



**Die Rolle von LASP1 in der Pathogenese der Atherosklerose
im murinen Modell**

**The role of LASP1 in the pathogenesis of atherosclerosis
in mice**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

Vorgelegt von

Paulina Elena Stürzebecher

aus

Berlin

Würzburg 2020



Eingereicht am:.....

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: **Univ.-Prof. Dr. med. Nicolas Schlegel**

1. Betreuer: **Prof. Dr. rer. nat. Elke Butt**

2. Betreuer: **Prof. Dr. med. Michaela Kuhn**

3. Betreuer: **PD Dr. rer. nat. Heike Herrmanns**

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	XI
1 Einleitung.....	1
1.1 <i>Krankheitsbild der Atherosklerose</i>	1
1.1.1 Atherogenese	1
1.1.2 Charakterisierung von Monozyten	3
1.1.3 Intimale Invasion	4
1.1.4 Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen.....	6
1.1.5 TNF α -Sekretion durch M1-Makrophagen.....	7
1.1.6 Schaumzellbildung	8
1.1.7 MMP-vermittelte Degradation der fibrösen Plaque-Kappe.....	9
1.2 <i>Ldlr^{-/-} Mausmodell</i>	9
1.3 <i>Das LIM and SH3 Domänen Protein 1 (LASP1)</i>	10
1.3.1 Proteinstruktur von LASP1	10
1.3.2 LASP1 in der Krebsforschung.....	12
1.4 <i>LASP1^{-/-} Mausmodell</i>	12
1.5 <i>Zielsetzung</i>	13
1.5.1 Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe	13
1.5.2 Fragestellungen der Arbeit.....	14
2 Material und Methoden	15
2.1 <i>Material</i>	15
2.1.1 Mauslinien	15
2.1.2 Zelllinien	15
2.1.3 Reagenzien für die Zellkultur	15
2.1.4 Antikörper	16
2.1.5 Primer.....	18
2.1.6 Reaktionskits.....	18
2.1.7 Chemikalien und Reagenzien	19

2.1.8	Verbrauchsmaterialien	22
2.1.9	Geräte und Instrumente	23
2.1.10	Software und Websites	25
2.2	<i>Methoden</i>	26
2.2.1	Zellkultur.....	26
2.2.2	Zellanalytische Methoden	30
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	43
2.2.4	Molekularbiologische Methode.....	47
2.2.5	Statistische Auswertung.....	50
3	Ergebnisse	51
3.1	<i>Immunhistochemischer Nachweis von LASP1 in atherosklerotischen Plaques in Aortenwurzeln</i>	51
3.2	<i>In vitro-Versuche zur monozytären, intimalen Invasion</i>	53
3.2.1	Isolation von Monozyten aus murinem Knochenmark	53
3.2.2	Herstellung des LASP1-PE-Antikörpers.....	54
3.2.3	<i>In vitro</i> -Flow-Assay zur monozytären Adhäsion an Endothel.....	55
3.2.4	<i>In vitro</i> -Migrations-Assay der Monozyten mit CCL2 als Lockstoff.....	57
3.3	<i>TNFα-Sekretion durch M1-Makrophagen</i>	58
3.3.1	Transkription und Protein-Expression von TNF α sowie TNF α -Sekretion durch Makrophagen nach LPS-Stimulation	59
3.3.2	Transkription von ADAM17 und Proteinexpression nach LPS-Stimulation	61
3.3.3	Nukleare Lokalisation von LASP1 in Makrophagen nach CXCL12-Stimulation.	62
3.4	<i>Schaumzellformation</i>	64
3.4.1	LASP1-Expression in murinen Makrophagen nach oxLDL Stimulation <i>in vitro</i>	64
3.4.2	Untersuchungen zur Schaumzellformation muriner Makrophagen <i>in vitro</i>	65
3.4.3	Expression von Schlüsselregulatoren des Lipidmetabolismus in Makrophagen auf RNA-Ebene nach oxLDL-Stimulation.....	66
3.5	<i>MMP12-vermittelte Degradationsfähigkeit durch murine Makrophagen</i>	67
3.6	<i>LASP1-Expression in Immunzellen und Gewebe aus HFD-Mäusen im Vergleich zu Chow-Diät-Mäusen</i>	69

3.6.1	Proteinexpression von LASP1 in Immunzellen aus Blut- und Milzproben in <i>Ldlr</i> ^{-/-} -Mäusen unter Chow-Diät im Vergleich zu HFD	69
3.6.2	mRNA-Expression von LASP1 in Gewebe entnommen aus Chow-Diät und HFD- <i>Ldlr</i> ^{-/-} -Mäusen	72
3.7	<i>Generelle Charakterisierung der Immunzellen in Blut und Milz aus <i>Ldlr</i>^{-/-} und <i>Ldlr.LASP1</i>^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Daten aus einem 16 Wochen HFD-Versuch</i>	72
3.7.1	Ergebnisse der Milzanalyse	73
3.7.2	Ergebnisse der Blutanalyse	74
4	Diskussion	77
4.1	<i>Analyse des Einflusses des LASP1-KO auf das Verhalten von Monozyten/Makrophagen in vitro</i>	77
4.1.1	Beeinflussung der intimalen, monozytären Invasion durch LASP1 <i>in vitro</i>	78
4.1.2	Einflussnahme von LASP1 auf Transkriptionsfaktoren in Makrophagen <i>in vitro</i> anhand TNF α	81
4.1.3	Einflussnahme von LASP1 auf die Schaumzellformation in Makrophagen <i>in vitro</i>	83
4.1.4	Einflussnahme von LASP1 in der MMP12-vermittelten Degradation <i>in vitro</i>	86
4.2	<i>Einordnung der Rolle von LASP1 in der Atherogenese</i>	87
4.2.1	Pro-atherosklerotische Aspekte der Involvierung von LASP1 in die Atherogenese	87
4.2.2	Anti-atherosklerotische Aspekte der Involvierung von LASP1 in die Atherogenese	89
4.2.3	Konklusion der Einflussnahme von LASP1 auf die Atherogenese.....	91
4.3	<i>Übertragbarkeit auf den humanen Organismus und klinische Relevanz</i>	91
5	Ausblick	93
6	Zusammenfassung	94
7	Literaturverzeichnis	98
8	Anhang	104
	Danksagung	105
	Lebenslauf	106
	Eidesstattliche Erklärung	107

Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celcius
A	Ampere
ABC	ATP- binding cassette transporter
ACAT-1	Acetyl-Coenzym A acetyltransferase 1
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
AG	Arbeitsgruppe
AP	Alkaline phosphatase
AP-1	Activator Protein 1
APC	Allophycocyanin
ApoA1	Apolipoprotein A1
APS	Ammoniumpersulfat
b.End5	Brain Endothelial Cellline.5
BCA-Assay	Bicinchoninic-Acid Assay
BFA	Brefeldin A
BMDMs	Bone marrow-derived macrophages
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
CCL2	CC-Chemokine ligand 2
CCR	Chemokin-Rezeptor
CD	Clusters of Differtiation
cDNA	Komplimentäre DNA
CER	Cytoplasmic Extraction Reagent
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPS5	Constitutive photomorphogenic homolog subunit 5
CT	Cycle threshold
Cu	Kupfer
CXCL	CXC-Motiv-Chemokin
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
Cy	Cyanine Dye
DAPI	4',6-Diamindino-2-phenylindol
DC	Dendritic cell
Dest.	Destilliert

Dil	3,3'-Diocetadecyloxacarbocyanine
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT1	DNA Methyltransferase 1
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EC	Endothelzellschicht
ECL	Enhanced Chemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMT	Endotheliale mesenchymale Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
EZM	Extrazellulärmatrix
FC-Rezeptor	Fragment crystallizable Fragment bindender Rezeptor
FCS	Fetal calf Serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	Forward scatter
g	Gramm
G9a	Histon-Lysin-N-Methyltransferase 2
G2/M	Gap 2/ Mitose Phase
GM-CSF	Granulocyte macrophage – colony stimulating factor
GTP	Guanosintriphosphat
GWAS	Genome wide association Studies
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCC	Hepatocelluläres Carzinom
HCL	Chlorwasserstoffsäure
HDL	High density lipoprotein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFD	High Fat Diet Bedingung
HIF-1 α	Hypoxia-inducible factor 1 alpha
HOCl	Hypochlorige Säure
HPRT	Hypoxanthin- Guanin- Phosphoribosyltransferase
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IF	Immunfluoreszenz
IFN γ	Interferon gamma
IH	Immunhistochemie

IL	Interleukin
Ion	Ionomycin
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KD	Knockdown
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
L/D	Life/Dead
LASP1	LIM and SH3 domain Protein 1
LDL	Low density lipoprotein
LDL-C	Low density lipoprotein - Cholesterin
LDLR	Low density lipoprotein receptor
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LIM	Lin-11, Isl-1, Mec-3 Protein
LOX-1	Lectin-type oxidized LDL Receptor 1
LPP	Lipoma-preferred partner
LPS	Lipopolysaccharid
Ly6C	Lymphocyte antigen 6 complex locus C
Ly6G	Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D
M	Molarität
M0	Nicht-stimulierte Makrophagen differenziert mit M-CSF aus einer murinen Knochenmarkszellsuspension
M1	Makrophagen (differenziert mit M-CSF aus einer murinen Knochenmarkszellsuspension), welche mit LPS (100 ng/ml) für 20-24 h zur Expression eines proinflammatorischen Phänotyps stimuliert wurden
M-CSF	Macrophage – Colony stimulating factor
M-MuLV-RV	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Trankriptase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
CCL2	Monocyte chemotactic protein 1
mg	Milligramm
Mg ⁺	Magnesium
Mio.	Millionen
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NC	Nitrocellulose-Membran

NCEH	Neutral cholesterol ester hydrolase 1
ND	No Diet Bedingung
NER	Nuclear Extraction Reagent
NFκB	Nuclear Factor ‚kappa-light-chain-enhancer‘ of activated B-cells
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoff
NR	Nebulin repeat
oxLDL	Oxidiertes low density lipoprotein
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PB	Pacific Blue
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
Percp	Peridinin Chlorophyll Protein Complex
pH	potentia Hydrogenii
PI3K	Phosphoinositid 3 Kinase
PK	Proteinkinase
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
POX	Peroxidase
PPARγ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PP2B	Serin/Threonin-Protein-Phosphatase 2
qPCR	Quantitative real time Polymerase-Kettenreaktion
RIPA- Puffer	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Sauerstoffspezies
RPLP0	Ribosomal Protein, Large, P0
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat -Polyacrylamidegelelektrophorese
sek/ min/ h/ d/ w	Sekunde/ Minute/ Stunde/ Tag/ Woche
SFK	Src family kinases
SH3	Src-homology 3
SMC	Smooth muscle cell
SR	Scavenger Rezeptor

SSC	Side scatter
STAT	Signal transducer and activator of transcription protein
SYBR	N',N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene)methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropane-1,3-diamine
TACE	Tumor necrosis factor alpha converting enzyme
TBS	Tris-buffered saline
TCR- β	T-Zell-Rezeptor beta
TCR- $\gamma\delta$	T-Zell-Rezeptor gamma/delta
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TRIS	Tris(hydroxymehtyl)-aminomethan
UHRF1	Ubiquitin-like containing PHD and RING finger domains 1
V	Volt
VASP	Vasodilatator-simuliertes Phosphoprotein
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VE	Vascular- endothelial
VE-Wasser	Voll-deionisiertes Wasser
VLA-4	Very late antigen 4
VSMC	Vascular smooth muscle cell
WB	Western Blot
WBC	White blood cells = Leukozyten
wt	Wildtyp
Y	Thyrosin
ZO-2	Zonula Occludens 2
μg	Mikrogramm

Abbildungsverzeichnis

Abb.	Bezeichnung	Seite
1-1	Häufigste Todesursachen in Deutschland im Jahr 2017 in Tausend	1
1-2	Schematische Darstellung der Atherogenese	2
1-3	Charakterisierung von Ly6C ^{high} und Ly6C ^{low} Monozyten	3
1-4	Adhäsionskaskade der Leukozyten	5
1-5	Entwicklung von Monozyten zu Makrophagen: M1-M2-Paradigma	6
1-6	Signalkaskade zur Induktion der Transkription von TNF α mRNA	7
1-7	Lipidmetabolismus in Makrophagen	8
1-8	Domänenstruktur und Bindungspartner von LASP1	10
2-1	Punktwolkendiagramm der Vorwärts- im Verhältnis zur Seitwärtsstreuung	34
2-2	Darstellung des o,4 I Luer Slides von Ibidi	35
2-3	Protokoll zum Mediumwechsel innerhalb der Ibidi-Slides	35
2-4	Schematische Darstellung des Ibidi-Pumpsystems	36
2-5	Schematische Darstellung des Chemotaxis Assay	37
2-6	Lineare Regression von CellTiter Glo	38
3-1	Immunhistochemische Färbung von atherosklerotisch veränderten Aortenwurzeln	52
3-2	Sequenzaufreinigung von murinem LASP1 und der orthologen Nebulette-Variante	52
3-3	Punktwolkendiagramm zur Bestimmung des Anteils der Monozyten in der Zellsuspension, isoliert aus murinem Knochenmark mittels „BM Monocyte Isolation Kit“ von <i>Miltenyi</i> .	53
3-4	Immunfluoreszenz von Makrophagen gefärbt mit LASP1-PE Antikörper	54
3-5	Vergleich der Reaktionskits für intrazelluläre Färbung für die Durchflusszytometrie der Firmen <i>eBioscience</i> und <i>BD</i> in Bezug auf die Detektion der LASP1-PE-Fluoreszenz	55
3-6	Quantifizierung der adhärenen Monozyten auf aktiviertem Endothel	56
3-7	Darstellung des Prozentsatz der migrierten Zellen an der Gesamtzellzahl	58
3-8	Unveränderte TNF α -Expression auf mRNA-, Protein-Ebene und im Zellüberstand nach LASP1-KO	57
3-9	Unveränderte Transkription und Proteinexpression von ADAM17 nach LASP1-KO	61
3-10	Keine LASP1-Detektion in der Kernfraktion in Makrophagen ohne Stimulation/ nach CXCL12-Stimulation/ nach PKA-Aktivierung	63
3-11	Gesteigerte LASP1-mRNA-Expression und erhöhter Prozentanteil von LASP1-positiven Ldlr ^{-/-} Makrophagen nach oxLDL-Stimulation	64
3-12	Erhöhte oxLDL-Aufnahme durch LASP1-defiziente Makrophagen	66

3-13	Relative mRNA Expression von CD36, ABCA1, ABCG1 in BMDMs nach oxLDL Stimulation	67
3-14	Zymographische Analyse des Degradationsverhalten der MMP12 in Casein-Gel nach IL-1 β Stimulation in Ldlr ^{-/-} und Ldlr.LASP1 ^{-/-} BMDMs	69
3-15	Durchflusszytometrische Quantifizierung der LASP1-exprimierenden Zellen in Monozyten, B-, T-Zellen, CD4 ⁺ , CD8 ⁺ T-Zellen und RPM (red pulp macrophages), isoliert aus Milzen von Ldlr ^{-/-} -Mäusen unter Chow-Diät und 6-Wochen HFD	70
3-16	Quantifizierung per FACS der LASP1-exprimierenden Zellen in B- und T-Zellen sowie CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen, isoliert aus Blutproben von Ldlr ^{-/-} -Mäusen unter Chow-Diät und 6-Wochen HFD	71
3-17	Quantifizierung per Durchflusszytometrie der LASP1-exprimierenden Zellen in Monozyten, isoliert aus Blutproben von Ldlr ^{-/-} -Mäusen unter Chow-Diät und 4 sowie 8-Wochen HFD	71
3-18	qPCR zur relativen LASP1-mRNA-Expression in gesamten Aortenwurzeln (A) und Milzen (B) von Ldlr ^{-/-} -Mäusen vergleichend unter Chow-Diät und 12w HFD	72
3-19	Gesteigerter Anteil der T-Zellen durch LASP1-KO bei Chow-Diät und 16 Wochen HFD in Milzproben	74
3-20	Signifikant höherer Anteil der T-Zellen an der Gesamtleukozytenzahl in Blutproben aus Ldlr.LASP1 ^{-/-} -Mäusen unter Chow-Diät	76
4-1	Modell zur CXCL12-vermittelten Translokation von LASP1 in den Zellkern	82
8-1	LASP1-Expression in verschiedenen Zellarten einer atherosklerotisch-veränderten Aorta	104

Tabellenverzeichnis

Tabelle	Bezeichnung	Seite
1	Körpergewicht, Milzgewicht und Anzahl der WBC von Ldlr ^{-/-} und Ldlr.LASP1 ^{-/-} -Mäusen unter Chow und 16 Wochen HFD	73

1 Einleitung

1.1 Krankheitsbild der Atherosklerose

Atherosklerose-assoziierte Krankheiten gehören sowohl in Deutschland (Abb. 1- 1) als auch weltweit zu den häufigsten Todesursachen (Statista, 2016).

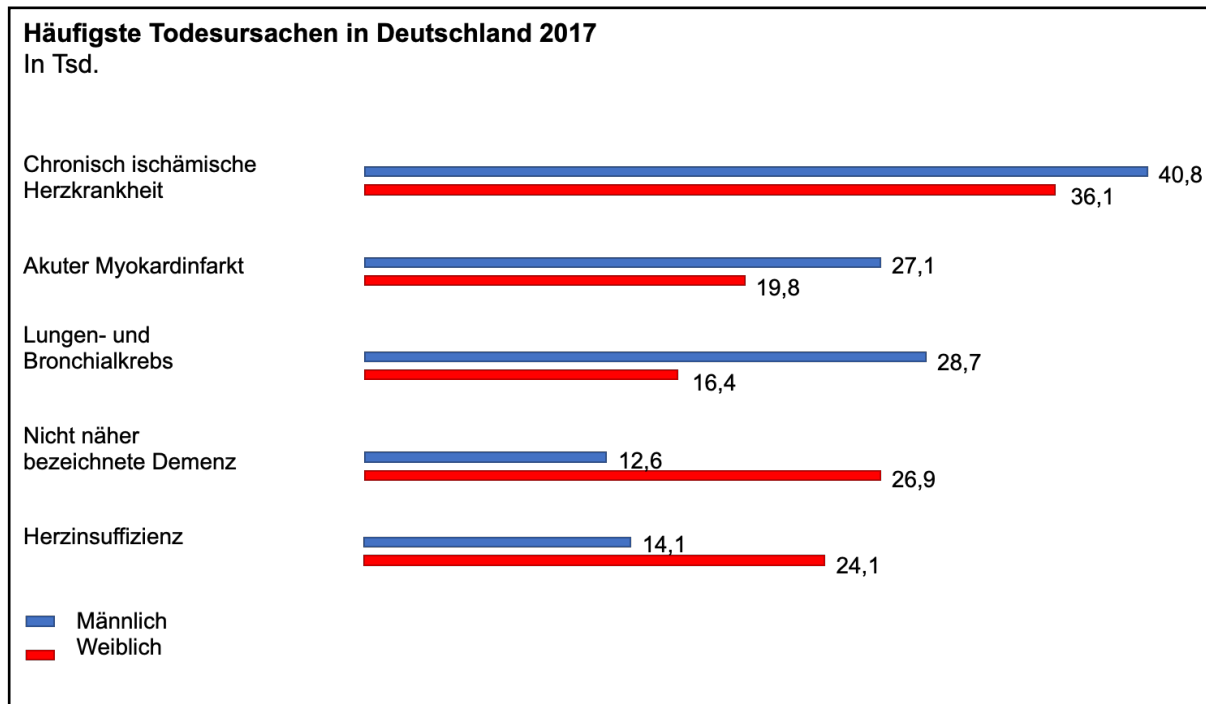


Abbildung 1-1: Häufigste Todesursachen in Deutschland im Jahr 2017 in Tausend (Statistisches Bundesamt, 2019). Fünf der zehn häufigsten Todesursachen in Deutschland im Jahr 2017 waren auf Atherosklerose-assoziierte Krankheiten zurückzuführen. © Statistisches Bundesamt (Destatis), 2021

Es handelt sich um eine progressive, chronisch inflammatorische Erkrankung des Gefäßsystems, die das Auftreten unter anderem von Herzinfarkten, Aortenaneurysmata, ischämischen Schlaganfällen, der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit sowie einer chronischen Niereninsuffizienz bedingt. Zu den Hauptrisikofaktoren gehören Hyperlipidämie, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus und die familiäre Prädisposition bzgl. Herz-Kreislaufferkrankungen. Aufgrund der breiten Anzahl an beeinflussbaren und nicht beeinflussbaren Risikofaktoren, die zur Entstehung beitragen, wird von einer komplexen, multifaktoriellen Ätiogenese ausgegangen (Libby et al., 2019).

1.1.1 Atherogenese

Wird aufgrund von Flussveränderungen innerhalb eines Gefäßes das Endothel aktiviert und dysfunktional, kann in der Folge *low density lipoprotein* (LDL) in die Intima gelangen. Die intimale Oxidation von LDL durch *reactive oxygen species* (ROS) führt zur Aktivierung von Endothelzellen und residenter Immunzellen und damit zur

gesteigerten Produktion von Adhäsionsrezeptoren, Chemokinen wie *Monocyte chemoattractant protein 1* (CCL2) und auch Wachstumsfaktoren wie *macrophage-colony stimulating factor* (M-CSF). Zirkulierende Monozyten, welche den am häufigsten vorkommenden Immunzelltyp in atherosklerotischen Läsionen darstellen, werden dadurch - wie in Abbildung 1-2 erkennbar - an die Gefäßwand rekrutiert, adhären und migrieren transendothelial in die Intima (Abb. 1-2) (Cochain & Zerneck, 2017).

Durch den Einfluss von M-CSF entwickeln sich Monozyten zu Makrophagen. Diese können unter anderem über *Scavenger*-Rezeptoren oxidiertes LDL aufnehmen. Die Akkumulation von oxLDL im Zellinneren führt schließlich zur Schaumzellbildung (Moroni, Ammirati, Norata, Magnoni, & Camici, 2019). Schaumzellen fördern die Entwicklung von Atherosklerose durch Sekretion proinflammatorischer Mediatoren wie Zytokine (vgl. TNF α) und ROS (Stremmel, Stark, & Schulz, 2019). Im weiteren Verlauf werden sie apoptotisch, wodurch frühe atherosklerotische Läsionen, sogenannte *fatty streaks*, entstehen. Bei weiterem Fortschreiten bildet sich durch Akkumulation von apoptotischen Zellen sowie Zellschrott ein nekrotischer Kern, der thrombogenes Material enthält (Gistera & Hansson, 2017). Fortgeschrittene atherosklerotische Plaques können durch Einengen des Gefäßlumens die Durchblutung behindern und zu Gewebischämie führen. Makrophagen sekretieren zudem proteolytische Proteine, sogenannte Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). Diese können die fibröse Kappe der Plaques degradieren. Der bei Ruptur der Plaques freigesetzte *tissue factor* setzt die Gerinnungskaskade in Gang. Atherothrombose und ein damit verbundenes ischämisches Ereignis können die Folge sein (Abb. 1-2) (Cochain & Zerneck, 2017).

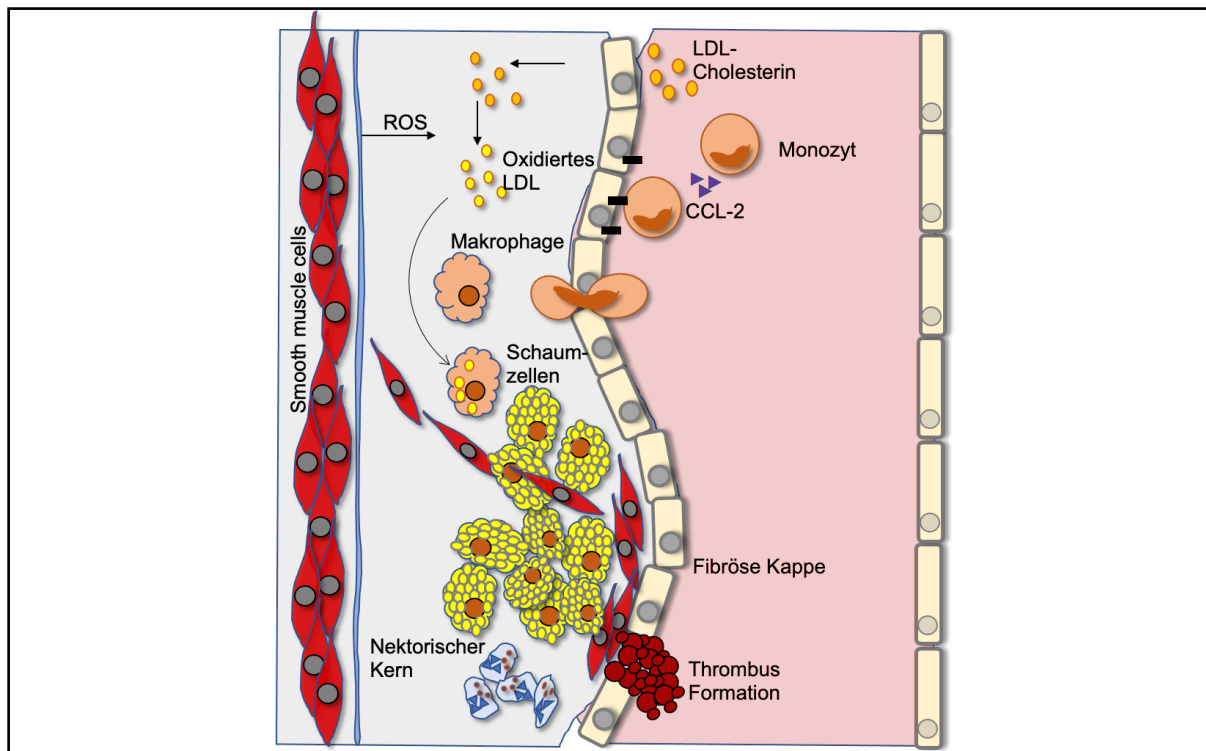


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Atherogenese. Teilschritte der Entwicklung atherosklerotischer Plaques bis hin zu Ruptur und Austreten des thrombogenen Materials, modifiziert nach (Madamanchi, Vendrov, & Runge, 2005).

1.1.2 Charakterisierung von Monozyten

Monozyten und Makrophagen sind Leukozyten und damit Teil des angeborenen Immunsystems. Leukozyten entstehen im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen und entwickeln sich in Abhängigkeit von äußeren Einflussfaktoren entlang unterschiedlicher Differenzierungswege (Abb. 1-3) (Ginhoux & Jung, 2014). Ein Großteil der so entstehenden Monoblasten, bzw. unreifen Monozyten weisen eine hohe Expression des Antigens *lymphocyte antigen 6 locus C* (Ly6C) und des Chemokin-Rezeptors 2 (CCR2) auf. Sie werden als klassische Ly6C^{high} CCR2⁺ CD43⁻ Monozyten bezeichnet. Auf Chemokin-Signale (CCL2/ CCR2) treten sie in den Blutstrom ein. Dort zirkulieren sie für ca. 20 h und reifen schließlich entweder zu Ly6C^{low} Blutmonozyten heran oder migrieren in Gewebe (Jakubzick, Randolph, & Henson, 2017) (Abb. 1-3). Entzündliche Veränderung von Gefäßwänden führt zur schnellen Rekrutierung von Ly6C^{high} Monozyten. Diese können sich nach der Migration in Gewebe zu Makrophagen und dendritischen Zellen (DCs) entwickeln (Abb. 1-3). Ly6C^{high} Monozyten werden als Hauptquelle der Plaque-Makrophagen betrachtet (Cochain & Zerneck, 2017).

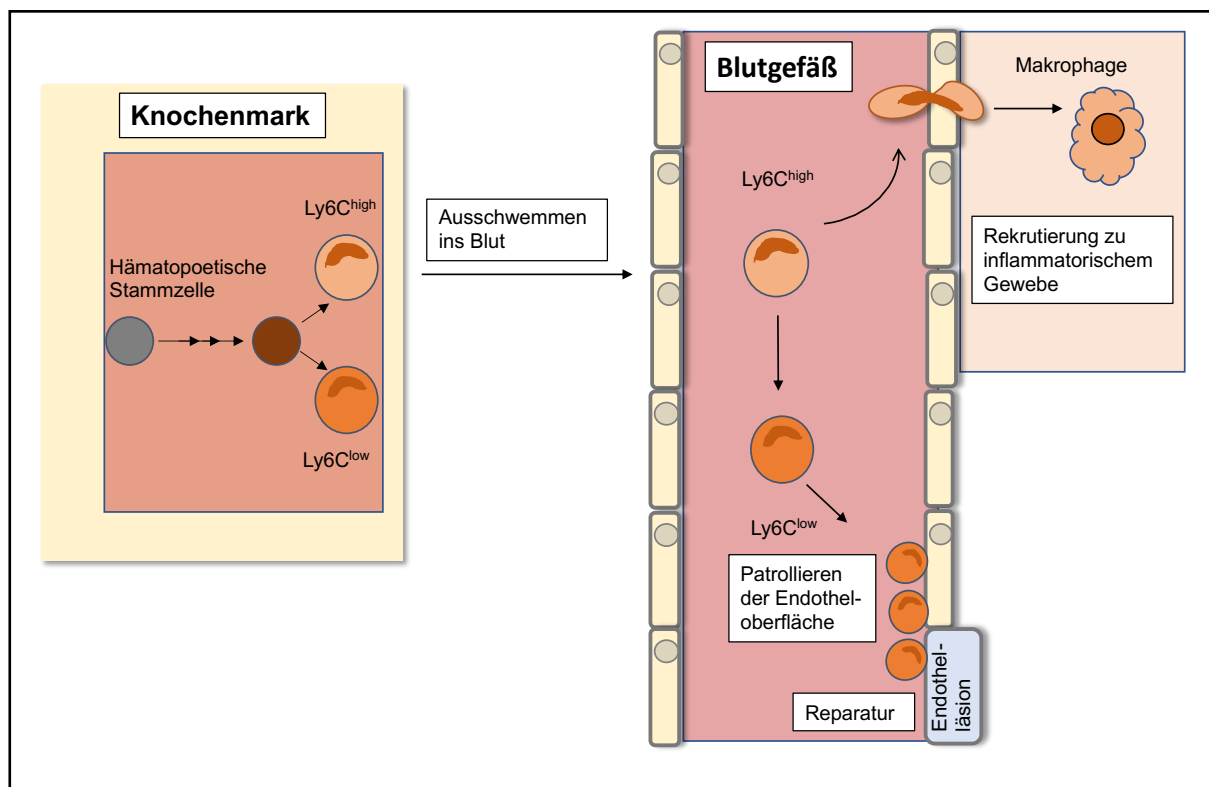


Abbildung 1-3: Charakterisierung von Ly6C^{high} und Ly6C^{low} Monozyten. Monozyten werden kontinuierlich im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen über Makrophagen- und DC-Zellvorläufer und „common monocyte progenitor“-Einheiten produziert. Ly6C^{low} Monozyten patrouillieren das lumenzugewandte Endothel und sind an Reparaturarbeiten beteiligt. Ly6C^{high} Monozyten werden in entzündetes Gewebe rekrutiert, extravasieren und entwickeln sich zu dendritischen Zellen oder Makrophagen, modifiziert nach (Ginhoux & Jung, 2014).

Ly6C^{low} Monozyten sind kleiner und exprimieren neben Ly6C auch weniger CCR2 Rezeptoren auf der Zelloberfläche im Vergleich zu Ly6C^{high} Monozyten. Der CCR2 ist essentiell für die Gewebemigration, sodass Ly6C^{low} Monozyten kaum migratorisches Verhalten aufweisen. Stattdessen patrouillieren sie entlang des Endothels venöser und arterieller Gefäße und sind dort an der Gewebereparation beteiligt (Abb. 1-3) (Woollard & Geissmann, 2010).

Monozyten und Makrophagen sind nachweislich von herausragender Bedeutung für das Fortschreiten und die Entwicklung reifer atherosklerotischer Läsionen (Cochain & Zerneck, 2017). Nachdem Monozyten und Makrophagen sowohl eine schützende Rolle in Bezug auf Immunität und Homöostase einnehmen, als auch zu vielen pathologischen Prozessen beitragen, stellen sie attraktive und erfolgsversprechende therapeutische Angriffsziele dar (Ginhoux & Jung, 2014). Im Folgenden werden im Detail - mit Fokus auf die Rolle von Monozyten/Makrophagen - die endotheliale Adhäsion, transendotheliale Migration, M1-vermittelte TNF α -Sekretion, Schaumzellbildung und auch die Plaque-Degradation näher erläutert, da jene den Hauptbestandteil dieser Arbeit ausmachen.

1.1.3 Intimale Invasion

Rekrutierung, Adhäsion und Migration von Leukozyten an bzw. durch das Endothel gehören zu den ersten Schritten in der Entwicklung von Atherosklerose. Monozyten stellen hierbei mit Abstand die größte Fraktion von Leukozyten dar, die in atherosklerotische Plaques einwandern. Läsionswachstum und -differenzierung werden durch konstanten Monozyteninflux in großem Maße beeinflusst (Cochain & Zerneck, 2017).

Histologisch besteht ein Gefäß aus 3 Schichten:

- 1) Tunica intima (zusammengesetzt aus Endothel und subendothelialer Schicht)
- 2) Tunica media (mit einem hohen Anteil an glattem Muskelgewebe)
- 3) Tunica adventitia (Bindegewebsschicht) (D. Wang, Wang, Zhang, & Wang, 2017).

Das Endothel besteht aus einer einschichtigen Lage polygonaler, platter Zellen. Diese reagieren auf *shear stress* mit einer Änderung ihrer Morphologie und der Aktivierung verschiedener Signalkaskaden. Wird der laminare Fluss durch Gefäßabzweigungen unterbrochen, kommt es zu tubulären Strömungen und damit zu einer Verringerung der Scherkräfte (Gimbrone & Garcia-Cardena, 2016). In der Folge kann das Endothel dysfunktional und aktiviert werden, was den LDL-Influx erleichtert. Als endotheliale Dysfunktion wird die verminderte Synthese, Sekretion und/oder Aktivität des vom Endothel produzierten NO bezeichnet bei gleichzeitig erhöhter Produktion von ROS (Gimbrone & Garcia-Cardena, 2016). Aktiviertes Endothel ist gekennzeichnet durch die gesteigerte Expression von Chemokinen (z.B. CCL2) und Adhäsionsmolekülen auf der Endothelzelloberfläche. Dies bedingt eine gesteigerte Rekrutierung, Adhäsion und transendotheliale Migration zirkulierender Leukozyten. Zur Induktion der Aktivierung

tragen unter anderem proinflammatorische Zytokine wie TNF α und Interleukin 6 (IL-6) sowie die Akkumulation von oxLDL bei (D. Wang et al., 2017). Charakteristisch ist die Formation fibrotischer Plaques besonders in großen und mittleren Gefäßen (Gimbrone & Garcia-Cardena, 2016).

Bezüglich der Rekrutierung von Monozyten bei Inflammation sowie bei der chemotaktischen Migration kommt dem Chemokin CCL2 (auch MCP-1 genannt) eine essentielle Rolle zu (Bianconi, Sahebkar, Atkin, & Pirro, 2018). Neben CCL2 sind auch andere Chemokine, wie CXCL12 (auch SDF-1a genannt), als Stimulatoren der Migration beschrieben worden (Chatterjee et al., 2015). Im Falle der monozytären Adhäsion an das Endothel und im Weiteren der Migration spricht man von positiver Chemotaxis. Chemotaxis ist als gerichtete Bewegung eines Organismus in Abhängigkeit eines chemischen Konzentrationsgradienten definiert, in diesem Fall entlang des Konzentrationsgefälles von CCL2 (Bianconi et al., 2018).

Die Adhäsionskaskade lässt sich in 4 große Schritte unterteilen (Abb. 1-4).

- 1) Selektin-vermittelt kommt es zur Rekrutierung, zum Rolling und Anheftung der Leukozyten an das Endothel (Gerhardt & Ley, 2015).
- 2) Die Chemokine CCL2 und CCL5, welche sich auf der apikalen Endothelzelloberfläche befinden, vermitteln die Integrin-Aktivierung auf den Monozyten (Mestas & Ley, 2008). Die Folge ist eine Verlangsamung des Rollings und anschließend die feste Adhäsion der Leukozyten an das Endothel (Schmidt, Moser, & Sperandio, 2013).
- 3) Durch Integrin-Clusterbildung wird die Adhäsionsbindung gestärkt (Stremmel et al., 2019)
- 4) Als letzter Schritt der Adhäsionskaskade folgt die Transmigration durch das Endothel. Adhärenente Monozyten breiten sich durch Neuordnung ihres Zytoskeletts aus, um durch intravasales Kriechen eine bevorzugte Stelle für die subendotheliale Invasion zu finden (Gerhardt & Ley, 2015).

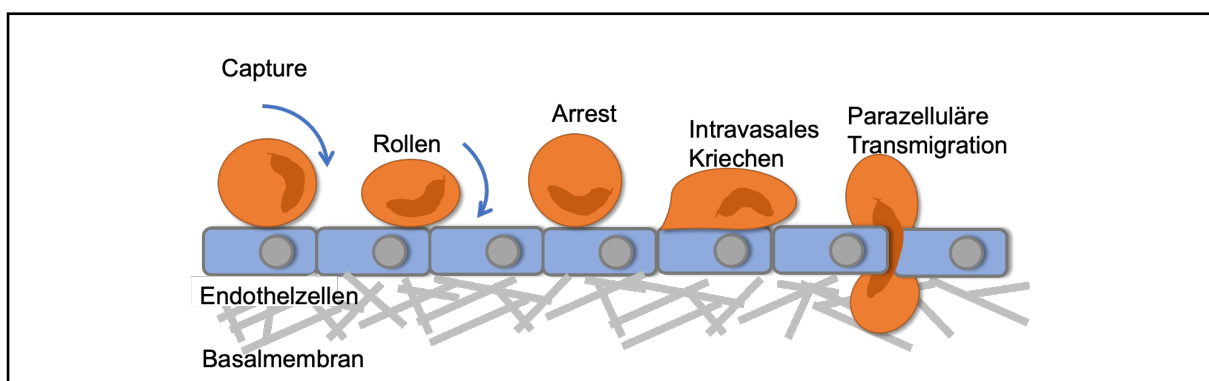


Abbildung 1-4: Adhäsionskaskade der Leukozyten. Es kommt zur Rekrutierung und zum Rolling der Monozyten, vermittelt durch Selektine. Es folgt die Aktivierung der Integrine durch Chemokine und schließlich der Zellarrest. Nach Adhäsionsstärkung und Zellspreading kommt es zur Transmigration, modifiziert nach (Ley, Laudanna, Cybulsky, & Nourshargh, 2007).

1.1.4 Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen

Die Transformation von Monozyten zu Makrophagen beinhaltet Veränderungen des zellulären Metabolismus, zytoplasmatischer Organelle und des Größenwachstums (Ruytinx, Proost, Van Damme, & Struyf, 2018). Ly6C^{high} Monozyten entwickeln sich zu sogenannten proinflammatorischen, klassisch aktivierten M1-Makrophagen. Ly6C^{low} Monozyten entwickeln sich dagegen zu Makrophagen des M2-Types, dem alternativ aktivierten, eher entzündungslösenden Typ (Woollard & Geissmann, 2010).

Die Transformation zu M1-Makrophagen wird durch TNF α , IFN γ und Lipopolysaccharid (LPS) induziert. Die Funktion dieser Makrophagen besteht vor allem in der Phagozytose von Erregern und Tumorzellen und in der Beteiligung an der adaptiven Immunantwort u.a. durch Sekretion von ROS und proinflammatorischen Zytokinen (Abb. 1-5). In atherosklerotischen Plaques wurde eine Anhäufung von M1-Makrophagen festgestellt. Darüber hinaus ist das Vorkommen dieses Zelltyps vermehrt mit instabilen Plaques assoziiert. (Stremmel et al., 2019).

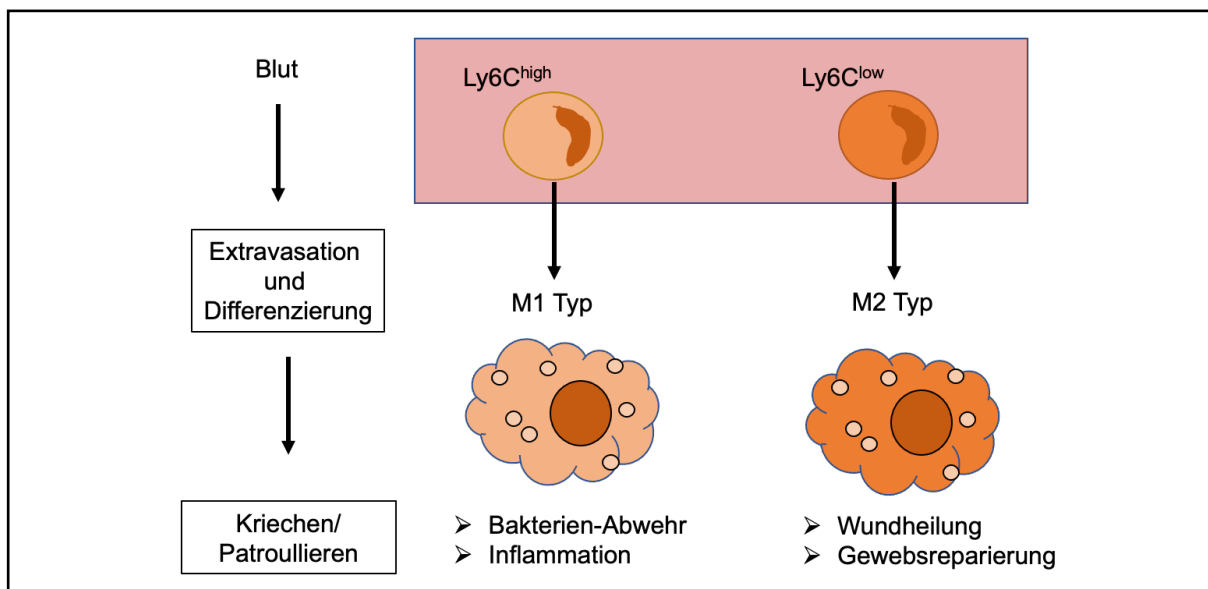


Abbildung 1-5: Entwicklung von Monozyten zu Makrophagen: M1-M2-Paradigma. Ly6C^{high} Monozyten wandern in Gewebe und differenzieren sich zu M1, klassisch-aktivierten Makrophagen. Sie phagozytieren Pathogene und vermitteln proinflammatorische Reaktionen. Ly6C^{low} Monozyten kriechen entlang des Endothels, können bei inflammatorischen Stimuli aber auch extravasieren und differenzieren sich in den M2-Makrophagentyp. Diese alternativ-aktivierten Makrophagen sind an der Wundheilung und Chemokinproduktion beteiligt, modifiziert nach (Woollard & Geissmann, 2010).

M2-Makrophagen bilden sich als Reaktion auf Stimulation mit IL-4, -10, -13. Ihre Aufgabe besteht unter anderem in der Entfernung von Zelltrümmern und Gewebsreparatur (Abb. 1-5). M2-Makrophagen kommen erst in späteren Stadien der atherosklerotischen Plaque-Entwicklung vor. Sie sind gehäuft in stabilen Plaqueformationen zu finden (Martinez & Gordon, 2014; Ruytinx et al., 2018).

1.1.5 TNF α -Sekretion durch M1-Makrophagen

Innerhalb atherosklerotischer Läsionen beteiligen sich M1-Makrophagen aktiv an der Aufrechterhaltung der vaskulären Entzündung durch Sekretion proinflammatorischer Zytokine. Sie zählen zu den Hauptproduzenten von TNF α , ein Schlüsselprotein in der Aufrechterhaltung unterschwelliger systemischer Inflammation (Parameswaran & Patial, 2010). Die pro-atherogene Rolle von TNF α zeigte sich unter anderem in der Steigerung von Endothelverletzung, -dysfunktion und -aktivierung (D. Wang et al., 2017). Zudem werden Makrophagen unter Einfluss von TNF α zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine sowie ROS angeregt und differenzieren sich vermehrt zu dem proinflammatorischen M1-Typ (Stremmel et al., 2019).

Die Transkription von TNF α wird maßgeblich durch Aktivierung des *toll like receptors* 4 (TLR-4) bestimmt. Ein Ligand von TLR-4 ist das Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS), ein Wandbestandteil gram-negativer Bakterien. Studien ergaben, dass gram-negative Bakterien die Morbidität und Mortalität Atherosklerose-assoziiertes, kardiovaskulärer Erkrankungen durch Induktion proinflammatorischer Signalwege erhöhen können (J. Wang et al., 2012). Bei Bindung von LPS an TLR-4 werden über eine Signalkaskade Tyrosinkinasen, Mitglieder der MAP-Kinasen Familie sowie die Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 aktiviert. Als Resultat kommt es zu einer Erhöhung der Transkription von TNF α (Abb. 1-6) (Kishore, McMullen, Cocuzzi, & Nagy, 2004).

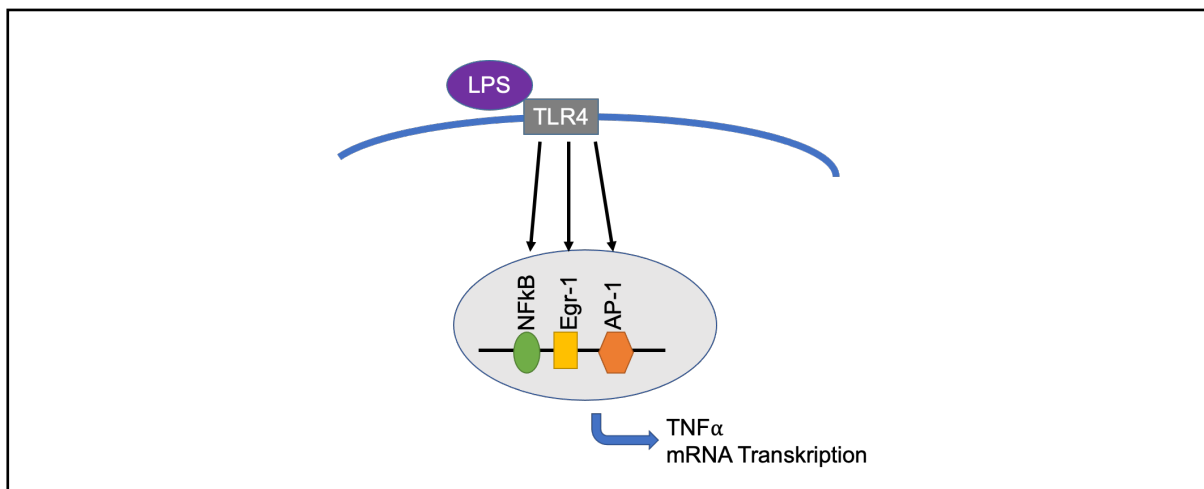


Abbildung 1-6: Signalkaskade zur Induktion der Transkription von TNF α mRNA. Lipopolysaccharide (LPS, LBP) führen über Aktivierung des TLR-4 und weiteren Schlüsselproteinen zu vermehrter Transkription von TNF α in Makrophagen, modifiziert nach (Kishore et al., 2004).

