899): 790-793.
- Etienne-Manneville, S. und A. Hall (2002). "Rho GTPases in cell biology." Nature **420**(6916): 629-635.
- Febbraio, M., et al. (2000). "Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice." J Clin Invest **105**(8): 1049-1056.

Feng, B., et al. (2003). "The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages." Nat Cell Biol **5**(9): 781-792.

Fessler, M. B., et al. (2007). "Dual role for RhoA in suppression and induction of cytokines in the human neutrophil." Blood **109**(3): 1248-1256.

Fiorentino, D. F., et al. (1991). "IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells." J Immunol **146**(10): 3444-3451.

Francis, S. A., et al. (2006). "Rho GEF Lsc is required for normal polarization, migration, and adhesion of formyl-peptide-stimulated neutrophils." Blood **107**(4): 1627-1635.

Fukuhara, S., et al. (2001). "RGS-containing RhoGEFs: the missing link between transforming G proteins and Rho?" Oncogene **20**(13): 1661-1668.

Gakidis, M. A., et al. (2004). "Vav GEFs are required for beta2 integrin-dependent functions of neutrophils." J Cell Biol **166**(2): 273-282.

Galis, Z. S., et al. (1994). "Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques." J Clin Invest **94**(6): 2493-2503.

Geissmann, F., et al. (2003). "Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties." Immunity **19**(1): 71-82.

Geissmann, F., et al. (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." Science **327**(5966): 656-661.

Gelissen, I. C., et al. (2006). "ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(3): 534-540.

Ghosn, E. E., et al. (2010). "Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(6): 2568-2573.

Girkontaite, I., et al. (2001). "Lsc is required for marginal zone B cells, regulation of lymphocyte motility and immune responses." Nat Immunol **2**(9): 855-862.

Gordon, S. und P. R. Taylor (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." Nat Rev Immunol **5**(12): 953-964.

Graler, M. H. und E. J. Goetzl (2002). "Lysophospholipids and their G protein-coupled receptors in inflammation and immunity." Biochim Biophys Acta **1582**(1-3): 168-174.

Guilluy, C., et al. (2011). "Rho protein crosstalk: another social network?" Trends Cell Biol **21**(12): 718-726.

Haas, K. M., et al. (2005). "B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*." Immunity **23**(1): 7-18.

Haberland, M. E., et al. (1988). "Malondialdehyde-altered protein occurs in atheroma of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits." Science **241**(4862): 215-218.

Hansson, G. K. und A. Hermansson (2011). "The immune system in atherosclerosis." Nat Immunol **12**(3): 204-212.

Hart, M. J., et al. (1998). "Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13." Science **280**(5372): 2112-2114.

Hayakawa, K., et al. (1999). "Positive selection of natural autoreactive B cells." Science **285**(5424): 113-116.

Hayakawa, K. und R. R. Hardy (2000). "Development and function of B-1 cells." Curr Opin Immunol **12**(3): 346-353.

Heasman, S. J. und A. J. Ridley (2008). "Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(9): 690-701.

Herroeder, S., et al. (2009). "Guanine nucleotide-binding proteins of the G12 family shape immune functions by controlling CD4+ T cell adhesiveness and motility." Immunity **30**(5): 708-720.

Higuchi, Y., et al. (2003). "The small GTP-binding protein Rac1 induces cardiac myocyte hypertrophy through the activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 and nuclear factor-kappa B." J Biol Chem **278**(23): 20770-20777.

Hla, T., et al. (2008). "The vascular S1P gradient-cellular sources and biological significance." Biochim Biophys Acta **1781**(9): 477-482.

Hollinger, S. und J. R. Hepler (2002). "Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling." Pharmacol Rev **54**(3): 527-559.

Honing, H., et al. (2004). "RhoA activation promotes transendothelial migration of monocytes via ROCK." J Leukoc Biol **75**(3): 523-528.

Horkko, S., et al. (1999). "Monoclonal autoantibodies specific for oxidized phospholipids or oxidized phospholipid-protein adducts inhibit macrophage uptake of oxidized low-density lipoproteins." J Clin Invest **103**(1): 117-128.

Ishibashi, S., et al. (1993). "Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery." J Clin Invest **92**(2): 883-893.

Itabe, H. (2003). "Oxidized low-density lipoproteins: what is understood and what remains to be clarified." Biol Pharm Bull **26**(1): 1-9.

Keshav, S., et al. (1991). "Lysozyme is an inducible marker of macrophage activation in murine tissues as demonstrated by in situ hybridization." J Exp Med **174**(5): 1049-1058.

Kimura, K., et al. (1996). "Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)." Science **273**(5272): 245-248.

Kozma, R., et al. (1995). "The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts." Mol Cell Biol **15**(4): 1942-1952.

Kruger, R. P., et al. (2005). "Semaphorins command cells to move." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(10): 789-800.

- Krugmann, S., et al. (2001). "Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex." Curr Biol **11**(21): 1645-1655.
- Kunkel, E. J. und E. C. Butcher (2002). "Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes." Immunity **16**(1): 1-4.
- Kurose, H. (2003). "Galpha12 and Galpha13 as key regulatory mediator in signal transduction." Life Sci **74**(2-3): 155-161.
- Kyaw, T., et al. (2010). "Conventional B2 B cell depletion ameliorates whereas its adoptive transfer aggravates atherosclerosis." J Immunol **185**(7): 4410-4419.
- Kyaw, T., et al. (2011). "B1a B lymphocytes are atheroprotective by secreting natural IgM that increases IgM deposits and reduces necrotic cores in atherosclerotic lesions." Circ Res **109**(8): 830-840.
- Laudanna, C., et al. (1996). "Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins." Science **271**(5251): 981-983.
- Lee, R. T. und P. Libby (1997). "The unstable atheroma." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(10): 1859-1867.
- Lewis, M. J., et al. (2009). "Immunoglobulin M is required for protection against atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice." Circulation **120**(5): 417-426.
- Li, F. und H. N. Higgs (2003). "The mouse Formin mDia1 is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition." Curr Biol **13**(15): 1335-1340.
- Libby, P., et al. (2013). "Immune effector mechanisms implicated in atherosclerosis: from mice to humans." Immunity **38**(6): 1092-1104.
- Lombardi, M. S., et al. (2002). "Role and modulation of G protein-coupled receptor signaling in inflammatory processes." Crit Rev Immunol **22**(2): 141-163.

Luttrell, L. M. und R. J. Lefkowitz (2002). "The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals." J Cell Sci **115**(Pt 3): 455-465.

Macara, I. G. (2004). "Parsing the polarity code." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(3): 220-231.

Maekawa, M., et al. (1999). "Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase." Science **285**(5429): 895-898.

Mallat, Z., et al. (1999). "Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis." Circ Res **85**(8): e17-24.

Mantovani, A., et al. (2004). "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." Trends Immunol **25**(12): 677-686.

Masmoudi, H., et al. (1990). "All T15 Id-positive antibodies (but not the majority of VHT15+ antibodies) are produced by peritoneal CD5+ B lymphocytes." Int Immunol **2**(6): 515-520.

Meigs, T. E., et al. (2002). "Galpha12 and Galpha13 negatively regulate the adhesive functions of cadherin." J Biol Chem **277**(27): 24594-24600.

Mestas, J. und K. Ley (2008). "Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis." Trends Cardiovasc Med **18**(6): 228-232.

Michaud, J., et al. (2010). "Inhibitory role of sphingosine 1-phosphate receptor 2 in macrophage recruitment during inflammation." J Immunol **184**(3): 1475-1483.

Miller, Y. I., et al. (2011). "Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity." Circ Res **108**(2): 235-248.

Moers, A., et al. (2003). "G13 is an essential mediator of platelet activation in hemostasis and thrombosis." Nat Med **9**(11): 1418-1422.

Moore, K. J. und I. Tabas (2011). "Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis." Cell **145**(3): 341-355.

Muppidi, J. R., et al. (2014). "Loss of signalling via Galpha13 in germinal centre B-cell-derived lymphoma." Nature **516**(7530): 254-258.

Murray, P. J. und T. A. Wynn (2011). "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets." Nat Rev Immunol **11**(11): 723-737.

Napetschnig, J. und H. Wu (2013). "Molecular basis of NF-kappaB signaling." Annu Rev Biophys **42**: 443-468.

Nelson, D. S. und S. V. Boyden (1963). "The loss of macrophages from peritoneal exudates following the injection of antigens into guinea-pigs with delayed-type hypersensitivity." Immunology **6**: 264-275.