TNF α wird im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und im Anschluss an die Zellmembran transportiert, wo es als funktionelles Membranprotein in der TNF α -Proform (26 kDa) verbleibt oder durch proteolytische Spaltung, dem sogenannten *Shedding* durch das membrangebundene *Cleaving-Enzym tumor necrosis factor alpha converting enzyme* (TACE= ADAM17) in die aktive, lösliche Form (17 kDa) überführt wird. Lösliches TNF α bildet Homotrimere und kann dann als 51 kDa Form detektiert werden (Parameswaran & Patial, 2010).

1.1.6 Schaumzellbildung

Die Entwicklung von Makropagen zu Schaumzellen in der arteriellen Intima stellt einen der pathognomonischen Schritte in der Bildung atherosklerotischer Plaques dar. Atherosklerose ist mit einer tiefgreifenden Störung des Cholesterolmetabolismus assoziiert (X. H. Yu, Fu, Zhang, Yin, & Tang, 2013). Unkontrollierte Aufnahme von oxLDL, übermäßige Cholesterol-Esterifizierung und/ oder verminderter Cholesterol-Efflux führen zur Akkumulation von Cholesterolestern in Makrophagen und schließlich zur Schaumzellbildung (Libby et al., 2019). Die Oxidierung von LDL-Cholesterin wird von vaskulären Zellen durch Sekretion von Oxidationsmitteln vermittelt (Chistiakov, Melnichenko, Orekhov, & Bobryshev, 2017). Die Aufnahme von modifiziertem LDL-C wird größtenteils durch verschiedene *Scavenger*-Rezeptoren, v.a. durch den CD36, SR-A1 und LOX-1 (Abb. 1-7), per Endozytose ermöglicht (Moroni et al., 2019). Das aufgenommene LDL unterläuft innerhalb der Zellen verschiedene Modifikationen (Abb. 1-7).

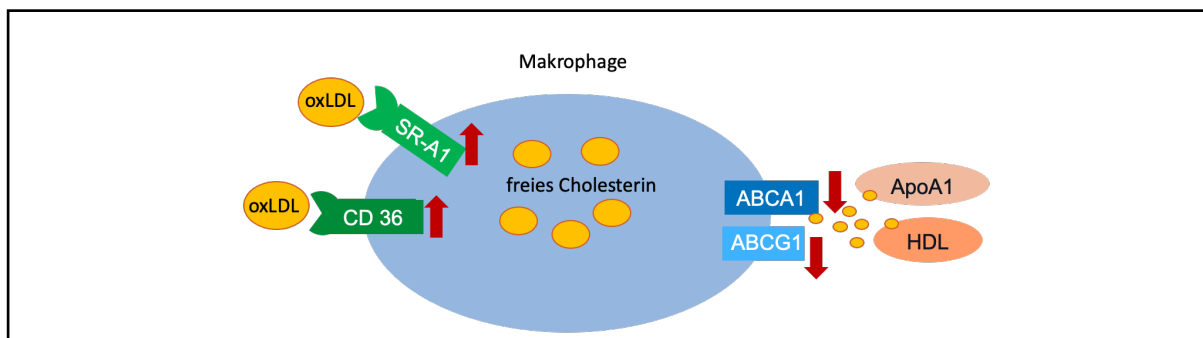


Abbildung 1-7: Lipidmetabolismus in Makrophagen. Das Sensing und die Aufnahme von oxLDL wird über die Scavenger-Rezeptoren SR-A1, CD36, LOX-1 vermittelt. Anschließend wird das LDL-C esterifiziert und gespeichert. Beim Cholesterin-Efflux wird freies Cholesterin, nach Abbau von Cholesterolestern über die ABC-Transporter und SRB-1 aus der Zelle befördert. In der Atherosklerose wird das unter physiologischen Bedingungen feinabgestimmte Gleichgewicht gestört (gekennzeichnet durch rote Pfeile). Es kommt zu übermäßiger oxLDL-Aufnahme durch gesteigerte Expression der Scavenger-Rezeptoren bei gleichzeitig verminderter Expression der Efflux-Transporter. In der Folge wird eine Akkumulation der Cholesterolester beobachtet. Exzessive Lipid Deposition bedingt die Formation zu Schaumzellen, modifiziert nach (Chistiakov, Melnichenko, Myasoedova, Grechko, & Orekhov, 2017).

Die Freisetzung des Cholesterins aus der Zelle, also der Cholesterolefflux, wird vor allem über die Transporter *ATP-binding cassette transporter A1* und *G1* (ABCA1, ABCG1) in der Anwesenheit eines extrazellulären Empfängers wie *high density lipoprotein* (HDL) vermittelt. Das Cholesterin gelangt über HDL in die Leber, wird dort weiter verstoffwechselt und kann mittels Gallensäuren per Faeces aus dem Körper ausgeschieden werden (Chistiakov, Melnichenko, Myasoedova, et al., 2017; Getz & Reardon, 2018). Physiologisch bedingt eine gesteigerte Lipidaufnahme der Zelle eine Steigerung des Efflux-Mechanismus (Abb. 1-7). Hypercholesterinämie führt allerdings über den TLR-4 zu einer Herunterregulation der Export-Transporter. So können proinflammatorische Makrophagen (M1-Typ), welche in atherosklerotischen Plaques vermehrt vorkommen, zwar aktiv Lipide aufnehmen, diese allerdings nicht effektiv ausscheiden (Chistiakov, Melnichenko, Myasoedova, et al., 2017). Dies begünstigt die Entstehung früher atherosklerotischer Läsionen, sogenannter *fatty streaks*.

1.1.7 MMP-vermittelte Degradation der fibrösen Plaque-Kappe

Exzessive Aufnahme von Lipiden und Zellschrott bedingen die Apoptose von Makrophagen. In späteren Entwicklungsstadien atherosklerotischer Plaques kommt es aufgrund von erschöpften Efferozytose-Kapazitäten der Makrophagen zur Bildung eines nekrotischen Kerns (Gistera & Hansson, 2017). *Smooth muscle cells* (SMC), bilden zwischen dem nekrotischen Kern und dem Gefäßlumen eine fibröse Kappe aus Kollagen und Elastin. So wird der Kontakt des thrombogenen Kernmaterials mit Blutbestandteilen vermieden. Hierbei gilt je dicker die Kappe, desto stabiler der Plaque (van der Vorst, Doring, & Weber, 2015).

Plaque-Makrophagen werden ausgeprägte proteolytische Fähigkeiten zugeschrieben. Durch Sekretion von MMPs - proteolytische Enzyme, welche Umbauprozesse von Extrazellulärmatrix (EZM) regulieren - tragen sie aktiv zur Destabilisierung der Läsionen bei (Cochain & Zerneck, 2017). MMPs gehören der Familie der Zink-abhängigen Endopeptidasen an. Eine Unterteilung ist aufgrund struktureller sowie funktioneller Eigenschaften möglich (Amin et al., 2016). Die Expressionsmuster humaner und muriner MMPs unterscheiden sich, wobei in der Maus vor allem MMP8,-12,-13,-14 von großer Bedeutung sind (Newby, 2005).

MMP12, eine Metalloelastase mit Elastin als Substrat, scheint aufgrund der Datenlage eine entscheidende Rolle in Bezug auf atherosklerotische Pathologien zuzukommen. In fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen besteht eine vermehrte MMP12-Expression. Zudem wiesen MMP12-KO Mäuse ein reduziertes Plaquewachstum auf (Newby, 2005; Scholtes et al., 2012). Auch bedingte eine erhöhte MMP12-Expression eine erhöhte Plaqueinstabilität, sodass erhöhte Spiegel von MMP12 in atherosklerotischen Plaques als Risikofaktor für nachfolgende kardiovaskuläre Ereignisse erkannt wurden (Newby, 2016). In Mäusen übersteigt die mRNA-Expression von MMP12 die aller anderen MMPs (Newby, 2015).

1.2 **Ldlr^{-/-} Mausmodell**

Es ist bisher kein Mausstamm bekannt, der spontan Atherosklerose entwickelt. Beim atherosklerotischen Mausmodell wird allgemein meist eine genetische Modifikation mit einer speziellen Diät kombiniert. In dieser Arbeit verwendeten wir C57Bl/6J-stämmige *Ldlr^{-/-}* Mäuse sowie in manchen Versuchsreihen die Kombination mit einer *high fat western diet* (HFD). Die verminderte zelluläre und hepatische Aufnahme von *low* und *intermediate density lipoprotein* durch das Fehlen des LDL-Rezeptors führt bei gesteigerter externer Zufuhr zu extremer Hypercholesterinämie und in der Folge zu komplexen atherosklerotischen Plaques. Neben weiteren Vorteilen der Maus als Tiermodell sind vor allem das schnelle Fortschreiten atherosklerotischer Läsionen sowie die hohe Ähnlichkeit zwischen humanen und murinen Konditionen als Vorzüge zu nennen (Mukhopadhyay, 2013).

1.3 Das LIM and SH3 Domänen Protein 1 (LASP1)

2012 wurde LASP1 von Stölting und Kollegen als Bestandteil und neuer Regulator von Podosomen in humanen Makrophagen beschrieben. Dort ist LASP1 als Strukturprotein zusammen mit Zyxin und Vinculin in der podosomalen Ringstruktur lokalisiert. Die Autoren zeigten, dass ein LASP1-Knockdown die Degradationskapazität der Zelle deutlich beeinträchtigte. Eine mögliche Einflussnahme von LASP1 auf die lokale Freisetzung von Matrixmetalloproteinasen an den Podosomen in Makrophagen wurde diskutiert. (Stolting et al., 2012).

LASP1 steht für *LIM and SH3 protein 1* (ursprünglich MLN50 genannt). Es handelt sich um ein Aktin-bindendes Phosphoprotein. LASP1 wird als Gerüstprotein ubiquitär in unterschiedlichen Konzentrationen exprimiert. Vermehrt kommt es in hämatopoetischen und gastrointestinalen Zellen vor. Innerhalb der Zelle ist LASP1 vor allem an dynamischen Aktinskelettkonstruktionen wie Fokalkontakten, Pseudopodien, Invadosomen (in Podosomen und Invadopodien) sowie *membran ruffles* lokalisiert. LASP1 ist Teil der Nebulin-Familie, zu der auch LIM-Nebulette (= LASP2) gehören. Erstmals wurde es 1995 in der cDNA Bibliothek von humanen Lymphknotenmetastasen bei Mamma-Karzinom gefunden (Orth, Cazes, Butt, & Grunewald, 2015).

1.3.1 Proteinstruktur von LASP1

LASP1 besteht aus 261 Aminosäuren. Im Wesentlichen setzt sich das Protein aus 4 Segmenten zusammen, und zwar aus einer Lim-Domäne am N-Terminus, zwei Nebulinwiederholungen NR1 und NR2, eine Linker-Region und einer C-terminale SH3 Domäne (Abb. 1-8) (Butt & Raman, 2018).

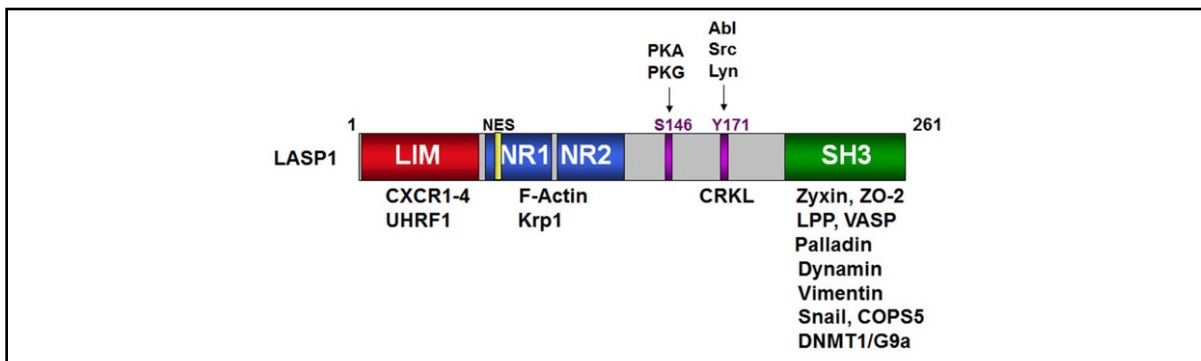


Abbildung 1-8: Domänenstruktur und Bindungspartner von LASP1. Schematische Darstellung von LASP1, bestehend aus der LIM-Domäne, zwei Nebulin-Repeats, einer Linker-Region mit zwei Phosphorylierungsstellen S146 und Y171 (jeweilige Kinasen sind eingezeichnet) sowie die SH3-Domäne. Liganden sind jeweils unter den Bindungsbereichen aufgeführt (Butt & Raman, 2018).

LIM Domäne

Die cysteinreiche LIM Domäne (lin-11, Isl-1, mec-3 Protein), welche aus zwei Zinkfinger-Domänen besteht, fungiert als Protein-Protein Interaktionsmotiv. Als direkte Liganden wurden die CXC-Rezeptoren 1- 3 beschrieben. Auch der CXC-Rezeptor 4

bindet die LIM Domäne unter der Voraussetzung der Phosphorylierung von LASP1 an S146. CXC-Rezeptor-vermittelte Chemotaxis wird durch Interaktion mit LASP1 positiv beeinflusst (Butt & Raman, 2018). *Ubiquitin-like containing PHD and RING finger domains 1* (UHRF1), ein epigenetisches Regulatorprotein, bindet ebenfalls an die LIM-Domäne. Durch zusätzliche Interaktion der SH3 Domäne mit der *DNA Methyltransferase 1* (DNMT1) und G9a kann es zur Beeinflussung von Genexpression, Chromatinstruktur sowie epigenetischen Veränderungen kommen. (Duvall-Noelle, Karwandyar, Richmond, & Raman, 2016)

Nebulinwiederholungen NR1 und NR2

Für die zwei Nebulinwiederholungen wurde eine phosphorylierungsabhängige Bindung von F-Aktin beschrieben.

Linker Region

Die Nebulin-ähnlichen *Repeats* und die SH3-Domäne sind durch eine Linker-Region getrennt. Hier sind zwei Phosphorylierungsstellen enthalten, die Funktion und Lokalisation von LASP1 regulierend beeinflussen. Die Phosphorylierungsstelle S146, welche von der Proteinkinase A (PKA), bzw PKG phosphoryliert und von der *Serin/Threonin-Protein-Phosphatase 2B* (PP2B) dephosphoryliert wird, kann bei Phosphorylierung die Affinität von LASP1 zu F-Aktin, Zyxin und *Lipoma-preferred partner* (LPP) reduzieren (Mihlan et al., 2013). Als Folge dessen ist eine subzelluläre Relokalisierung von LASP1 ins Zytosol möglich. Eine Involvierung von LASP1 in zytoskelettale Umbauprozesse sowie Zellmotilität scheint daher wahrscheinlich. Die Phosphorylierungsstelle Y171, welche von c-Src- und c-Abl-Tyrosinkinasen phosphoryliert wird, ist an der Regulation der Assoziation zu Fokalkontakten beteiligt (Butt & Raman, 2018). Es ist zu beachten, dass in murinen Zellen S146 nicht vorhanden ist. Stattdessen wurde Thr-156 als Phosphorylierungsstelle der PKA beschrieben. Funktionelle Unterschiede konnten jedoch nicht detektiert werden (Keicher et al., 2004).

SH3 Domäne

Das C-terminale Ende bildet eine SH3 Domäne (Src-homology 3). SH3-Domänen vermitteln allgemein intrazelluläre Protein-Protein-Interaktionen. Im Speziellen binden sie Proteine mit Prolin-reichen Domänen. Für LASP1 wurden in diesem Bereich zahlreiche Bindungspartner beschrieben: Zyxin (Organisation des Aktin-Zytoskeletts), ZO-2 (*Tight junction* Protein, Shuttle in den Kern), LPP (Shuttle Protein, Transkriptionsfaktor, Organisation des Aktin-Zytoskeletts), VASP (Aktin-Bindungspartner), Palladin (Lokalisation von LASP1 an Stressfasern), Dynamin (Beteiligung an Endozytose), Vimentin (Co-Lokalisation mit LASP1 in Filopodien), Snail1 (Transkriptionsfaktor), COPS5 (Teil des Signalosoms COP9), DNMT1/G9a (DANN-Methylierung) (Butt & Raman, 2018).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die einzigartige Domänenkomposition von LASP1 das funktionelle Eingreifen des Proteins in zahlreiche zelluläre Prozesse ermöglicht (Orth et al., 2015).

1.3.2 LASP1 in der Krebsforschung

In 20-30% aller Brustkrebspatienten ist die Genregion von LASP1 mutiert oder amplifiziert. In vielen weiteren Krebsarten (wie z. B. beim kolorektalem Karzinom, Medulloblastom, hepatozellulären Karzinom, Prostatakrebs, Lungenkrebs u.w.) wurde bereits eine Überexpression von LASP1 detektiert. Die Daten sprechen dafür, dass es sich bei der LASP1-Überexpression in Tumorzellen nicht nur um einen passageren Zustand handelt, sondern dass LASP1 die Tumorgenese und Progression vorantreibt. Speziell eine erhöhte nukleare Translokation von LASP1 wird mit einer reduzierten Lebenserwartung in Brustkrebs, HCC und ösophagealem Plattenepithel-Karzinom assoziiert (Orth et al., 2015).

Das Protein spielt außerdem eine Schlüsselrolle in der Metastasierung und Invasion von Tumorzellen. LASP1 ist in Invadopodien lokalisiert und dadurch maßgeblich an der Sekretion von MMPs und dem Abbau der Extrazellulärmatrix beteiligt. *Knockdown*, bzw. *Silencing* von LASP1 führte zu einer verminderten Zellmigration, Proliferation und Invasionsfähigkeit verschiedener Krebszelllinien (s. Brustkrebs, Prostata-, Magen-, Blasenkrebs, HCC, Pankreas-Karzinom, u.w.). Desweiteren konnte LASP1 durch seine Expression in Fokalkontakten, in Pseudopodien und Invadosomen, also Strukturen, welche eine Schlüsselrolle in Zellmotilität, -adhäsion und -kommunikation spielen, in verschiedenen Krebsarten als Mediator von Zytoskelettorganisation und Migration beschrieben werden (Orth et al., 2015).

1.4 LASP1^{-/-} Mausmodell

Murines LASP1 und das humane Äquivalent sind in ihrer Struktur nahezu identisch (97,3% Homologie). Trotz geringer Abweichung in der Gensequenz und unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen verhält sich menschliches und murines LASP1 funktionell analog. Transgenetisch veränderte LASP1^{-/-}-Mäuse stellen daher ein geeignetes Modell zur Durchführung funktioneller Studien bzgl. LASP1 *in vivo* dar (Keicher et al., 2004). Obwohl LASP1 in fetalem Gewebe vermehrt exprimiert wird und so eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung angenommen wird, zeigen LASP1^{-/-}-Mäuse eine normale Entwicklung und sind fruchtbar. Abnormales Verhalten sowie Unterschiede in der Gewichts- und Größenentwicklung wurden nicht beobachtet (Chew et al., 2008). Es scheint zu einer Kompensation des *Knockouts* zu kommen (Butt & Raman, 2018).

1.5 Zielsetzung

Auf der einen Seite stellen die Entwicklungen und Erkenntnisse der letzten Jahre ein beeindruckendes Repertoire an Möglichkeiten zur Behandlung manifester Atherosklerose und dessen Komplikationen zur Verfügung. Libby und Bornfeldt kritisieren allerdings zurecht, dass diese Technologie-intensiven Behandlungen von Folgekrankheiten im Spätstadium auf der anderen Seite ein Versagen der Prävention oder ein mangelndes tieferes Verständnis der Entstehungsprozesse widerspiegeln. Es besteht damit ein Bedarf nach mehr Grundlagenforschung, um Atherosklerose-bedingte Erkrankungen in einem früheren Stadium und auf grundlegenden Ebenen anzugehen (Libby & Bornfeldt, 2020).

LASP1 ist über die Lokalisation in protrusiven, kontraktilen Aktinfilamenten als wichtiger Regulator der Zellmigration, -adhäsion, -invasionsfähigkeit und -proliferation in Krebszellen beschrieben worden (Butt & Raman, 2018) - Prozesse, die auch in der Entstehung der Atherosklerose eine wichtige funktionelle Rolle spielen. Sowohl die Entstehung von Krebs als auch die Entwicklung von Atherosklerose stellen chronische, inflammatorische, multifaktoriell bedingte Erkrankungen dar. Entstehung und Progression können in beiden Fällen Jahre dauern. Erstaunlicherweise beruhen beide Pathologien auf homologen zugrundeliegenden molekularen Signalwegen. Die Progression beider Erkrankungen ist unter anderem auf unkontrollierte Zellproliferation, veränderte Synthese von Transkriptionsfaktoren und Adhäsionsrezeptoren sowie oxidativem Stress und auf eine gehinderte Kontrolle der Angiogenese zurückzuführen (Tapia-Vieyra, Delgado-Coello, & Mas-Oliva, 2017). Atherosklerose als pathologischer Prozess ist demnach der Entwicklung von Neoplasien sehr ähnlich. Aufgrund dessen wird mittlerweile, überspitzt formuliert, Atherosklerose als eine Art Krebs der Arterien diskutiert (Jian-Jun, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wird hier erstmalig LASP1 überblickend im Ablauf atherosklerotischer Plaquebildung untersucht, um relevante Einflussfaktoren des Proteins zu erörtern und einen Ausblick auf zukünftig relevante Forschungsgebiete zu geben. Basierend auf der Arbeit von Stölting und Kollegen (Stolting et al., 2012) wird der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Rolle von LASP1 in Monozyten/ Makrophagen bzgl. atherosklerotischen Veränderungen liegen.

1.5.1 Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe

In der Arbeitsgruppe wurde im Vorfeld ein *in vivo*-Versuch mit Ldlr^{-/-} und Ldlr.LASP1^{-/-} Mäusen unter HFD-Bedingungen durchgeführt. Nach einer 16-wöchigen *high fat diet* (HFD) zeigten LASP1^{-/-}-Mäuse im thorakalen Bereich der Aorta sowie in der Gesamt-Aorta signifikant mehr atherosklerotische Plaques als die Kontrollgruppe. Das Gesamtcholesterin im Serum der Ldlr.LASP1^{-/-} Mäuse war im Vergleich zu Ldlr^{-/-}-Tieren erniedrigt. Eine Einflussnahme von LASP1 auf die Atherosklerose ist damit anzunehmen.

Thorsten Günder untersuchte in seiner Arbeit mittels *in vitro*-Versuchen bereits verschiedene Aspekte der Einflussnahme von LASP1 auf Prozesse der Atherogenese, u.a. das Adhäsionsverhalten unter statischen Bedingungen und das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von murinen Makrophagen sowie im Detail die Expression und das Degradationsverhalten der Matrixmetalloproteasen nach LASP1-KO in murinen Makrophagen. Die Differenzierung zu M1-, bzw. M2-Makrophagen zeigte sich durch den LASP1-KO nicht beeinflusst und in Wildtyp-Zellen war die LASP1-Expression durch die Differenzierung unbeeinträchtigt (unveröffentlichte Daten).

1.5.2 Fragestellungen der Arbeit

1. Analyse des Einflusses des LASP1-KOs auf das Verhalten von Monozyten/Makrophagen *in vitro* bzgl. endothelialer Adhäsion, chemotaktischer Migration hin zu CCL2, TNF α -Sekretion durch M1-Makrophagen, Schaumzellformation und MMP12-vermittelte Casein-Degradation durch murine Makrophagen.
2. Untersuchungen zur Einflussnahme von LASP1 auf die Atherogenese *in vivo*:
 - Analyse der LASP1-Expression in Monozyten und in Gewebe *in vivo* unter Chow-Diät im Vergleich zu Hochfettdiät.
 - Charakterisierung von Parametern zu Monozyten, T-Zellen, B-Zellen in Blut und Milz von Ldlr^{-/-}-Mäusen zu Ldlr^{-/-} und LASP1^{-/-} Doppel-KO-Mäusen unter Chow-Diät sowie im Vergleich zu bereits vorhandenen Daten aus Hochfettdiät Versuchen.
3. Einordnung der Rolle von LASP1 in murinen, monozytären Zellen bzgl. Atherosklerose.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Mauslinien

Folgende Mauslinien wurden aus dem Jackson Laboratory (Maine, USA) bezogen:

- C57BL/6J = Wildtyp (im Weiteren B6 genannt),
- B6.-Lasp1tm1Chew/J (im Weiteren LASP1^{-/-}),
- B6.129S7-Ldlr^{tm1Her}/J (im Weiteren Ldlr^{-/-} genannt),
- B6.129S7-Ldlr^{tm1Her}/J-Lasp1tm1Chew/J (im Weiteren Ldlr.LASP1^{-/-}).

Die Haltung und Züchtung der Mäuse erfolgte im ZEMM, Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin (Zinklesweg 10, 97078 Würzburg), entsprechend der Haltungsvorschriften. Für *in vitro*-Versuche wurden Mäuse im Alter von 8-12 Wochen eingesetzt und wiesen in Kontroll- und LASP1-KO Gruppe jeweils das gleiche Geschlecht auf. Das Diätfutter für Hochfett-diät-Versuche (*high-fat western diet*) wurde von *Altromin* bezogen und enthielt 15 % Milchfette und 1,25 % Cholesterol. Alle durchgeführten Tierexperimente wurden von den lokalen Behörden genehmigt (Az.:55.2-2532-2-298).

2.1.2 Zelllinien

2.1.2.1 *b.End5*

b.End5 Zellen (ECACC General Cell Collection, Katalognr.: 96091930) wurden freundlicherweise von der AG Nieswandt aus dem RVZ Würzburg bereitgestellt. Es handelt sich um eine Zelllinie aus Endothelzellen muriner Hirngefäße von BALB/c Mäusen.

2.1.2.2 *L929*

L929-Zellen (ATCC CCL-1) bezeichnen eine adhärenente, murine Fibroblasten-Zelllinie, welche aus dem Laborbestand genutzt werden konnte.

2.1.3 Reagenzien für die Zellkultur

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate	31966047	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DPBS PBS (1X) ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	14190250	
FCS	F7524	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
HBSS, no calcium, no magnesium, no phenol red	14175095	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
β-Mercaptoethanol (50 mM)	31350010	

Penicillin – Streptomycin	15140122	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Poly-L-lysine solution	P4832	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RPMI 1640	11875093	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Trypsin-EDTA (0.05 %), phenol red	25300062	
Zell-Ablöse-Reagenz StemPro Accutase	A1110501	

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Primärantikörper

Antikörper	Typ	Katalognummer	Hersteller
Aktin	Polykonal; Kaninchen; WB 1:1000	sc-1616-r	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschl.
ADAM 17	Monoklonal; Maus; WB 1:1000	sc-390859	
GAPDH	Polykonal; Ziege; WB 1:1000	sc-20357	
Lamin A/C	Polykonal; Ziege; WB 1:200	sc-6215	
LASP1 IG1343	Polykonal; Kaninchen; WB 1:5000		aus Laborbestand
α -LASP1-Y171 (pan) IG1180	Monoklonal; Kaninchen; IH 1:100		
Mac2	Monoklonal, Maus IH 1:800	CL8942AP	Cedarlane, Burlington, Ontario
MMP12	Monoklonal, Kaninchen; WB 1:1000	ab52897	Abcam plc, Cambridge, UK
M4 Anti-VASP	Polykonal; Kaninchen; WB 1:1000		aus Laborbestand
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	Polykonal; Kaninchen; WB 1:1000	9101	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande
TNF α	Monoklonal; Kaninchen; WB 1:1000	11948	
ZO-2	Polyclonal; Kaninchen; WB 1:1000	2847	

2.1.4.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Katalognummer	Hersteller
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate	WB 1:5000	1706515	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Donkey Anti-Goat IgG (H+L)-HRP Conjugate	WB 1:5000	SC 2020	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschl.
Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate	WB 1:5000	1706516	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 555	IH 1:500	A21429	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Goat anti-Rat IgG (H+L), Alexa Fluor 488	IH 1:500	A11006	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ziege IgG anti-Maus IgG (Fc)-Cy2	IF 1:500	115-225-071	DIANOVA GmbH Hamburg, Deutschland
Oregon Green® 488 Phalloidin	IF 1:30	O7466	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.4.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Im Folgenden steht "BD" für "BD Biosciences San Jose, CA" und "Thermo Fisher" für "Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA".

Antikörper	Farbstoff	Verdünnung	Katalognummer	Hersteller
CD3e	V450	1:300	560801	BD
CD4	V500	1:300	69-0042-82	Thermo Fisher
CD8a	PE-Cy7	1:300	25-0081-81	Thermo Fisher
CD11b	V500	1:300	562127	BD
	Percp-Cy5.5	1:300	45-0112-82	Thermo Fisher
CD44	Percp-Cy5	1:300	45-0441-82	Thermo Fisher
CD45	AP-Cy7	1:300	557659	BD
	FITC	1:300	11-0452-85	Thermo Fisher
CD62L	FITC	1:300	553150	BD
F4/80	APC	1:300	17-4801-82	Thermo Fisher
CD115	PE	1:300	12-1152-83	Thermo Fisher
	APC	1:300	17-1152-80	
IFN γ	APC	1:100	554413	BD
Ly6C	APC	1:500	17-5932-80	Thermo Fisher

Ly6G	V450	1:500	560603	BD
LASP1	PE	1:100	selbst konjugiert	
TCR β	Percp-Cy5	1:300	45-5961-82	Thermo Fisher
TCR $\gamma\delta$	FITC	1:300	11-5711-82	Thermo Fisher

2.1.5 Primer

Die Primer konnten aus dem Bestand des Labors genutzt werden. Hergestellt wurden die Primer von der Firma Microsynth AG, Balgach, Schweiz.

Gen	Primer	Sequenz
ABCA1	Forward Reverse	5'- AGTGATAATCAAAGTCAAAGGGACAC -3' 5'- AGCAACTTGGCACTAGTAACTCTG -3'
ABCG1	Forward Reverse	5'- TTCATCGTCCTGGGCATCTT -3' 5'- CGGXTTTGTATCTGAGGACGAA -3'
ADAM17	Forward Reverse	5'- AGGGATCTACAGTCTGCGACA -3' 5'- CCACCACCACGACTCTCAAG -3'
CD36	Forward Reverse	5'- GAACCACTGCTTTCAAAAAGTGG-3' 5'- TGCTGTTCTTTGCCACGTCA-3'
HPRT	Forward Reverse	5'- TCCTCCTCAGACCGCTTTT -3' 5'- CCTGGTTCATCATCGCTAATC -3'
LASP1	Forward Reverse	5'- TAAGGGCAAAGGTTTCAGCGT -3' 5'- CGGCTCTTCTCAAACCTCCTCA -3'
Rplp0	Forward Reverse	5'- GAAACTGCTGCCTCACATCCG -3' 5'- CTGGCACAGTGACCTCACACG -3'
TNF α	Forward Reverse	5'- CTGTAGCCCACGTCGTAGC -3' 5'- GGTTGTCTTTGAGATCCATGC -3'

2.1.6 Reaktionskits

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/ Permeabilization Solution Kit	5547554714	BD Biosciences San Jose, CA
Duo Set Ancillary Reagent Kit 2	DY008	R&D Systems, Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschl.
First strand cDNA Synthesis Kit	K1612	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
FIX & PERM™ Cell Permeabilization Kit	GAS004	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Violet Stain kit (PB) 1:100	L34963	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

LS columns	130-042-401	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MidiMACS Starting Kit (LS)	130-042-301	
Monocyte Isolation Kit (BM), mouse	130-100-629	
Mouse TNF A DuoSet ELISA	DY410-05	R&D Systems, Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	78833	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PE / R-Phycoerythrin Conjugation Kit	ab102918	Abcam plc, Cambridge, UK
peqGOLD Total RNA Kit	732-2867	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	23225	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
SYBR® Select Master Mix	K0221	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.7 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Katalognummer	Hersteller
Ammoniumchlorid	A9434	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ammoniumpersulfat	A6761	
BFA	B6542-5MG	
Brilliant Blau G	B0770	
Bromphenolblau	B5525	
BSA	A7030-509	
Calcein violet, AM 405 nm excitation	C34858	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Calyculin A	19-139	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Casein Protein Gel	64052	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Sp-5,6-DCI-cBIMPS	120912-54-1	BioLog life science institute, Bremen, Deutschland
eBioscience™ CFSE	65-0850-84	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
CCL2/ MCP-1 Maus	Chm 313	ProSpec-Tany TechnoGene Ltd. International, Ness-Ziona, Israel
CXCL12/ SDF-1 Maus	Chm 323	
DABCO®	D27802	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dako Antibody Diluent with background reduction	S3022	Agilent, Santa Clara, CA, USA

DAPI	D9564	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Developing Buffer (10X)	LC2671	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DMSO	D8418	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EDTA	A3234	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	33209	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol	32205	Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Deutschl.
Forskolin	66575	BIOZOL Diagnostica Vertrieb, Eching, Deutschland
Glycerin	3783	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glyzin	G8898	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Goat-Serum	G9023	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
HBSS	1402505	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
HEPES	15630080	
H ₂ O ₂	1.07209	Merck KGaA, Darmstadt Deutschl.
Inomycin	19657	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isofluran	1214 - NASA Kombi	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland
IL-1 β (rekombinant, murin)	211-11B	PeproTech Germany, Hamburg, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat	237205	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kaninchen Serum	R9133	
Kristallviolett	C0775	
Leupeptin	L5793	
Lipopolysaccharides	L4391	
Lipoprotein low density oxidized (oxLDL), human plasma, 99 %	BT-910	Alfa Aesar, Hycultec GmbH, Beutelsbach, Deutschland
Lipoprotein low density oxidized, Dil conjugate	J64164	
Luminol Natriumsalz	A4685	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Luminescent Zellviabilitätsassays	CellTiter-Glo® G7570	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Maus Serum	M5905	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methanol	322413	Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Deutschl.
β - Mercaptoethanol	M6250	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Milchpulver	A0830	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mowiol® 4-88	0713	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D

Natriumchlorid	31434	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumcitrat	HN 13.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschl.
Natriumdesoxycholat	A1531	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid Pellets	S5881	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natrium- Orthovanadat	S6508	
NileRed	19123-10MG	
p-Cumarinsäure	C9008	
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	26616	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Paraformalddehyd	P6148	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Pefabloc® SC	76307	
Pepstatin A	P5318	
PFA	P6148	
Phosphate Buffered Saline Tablets	P-14417	
PMA	P8139	
Ponceau S	A2935	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Protein Block, Serum-free	X090930-2	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Renaturing Buffer (10X)	LC2670	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
SeeBlue® Plus2 Prestained Protein Standard	LC5925	
SDS	CN30.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS Running Buffer	LC2675	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
SDS Sample Buffer (2X)	LC2676	
Trasylol 0,5	34579.00.00	Bayer AG, Leverkusen, Deutschl.
TEMED	T9281	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tergitol® NP-40	NP40	
TNF α (recombinant, murin)	315-01A	PeptoTech Germany, Hamburg, Deutschland
TRIS/HCL	A1379	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Triton™ X-100	T9284	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypan Blue Solution 0,4 %	T8154	
Trypsin	T3924	
TWEEN® 20	A1389	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

VECTASHIELD™ Mounting Medium with DAPI	H-1200	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Xylol	16446	Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Deutschl.
Zitronensäure (Monohydrat)	33114	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Material	Modell	Hersteller
Amicon Ultra-15, PLBC Ultracel-PL Membran, 3 kDa	UFC900308	Merck KGaA, Darmstadt Deutschl.
Blocking Papier		A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschl.
Celophan Papier		Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Deckglas rund eckig		A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschl.
Desinfektionsmittel	Terralin® liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschl.
EDTA – Röhrchen		SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Deutschl.
Einmalspritze	5 ml, 20 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
ELISA Mikroplatte COSTAR	96-well weiß, flat bottom, polystyrene, not treated, 3912	Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA
FACS-Röhrchen	5 ml round bottom, polystyrene tube, 352008	Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA
Insert	24-Well, 5 µm 89. 3932.500	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Deutschl.
Insulinspritze	Omnican 40	Braun GmbH, Kronberg i. T., Deutschl.
Kryoröhrchen	2 ml	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
MicroAmp Optical Adhesive Films	4311971	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Microcon-10 kDa centrifugal Filter Unit Ultracel 10-Membrane	MRCPRT010	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschl.
Nitrilhandschuhe	Peha-soft nitril; 942 206	Medline Industries, Kleve, Deutschl.
Nitrocellulose Membran	30 cm x 3 m BA85	GE Healthcare Life Sc., Fairfield, CT, USA
Objektträger	SuperFrost®	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
PAP Pen Liquid Blocker	6505	Newcomer Supply, Middleton, Wisconsin
Perfusions Set Yellow-and-green: Länge 50 cm, ID 1,6 mm; 10 ml Reservoir	10964	ibidi GmbH, Planegg / Martinsried, Deutschland

Pipettenspitze	Biosphere® Filter Tip	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
	Combitips advanced®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschl.
	Gel-loading Tip SARSTEDT AG & Co	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Pre-Separation Filter	30 µm; 130-041-407	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
qPCR Reaction Plate	PCR 384-Well	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Scepter Sensor-Spitze	60 µm; 33280;	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
µ-Slide I Luer	0,4 mm 80176	ibidi GmbH, Planegg / Martinsried, Deutschland
Verschlussfolie	PARAFILM®	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschl.
Zellkulturplatte/-flasche	6-Well/ 12-Well/ 24-well/ 48-well/ 96-well/ T25/ T75/ T175	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	5316400	
Zellsieb Easy Cell strainer	70 µm steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschl.
Zentrifugenröhrchen		
Mikro-reaktionsgefäß	0,5 ml/ 1,5 ml/ 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschl.
Falcon®	15 ml/ 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

2.1.9 Geräte und Instrumente

Gerät/Instrument	Modell	Hersteller
Bakterienschüttler	Certomet R	Braun GmbH, Kronberg i. T., Deutschl.
Biosafety Werkbank (Kl. 2)	LabGard® ES AIR NU-543E	NuAire, Plymouth, USA
Brutschrank	Heracell™ VIOS 160i CO ₂ /O ₂ -Inkubatoren	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
	TECO 20E, CO ₂ Klein-Inkubator	Selutec, GmbH, Hechingen, Deutschland
Durchflusszytometrie	BD FACSCANTO II	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
ELISA microplate reader	Infinite® 200 PRO series	Tecan Trading AG, Schweiz
	ThermoMax	Molecular Devices, LLC., San Jose, CA, USA
Elektrophorese-kammer	PROTEAN II XL Cell/ Sub-Cell® GT Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
	PerfectBlue Tank Web S	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland

Feinwaage	ABS 120-4N	KERN & SOHN GmbH, Balingen, Deutschland
Geltrockner	583	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
IBIDI systems	10902	ibidi GmbH, Planegg / Martinsried, Deutschl.
Imager	Amersham TM Imager 600	GE Healthcare Life Sc., Fairfield, CT, USA
Kühl-/Gefrierschrank		
Kühlschrank	4 °C – 8 °C	Kirch GmbH, Offenberg, Deutschl.
Gefrierschrank	- 20 °C	Liebherr MediLine, Newport, UK
	- 80 °C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Laborschüttler	Heidolph Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschl.
	KS 10	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Magnetrührer	RCT basic	IKA-Werke, Staufen i. B., Deutschl.
Mikroinjektionsspritze	Hamilton 25 µl Syringe	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Mikroskope		
Fluoreszenzmikroskop	Leica DM ₄₀₀₀ B	Leica Biosystems
	BZ 9000	Keyence, Osaka, Japan
Lichtmikroskop	VisiScope® IT404	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschl.
Mikrowelle	NN-3256	Panasonic Marketing Europe GmbH, Hamburg, Deutschl.
NanoDrop TM 2000C	ND2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PCR Thermal Cyclers	peqSTAR 96X	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschl.
pH-Meter	PHM 92 LAB	Radiometer Analytical, Lyon, Frankreich
Pipetten		
Einkanalpipette	0,5-10 µl/ 2-20 µl/ 20-200 µl/ 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschl.
Multipette® plus	200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschl.
Pasteurpipette	5 ml	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschl.
Serologische Pipette	5 ml/ 10 ml/ 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschl.
Pipette Controller	accu-jet® pro	BrandTech Scientific, Essex, CT, USA
qPCR System	QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Scepter TM 2.0 (automat. Zellzähler)	PHCC00000	Merck Millipore, Billerica, MA, USA

Scherbeneismaschine	AF103	Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien
Spannungsgerät	PowerPac™ HC	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Thermoschüttler	TS 100	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschl.
Transferkammer	Trans-Blot® Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Vakuumpumpe	VACUUBRAND Membranpumpe	Vaccubrand, Wertheim, Deutschl.
Vortex-Genie	K-550-GE	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Wasserbad	3043	Köttermann GmbH & Co KG Uetze/Hänigsen, Deutschland
Zentrifugen		
Zellkulturzentrifuge	Universal 320	HettichLab, Tuttlingen, Deutschl.
Tischzentrifuge	Mikro 120	HettichLab, Tuttlingen, Deutschl.
Kühlzentrifuge	5810	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschl.

2.1.10 Software und Websites

BD FACSDIVA™ Software	Version 8.0.1
Diskus image analysis (V4.8.1.1638)	Hilgers Technisches Büro
FlowJo	Version 10.0 (Treestar Inc., USA)
GraphPadPrism	Version 8
ImageJ Software	Version 1.48
Microsoft Word	Version 2016
Primer Express® Software	Version 3.0.1
Primer-BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
Pump Control Software	Version V.1.4.4 für Windows XP

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter Verwendung steriler Reagenzien und Arbeitsmaterialien in einer Sterilbank (LabGard® ES AIR NU-543E) durchgeführt. FCS wurde durch Erhitzen auf 56 °C für 45 min in einem Wasserbad vor Einsatz in der Zellkultur hitze-inaktiviert, um durch verminderte Titer hitzelabiler Komplementproteine die hämolytische Aktivität des Serums zu reduzieren. Zellen wurden in einem Inkubator (Heracell™ VIOS 160i) bei 37 °C einer CO₂ Konzentration von 5 % sowie bei 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.2.1.1 *Kultivierung und Aufbewahrung der stabilen Zelllinie b.End5*

b.End5 – Zellmedium

DMEM+ Glutamax	500 ml
FCS (10 %)	50 ml
Penicillin/Streptomycin (1 %)	5 ml

Arbeitslösung – 500 ml DMEM + Glutamax mit 50 ml FCS und 5 ml Penicillin/Streptomycin versetzen und bei 4 °C lagern.

Als wichtiger Bestandteil des Adhäsions-Flow-Assay wurde die murine, adhärente Endothelzelllinie „Brain Endothelial Cells 5“ (b.End5) verwendet. Es wurden 4 Mio. Zellen in 15 ml des angegebenen Zellmediums in T75-Flaschen ausgesät. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 1-2 Tage. Zur Subkultivierung wurden die Zellen nach 3-4 Tagen mit 10 ml PBS serumfrei gewaschen und im Anschluss mit 4 ml Trypsin/EDTA von der Kulturflasche abgelöst. Nach der Zentrifugation bei 300 xg bei RT für 5 min wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:3 in frischem Medium verdünnt und neu ausgesät. Es wurden für alle Experimente nur die ersten fünf Passagen b.End5 Zellen verwendet.

Zur Einlagerung der Zelllinie wurden 6 Mio. Zellen wie oben beschrieben mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA abgelöst und zentrifugiert. Die Resuspension erfolgte in 1,5 ml Medium zuzüglich 10 % DMSO. Nach Überführung in ein Kryoröhrchen wurde dieses zur dauerhaften Aufbewahrung in einen Stickstofftank verbracht.

Zu Reaktivierung wurden die Zellen aus dem Stickstofftank entnommen, in einem Wasserbad bei 37 °C zügig aufgetaut und im Anschluss in 10 ml Kulturmedium aufgenommen. Nach einer 5- minütigen Zentrifugation bei 300 xg wurde das Pellet in b.End5-Zellmedium resuspendiert und in T75 Kulturflaschen ausgesät. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 24 h.

2.2.1.2 Isolierung von monozytären Vorläuferzellen/ Monozyten aus murinem Knochenmark

Knochenmarkextraktion

Dendritic Cell (DC)-Medium

RPMI (1640) Medium	500 ml
FCS (10 %)	50 ml
Penicillin/Streptomycin (1 %)	5 ml
50mM β -Mercaptoethanol (0,1 %)	500 μ l

Arbeitslösung – 500 ml RPMI mit 50 ml FCS, 5 ml Penicillin/Streptomycin und 500 μ l β -Mercaptoethanol mischen und bei 4 °C, lagern.

Die Isolierung der Knochenmarkszellsuspension erfolgte nach dem Protokoll von Weischenfeldt und Porse (Weischenfeldt & Porse, 2008). Nach Betäubung der Maus mittels Isofluran und Tötung per Genickbruch wurden Femur und Tibiae präpariert und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis in DC-Medium gelagert. Die Extraktion des Knochenmarks erfolgte im sterilen Bereich. Nach Desinfektion mittels 70 prozentigem Ethanol wurden die Knochen auf Höhe der Metaphysen eröffnet. Mit Hilfe einer 23-gauge Insulinspritze wurden pro Knochen 2-3 ml DC-Medium genutzt, um das Knochenmark aus dem Knochen durch einen 70 μ m Filter in ein 50 ml Greiner-Röhrchen zu spülen. Die Zellzahl wurde bestimmt (je Maus konnten ca. 80-100 Mio. Makrophagen gewonnen werden). Aus der gewonnen Zellsuspension wurden entweder Makrophagen (bone marrow-derived macrophages = BMDMs) kultiviert (s. 2.2.1.4) oder Monozyten für *in vitro*-Versuche isoliert.

Monozytenisolation

MACS-Buffer

PBS	500 ml
EDTA (1M)	2 ml
25 % BSA in PBS (0,5 %)	10 ml

Arbeitslösung – 2,5 g BSA in 10 ml PBS lösen, steril durch einen 22 μ m Filter filtrieren und anschließend zu 500 ml PBS mit 2 ml EDTA geben. Bei 4 °C, lagern.

Die Isolation der Monozyten erfolgte mit Hilfe des *Monocyte Isolation Kit* (BM) von Miltenyi. Hierbei wurden alle Zellarten, die nicht Monozyten darstellten und im Knochenmark vorkommen, an Antikörper gebunden. Diese Antikörper waren wiederum an magnetische *Beads* konjugiert, sodass im letzten Schritt über eine magnetische Säule die Monozyten ohne Anhaftung durch die Säule in ein Auffanggefäß flossen, während die anderen Bestandteile der Zellsuspension in der Säule verblieben. Dies bot den großen Vorteil, dass die Monozyten direkt im Anschluss für weitere Versuche genutzt werden konnten und keine *Bias* durch anhaftende magnetische *Beads* bestand. Alle Schritte von der Extraktion des Knochenmarks bis hin zur Isolation der Monozyten wurden auf Eis durchgeführt und auch die Reagenzien

gekühlt verwendet, um unspezifische Bindungen zu minimieren und, besonders wichtig, eine Internalisierung des Rezeptors CD115 zu verhindern.