Niessner, A., et al. (2006). "Pathogen-sensing plasmacytoid dendritic cells stimulate cytotoxic T-cell function in the atherosclerotic plaque through interferon-alpha." Circulation **114**(23): 2482-2489.

Nimnual, A. S., et al. (2003). "Redox-dependent downregulation of Rho by Rac." Nat Cell Biol **5**(3): 236-241.

Nourshargh, S., et al. (2010). "Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(5): 366-378.

Nurnberg, A., et al. (2008). "Antagonistic regulation of neurite morphology through Gq/G11 and G12/G13." J Biol Chem **283**(51): 35526-35531.

Obinata, H. und T. Hla (2012). "Sphingosine 1-phosphate in coagulation and inflammation." Semin Immunopathol **34**(1): 73-91.

Ohta, Y., et al. (2006). "FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling." Nat Cell Biol **8**(8): 803-814.

Olson, T. S. und K. Ley (2002). "Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **283**(1): R7-28.

- Pai, R. K., et al. (2002). "Regulation of class II MHC expression in APCs: roles of types I, III, and IV class II transactivator." J Immunol **169**(3): 1326-1333.
- Palinski, W., et al. (1996). "Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice. Demonstration of epitopes of oxidized low density lipoprotein in human plasma." J Clin Invest **98**(3): 800-814.
- Perdiguerro, E. G., et al. (2014). "Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors." Nature.
- Perry, H. M., et al. (2012). "B cell subsets in atherosclerosis." Front Immunol **3**: 373.
- Pierce, K. L. und R. J. Lefkowitz (2001). "Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors." Nat Rev Neurosci **2**(10): 727-733.
- Rattan, R., et al. (2003). "Rho A negatively regulates cytokine-mediated inducible nitric oxide synthase expression in brain-derived transformed cell lines: negative regulation of IKKalpha." Free Radic Biol Med **35**(9): 1037-1050.
- Rekhter, M. D. (1999). "Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough." Cardiovasc Res **41**(2): 376-384.
- Ridley, A. J. und A. Hall (1992). "Distinct patterns of actin organization regulated by the small GTP-binding proteins Rac and Rho." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **57**: 661-671.
- Rieken, S., et al. (2006). "G12/G13 family G proteins regulate marginal zone B cell maturation, migration, and polarization." J Immunol **177**(5): 2985-2993.
- Rotsch, J., et al. (2012). "Inhibition of macrophage migration by C. botulinum exoenzyme C3." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **385**(9): 883-890.
- Sander, E. E., et al. (1999). "Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior." J Cell Biol **147**(5): 1009-1022.

Schmidt, H., et al. (2006). "LC-MS/MS-analysis of sphingosine-1-phosphate and related compounds in plasma samples." Prostaglandins Other Lipid Mediat **81**(3-4): 162-170.

Shaw, P. X., et al. (2000). "Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity." J Clin Invest **105**(12): 1731-1740.

Shortman, K. und S. H. Naik (2007). "Steady-state and inflammatory dendritic-cell development." Nat Rev Immunol **7**(1): 19-30.

Sica, A. und A. Mantovani (2012). "Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas." J Clin Invest **122**(3): 787-795.

Sivaraj, K. K., et al. (2013). "G13 controls angiogenesis through regulation of VEGFR-2 expression." Dev Cell **25**(4): 427-434.

Skalen, K., et al. (2002). "Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis." Nature **417**(6890): 750-754.

Smith, J. D., et al. (1995). "Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(18): 8264-8268.

Spangrude, G. J., et al. (1985). "Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin." J Immunol **135**(6): 4135-4143.

Sugimoto, N., et al. (2003). "Inhibitory and stimulatory regulation of Rac and cell motility by the G12/13-Rho and Gi pathways integrated downstream of a single G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor isoform." Mol Cell Biol **23**(5): 1534-1545.

Sulciner, D. J., et al. (1996). "rac1 regulates a cytokine-stimulated, redox-dependent pathway necessary for NF-kappaB activation." Mol Cell Biol **16**(12): 7115-7121.

Sun, C. X., et al. (2004). "Rac1 is the small GTPase responsible for regulating the neutrophil chemotaxis compass." Blood **104**(12): 3758-3765.

- Swirski, F. K., et al. (2007). "Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata." J Clin Invest **117**(1): 195-205.
- Tabas, I. (2010). "Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis." Nat Rev Immunol **10**(1): 36-46.
- Takabe, K., et al. (2008). "'Inside-out' signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets." Pharmacol Rev **60**(2): 181-195.
- Takefuji, M., et al. (2012). "G(13)-mediated signaling pathway is required for pressure overload-induced cardiac remodeling and heart failure." Circulation **126**(16): 1972-1982.
- Takuwa, Y., et al. (2008). "Sphingosine-1-phosphate signaling and biological activities in the cardiovascular system." Biochim Biophys Acta **1781**(9): 483-488.
- Tellides, G., et al. (2000). "Interferon-gamma elicits arteriosclerosis in the absence of leukocytes." Nature **403**(6766): 207-211.
- Thies, F. G., et al. (2013). "Cross talk between peritoneal macrophages and B-1 cells in vitro." PLoS One **8**(5): e62805.
- Tsiantoulas, D., et al. (2014). "B cells and humoral immunity in atherosclerosis." Circ Res **114**(11): 1743-1756.
- Tumang, J. R., et al. (2004). "Peritoneal and splenic B-1 cells are separable by phenotypic, functional, and transcriptomic characteristics." Eur J Immunol **34**(8): 2158-2167.
- Uderhardt, S., et al. (2012). "12/15-lipoxygenase orchestrates the clearance of apoptotic cells and maintains immunologic tolerance." Immunity **36**(5): 834-846.
- Wang, F., et al. (2010). "Sphingosine-1-phosphate receptor-2 deficiency leads to inhibition of macrophage proinflammatory activities and atherosclerosis in apoE-deficient mice." J Clin Invest **120**(11): 3979-3995.

- Watanabe, N., et al. (1999). "Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization." Nat Cell Biol **1**(3): 136-143.
- Weber, C., et al. (2008). "The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models." Nat Rev Immunol **8**(10): 802-815.
- Weber, K. S., et al. (1998). "Chemokine-induced monocyte transmigration requires cdc42-mediated cytoskeletal changes." Eur J Immunol **28**(7): 2245-2251.
- Wells, C. M., et al. (2004). "Rac1-deficient macrophages exhibit defects in cell spreading and membrane ruffling but not migration." J Cell Sci **117**(Pt 7): 1259-1268.
- Westerterp, M., et al. (2014). "ATP-binding cassette transporters, atherosclerosis, and inflammation." Circ Res **114**(1): 157-170.
- Westerterp, M., et al. (2013). "Deficiency of ATP-binding cassette transporters A1 and G1 in macrophages increases inflammation and accelerates atherosclerosis in mice." Circ Res **112**(11): 1456-1465.
- Wettschureck, N. und S. Offermanns (2005). "Mammalian G proteins and their cell type specific functions." Physiol Rev **85**(4): 1159-1204.
- Wheeler, A. P., et al. (2006). "Rac1 and Rac2 regulate macrophage morphology but are not essential for migration." J Cell Sci **119**(Pt 13): 2749-2757.
- Williams, J. A. und E. Shacter (1997). "Regulation of macrophage cytokine production by prostaglandin E2. Distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2." J Biol Chem **272**(41): 25693-25699.
- Won, W. J. und J. F. Kearney (2002). "CD9 is a unique marker for marginal zone B cells, B1 cells, and plasma cells in mice." J Immunol **168**(11): 5605-5611.
- Woollard, K. J. und F. Geissmann (2010). "Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions." Nat Rev Cardiol **7**(2): 77-86.

Worthylake, R. A., et al. (2001). "RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration." J Cell Biol **154**(1): 147-160.

Worzfeld, T., et al. (2008). "G(12)/G(13)-mediated signalling in mammalian physiology and disease." Trends Pharmacol Sci **29**(11): 582-589.

Wynn, T. A., et al. (2013). "Macrophage biology in development, homeostasis and disease." Nature **496**(7446): 445-455.

Xu, J., et al. (2003). "Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils." Cell **114**(2): 201-214.

Xu, N., et al. (1994). "Potent transforming activity of the G13 alpha subunit defines a novel family of oncogenes." Biochem Biophys Res Commun **201**(2): 603-609.

Yla-Herttuala, S., et al. (1989). "Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man." J Clin Invest **84**(4): 1086-1095.