Zur Herstellung einer homogenen Zellsuspension wurde das isolierte Knochenmark durch einen 30 µm *Pre-Separation* Nylon-Filter gegeben. Das weitere Verfahren erfolgt nach der Anleitung des Herstellers. Die Menge der Reagenzien des *Miltenyi Monocyte Isolation Kit* wurden der Zellzahl entsprechend eingesetzt. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei 300 xg zentrifugiert und mit 175 µl MACS-Puffer je 5×10^7 Gesamtzellzahl resuspendiert. Es wurden 25 µl *Blocking*-Reagenz hinzugefügt, um offene Bindungen zu sättigen, sowie 50 µl *Monocyte Biotin-Antibody Cocktail* je 5×10^7 Zellen. Die Inkubationszeit für den Antikörpermix betrug 5 min. Nach einem Waschschrift mit 10 ml MACS-Puffer und einer 10-minütigen Zentrifugation bei 300 xg wurden die Zellen in 400 µl MACS-Puffer je 5×10^7 Zellen aufgenommen. Es wurden 100 µl Anti-Biotin *MicroBeads* je 5×10^7 Zellen hinzugefügt. Dadurch wurden die antikörpermarkierten Zellen an die magnetischen *Beads* gebunden. Im Anschluss an die Inkubationszeit von 10 min wurde mit der magnetischen Separation begonnen. Hierfür wurden LS-Säulen verwendet. Es war darauf zu achten, dass das Reservoir der Säule stets leer war, bevor neue Flüssigkeit appliziert wurde und dass keine Luftblasen entstanden. Der Durchfluss enthielt die unmarkierten Monozyten. Es folgten 3 Waschschriffe mit jeweils 3 ml MACS-Puffer. Das Zählen erfolgte in einer 1:1 Verdünnung in der Neubauerkammer. Die Reinheit der Monozytensuspension wurde per FACS-Messung bestimmt. Unter der Voraussetzung einer Reinheit von mindestens 80%, wurden die Monozyten direkt im Anschluss für *in vitro*-Versuche verwendet.

2.2.1.3 Differenzierung, Primärkultur und Polarisierung bzw. Stimulierung von BMDMs

Herstellung des M-CSF-haltigen L929-Zellüberstands zur Kultivierung und Differenzierung von BMDMs

L929-Zellmedium

RPMI 1640	500 ml
FCS (10 %)	50 ml
Penicillin/Streptomycin (1 %)	5 ml
25 mM HEPES	12,5 ml

Arbeitslösung – 500 ml RPMI mit 50 ml FCS und 5ml Penicillin/ Streptomycin sowie 12,5 ml HEPES versetzen und bei 4 °C, lagern.

M-CSF ist ein linienspezifischer Wachstumsfaktor, der für die Proliferation und Differenzierung von Myeloid-Vorläuferzellen in Zellen der Makrophagen/Monozyten-Linie verantwortlich ist (Stremmel et al., 2019). Für die *in vitro*-Differenzierung von Knochenmarksmonozyten/ Makrophagen-Vorläufern zu einer homogenen Population

reifer Makrophagen (BMDMs) wurde M-CSF, welches von L929-Zellen in den Überstand sekretiert wurde, verwendet.

Zur Gewinnung des M-CSF-haltigen Zellüberstandes wurde L929-Zellen in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut, in vorgewärmtes L929-Medium aufgenommen und bei 400 xg für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in 5 ml L929-Medium resuspendiert und die Zellen in einer T25-Flasche ausgesät. Aufgrund der hohen Teilungsrates der Zelllinie erfolgte das erste Passagieren bei Konfluenz nach ca. 2 Tagen im Verhältnis 1:3 in T175-Flaschen. Diese wurden wiederum nach ca. 2 Tagen zu fünf T175-Flaschen gesplittet. Zum Ablösen der Zellen wurde 0,05 % Trypsin-EDTA verwendet. Das Passagieren der fünf T175 Flaschen ergab 36 weitere T175 Flaschen. 55 ml L929-Medium wurden pro Flasche hinzugegeben. Nun wurden die Zellen für 10 Tage bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. An Tag 10 konnte je T175 50 ml Medium, welches nun das sekretierte M-CSF enthielt, abgenommen werden. Nach dem Zentrifugieren für 5 min bei 350 xg wurde der Überstand durch einen 22 µm Filter steril filtriert. Aliquotes à 45 ml wurden bei -80 °C eingelagert. Der aufgetaute L929-Zellüberstand konnte für maximal 7 Tage bei 4 °C aufbewahrt werden.

Kultivierung der Makrophagen

Makrophagen-Medium

DC-Medium	42,5 ml
L929-Zellüberstand (15%)	7,5 ml

Arbeitslösung – 42,5 ml mit 7,5 ml steril gefiltertem L929-Zellüberstand vereinen und bei 4 °C im Kühlschrank lagern.

Es wurde nach dem Protokoll von Weischenfeldt und Porse (Weischenfeldt & Porse, 2008) vorgegangen. Die Zellsuspension aus dem Knochenmark wurde für 5 min bei 400 xg bei RT zentrifugiert und im Anschluss in 1 ml Makrophagen-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in der Konzentration 1 Mio. Zellen/ml in Platten ausgesät. Das Medium wurde an Tag 3 und 5 gewechselt. Nach 7 Tagen war die Differenzierung abgeschlossen und die Zellschicht konfluent. Die Charakterisierung und Qualitätskontrolle der so entstandenen Zellpopulation war durch Thorsten Günder in seiner Arbeit durchgeführt worden: Eine homogene Makrophagenpopulation wurde bestätigt (Daten nicht veröffentlicht). Die unten beschriebenen *in vitro*-Versuche konnten in der Folge durchgeführt werden.

Polarisierung von Makrophagen

Zur Provozierung des M1-Phänotyps wurden die BMDMs nach vollständiger Differenzierung an Tag 6 zunächst mit PBS gewaschen und anschließend in nährstofffreiem Medium (RPMI 1640 + 1 % Penicillin/Streptomycin) für 6 h gehungert. Die Stimulation und damit die Polarisierung der Makrophagen erfolgte für 24 h mit 100 ng/ml murinem LPS.

Stimulierung von Makrophagen mit oxLDL

Ausdifferenzierte BMDMs wurden an Tag 6 mit PBS gewaschen und in nährstofffreiem Medium (RPMI 1640 + 1 % Penicillin/Streptomycin + 2 % BSA) für 5 h, bzw. 24 h gehungert und anschließend mit 50 µg/ml humanem oxLDL für 24 h stimuliert.

2.2.2 Zellanalytische Methoden

2.2.2.1 Immunfluoreszenz

Mowiol

Glycerin	6 g
Mowiol	2,4 g
Dest. H ₂ O	6 ml
0,2 M Tris (pH 8,5)	12 ml

Arbeitslösung – Glycerin und Mowiol unter Rühren vermischen, 6 ml destilliertes Wasser hinzugeben und über Nacht ruhen lassen. Nach der Zugabe des Tris/HCL erfolgt die Erhitzung unter Rühren auf 50 °C. Sind alle Feststoffe gelöst, folgt zum Säubern der Lösung eine Zentrifugation bei 500 xg für 15 min. Die Lagerung erfolgte in Aliquots bei -20 °C.

4% PFA

Paraformaldehyd	4 g
PBS	100 ml

Arbeitslösung – Unter dem Abzug wurde PFA in auf 70 °C erhitztes PBS gelöst. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C eingelagert.

Goat Serum in 0,1 % Triton

Goat Serum (10%)	1 ml
0,1 % Triton X	20 ml

Arbeitslösung – Die angegebenen Substanzen mischen und bei - 20 °C lagern.

Die Knochenmarkszellsuspension wurden nach Protokoll von B6 und LASP1^{-/-} Mäusen entnommen (s. 2.2.1.2). Die Kultivierung von BMDMs erfolgte auf kleinen Deckgläschen in 12-Well-Platten über 7 Tage hinweg mit Makrophagen-Medium (s. 2.2.1.3).

Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen nach dem Waschen mit 1 ml warmen PBS, mit 1 ml PFA je Well fixiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgten weitere 5 Waschgänge mit je 1 ml PBS. Die Zellen wurde mit 1 ml einer 50 mM NH₄Cl Lösung überschichtet (10 min bei RT) und im Anschluss mit 1 ml je Well 10 %iger Triton/PBS Lösung permeabilisiert (10 min bei RT). Nach dem Blocken mit 50 µl 5 % Goat Serum/PBS (30 min bei RT) wurde das Aktingerüst mittels Oregon Green® 488 Phalloidin (1:30 in Goat Serum verdünnt) und LASP1 mittels dp-LASP-171 (pan1180)-

PE gelabelten Antikörper (1:200 in *Goat Serum* verdünnt) (s. 2.2.2.2.1) gefärbt. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei RT im Dunkeln. Die Deckgläschen wurden 3-mal mit je 1 ml PBS gewaschen. Zur Kerndarstellung wurden die Deckgläschen für 1 min in destilliertes Wasser, welches 1:1000 mit DAPI versetzt war, getaucht. Die Fixierung folgte mit 10 µl Mowiol auf einem Objektträger. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei 4 °C. Die omnifokale Mikroskopie erfolgte an einem Zeiss BZ 9000 Fluoreszenzmikroskop der Hepatologie des Universitätsklinikums Würzburg.

2.2.2.2 Durchflusszytometrie

FACS-Staining-Puffer Stocklösung

PBS	5 ml
Maus Serum (2 %)	100 µl
Kaninchen Serum (2 %)	100 µl
30 % BSA in PBS	333 µl

Arbeitslösung – 5 ml PBS mit jeweils 100 µl Maus-Serum und Kaninchen-Serum mischen. Zuletzt 333 µl einer 30 %igen BSA-Lösung (3 g BSA in 10 ml PBS lösen und steril filtrieren mit 79 µm Filter) in PBS beimengen. Die Lösung als 1,5 ml Aliquotes bei -20 °C einlagern.

Erythrozyten-Lyse- Puffer (1X, 1l)

NH ₄ Cl (155 mM)	0,5 g
KHCO ₃ (10 mM)	1 g
EDTA (0,1 mM)	2,9 g

Arbeitslösung – Entsprechende Mengen abwiegen und in 1 l VE-Wasser lösen. Bei 4 °C lagern.

2.2.2.2.1 Antikörper-Labeling

Der LASP1-Antikörper dp-LASP-171 (pan1180) wurde für den Einsatz in der Durchflusszytometrie mit dem PE-Konjugations-Kit von *Abcam* an R-Phycoerythrin gekoppelt. Zunächst musste der Antikörper von einer Ausgangskonzentration von 60 µg/ 200 µl auf eine Konzentration von 60 µg je 100 µl mittels 30 µm *Centricon Filter-Units* aufkonzentriert werden. Dies geschah durch 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 3200 *xg* von 200 µl Antikörper. Nun wurde nach Angabe des Herstellers der Antikörper markiert. Zunächst wurde 1 µl *Modifier Reagent* je 10 µl Antikörper hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Direkt im Anschluss wurde die Lösung in die „*R-PE Conjugation Mix*“ enthaltende Phiolen pipettiert. Nach der Inkubation über Nacht, bei RT im Dunkeln, wurde 1 µl *Quencher* je 10 µl Antikörper hinzugefügt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

2.2.2.2.2 Präparation von Milz und Blut aus Mäusen für FACS-Analyse

Präparation und Aufbereitung von murinen Milzen

Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Milzen wurden aus der getöteten Maus durch einen linksseitigen, subcostalen Schnitt entnommen und durch einen 70 µm Nylonfilter in ein 50 ml Greinerröhrchen mit einem Spritzenstempel zerdrückt. Es wurde mit 3 ml PBS1%FCS nachgespült. Im Anschluss wurden die Proben bei 400 xg und 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Resuspension erfolgte mit 3 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer. Nach einer Inkubationszeit von 7 min wurden 7 ml PBS1%FCS hinzugefügt und erneut wie oben zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml PBS1%FCS aufgenommen und durch einen 70 µm-Filter gegeben. Die Zellen wurden gezählt und mit der Färbung fortgefahren (s. 2.2.2.2.4).

Gewinnung und Aufbereitung von murinen Blutproben

Es wurden bis zu 200 µl Blut aus der Ateria ophthalmica einer betäubten, aber noch lebenden Maus, freundlicherweise durch Dr. Jesús Gil Pulido in der AG Zerneck, entnommen und in ein EDTA-Eppi auf Eis gegeben. 150 µl des gewonnenen Bluts wurden mit 850 µl Erythrozyten-Lyse-Puffer für 10 min bei RT inkubiert. Nachdem die Proben bei 300 xg und 4 °C für 5 min zentrifugiert wurden, konnte der Überstand verworfen werden. Das Zellpellet wurde in PBS1%FCS resuspendiert. Es folgte das Färben der Zellen (s. 2.2.2.2.4).

2.2.2.2.3 Stimulation von KM-Makrophagen mit oxLDL mit folgender FACS-Analyse

Quantifizierung der oxLDL-Aufnahme durch murine Makrophagen

Ausdifferenzierte BMDMs in 24-Well-Platten wurden an Tag 7 in 300 µl nährstoffreies Makrophagen-Medium + 2 % BSA für 4 h gehungert. Anschließend wurden neben der unstimulierten Kontrolle, jeweils Makrophagen mit 20 µg/ml Dil-oxLDL für 6 h stimuliert. Zur FACS-Analyse wurden die Zellen mit 500 µl Akkutase abgelöst, in 1,5 ml DC-Medium zur Inhibition der Akkutase gegeben und bei 400 xg, 4 °C für 5 min zentrifugiert. Die Resuspension erfolgte in 200 µl PBS1%FCS. Die Fluoreszenz der Makrophagen konnte nun auf der PE-Wellenlänge gemessen werden.

Schaumzellbildung in murinen Makrophagen

Ausdifferenzierte BMDMs in 24-Well-Platten wurden an Tag 7 mit nährstoffreiem Makrophagen-Medium + 2 % BSA versetzt und für 24 h gehungert. An Tag 8 wurden neben der unstimulierten Kontrollgruppe jeweils Makrophagen mit 20 µg/ml humanem oxLDL für 48 h im Brutschrank inkubiert. An Tag 10 wurden die Zellen mit 500 µl Akkutase abgelöst, in 1,5 ml DC-Medium zur Inhibition der Akkutase gegeben und bei 400 xg, 4 °C 5 Min zentrifugiert. 200 µl PBS wurden zum Resuspendieren genommen und die Proben in eine 96-Well-Platte überführt. Nach erneuter Zentrifugation bei 4 °C, 400 xg und 10 Min wurden zur *NileRed*-Färbung die Makrophagen zunächst mit 200 µl *BD Cytifix Fixation Buffer* je Well für 5 Min bei RT fixiert und anschließend mit *NileRed* verdünnt (1:2000 in PBS) und mit einem Finalvolumen von 200 µl je Well gefärbt. Die Inkubation betrug 10 Min bei RT im Dunkeln. Mindestens eine Probe blieb

ungefärbt zur internen Kontrolle. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Proben in 200 µl PBS resuspendiert und die Messung der gelb-goldenen Fluoreszenz erfolgte.

2.2.2.2.4 Färbung

Es wurden maximal 1.000.000 Zellen je Well in eine 96-Well-Platte gegeben. Nach einer 5- minütigen Zentrifugation bei 400 xg wurde der Überstand verworfen.

Oberflächenfärbung

Für die Oberflächenfärbung wurde je Well 50 µl einer 1:1 Mischung von PBS1%FCS und FACS *Staining* Puffer verwendet, in die der Antikörper in der entsprechenden Konzentration verdünnt wurde. Nach 30 Min Inkubation bei 4 °C wurden die Zellen mit 150 µl PBS1%FCS gewaschen und im Anschluss für 5 Min bei 400 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Entweder wurde nun mit einer intrazellulären Färbung fortgefahren oder die Zellen wurden in 200 µl PBS1%FCS resuspendiert und im Dunkeln sowie auf Eis bis zur Messung am FACS-Gerät aufbewahrt.

Intrazelluläre Färbung

LASP1-Detektion: Intrazelluläre Färbung mit dem *eBiosciences* Kit. Zunächst wurden die Zellen mit 100 µl *FixPer*-Lösung (1:4 Konzentrat verdünnt in *Diluent*) während einer 20- minütigen Inkubation bei 4 °C im Dunkeln fixiert und permeabilisiert. Die Zellen wurden mit 150 µl Wasch-Puffer gewaschen, welcher aus einer 1:10 Verdünnung aus konzentriertem Puffer in *Diluent* bestand. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 400 xg und dem Verwerfen des Überstandes folgte ein erneuter Waschschrift mit 200 µl Wasch-Puffer. Es wurde bei 400 xg für 10 Min zentrifugiert. Der LASP1-Antikörper (s. 2.2.2.2.1) wurde 1:100 in Wasch-Puffer in einem finalen Volumen von 50 µl je Well verdünnt. Die Inkubationszeit bei 4 °C betrug 30 Min. Ein weiterer Waschschrift mit 150 µl Wasch-Puffer und eine Zentrifugation bei 400 xg für 10 Min schloss sich an.

IFN γ -Detektion: Die Zellen wurden vor der Oberflächenfärbung in einer 96-Well-Platte für 4 h in DC-Medium zugesetzt mit PMA (50 ng/ml), Inomycin (750 ng/ml) und BFA (25 µg/ml) im Brutschrank inkubiert und dadurch entsprechend zur IFN γ -Sekretion stimuliert. Nach der Oberflächenfärbung schloss sich die intrazelluläre Färbung mit dem BD-Kit an. Es wurde wie bei LASP1 Detektion verfahren, nur wurden die Komponenten des BD Kits verwendet. Die Verdünnung des IFN γ -Antikörpers betrug ebenfalls 1:100.

Im Anschluss an die intrazelluläre Färbung wurden die Zellen jeweils in 200 µl PBS1%FCS resuspendiert und im Dunkeln sowie auf Eis bis zur Messung am FACS-Gerät aufbewahrt.

2.2.2.2.5 FACS-Analyse

In der vorliegenden Arbeit wurde das *FACS Canto II* der Firma *BD Biosciences* für durchflusszytometrische Messungen verwendet. Die Erfassung der Daten erfolgte mit der *BD Diva Software*. Bei einer Geschwindigkeit von 20 $\mu\text{l}/\text{Min}$ wurden 10.000 Zellen pro Sekunde gelesen. Eine Negativ-Kontrolle wurde eingesetzt, um die Autofluoreszenz von richtiger Fluoreszenz zu unterscheiden. Die Verstärker- und Bildverstärkerspannung wurde entsprechend eingestellt, sodass die Negativkontrolle keine Fluoreszenz enthält (Werte kleiner 10^1). Die Positivkontrolle diente zur Einschätzung der erwartenden Fluoreszenzintensität und stellte Werte $> 10^3$ dar. Zur Korrektur spektraler Überlappung der Fluorochrome wurde eine Kompensation durchgeführt. Aneinanderhaftende Zellen können zu einer Verfälschung führen. Dies wurde durch eine Doubletten-Diskriminierung unterbunden. Die Analyse der Daten erfolgte mittels *FlowJo*. Die Vorwärtsstreuung des Laserlichts (Lichtbeugung) lässt Rückschlüsse auf die Zellgröße zu (*Forward-Scatter FSC*), die Seitwärtsstreuung (Lichtbrechung und Reflexion) auf die Zellgranularität (*Side-Scatter SSC*). In der Einstellungsmessung wurde über die Bestimmung dieser Parameter der zu erfassende Bereich ausgewählt, unter der Vermeidung von toten Zellen, bzw. Zellschrott (Abb. 2-1). Die Darstellung erfolgte als geometrisches Mittel der Fluoreszenzintensität, bzw. als Zellproportion innerhalb eines spezifischen Gates.

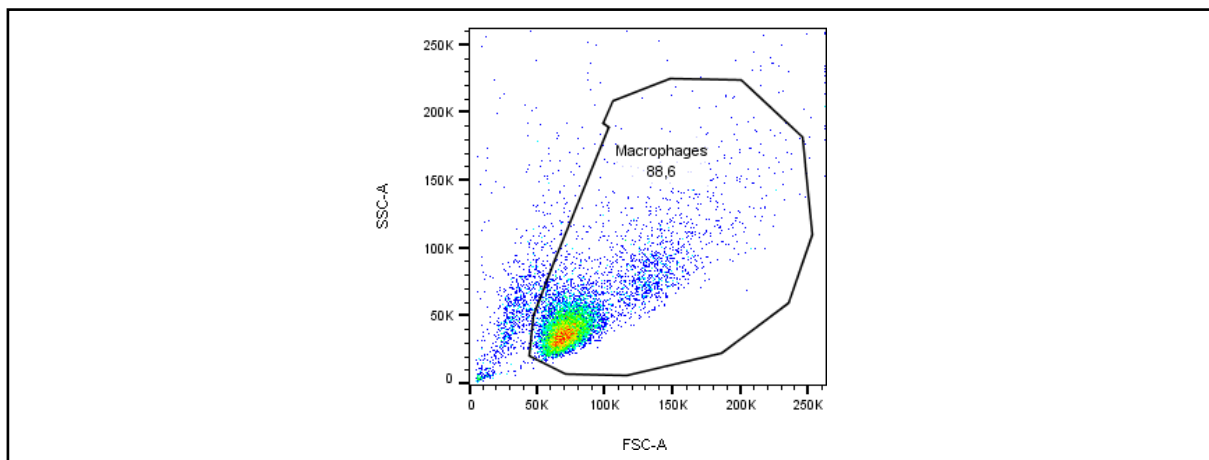


Abbildung 2-1: Punktwolkendiagramm der Vorwärts- im Verhältnis zur Seitwärtsstreuung. Die eingesetzte Zellsuspension bestand aus differenzierten Makrophagen. Exemplarischen Darstellung der Gating-Strategie: vitale Zellpopulation wurde ausgewählt. Die Population mit geringer Zellgranularität und Zellgröße stellt Zellschrott dar und wurde ausgeschlossen.

2.2.2.3 Adhäsions-Flow-Assay

HBSS-Puffer

HBSS 1x mit Ca^{2+} , Mg	500 ml
-----------------------------------	--------

Arbeitslösung – 500 ml HBSS Puffer, den pH auf 7,2 einstellen

Für die *in vitro*-Simulation eines arteriellen Gefäßes wurden, die in Abbildung 2-2 dargestellten 0,4 l Luer Slides verwendet. Diese waren sowohl für Durchlicht- als auch für Fluoreszenzmikroskopie zwecks mikroskopischer Auswertung geeignet. Zwei Tage vor dem Versuch wurden b.End5 Zellen in der Konzentration $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml in die im Brutschrank vorgewärmten 0,4 l Luer Slides ausgesät. Die Slides umfassten ein Volumen von 100 μ l. Entsprechend wurden pro Slide 100 μ l Zellsuspension + 60 μ l Medium für die Seiten verwendet.

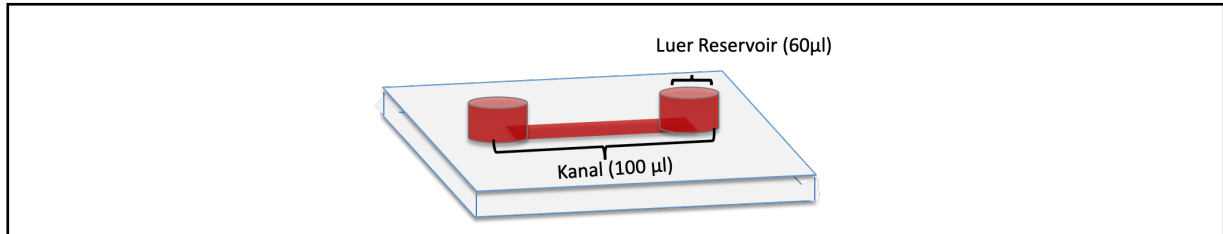


Abbildung 2-2: Darstellung des 0,4 l Luer Slides von Ibidi. Der Kanal hat ein Fassungsvermögen von 100 μ l, die beiden Luer-Reservoirs jeweils 60 μ l. Die Zellen adhärten am Boden des Kanals und bilden dort eine konfluente Zellschicht (Kang, Bajana, & Tanaka, 2016).

Das Medium wurde bis zum Versuch, wie in Abbildung 2-3 graphisch dargestellt, täglich gewechselt.

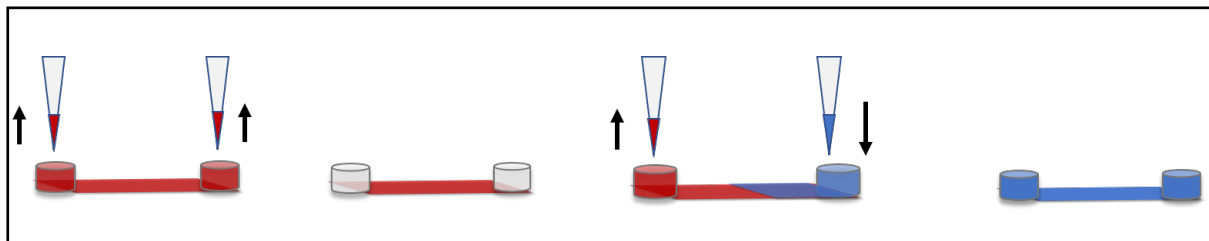


Abbildung 2-3: Protokoll zum Mediumwechsel innerhalb der Ibidi-Slides. Zunächst wurden die beiden Luer-Reservoirs geleert. Dann folgte die Zugabe von frischem Medium auf der einen Seite des Slides. Auf der anderen Seite wurde nun Medium abgenommen. So konnte der Austausch des Mediums ohne Beeinträchtigung der adhärenen Zellschicht am Boden des Slides sichergestellt werden (Kang et al., 2016).

Am Vorabend des Versuchs wurden die konfluente Zellschicht mit 10 ng/ml murinem TNF α stimuliert, um die Endothelzellschicht zur Ausbildung von Adhäsionsrezeptoren anzuregen. Die Stimulationszeit betrug ca. 18 h. Zu diesem Zeitpunkt waren die b.End5 Zellen im Zellkanal zu mind. 90 % konfluent.

Am Tag des Versuches wurden Monozyten aus dem Knochenmark der Mäuse nach oben beschriebener Methode extrahiert (Kapitel 2.2.1.2). Die Reinheit der Zellsuspension wurde per Durchflusszytometrie bestimmt (Kapitel 2.2.2.2), der Großteil zeigte einen Ly6C^{high}-Phänotyp. Für den Adhäsionsversuch wurden die isolierten Monozyten mit CFSE, einem grünen Fluoreszenzfarbstoff, gefärbt. Das Ibidi-Schlauchsystem umfasste ein Mindestvolumen von 6 ml. Für eine Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Monozyten je ml innerhalb des Schlauchsystems wurden daher 3 Mio. Zellen pro Maus benötigt. Die Zellen wurden in 1 ml HBSS-Puffer resuspendiert. Die Färbung erfolgt mit 10 μ M CFSE für 15 Min im Brutschrank. Danach wurden die Proben bis zur weiteren Versuchsdurchführung auf Eis und im Dunkeln gelagert. Die Slides mit den

Endothelzellen wurden an ein 10 ml Mediumsreservoir mit Verbindungsschläuchen (Ibidi Perfusions Set Yellow-and-green: Länge 50 cm, ID 1,6 mm, 10 ml Reservoir) sowie an eine programmierbare Pumpe angeschlossen. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 2-4 dargestellt.

Unmittelbar bevor das Experiment gestartet wurde, wurden Ca^{2+} und Mg^{2+} in einer finalen Konzentration von 6 mM zugegeben. Die laminaren Strömungsverhältnisse in der Flusskammer wurden unter Berücksichtigung der Slidegeometrie (Kanalbreite: 5 mm, Höhe: 0,4 mm) auf einen unidirektionalen Fluss mit Scherkräften von $1,5 \text{ dyn/cm}^2$, einem Druck von 3 mbar und einer Fließgeschwindigkeit von $1,15 \text{ ml/Min}$ eingestellt. Die Zyklusdauer betrug 20 s. Die Flow-Aufnahmen wurden am Fluoreszenzmikroskop (Leica DM 4000B) in 10-facher Vergrößerung gemacht. Um eine konstante Temperatur von $36 \text{ }^\circ\text{C}$ sowohl der Monozyten als auch der Endothelzellen zu garantieren, wurde ein Brutschrank verwendet. Die Messung erfolgte aufgrund des Fluoreszenzfarbstoffs im Dunkeln. Die Adhäsion unter dynamischen Bedingungen erfolgte für 5 Min. Anschließend wurden an ca. 8 verschiedenen Stellen des Slides jeweils zwei Bilder kurz hintereinander geschossen. Die anhaftenden Monozyten pro Bild (ca. $0,7 \text{ mm}^2$) wurden gezählt und der Mittelwert gebildet.

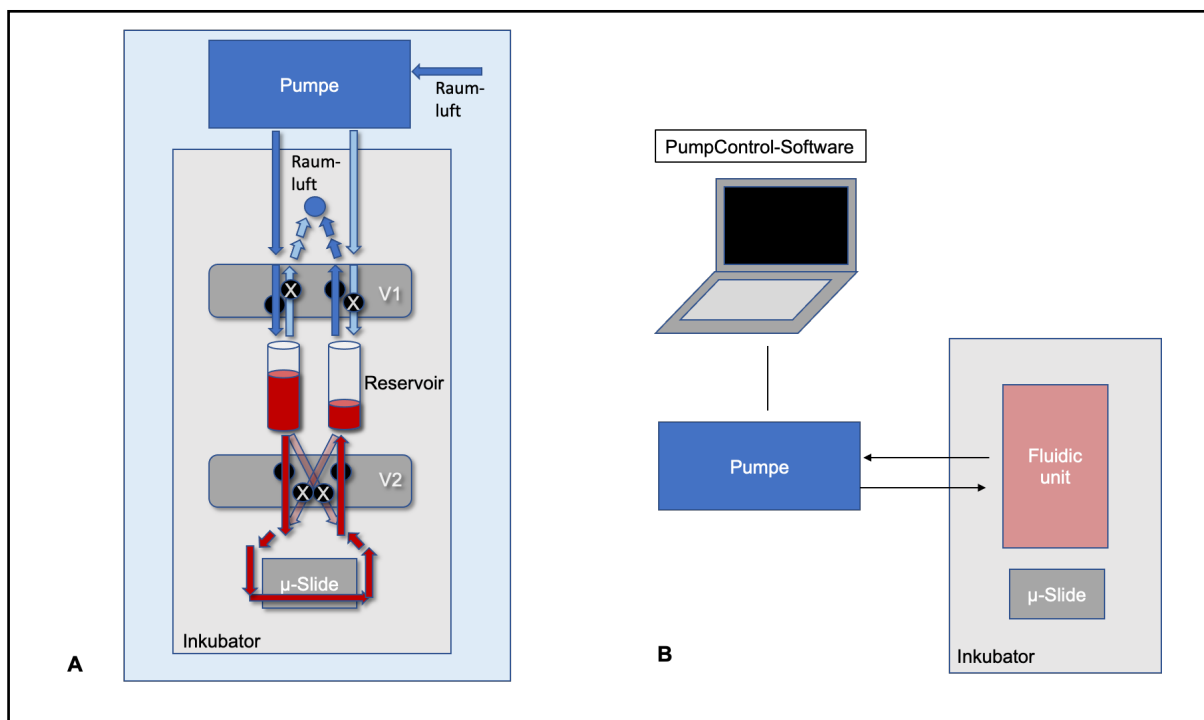


Abbildung 2-4: Schematische Darstellung des Ibidi-Pumpsystems. Zu A: In blau sind Luftflüsse dargestellt, in rot die Zirkulation des Zellmediums. Die Pumpe erzeugt einen positiven Luftdruck, der in der Fluidic Unit zur Bewegung des Mediums führt und so den Fluss im μ -Slide erzeugt. Das Medium wird zwischen Reservoir A und B hin- und hergepumpt, indem die Klappe V1 in festgelegten Zeitintervallen ihre Position wechselt. Um einen unidirektionalen Fluss zu gewährleisten, wird die Klappe V2 synchron zu V1 bewegt. Durch das Überkreuzen der Verbindungsschläuche des Perfusionssets wird das Medium immer in die gleiche Richtung gepumpt. Außer der Pumpe befanden sich alle Komponenten in einem Brutschrank, sodass Temperaturschwankungen des Mediums vermieden wurden. Zu B: Die Steuerung des Systems erfolgte mittels der PumpControl-Software über einen Laptop. Modifiziert nach Herstellerbroschüre ©(Ibidi).

2.2.2.4 Migrations-Assay

Medium für Migration

RPMI (1640)	500 ml
BSA (0,5 %)	2,5 g

Arbeitslösung – 2,5 g BSA in 10ml RPMI lösen und durch einen 70 µm Filter steril filtrieren. 490 ml RPMI mit dem gelösten BSA vereinen und bei 4 °C lagern

Zur Untersuchung der positiven Chemotaxis von Monozyten wurde eine Boyden-Kammer, ein System bestehend aus zwei Kompartimenten, welche durch eine porige Membran getrennt sind, verwendet. In das obere Kompartiment wird eine Zellsuspension gegeben. Das untere Kompartiment enthält die Lockstofflösung (Chemoattraktant). Dem chemischen Gradienten folgend, können die Zellen nun durch aktive Migration durch die Poren in das untere Kompartiment wandern. Über die Ermittlung an der Unterseite der Membran kann rein quantitativ die Auswertung erfolgen (Chen, 2005). Es wurden Boyden-Kammern im 24-Well Format mit Zellkultur-Inserts (Porengröße: 5 µm) verwendet. Als Lockstoff, welcher die zielgerichtete Migration der Monozyten anregen sollte, wurde jeweils CCL2, bzw. CXCL12 eingesetzt. Die Monozyten wurden, wie oben beschrieben, aus dem Knochenmark isoliert (s. 2.2.1.2). Jeweils 500 µl „Migrations-Medium“ wurden mit 20 ng/ml CCL2, bzw. 100 µg/ml CXCL12 versetzt und in die untere Kammer gefüllt. In das Insert wurden 1×10^5 Monozyten in 100 µl Migrations-Medium gegeben. Es wurden pro Maus Triplikate angesetzt. Zusätzlich wurde als Referenzmessung auch mindestens eine Negativkontrolle ohne Lockstoff inkludiert. Die Inkubationszeit im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ betrug 4 h. Der Versuchsaufbau wird in Abbildung 2-5 graphisch dargestellt.

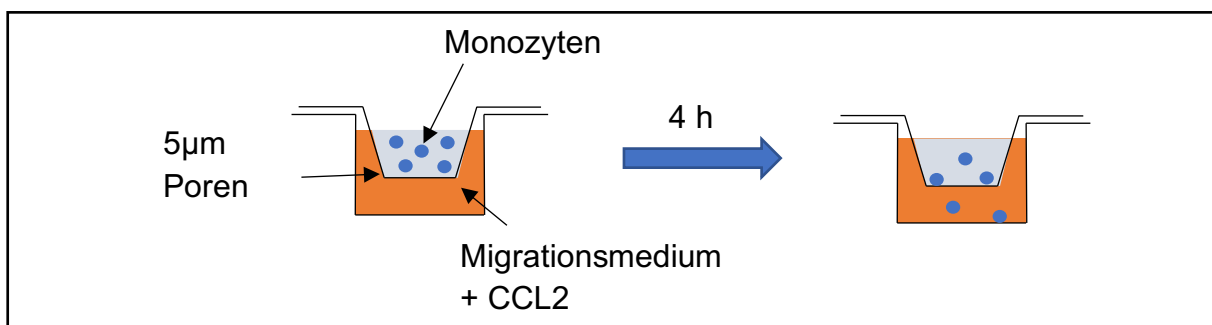


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung des Chemotaxis Assay. Die verwendete modifizierte Boyden Chamber ist als Querschnitt skizziert. Das untere Kompartiment wurde mit Medium befüllt und ein Chemoattraktant zugefügt (orange). Monozyten (dunkelblau) im oberen Kompartiment folgten dem Chemo-Gradienten durch eine 5 µm Porenmembran in das untere Kompartiment. Die Quantifizierung der gewanderten Monozyten erfolgte nach 4 h auf ATP-Basis mittels CellTiter Glo.

Da es sich bei Monozyten um nicht-adhärenente Zellen handelt, wurde nicht die Unterseite der Membran eingefärbt und die Zellen mit dieser Methode quantifiziert. Stattdessen wurde die Zahl der transmigrierten Monozyten im unteren Kompartiment mittels CellTiter-Glo bestimmt, einem Verfahren zur Bestimmung der Anzahl lebensfähiger Zellen in Kultur basierend auf der Quantifizierung des vorliegenden ATP.

Hierfür wurden die Transwell-Inserts entfernt und in das untere Kompartiment 250 µl des CellTiter-Glo-Reagenzes gegeben. Nach einer Inkubation von ca. 15 Min auf dem Schüttler war die Zellyse eingetreten und die Proben konnten auf eine *COSTAR-Flat white* 96-Well-ELISA-Platte überführt werden. Das Lumineszenzsignal wurde per ELISA-Reader gemessen werden.

2.2.2.5 Standardkurve von CellTiter-Glo

Der CellTiter-Glo *Luminescent Cell Viability Assay* lässt über die Quantifizierung der ATP-Konzentration Rückschlüsse auf die Zahl metabolisch aktiver Zellen zu. ATP wird als Co-Faktor für die Luziferase-Reaktion gebraucht, bei der Energie in Form von Lumineszenz freigesetzt wird. Eine direkte Proportionalität zwischen ATP-Gehalt und Lumineszenzsignal lässt sich zeigen: Zellzahl und Lumineszenzsignal weisen einen linearen Zusammenhang auf. Es handelt sich um einen sehr sensitiven, reproduzierbaren und einfach durchführbaren Assay. Im Datenblatt des Reagenzes wird eine lineare Beziehung zwischen Lumineszenzsignal und 0 - 50.000 Zellen pro Well angegeben. Dies konnten wir bestätigen und sogar eine Linearität bis zu 1×10^5 eingesetzten Zellen nachweisen (s. Abb. 2-6).

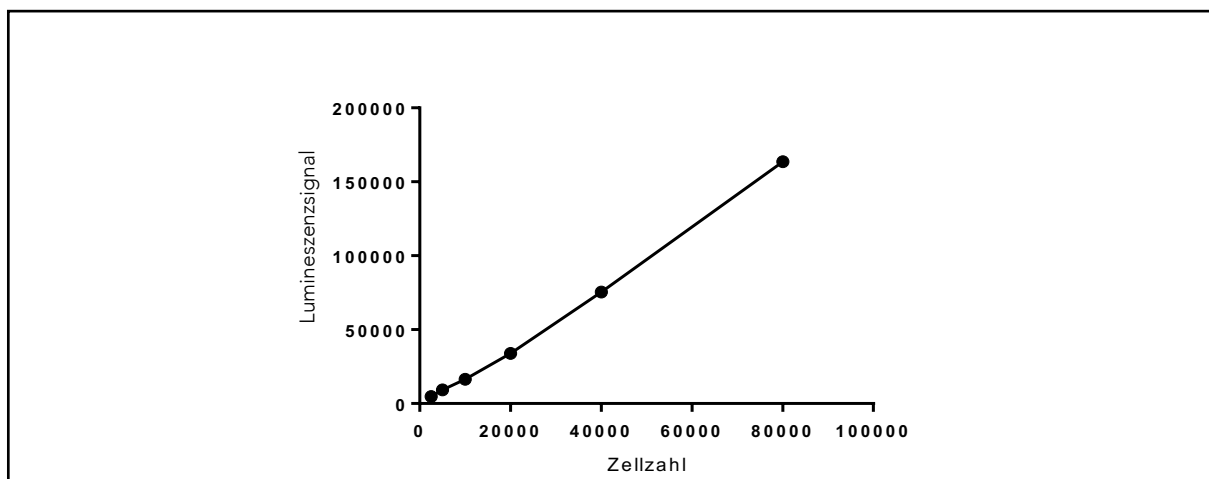


Abbildung 2-6: Lineare Regression von CellTiter-Glo. Darstellung eines linearen Zusammenhangs zwischen Zellzahl und Lumineszenzwerten, basierend auf der Quantifizierung von ATP mittels CellTiter Glo.

2.2.2.6 TNF α ELISA

Capture antibody Goat-Anti-Mouse	1:125	in PBS
Wash-Buffer	1:25	in Aqua-dest.
Reagent Diluent	1:10	in Aqua-dest.
TNF α Standard	1:100	in Reagent Diluent
Detection antibody Goat-Anti-Mouse	1:60	in Reagent Diluent
Streptavidin-HRP	1:40	in Reagent Diluent
Substrate Solution	1:1	Color Reagent A+B

BMDMs wurden entsprechend des Protokolls in 24-Well-Platten kultiviert und zum M1-Typ polarisiert (s. 2.2.1.1 & 2.2.1.2) Als Kontrollgruppe wurden BMDMs ohne LPS Stimulation ausschließlich in Hungermedium kultiviert.

Der Überstand betrug je Well 500 μ l. Dieser wurde nach der Inkubationszeit in je 3x 100 μ l Aliquots bei -80 °C eingefroren. Die restlichen 200 μ l wurden in dem Well belassen, mit 200 μ l CellTiter-Glo vermischt und für 15 Min auf dem Schüttler inkubiert und die Proben auf eine ELISA-Platte übertragen. Im Anschluss erfolgte die Zellzahlbestimmung mittels ELISA-Reader per Lumineszenzmessung (s. auch 2.2.2.5).

Für die Bestimmung des Zytokins TNF α im Überstand von Zellkulturen wurde das „Mouse TNF- α DuoSet ELISA“ Kit zusammen mit dem „DuoSet Ancillary Reagent Kit 2“ genutzt. Es handelte sich um die sogenannte Sandwich-ELISA-Technik. Es wurde nach Anleitung des Herstellers vorgegangen. Am Vortag des Versuches wurde die ELISA-Platte mit dem Goat-Anti-Mouse TNF α *Capture Antibody*, dem ersten Primär-Antikörper mit 100 μ l je Well beschichtet und über Nacht bei RT inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen der Platte mit je 400 μ l Wasch-Puffer pro Well entfernt. Es folgte ein Blockschritt mit 300 μ l *Reagent Diluent* pro Well. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei RT. Der folgende Waschschrift wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Nun wurde eine Standardreihe ausgehend von 2000 pg/ml TNF α Standard bis zu einer Verdünnung von 31,2 pg/ml und einer Negativprobe erstellt. Die Proben des Überstands der M1-Makrophagen wurden aufgetaut und jeweils 1:10 in einem Endvolumen von 100 μ l mit *Reagent Diluent* verdünnt auf die ELISA-Platte aufgetragen. Die Zellüberstände unstimulierter Makrophagen wurden unverdünnt verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 2h bei RT, in der der erste Primär-Antikörper das Antigen, in diesem Fall TNF α binden konnte, wurde die Platte erneut gewaschen. Anschließend wurden je 100 μ l biotinhaltiger *Detection Antibody* als zweiter Primärantikörper je Well hinzugefügt und erneut eine Inkubationszeit von 2 h eingehalten. Nachdem der überschüssige Detektionskörper ausgewaschen wurde, wurde je 100 μ l Streptavidin-HRP je Well pipettiert und für 20 Min bei RT im Dunklen inkubiert. Streptavidin bindet an Biotin, stellt also den Sekundärantikörper dar und stellt mit der konjugierten Meerrettichperoxidase die Enzymaktivität zur Katalyse der Farbreaktion bereit. Es wurde erneut gewaschen und die *Substrate Solution*, welche das Substrat Tetramethylbenzidin der Meerrettichperoxidase beinhaltet, mit einer Menge von 100 μ l je Well aufgetragen. Nach 20 Min Inkubation bei RT hat durch die enzymatisch katalysierte Reaktion ein blauer Farbumschlag stattgefunden. Die Reaktion wurde mit 50 μ l *StopSolution* je Well abgestoppt. Die Messung am ELISA-Reader wurde mit einer Absorption von 450 nm durchgeführt. Die Absorptionmesswerte wurden auf die Zellzahl angeglichen.

2.2.2.7 Zymographie

RIPA-Puffer (1X, pH 7,6, 100 ml) + Proteaseninhibitoren

25 mM TRIS/HCL	2,5 ml
150 mM NaCl	0,875 g
1 % Tergitol® NP-40	1 ml
1 % NaDesoxycholat	1 g

Arbeitslösung – Substanzen in 100 ml VE-Wasser lösen, bei 4 °C lagern. Kurz vor Nutzung wurden folgende Proteaseinhibitoren zugesetzt: Leupeptin, Pefabloc, Pepstatin, Trasylol jeweils 1:1000

Coomassie – Brilliant Blue (Färbelösung)

Essigsäure	1 ml
Ethanol	45 ml
Brilliant Blue G	0,25 g

Arbeitslösung – Reagenzien in 54 ml VE-Wasser lösen, bei RT lagern.

Coomassie – Entfärbelösung

Essigsäure	100 ml
Ethanol	100 ml

Arbeitslösung – Reagenzien in 1 l VE-Wasser lösen und bei RT lagern.

Gel Preservative Solution

Aqua dest.	67 ml
Glycerin	3,78 g
Methanol	30 ml

Arbeitslösung – 67 ml destilliertes Wasser mit 30 ml Methanol und 3,78 g Glycerol vereinen und bei RT lagern.

Basierend auf einem SDS-PAGE-Verfahren kann in der Zymographie durch elektrophoretische Auftrennung die Aktivität eines Enzyms nachgewiesen werden. Zur Detektion der MMP12 wurde das Substrat Casein genutzt. Zunächst wurde nach bekanntem Protokoll die Zellsuspension aus dem Knochenmark zu Makrophagen (2x 6-Well pro Maus) ausdifferenziert (s. 2.2.1.2 & 2.2.1.3). An Tag 6 wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in nährstofffreiem Makrophagen-Medium in einen Hungerzustand überführt. Die Stimulation zur MMP-Vesikel-Sekretion erfolgte mit 10 ng/ml IL-1 β . Nach ca. 20 h wurde jeweils der Überstand abgenommen und mit 10 kDa Microcon durch Zentrifugation bei 400 xg um den Faktor 20 aufkonzentriert. Das Konzentrat wurde bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung eingelagert. Die Zellen wurden mittels 1 ml Akkutase je Well nach einer Inkubationszeit von 15 Min abgelöst. Die Reaktion wurde mit 1 ml FCS pro Well zum Schutz der Makrophagen gestoppt. Es folgte eine Zentrifugation bei 200 xg für 4 Min und das Zellpellet wurde in 500 μ l PBS

resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels *Scepter™ 2.0* bestimmt und nach einer weiteren Zentrifugation wurde zur Resuspension je 2×10^6 Zellen 100 μ l hypotonen Ripa-Puffer (Radioimmunoprecipitation assay Puffer) zur Zellyse eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Min auf Eis konnte das Zelllysate mittels Insulinspritze homogenisiert und im Anschluss für 15 Min bei 400 xg und 4 °C zentrifugiert werden. Der Überstand wurde bei -80 °C eingefroren.

Die quantitative Proteinbestimmung wurde mittels BCA (Bichinchoninsäure)-Tests in einer 96-Well-Platte durchgeführt. Als Referenz wurde eine Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen BSA-Konzentrationen (0,1 mg/ml; 0,2 mg/dl; 0,4 mg/dl; 0,6 mg/dl; 0,8 mg/dl; 1,0 mg/dl) aufgetragen. Die lysierten Makrophagenproben sowie der RIPA-Puffer als Referenz wurden 1:20 in VE-Wasser verdünnt. Es wurden jeweils 10 μ l aufgetragen. Das *Pierce™ BCA Protein Assay Reagent A* wurde 1:50 mit dem *Pierce™ BCA Protein Assay Reagent B* versetzt und zu je 200 μ l pro Well pipettiert. Während der Inkubationszeit von 30 Min bei RT fand die bekannte Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Protein in alkalischem Milieu statt. In der zweiten Stufe der Farbentwicklungsreaktion reagierte BCA mit dem reduzierten Kupfer (I) Kation und es resultierte ein purpurfarbenes Reaktionsprodukt (Walker, 1994). Bei 562 nm konnte in einem ELISA-Reader mit zunehmender Proteinkonzentration eine starke lineare Absorption gemessen werden.

Für die Zymographie wurde ein 12 % Casein Protein Gel in eine Gelkammer eingespannt. *SDS Running Buffer (1X)* wurde in die Kammer gefüllt. Die Proben wurden für 15 Min 1:1 mit *SDS Sample Buffer (2X)* inkubiert und anschließend in die Taschen des Gels geladen (maximales Fassungsvermögen einer Tasche ca. 30 μ l). Es wurde jeweils 20 μ g Zelllysate aufgetragen sowie 15 μ l des 1:20 aufkonzentrierten Überstandes. Fibroblasten wurden als Positivkontrolle verwendet. Als Proteinstandard wurde *SeeBlute Plus2 Prestained* von *Thermo Fisher* eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 4 °C, einer Spannung von 125 V sowie einer Stromstärke von 30mA über einen Zeitraum von ca. 2 h. Erreichte die Lauffront das Ende des Gels, wurde dieses aus der Kammer gelöst und zweimal für 20 Min in 50 ml *Renaturing Buffer (1X)* gelegt, um das SDS zu extrahieren. Über Nacht bei 37 °C und 5 % CO_2 wurde das Gel in 50 ml *Developing Buffer (1X)* inkubiert, wodurch die enzymatische Aktivität gesteigert wurde. Am nächsten Tag wurden die Gele vor dem Färben mit 50 ml Coomassie-Lösung 5 Min mit eiskaltem, destilliertem Wasser gewaschen. Die Entfärbung erfolgte mit Coomassie-Entfärbereagens. Die Entfärbung wurde bis zur klaren Darstellung der Bereiche, die einen Abbau des Substrats in Form weißer Banden zeigen, fortgeführt. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4 °C in destilliertem Wasser bzw. in *Gel Preservative Solution*. Nach der photographischen Dokumentation des Gels mittels *Imager* wurde dieses getrocknet.

2.2.2.8 Immunhistologische Färbung von Kryoschnitten der Aortenwurzeln

Puffer A (1x, 1 l) für Immunhistologie

Zitronensäure	21,01 g
---------------	---------

Arbeitslösung – 21,01 g Zitronensäure in 1 l VE-Wasser lösen. Anschließend bei RT lagern.

Puffer B (1x, 1 l) für Immunhistologie

Natriumcitrat	29,41 g
---------------	---------

Arbeitslösung – 29,41 g Natriumcitrat in 1 l VE-Wasser lösen. Anschließend bei RT lagern.

Citrat Puffer (1x, 300 ml)

Puffer A (1,8 %)	5,4 ml
Puffer B (8,2 %)	24,6 ml
Aqua dest.	270 ml
Tween 20 (0,05 %)	150 µl

Arbeitslösung – 5,4 ml Puffer A mit 24,6 ml Puffer B vermischen und mit 270 ml Aqua dest. auffüllen, 150 µl Tween 20 hinzufügen und direkt im Anschluss verwenden.

Die Kryoschnitte der Aortenwurzel (ca. 4 µm) der 8 Wochen-HFD-Mäuse waren bereits im Bestand des Labors vorhanden. Als Negativkontrolle wurde bei jeder Färbung von Schnitten aus Ldlr^{-/-} Mäusen auch eine Ldlr.LASP1^{-/-} Maus gefärbt.

Für das Antigen-*Retrieval* wurde neuangesehter Citrat-Puffer in einer Küvette für 2 Min in der Mikrowelle erwärmt. Die histologischen Schnitte der Aortenwurzeln wurden in die Küvette mit dem vorgewärmten Puffer gegeben und erneut für 2-3 Min unterhalb des Siedepunkts erwärmt. Nach einer Abkühlzeit von 15 Min wurden die Schnitte mehrmals mit PBS gewaschen. Um das sparsame Einsetzen der Reagenzien zu ermöglichen, wurden die einzelnen Schnitte mit einem Pap-Pen-Liquid Blocker umrandet. Das *Blocking*-Reagenz (50 µl *Protein Block*-Reagenz + 950 µl „Dako Antibody Diluent“-Reagenz) wurde großzügig aufgetropft und die Schnitte für 1 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Der erste Antikörper, dp-LASP-171 (pan1180) - Antikörper wurde in der Verdünnung 1:50 in *Diluent* aufgetragen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Als Negativ-Kontrolle wurde mindestens ein Schnitt nur mit Negativ-Control-Reagenz beschichtet.

Am nächsten Tag wurde vorsichtig ein Teil der bedeckenden Flüssigkeit pro Schnitt abgenommen und stattdessen mit dem Makrophagen-Antikörper Mac2 in einer 1:800 Verdünnung in *Diluent* ergänzt. Dieser Antikörper wurde für 1,5 h bei RT inkubiert. Es folgte ein Waschschritt mit PBS für 15 Min. Für den zweiten Antikörper wurde in Bezug auf den LASP1-Antikörper der Alexa Fluor 555 *goat-anti-rabbit*-Antikörper in Rot

verwendet. Für den Primärmakrophagen-Antikörper wurde der *goat-anti-rat*-Antikörper Alex Fluor 488 in grün verwendet. Die Sekundärantikörper wurden 1:500 in *Diluent* verdünnt. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei RT im Dunkeln. Nachdem Waschen der Schnitte mit PBS für 15 Min wurde zur Zellkerndarstellung und zur Fixierung der Schnitte *Vectashield Mounting Medium* mit DAPI aufgetropft. Das Deckgläschen wurde aufgesetzt und mit Nagellack an den Ecken fixiert. Nach 10 Min Inkubationszeit bei 4 °C konnten die gefärbten Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica DM 4000B) begutachtet werden. Danach folgte die Lagerung bei 4 °C im Dunkeln.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 *SDS Page und Western Blot*

SDS Stopp (3X, 100 ml)

TRIS/ HCL	2,42 g
SDS 6 %	6 g
Glycin 15 %	11 g
Bromphenolblau	3 mg

Stocklösung – 2,42 g Tris/HCL in 70 ml VE-Wasser lösen. Mit HCL einen pH von 6,7 einstellen. Anschließend werden 6 g SDS, 11 g Glycin und 3 mg Bromphenolblau zugegeben.

Arbeitslösung - Für den *Western Blot* werden 10 % Beta-Mercaptoethanol beigefügt.

Puffer A (1X; pH 6,7; 100 ml) für Polyacrylamid-Gel

0,5 M TRIS/HCL	6,057 g
----------------	---------

Arbeitslösung – TRIS/HCL in 80 ml VE-Wasser lösen und den pH auf 6,7 einstellen. Im Anschluss auf 100 ml mit VE-Wasser auffüllen und bei RT lagern.

Puffer B (1X; pH 8,9; 100 ml) für Polyacrylamid-Gel

3 M TRIS/HCL	36,34 g
--------------	---------

Arbeitslösung – TRIS/HCL in 50 ml VE-Wasser lösen und den pH auf 8,9 einstellen. Im Anschluss auf 100 ml mit VE-Wasser auffüllen und bei RT lagern.

10 % SDS

SDS	10 g
-----	------

Arbeitslösung – 10 g SDS in 100 ml H₂O lösen

Ammoniumpersulfat – Lösung (10 %, 10 ml)

APS	1 g
-----	-----

Arbeitslösung – 1 g APS in 10 ml VE-Wasser lösen und bei 4 °C lagern.

Polyacrylamid-Gel (1X)

Trenngel (10 %):

VE-Wasser	5,2 ml
30 % Acryl-/ Bisacrylamid	3,3 ml
Puffer B	1,25 ml
10 % SDS	0,1 ml
10 % APS	0,1 ml
TEMED	5 µl

Sammelgel:

VE-Wasser	3,8 ml
30 % Acryl-/ Bisacrylamid	0,5 ml
Puffer A	625 µl
10 % SDS	50 µl
10 % APS	50 µl
TEMED	5 µl

Gel-Elektrophoresepuffer (10X, pH 8,9, 4 l)

Tris/HCL	120 g
Glyzin	576 g
SDS	40 g

Arbeitslösung – Substanzen in etwas VE-Wasser lösen. Den pH auf 8,9 einstellen und anschließend auf 4 l auffüllen. Puffer bei RT aufbewahren.

Transferpuffer (1X, pH 10, 10 l)

25 mM TRIS/HCL	30 g
192 mM Glyzin	144 g
NaOH - Pellets	56 g
Methanol	2 l

Arbeitslösung – die angegebenen Substanzen bis auf das Methanol in 5 ml VE-Wasser unter Rühren lösen, bis die Lösung klarer wird. 2 l Methanol werden zugeben und anschließend wird der Puffer mit VE-Wasser auf 10 l aufgefüllt. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C.

Ponceau S – Färbelösung (0,5 %, 100 ml)

Ponceau S	0,5 g
10 % Essigsäure	100 ml

Arbeitslösung – 0,5 g Ponceau S in 100 ml 10 %iger Essigsäure lösen und bei RT lagern.

TBS-T-Puffer (10X, pH 7,5, 1 l)

100 mM TRIS/HCL	12,1 g
1,5 M NaCl	87,6 g

Stocklösung – Substanzen in 750 ml VE-Wasser geben und den pH-Wert auf 7,5 einstellen. Anschließend die Lösung auf 1 l auffüllen und bei RT lagern.

Arbeitslösung – 100 ml Stocklösung mit 900 ml VE-Wasser vermischen und 1 ml TWEEN 20 zugeben (\cong 1 % TBS-T).

TBS-T Milch (3 %, 100 ml)

3 % Milchpulver	3 g
1 % TBS-T	100 ml

Arbeitslösung – 3 g Milchpulver (*Nonfat-Dried Milk*) in 100 ml 1 % TBS-T lösen und bei 4 °C lagern oder in 10 ml Aliquots einfrieren.

ECL Home-Made

Stocklösung bestehend aus:

Reagenz A: 0,1 M TRIS/HCL + 50 mg Luminol	200 ml
Reagenz B: p-Cumarinsäure in 10 ml DMSO	11 mg
Reagenz C	30 % H ₂ O ₂

Arbeitslösung – Die angegebenen Substanzen für Reagenz A werden vermischt und im Kühlschrank aufbewahrt. Reagenz B wird nach Herstellung bei RT gelagert. Für die Chemolumineszenzreaktion werden 3 ml von Reagenz A mit 300 μ l Reagenz B sowie 1 μ l H₂O₂ vermischt. Der Ansatz reicht für eine Membran mit ca. 10x10 cm.

Stripping Medium

TRIS/ HCL	3 g
SDS	8 g
Glycin	11 g

Stocklösung – 3 g TRIS mit 350 ml H₂O mischen. Danach wird der pH auf 6,8 eingestellt. 8 g SDS werden zugegeben und auf 400 ml mit VE-H₂O auf.

Arbeitslösung - zu 10 ml Stripping-Medium werden 70 μ l β -Mercaptoethanol beigefügt und die Membran wird für 30-60 Min bei 50 °C inkubiert.

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde eine SDS-Page durchgeführt.

SDS-Page

Die Gelkammer wurde präpariert und ein Polyacrylamidgel, bestehend aus einem 10 % Trenngel und einem darüber liegendem Sammelgel eingegossen. Das Gel wurde nach abgeschlossener Polymerisation in die Elektrophoresekammer eingespannt. Nach Befüllen der Kammer mit Elektrophoresepuffer wurden ein Standard sowie die Proben zu gleichen Mengen (ca. 5×10^4 Zellen/ Tasche) auf das Gel geladen. Bis die Lauffront das Trenngel erreichte, wurden 70 V Spannung angelegt. Danach folgte 1 h Laufzeit bei 120 V.

Western Blot

Zur Detektion der in der SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden diese auf eine Trägermembran aus Nitrocellulose transferiert. Hierfür wurde das Gel mit der Nitrocellulose sowie *Blotting Paper* und Schaumstoff zu einem Transfer-Sandwich zusammengesetzt und in die Transferkammer zusammen mit Transferpuffer gegeben, sodass die negativ geladenen Proteine durch den Elektronenfluss auf die Membran übertragen wurden. Der Elektrotransfer erfolgte bei 1,8 A für 1 h bei 4 °C. Die NC wurde im Anschluss für wenige Minuten mit Ponceau S inkubiert und die dadurch gefärbten Banden im Anschluss durch partielles Entfärben der Membran mit destilliertem Wasser sichtbar gemacht, um den Erfolg des Transfers zu beurteilen.

Die Entfärbung erfolgte mit 1 % TBS-T. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern, wurde die Membran in TBS-T mit 3 % Magermilchpulver für 1 h bei RT auf dem Schüttler geblockt. Der primäre Antikörper wurde in 3 % TBS-T Milch verdünnt und zusammen mit der NC über Nacht bei 4 °C unter Schütteln inkubiert.

Es folgten drei Waschschrte mit TBS-T. Der Sekundär-Antikörper wurde in TBS-T 3 % Milchpulver für 1 h mit der Membran bei RT geschwenkt. Nach drei weiteren Waschgängen erfolgte die Protein-Detektion mittels Chemolumineszenzreaktion, welche durch das Enzym-gekoppelte Immunkonjugat katalysiert wurde. Hierfür wurde die NC mit ECL *home made* bedeckt, für 2 Min inkubiert und die spezifischen Proteinbanden im *Imager* dargestellt. Die Analyse erfolgte mittels ImageJ-Software.

2.2.3.2 Kern-Zytosol-Trennung

Zunächst wurden die aus dem Knochenmark isolierten Zellen wie beschrieben über 6 Tage in einer 6-Well-Platte kultiviert und zu Makrophagen differenziert (s. 2.2.1.2 & 2.2.1.3). An Tag 6 wurde für 18 h das DC-Medium durch Hungermedium (RPMI + 1 % Penicillin/Streptomycin + 0,5 % FCS) ersetzt. An Tag 7 wurden die Makrophagen entweder direkt geerntet, mit 200 ng/ml CXCL12 für 0, 1, 5, 10, 20 Min stimuliert oder für 0, 1, 5, 10 Min mit 30nM cBIMPS stimuliert.

Die Kern-Zytosol-Trennung erfolgte mit dem „NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents“ von Thermo Fisher. Das Reagenz CER-I wurde mit folgenden Proteaseinhibitoren in der Verdünnung 1:1000 versetzt: Calyculin A, Leupeptin, Pepstatin, Pefablock sowie Na-Orthovanadat. Ca. 800.000 Zellen (1x6-Well) wurden in 100 µl des bereiteten CER-I Puffer aufgenommen, sodass es zur schrittweisen

Zellyse kam. An dieser Stelle wurden die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei - 80 °C eingelagert.

Alle Schritte der Kern-Zytosol-Trennung erfolgten auf Eis. Es wurde eine Homogenat-Probe abgenommen, mit SDS Stopp versetzt und abgekocht, bevor mit der Trennung begonnen wurde. Nach dem Auftauen erfolgte zur Homogenisierung der Spritzenaufschluss mittels Insulinspritze. 11 µl des kalten CER-II Reagenz wurden nach einer 10-minütigen Pause hinzugefügt. Nach weiteren 60 s Inkubationszeit folgte die Zentrifugation bei 4 °C für 10 Min bei 16.000 xg. Der Überstand stellte das Zytoplasma dar und konnte vorsichtig in ein neues, kaltes Eppi überführt wurden. Für die *Western Blot*-Probe wurde der Überstand 1:1 mit SDS-Stopp versetzt und für 5 Min bei 95 °C abgekocht. Das Pellet enthielt den intakten Zellkern und wurde dreimal mit kaltem PBS gewaschen, zentrifugiert (wie oben) und wieder gut trocken gesaugt. Anschließend wurden 100 µl kaltes NER-Reagenz zu dem Pellet gegeben, welches nun für 40 Min auf Eis mit wiederholtem Vortexen inkubiert wurde. Hierbei wurden die Nukleinproteine extrahiert. Nach der Zentrifugation für 10 Min bei 4 °C und 16.000 xg konnte der Überstand mit der nuklearen Fraktion vorsichtig abgenommen, 2:1 mit SDS Stopp versetzt und schließlich für 5 Min bei 95 °C abgekocht werden. Es folgte ein *Western Blot* zur Analyse der Proben.

2.2.4 Molekularbiologische Methode

2.2.4.1 *Quantitative Real-Time- PCR*

2.2.4.1.1 Präparation von Milz, Aortenwurzel für RNA-Isolierung

Zunächst wurden Mörser, Pistill und Spatel für 30 Min auf Trockeneis gekühlt. Die Entnahme der Aortenwurzel erfolgte freundlicherweise durch Frau Melanie Rösch in der AG Zerneck. Die Präparation der Milz wurde selbstständig durch einen subcostalen Schnitt durchgeführt. Das entnommene Gewebe (die gesamte Aortenwurzel, bzw. ein erbsengroßes Teilstück der Milz) wurde mittels Mörser und Pistill pulverisiert und in ein mit 400 µl RNA-Lysepuffer gefülltes Eppi gegeben. 15 s kräftiges Durchmischen mittels Vortexen folgten. Es wurde nach Anleitung des Herstellers mit der RNA-Isolierung fortgefahren (Kapitel 2.2.4.1.3).

2.2.4.1.2 Präparation von Makrophagen für RNA-Isolierung

Die Ernte der BMDMs erfolgte mit 100 µl RNA-Lyse-Puffer je 12-Well. Die Proben wurden bei -20 °C bis zur RNA-Isolierung gelagert.

2.2.4.1.3 RNA - Isolierung

Die RNA-Isolation erfolgte mittels des „peqGOLD Total RNA Kit“ von *Peqlab*. Alle Aufreinigungsschritte fanden bei RT statt. Nach dem Auftauen wurden die Proben auf die DNA *Removing* Säule, welche in einem 2 ml Eppi steckte, gegeben und für 1 Min

bei 12.000 xg zentrifugiert. Die Säule mit der gebundenen DNA wurde entsorgt. Der Durchfluss wurde 1:1 mit 80 %igem Ethanol versetzt und auf die *PerfectBind* RNA Säule pipettiert. Nach der 1-minütigen Zentrifugation bei 10.000 xg wurde die Säule in ein frisches Eppi gegeben und zunächst mit 500 µl der Waschlösung I für 15 s bei 10.000 xg zentrifugiert. Im Anschluss wurde dieser Schritt zweimal mit 600 µl Waschlösung II wiederholt, um die Säule von unspezifisch gebundenen zellulären Bestandteilen zu befreien. Durch 2 Min. Zentrifugieren bei 10.000 xg wurde die *PerfectBind* RNA Säule vollständig getrocknet. Für die *Elution* wurde die Säule in ein neues Eppi gegeben und für 3 Min mit 40 µl RNase-freiem Wasser inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 5.000 xg für 1 Min. Der Durchfluss stellte die isolierte RNA dar. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben auf Eis gelagert.

2.2.4.1.4 Photometrische Vermessung der RNA

Das Spektralphotometer (NanoDrop™ 2000C) wurde mit dem verwendeten RNase-freiem Wasser geeicht und anschließend der RNA-Gehalt jeder Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm zweimalig gemessen. Die Abweichung zwischen zwei gleichen Proben wurde mit kleiner 0,5 festgelegt und der Mittelwert errechnet. Die Reinheit der RNA wurde mittels Messung des Extinktionskoeffizienten bei 280 nm quantifiziert. Ein $A_{260/280}$ Quotienten von $\geq 2,0$ zeugte von reiner RNA und schloss eine Proteinkontamination aus.

2.2.4.1.5 qPCR zum Umschreiben der RNA in cDNA

Zur Synthese der komplementären cDNA aus RNA-Proben mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) wurde das „First Strand cDNA Synthesis Kit“ von *Thermo Fisher* eingesetzt. Es wurde nach Angabe des Herstellers vorgegangen. Es wurden mindestens 100 ng RNA je Probe eingesetzt und diese entsprechend der RNA-Konzentration mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. 1 µl Oligo(dT)₁₈ Primer wurde je Probe appliziert und während einer kurzen Zentrifugation gut vermischt. Dieser Primermix wurde bei 65 °C für 5 Min inkubiert, um die Sekundärstruktur der RNA aufzulösen und direkt im Anschluss auf Eis gelagert. Nun wurde je Probe 4 µl 5X Reaktionspuffer, 1 µl RiboLock RNase Inhibitor zum Schutz der RNA vor Denaturierung, 2 µl 10 mM dNTP Mix (Desoxyribonukleose Mix) und 2 µl M-MuLV Reverse Transkriptase hinzugefügt. Nach dem Vermischen und Zentrifugieren wurden die Proben im PCR-Gerät für 60 Min auf 37 °C und im Anschluss für 5 Min auf 70 °C erhitzt, wodurch die Reaktion mit der Denaturierung der Reversen Transkriptase beendet wurde. Nach Abkühlen des Thermocyclers wurde die cDNA mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 5ng/µl verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.2.4.1.6 Quantitative real-time PCR (qPCR)

Mittels quantitativer real-time-PCR wurde die Genexpression ermittelt. Zur Einschätzung der Primerspezifität sowie um potentielle Primer-Dimere auszuschließen wurde direkt im Anschluss an den PCR-Zyklus ein *Melt Curve*-Zyklus durchgeführt. Vor Einsatz eines neuen Primers wurde dessen Effizienz mittels lineare Regressionsanalyse der Verdünnungsreihe bestimmt. Ein Wert von mindestens 95% war die Voraussetzung für die Verwendung in Versuchen. Die qPCR wurde durchgeführt gemäß Anleitung des Herstellers *Thermo Fisher* mittels folgendem *SYBR Select Master Mix*:

Reagenzien	Volumen/ Well
SYBR® Select Master Mix	5 µl
Primer Forward (10 µM)	0,25 µl
Primer Reverse (10 µM)	0,25 µl
RNase freies Wasser	3,5 µl
Total	9 µl

Die Messung erfolgt in einem Thermocycler (peqSTAR 96X) mit optischer Einrichtung (Argon Laser und Charge Coupled Device). Der frisch angesetzte Mastermix wurde je Well einer 384-Well-Platte pipettiert (9 µl/ Well). Im Anschluss wurde je 1 µl cDNA Probe zugegeben. Jede Probe wurde als Duplett aufgetragen. Als endogene *non-template*-Kontrolle wurde in zwei Wells statt cDNA 1 µl RNase freies Wasser zu den 9 µl Mastermix gegeben. Nachdem die Ansätze pipettiert waren, folgte eine Zentrifugation für 10 s bei 400 *xg*. Die 384-Well-Platte wurde mit dem *MicroAmp Optical Adhesive Film* luftdicht verschlossen. Nun erfolgte die Messung mittels vorprogrammiertem *QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System* unter folgenden Konditionen:

Abschnitt	Temperatur	Zeit
1	95 °C	15 min
2 (40 Wiederholungen)	95 °C	15 s
	60 °C	30 s
	72 °C	50 s
3	95 °C	15 s
	60 °C	15 s
	95 °C	15 s

Die Analyse der Daten wurde als relative Quantifizierung durchgeführt. Die Expressionsausprägung des Zielgens wurde auf ein Referenzgen (=Housekeeping-Gen), welches eine möglichst geringe Schwankbreite der Expression in allen Proben unter allen Bedingungen aufwies, normalisiert, in diesem Fall *Rplp0* bzw. *HPRT*. Hierfür wurde die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (Livak & Schmittgen, 2001) eingesetzt. Die maximale Abweichung zwischen zwei Duplikaten wurde auf 0,5 festgelegt.

2.2.5 Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse wurde das Programm *GraphPad Prism 8* genutzt. Wenn nicht anders beschrieben, erfolgt die Darstellung des Mittelwerts mit dazugehöriger Standardabweichung. Die Berechnung der mathematischen Signifikanz erfolgte mittels „*Unpaired Student's t-Test*“. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten $<0,05$ angenommen und mit einem Stern (*) in den Abbildungen markiert. P-Werte $<0,01$ wurden als hochsignifikant bezeichnet (Markierung mit 2 Sternen (**)) und Ergebnisse mit p- Werten $<0,001$ sind als höchst signifikant (Markierung mit 3 Sternen (***)) definiert.

3 Ergebnisse

3.1 Immunhistochemischer Nachweis von LASP1 in atherosklerotischen Plaques in Aortenwurzeln

Mittels immunhistochemischer Färbung von Kryoschnitten muriner Aortenwurzeln aus *Ldlr*^{-/-}-Mäusen wurde nach 8 und 16 Wochen HFD das mögliche Vorkommen von LASP1 in Plaquemakrophagen *in vivo* untersucht. Aufgrund der ausgeprägten Blutstromverwirbelungen an den Herzklappen stellen die Aortenwurzeln einen Prädilektionsort zur atherosklerotischen Plaqueeentwicklung dar. Die histologischen Schnitte, auf die ich freundlicherweise zurückgreifen durfte, wurden von Frau Melanie Rösch in der AG Zerneck e präpariert.

Die Kryoschnitte wurden sowohl mit dem Makrophagenantikörper Mac-2 als auch dem dp-LASP-171 (pan1180) Antikörper inkubiert. Im Rahmen dieser Doppelfärbung zeigte sich der Antikörper zur Darstellung der Makrophagen deutlich sensitiver als der von LASP1. Es wurde daher ein Versuchsprotokoll ausgearbeitet, das eine längere Inkubationszeit des LASP1-Antikörpers vorsieht: Die Schnitte wurden über Nacht bei 4 °C mit dem dp-LASP-171 (pan1180) Antikörper inkubiert. Der Mac2-Antikörper wurde für weitere 1,5 h Inkubationszeit bei RT am folgenden Tag hinzugefügt. Makrophagen wurden mit grüner Fluoreszenz, das Protein LASP1 mit einem rotem Fluoreszenzfarbstoff visualisiert. Der Kern wurde mittels DAPI blau gefärbt. Die Aufnahmen erfolgten am Fluoreszenzmikroskop (Leica DM 4000B) (Abb. 3-1).

Ldlr.LASP1^{-/-}-Mäuse wurden als Negativ-Kontrolle für die LASP1-Färbung eingesetzt (Daten nicht gezeigt). Der verwendete Mac-2-Antikörper reagiert mit dem Antigen Galectin-3, ein beta-Galactosidase bindenes Lektin. Galectin-3 wird von verschiedenen Zellarten exprimiert, wobei die höchste Expression in Makrophagen nachzuweisen ist (s. Angaben des Herstellers im Datenblatt des Antikörpers). Dennoch kann eine Kreuzreaktion in geringem Ausmaß mit eosinophilen Granulozyten, Mastzellen und dendritischen Zellen durch den Mac-2 Antikörper nicht ausgeschlossen werden.

In der Plaqueanalyse aus 8 Wochen HFD-Tieren waren Makrophagen wie erwartet innerhalb der atherosklerotischen Plaques akkumuliert (s. Abb. 3-1; B). Außerhalb der Läsionen konnten nahezu keine Zellen mit einem positiven Mac2-Signal nachgewiesen werden.

Durch die doppelte Immunfärbung zeigte sich, dass LASP1 von Mac2-positiven Zellen exprimiert wurde (Abb. 3-1; A, B, D). LASP1 als Aktin-Gerüstprotein ist insbesondere an der Zellperipherie und im Zytoplasma, speziell in Kernnähe lokalisiert. Im Kern selbst konnte kein LASP1 nachgewiesen werden (Abb. 3-1; B, C).

Neben einem positiven Signal in Makrophagen (s. Abb. 3-1; D) konnte auch eine Lokalisation von LASP1 in Endothelzellen detektiert werden (s. Abb. 3-1; A, Pfeile). Eine hohe Expression von LASP1 in epitheliale m Gewebe war bereits bekannt (Chew, Parente, Chen, Chaponnier, & Cameron, 2000).

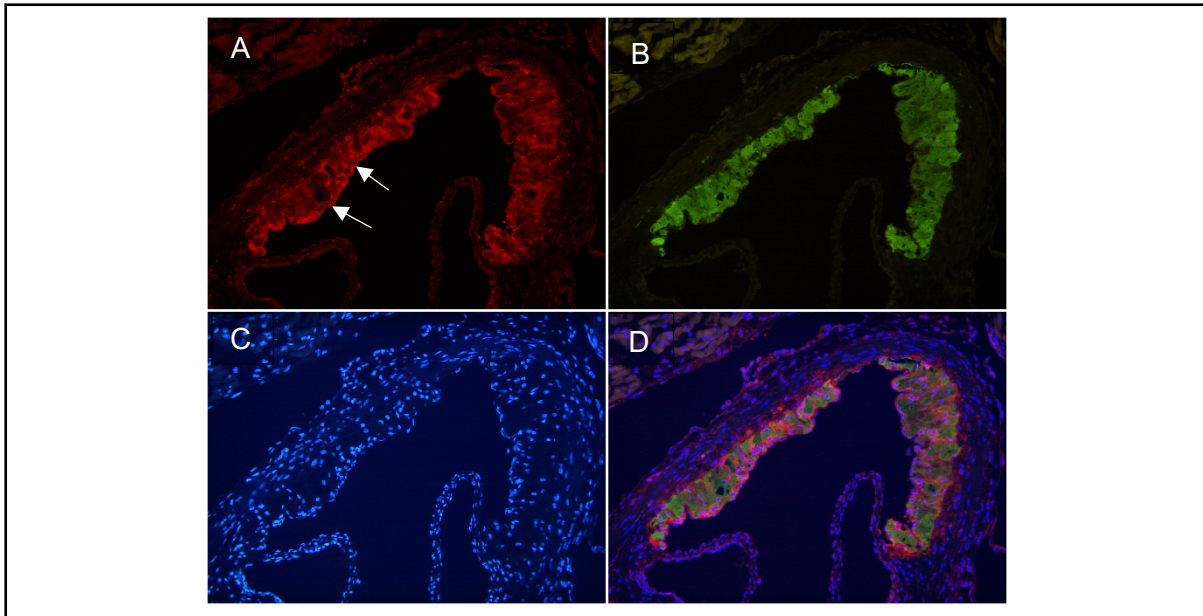


Abbildung 3-1: Immunhistochemische Färbung von atherosklerotisch veränderten Aortenwurzeln. Die histologischen Schnitte von 8 Wochen HFD *Ldlr*^{-/-} Mäusen wurden gefärbt (A: dp-LASP-171 (pan1180) in rot; B: Mac2-Färbung in grün; C: Kernfärbung mit DAPI; D: Merging). Makrophagen zeigten sich innerhalb des Plaques akkumuliert. LASP1 war in Makrophagen und zusätzlich in Endothelzellen (siehe Pfeile), jedoch nicht im Zellkern nachweisbar.

Die Plaques der eingefärbten Aortenwurzeln aus 16 Wochen HFD Mäusen zeigten sich stark fortgeschritten. Durch das enorme Ausmaß des nekrotischen Kerns war eine quantitative Auswertung bezüglich der LASP1-Expression nicht möglich (Bilder nicht gezeigt).

Der monoklonale Antikörper dp-LASP-171 (pan1180) bindet murines LASP1 an einer Gensequenz (s. blaue Markierung, Abb. 3-2), die sich von der Gensequenz weiterer Mitglieder der Nebulette-Familie unterscheidet. LIM-Nebulette und LASP1 weisen homologe Gensequenzen (Abb. 3-2). Durch Einsetzen dieses Antikörpers wurde sichergestellt, dass Nebulette nicht erkannt wurden und so die Aussagekraft der Ergebnisse gestärkt.

Maus Nebulette NP_083033

121 KYHEDFEKTK GRGFTPVVDD PVTERVRKS **R** QVVSDAAYKG VQPHVEMDR RPQIIVAPVL

Maus LASP1

121 KYHEEFEKSR MGPSGGEGVE PERREAQDSS SYRRP **R** EQQQ PQPHHI**PTSAPV** **Y**QQPQQQMT

Abbildung 3-2: Sequenzaufreihung von murinem LASP1 und der orthologen Nebulette-Variante. Die Sequenz welche von dem Antikörper dp-LASP-171 (pan1180) erkannt wird, ist in blau markiert, die PKG Phosphorylierungstelle in rot. Modifiziert nach (Butt & Raman, 2018).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass LASP1 von Makrophagen und Endothelzellen innerhalb atherosklerotischer Plaques exprimiert wird.

3.2 *In vitro*-Versuche zur monozytären, intimalen Invasion

In Tumorzellen konnte LASP1, bedingt durch die Lokalisation an dynamischen Aktinfilamenten, als Induktor von Migration und Adhäsion und invasivem Verhalten funktional charakterisiert werden (Orth et al., 2015). Es handelt sich um ebenfalls essentielle Prozesse in der Atherogenese. Für Monozyten wurde daher die endotheliale Adhäsionsrate sowie das transmigratorische Verhalten der Zellen nach LASP1-KO *in vitro* erhoben und mit LASP1-exprimierenden Zellen verglichen.

3.2.1 Isolation von Monozyten aus murinem Knochenmark

Monozyten wurden mit Hilfe des „BM Monocyte Isolation Kit“ von Miltenyi Biotec aus der Knochenmarkszellsuspension isoliert. Oliva-Martin und Kollegen beschrieben dies als die effektivste Methode der Monozytenisolation (Oliva-Martin, Sanchez-Abarca, Carrillo-Jimenez, Perez-Simon, & Venero, 2015). Um aussagekräftige *in vitro*-Versuche mit Monozyten machen zu können, benötigt man eine reine, unveränderte Monozytenpopulation. Durch die indirekte, immunomagnetische Separation, bei der alle nicht-monozytären Zellen markiert werden, wird eine Aktivierung von Monozyten durch Bindung von Antikörpern vermieden. Zudem führt die Isolation von Monozyten aus dem Knochenmark zu einer deutlich höheren Ausbeute als aus dem Blut. Mit genanntem Kit kann daher eine große Anzahl an Monozyten mit hoher Reinheit bei verhältnismäßig geringer Anzahl benötigter Mäuse erzielt werden (Oliva-Martin et al., 2015). Die Reinheit der isolierten Monozyten wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die isolierten Zellen wurden auf CD11b- V500, CD115- PE, LY6G- V450 gefärbt. Wie in der Abbildung 3-3 exemplarisch dargestellt, betrug der Anteil der Zellen mit Monozytenmerkmalen (CD11b⁺, CD115⁺, Ly6G⁻) mindestens 80 %.

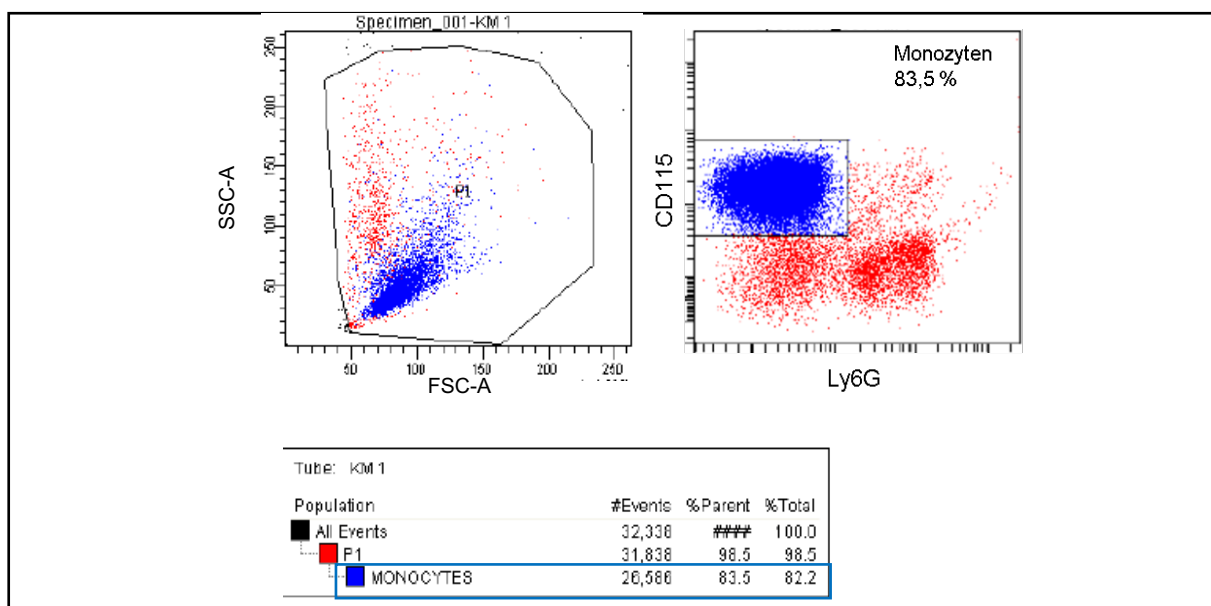


Abbildung 3-3: Punktwolkendiagramm zur Bestimmung des Anteils der Monozyten in der Zellsuspension, isoliert aus murinem Knochenmark mittels „BM Monocyte Isolation Kit“ von Miltenyi. Über 80% (siehe blauer Kasten) der insgesamt vorhandenen Zellen wiesen die Merkmale eines Monozyten auf (CD11b⁺, CD115⁺, Ly6G⁻). Es war nur wenig Zellschrott vorhanden.

3.2.2 Herstellung des LASP1-PE-Antikörpers

Um die Proteinexpression von LASP1 mittels Durchflusszytometrie messen zu können, wurde der LASP1 Antikörper dp-LASP-171 (pan1180) mittels des PE-Konjugations-Kit von *Abcam* an R-Phycoerythrin gekoppelt.

3.2.2.1 *Überprüfen des LASP1-PE Antikörpers per Immunfluoreszenz*

Die Funktionalität und Spezifität des Antikörpers wurde zunächst durch Färbung von murinen Makrophagen, ausgesät auf einem Objektträger, überprüft. Nach Ausdifferenzierung der Zellen an Tag 7 erfolgte die Färbung des Aktinzytoskeletts mit Phalloidin *oregon green* und von LASP1 mittels des konjugierten dp-LASP-171 (pan1180) -PE Antikörper. Die Bilder wurden am Fluoreszenzmikroskop (BZ 9000, Keyence) aufgenommen.

LASP1 zeigte sich an den Prädilektionsstellen angereichert, d.h. besonders in der Zellperipherie und perinuklear zeigte sich verstärkt ein rotes Signal (Abb. 3-4; A). Der Kern selbst wurde nicht durch den LASP1-Antikörper markiert. Die Negativ-Kontrolle zeigte kein LASP1-positives Signal (Abb. 3-4; B). Es handelte sich dementsprechend um eine spezifische LASP1-Färbung.

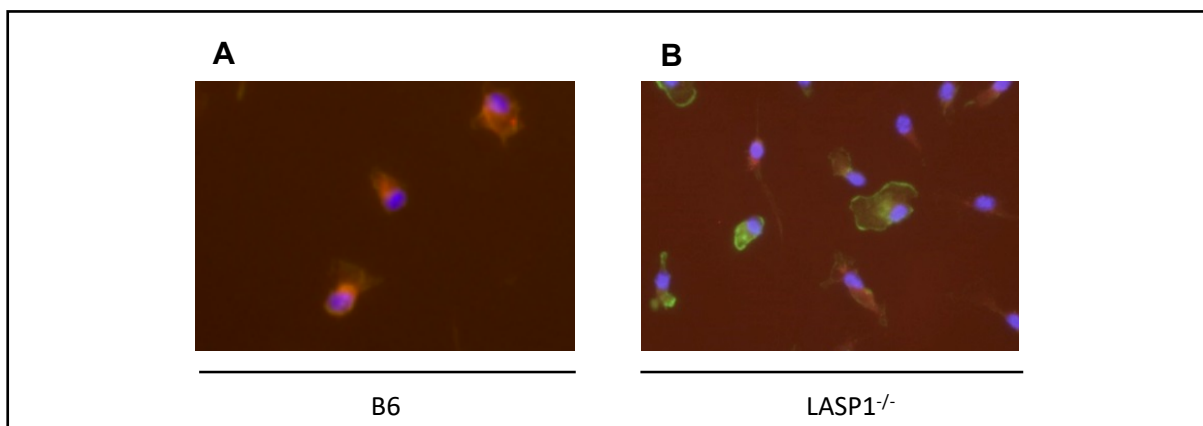


Abbildung 3-4: Immunfluoreszenz von Makrophagen gefärbt mit LASP1-PE Antikörper. Kerndarstellung in blau mittels DAPI-Färbung, Aktinzytoskelett mittels Phalloidin oregon green in grün, LASP1-PE zeigte eine rote Fluoreszenz. Darstellung als Überlagerung der drei Farben. A: Makrophagen aus Wildtyp (B6-Maus); B: BMDMs, stammend aus einer LASP1^{-/-}-Maus.

3.2.2.2 *Ermittlung der Konzentration und des passenden Hersteller-Kits zum Einsatz des LASP1-PE Antikörpers in der Durchflusszytometrie*

Der Antikörper LASP1-PE wurde nun per Durchflusszytometrie auf Spezifität geprüft. Es wurden Milzen von B6- und LASP1^{-/-}-Mäusen verwendet und eine Monozyten-spezifische Färbung durchgeführt (Antikörpermix: CD45- APC-Cy7,

CD11b- PerCP- Cy5.5, CD115- APC, LASP1-PE). Es wurde sowohl das Reaktionskit für intrazelluläre Färbung für die Durchflusszytometrie der Firma *BD* (BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/ Permeabilization Solution Kit), als auch das der Firma *eBioscience* (FIX & PERM™ Cell Permeabilization Kit) getestet. Der Antikörper LASP1-PE wurde jeweils 1:50 und 1:100 verwendet.

Wie in Abb. 3-5 deutlich wird, führte das Färben mittels des Reaktionskit von *eBioscience* zu einer besseren Differenzierbarkeit zwischen B6- und LASP1^{-/-}-Zellen. Als weiteres Ergebnis konnte festgestellt werden, dass bereits eine Antikörperkonzentration von 1:100 zu einem aussagekräftigen LASP1-Nachweis führte. Der gelabelte LASP1-PE-Antikörper wurde daher in zukünftigen Versuchen in der Verdünnung 1:100 in der intrazellulären Färbung mittels *eBioscience*-Kit eingesetzt.

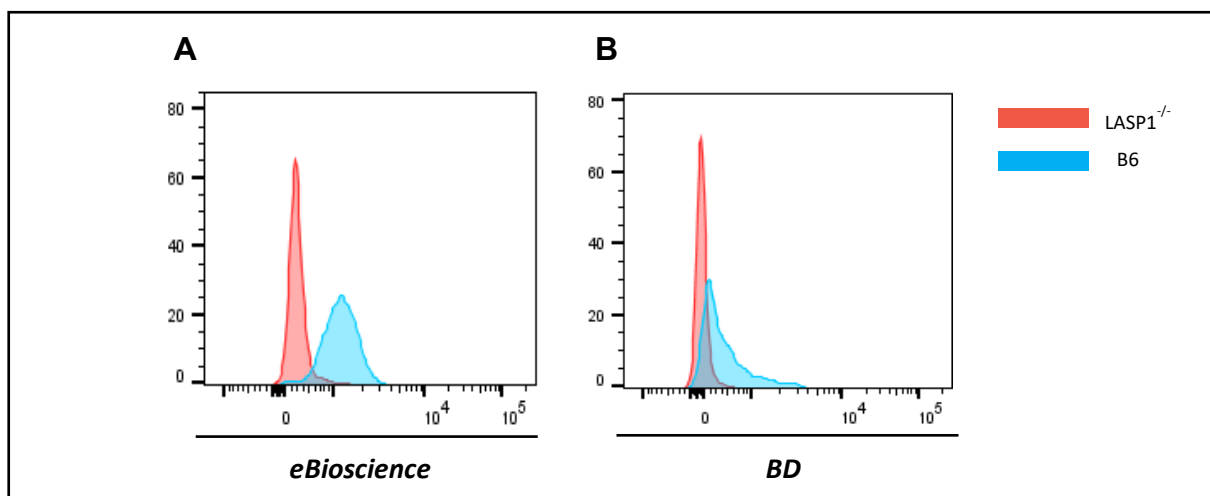


Abbildung 3-5: Vergleich der Reaktionskits für intrazelluläre Färbung für die Durchflusszytometrie der Firmen *eBioscience* und *BD* in Bezug auf die Detektion der LASP1-PE-Fluoreszenz. Durchflusszytometrisch erhobene Histogramme zur PE-Fluoreszenz nach intrazellulärer Färbung von Milzmonozyten mittels LASP-PE-Antikörper (jeweils 1:100). Intrazelluläre Färbung mittels des *eBioscience*-Kits (s. A), mittels des *BD*-Kits (s. B).

3.2.3 In vitro-Flow-Assay zur monozytären Adhäsion an Endothel

Für die Initiierung der Adhäsionskaskade der Monozyten an das Endothel sind *shear stress*-Bedingungen essentiell (Gerhardt & Ley, 2015). Um den Versuchsaufbau dem physiologischen intraarteriellen Zustand möglichst ähnlich nachzuempfinden, wurde das Adhäsionsverhalten der Monozyten daher unter Flussbedingungen untersucht. Dazu wurde das *Ibidi*-Flusssystem eingesetzt, da es einen kontinuierlichen, unidirektionalen Fluss ermöglicht. Die Adhäsion der Knochenmarksmonozyten wurde unter laminaren Flussbedingungen und geringem *shear stress* (1,5 dyn/cm², Druck von 3 mbar, Fließgeschwindigkeit von 1,15 ml/Min, Zyklusdauer von 20 s) untersucht.

In den *in vitro*-Versuchen wurde eine Monozytenpopulation mit hohem Anteil an Ly6C^{high}-Monozyten eingesetzt, da es *in vivo* unter inflammatorischen Bedingungen zur Ausschwemmung von unreifen Ly6C^{high}-Monozyten aus dem Knochenmark ins

Blut kommt. Im Gegensatz zu reifen Ly6C^{low}-Monozyten exprimieren diese mehr Adhäsionsrezeptoren und eine erhöhte Zahl an CCR2 auf der Zelloberfläche - beides wichtige Parameter zur Zellrekrutierung an das Endothel (Woollard & Geissmann, 2010).

Weil die Isolierung und Primärkultur von Endothelzellen aus murinen Aortae äußerst aufwendig sowie die Zellausbeute gering ist, wurde die Zelllinie b.End5 verwendet. Die konfluente Endothelzellschicht (Abb. 3-6; B) wurde zur Aktivierung für 18 h mit TNF α am Vorabend des Versuchs stimuliert. Die Monozyten wurden kurz vor dem Versuch mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff CFSE gefärbt (Anmerkung: Eine Färbung mit *Calcein AM* führte zu nicht detektierbaren Signalen, da es zu Interferenz mit dem im Endothelzellmedium enthaltenen Phenolrot kam). Unmittelbar vor Zugabe in das Flusssystem erfolgte die Aktivierung der Monozyten mittels einer 6 mM Magnesium-Calcium Lösung. Die b.End5-Zellen wurden für 5 Min mit Monozyten perfundiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden adhärenen Zellen an acht verschiedenen Stellen des μ -Slides pro Sichtfeld (ca. 1 mm²) ausgezählt (s. Abb. 3-6; C).