Yvan-Charvet, L., et al. (2008). "Increased inflammatory gene expression in ABC transporter-deficient macrophages: free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions." Circulation **118**(18): 1837-1847.

Zand, T., et al. (1999). "Lipid deposition in rat aortas with intraluminal hemispherical plug stenosis. A morphological and biophysical study." Am J Pathol **155**(1): 85-92.

Zhou, Q., et al. (2012). "Rho-associated coiled-coil-containing kinase 2 deficiency in bone marrow-derived cells leads to increased cholesterol efflux and decreased atherosclerosis." Circulation **126**(18): 2236-2247.

Zhu, X., et al. (2010). "Macrophage ABCA1 reduces MyD88-dependent Toll-like receptor trafficking to lipid rafts by reduction of lipid raft cholesterol." J Lipid Res **51**(11): 3196-3206.

9 Anhang

9.1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
adTF	adoptiver Transfer
AK	Antikörper
aoMP	aortale Makrophagen
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
Cre	Rekombinase Cre
cDNA	komplementäre DNA
d	Tag(e)
DKO	Doppel-Knockout (Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFP	grün fluoreszierendes Protein (enhanced green fluorescent protein)
ELISA	Enzym-gebundene Nachweismethode für Immunglobuline
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting)
FBS	Fötales Kälberserum (fetal bovine serum)
g	Zentrifugalkraft
G	Gauche (Größeneinheit für Kanülen)
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat

GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde(n)
HFD	Hochfettdiät
IgG/M	Immunglobulin G/M
IHCfr	Immunhistochemie an Gefrierschnitten
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kmMP	aus Knochenmark differenzierte Makrophagen
(ac/ox)LDL	(acetyliertes/oxidiertes) Low-densitiy Lipoprotein
Ldlr	Low-density lipoprotein receptor
LPA	Lysophosphatidsäure
LPM	large peritoneal macrophage
LPS	Lipopolysaccharide
Lys/LysM	Lysozym M
MACS	magnetisch assistierte Zellsortierung
M-CSF	murine colony-stimulating factor
min	Minute(n)
MLCK	myosin light chain kinase
MLCP	myosin light chain phosphatase
mRNA	messenger RNA
n	unabhängig voneinander gemessene Proben/Experimente
nAK	natürliche Antikörper
NF- κ B	nuclear factor kappa B
ORO	Oil-Red-O
p	statistischer p-Wert

PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
RGS	regulators of G-protein signaling
RhoGEF	Rho-spezifischer Guaninnukleotidaustauschfaktor
Rho-GTPase	Rho-spezifische Guanosintriphosphatase
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	Rho-Kinase
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
rpMP	residente peritoneale Makrophagen
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
SPM	small peritoneal macrophage
TG	Brewer's Thioglykollat
TNF α	Tumornekrosefaktor α
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Entwicklung und Funktion von Makrophagen im Immunsystem.....	3
Abb. 1.2	Prinzip der G-Protein-gekoppelten Signaltransduktion.....	6
Abb. 1.3	Regulation des Zytoskeletts durch $G_{12/13}$ -gekoppelte Signaltransduktion und Interaktion zu $G_{q/11}$ - und $G_{i/o}$ -gekoppelter Signalweiterleitung	11
Abb. 1.4	Bedeutung verschiedener Immunzellen bei der Entstehung einer Atherosklerose	16
Abb. 3.1	Exemplarischer Dot Plot mit Gating-Strategie zur Isolierung von myeloiden Zellen aus Mausblut	47
Abb. 3.2	Exemplarischer Dot Plot mit Gating-Strategie zur Isolierung residenter peritonealer Makrophagen	48
Abb. 3.3	Exemplarischer Dot Plot mit Gating-Strategie zur Isolierung von Makrophagen aus der Aorta	50
Abb. 5.1	Rekombinationseffizienz myeloider Zellen des LysMCre-dTom-Reporters ..	66
Abb. 5.2	Proteinmengen für $G\alpha_{13}$ in myeloiden Zellen des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO.....	67
Abb. 5.3	Basale Untersuchung myeloider Zellen in Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO-Tieren	68
Abb. 5.4	Untersuchung von rpMP des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO auf Apoptose.....	69
Abb. 5.5	Analyse peritonealer Makrophagenpopulationen des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO ...	70
Abb. 5.6	Morphologische Untersuchung von rpMP des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO	71
Abb. 5.7	Untersuchung des Signalmoleküls RhoA in rpMP des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO	72
Abb. 5.8	Morphologische Untersuchung von kmMP des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO.....	73
Abb. 5.9	Migrationsverhalten der rpMP des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO	74
Abb. 5.10	Funktionelle Konsequenzen des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO für das Immunsystem.....	75
Abb. 5.11	Expressionsanalyse in rpMP nach Stimulation mit LPS.....	76
Abb. 5.12	Expressionsanalyse in rpMP des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO.....	78
Abb. 5.13	Analyse von rpMP auf phosphoryliertes NF- κ B (p65).....	79
Abb. 5.14	Analyse des Mikromilieus im Peritoneum von Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO-Mäusen.....	80
Abb. 5.15	Expressionsanalyse in kmMP des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO	81
Abb. 5.16	Untersuchung $G_{12/13}$ -relevanter Signalmoleküle in kmMP	83
Abb. 5.17	Untersuchung von $G_{12/13}$ -gekoppelten Rezeptoren in rpMP	84
Abb. 5.18	Analyse der Relevanz von $G_{12/13}$ -gekoppelten Rezeptoren in rpMP.....	86
Abb. 5.19	Untersuchung auf Sphingosinkinase-Expression und S1P-Produktion im Peritoneum von Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO-Mäusen.....	87
Abb. 5.20	Analyse von Lymphozyten im Peritoneum des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO	88
Abb. 5.21	Messung natürlicher IgM-Antikörper im Plasma des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO..	89
Abb. 5.22	Bestimmung der Titer für IgG-Antikörper im Plasma des Lys- $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -KO	90