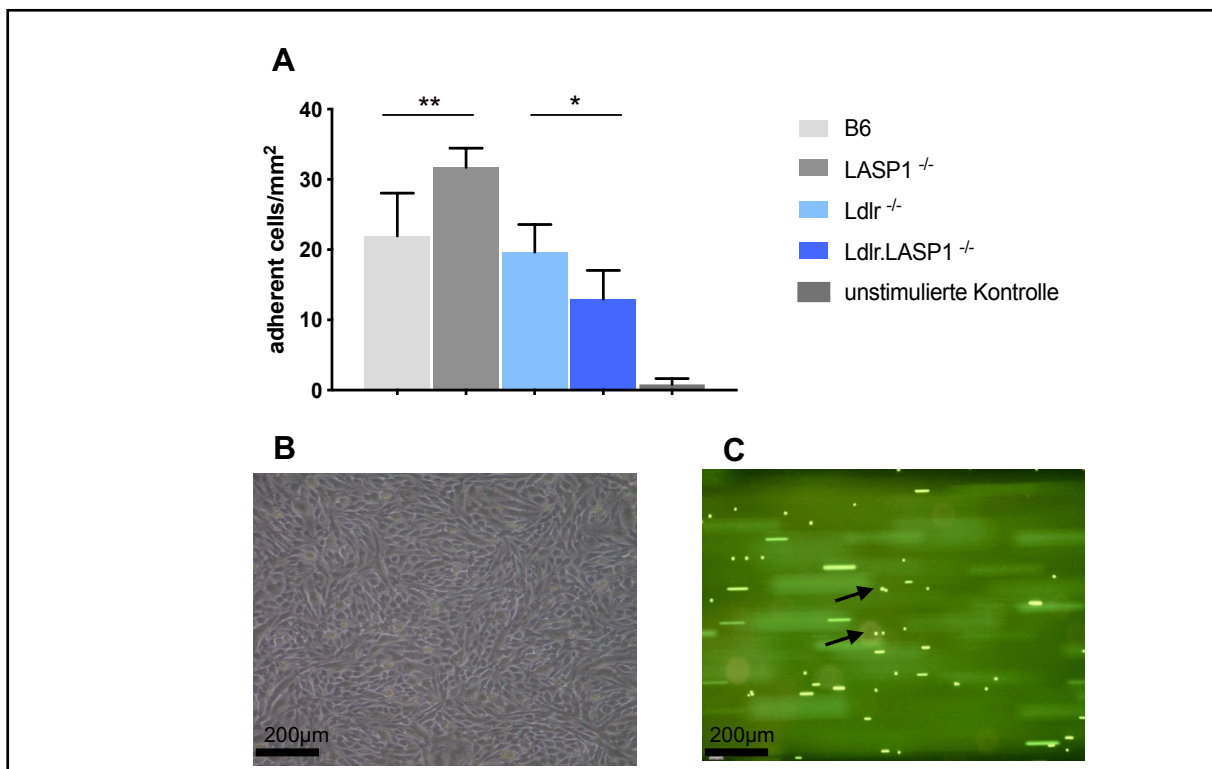


Abbildung 3-6: Quantifizierung der adhärenen Monozyten auf aktiviertem Endothel. A) CFSE-markierten Monozyten perfundierten 5 Min über einen mit TNF α aktivierten b.End5 -Endothelzellen bewachsenen Ibidi-Slide. Die Auswertung erfolgte über die Zählung der adhärenen Monozyten pro 1 mm². Nicht stimulierte Endothelzellen fungierten als Negativkontrolle. B6 vs. LASP1^{-/-}: p=0,006; Ldlr^{-/-} vs. Ldlr.LASP1^{-/-}: p=0,02; n=6. B: Durchlichtmikroskopische Aufnahme des Ibidi-Slides mit konfluenter b.End5-Endothelzellschicht. C: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach 5-minütiger Perfusionszeit mit CFSE-markierten Monozyten. Adhärenen Monozyten wurden exemplarisch mit Pfeilen markiert. Vergrößerung: x10.

Wie in Abbildung 3-6, A ersichtlich zeigte sich das Adhäsionsverhalten von LASP1^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu B6-Mäusen signifikant erhöht (p= 0,006). Der doppelte KO von sowohl des Ldlr als auch von LASP1 führte dagegen zu einer signifikanten

Verminderung der Zahl adhärerender Monozyten ($p=0,02$). Die Zahl haftender Monozyten war bei B6 und Ldlr-defizienten Mäusen vergleichbar ($p= 0,48$). Pro Genotyp wurden Monozyten aus je 6 Mäuse entnommen. Auf nicht aktiviertem Endothel (also bei fehlender TNF α -Stimulation) konnten nur vereinzelt adhärenente Monozyten nachgewiesen werden (s. Abb. 3-6; A; unstimulierte Kontrolle).

3.2.4 In vitro-Migrations-Assay der Monozyten mit CCL2 als Lockstoff

In der Atherogenese folgt auf die monozytäre Endotheladhäsion die Transmigration der Monozyten, einem Chemokingradienten folgend (u.a. CCL2), in die Intima hinein (Libby et al., 2019). Basierend auf den Daten aus der Krebsforschung (Orth et al., 2015) wurde eine verminderte Migration der Monozyten nach LASP1-KO angenommen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Untersuchung des migratorischen Verhaltens der Monozyten eine *Boyden Chamber* eingesetzt. Durch Trennung der beiden Kompartimente der Boyden-Kammer mittels einer porendurchsetzten Membran entsteht ein abnehmender Konzentrationsgradient von der unteren Kammer, welche das Chemoattraktand enthält, hin zur oberen Kammer. Parallel dazu findet Zellmigration von der oberen Kammer Richtung höherer Ligandkonzentration in die untere Kammer statt. Dies wurde genutzt, um den Prozess der positiven Chemotaxis von Monozyten durch das arterielle Endothel zu simulieren. Die Porengröße betrug 5 μm (8 μm zeigte sich für murine Knochenmarksmonozyten zu groß). BSA wurde aufgrund seiner positiven Eigenschaften zur Stabilisierung und zum Schutz vor oxidativen Schädigungen dem Medium beigefügt. Bei Monozyten handelt es sich um nicht adhärenente Zellen. Es wurden daher nicht die Zellen, welche an der Unterseite der Membran hafteten, gezählt, sondern die Zahl transmigrierter Monozyten im unteren Kompartiment der Boyden-Kammer mittels *CellTiterGlo* bestimmt (Kapitel 3.3.5). Das Beschichten der Membran mit Fibronectin und anschließendem Anfärben adhärenenter Monozyten an der Membranunterseite mittels Kristallviolett zeigte nur wenig Zellen und keine auswertbaren Ergebnisse und wurde daher als Methode verworfen.

CCL2 fungierte als Lockstoff (FCS als Nährstoff und damit Lockstoff im unteren Kompartiment hatte keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten der Monozyten). Es wurden jeweils Triplikate einer Maus-Probe angelegt und daraus der Mittelwert berechnet. Auch wurde immer mindestens eine Negativkontrolle ohne Lockstoff eingesetzt, wobei hier über alle Genotypen hinweg unter 5 % der Zellen migrierten. Im Gegensatz dazu zeigte sich unter Zugabe von CCL2 eine 10 bis 15 %ige Migrationsrate der Monozyten durch die porendurchsetzte Membran hin zu höheren CCL2-Konzentrationen (Abb. 3-7). Der Versuch wurde mit je 6 Mäusen pro Genotyp durchgeführt. Wie in der Abbildung 3-7 erkenntlich, fiel die Zahl transmigrierter LASP1^{-/-}-Monozyten signifikant geringer aus im Vergleich zu Kontroll-Monozyten mit LASP1-Expression (B6 vs. LASP1^{-/-}: $p=0,017$; Ldlr^{-/-} vs. Ldlr.LASP1^{-/-}: $p=0,004$). Insgesamt migrierten ca. 35 % weniger LASP1^{-/-}-Monozyten im Vergleich zur LASP1-

exprimierenden Kontrollgruppe. Überraschenderweise migrierten in der Kontrollgruppe ohne CCL2-Zusatz signifikant mehr Monozyten ($p=0,017$), welche keinen LDL-Rezeptor exprimierten im Vergleich zu solchen ohne den Ldlr-KO bzw. Ldlr.LASP1^{-/-} Monozyten. Dieser Effekt relativierte sich nach CCL2-Zusatz ins untere Kompartiment und war dann nicht mehr nachweisbar. Ein Einfluss des LDL-Rezeptors auf das Migrationsverhalten von Monozyten ist diesen Daten zufolge nicht auszuschließen.

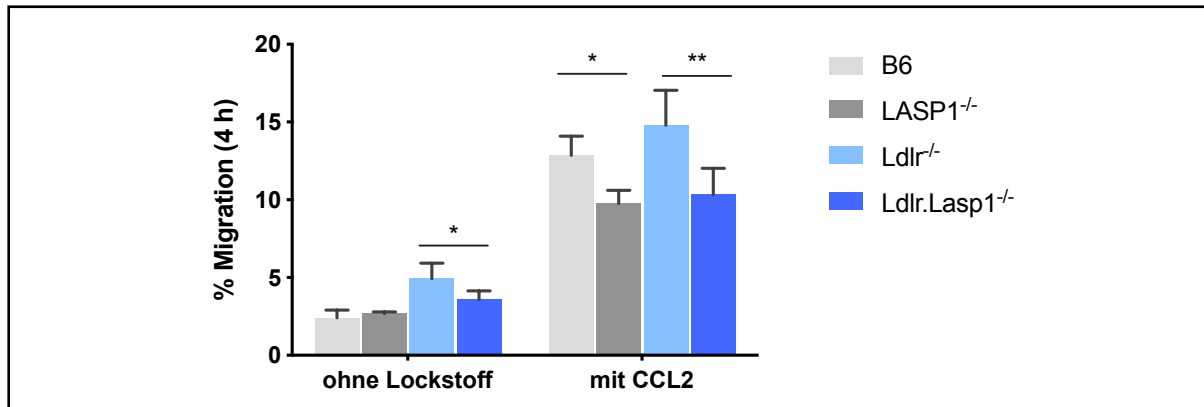


Abbildung 3-7: Darstellung des Prozentsatzes der migrierten Zellen an der Gesamtzellzahl. A) Nach einer Inkubationszeit von 4h wurden die Knochenmarksmonozyten, welche dem CCL2-Chemokingradienten folgend in das untere Kompartiment migrierten, per CellTiterGlo quantifiziert. Die Standardabweichung stammt aus 3 unabhängigen Experimenten. Es wurde sowohl die Migration der Monozyten ohne Zugabe eines Chemoattractant und als auch bei CCL2-Zusatz untersucht. Es zeigt sich eine signifikant geminderte Migrationsrate nach LASP1^{-/-} Depletion. B6 vs. LASP1^{-/-}: $p=0,017$; Ldlr^{-/-} vs. Ldlr.LASP1^{-/-}: $p=0,004$; $n=6$ in Triplikaten.

Zusammenfassend konnte in Ldlr.LASP1^{-/-} im Vergleich zu Ldlr^{-/-}-Monozyten eine signifikante Reduktion der endothelialen Adhäsionsrate sowie der CCL2-vermittelten Migrationsrate *in vitro* in Kongruenz zu den vorbekannten Daten aus der Literatur festgestellt werden.

3.3 TNF α -Sekretion durch M1-Makrophagen

Die Transkription von TNF α wird maßgeblich über die Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 gesteuert. Diese stehen am Ende einer Signalkaskade, die durch Aktivierung des TLR-4 durch Liganden wie z.B. LPS, in Gang gesetzt wird (Kishore et al., 2004). Eine indirekte Interaktion von LASP1 mit NF κ B und AP-1 ist in der Literatur beschrieben worden (Endres et al., 2016; Sun et al., 2017). Auf Basis dieser Daten wurde postuliert, dass LASP1 die Transkription von TNF α und damit dessen Sekretion durch Wechselwirkung mit NF κ B bzw. AP-1 in M1-Makrophagen steigern könnte, sodass ein pro-inflammatorisches, also pro-atherosklerotisches Milieu innerhalb der Plaques gefördert wird.

3.3.1 Transkription und Protein-Expression von TNF α sowie TNF α -Sekretion durch Makrophagen nach LPS-Stimulation

Die mRNA-Expression von TNF α wurde mittels qPCR in M1-Makrophagen im Vergleich zu nicht-stimulierten Proben (M0-Makrophagen) untersucht.

BMDMs (aus je 3 Mäusen pro Genotyp) wurden nach abgeschlossener Differenzierung nach einer 6-stündigen Hungerphase in nährstofffreiem Medium mit LPS (100 ng/ml) für 20-24 h stimuliert, um so die Polarisierung zu M1-Makrophagen anzuregen und die Signalkaskade über den TLR-4 zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 zu starten (Kapitel 1.1.5; Abb. 1-6). Anschließend wurden RNA-Isolierung, c-DNA-Synthese und qPCR angeschlossen. M0-Makrophagen dienten als interne Kontrolle. Als Referenzgen wurde Rplp0 (ribosomales Protein, large, P0, ein Bestandteil der 60S Untereinheit des Ribosoms) verwendet. Die Stimulation mit LPS führte, wie erwartet, zu einer deutlich höheren Expression von TNF α -mRNA. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der relativen mRNA-Expression bzgl. TNF α zwischen LASP1^{-/-} / Ldlr.LASP1^{-/-}-Makrophagen und Kontrollzellen (B6- und Ldlr^{-/-}-Zellen) festgestellt werden (s. Abb. 3-8; A).

Neben der Transkription von TNF α wurde auch die Proteinexpression durch *Western Blot* (WB)-Analyse und die Freisetzung des Zytokins ins Medium mittels ELISA nach LASP1-KO bestimmt. Nach der Proteinauftrennung lysierter M1-Makrophagen durch das SDS-Page-Verfahren konnte im *Western Blot* mittels eines monoklonalen TNF α -Antikörpers das TNF α -Protein detektiert werden. Das Strukturprotein Aktin wurde als Ladungskontrolle verwendet. Die membrangebundene bzw. intrazelluläre Form von TNF α zeigte sich bei 26 kDa, die lösliche Form, nach proteolytischer Spaltung durch ADAM17, bei 17 kDa (Abb. 3-8; C). Eine Unterscheidung zwischen der membrangebundenen, bzw. intrazellulären Form von TNF α war nicht möglich. Lösliches TNF α kann zudem Homotrimere bilden und dann auf Höhe von 51 kDa detektiert werden (Parameswaran & Patial, 2010). Eine klare Abgrenzung dieser Bande war jedoch in unseren Blots nicht möglich. Die Zunahme der Aktinladungskontrolle in M1-Makrophagen spiegelte die Proliferationssteigerung der Zellen nach LPS-Stimulation wider. Insgesamt konnten keine quantitativen Unterschiede in der TNF α -Proteinexpression zwischen LASP1^{-/-}- und Kontroll-Makrophagen festgestellt werden.

Zur Untersuchung der Sekretion von TNF α in den Zellüberstand durch murine Makrophagen wurde der Zellüberstand von konfluenten M1-Makrophagen abgenommen. Mittels ELISA wurde die Konzentration von TNF α im Zellüberstand bestimmt. Parallel wurde die Zellzahl als interne Kontrolle ermittelt und das Ergebnis des ELISAs entsprechend der Zellzahl angeglichen. Wie bereits in der WB-Analyse detektiert, bestätigte sich auch hier in der Zellzahlbestimmung eine Proliferationssteigerung der Makrophagen durch LPS-Stimulation. Im Zellüberstand von M0-Makrophagen konnte nur minimal TNF α nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Konzentration der löslichen Form von TNF α im Zellüberstand von M1-

Makrophagen zeigte sich nach LASP1-KO nicht verändert zu LASP1-exprimierenden Makrophagen (Abb. 3-8; B). Ein Einfluss von LASP1 auf die Sekretion von TNF α ist daher nicht anzunehmen.

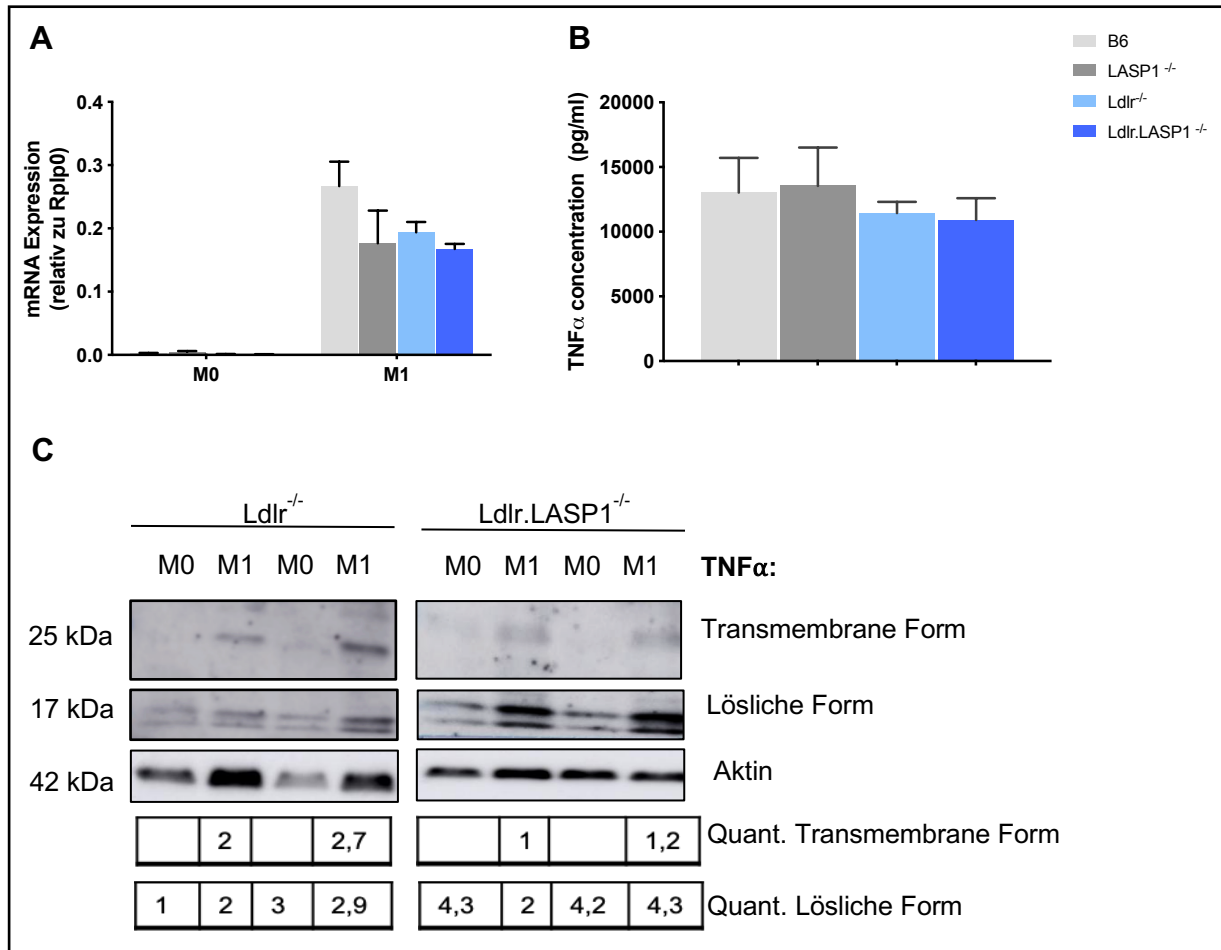


Abbildung 3-8: Unveränderte TNF α -Expression auf mRNA-, Protein-Ebene und im Zellüberstand nach LASP1-KO. A) qPCR der TNF α -Expression relativ zu Rplp0 (Housekeeping-Gen) in BMDMs. Die Transkription des TNF α -Gens wurde durch 18-stündige LPS-Stimulation aktiviert. M1-Makrophagen wurden vergleichend aus B6, LASP1^{-/-}, Ldlr^{-/-} und Ldlr.LASP1^{-/-} Mäusen gewonnen und auf den RNA-Gehalt bzgl. des TNF α -Gens untersucht. Die Expression differierte nicht signifikant zwischen den verschiedenen Genotypen. n=3. B) Quantitative TNF α -Bestimmung im Zellüberstand von M1-Makrophagen mittels ELISA. BMDMs der verschiedenen Genotypen wurden mittels 18-stündiger LPS-Stimulation zur Sekretion des Zytokins angeregt. Eine Differenz der TNF α -Konzentration im Zellüberstand nach LASP1-KO war nicht zu detektieren. n= 5. C) Western Blot zur Proteinexpression von TNF α in Ldlr^{-/-} und Ldlr.LASP1^{-/-} BMDMs. Nach 18-stündiger LPS-Stimulation wurden M1-Makrophagen generiert und vergleichend zu nicht-stimulierten M0-Makrophagen auf die Proteinexpression der transmembranen (26 kDa) und löslichen Form (17 kDa) von TNF α untersucht. Es konnte keine quantitative Differenz zwischen den verschiedenen Genotypen detektiert werden. Als Ladungskontrolle wurde Aktin verwendet. Die Zunahme der Aktinladungskontrolle in M1-Makrophagen spiegelte die Proliferationssteigerung der Zellen nach LPS-Stimulation wider.

3.3.2 Transkription von ADAM17 und Proteinexpression nach LPS-Stimulation

Die Transkription der *Sheddase* ADAM17, die maßgeblich an der Sekretion von TNF α beteiligt ist, wird wie jene von TNF α durch Aktivierung des TLR4 initiiert. In murinen Endothelzellen konnte nach Stimulation mit LPS eine gesteigerte ADAM17-Expression beobachtet werden (Wawro, Wawro, Strzelecka, Czarnek, & Bereta, 2019). ADAM17 wurde als Faktor in der Pathogenese vieler inflammatorischer Krankheiten, wie z.B. Atherosklerose und Krankheiten des rheumatoiden Formenkreises beschrieben. Nicolaou und Kollegen konnten ADAM17 eine atheroprotektive Rolle zuschreiben (Nicolaou et al., 2017). Zudem ließen Untersuchungen einer kooperierenden Arbeitsgruppe in Kanada (AG Krepinsky) eine Interaktion zwischen LASP1 und ADAM17 vermuten (unveröffentlichte Daten). Daher wurden, trotz der negativen Ergebnisse bzgl. der TNF α -Sekretion, qPCRs und WB-Analysen zur Quantifizierung der ADAM17-Expression muriner BMDMs nach LASP1-KO durchgeführt. Zur Aktivierung der Transkription von ADAM17 wurde wiederum LPS eingesetzt und M1-Makrophagen generiert. Die Ergebnisse der qPCR wurden in Relation zu Rplp0 als Referenzgen erhoben. Die relative mRNA-Konzentration von ADAM17 wurde durch die Depletion von LASP1 nicht beeinflusst (Abb. 3-9; A). Die Expression zeigte ein ähnliches Ergebnis zwischen den verschiedenen Genotypen. Es wurden 6 Mäuse je Genotyp eingesetzt. Im *Western Blot* zeigte sich auf Proteinebene ebenfalls kein quantitativer Unterschied des ADAM17-Levels zwischen *Ldlr*^{-/-} und *Ldlr.LASP1*^{-/-} Makrophagen (s. Abb. 3-9; B).

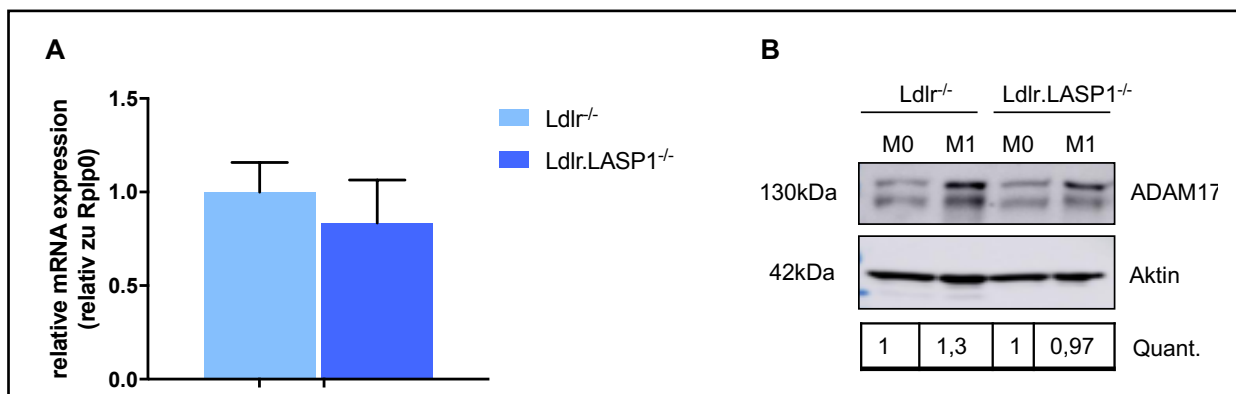


Abbildung 3-9: Unveränderte Transkription und Proteinexpression von ADAM17 nach LASP1-KO. A) qPCR zur Quantifizierung der Transkription des ADAM17-Gens in M1-Makrophagen, stammend aus *Ldlr*^{-/-} und *Ldlr.LASP1*^{-/-} BMDMs. Der LASP1-KO beeinflusste die Genexpression von ADAM17 in LPS stimulierten BMDMs nicht. $p=0,2$; $n=6$. B) WB zur Proteinexpression von ADAM17 in *Ldlr*^{-/-} und *Ldlr.LASP1*^{-/-} BMDMs. Erwartungsgemäß war ein erhöhter Nachweis der ADAM17-Expression in LPS-stimulierten M1-Makrophagen aus B6-Mäusen zu beobachten. Der LASP1-Knockout hatte keinen Einfluss auf die ADAM17 Konzentration in den Zellen.

3.3.3 Nukleare Lokalisation von LASP1 in Makrophagen nach CXCL12-Stimulation

Die beschriebene Interaktion von LASP1 mit AP-1 bzw. NF κ B (Endres et al., 2016; Sun et al., 2017) fand bei nuklearer Akkumulation von LASP1 statt. Ein vermehrtes Vorkommen von LASP1 im Zellkern wurde in verschiedenen Krebsarten beobachtet und zeigte eine direkte Korrelation mit einer Verkürzung der Lebenszeit betroffener Patienten (Orth et al., 2015). Es ist bekannt, dass LASP1 unter anderem in Brustkrebszellen, nach Phosphorylierung durch die PKA an S146, mittels ZO-2 als Shuttleprotein in den Zellkern wandert und dort akkumuliert (Mihlan et al., 2013). Studien der Arbeitsgruppe Raman zeigten zudem eine Translokation von LASP1 in den Zellkern 15 Min nach CXCR4-Stimulation in metastierten humanen Brustkrebszellen (MDA-MB-231S) (Duvall-Noelle et al., 2016). B6- und Ldlr^{-/-}-Makrophagen verfügen nachweislich ebenfalls über einen CXC- Rezeptor 4 (Weber, Doring, & Noels, 2016). Um diese Signalkaskaden in besagten Zellen näher zu untersuchen, wurden BMDMs zur Kern-Zytosol-Trennung mittels „NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents“ von Thermo Fisher geerntet.

Wie in der Abbildung 3-10 erkennbar, konnte ein Nachweis von LASP1 in unstimulierten B6- und Ldlr^{-/-}-Kontroll-Makrophagen ausschließlich in der Zytosolfraction, jedoch nicht im Zellkern erbracht werden. Als Positivkontrolle für die LASP1-Kernlokalisierung wurden MDA-MB- 231S Zellen (Brustkrebszelllinie aus dem Laborbestand) aufgetragen (Abb. 3-10, Bande links). In der WB-Analyse konnte weder Lamin A/B (ein kernspezifisches Protein) in der Zytosolfraction, noch GAPDH, welches physiologischerweise nicht im Kern vorkommt, in der Kernfraction nachgewiesen werden. Damit war die Aufreinigung frei von Kreuzkontamination.

Eine CXCL12-Stimulation (200 ng/ml an Minute 0, 1, 5, 10, 20) bedingte in murinen Makrophagen ebenfalls keine Relokalisierung von LASP1 in den Kern (s. Abb. 3-10; A). Um sich im Zusammenschluss mit ZO-2 von der Zellmembran zu lösen, ist die Phosphorylierung von LASP1 an S146 mittels PKA nötig (Mihlan et al., 2013). Die Kern-Zytosol-Trennung wurde dementsprechend nach vorhergehender Stimulation der Makrophagen mit cBIMPS, einem PKA-Aktivator, wiederholt. Zur Verifizierung der erfolgreichen Stimulation wurde die Phosphorylierung von VASP, einem Gerüstprotein, welches nachweislich nach PKA-Aktivierung phosphoryliert wird (Benz et al., 2009; Butt et al., 1994), in den Homogenatproben kontrolliert. Der Höhepunkt der Stimulation zeigte sich nach 5 Min (s. Abb. 3-10; B). Auch nach PKA-Aktivierung war kein LASP1 in der Kernfraction nachweisbar (Abb. 3-10; A). Als Kontrolle der erfolgreichen CXCR4 Stimulation wurde die Phosphorylierung von ERK (p44/42) positiv detektiert (Busillo & Benovic, 2007). Nach 5-minütiger CXCL12-Stimulation wurde bereits eine gesteigerte Phosphorylierung gesehen (Abb. 3-10; C). Negativ war zudem der Nachweis des LASP1 Shuttlepartners ZO-2 (Mihlan et al., 2013) in den B6 und Ldlr^{-/-} Makrophagen (Abb. 3-10; A).

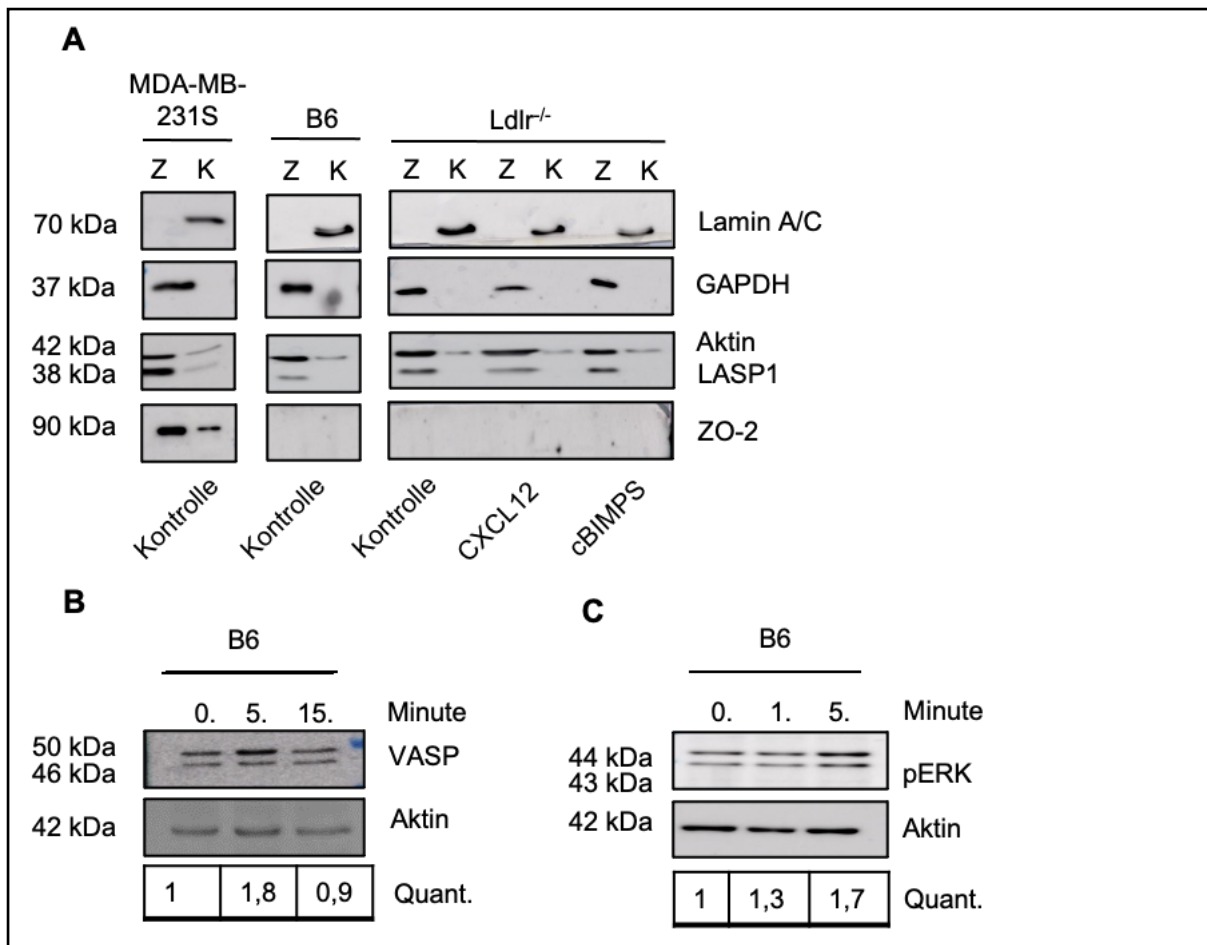


Abbildung 3-10: Keine LASP1-Detektion in der Kernfraktion in Makrophagen ohne Stimulation/ nach CXCL12-Stimulation/ nach PKA-Aktivierung. A) Western Blot zur LASP1-Detektion in Kern (K)- und Zyotsol (Z)-Fraktionen von B6- und Ldlr^{-/-}-Makrophagen. Bezüglich CXCL12-/ cBIMPS-Stimulation wurden verschiedene Inkubationszeiten (0, 1, 5, 10, 20 Minuten) getestet, hier exemplarisch nach 5-minütiger Stimulationszeit dargestellt. Mittels GAPDH und Lamin A/C wurde eine Verunreinigung der Kern- und Zyotsolfraktion ausgeschlossen. Aktin wurde als Ladungskontrolle verwendet und war in der Zyotsolfraktion erwartungsgemäß höher exprimiert. Das LASP1-Zyotsol-Kern-Shuttelprotein ZO-2 konnte in murinen Makrophagen nicht nachgewiesen werden. In der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231S waren erwartungsgemäß sowohl nukleares LASP1 als auch ZO-2 detektierbar. B) Western Blot zum Nachweis von VASP nach cBIMPS-Stimulation. Nachweis der VASP-Phosphorylierung durch Shift von 46 auf 50 kDa nach 5 Min cBIMPS-Stimulation (PKA-Aktivator) in BMDMs stammend aus einer B6-Maus nach 5-minütiger Stimulation. C) Western Blot der pERK-Phosphorylierung nach CXCR4-Stimulation mit CXCL12 in BMDMs stammend aus einer B6-Maus. Gesteigerte Phosphorylierung von Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) nach 5-minütiger Inkubation.

Zusammenfassend konnte kein Einfluss von LASP1 auf die Transkription des TNF α -Gens, auf die Proteinexpression oder auf die Konzentration von sekretiertem TNF α im Zellüberstand durch LASP1 nachgewiesen werden. Ebenfalls unbeeinflusst zeigte sich die mRNA- und Proteinkonzentration von ADAM17. Die Hypothese einer proatherogenen Wirkung von LASP1 über eine Steigerung der TNF α -Konzentration konnte damit nicht bestätigt werden. Eine Kern-Lokalisation von LASP1 in murinen BMDMs konnte weder in unstimulierten Zellen noch nach CXCR4-Aktivierung mittels CXCL12 beobachtet werden, was sich vermutlich durch das Fehlen des Shuttelpartners ZO-2 erklären lässt. Diese Ergebnisse lassen eine Interaktion von LASP1 mit Transkriptionsfaktoren in BMDMs als unwahrscheinlich erscheinen, was

sich mit den Ergebnissen zur unveränderten Transkriptionsrate von TNF α und ADAM17 durch den LASP1-KO deckt.

3.4 Schaumzellformation

Ein *in vivo*-Versuch der Arbeitsgruppe AG Zerneck zeigte ein erhöhtes aortales Plaquevorkommen in Mäusen mit dem Ldlr.LASP1^{-/-}-Genotyp im Vergleich zu Ldlr^{-/-}-Tieren unter HFD (unveröffentlichte Daten). Im Rahmen der Plaqueformation ist die Entwicklung von Makrophagen zu Schaumzellen durch Akkumulation von oxLDL im Zellinneren ein pathognomonischer Schritt. Es wurde daher untersucht, ob LASP1 einen Einfluss auf die Aufnahme von oxLDL durch Makrophagen und auf die Lipidakkumulation in Makrophagen hat.

3.4.1 LASP1-Expression in murinen Makrophagen nach oxLDL Stimulation *in vitro*

Wie unter 3.1 gezeigt, konnte LASP1 in atherosklerotischen Plaques in Makrophagen nachgewiesen werden. Der Einfluss hoher oxLDL-Konzentrationen auf die LASP1-Expression in Makrophagen wurde untersucht.

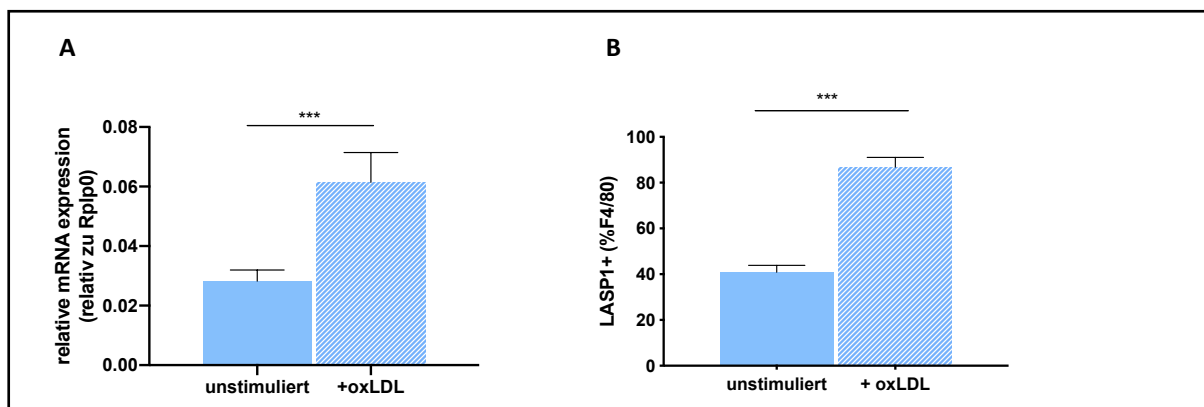


Abbildung 3-11: Gesteigerte LASP1-mRNA-Expression und erhöhter Prozentanteil von LASP1-positiven Ldlr^{-/-} Makrophagen nach oxLDL-Stimulation. A) qPCR des relativen LASP1 mRNA-Niveaus in Makrophagen nach 24-stündiger oxLDL (50 μ l/ml) Stimulation. Rplp0 wurde als Referenzgen verwendet. $p=0,0008$; $n=4$. B) Hochsignifikante Steigerung des Prozentanteils LASP1-exprimierender Zellen an der Gesamtzahl der Makrophagen nach oxLDL-Zugabe. $p=0,0001$, $n=3$.

Ausdifferenzierte BMDMs aus 4 Ldlr^{-/-}-Mäusen wurden für 5 h in nährstoffreiem Medium gehungert. Im Anschluss wurden die Zellen für 24 h in oxLDL-haltigem Medium (50 μ g/ml) inkubiert. Nach RNA-Isolierung sowie cDNA-Synthese wurde mittels qPCR der mRNA-Gehalt von LASP1 in Relation zu Rplp0 als *Housekeeping-Gen* quantifiziert. In der relativen mRNA-Expression zeigte sich, wie in Abbildung 3-11; A erkennbar, ein höchstsignifikanter Anstieg um mehr als den Faktor 2 ($p=0,0008$) von LASP1 nach oxLDL-Stimulation in Ldlr^{-/-}-Makrophagen. Im Weiteren wurde mittels Durchflusszytometrie der Prozentsatz der LASP1-positiven Ldlr^{-/-}-Makrophagen ($n=3$)

vor und nach oxLDL-Zusatz bestimmt. Ausdifferenzierte BMDMs wurden nach einer 5-stündigen Hungerperiode für 24 h mit 50 µg/ml oxLDL inkubiert. Zur Färbung wurde folgender Antikörper-Mix verwendet: L/D-PB, F4/80-APC, LASP1-PE. Wie in Abbildung 3-11; B zu sehen, führte die Zugabe von oxLDL zu einer Verdopplung des Prozentanteils LASP1-positiver Ldlr^{-/-}-Makrophagen von ca. 40% auf über 80% (p=0,0001) (s. Abb. 3-11; B).

3.4.2 Untersuchungen zur Schaumzellformation muriner Makrophagen *in vitro*

Zur Quantifizierung der Aufnahme von oxidiertem LDL wurden BMDMs für 6 h in nährstoff-freiem Medium gehungert und im Anschluss für 4 h mit 20 µg/ml *Dil* (3,3'-Diocadecyloxacarbo-cyanine) markiertem oxLDL inkubiert. Der Fluoreszenzfarbstoff *Dil* wurde auf der PE-Wellenlänge per Durchflusszytometrie gemessen und die Menge des aufgenommenen oxLDLs durch die BMDMs wurde auf diese Weise quantifiziert.

LASP1-defiziente Makrophagen nahmen wie in Abbildung 3-12; A zu sehen innerhalb von 4 h signifikant mehr oxLDL auf als die Vergleichsgruppe (B6 vs. LASP1^{-/-}: p=0,005; Ldlr^{-/-} vs. Ldlr.LASP1^{-/-}: p=0,025). Dieser Effekt wurde in drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten bestätigt (insgesamt n=7). Bei Zellen mit einem Ldlr^{-/-}-Hintergrund fiel die oxLDL-Aufnahme insgesamt geringer aus, was die Involvierung des LDL-Rezeptors in der Lipidaufnahme widerspiegelt. Es ist zu beachten, dass Makrophagen eine Autofluoreszenz aufweisen, sodass auch in der nicht-stimulierten Kontrollgruppe ein positives, wenn auch geringes Signal auf der PE-Wellenlänge zu detektieren war.

Die Schaumzellformation, also die Akkumulation von Lipidtröpfchen im Zellinneren, ist, neben der vermehrten Aufnahme von oxLDL, durch die reduzierte Ausscheidung von Cholesterolestern bedingt. Die Quantifizierung der Lipidakkumulation in BMDMs, nach einer 24-stündigen Hungerphase und 48-stündigen Inkubationszeit mit oxLDL (20 µg/ml) und einer NileRed-Färbung erfolgte in der Durchflusszytometrie. NileRed (9-diethylamino-5H-benzo-α-phenoxazine-5-one) ist ein hervorragender Vitalfarbstoff für die Detektion intrazellulärer Lipidtröpfchen und kann als rote Fluoreszenz (Anregung 515-560 nm; Emission größer als 590 nm) gemessen werden (Greenspan, Mayer, & Fowler, 1985). Allerdings führt die Färbung hauptsächlich hydrophober Strukturen, unter anderem von Zellmembranen, zu einer hohen Hintergrundfluoreszenz. Dies spiegelte sich in den hier erhobenen Daten wider (Abb. 3-12; B). Im Gegensatz zu der verstärkten Lipidaufnahme konnte keine signifikant gesteigerte Akkumulation von oxLDL in LASP1 defizienten Makrophagen gemessen werden (Abb. 3-12; B). Die Daten zeigten eine deutliche Tendenz hin zu vermehrter Schaumzellbildung in LASP1^{-/-}-Makrophagen, jedoch keine statistische Signifikanz (p=0,057). Der Versuch wurde mit je 4 Mäusen pro Genotyp durchgeführt.

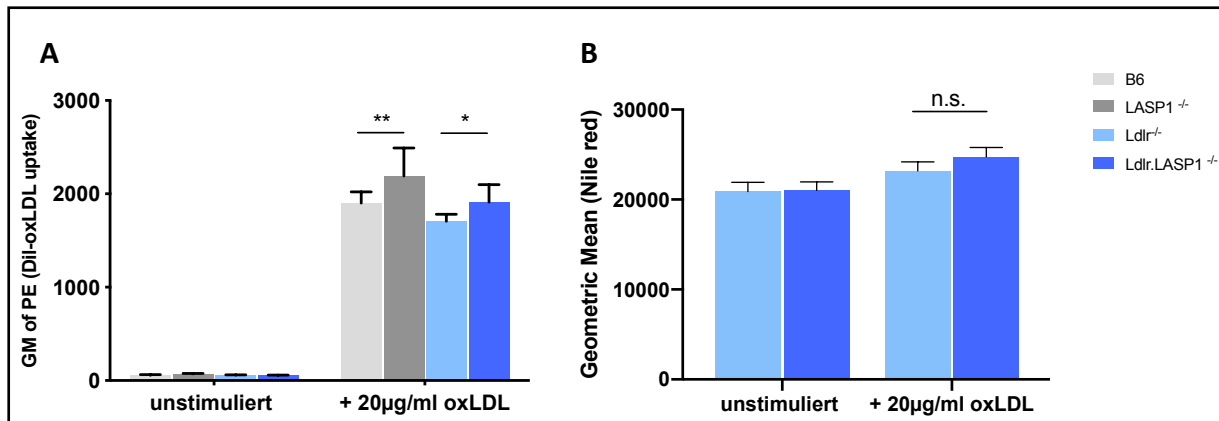


Abbildung 3-12: Erhöhte oxLDL-Aufnahme durch LASP1-defiziente Makrophagen. A) Durchflusszytometrische Quantifizierung der Aufnahme von Dil-markiertem oxLDL (20 µg/ml) nach 4-stündiger Inkubation. Darstellung des geometrischen Mittels der PE-Fluoreszenzintensität der Population lebender Zellen. B6 vs. LASP1^{-/-}: $p=0,005$; Ldlr^{-/-} vs. Ldlr.LASP1^{-/-}: $p=0,025$, $n=7$. B) Schaumzellquantifizierung nach NileRed-Färbung mittels FACS. Messung der Lipidakkumulation in Ldlr^{-/-} und Ldlr.LASP1^{-/-}-Makrophagen nach 48 h Stimulation mit oxLDL (20 µg/ml) auf PE-Wellenlänge nach NileRed-Färbung. Ein signifikanter Anstieg von unstimulierter Kondition zu stimuliert war sowohl in Ldlr^{-/-} ($p=0,01$) als auch in Ldlr.LASP1^{-/-}-BMDMs ($p=0,0003$) detektierbar. Dagegen konnte keine signifikante Steigerung durch den LASP1-KO gezeigt werden. Eine klare Tendenz zu vermehrter PE-Fluoreszenz bei LASP1^{-/-} Makrophagen nach oxLDL Stimulation ($p=0,057$) zeichnete sich jedoch ab. $n=4-5$.

3.4.3 Expression von Schlüsselregulatoren des Lipidmetabolismus in Makrophagen auf RNA-Ebene nach oxLDL-Stimulation

Die Aufnahme von oxLDL durch Makrophagen wird primär durch den Scavenger-Rezeptor vermittelt, wohingegen der Cholesterolefflux durch die Transporter ABCA1 und ABCG1 ermöglicht wird (Chistiakov, Melnichenko, Myasoedova, et al., 2017) (Kapitel 1.1.6).

BMDMs aus je 3 Ldlr^{-/-} und Ldlr.LASP1^{-/-}-Mäusen wurden nach einer Hungerperiode von 24 h in nährstoffreiem Medium für 24 h mit oxLDL inkubiert. Im Anschluss wurde die RNA isoliert, cDNA synthetisiert und die mRNA-Expression von CD36, ABCA1 und ABCG1 per qPCR mit *Rplp0* als Referenzgen bestimmt (Abb. 3-13).

Nach oxLDL-Stimulation kam es zur Steigerung der Expression aller drei Gene. Es wurden keine Unterschiede in der relativen mRNA-Expression von ABCA1 und ABCG1 nach LASP1-KO gesehen, weder in der Kontrollgruppe noch nach oxLDL-Stimulation. Es bestand eine höhere Expression von ABCA1 gegenüber ABCG1 in murinen Makrophagen. Passend dazu wird in der Literatur dem ABCG1 eine zweitrangige Rolle im Vergleich zu ABCA1 zugeschrieben (Chistiakov, Melnichenko, Myasoedova, et al., 2017). Auch scheint LASP1 keinen Einfluss auf die Transkription von CD36 nach oxLDL-Stimulation zu haben. Allerdings zeigten sich signifikant mehr CD36-mRNA-Kopien in Makrophagen aus Ldlr.LASP1^{-/-}-Mäusen als in Ldlr^{-/-}-Makrophagen der nicht-stimulierten Kontrollgruppe ($p=0,0012$). Nach oxLDL-Stimulation gleicht sich dieser Unterschied jedoch wieder an (Abb. 3-13). Es konnte

keine signifikante Steigerung der CD36-mRNA-Expression in *Ldlr.LASP1^{-/-}*- Mäusen nach oxLDL-Zusatz gesehen werden ($p=0,078$).

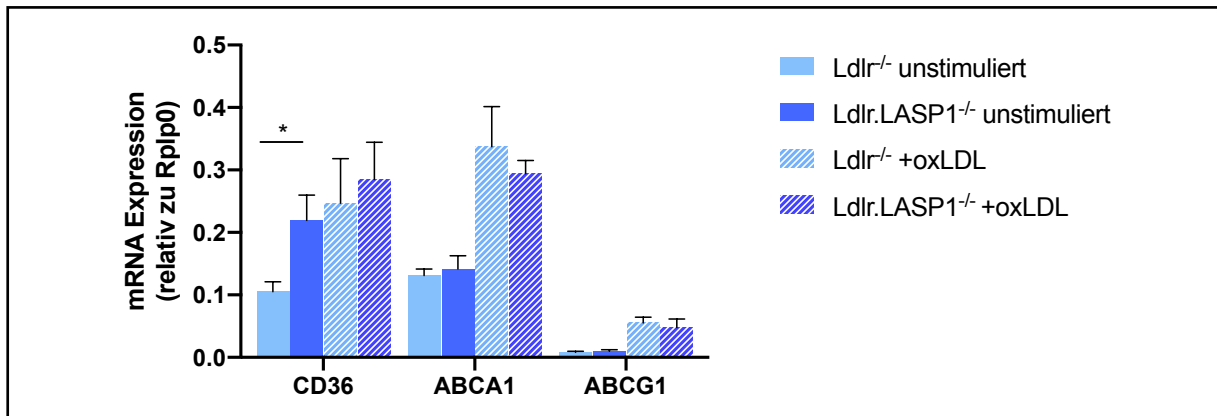


Abbildung 3-13: Relative mRNA-Expression von CD36, ABCA1, ABCG1 in BMDMs nach oxLDL-Stimulation. BMDMs aus *Ldlr^{-/-}* und *Ldlr.LASP1^{-/-}*- Mäusen wurden für 24 h mit 50 µg/ml oxLDL inkubiert und im Anschluss die relative mRNA-Expression zu *Rplp0* als Referenzgen bestimmt. Nach Zugabe von oxLDL in das Medium stieg die Transkriptionsrate aller drei Gene an. $n=3$; CD36 unstimuliert: $p=0,0012$; CD36-Expression in *Ldlr.LASP1^{-/-}*- Mäusen unstimuliert vs. stimuliert: $p=0,078$.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass *Ldlr^{-/-}*-Makrophagen *in vitro* auf hohe oxLDL-Konzentrationen im Zellmedium mit einer Hochregulierung der relativen mRNA-Expression von *LASP1* reagieren. Auch durchflusszytometrisch zeigte sich ein deutlicher Anstieg des Anteils *LASP1*-exprimierenden BMDMs nach oxLDL-Zugabe. Zudem wiesen BMDMs aus *LASP1*-defiziente Mäusen eine erhöhte Aufnahme von oxLDL in einem Zeitfenster von 4h auf. Die Schaumzellformation stellte sich in diesen Mäusen jedoch nicht signifikant erhöht dar. In *LASP1.Ldlr^{-/-}*-Makrophagen waren im Vergleich zu *Ldlr^{-/-}*-Makrophagen unter physiologischen Bedingungen signifikant mehr mRNA-Kopien des CD36-Rezeptors nachweisbar. Nach oxLDL-Stimulation zeigte sich weder die Expression des Cholesterolaufnahmerezeptors CD36 noch die der Cholesteroleffluxpumpen ABCA1 und ABCG1 auf RNA-Ebene durch den *LASP1*-KO beeinflusst.

3.5 MMP12-vermittelte Degradationsfähigkeit durch murine Makrophagen

Plaque-Makrophagen tragen durch Sekretion von Matrixmetalloproteasen aktiv zur Destabilisierung von atherosklerotischen Läsionen bei (Cochain & Zerneck, 2017). Stöling und Kollegen zeigten, dass der *LASP1*-KO die Matrixdegradationsfähigkeit humaner Makrophagen beeinträchtigt. Dieser Effekt könnte möglicherweise durch eine Einflussnahme von *LASP1* auf die lokale Freisetzung von MMPs an Podosomen bedingt sein (Stöling et al., 2012).

Thorsten Günder beschäftigte sich in seiner Arbeit detailliert mit der Expression und dem Degradationsverhalten der verschiedenen MMPs im murinen Kontext. Seine Daten zeigen einen deutlichen Anstieg der mRNA-Kopien der MMP12 nach *LASP1*-KO (unveröffentlichte Daten). *In vivo* werden MMPs als inaktive Zymogene,

sogenannte pro-MMPs gebildet. Mittels Zymographie auf Basis von 12%igen Caseingelen wurde der Frage nachgegangen, ob die erhöhte Quantität der MMP12-mRNA-Kopien bei LASP1-KO zu einer gesteigerten Sekretion und Aktivität der (pro-)MMP12 führt und infolgedessen in einem vermehrten Degradationsverhalten von Ldlr.LASP1^{-/-}-Makrophagen im Vergleich zu Ldlr^{-/-}-Makrophagen mündet.

Da es sich bei dem proinflammatorische Zytokine IL-1 β (vgl. TNF α , IL-1 β , etc.) um einen bekannten Induktoren von MMPs in Monozyten und Makrophagen handelt (Newby, 2016), wurden jeweils Zelllysate und Zellüberstand von BMDMs auf MMP12-Aktivität nach IL-1 β -Stimulation (10 ng/ml IL-1 β für 20 h in nährstoffreiem Medium) untersucht (Dasilva & Yong, 2008; Newby, 2005). Der Zellüberstand (konditioniertes Medium) wurde um den Faktor 20 aufkonzentriert. Die Zellen wurden in Ripa-Puffer mit zugesetzten Proteaseinhibitoren lysiert und die Proteinkonzentration per BCA-Assay quantifiziert. Nach elektrophoretischer Auftrennung der zu untersuchenden Proteingemische wurde das SDS durch Zugabe von Triton-X-Lösung über Nacht (für ca. 12 h) aus dem Gel extrahiert. Eine Aktivitätssteigerung der Proteasen, also der MMPs, war die Folge. Es kam zur substratspezifischen Degradation des Caseins. Der Abbau des Substrats im Bereich des Molekulargewichts der MMP12 konnte nach Coomassiefärbung als weiße Balken sichtbar gemacht werden. Die Stärke und Ausprägung der weißen Stellen korrelierten direkt mit der Aktivität der Protease. Als Positiv- Kontrolle wurden embryonale, humane Fibroblasten aus dem Laborbestand verwendet. Um auszuschließen, dass bereits nach 12 h ein Degradationsmaximum erreicht war und dementsprechend keine Unterschiede mehr erkennbar wären, wurde in einem Vorversuch die Inkubationszeit auf 6 h verkürzt. Die charakteristischen Doppelbanden der aktiven Form der MMP12 war nach dieser Zeitspanne allerdings noch nicht darstellbar. Der Verdau wurde daher für 12 h durchgeführt.

Das Zymogen der MMP12 besitzt ein Molekulargewicht von 54 kDa. Durch Prozessieren der aktiven 45 kDa-Form entsteht über Zwischenstufen die reife und aktive 22 kDa-Form. Im Zelllysate konnten sowohl das inaktive Zymogen als auch die aktiven Formen sowie Übergangsvarianten unterschieden und nachgewiesen werden (Abb. 3-14). Im konditionierten Medium waren hingegen nur die aktiven Formen zu detektieren (s. Abb. 3-14). Allgemein fiel die Degradation des Caseins durch die MMP12 in den Zelllysaten deutlich geringer aus als im konditionierten Medium. Signifikante Unterschiede bzw. eine Steigerung im Degradationsverhalten als Ausdruck einer veränderten Vesikel-Sekretion, bzw. Aktivierung der Proformen der MMPs zwischen Ldlr und LASP1.Ldlr^{-/-} Makrophagen konnte nicht festgestellt werden.

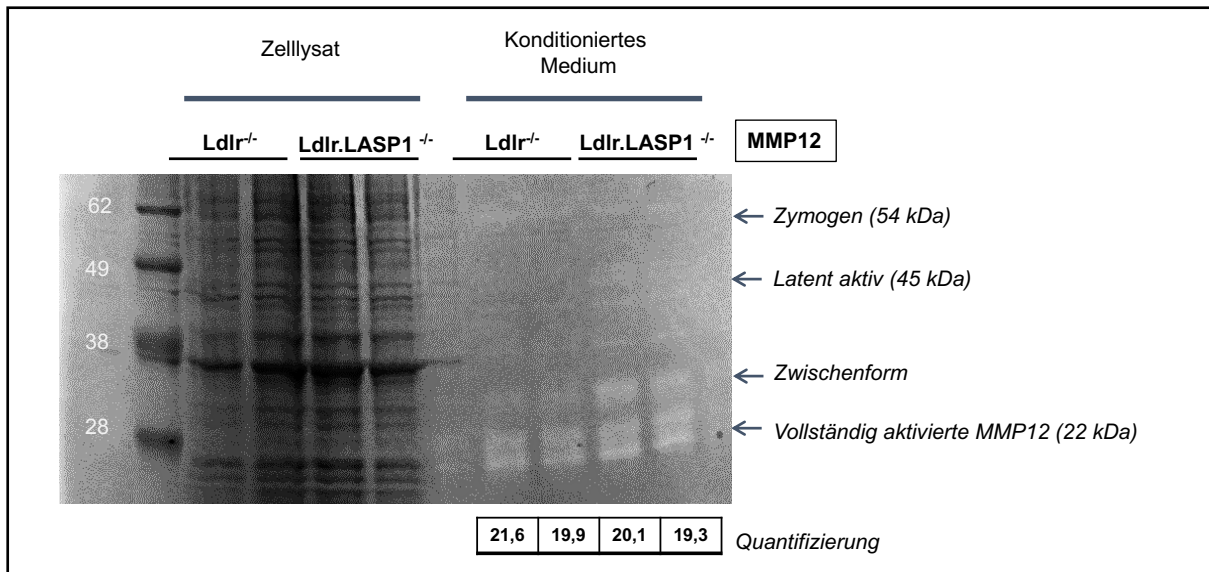


Abbildung 3-14: Zymographische Analyse des Degradationsverhalten der MMP12 in Casein-Gel nach IL-1 β -Stimulation in *Ldlr*^{-/-} und *Ldlr.LASP1*^{-/-} (Doppel-KO=DKO) BMDMs. Zellysate im Vergleich zu konditioniertem Medium mit vollständig aktiver und prozessierter MMP12 bei 22 kDa. MMPs werden als Pre-Proenzyme synthetisiert. Während der Translation wird das Signalpeptid entfernt. Es entstehen Zymogene (MMP12-Zymogen bei 54 kDa). Gewebs- und Plasma-Proteinasen können die Zymogene nach Sekretion aktivieren, entfernen das Propeptid jedoch nicht vollständig. Das Cystein des „cysteine switch“ Motivs interagiert daraufhin in der Zymogenform mit dem katalytischen Zinkion, das im aktiven Bereich der MMP enthalten ist, und sichert auf diese Weise einen latenten, inaktivierten Zustand der proMMP-Form (bei MMP12: 45 kDa + weitere Zwischenformen). Während der vollständigen Aktivierung durch andere proteolytische Enzyme wird der Cystein-switch gespalten und die Propeptid Domäne abgetrennt (aktive MMP12 bei 22 kDa). Deutlich geminderte Degradation in Zellysaten im Vergleich zu Aktivität in konditioniertem Medium. Eine quantitative Auswertung der Degradation durch MMP12 im konditionierten Medium ergab keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität. *n*=2; *n.s.*

3.6 LASP1-Expression in Immunzellen und Gewebe aus HFD-Mäusen im Vergleich zu Chow-Diät-Mäusen

3.6.1 Proteinexpression von LASP1 in Immunzellen aus Blut- und Milzproben in *Ldlr*^{-/-}-Mäusen unter Chow-Diät im Vergleich zu HFD

LASP1 wurde in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen (Kapitel 3.1), darüber hinaus zeigte sich eine höchstsignifikante Hochregulierung des LASP1-Gens nach *in vitro*-Stimulation von Makrophagen mit oxLDL (Kapitel 3.5.1) Inwiefern die LASP1-Expression in Immunzellen aus dem Blut von *Ldlr*^{-/-}-Mäusen unter HFD *in vivo* beeinflusst wird, wurde per Durchflusszytometrie untersucht. Da unter inflammatorischen Bedingungen auch die extramedulläre Hämatopoese in der Milz signifikant zur Atherosklerose-assoziierten Monozytose beiträgt und die so gebildeten Monozyten in atherosklerotischen Läsionen akkumulieren (Cochain & Zerneck, 2017), wurde auch die Milz der Tiere entnommen und analysiert. Monozyten, Makrophagen sowie T- und B-Zellen aus *Ldlr*^{-/-} Mäusen unter HFD im Vergleich zu

Normaldiät (Chow-Diät) $Ldlr^{-/-}$ -Tieren wurden auf die Expression von LASP1 per Durchflusszytometrie untersucht.

Zur Färbung wurde folgender Antikörpermix verwendet:

- 1) Makrophagen: CD45- APC-Cy7, CD11b- PerCP-Cy5.5, F4/80- APC, LASP1- PE
- 2) Monozyten/ T-/ B- Zellen: CD45- APC-Cy7, CD11b- PerCP- Cy5.5, CD115- APC, CD3- PB, CD4- V500, CD8- Per- Cy7, B220- FITC, LASP1- PE (selbst gelabelt, Kapitel 3.2.2)

Ergebnisse eines 6 Wochen HFD-Versuches

Milzanalyse

Wie in der Abbildung 3-15; A erkennbar, zeigte sich der Anteil der LASP1-exprimierenden Milz-Monozyten nach 6-wöchiger HFD unverändert bei ca. 20 %. Auch blieb die Zahl der LASP1-positiven B-Zellen, T-Zellen sowie der LASP1 positiven $CD4^+$ und $CD8^+$ -Zellen nach HFD stabil (Abb. 3-15; C, D). Dagegen exprimierten signifikant weniger Makrophagen der roten Pulpa LASP1 nach Ende der 6-wöchigen HFD (Abb. 3-15; B).

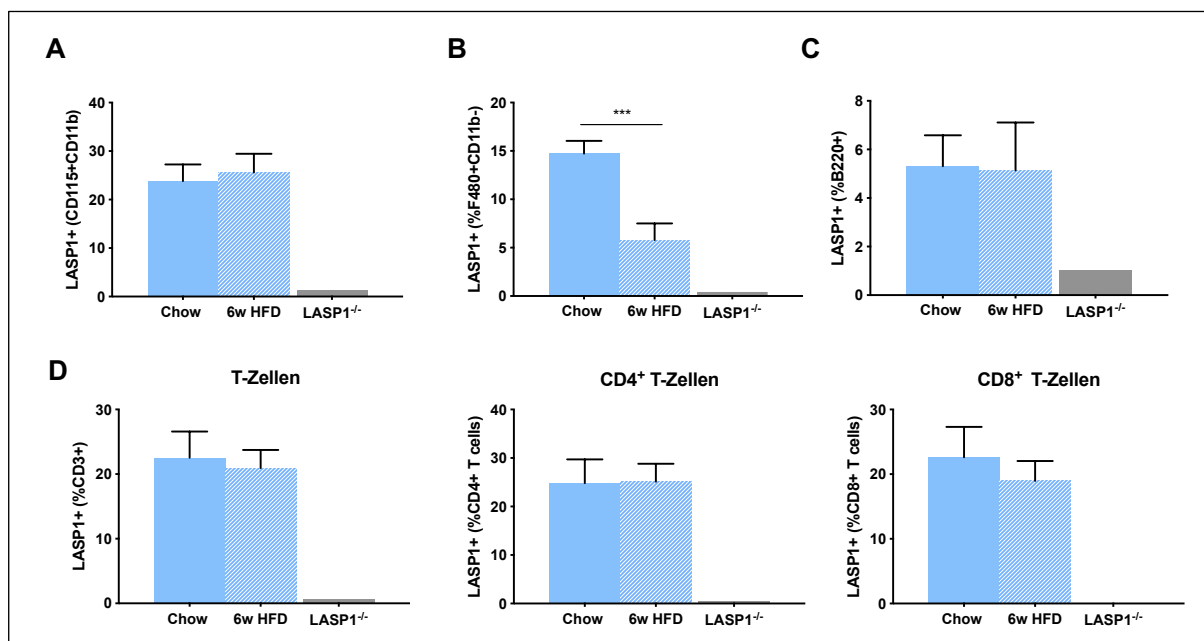


Abbildung 3-15: Durchflusszytometrische Quantifizierung der LASP1-exprimierenden Zellen in Monozyten, B-, T-Zellen, $CD4^+$, $CD8^+$ T-Zellen und RPM (red pulp macrophages), isoliert aus Milzen von $Ldlr^{-/-}$ -Mäusen unter Chow-Diät und 6-Wochen HFD. A) 6-wöchige HFD veränderte die Fraktion LASP1-exprimierender Monozyten nicht, während der Anteil LASP1-exprimierender Makrophagen der roten Pulpa signifikant ($p=0,001$) reduziert wurde (siehe B). Der Anteil der LASP1 positiven B-Zellen (C), T-Zellen, $CD4^+$ und $CD8^+$ -Zellen (siehe D) nach HFD stabil (ca. 20 % der T-Zellen und 5 % der B-Zellen exprimierten LASP1). Als Negativ-Kontrolle wurde die Milz einer $LASP1^{-/-}$ Maus verwendet. $n=5$.

Blutanalyse

Der Anteil LASP1-positiver B- und T-Zellen war im peripheren Blut nach 6w HFD nicht signifikant verändert. Auch exprimierten nicht signifikant mehr oder weniger CD4⁺ und CD8⁺ Zellen LASP1 (Abb. 3-16).

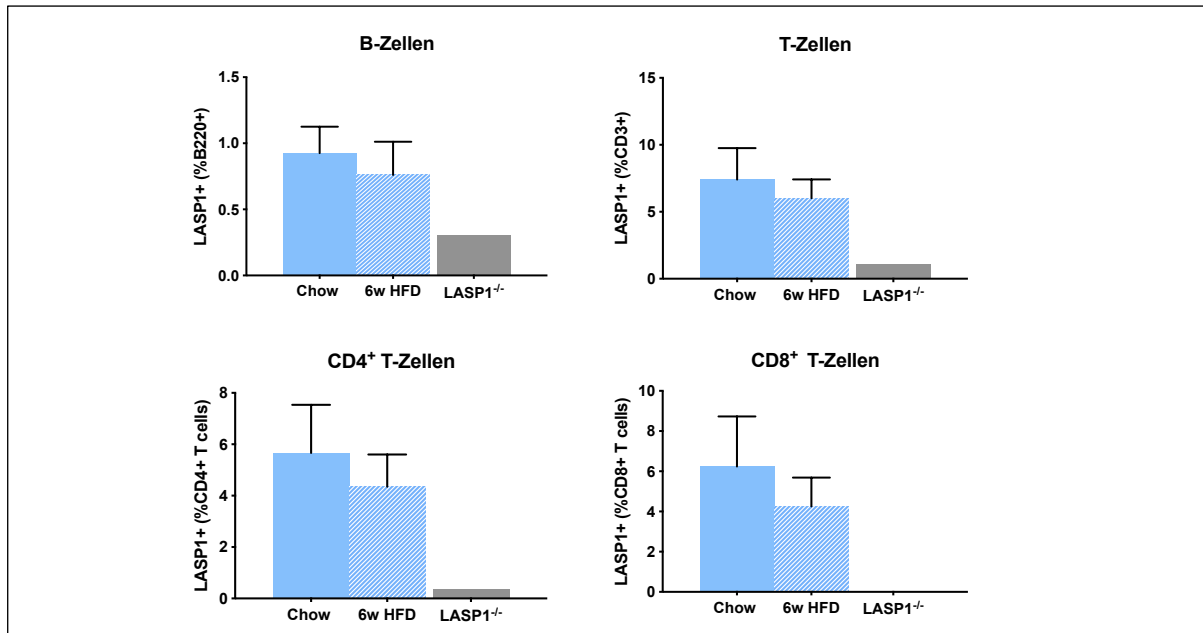


Abbildung 3-16: Quantifizierung per FACS der LASP1-exprimierenden Zellen in B- und T-Zellen sowie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, isoliert aus Blutproben von Ldlr^{-/-}-Mäusen unter Chow-Diät und 6-Wochen HFD. Durchflusszytometrische Erhebung mit LASP1^{-/-}-Probe als Negativ-Kontrolle. Keine signifikanten Unterschiede im Anteil der LASP1-positiven B-, T-Zellen, CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen im Blut durch 6 Wochen HFD. n=5.

Ergebnis eines 4 und 8 Wochen HFD-Versuches

In den Blutproben war die Fraktion der LASP1-exprimierenden Blutmonozyten sowohl nach 4-wöchiger als auch nach 8 Wochen HFD signifikant erniedrigt (Abb. 3-17).

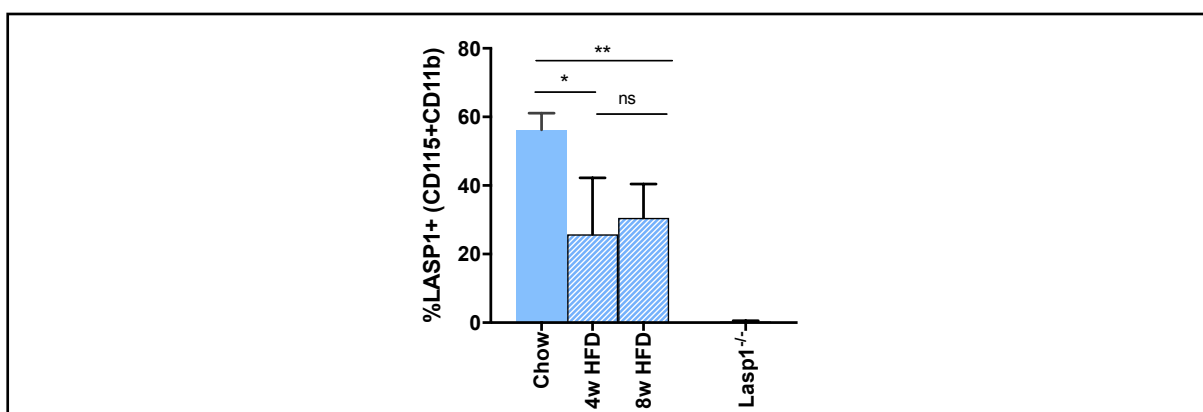


Abbildung 3-17: Quantifizierung per Durchflusszytometrie der LASP1-exprimierenden Zellen in Monozyten, isoliert aus Blutproben von Ldlr^{-/-}-Mäusen unter Chow-Diät und 4 sowie 8-Wochen HFD. Signifikante Reduktion der Anzahl LASP1-exprimierender Blutmonozyten nach 4 und 8 Wochen HFD durch Ldlr^{-/-}-Mäuse. Durchflusszytometrische Erhebung mit LASP1^{-/-}-Probe als Negativ-Kontrolle. n=4; p(4w)= 0,016; p(8w)=0,0035.

3.6.2 mRNA-Expression von LASP1 in Gewebe entnommen aus Chow-Diät und HFD-Ldlr^{-/-}-Mäusen

Aufgrund ihrer Bedeutung in der Erkrankung Atherosklerose wurden Aortenwurzeln (= Schauplatz ausgeprägter Plaqueeentwicklung) und Milzen (u. a. involviert in Monozytenrekritierung) aus je fünf 12 Wochen HFD Ldlr^{-/-}-Mäusen präpariert und eine RNA-Isolierung sowie qPCR durchgeführt. HPRT wurde als *Housekeeping*-Gen eingesetzt. Wie in Abb. 3-18 erkennbar, variierte die relative mRNA-Expression von LASP1 in der gesamten Aortenwurzel und dem gesamten Milzgewebe zwischen den Mauskohorte unter Chow- bzw. Hochfettdiät nicht.

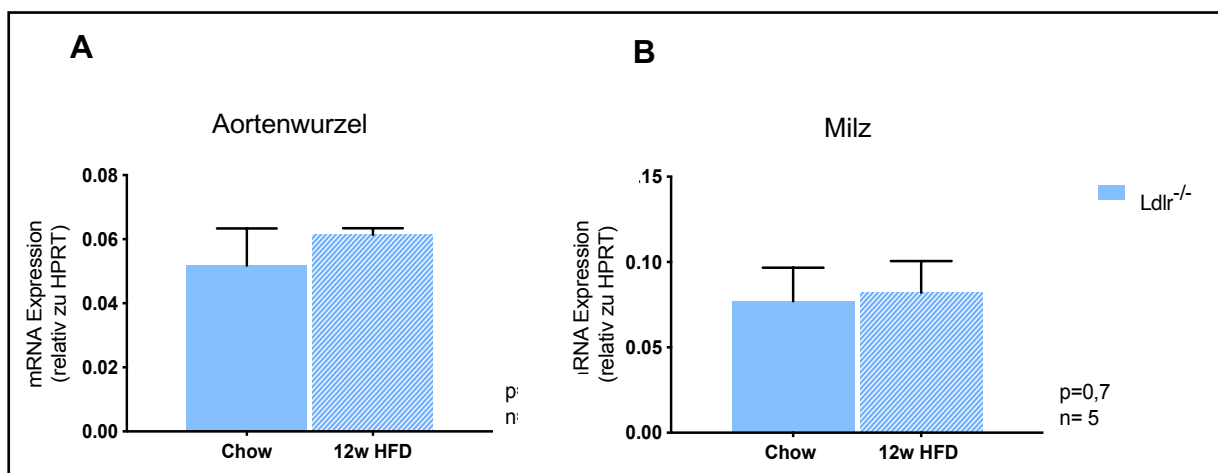


Abbildung 3-18: qPCR zur relativen LASP1-mRNA-Expression in gesamten Aortenwurzeln (A) und Milzen (B) von Ldlr^{-/-}-Mäusen vergleichend unter Chow-Diät und 12w HFD. Keine signifikanten Unterschiede in der Transkription des LASP1-Gens erkennbar. HPRT wurde als Housekeeping Gen eingesetzt. n=5.

3.7 Generelle Charakterisierung der Immunzellen in Blut und Milz aus Ldlr^{-/-} und Ldlr.LASP1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Daten aus einem 16 Wochen HFD-Versuch

Wie bereits erwähnt (Kapitel 1.5.1), wurde innerhalb der Arbeitsgruppe ein *in vivo*-Versuch mit Ldlr^{-/-} im Vergleich zu Ldlr.LASP1^{-/-}-Mäusen unter HFD u. a. zur atherosklerotischen Plaqueeanalyse durchgeführt. Das Akquirieren derselben Parameter unter Chow-Diät ist eine wichtige Komponente, um die Daten der HFD-Versuche interpretieren zu können.

Per Durchflusszytometrie wurden Parameter zu Monozyten, neutrophilen Granulozyten und T-Zellen aus dem Blut sowie die IFN γ -Produktion in Blut-CD8⁺T-Zellen in 9 Wochen alten Mäusen unter Chow-Diät erhoben. Es wurden jeweils 4 Ldlr^{-/-} mit 5 Ldlr.LASP1^{-/-}-Mäuse verglichen. Die im Folgenden gezeigten Daten des HFD-Versuches wurden freundlicherweise von Frau Prof. Elke Butt zur Verfügung gestellt.

Es wurden folgende Antikörper-Mischungen verwendet:

- 1) Monozyten/ Neutrophile: CD45- APC-Cy7, CD11b- V500, CD115- PE, LY6C- APC, LY6G- V450
- 2) T-Zellen: CD45- APC-Cy7, CD3e- V450, CD4- V500, CD8- Pe-Cy7
- 3) IFN γ Produktion in T-Zellen: CD45- APC-Cy7, CD3e- V450, TCR β - Percp-Cy5, TCR $\gamma\delta$ - FITC, CD4- V500, CD8- Pe-Cy7, IFN γ - APC

Die Mäuse der verschiedenen Genotypen unterschieden sich nicht hinsichtlich des Körper- und Milzgewichts oder Anzahl weißer Blutkörperchen (WBC) per μl Blut (Tabelle 1).

Tabelle 1: Körpergewicht, Milzgewicht und Anzahl der WBC von Ldlr^{-/-} und Ldlr.LASP1^{-/-} Mäusen unter Chow und 16 Wochen HFD.

		Ldlr ^{-/-}	Ldlr.LASP1 ^{-/-}	p-Wert
Körpergewicht (g)	Chow Diät	20,3 \pm 1,0	19,2 \pm 0,6	0,09
	16 w HFD	23,2 \pm 3,2	20,8 \pm 1,0	0,06
Milzgewicht (g)	Chow Diät	89,7 \pm 11,7	85,7 \pm 7,0	0,5
	16 w HFD	104,7 \pm 28,8	88,1 \pm 12,0	0,1
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Chow Diät	1,0 \pm 0,2	1,7 \pm 0,7	0,07
	16 w HFD	3,7 \pm 1,0	4,3 \pm 1,7	0,4

3.7.1 Ergebnisse der Milzanalyse

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Ldlr^{-/-} und Ldlr.LASP1^{-/-} Mäusen in Bezug auf den Prozentanteil der Monozyten in den Milzproben unter homöostatischen Bedingungen. Im Vergleich zu den Daten nach 16-wöchiger HFD kam es in der Kontrollgruppe zu einem 2,5-fachen Anstieg des Anteils der Monozyten, während der Anteil der Milz-Monozyten an den Leukozyten bei LASP1-KO nur 1,8-fach anstieg. Dementsprechend waren signifikant weniger Monozyten im Verhältnis zu den Leukozyten nach 16 Wochen HFD in murinen Milzen aus Ldlr.LASP1^{-/-} Mäusen zu messen. Die Anteile der inflammatorischen Ly6C^{high} und Ly6C^{low} Monozyten waren vergleichbar zwischen den Genotypen und differierten nicht signifikant zwischen Chow und HFD (Abb. 3-19; A).

Die Fraktion der neutrophilen Granulozyten in Bezug auf Leukozyten war weder durch den LASP1-KO noch durch das Verabreichen einer HFD verändert (Abb. 3-19; B).

Sowohl unter Chow als auch nach 16 Wochen HFD kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Fraktion der T-Zellen an der Gesamtleukozytenzahl. Nur bei Ldlr.LASP1^{-/-} Milzen konnte ein signifikanter Anstieg der T-Zell Proportion nach HFD im Vergleich

zu Chow Diät gesehen werden ($p=0,03$) (Abb. 3-19; C). Der Anteil der $IFN\gamma^+$ positiven T-Zellantwort in murinen Milzen aus Tieren unter Chow-Diät zeigte sich durch den $LASP1$ -KO unter physiologischen Bedingungen unverändert. Allerdings zeigte sich ein signifikanter Abfall der Produktion nach 16 Wochen HFD ($p=0,002$) (Abb. 3-19; D).

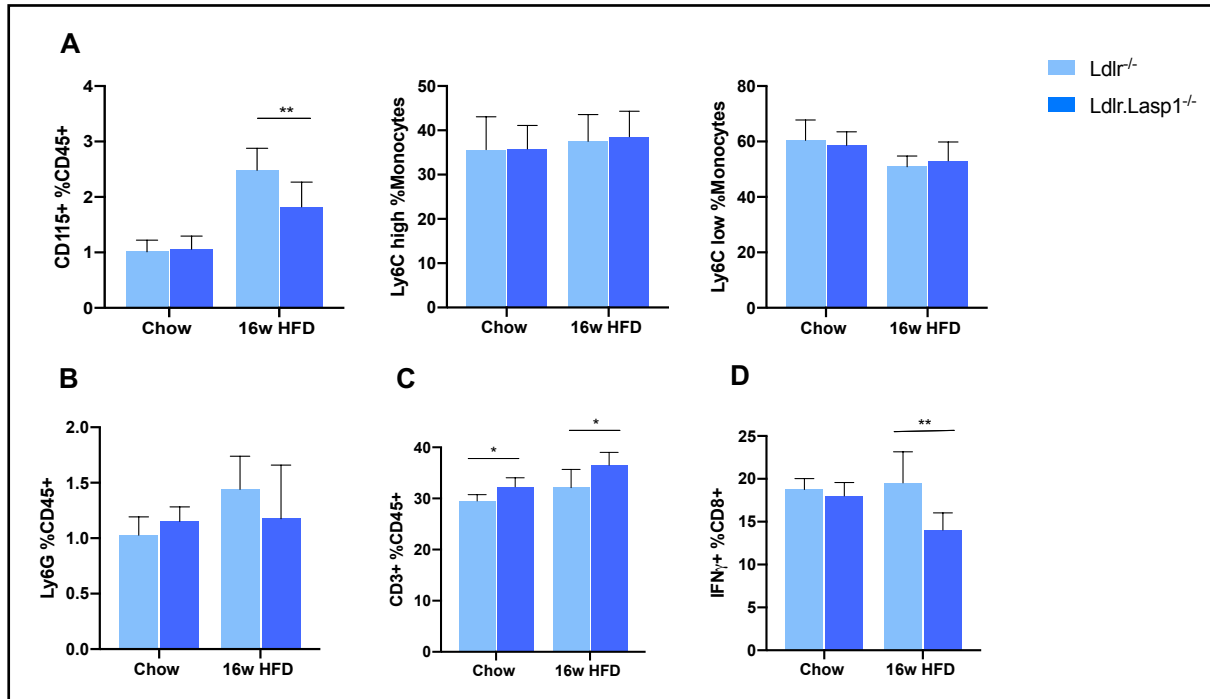


Abbildung 3-19: Gesteigerter Anteil der T-Zellen durch $LASP1$ -KO bei Chow-Diät und 16 Wochen HFD in Milzproben. Murine Milzen wurden von Tieren unter Chow Diät (Alter: 9 Wochen; $Ldlr^{-/-}$ $n=5$; $Ldlr.LASP1^{-/-}$ $n=6$) durchflusszytometrisch analysiert. Die Daten nach 16 Wochen HFD ($Ldlr^{-/-}$ $n=7$; $Ldlr.LASP1^{-/-}$ $n=7$) wurden von Prof. Elke Butt zur Verfügung gestellt. A) Prozentanteil der $CD115^+$ Monozyten an den gesamten $CD45^+$ Zellen $p(HFD)=0,01$. Prozentanteile der inflammatorischen $Ly6C^{high}$ und nicht-konventionellen $Ly6C^{low}$ Monozyten in Bezug auf $CD115^+$ Zellen. B) Der Anteil der $Ly6G$ positiven Zellen an der Gesamtzahl der Leukozyten war unverändert durch den $LASP1$ -KO. C) Unter Chow-Diät und HFD waren signifikant mehr T-Zellen an der Gesamtleukozytenzahl nachweisbar, wenn $LASP1$ depletiert war. $p(Chow-Diät)=0,03$, $p(HFD-Diät)=0,015$. D) $CD8^+$ Zellen wurden aus Milzen von $Ldlr^{-/-}$ ($n=4$) und $Ldlr.LASP1^{-/-}$ Mäusen ($n=5$) extrahiert und mit PMA (50 ng/ml), Ionomycin (750 ng/ml) und BFA (2,5 μ g/ml) für 4 h stimuliert und dann per Durchflusszytometrie analysiert. Die $Th1$ -Antworten wurden im Blut analysiert, definiert als $IFN\gamma^+ CD8^+$ -T-Zellen.

3.7.2 Ergebnisse der Blutanalyse

Die Zahl der zirkulierenden Monozyten pro μ l Blut unterschied sich nicht signifikant unter Chow-Diät zwischen den Genotypen. Ein Anstieg der Monozytenzahl durch die 16-wöchige HFD im Vergleich zu normaler Nahrungsform der Mäuse war zu verzeichnen, allerdings fiel dieser Anstieg in $Ldlr.LASP1^{-/-}$ Mäusen nicht signifikant aus. Durch die große Inhomogenität der Werte konnte keine signifikante Abweichung zwischen $Ldlr$ und $Ldlr.LASP1^{-/-}$ Mäusen unter HFD in Bezug auf die Monozytenzahl errechnet werden. Der Prozentanteil der Monozyten an der Gesamtleukozytenzahl zeigte sich durch den $LASP1$ -KO unter Chow-Bedingungen nicht signifikant verändert

(Abb. 3-20; A). Interessanterweise stieg der Anteil der CD115⁺ Ldlr.LASP1^{-/-} Zellen nicht signifikant ($p=0,17$) durch die HFD an, wohingegen in reinen Ldlr^{-/-} Mäusen der Anteil der Monozyten an den Leukozyten sich nahezu verdreifachte (Abb. 3-20; A). Unter Chow-Diät-Bedingungen war der Prozentanteil der Ly6C^{high} sowie der Ly6C^{low} Monozyten zwischen Ldlr^{-/-} und Ldlr.LASP1^{-/-}-Blutproben vergleichbar. Allerdings konnte keine Erhöhung des Anteils der Ly6C^{high} Monozyten in Ldlr.LASP1^{-/-}-Blutproben nach 16 HFD beobachtet werden, während er in Ldlr^{-/-} Tieren erwartungsgemäß anstieg (Abb. 3-20; A). Damit war der Anteil der Ly6C^{high} Monozyten an der Gesamtmonozytenzahl nach 16 Wochen HFD in Ldlr.LASP1^{-/-} Tieren signifikant geringer. Der Anteil der Ly6C^{low} Monozyten verhielt sich entsprechend invers zu den Ly6C^{high} Daten.

Die Fraktion der T-Zellen an der Gesamtleukozytenzahl in Blutproben war signifikant erhöht bei LASP1-Depletion unter physiologischen Bedingungen. Dieser signifikante Unterschied blieb auch nach 16 Wochen HFD bestehen. Insgesamt war eine signifikante Verringerung der T-Zellfraktion im Verhältnis zur Leukozytenzahl im peripheren Blut durch die HFD sowohl bei der Kontrollgruppe als auch nach LASP1-KO zu verzeichnen (Abb. 3-20; B). Der Anteil der IFN γ ⁺CD8⁺T-Zellen im Blut aus Tieren unter Chow-Diät zeigte sich durch den LASP1-KO unverändert. Der Anteil der IFN γ ⁺positiven T-Zellantwort war nach HFD sowohl bei Ldlr^{-/-} als auch bei Ldlr.LASP1^{-/-} Proben signifikant verringert, wobei es bei LASP1-Depletion zu einer 3,6-fachen Reduktion kam, bei der Kontrollgruppe nur um den Faktor 1,7. Eine signifikante Verminderung der IFN γ ⁺positiven T-Zellantwort nach 16 Wochen HFD bei LASP1-KO im Vergleich zu Ldlr^{-/-} Tieren war zu verzeichnen (Abb. 3-20; B).

Der Knockout von LASP1 hatte keinen Einfluss auf den Anteil zirkulierender neutrophiler Granulozyten unter homöostatischen Bedingungen und auch nicht unter HFD. Es kam zu einem signifikanten Anstieg des Anteils der neutrophilen Granulozyten unter HFD in Bezug auf Chow Diät von 8-9% auf 16% (Abb. 3-20; C).

Die Fraktion der T-Zellen an der Gesamtleukozytenzahl in Blutproben war signifikant erhöht bei LASP1-Depletion unter physiologischen Bedingungen. Dieser signifikante Unterschied blieb auch nach 16 Wochen HFD bestehen. Insgesamt war eine signifikante Verringerung der T-Zellfraktion im Verhältnis zur Leukozytenzahl im peripheren Blut durch die HFD sowohl bei der Kontrollgruppe als auch nach LASP1-KO zu verzeichnen (Abb. 3-20; B). Der Anteil der IFN γ ⁺CD8⁺T-Zellen im Blut aus Tieren unter Chow-Diät zeigte sich durch den LASP1-KO unverändert. Der Anteil der IFN γ ⁺positiven T-Zellantwort war nach HFD sowohl bei Ldlr^{-/-} als auch bei Ldlr.LASP1^{-/-} Proben signifikant verringert, wobei es bei LASP1-Depletion zu einer 3,6-fachen Reduktion kam, bei der Kontrollgruppe nur um den Faktor 1,7. Eine signifikante Verminderung der IFN γ ⁺positiven T-Zellantwort nach 16 Wochen HFD bei LASP1-KO im Vergleich zu Ldlr^{-/-} Tieren war zu verzeichnen (Abb. 3-20; B).

Der Knockout von LASP1 hatte keinen Einfluss auf den Anteil zirkulierender neutrophiler Granulozyten unter homöostatischen Bedingungen und auch nicht unter

HFD. Es kam zu einem signifikanten Anstieg des Anteils der neutrophilen Granulozyten unter HFD in Bezug auf Chow Diät von 8-9% auf 16% (Abb. 3-20; C).

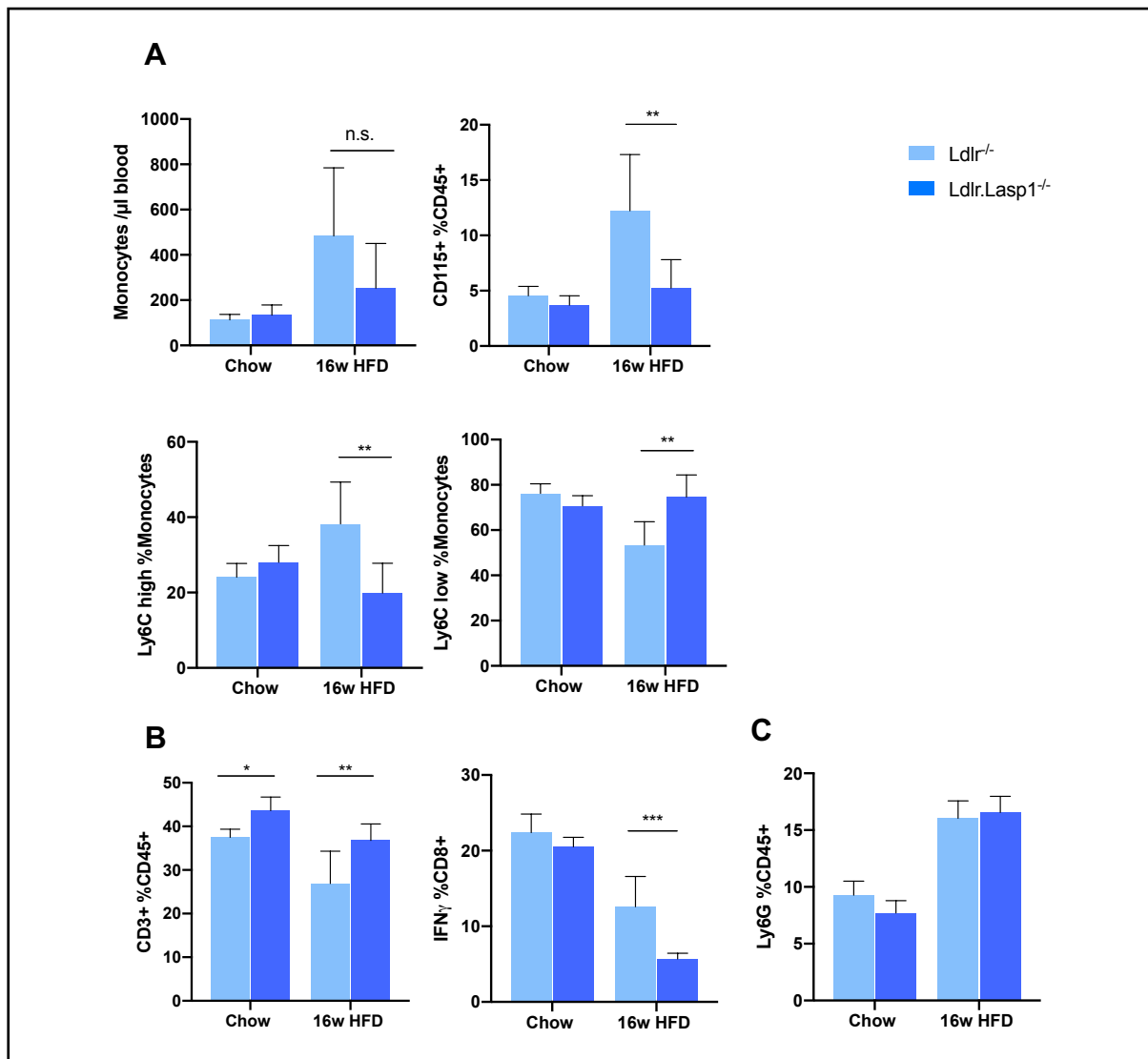


Abbildung 3-20: Signifikant höherer Anteil der T-Zellen an der Gesamtleukozytenzahl in Blutproben aus Ldlr.LASP1^{-/-}-Mäusen unter Chow-Diät. Durchflusszytometrische Analyse von Blut gewonnen aus Ldlr^{-/-} (n= 4) und Ldlr.LASP1^{-/-} (n= 5) Mäusen unter 9 Wochen Chow-Diät. Die Daten nach 16 Wochen HFD (Ldlr^{-/-} n=7; Ldlr.LASP1^{-/-} n=7) wurden von Prof. Elke Butt zur Verfügung gestellt. A) Prozentanteil der CD115⁺ Monozyten an den gesamten CD45⁺ Zellen. p(HFD)= 0,004. Prozentanteile der inflammatorischen Ly6C^{high} (p(HFD)=0,002) und nicht-konventionellen Ly6C^{low} Monozyten (p(HFD)=0,001) in Bezug auf CD115⁺ Zellen. B) Signifikante Erhöhung des Anteils der T-Zellen an der Gesamtleukozytenzahl in Blutproben bei LASP1-Depletion p(Chow)=0,013, p(HFD)=0,005. Es kam zu einer signifikanten Verringerung der T-Zellen im Verhältnis zu der Leukozytenzahl im peripheren Blut nach 16 Wochen HFD sowohl bei der Kontrollgruppe (p=0,02) und nach LASP1-KO (p=0,006). Blutproben von Ldlr^{-/-} (n = 4) und Ldlr.LASP1^{-/-}-Mäusen (n = 5) wurde mit PMA (50 ng/ml), Ionomycin (750 ng/ml) und BFA (2,5 μ g/ml) für 4 h stimuliert und dann per Durchflusszytometrie analysiert. Die Th1-Antworten wurden im Blut analysiert, definiert als IFN γ ⁺-CD8⁺-T-Zellen. Signifikante Verminderung nach 16 Wochen HFD bei LASP1-KO im Vergleich zu Ldlr^{-/-} Tieren war zu verzeichnen (p(HFD)=0,0004). C) Es kam zu einem signifikanten Anstieg des Anteils der neutrophilen Granulozyten unter HFD von 8-9% auf 16% ohne signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen.