Abb. 5.23	Basale Analyse der Lys-G α_{12} /G α_{13} ;Ldlr ^{-/-} -Tiere unter Hochfettdiät.....	91
Abb. 5.24	Analyse der Atherosklerose in Lys-G α_{12} /G α_{13} ;Ldlr ^{-/-} -KO-Tieren	92
Abb. 5.25	Zusammensetzung atherosklerotischer Läsionen im Lys-G α_{12} /G α_{13} ;Ldlr ^{-/-}	93
Abb. 5.26	Expressionsanalyse in aoMP des Lys-G α_{12} /G α_{13} ;Ldlr ^{-/-}	94
Abb. 5.27	Rekrutierung von Makrophagen in atherosklerotische Läsionen	95
Abb. 5.28	Expressionsanalyse in Schaumzellen des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO.....	96
Abb. 5.29	Analyse von Schaumzellen des Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO	97
Abb. 5.30	Analyse atherosklerotischer Läsionen des Lys-G α_{12} /G α_{13} ;Ldlr ^{-/-} -KO auf natürliche, atheroprotective Antikörper	98
Abb. 5.31	Analyse der Atherosklerose in Ldlr ^{-/-} -KO-Tieren nach adoptivem Transfer von peritonealen Zellen aus Lys-G α_{12} /G α_{13} -KO und Kontrollen.....	99
Abb. 6.1	Modell der S1P ₂ /G _{12/13} /RhoA vermittelten Signaltransduktion in residenten Makrophagen	105

9.3 Publikationen

Chen, H., Assmann, J. C., Krenz, A., Rahman, M., Grimm, M., Kaersten, C. M., Köhl, J., Offermanns, S., Wettschureck, N., Schwaninger, M. (2014) Hydrocarboxylic acid receptor 2 mediates dimethyl fumarate's protective effect in EAE. *J. Clinical Investigation* 124 (5):2188-92.

Sivaraj, K. K., Li, R., Juarez-Albarran, J., Wang, S., Tischner, D., Grimm, M., Swiercz, J., Offermanns, S., Wettschureck, N. Endothelial $G\alpha_{q/11}$ is required for VEGF-induced vascular permeability and angiogenesis. *Cardiovascular Research* (in Revision).

Grimm, M., Tischner, D., Sivaraj, K. K., Ferreirós Bouzas, N., Geisslinger, G., Binder, C. J., Wettschureck, N. $S1P_2/G_{12/13}$ signaling negatively regulates macrophage activation and indirectly shapes the atheroprotective B1 cell population (eingereicht).

9.4 Danksagung

10 Lebenslauf