4 Diskussion

Atherosklerose-bedingte Krankheitsfälle verursachten im Jahr 2016 über 15 Millionen Todesfällen weltweit und stellten damit die häufigste Todesursache dar (Statista, 2016). Durch intimale Invasion, Zytokinsekretion, Schaumzellformation und schließlich MMP-vermittelter Plaquedestabilisierung sind Monozyten bzw. Makrophagen von der Initiation bis zur Plaqueruptur an der Pathogenese atherosklerotischer Läsionen beteiligt (Cochain & Zerneck, 2017).

2012 wurde das regulatorische Gerüstprotein LASP1 in humanen Makrophagen nachgewiesen. Ein LASP1-Knockdown minderte hier das gesamtinvasive Potential der Zellen (Stolting et al., 2012). Bis dato wurde LASP1 primär im Rahmen der Krebsforschung untersucht. In diesem Zusammenhang spielt LASP1, bedingt durch seine Lokalisation und Beteiligung an dynamischen Zytoskelettlagerungen (Nakagawa, Terasaki, Suzuki, Ohashi, & Miyamoto, 2006; Panaviene & Moncman, 2007; Spence et al., 2006), nachweislich eine Rolle in der Zellmigration, Proliferation und Invasionsfähigkeit bestimmter Tumorzellen (Orth et al., 2015). Da es eine große gemeinsame Schnittmenge von Krebserkrankungen und Atherosklerose hinsichtlich der Entstehungsmechanismen und zugrundeliegenden Signalwegen gibt (Tapia-Vieyra et al., 2017), wurde die Rolle des Proteins LASP1 in der Atherogenese mit Schwerpunkt auf monozytäre Zellen im Zuge dieser Arbeit näher beleuchtet.

In einem Vorversuch der Arbeitsgruppe zur Untersuchung dieses Sachverhalts zeigte sich nach 16 Wochen HFD in Ldlr.LASP1^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Ldlr^{-/-}-Tieren signifikant mehr Plaquebildung in der thorakalen Aorta, sowie in der Gesamtaorta (unveröffentlichte Daten). Diesen Daten zufolge scheint LASP1 am Prozess der Atherogenese beteiligt zu sein und auf diesen hemmend, also atheroprotektiv, zu wirken. Kongruent dazu konnte im Zuge dieser Arbeit eine erhöhte oxLDL-Aufnahmerate und auch tendenziell erhöhte Schaumzellbildung *in vitro* bei Depletion von LASP1 in Makrophagen detektiert werden. Zudem führte die Zugabe von oxLDL zu Makrophagenmedium *in vitro* zu einem hochsignifikanten Anstieg der Expression von LASP1 in den Makrophagen.

4.1 Analyse des Einflusses des LASP1-KO auf das Verhalten von Monozyten/Makrophagen *in vitro*

Es wurden BMDMs mittels M-CSF, welches im Zellüberstand von L929-Zellen enthalten ist, differenziert. Der Einsatz von L929-Überstand in diesem Kontext ist gängige Praxis, obwohl neben M-CSF weitere Wachstumsfaktoren in den Überstand sekretiert werden und so eine endgültige Kontrolle über die genaue Zusammensetzung nicht gegeben ist. In der Tat werden in der Literatur BMDMs, welche sich von L929-Zellüberstand ableiten und solche, welche mittels rekombinantem M-CSF differenziert werden, allgemein als gleichwertig betrachtet. De Brito Monteiro und Kollegen zeigten allerdings kürzlich Unterschiede im Sekretionsverhalten und im Metabolismus von BMDMs, je nachdem welcher

Wachstumsfaktor eingesetzt wurde (de Brito Monteiro et al., 2020). Da in dieser hier vorliegenden Arbeit durchweg L929-Zellüberstand eingesetzt wurde und eine homogene Makrophagenpopulation nachgewiesen wurde, ist nicht von einer signifikanten Verzerrung der Daten durch den Einsatz von L929-Überstand im Zuge der Differenzierung der BMDMs auszugehen.

Im Folgenden werden die erhobenen Daten zu den einzelnen Schritten der Atherogenese diskutiert.

4.1.1 Beeinflussung der intimalen, monozytären Invasion durch LASP1 *in vitro*

Im Zuge dieser Arbeit konnte eine reduzierte, monozytären Adhäsions- und Migrationsrate bei LASP1-Defizienz *in vitro* gezeigt werden. In der Atherogenese korreliert die Zahl der einwandernden Monozyten in die Intima mit der nachfolgenden Plaqueformation (Cochain & Zerneck, 2017; Groh, Keating, Joosten, Netea, & Riksen, 2018). Anhand unserer Daten könnte daher eine verminderte intimale Invasionsfähigkeit von Ldlr.LASP1^{-/-}-Monozyten *in vivo* angenommen werden, was wiederum eine reduzierte atherosklerotische Plaquebildung *in vivo* in Ldlr.LASP1^{-/-}-Mäusen unter HFD vermuten lassen würden.

Adhäsion

Inwiefern der KO des LASP1-Proteins das zelluläre Adhäsionsverhalten beeinflusst, wurde bereits in verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Die Ergebnisse variierten je nach Zellart und Versuchsaufbau deutlich, sodass keine allgemeingültige Aussage anhand der Literatur über die Rolle von LASP1 im Prozess der Adhäsion getroffen werden kann (Ardelt et al., 2013; Lin et al., 2004; C. Traenka et al., 2010; Zhang et al., 2009).

Interessanterweise sahen wir eine erhöhte Adhäsionsrate von LASP1^{-/-}-Monozyten an das Endothel im Vergleich zu Wildtyp-Monozyten, wohingegen Ldlr.LASP1^{-/-}-Monozyten eine reduzierte Anheftung im Vergleich zu Ldlr^{-/-}-Zellen aufwiesen (Kapitel 3.2.3). Dieser Effekt lässt sich allerdings nicht ausreichend durch den LDL-Rezeptor-KO erklären, da die Zahl der anhaftenden Monozyten aus B6-, bzw. Ldlr^{-/-}-Mäusen vergleichbar war, sodass insgesamt ein Einfluss des LDL-Rezeptors unwahrscheinlich wird. Zudem wurde bisher kein direkter Einfluss des fehlenden LDL-Rezeptors auf die Zelladhäsion in der Literatur beschrieben.

Unsere Daten sprechen im Vergleich zu anderen Studien für eine hohe monozytäre Adhäsionsrate. Von Manthey und Kollegen nutzten einen vergleichbaren Versuchsaufbau, jedoch verwendeten sie Blutmonozyten statt Knochenmarksmonozyten. In Bezug auf Ldlr^{-/-}-Monozyten sahen sie bei 8-fach höherer Zellkonzentrierung pro ml ca. die doppelte Anzahl adhärenter Ldlr^{-/-}-Monozyten pro mm² im Vergleich zu den hier vorliegenden Daten (Manthey et al.,

2013). Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied könnte sich durch den unterschiedlichen Ursprung der Zellen ergeben.

Möglicherweise kommt es bei $LASP1^{-/-}$ -Monozyten zu einer Kompensation des KO durch andere Zytoskelett-assoziierte Proteine, was zu einer gesteigerten Adhäsionsrate führt. Bei $Ldlr.LASP1^{-/-}$ -Zellen hingegen könnte durch eine bisher unbekannte Interaktion dieser Effekt unterdrückt werden, sodass weniger Zellen adhären. Die Bestimmung der Integrin- und Selektinexpression von $\alpha4 = CD49d$, $\alpha4\beta1 = VLA4$, $\alpha4\beta7 = LPAM$, $\alpha4\beta2 = LFA-1$, $\alpha Mb2 = MAC-1$ sowie E- und P-Selektin auf der Monozytenoberfläche könnte Aufschluss und eine mögliche Interpretation des Ergebnisses ermöglichen.

Eine andere Erklärung für die reduzierte Adhäsionsrate von $Ldlr.LASP1^{-/-}$ Monozyten könnte sich durch Phosphorylierung von $LASP1$ durch src-Kinasen im Zuge des Integrin-Signalings ergeben: Nach der Selektin-vermittelten Adhäsion kommt es im zweiten Schritt zur Chemokin-vermittelten Integrin-Aktivierung mit nachfolgender Verlangsamung des Rolling im Rahmen des *inside-out* Signals. Durch Binden des Liganden an das Integrin wird eine Signalkaskade durch Integrin-Clusterbildung initiiert. Durch dieses sogenannte *outside-in Signaling* kommt es zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts, welches für die Regulation der Lamellipodien-Aktivität benötigt wird sowie für die Funktion von Fokalkontakten. Die Extension von Lamellipodien sowie Zell-*Spreading* führen schließlich zu einer gestärkten Adhäsionsbindung (Schmidt et al., 2013).

Eine Involvierung von Src-Familien-Kinasen (SFKs) - zyttoplasmatische Tyrosin-Kinasen - in Integrin *outside-in Signaling* wurde in verschiedenen Zellarten (u. a. in neutrophilen Granulozyten, Thrombozyten und auch in Makrophagen) beschrieben (Abram & Lowell, 2008). In humanen, aktivierten Thrombozyten führte die Clusterbildung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ im Rahmen des *outside-in Signaling* zur trans-Autophosphorylierung von Src-Kinasen und durch nachfolgende Signalkaskaden zur vollständigen Aktivierung der Integrine, also zur gestärkten Adhäsionsbindung. Traenka und Kollegen konnten zeigen, dass auch $LASP1$ in diesem Zuge durch die Src-Kinase an Y171 phosphoryliert wird und daraufhin zu Fokalkontakten und Lamellipodien transloziert, um dort zur Formation von Pseudopodien und damit dem Zell-*Spreading* beizutragen (J. Traenka et al., 2009).

Es ist zu diskutieren, ob nach $LASP1$ -KO die gestärkte Adhäsionsbindung am Ende der *outside-in* Signalkaskade nicht vollständig vermittelt werden kann und so weniger Monozyten an dem Endothel langfristig adhären. Dies wäre kongruent zu den Daten, die bzgl. des Adhäsionsverhalten von $Ldlr^{-/-}$ und $Ldlr.LASP1^{-/-}$ Monozyten im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit erhoben werden konnten.

Migration und Chemotaxis

Basierend auf Voruntersuchungen anderer Arbeitsgruppen bzgl. des Migrationsverhalten bei $LASP1$ -Defizienz in Krebszelllinien (Butt & Raman, 2018) und der humanen, embryonalen Fibroblastenzelllinie NIH3T3 (Lin et al., 2004) bestand die

Hypothese, dass bei fehlender Expression des dynamisches Fokalkontaktproteins LASP1 in murinen Monozyten ebenfalls eine Migrationsminderung zu verzeichnen sei.

Diese Hypothese konnte bei Untersuchung des chemotaktischen Verhaltens von LASP1^{-/-} Monozyten mittels *Boyden Chamber* in dieser Arbeit bestätigt werden (Kapitel 3.2.4). Die detektierte Migrationsrate von bis zu 15% der Zellen ist kongruent zu den Daten, welche andere Arbeitsgruppen erhoben: Grunewald und Kollegen beispielweise konnten eine ähnliche Migrationsrate nach LASP1-Silencing in der ovariellen Krebszelllinie SCOV-3 beobachten (Grunewald et al., 2007).

Erklärungsversuche für die reduzierte Migrationsrate nach LASP1-KO basieren auf dessen Lokalisation und Beteiligung an dynamischen Zytoskelettlagerungen.

Grunewald und Kollegen führten die geringere Zahl migrierender Krebszellen nach LASP1-Silencing auf die fehlende Interaktion mit dem Bindungspartner Zyxin zurück. Da LASP1 als essentieller Vermittler der Rekrutierung von Zyxin an Fokalkontakte in Krebszellen charakterisiert wurde (Grunewald & Butt, 2008), könnte die reduzierte Zellmobilität nach LASP1-KO durch den Funktionsverlust von Zyxin als Gerüstprotein und die damit verminderte Rekrutierung weiterer Zytoskelettproteine wie VASP, LPP, Dynamin und Vimentin erklärt werden (Butt & Raman, 2018). Dementsprechend würde die Bildung der bereichsspezifischen Aktinformationen, welche für die Zellmigration nötig sind, erschwert (Grunewald & Butt, 2008).

Stölting et al. beobachteten eine Verkürzung der Beständigkeit, der Größe sowie der Anzahl von Podosomen in humanen Makrophagen nach LASP1-Knockdown (Stolting et al., 2012). Podosomen scheinen neben Pseudopodien und anderen dynamischen Aktinstrukturen ebenfalls an der extravasalen Diapedese von Monozyten beteiligt zu sein (Linder & Wiesner, 2015). Es wäre möglich, dass die Migrationsfähigkeit der Monozyten auch im murinen Kontext durch den fehlenden, stabilisierenden Einfluss von LASP1 auf Podosomen vermindert werden könnte.

Eine ursächliche Beteiligung von LASP1 an der Bildung von Podosomen/ Fokalkontakten konnte allerdings bisher nicht gezeigt werden und ist auch anhand unserer Daten nicht zu vermuten, da trotz des LASP1-KO eine Basalmigrationsrate von 10% beobachtet werden konnte.

Ebenfalls denkbar wäre ein CXCR4-vermittelter Effekt, nachdem gezeigt wurde, dass LASP1 an CXCR4 phosphorylierungsabhängig bindet (Raman, Sai, Neel, Chew, & Richmond, 2010) und diesen stabilisiert (Butt et al., 2020). So konnte in humanen Brustkrebszellen nach LASP1-Knockdown eine Minderung der CXCR4-vermittelte Invasionsfähigkeit der Zellen gesehen werden (Duvall-Noelle et al., 2016).

Insgesamt kann gesagt werden, dass LASP1 im Zusammenhang der Migration wohl am ehesten eine unterstützende Rolle in der Neuorganisation von dynamischen Aktinstrukturen zukommt.

Die Transmigration stellt ein aktives Durchwandern der Zellen durch die Poren da, daher ist bei Abwesenheit eines Lockstoffs keine nachweisbare Migration zu erwarten. In den Versuchen im Rahmen dieser hier vorliegenden Arbeit konnte in der Kontrollgruppe aber auch ohne Stimulanz eine Migrationsrate von bis zu 5 % der Zellen

vom oberen Kompartiment in die untere Kammer beobachtet werden. Anna-Chi Schreyer konnte in ihrer Dissertation zur Bewertung der *Boyden Chamber* zur Analyse der Chemotaxis ähnliche Beobachtungen machen und führte dies auf das Vorhandensein der Schwerkraft zurück (Schreyer, 2014).

Die Boyden-Kammer ist ein weit verbreitetes Verfahren zur Chemotaxismessung. Es birgt jedoch auch einige Nachteile. So ist zum Beispiel ein stabiler Gradientenaufbau nicht möglich und es besteht keine Möglichkeit zur Live-Cell-Mikroskopie, sodass reine Chemokinese nicht von Chemotaxis unterschieden werden kann. Ein alternatives Testverfahren zur Migration, welches eine exaktere Analyse und stabilere Konditionen ermöglicht, wäre die Verwendung der μ -Slides Chemotaxis von Ibidi, bei der ein Gradient über 48h aufrechterhalten werden kann (Zengel et al., 2011).

4.1.2 Einflussnahme von LASP1 auf Transkriptionsfaktoren in Makrophagen *in vitro* anhand TNF α

Butt et al. beschrieben, dass sich der Verdacht erhärtet, dass LASP1 auch als Co-Transkriptionsfaktor an der Genexpression beteiligt ist (Butt & Raman, 2018): Die Abwesenheit von LASP1 in Krebszellen scheint hemmend auf die Transkriptionsfaktoren AP-1 (Endres et al., 2016) und NF κ B (Sun et al., 2017) einzuwirken, welche u.a die Transkription des TNF α -Gens fördern (Kishore et al., 2004) (Kapitel 1.1.5).

Im Gegensatz zu AP-1 und NF κ B übt der Transkriptionsfaktor PPAR γ einen suppressiven Einfluss auf die mRNA-Expression von TNF α aus (Jiang, Ting, & Seed, 1998). Ein hemmender Effekt der epigenetischen Faktoren DNMT1 und UHRF1 auf die Aktivität PPAR γ s und damit die Förderung der Transkription proinflammatorischer Mediatoren wurde beschrieben: Untersuchungen zur Beteiligung dieser epigenetischen Transkriptionsfaktoren in Bezug auf atherosklerotische Prozesse im Mausmodell zeigten, dass die Überexpression von DNMT1 in einer Steigerung der Atherosklerose resultierte, da der hemmende Einfluss von PPAR γ auf die Transkription proinflammatorischer Zytokine entfiel (J. Yu et al., 2016). Im kolorektalen Karzinom zeigte sich eine negative Regulation von PPAR γ durch UHRF1 (Sabatino et al., 2012).

In diesem Zusammenhang ist interessant, dass nukleares LASP1 den epigenetisch involvierten DNMT1-UHRF1-Komplex in Brustkrebszellen stabilisiert (Duvall-Noelle et al., 2016), also die Transkription proinflammatorischer Zytokine fördern könnte.

Die Datenlage in Bezug auf die gezeigte Interaktion von LASP1 und AP-1/ NF κ B sowie die stabilisierende Wirkung von LASP1 auf die epigenetischen Faktoren lassen die Hypothese zu, dass Makrophagen aus LASP1^{-/-}-Mäusen weniger TNF α transkribieren und damit die Konzentration im Zellüberstand im Vergleich zu wt-Zellen vermindert ist.

Die Untersuchungen im Zuge dieser Arbeit bzgl. der TNF α und ADAM17-mRNA und Protein-Expression sowie der TNF α -Sekretion zeigten jedoch keine Unterschiede durch die LASP1-Depletion auf. Damit konnte die ursprüngliche Hypothese eines

signifikanten Einflusses von LASP1 auf die Transkriptionsfaktoren AP-1, NF κ B und den DNMT1-UHRF1-Komplex mit folgender verminderter TNF α -Transkription/ Proteinexpression/ Sekretion nicht bestätigt werden.

Die beschriebene Interaktion von LASP1 mit AP-1 bzw. NF κ B fand bei nuklearer Akkumulation von LASP1 statt. Eine vermehrt nukleare Lokalisation von LASP1 wurde in verschiedenen Krebsarten gefunden und ging dort mit einer reduzierten Lebenserwartung einher (Orth et al., 2015). Speziell in humanen Brustkrebszellen (MDA-MB-231S) wurde der Mechanismus des Wanderns von LASP1 in den Zellkern genauer untersucht: Unter der Voraussetzung der Phosphorylierung an S146 wanderte LASP1 nach CXCL12-Stimulation (Duvall-Noelle et al., 2016) zusammen mit ZO-2 als Shuttleprotein in den Zellkern (Mihlan et al., 2013). Butt und Raman stellten daraufhin die in Abbildung 4-1 veranschaulichte Hypothese auf: Über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor wird die PKA aktiviert und LASP1 nachfolgend an S146 phosphoryliert, was die Bindung des Proteins an den CXCR4 erleichtert. Wird der CXCR4 über CXCL12 aktiviert, kommt es zur Inhibition der PKA durch G α_i . Durch Dephosphorylierung des CXCR4 löst sich LASP1 vom Rezeptor, bindet an ZO-2 und shuttelt als Komplex in den Zellkern (Butt & Raman, 2018).

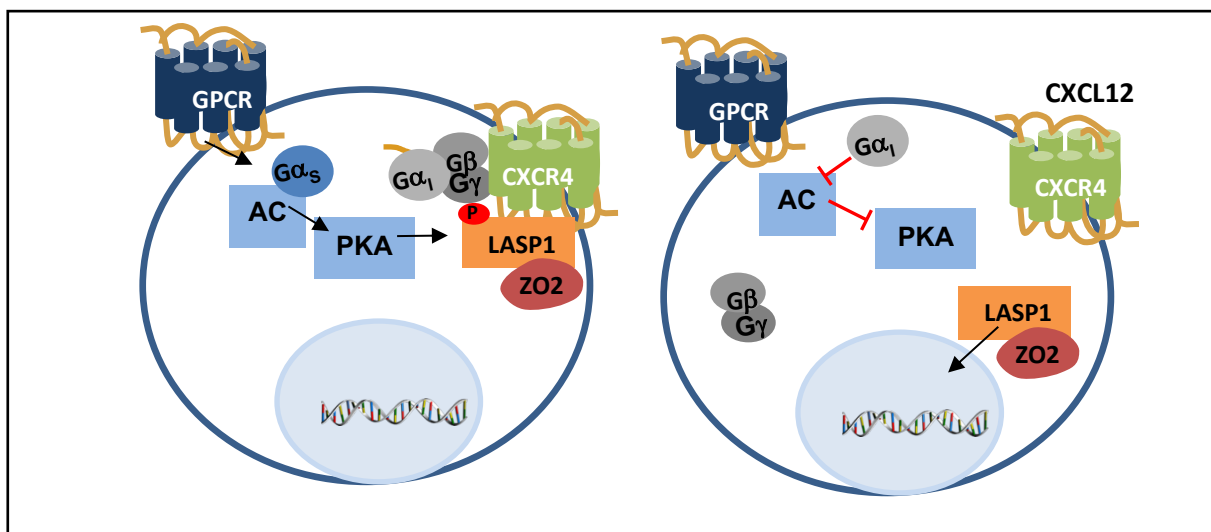


Abbildung 4-1: Modell zur CXCL12-vermittelten Translokation von LASP1 in den Zellkern. Ein an G α_s gekoppelter G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR) aktiviert die Proteinkinase A (PKA), die wiederum LASP1 an S146 phosphoryliert und dessen Bindung an den CXCR4 erleichtert. Bei Aktivierung von CXCR4 durch seinen Liganden CXCL12 wird G α_i aktiviert und inhibiert die Adenylatcyclase (AC) /PKA-Signal, wodurch die Akkumulation von pLASP1 verhindert wird. Es kommt zur Ablösung vom Rezeptor und LASP1 wird als Komplex zusammen mit dem Shuttleprotein ZO-2 in den Kern importiert. Modifiziert nach (Butt & Raman, 2018).

Eine nukleare Lokalisation von LASP1 in BMDMs war jedoch im Zuge der hier vorliegenden Arbeit weder *in vivo* (in der immunhistochemischen Färbungen von atherosklerotischen Plaques zeigte sich LASP1 in Plaquemakrophagen überwiegend an der Zellperipherie, bzw. im Zytoplasma, aber nicht im Kern), noch *in vitro* (im Rahmen einer CXCL12-Stimulation von Makrophagen, bzw. Zusatz eines PKA-Aktivators mit nachfolgender Kern-Zytosol-Trennung war LASP1 nicht in der Kernfraktion nachweisbar) festzustellen. Es ist zu beachten, dass eine signifikante

CXCR7-Expression in den Zellen per qPCR ausgeschlossen wurde (Daten nicht gezeigt), da CXCL12 ebenfalls durch den CXCR7 Effekte vermitteln kann (Butt et al., 2020; Xu, Li, Wu, Jiang, & Zhong, 2016). Auch war die Detektion des Proteins ZO-2 weder in der zytosolischen noch in der nuklearen Fraktion möglich. Dies wäre kongruent zu den Daten von Ogasawara et al., welche in der humanen Monozytenzelllinie THP eine ZO-2-Expression auf mRNA-Level nachweisen konnten, in einer *Western Blot*-Analyse allerdings ebenfalls kein Protein detektierten (Ogasawara et al., 2009). Durch die Abwesenheit des Shuttle-Partners ZO-2 könnte sich der fehlende Nachweis von LASP1 in Makrophagen im Kern erklären und damit auch die fehlende Beeinflussung der TNF α - und ADAM17-Transkription. Die Involvierung von LASP1 als modulierender Transkriptionsfaktor in Makrophagen/Monozyten bei der Atherogenese ist damit insgesamt als unwahrscheinlich zu werten.

4.1.3 Einflussnahme von LASP1 auf die Schaumzellformation in Makrophagen *in vitro*

Wurde in das Medium einer aus murinem Knochenmark gezüchteten Makrophagenpopulation oxLDL zugesetzt, zeigte sich eine deutliche Zunahme der LASP1 mRNA-Kopien und auch der Anteil LASP1-exprimierender Makrophagen nahm massiv zu (Kapitel 3.4.1).

Die Oxidation der LDL-Partikel kann unter anderem von ROS vermittelt werden, welche durch Hypoxie und Reoxygenierung entstehen (X. H. Yu et al., 2013). Hypoxie wird zunehmend als entscheidender Faktor in der Atherogenese diskutiert. Aufgrund reduzierter Sauerstoffversorgung in wachsenden Läsionen oder erhöhtem Sauerstoffverbrauch durch verstärkte Zellproliferation kann in bestimmten Regionen innerhalb atherosklerotischer Plaques ein Sauerstoffdefizit entstehen. Auf molekularer Ebene ist Hypoxie durch Stabilisierung der HIF-1 α -Untereinheit des Transkriptionsfaktors HIF charakterisiert. Es handelt sich um den Hauptregulator der Sauerstoffhomöostase, der zudem zahlreiche pro-atherogene Prozesse, wie SMC-Proliferation und -Migration, Angiogenese und Beeinträchtigung des Lipidmetabolismus bedingt (Ferns & Heikal, 2017). Dementsprechend zeigte sich eine hohe Expression von HIF-1 α in Makrophagen-reichen und Schaumzell-reichen Arealen muriner, atherosklerotischer Plaques (Aarup et al., 2016). Shatov et al konnten eine Hypoxie-unabhängige Akkumulation von HIF-1 α nach oxLDL-Stimulation in der humanen monozytären Zelllinie MM6 zeigen (Shatov, Sumbayev, Zhou, & Brune, 2003). Hutter und Kollegen konnten dies bestätigen und zeigten eine Hochregulierung der HIF-1 α -mRNA nach oxLDL-Stimulation in humanen peripheren Blutmonozyten (Hutter et al., 2013). Interessanterweise wurde die Hochregulierung von LASP1 unter hypoxischen Bedingungen in der Literatur bereits unter verschiedenen Aspekten diskutiert (Fang et al., 2017; Fjeldbo, Aarnes, Malinen, Kristensen, & Lyng, 2016). So konnte im Pankreas-Karzinom gezeigt werden, dass HIF-1 α an eine Promotorregion von LASP1 bindet und dies zur Überexprimierung sowohl auf mRNA als auch auf Protein-Level von LASP1 führt (T. Zhao et al., 2015). Folglich könnte die beobachtete

Hochregulierung der LASP1-mRNA in Makrophagen nach oxLDL-Stimulation über eine erhöhte HIF-1 α -Expression zu erklären sein. Weitere Untersuchungen bezüglich dieses Sachverhalts wären zur Bestätigung der Hypothese nötig.

Als weiteres Ergebnis konnte eine erhöhte Aufnahme von oxLDL in LASP1-defizienten Makrophagen *in vitro* beobachtet werden. Die Aufnahme der oxidierten LDL-Partikel durch Makrophagen wird zu einem Großteil über *Scavenger*-Rezeptoren (CD36, SR-A, SR-B, LOX-1) per *lipid raft* Endozytose vermittelt. Es wird angenommen, dass 75% - 90% der oxLDL-Aufnahme durch Makrophagen über die *Scavenger*-Rezeptoren CD36 und SR-A ermöglicht werden. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit totaler oder Makrophagen-spezifischer CD36-Defizienz weniger atherosklerotische Läsionen aufwiesen, was die Schlüsselrolle dieses Rezeptors unterstreicht (L. Zhao, Varghese, Moorhead, Chen, & Ruan, 2018).

Die hier vorliegenden Daten zur relativen mRNA-Expression des CD36 zeigten unter nicht-stimulierten Bedingungen eine signifikante Erhöhung in Ldlr.LASP1^{-/-}-Makrophagen im Vergleich zu Ldlr^{-/-}-Makrophagen. Dieser Unterschied glich sich nach oxLDL-Stimulation jedoch an. Es ist wichtig zu bemerken, dass in Ldlr.LASP1^{-/-}-Makrophagen nach oxLDL-Stimulation keine signifikante Steigerung der CD36-Transkription beobachtbar war. Das Erreichen einer maximalen Transkriptionsrate unter oxLDL-Stimulation, im Sinne eines Plateaus, ist zu diskutieren, sodass etwaige Unterschiede gar nicht mehr abbildbar sind. Eine Untersuchung zur Expression des CD36 auf Proteinebene ist anzuraten, da ggf. in LASP1-defizienten Makrophagen eine erhöhte CD36-Expression die vermehrte oxLDL-Aufnahme erklären könnte.

Die Transkription von CD36 wird unter anderem über PPAR γ in einer positiven *Feedback*-Schleife reguliert: Das, über den CD36 aufgenommene oxLDL aktiviert PPAR γ , welcher in der Folge die Transkriptionsrate von CD36 erhöht und so die Schaumzellbildung fördert (L. Zhao et al., 2018). Auch AP-1, ein Transkriptionsfaktor, der ebenfalls in Zusammenhang mit LASP1 als Co-Faktor diskutiert wird (Endres et al., 2016), scheint die CD36-Expression zu erhöhen (Chistiakov, Melnichenko, Myasoedova, et al., 2017). LASP1, als Stabilisator der Transkriptionsfaktoren UHRF1 und DNMT1, könnte in den LASP1-Knockout Zellen über eine Verminderung von PPAR γ und/oder Destabilisierung von AP1 die CD36-Expression verringern (Sabatino et al., 2012; J. Yu et al., 2016). Da allerdings im Zuge dieser Arbeit die nukleare Lokalisation von LASP1 in Makrophagen nicht bestätigt werden konnte (s. 4.1.2), ist die Regulation über diesen Signalweg nicht anzunehmen und spiegelte sich nicht unseren Daten wider.

Neben der Rezeptor-vermittelten Lipidaufnahme kann oxLDL auch zu einem geringeren Anteil per Makropinozytose von Makrophagen aufgenommen werden (Michael et al., 2013). In diesem Zusammenhang ist der G-Protein-gekoppelte Rezeptor CXCR4 zu nennen, der mit der Induktion von Makropinozytose (Tanaka et al., 2012) in Leukozyten in Verbindung gebracht wurde (Weber et al., 2016). LASP1 bindet phosphorylierungsabhängig an den CXCR4 (Raman et al., 2010). Butt et al. zeigten, dass es hier zu einer Stabilisierung des Rezeptors kommt (Butt et al., 2020). In der Folge wäre bei LASP1-KO nicht mit einer erhöhten Rate an Makropinozytose zu

rechnen und gibt damit keine Erklärung für die gesteigerte oxLDL-Aufnahme bei LASP1-KO.

Interessanterweise bildete sich die erhöhte oxLDL-Aufnahme durch Ldlr.LASP1^{-/-} Makrophagen nicht in einer erhöhten Schaumzellbildung *in vitro* ab. Ausgehend von diesen Ergebnissen kann somit nicht auf eine erhöhte atherosklerotische Plaquebildung *in vivo* geschlossen werden.

Der entscheidende Regulationsmechanismus zur Lipidhomöostase stellt nicht die oxLDL-Aufnahme über *Scavenger*-Rezeptoren dar, sondern die Cholesterinefflux-Pumpen (Pennings et al., 2006). Unter atherosklerotischen Bedingungen wird die Expression der Influx-Rezeptoren erhöht, demgegenüber die der Efflux-Transporter erniedrigt. Damit ist die Balance gestört und es kommt zu exzessiver Akkumulation von Cholesterin in Form von Lipidtröpfchen im Zellinneren (Chistiakov, Melnichenko, Myasoedova, et al., 2017) (Abb.1-8). Die Daten, welche im Zuge dieser Arbeit erhoben wurden, spiegeln die erhöhte mRNA- des CD36 nach oxLDL-Stimulation, also die erhöhte Expression der Influx-Rezeptoren unter atherosklerotischen Bedingungen, wider (Abb. 3-22). Allerdings stieg auch in vergleichbarem Maße die Quantität der mRNA-Kopien der ABCA1- und ABCG1-Transporter an. Es kam also nicht zu einer Erniedrigung der mRNA-Expression der Efflux-Transporter. Der Schluss liegt nahe, dass die intrazelluläre Lipidakkumulation nicht die erhöhte oxLDL-Aufnahme abbildet, da durch die hohe Expression der ABC-Transporter die Lipidhomöostase in den Makrophagen durch aktiven Cholesterolefflux weiterhin aufrechterhalten werden kann. Ein interessanter Aspekt zeigte sich in der Arbeit von Bekkering und Kollegen. Sie untersuchten den Prozess der *trained immunity* in humanen peripheren Blutmonozyten nach oxLDL-Stimulation. Sie setzten oxLDL für 24 h dem Medium zu und analysierten im Anschluss an die Stimulation sowie 6 Tage später per qPCR die mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine, Schlüsselrezeptoren und per *OilRed-O*-Färbung die Schaumzellbildung. Bei der Messung im Anschluss an die 24-stündige oxLDL-Stimulation konnte analog zu unseren Ergebnissen keine gesteigerte Schaumzellbildung beobachtet werden. Eine Hochregulierung der Influx-Rezeptoren und Suppression der Efflux-Transporter und in der Folge eine erhöhte Schaumzellbildung konnte allerdings bei der Messung nach 6 Tagen gezeigt werden (Bekkering et al., 2014). Möglicherweise müsste unser Versuchsprotokoll bzgl. einer Verlängerung der oxLDL-Exposition bzw. einer höheren oxLDL-Konzentration angepasst werden, um eine bestehende Veränderung der Schaumzellbildung abbilden zu können.

4.1.4 Einflussnahme von LASP1 in der MMP12-vermittelten Degradation *in vitro*

Stöling und Kollegen diskutierten eine mögliche Einflussnahme von LASP1 auf die lokale Freisetzung von Matrixmetalloproteinasen an den Podosomen in humanen Makrophagen (Stolting et al., 2012). Die Aktivität von MMPs kann auf vier verschiedene Weisen reguliert werden: Erhöhung der Genexpression, Vesikel-Sekretion, Aktivierung der Proformen und Komplexbildung mit TIMPs (Newby, 2005).

In der Arbeitsgruppe wurde die Genexpression verschiedener MMPs bereits untersucht. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der mRNA-Kopien der MMP12 in murinen BMDMs nach LASP1-KO (unveröffentlichte Daten). Die MMP12 scheint insgesamt eine atherogene Wirkung zu entfalten (Newby, 2016). Aufgrund dessen wäre bei einer möglichen erhöhten Aktivität der MMP12 in LASP1^{-/-}-Makrophagen eine erhöhte Plauebildung und -instabilität zu erwarten.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des LASP1-KOs auf das Degradationsverhalten der MMP12 mittels Zymographie untersucht. Trotz hoher Aktivität der MMP12 waren weder im Zellüberstand, welcher die Vesikelsekretion und Aktivierung der Pro-Enzyme repräsentiert, noch im Zelllysate Unterschiede zwischen Ldlr^{-/-} und Ldlr.LASP1^{-/-}-Makrophagen zu beobachten. In den Daten von Thorsten Günder zeigte sich kein Unterschied durch den LASP1-KO in der Detektion des MMP12-Proteins mittels WB. Damit spiegelte sich die erhöhte Transkriptionsrate der MMP12 nicht in einer erhöhten Proteinexpression wider. Zudem fiel die Proteinexpression der MMP12 insgesamt eher gering aus (unveröffentlichte Daten). Dieses Ergebnis ist kongruent zu den nicht detektierbaren Unterschieden im Degradationsverhalten beim Auftragen von Zelllysaten sowie der insgesamt geringeren Caseindegradation durch die MMP12 in den Zelllysaten im Vergleich zum konditionierten Medium.

Zur Bestätigung, dass die aktivierte MMP12 tatsächlich im Zellüberstand vorhanden ist und die beobachtete Degradation bedingen kann, wurde der Zellüberstand, welcher in der Zymographie eingesetzt wurde, ebenfalls in einer WB-Analyse zum Nachweis und zur Quantifizierung der MMP12 auf Proteinebene analysiert. Der eingesetzte, monoklonale Antikörper bindet allerdings an die letzten 25 Aminosäuren des C-terminalen Endes der MMP12, welche das Propeptid darstellt. Während der proteolytischen Aktivierung der MMP12 in seine 22 kDa Form wird die Propeptid-Domäne abgetrennt (s. Datenblatt des Herstellers des Antikörpers). Vermutlich wird zuerst der N-Terminus degradiert, da der Nachweis von intermediären, aktiven Formen möglich war, jedoch nicht der Nachweis der aktivierten MMP12 bei 22 kDa im Zellüberstand (Daten nicht gezeigt).

Prinzipiell kann die Casein-Degradation zusätzlich zur MMP12 auch durch die Gelatinasen MMP2 und -9 sowie die Matrilysinase MMP7 vermittelt werden. Die Pro-Form von MMP9 hat ein Molekulargewicht von 92 kDa, während die aktivierte Form 84 kDa aufweist. MMP2 besitzt ein Molekulargewicht von 72 kDa (Newby, 2005). Im Zymogramm konnte auf dieser Höhe keine Degradation des Gels beobachtet werden.

Eine Beeinflussung der Casein-Degradation durch MMP2 und 9 ist damit unwahrscheinlich. MMP7 hat wie MMP12 eine aktive 22kDa-Form. Allerdings wird MMP7 in murinen Makrophagen nur zu einem sehr geringen Anteil exprimiert (Newby, 2016). In einer qPCR-Analyse durchgeführt von Thorsten Günder zum Screening der mRNA-Expression verschiedener MMPs in murinen Makrophagen ergab sich ebenfalls kein Hinweis auf eine signifikante Expression der MMP7 (unveröffentlichte Daten). Die gleichzeitige Degradation des Gels durch MMP7 zusätzlich zu MMP12 in der hier durchgeführten Zymographie ist damit auszuschließen.

Aufgrund nicht-detektierbarer Unterschiede im Degradationsverhalten der aktiven MMP12 in der Caseingel-Zymographie zwischen den verschiedenen Genotypen zeigte sich keine Anhalt für eine Einflussnahme von LASP1 auf die MMP12-Aktivität, bzw. Vesikelsekretion und Aktivierung der Proformen. In der Folge ist eine Konsequenz der erhöhten MMP12-Transkription bei LASP1-KO für das Fortschreiten des Krankheitsbildes der Atherosklerose unwahrscheinlich.

4.2 Einordnung der Rolle von LASP1 in der Atherogenese

4.2.1 Pro-atherosklerotische Aspekte der Involvierung von LASP1 in die Atherogenese

Ausgehend von den Ergebnissen des 16 Wochen-HFD-Versuches, welcher ein signifikant erhöhtes Plaquevorkommen nach LASP1-KO zeigte, ist LASP1 insgesamt als protektiv bezüglich der Entwicklung von Atherosklerose einzuordnen.

Allerdings deuten einige Daten, die im Rahmen dieser Arbeit erhoben wurden, für sich stehend eher auf eine pro-atherosklerotische Wirkung von LASP1 hin.

1. Reduzierte, intimale Invasion nach LASP1-KO *in vitro*

In vitro konnte eine Reduktion der Adhäsion und Migration durch den LASP1-KO in *Ldlr*^{-/-}-Monozyten gezeigt werden. Nachdem die intimale Invasion der Monozyten einen essentiellen, initialen Schritt in der Atherogenese darstellt, würden die Daten eine reduzierte aortale Plaquebildung in *LASP1.Ldlr*^{-/-}-Mäusen nahelegen. Im Umkehrschluss würden in der Anwesenheit von LASP1 mehr Monozyten an das Gefäßendothel adhären und in der Folge in die Intima migrieren.

2. Ausbleibende Monozytose nach LASP1-KO unter HFD

Unter Chow-Diät unterschied sich die Zahl und Aktivierung der Blutmonozyten in *Ldlr*^{-/-} und *Ldlr.LASP1*^{-/-}-Tieren nicht signifikant. Interessanterweise konnte nach 16 Wochen HFD kein signifikanter Anstieg der Monozytenzahl pro μl in *Ldlr.LASP1*^{-/-}-Tieren nachgewiesen werden und auch der Anteil der *Ly6C*^{high} Monozyten an der Gesamtmonozytenzahl erhöhte sich nicht wie in *Ldlr*^{-/-} Mäusen. Der LASP1-KO scheint einen Einfluss auf die Zahl der peripheren Leukozyten speziell unter inflammatorischen Bedingungen zu haben. Das Ausmaß der Akkumulation von Makrophagen in atherosklerotischen Plaques korreliert direkt mit der Menge an zirkulierenden *Ly6C*^{high}

Blutmonozyten (Cochain & Zerneck, 2017), sodass in Ldlr.LASP1^{-/-}-Tieren basierend auf den erhobenen Daten eher mit einer geringeren Anzahl an Plaques zu rechnen wäre.

3. Vermindertes Serumcholesterin nach LASP1-KO unter HFD

Zudem war in Ldlr.LASP1^{-/-}-Tieren das Gesamtcholesterin im Serum nach HFD im Vergleich zu Ldlr^{-/-}-Mäusen vermindert (Daten unveröffentlicht, nicht gezeigt). Es ist bekannt, dass Hypercholesterinämie zu Monozytose, insbesondere selektiver Erhöhung der Zahl der Ly6C^{high}-Monozyten führt (Swirski et al., 2007). Dies ist zum einen durch die Bildung im Knochenmark erklärbar: Hämatopoetische Stammzellen werden durch Hypercholesterinämie zur gesteigerten Produktion von proinflammatorischen, myeloischen Zellen angeregt (Seijkens et al., 2014). Zum anderen führt auch das erhöhte Überleben der Ly6C^{high}-Monozyten und die gehemmte Konversion in Ly6C^{low} Monozyten zu dieser Differenz (Swirski et al., 2007). Eine Einflussnahme auf die Monopoese und auf das Verhalten der Ly6C^{high} Monozyten durch das verminderte Serumcholesterin in Ldlr.LASP1^{-/-} Tieren ist daher nicht auszuschließen und wäre stimmig zu den nicht im gleichen Maße erhöhten Monozytenwerten wie in Ldlr^{-/-}-Mäusen nach 16 Wochen HFD. Es ist anzumerken, dass trotz des reduzierten Serumcholesterins weiterhin eine ausgeprägte Hypercholesterinämie vorlag, sodass die Voraussetzung für die Bildung atherosklerotischer Läsionen nach wie vor gegeben war.

4. Verminderte IFN γ Produktion der CD8⁺ T-Zellen unter HFD bei LASP1-KO

Des Weiteren konnte eine signifikant verringert IFN γ -Produktion der CD8⁺-T-Zellen unter HFD bei LASP1-KO gemessen werden. Der Anteil der CD8⁺-Zellen im Vergleich zur Gesamt-T-Zellzahl war zwischen Ldlr^{-/-}- und Ldlr.LASP1^{-/-}-Mäusen sowohl unter Chow-Diät als auch unter HFD vergleichbar (Daten unveröffentlicht, nicht gezeigt). Es gibt Hinweise darauf, dass die IFN γ -Sekretion durch CD8⁺-T-Zellen in Bereichen die Monopoese und Ly6C^{high}-Monozytose während der Atherogenese beeinflusst (Cochain et al., 2015; Schurch, Riether, & Ochsenein, 2014). Ein Einfluss der unter HFD detektierten, reduzierten IFN γ -Produktion durch CD8⁺ Zellen, isoliert aus Ldlr.LASP1^{-/-}Mäusen, auf die Monopoese wäre denkbar und könnte einen weiteren Erklärungsversuch für die ausbleibende Monozytose in Ldlr.LASP1^{-/-} Mäusen darstellen.

Die Zusammenschau dieser Ergebnisse ließe eher auf eine verminderte Plaquebildung in Ldlr.LASP1^{-/-} Mäusen schließen. Eine reduzierte Zahl läSIONaler Makrophagen konnte jedoch in den Plaques in LASP1^{-/-}-Mäusen mittels immunhistochemischer Färbung nicht nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten; nicht gezeigt). Dagegen konnte LASP1 in der immunhistochemischen Färbung neben Makrophagen, in den Endothelzellen nachgewiesen werden. Es ist zu diskutieren, ob LASP1 gegebenenfalls einen Einfluss auf die Endothelzellbarriere haben könnte. Endotheliale „tight junctions“ sind entscheidend in der Regulation von Zeit und Ort der Leukozytenextravasation. In diesem Zusammenhang kommt speziell VE-Cadherin als

wichtiger Stabilisator der Adhäsionsbindung zwischen Endothelzellen eine wichtige Funktion zu (Gerhardt & Ley, 2015). VASP, Zyxin und LPP, Bindungspartner von LASP1 scheinen zusammen eine Rolle in der Verstärkung von VE-Cadherin-basierenden Zell-Zell-Adhäsion zu spielen (Hansen & Beckerle, 2006). In LASP1-defizienten Tieren könnte die korrekte Lokalisation der Proteine gestört sein. Dies wurde bereits beim *Silencing* von LASP1 in humanen Brustkrebszellen gezeigt, die eine verminderte Rekrutierung von Zyxin und VASP an Fokalkontakte aufwiesen (Grunewald & Butt, 2008). In LASP1^{-/-} Mäusen könnte daraus eine erhöhte Durchlässigkeit des Endothels resultieren, was wiederum mit einer verstärkten Akkumulation von LDL-Partikeln sowie Monozytentransmigration einhergehen könnte.

4.2.2 Anti-atherosklerotische Aspekte der Involvierung von LASP1 in die Atherogenese

Erhobene Daten, welche das Ergebnis des 16 Wochen HFD Versuchs eines anti-atherosklerotischen Einflusses von LASP1 auf die Atherogenese stützen, sind folgende:

1. Gesteigerte oxLDL-Aufnahme und Schaumzellbildung

In Bezug auf die *in vitro*-Daten, welche im Rahmen dieser Arbeit erhoben wurden, unterstützen primär die erhöhte oxLDL-Aufnahme nach LASP1-KO durch Makrophagen sowie die tendenziell erhöhte Schaumzellbildung die anti-atherosklerotische Rolle von LASP1. Da allerdings *in vitro* keine entsprechende Steigerung der Schaumzellformation in LASP1-defizienten Makrophagen beobachtet werden konnte, lässt dies keine eindeutige Erklärung für die gesteigerte Plaquebildung *in vivo* zu. Allerdings könnte schlicht die Inkubationszeit mit oxLDL bis zur Messung der Schaumzellformation zu kurz gewesen sein. Auch die bereits diskutierte Involvierung von LASP1 in der Entwicklung einer Endothelzell dysfunktion könnte ausschlaggebend sein für eine erhöhte Akkumulation von oxLDL in der Gefäßwand und damit für eine vermehrte Plaquebildung.

Eine Erklärung für das reduzierte Serumcholesterin bei erhöhter Plaquebildung in Ldlr.LASP1^{-/-} Tieren unter HFD könnte die Rolle von LASP1 in dendritischen Zellen sein: Neben Makrophagen scheinen auch dendritische Zellen an der Schaumzellbildung und der Kontrolle des Lipidmetabolismus beteiligt zu sein. Bei Hypercholesterinämie wird die Fähigkeit der dendritischen Zellen, aus der arteriellen Wand herauszuwandern, vermindert mit nachfolgender Akkumulation der Zellen in der Gefäßwand. Dort könnten sie analog zu Makrophagen oxLDL aufnehmen und somit zum Schaumzellgehalt in atherosklerotischen Läsionen beitragen (Gil-Pulido & Zerneck, 2017). Interessanterweise geht eine Überexpression von DCs mit einem reduzierten Serumcholesterinlevel einher. Damit wäre eine Beteiligung von DCs an der Cholesterin-Clearance aus dem Blut möglich (Gautier et al., 2009). LASP1 konnte in DCs, differenziert aus humanen peripheren Blutmonozyten, nachgewiesen werden und scheint dort auch eine regulatorische Rolle einzunehmen (Kaspar et al., 2009).

Auch konnte in RNA-Sequenz-Analysen von DCs aus GM-CSF differenzierten Monozyten sowie reifen DCs isoliert aus B6-Mausblut (freundlicherweise von Dr. Clement Cochain zur Verfügung gestellt; Anhang) eine deutliche Expression von LASP1 gemessen werden. Zur genaueren Differenzierung der Rolle von LASP1 in DCs im Rahmen der Atherosklerose bedarf es weiterer Untersuchungen.

2. Erhöhung der T-Zellfraktion

Unter Chow-Diät war der Anteil CD3⁺ Zellen an der Leukozytenpopulation im Blut in Ldlr.LASP1^{-/-} Mäusen signifikant größer. Dieser Effekt verstärkte sich unter HFD-Bedingungen. Pro-IL-16, welches in T-Zellen zu einer Unterdrückung des Zellzykluswachstums führt, wurde in einer Doktorarbeit der Uni Berlin als Bindungspartner der SH3 Domäne von LASP1 beschrieben (Haag, 2007). LASP1 wird in starkem Ausmaß in T-Zellen exprimiert. Damit ist eine Einflussnahme von LASP1 über Pro-IL-16 auf die T-Zell-Proliferation nicht auszuschließen (Grunewald & Butt, 2008). Der LASP1-KO würde damit eine gesteigerte T-Zell-Proliferation bedingen. Dies wäre kongruent zu den erhobenen *in vivo*-Daten. T-Zellen sind als Immunzellen im Rahmen der Atherosklerose in viele Prozesse involviert. Eine positive Beeinflussung der Atherogenese über das vermehrte Vorkommen von T-Zellen in Ldlr.LASP1^{-/-} Tieren ist vorstellbar.

3. Reduktion der Fraktion LASP1-exprimierender, zirkulierender Blutmonozyten unter HFD

Der Prozentanteil LASP1-exprimierender Blutmonozyten an der Gesamtleukozytenzahl war unter HFD in Ldlr^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Werten unter Chow-Diät erniedrigt. Kongruent dazu war die Anzahl der LASP1-exprimierenden Makrophagen der roten Pulpa, isoliert aus Milzen dieser Mäuse, ebenfalls unter HFD hochsignifikant reduziert. Cholesterinreiche Ernährung und damit verbundene Signalkaskaden und Entzündungsvorgänge scheinen die Proteinexpression von LASP1 in monozytären Zellen zu mindern und so gegebenenfalls die Atherogenese weiter voranzutreiben.

Die Transkriptionsrate von LASP1 im Gesamtgewebe atherosklerotisch veränderten Aortenwurzeln und Milzen, entnommen aus HFD-Tieren, war im Vergleich zu Organen aus Chow-Diät-Mäusen allerdings nicht signifikant verändert. Da keine Differenzierung der einzelnen Zelltypen möglich ist, sondern das Gesamtgewebe verwendet wurde, ist die Aussagekraft dieses Versuchs prinzipiell fraglich. Zur besseren Beurteilung des LASP1-Gehalts in Makrophagen, welche in Aortae aus Diät- und Nicht-Diät-Tieren akkumulieren, wäre eine durchflusszytometrische Analyse denkbar. Per Antikörperfärbung ist hier die spezifische Messung des LASP1-Levels in Makrophagen möglich. Butcher und Kollegen haben 2011 ein dies bezügliches Versuchsprotokoll entworfen (Butcher, Herre, Ley, & Galkina, 2011).

4.2.3 Konklusion der Einflussnahme von LASP1 auf die Atherogenese

Trotz reduzierter initialer Invasionsfähigkeit der Monozyten *in vitro* sowie vermindertem Serumcholesterin und geringerer Fraktion der Ly6C^{high}-Monozyten unter HFD, konnten mehr Plaques bei LASP1^{-/-}-Mäusen gesehen werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sich in der Einflussnahme auf die Endothelbarriere durch das Fehlen von LASP1 ergeben. Dagegen zeigten sich kongruent zu dem vermehrten Plaquevorkommen in den Aortenwurzeln der LASP1^{-/-}-Mäuse eine erhöhte oxLDL-Aufnahmerate und auch eine tendenziell erhöhte Schaumzellbildung *in vitro* bei Depletion von LASP1 in BMDMs. *In vivo* war zudem die T-Zellzahl erhöht, was einen weiteren Faktor zur Progression von Plaques darstellt.

In vitro führte die Zugabe von oxLDL zu Makrophagenmedium zu einem hochsignifikanten Anstieg der Expression von LASP1 in BMDMs. Wenn mehr LASP1 exprimiert wird, dann müsste, basierend auf den *in vitro*-Ergebnissen, auch die oxLDL-Aufnahme vermindert und damit die Schaumzellformation reduziert sein. Dies unterstützt das Ergebnis der 16 Wochen HFD-Versuche. Ausgehend von diesen Daten scheint ein entscheidender modulierender Einfluss von LASP1 primär im Prozess der Schaumzellformation vorhanden zu sein.

Der postulierte Einfluss von LASP1 auf die Invasionsfähigkeit der Zellen, basierend auf den Daten aus der Krebsforschung, konnte zwar *in vitro* in monozytären Zellen wiederholt werden (s. Migrations + Adhäsionsassay), allerdings scheint sich dies nicht entscheidend auf die Atherogenese *in vivo* auszuwirken.

4.3 Übertragbarkeit auf den humanen Organismus und klinische Relevanz

Eine Einflussnahme von LASP1 auf die Atherogenese konnte in dieser Arbeit aufgezeigt werden. Die Entstehung von Atherosklerose spiegelt jedoch ein hochkomplexes Zusammenspiel vieler verschiedener Faktoren wider. Die Untersuchungen eines einzelnen Proteins in diesem Zusammenhang kann wichtige Hinweise geben und neue Forschungsmöglichkeiten eröffnen, aber unmöglich umfassende und eindeutige Kausalitäten aufzeigen. Zwar wird LASP1 als Aktin-Zytoskelettprotein ubiquitär exprimiert, LASP1^{-/-}-Mäuse sind jedoch lebensfähig, fruchtbar und zeigen keinerlei Auffälligkeiten oder gar Missbildungen. Es ist daher anzunehmen, dass die Abwesenheit des Proteins in irgendeiner Form in der Maus kompensiert wird (Butt & Raman, 2018). Die Vielfältigkeit der erhobenen Daten zu LASP1 im Zusammenhang der Atherogenese spiegeln die breitgefächerte Beteiligung des Zytoskelettproteins an zahlreichen zellulären Prozessen wider. So ergaben sich Hinweise darauf, dass LASP1, neben den Zellen der monozytären Linie, auch über anderen Zellarten, wie DCs und ECs, beteiligt sein könnte.

Aufgrund gegebener Limitationen der Erforschung von Atherosklerose im Mausmodell ist in Bezug auf die Übertragbarkeit von Mechanismen und therapeutischen Optionen auf den Menschen insgesamt Vorsicht geboten (Weber & Noels, 2011). Allerdings ist

angesichts der hohen genetischen Konkordanz humaner und muriner Monozyten-Subtypen anzunehmen, dass die erhobenen Daten mit murinen Monozyten im Zusammenhang mit der Atherosklerose Rückschlüsse auf die humane Erkrankung zulassen (Manthey et al., 2013). Dagegen zeigten die Forschungsergebnisse der letzten Jahre in Bezug auf *in vitro* Makrophagen-Untersuchungen, dass die M1/M2-Polarisierung artifizielle Extrema des Makrophagenspektrums verkörpert. Unter realen Bedingungen stellen Makrophagen in inflammatorischen Geweben eine höchst heterogene Population dar und sind durch erstaunliche Plastizität charakterisiert (Woollard & Geissmann, 2010). Eine Übertragbarkeit der Daten, die im Zusammenhang mit diesen stark reglementierten, speziellen *in vitro*-Konditionen gesammelt wurden, auf ein humanes Krankheitsmodell, ist fraglich. Trotz weitverbreiteter Anwendung ist es unwahrscheinlich, dass das M1/M2-Paradigma der Vielschichtigkeit der phänotypischen Heterogenität von Makrophagen in Atherosklerose gerecht wird (Cochain & Zerneck, 2017; Martinez & Gordon, 2014).

Inwiefern die Entwicklung pharmakologischer Substanzen zur Prävention und Intervention kardiovaskulärer Erkrankungen möglich und sinnvoll ist, kann zum jetzigen Forschungsstand noch nicht mit Sicherheit gesagt werden. Aufgrund der Komplexität der Involvierung von LASP1 sollte allerdings insgesamt Vorsicht geboten sein, Therapien basierend auf LASP1-Interaktionen einzusetzen, da unerwünschte Nebenwirkungen aufgrund des ubiquitären Vorkommens sehr wahrscheinlich sind. Deshalb sind sehr spezifische, zielorientierte Ansätze nötig, um eine spezifische Ligand-Rezeptor-Interaktion in einem speziellen Zelltyp isoliert zu untersuchen und zu beeinflussen. Es bedarf der Erhebung weiterer Daten, um die Rolle von LASP1 in der Atherogenese genauer zu charakterisieren.

5 Ausblick

Eine Involvierung von LASP1 in zahlreichen Prozessen der Atherogenese konnte belegt werden. Die Phosphorylierung von LASP1 an S146 und Y171 reguliert die Wirkung und das Verhalten des Proteins auf entscheidende Art und Weise (Butt et al., 2020; Mihlan et al., 2013; Orth et al., 2015). In zukünftigen Untersuchungen sollte daher im Besonderen ein Schwerpunkt auf die Veränderung und Auswirkungen der Phosphorylierung von LASP1 während der Atherogenese gelegt werden.

Die erhöhte Plaquebildung in der Gesamtaorta in Ldlr.LASP1^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Ldlr^{-/-}-Tieren nach 16 Wochen HFD lassen auf eine anti-atherosklerotische Wirkung von LASP1 schließen, was im Speziellen mit den erhobenen *in vitro*-Daten bezüglich der gesteigerten oxLDL-Aufnahme nach LASP1-KO korreliert. Zur Bestätigung einer erhöhten Schaumzellformation in LASP1^{-/-}-Makrophagen könnte eine OilRedO Färbung von Aorten, isoliert aus HFD-Ldlr^{-/-} und -Ldlr.LASP1^{-/-}-Tieren, eine Möglichkeit zur Untersuchung der Schaumzellbildung bei Langzeit-oxLDL-Einwirkung *in vivo* darstellen.

Zur weiteren Erforschung der erhöhten oxLDL-Aufnahme scheint vor allem die Fokussierung auf den CD36-Rezeptor vielversprechend. Um die Rolle des CXCR4-Rezeptors im Zusammenhang der Makropinozytose bei der Schaumzellformation in LASP1-defizienten Makrophagen genauer zu charakterisieren, wäre die Untersuchung der Dil-oxLDL-Aufnahme bei Einsatz des CXCR4-Inhibitors AMD3100 sowie nach CXCL12-Stimulation denkbar.

Die aufgezeigte verminderte Serumcholesterinkonzentration in Ldlr.LASP1^{-/-}-Mäuse unter HFD lässt die Vermutung zu, dass LASP1 im Zusammenhang mit der Cholesterinhomöostase bzw. des Cholesterinstoffwechsel ein neues Forschungsfeld darstellt. Allgemein wird die Regulation des Cholesterinspiegels über intestinale Resorption, endogene Synthese sowie den intrahepatischen Stoffwechsel bzw. die biliäre Ausscheidung und *Clearance* aus dem Blut vermittelt (Li, Gu, & Zhang, 2013). Eine wichtige Rolle kommt dem Cholesterintransferprotein NPC1L1 (Niemann-Pick C1-ähnliches 1-Protein) in Enterozyten, also in der intestinalen Lipid-Resorption, zu. Die Hemmung von NPC1L1 kann eine Senkung des LDL-Cholesterins bedingen (Libby & Bornfeldt, 2020). Eine Einflussnahme von LASP1 auf den NPC1L1 wurde bisher nicht untersucht.

Zudem gibt es Hinweise darauf, dass das Darmmikrobiom mit metabolischen Veränderungen und mit Atherosklerose korreliert. Weber et al. diskutierten hier ein neues Forschungsfeld, welches die Modulation des Lipidmetabolismus mit kardiovaskulären Erkrankungen verknüpft (Weber & Noels, 2011). Die Untersuchung der Zusammensetzung der Stuhlproben von Ldlr.LASP1^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Ldlr^{-/-}-Tieren könnte entsprechende mikrobiome Veränderungen aufzeigen.

6 Zusammenfassung

Deutsch

Weltweit sind Atherosklerose bedingte Krankheitsfälle die Haupttodesursache. Von zirkulierenden Monozyten stammende Makrophagen wurden als Protagonisten in der Atherosklerose beschrieben. Das regulatorische Gerüst-Protein LASP1 wurde 2012 in humanen Makrophagen, im Speziellen in Podosomen nachgewiesen. Der LASP1 Knockdown minderte hier das gesamt-invasive Potential der Zellen (Stolting et al., 2012). Bis dato wurde LASP1 primär im Rahmen der Krebsforschung untersucht. Dort spielt es, bedingt durch seine Lokalisation an dynamischen Aktinskelettkonstruktionen (vgl. Invadopodien, Podosomen), nachweislich eine Rolle in Zellmigration, Proliferation und Invasionsfähigkeit bestimmter Tumorzellen (Orth et al., 2015). Hinsichtlich Entstehungsmechanismen und zugrundeliegenden Signalwegen wurde eine große gemeinsame Schnittmenge von Krebserkrankungen und Atherosklerose festgestellt. Die Prozesse der Adhäsion, Migration, Proliferation und Invasionsfähigkeit sind sowohl in der Pathogenese von Krebserkrankungen als auch in der Atherogenese von großer Bedeutung.

In einem 16 Wochen Hochfettdiätversuch zeigten LASP1.Ldlr^{-/-}-Mäuse mehr atherosklerotische Läsionen in der Gesamtaorta als Ldlr^{-/-}-Tiere. Damit scheint LASP1 protektiv bezüglich der Entwicklung von Atherosklerose zu wirken. In verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen wurde im Zuge dieser Arbeit die Rolle von LASP1 in der Atherogenese genauer untersucht.

Ergebnisse, die eine anti-atherosklerotische Rolle von LASP1 unterstützen:

1. Stimulation mit oxLDL führt in Makrophagen zu einer Hochregulation von LASP1 sowohl in Bezug auf die mRNA-Expression, als auch auf den Anteil LASP1-positiver Makrophagen. Zusätzlich internalisierten LASP1^{-/-}-Makrophagen signifikant mehr oxLDL im Vergleich zu LASP1-exprimierenden Zellen. Analog zur erhöhten Cholesterolinternalisierung konnte jedoch keine signifikant erhöhte Schaumzellformation nachgewiesen werden. Die Tendenz zu erhöhten Werten zeichnete sich jedoch, wenn auch ohne statistische Signifikanz, ab.
2. Der Nachweis von LASP1 in Plaquemakrophagen aus atherosklerotisch veränderten Aortenwurzeln konnte erbracht werden.
3. *In vivo* wurde eine Verminderung des Anteils LASP1-positiver Blutmonozyten an der Gesamt-Monozytenzahl unter HFD gezeigt.
4. In LASP1.Ldlr^{-/-} Tieren lag eine Erhöhung der T-Zellfraktion an der Gesamtleukozytenzahl vor.

Ergebnisse, welche solitär betrachtet eine pro-atherosklerotische Rolle von LASP1 vermuten lassen:

1. *In vitro* konnte im Zuge dieser Arbeit eine reduzierte endotheliale Adhäsion sowie chemotaktische Migration von Ldlr.LASP1^{-/-}-Monozyten im Vergleich zu Ldlr^{-/-}-Monozyten festgestellt werden.
2. Unter Normal-Diät ergaben sich in den Ldlr^{-/-}-und Ldlr.LASP1^{-/-}-Mäusen keine Unterschiede in der Monozytenexpression, während unter HFD eine Reduktion des Anteils CD115⁺ Zellen an der Gesamtleukozytenzahl in LASP1^{-/-}-Tieren im Vergleich zu den Ldlr^{-/-}-Tieren vorlag. Dies deutet auf eine direkte oder indirekte Regulation der Monopoese durch LASP1 unter inflammatorischen Bedingungen hin.
3. Die beobachtete reduzierte IFN γ -CD8⁺-T-Zellantwort in LASP1-defizienten Tieren könnte ebenfalls Einfluss auf zahlreiche Prozesse in der Atherogenese haben.

Ergebnisse, welche keine Involvierung von LASP1 in der Atherogenese nahelegen:

1. Ein Nachweis von LASP1 im Zellkern von BMDMs konnte, zusätzlich zum fehlenden Shuttleproteinpartner ZO-2, nicht erbracht werden. Die Interaktion von LASP1 mit Transkriptionsfaktoren scheint daher unwahrscheinlich. Kongruent mit diesen Ergebnissen zeigte sich keine Veränderung der Transkription, der Proteinexpression sowie Sekretion von TNF α und ADAM17 durch den LASP1-KO.
- 2 In der Caseingel-Zymographie ließ sich eine aktive MMP12 nachweisen, ohne jedoch Unterschiede im Degradationsverhalten nach LASP1-KO zu sehen. Dies ist kongruent zu der ebenfalls nicht-detektierbaren Expressionsdifferenz der MMP12 auf Proteinebene in LASP1^{-/-}-Makrophagen. Die Aktivität einer anderen MMP, welche den beobachteten Substratverdau bedingen könnte, konnte ausgeschlossen werden.

Konklusion

Insgesamt kommt LASP1 eine zweifellos komplexe Rolle in der Atherogenese zu. Die Ergebnisse der HFD-Versuche legen nahe, dass die primär anti-atherosklerotischen Einflüsse von LASP1 *in vivo* gegenüber den eher pro-atherosklerotischen Effekten des Proteins *in vitro* überwiegen.

Die gezeigte Reduktion des Serumcholesterins in Ldlr.LASP1^{-/-}-Mäusen unter HFD im Vergleich zu Ldlr^{-/-}-Tieren stellt momentan den interessantesten und potentiell vielversprechendsten neuen Forschungsansatz dar.

Englisch

Atherosclerosis-related illnesses are the leading cause of death worldwide. Macrophages derived from circulating monocytes have been described as protagonists in atherosclerosis. In 2012 the regulatory scaffold protein LASP1 was detected in human macrophages, notably in podosomes. The LASP1 knockdown reduced the overall invasive potential of the cells (Stolting et al., 2012). So far, LASP1 has primarily been studied in the context of cancer research. In this context it has been shown to play a role in cell migration, proliferation and invasiveness of certain tumor cells due to its localization on dynamic actin skeletal structures (cf. Invadopodien, Podosomes) (Orth et al., 2015). With regard to the development mechanisms and underlying signaling pathways, a large common overlap between cancer diseases and atherosclerosis has been identified. The processes of adhesion, migration, proliferation and the ability to invade are of great importance both in the pathogenesis of cancer diseases and in atherogenesis.

In a 16-week high-fat diet trial, LASP1.Ldlr^{-/-} mice showed more atherosclerotic lesions in the total aorta than Ldlr^{-/-} animals. Thus, LASP1 seems to have a protective effect on the development of atherosclerosis. In various *in vitro* and *in vivo* experiments, the role of LASP1 in atherogenesis was investigated in more detail.

Findings supporting an anti-atherosclerotic role of LASP1:

1. Stimulation with oxLDL leads to an upregulation of LASP1 in macrophages, both with regard to RNA expression and the proportion of LASP1-positive macrophages. In addition, LASP1^{-/-} macrophages internalized significantly more oxLDL compared to cells expressing LASP1. Analogous to the increased internalization of cholesterol, however, no significantly increased foam cell formation could be detected. Nevertheless, there was a tendency towards higher values, albeit without statistical significance.
2. The detection of LASP1 in plaque macrophages from atherosclerotic aortic roots could be provided.
3. *In vivo*, a reduction in the fraction of LASP1-positive blood monocytes of all CD45⁺ cells was shown under HFD.
4. In LASP1.Ldlr^{-/-} animals there was an increase of the T cell fraction of total leukocyte count.

Results which, standing for itself, suggest a pro-atherosclerotic role of LASP1:

1. In the course of this work, a reduced endothelial adhesion and chemotactic migration of Ldlr.LASP1^{-/-} monocytes compared to Ldlr^{-/-} monocytes could be determined *in vitro*.
2. Under normal diet there were no differences in monocyte expression in Ldlr^{-/-} and Ldlr.LASP1^{-/-} mice, while under HFD there was a reduction in the proportion of CD115⁺ cells of total leukocyte count in LASP1^{-/-} animals compared to Ldlr^{-/-} animals. This indicates a direct or indirect regulation of monopoiesis by LASP1 under inflammatory conditions.
3. The observed reduced IFN γ -CD8 + T cell response in LASP1-deficient animals could also influence numerous processes in atherogenesis.

Results that do not suggest the involvement of LASP1 in atherogenesis:

1. In addition to the missing shuttle protein partner ZO-2, it was not possible to detect LASP1 in the nucleus of BMDMs. Therefore, the interaction of LASP1 with transcription factors in macrophages seems unlikely. In line with these results, there was no change in transcription, protein expression or secretion of TNF α and ADAM17 by depletion of LASP1.
- 2 An active MMP12 could be detected in the casein gel zymography. Whereas no differences in degradatory behavior could be detected due to LASP1-KO. This is congruent with the findings of undetectable difference in the expression of MMP12 on protein level in LASP1^{-/-} macrophages. The possibility of another active MMP, which could cause the observed substrate digestion, could be excluded.

Conclusion

Overall, LASP1 plays an undoubtedly complex role in atherogenesis. The results of the HFD experiments suggest that the primarily anti-atherosclerotic effects of LASP1 *in vivo* outweigh the more pro-atherosclerotic effects of the protein *in vitro*.

The reduction in serum cholesterol in Ldlr.LASP1^{-/-} mice to Ldlr^{-/-} animals under HFD compared is currently the most interesting and potentially most promising new research approach.

7 Literaturverzeichnis

- Aarup, A., Pedersen, T. X., Junker, N., Christoffersen, C., Bartels, E. D., Madsen, M., . . . Nielsen, L. B. (2016). Hypoxia-Inducible Factor-1alpha Expression in Macrophages Promotes Development of Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36(9), 1782-1790. doi:10.1161/ATVBAHA.116.307830
- Abram, C. L., & Lowell, C. A. (2008). The diverse functions of Src family kinases in macrophages. *Frontiers in Bioscience*, 13, 4426-4450. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18508521>
- Amin, M., Pushpakumar, S., Muradashvili, N., Kundu, S., Tyagi, S. C., & Sen, U. (2016). Regulation and involvement of matrix metalloproteinases in vascular diseases. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 21, 89-118. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26709763>
- Ardelt, P., Grunemay, N., Strehl, A., Jilg, C., Miernik, A., Kneitz, B., & Butt, E. (2013). LASP-1, a novel urinary marker for detection of bladder cancer. *Urologic Oncology*, 31(8), 1591-1598. doi:10.1016/j.urolonc.2012.02.002
- Bekkering, S., Quintin, J., Joosten, L. A., van der Meer, J. W., Netea, M. G., & Riksen, N. P. (2014). Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(8), 1731-1738. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303887
- Benz, P. M., Blume, C., Seifert, S., Wilhelm, S., Waschke, J., Schuh, K., . . . Renne, T. (2009). Differential VASP phosphorylation controls remodeling of the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, 122(Pt 21), 3954-3965. doi:10.1242/jcs.044537
- Bianconi, V., Sahebkar, A., Atkin, S. L., & Pirro, M. (2018). The regulation and importance of monocyte chemoattractant protein-1. *Current Opinion in Hematology*, 25(1), 44-51. doi:10.1097/MOH.0000000000000389
- Busillo, J. M., & Benovic, J. L. (2007). Regulation of CXCR4 signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768(4), 952-963. doi:10.1016/j.bbamem.2006.11.002
- Butcher, M. J., Herre, M., Ley, K., & Galkina, E. (2011). Flow cytometry analysis of immune cells within murine aortas. *J Vis Exp*(53). doi:10.3791/2848
- Butt, E., Abel, K., Krieger, M., Palm, D., Hoppe, V., Hoppe, J., & Walter, U. (1994). cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *Journal of Biological Chemistry*, 269(20), 14509-14517. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8182057>
- Butt, E., & Raman, D. (2018). New Frontiers for the Cytoskeletal Protein LASP1. *Frontiers in Oncology*, 8, 391. doi:10.3389/fonc.2018.00391
- Butt, E., Stempfle, K., Lister, L., Wolf, F., Kraft, M., Herrmann, A. B., . . . Frietsch, J. J. (2020). Phosphorylation-Dependent Differences in CXCR4-LASP1-AKT1 Interaction between Breast Cancer and Chronic Myeloid Leukemia. *Cells*, 9(2). doi:10.3390/cells9020444
- Chatterjee, M., von Ungern-Sternberg, S. N., Seizer, P., Schlegel, F., Buttcher, M., Sindhu, N. A., . . . Gawaz, M. (2015). Platelet-derived CXCL12 regulates monocyte function, survival, differentiation into macrophages and foam cells through differential involvement of CXCR4-CXCR7. *Cell Death & Disease*, 6, e1989. doi:10.1038/cddis.2015.233
- Chen, H. C. (2005). Boyden chamber assay. *Methods in Molecular Biology*, 294, 15-22. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15576901>
- Chew, C. S., Chen, X., Bollag, R. J., Isales, C., Ding, K. H., & Zhang, H. (2008). Targeted disruption of the Lasp-1 gene is linked to increases in histamine-stimulated gastric HCl secretion. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 295(1), G37-G44. doi:10.1152/ajpgi.90247.2008
- Chew, C. S., Parente, J. A., Jr., Chen, X., Chaponnier, C., & Cameron, R. S. (2000). The LIM and SH3 domain-containing protein, lasp-1, may link the cAMP signaling pathway with dynamic membrane restructuring activities in ion transporting epithelia. *Journal of Cell Science*, 113 (Pt 11), 2035-2045. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10806114>
- Chistiakov, D. A., Melnichenko, A. A., Myasoedova, V. A., Grechko, A. V., & Orekhov, A. N. (2017). Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 95(11), 1153-1165. doi:10.1007/s00109-017-1575-8
- Chistiakov, D. A., Melnichenko, A. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2017). How do macrophages sense modified low-density lipoproteins? *International Journal of Cardiology*, 230, 232-240. doi:10.1016/j.ijcard.2016.12.164
- Cochain, C., Koch, M., Chaudhari, S. M., Busch, M., Pelisek, J., Boon, L., & Zerneck, A. (2015). CD8+ T Cells Regulate Monopoiesis and Circulating Ly6C-high Monocyte Levels in Atherosclerosis in Mice. *Circulation Research*, 117(3), 244-253. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.304611

- Cochain, C., & Zerneck, A. (2017). Macrophages in vascular inflammation and atherosclerosis. *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology*, 469(3-4), 485-499. doi:10.1007/s00424-017-1941-y
- Dasilva, A. G., & Yong, V. W. (2008). Expression and regulation of matrix metalloproteinase-12 in experimental autoimmune encephalomyelitis and by bone marrow derived macrophages in vitro. *Journal of Neuroimmunology*, 199(1-2), 24-34. doi:10.1016/j.jneuroim.2008.04.034
- de Brito Monteiro, L., Davanzo, G. G., de Aguiar, C. F., Correa da Silva, F., Andrade, J. R., Campos Codo, A., . . . Moraes-Vieira, P. M. (2020). M-CSF- and L929-derived macrophages present distinct metabolic profiles with similar inflammatory outcomes. *Immunobiology*, 225(3), 151935. doi:10.1016/j.imbio.2020.151935
- Duvall-Noelle, N., Karwandyar, A., Richmond, A., & Raman, D. (2016). LASP-1: a nuclear hub for the UHRF1-DNMT1-G9a-Snail1 complex. *Oncogene*, 35(9), 1122-1133. doi:10.1038/onc.2015.166
- Endres, M., Kneitz, S., Orth, M. F., Perera, R. K., Zerneck, A., & Butt, E. (2016). Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) expression and secretion in MDA-MB-231 breast cancer cells by LIM and SH3 protein 1 (LASP1). *Oncotarget*, 7(39), 64244-64259. doi:10.18632/oncotarget.11720
- Fang, M., Du, H., Han, B., Xia, G., Shi, X., Zhang, F., . . . Zhang, T. (2017). Hypoxia-inducible microRNA-218 inhibits trophoblast invasion by targeting LASP1: Implications for preeclampsia development. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 87, 95-103. doi:10.1016/j.biocel.2017.04.005
- Ferns, G. A. A., & Heikal, L. (2017). Hypoxia in Atherogenesis. *Angiology*, 68(6), 472-493. doi:10.1177/0003319716662423
- Fjeldbo, C. S., Aarnes, E. K., Malinen, E., Kristensen, G. B., & Lyng, H. (2016). Identification and Validation of Reference Genes for RT-qPCR Studies of Hypoxia in Squamous Cervical Cancer Patients. *PLoS One*, 11(5), e0156259. doi:10.1371/journal.pone.0156259
- Gautier, E. L., Huby, T., Saint-Charles, F., Ouzilleau, B., Pirault, J., Deswaerte, V., . . . Lesnik, P. (2009). Conventional dendritic cells at the crossroads between immunity and cholesterol homeostasis in atherosclerosis. *Circulation*, 119(17), 2367-2375. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.807537
- Gerhardt, T., & Ley, K. (2015). Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovascular Research*, 107(3), 321-330. doi:10.1093/cvr/cvv147
- Getz, G. S., & Reardon, C. A. (2018). Apoprotein E and Reverse Cholesterol Transport. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11). doi:10.3390/ijms19113479
- Gil-Pulido, J., & Zerneck, A. (2017). Antigen-presenting dendritic cells in atherosclerosis. *European Journal of Pharmacology*, 816, 25-31. doi:10.1016/j.ejphar.2017.08.016
- Gimbrone, M. A., Jr., & Garcia-Cardena, G. (2016). Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation Research*, 118(4), 620-636. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306301
- Ginhoux, F., & Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews: Immunology*, 14(6), 392-404. doi:10.1038/nri3671
- Gistera, A., & Hansson, G. K. (2017). The immunology of atherosclerosis. *Nat Rev Nephrol*, 13(6), 368-380. doi:10.1038/nrneph.2017.51
- Greenspan, P., Mayer, E. P., & Fowler, S. D. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *Journal of Cell Biology*, 100(3), 965-973. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3972906>
- Groh, L., Keating, S. T., Joosten, L. A. B., Netea, M. G., & Riksen, N. P. (2018). Monocyte and macrophage immunometabolism in atherosclerosis. *Seminars in Immunopathology*, 40(2), 203-214. doi:10.1007/s00281-017-0656-7
- Grunewald, T. G., & Butt, E. (2008). The LIM and SH3 domain protein family: structural proteins or signal transducers or both? *Molecular Cancer*, 7, 31. doi:10.1186/1476-4598-7-31
- Grunewald, T. G., Kammerer, U., Winkler, C., Schindler, D., Sickmann, A., Honig, A., & Butt, E. (2007). Overexpression of LASP-1 mediates migration and proliferation of human ovarian cancer cells and influences zyxin localisation. *British Journal of Cancer*, 96(2), 296-305. doi:10.1038/sj.bjc.6603545
- Haag, M. (2007). *Interaktionspartner von Pro-Interleukin-16*. FUBerlin,
- Hansen, M. D., & Beckerle, M. C. (2006). Opposing roles of zyxin/LPP ACTA repeats and the LIM domain region in cell-cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, 281(23), 16178-16188. doi:10.1074/jbc.M512771200
- Hutter, R., Speidl, W. S., Valdiviezo, C., Sauter, B., Corti, R., Fuster, V., & Badimon, J. J. (2013). Macrophages transmit potent proangiogenic effects of oxLDL in vitro and in vivo involving HIF-

- 1alpha activation: a novel aspect of angiogenesis in atherosclerosis. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 6(4), 558-569. doi:10.1007/s12265-013-9469-9
- Ibidi. 0,4 I Luer Slides von Ibidi. (<https://ibidi.com/perfusion-system/112-ibidi-pump-system.html> , abgerufen am 20.04.19)
- Jakubzick, C. V., Randolph, G. J., & Henson, P. M. (2017). Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nature Reviews: Immunology*, 17(6), 349-362. doi:10.1038/nri.2017.28
- Jian-Jun, L. (2005). Should atherosclerosis be considered a cancer of the vascular wall? *Medical Hypotheses*, 64(4), 694-698.
- Jiang, C., Ting, A. T., & Seed, B. (1998). PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, 391(6662), 82-86. doi:10.1038/34184
- Kang, S. A., Bajana, S., & Tanaka, T. (2016). In vitro Flow Adhesion Assay for Analyzing Shear-resistant Adhesion of Metastatic Cancer Cells to Endothelial Cells. *Bio Protoc*, 6(4). doi:10.21769/BioProtoc.1731
- Keicher, C., Gambaryan, S., Schulze, E., Marcus, K., Meyer, H. E., & Butt, E. (2004). Phosphorylation of mouse LASP-1 on threonine 156 by cAMP- and cGMP-dependent protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324(1), 308-316. doi:10.1016/j.bbrc.2004.08.235
- Kishore, R., McMullen, M. R., Cocuzzi, E., & Nagy, L. E. (2004). Lipopolysaccharide-mediated signal transduction: Stabilization of TNF-alpha mRNA contributes to increased lipopolysaccharide-stimulated TNF-alpha production by Kupffer cells after chronic ethanol feeding. *Comparative Hepatology*, 3 Suppl 1, S31. doi:10.1186/1476-5926-2-S1-S31
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., & Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews: Immunology*, 7(9), 678-689. doi:10.1038/nri2156
- Li, G., Gu, H. M., & Zhang, D. W. (2013). ATP-binding cassette transporters and cholesterol translocation. *IUBMB Life*. doi:10.1002/iub.01165
- Libby, P., & Bornfeldt, K. E. (2020). How Far We Have Come, How Far We Have Yet to Go in Atherosclerosis Research. *Circulation Research*, 126(9), 1107-1111. doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.316994
- Libby, P., Buring, J. E., Badimon, L., Hansson, G. K., Deanfield, J., Bittencourt, M. S., . . . Lewis, E. F. (2019). Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers*, 5(1), 56. doi:10.1038/s41572-019-0106-z
- Lin, Y. H., Park, Z. Y., Lin, D., Brahmabhatt, A. A., Rio, M. C., Yates, J. R., 3rd, & Klemke, R. L. (2004). Regulation of cell migration and survival by focal adhesion targeting of Lasp-1. *Journal of Cell Biology*, 165(3), 421-432. doi:10.1083/jcb.200311045
- Linder, S., & Wiesner, C. (2015). Tools of the trade: podosomes as multipurpose organelles of monocytic cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(1), 121-135. doi:10.1007/s00018-014-1731-z
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Madamanchi, N. R., Vendrov, A., & Runge, M. S. (2005). Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(1), 29-38. doi:10.1161/01.ATV.0000150649.39934.13
- Manthey, H. D., Cochain, C., Barnsteiner, S., Karshovska, E., Pelisek, J., Koch, M., . . . Zernecke, A. (2013). CCR6 selectively promotes monocyte mediated inflammation and atherogenesis in mice. *Thrombosis and Haemostasis*, 110(6), 1267-1277. doi:10.1160/TH13-01-0017
- Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*, 6, 13. doi:10.12703/p6-13
- Mestas, J., & Ley, K. (2008). Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 18(6), 228-232. doi:10.1016/j.tcm.2008.11.004
- Michael, D. R., Ashlin, T. G., Davies, C. S., Gallagher, H., Stoneman, T. W., Buckley, M. L., & Ramji, D. P. (2013). Differential regulation of macropinocytosis in macrophages by cytokines: implications for foam cell formation and atherosclerosis. *Cytokine*, 64(1), 357-361. doi:10.1016/j.cyto.2013.05.016
- Mihlan, S., Reiss, C., Thalheimer, P., Herterich, S., Gaetzner, S., Kremerskothen, J., . . . Butt, E. (2013). Nuclear import of LASP-1 is regulated by phosphorylation and dynamic protein-protein interactions. *Oncogene*, 32(16), 2107-2113. doi:10.1038/onc.2012.216

- Moroni, F., Ammirati, E., Norata, G. D., Magnoni, M., & Camici, P. G. (2019). The Role of Monocytes and Macrophages in Human Atherosclerosis, Plaque Neoangiogenesis, and Atherothrombosis. *Mediators of Inflammation*, 2019, 7434376. doi:10.1155/2019/7434376
- Mukhopadhyay, R. (2013). Mouse models of atherosclerosis: explaining critical roles of lipid metabolism and inflammation. *J Appl Genet*, 54(2), 185-192. doi:10.1007/s13353-013-0134-4
- Nakagawa, H., Terasaki, A. G., Suzuki, H., Ohashi, K., & Miyamoto, S. (2006). Short-term retention of actin filament binding proteins on lamellipodial actin bundles. *FEBS Letters*, 580(13), 3223-3228. doi:10.1016/j.febslet.2006.04.082
- Newby, A. C. (2005). Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiological Reviews*, 85(1), 1-31. doi:10.1152/physrev.00048.2003
- Newby, A. C. (2015). Metalloproteinases promote plaque rupture and myocardial infarction: A persuasive concept waiting for clinical translation. *Matrix Biology*, 44-46, 157-166. doi:10.1016/j.matbio.2015.01.015
- Newby, A. C. (2016). Metalloproteinase production from macrophages - a perfect storm leading to atherosclerotic plaque rupture and myocardial infarction. *Experimental Physiology*, 101(11), 1327-1337. doi:10.1113/EP085567
- Nicolaou, A., Zhao, Z., Northoff, B. H., Sass, K., Herbst, A., Kohlmaier, A., . . . Holdt, L. M. (2017). Adam17 Deficiency Promotes Atherosclerosis by Enhanced TNFR2 Signaling in Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37(2), 247-257. doi:10.1161/ATVBAHA.116.308682
- Ogasawara, N., Kojima, T., Go, M., Fuchimoto, J., Kamekura, R., Koizumi, J., . . . Sawada, N. (2009). Induction of JAM-A during differentiation of human THP-1 dendritic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 389(3), 543-549. doi:10.1016/j.bbrc.2009.09.024
- Oliva-Martin, M. J., Sanchez-Abarca, L. I., Carrillo-Jimenez, A., Perez-Simon, J. A., & Venero, J. L. (2015). Evaluation of a method for murine monocyte isolation by bone marrow depletion. *Analytical Biochemistry*, 480, 42-48. doi:10.1016/j.ab.2015.04.012
- Orth, M. F., Cazes, A., Butt, E., & Grunewald, T. G. (2015). An update on the LIM and SH3 domain protein 1 (LASP1): a versatile structural, signaling, and biomarker protein. *Oncotarget*, 6(1), 26-42. doi:10.18632/oncotarget.3083
- Panaviene, Z., & Moncman, C. L. (2007). Linker region of nebulin family members plays an important role in targeting these molecules to cellular structures. *Cell and Tissue Research*, 327(2), 353-369. doi:10.1007/s00441-006-0305-2
- Parameswaran, N., & Patil, S. (2010). Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 20(2), 87-103. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21133840>
- Pennings, M., Meurs, I., Ye, D., Out, R., Hoekstra, M., Van Berkel, T. J., & Van Eck, M. (2006). Regulation of cholesterol homeostasis in macrophages and consequences for atherosclerotic lesion development. *FEBS Letters*, 580(23), 5588-5596. doi:10.1016/j.febslet.2006.08.022
- Raman, D., Sai, J., Neel, N. F., Chew, C. S., & Richmond, A. (2010). LIM and SH3 protein-1 modulates CXCR2-mediated cell migration. *PLoS One*, 5(4), e10050. doi:10.1371/journal.pone.0010050
- Ruytinx, P., Proost, P., Van Damme, J., & Struyf, S. (2018). Chemokine-Induced Macrophage Polarization in Inflammatory Conditions. *Frontiers in Immunology*, 9, 1930. doi:10.3389/fimmu.2018.01930
- Sabatino, L., Fucci, A., Pancione, M., Carafa, V., Nebbioso, A., Pistore, C., . . . Colantuoni, V. (2012). UHRF1 coordinates peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARG) epigenetic silencing and mediates colorectal cancer progression. *Oncogene*, 31(49), 5061-5072. doi:10.1038/onc.2012.3
- Schmidt, S., Moser, M., & Sperandio, M. (2013). The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies. *Molecular Immunology*, 55(1), 49-58. doi:10.1016/j.molimm.2012.11.006
- Scholtes, V. P., Johnson, J. L., Jenkins, N., Sala-Newby, G. B., de Vries, J. P., de Borst, G. J., . . . Newby, A. C. (2012). Carotid atherosclerotic plaque matrix metalloproteinase-12-positive macrophage subpopulation predicts adverse outcome after endarterectomy. *J Am Heart Assoc*, 1(6), e001040. doi:10.1161/JAHA.112.001040
- Schreyer, A. (2014). *Charakterisierung des μ -Slides zur Analyse von Chemotaxis: Ein Vergleich zur Boyden Chamber*. LMU München,
- Schurch, C. M., Riether, C., & Ochsenbein, A. F. (2014). Cytotoxic CD8+ T cells stimulate hematopoietic progenitors by promoting cytokine release from bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cell Stem Cell*, 14(4), 460-472. doi:10.1016/j.stem.2014.01.002

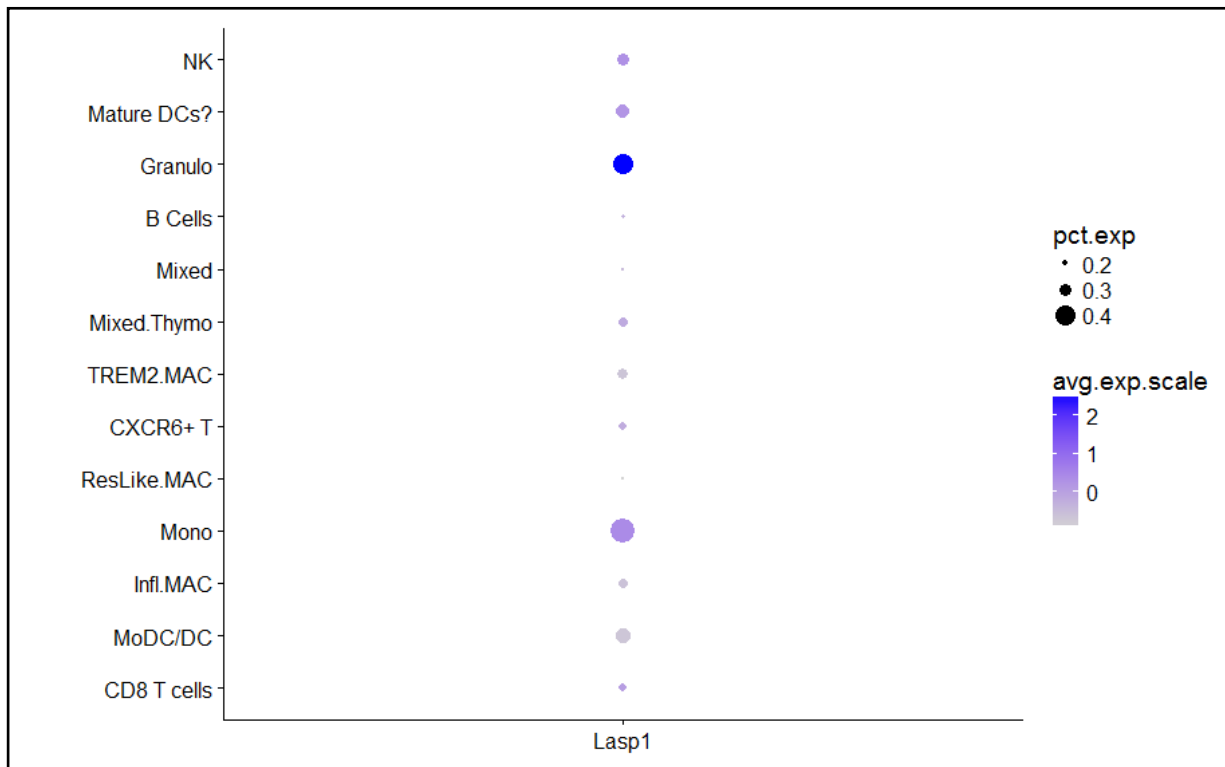
- Seijkens, T., Hoeksema, M. A., Beckers, L., Smeets, E., Meiler, S., Levels, J., . . . Lutgens, E. (2014). Hypercholesterolemia-induced priming of hematopoietic stem and progenitor cells aggravates atherosclerosis. *FASEB Journal*, *28*(5), 2202-2213. doi:10.1096/fj.13-243105
- Shatrov, V. A., Sumbayev, V. V., Zhou, J., & Brune, B. (2003). Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) triggers hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) accumulation via redox-dependent mechanisms. *Blood*, *101*(12), 4847-4849. doi:10.1182/blood-2002-09-2711
- Spence, H. J., McGarry, L., Chew, C. S., Carragher, N. O., Scott-Carragher, L. A., Yuan, Z., . . . Ozanne, B. W. (2006). AP-1 differentially expressed proteins Krp1 and fibronectin cooperatively enhance Rho-ROCK-independent mesenchymal invasion by altering the function, localization, and activity of nondifferentially expressed proteins. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(4), 1480-1495. doi:10.1128/MCB.26.4.1480-1495.2006
- Statista. (2016). Häufigste Todesursachen weltweit im Jahr 2016 in Millionen. <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/38995/umfrage/weltweite-odesfaelle-aufgrund-chronischer-krankheiten/>, abgerufen am 15.11.19.
- Statistisches Bundesamt. (2019). Häufigste Todesursachen in Deutschland im Jahr 2017 in Tausend <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/inhalt.html>, abgerufen am 15.01.20.
- Stolting, M., Wiesner, C., van Vliet, V., Butt, E., Pavenstadt, H., Linder, S., & Kremerskothen, J. (2012). Lasp-1 regulates podosome function. *PloS One*, *7*(4), e35340. doi:10.1371/journal.pone.0035340
- Stremmel, C., Stark, K., & Schulz, C. (2019). Heterogeneity of Macrophages in Atherosclerosis. *Thrombosis and Haemostasis*, *119*(8), 1237-1246. doi:10.1055/s-0039-1692665
- Sun, W., Guo, L., Shao, G., Liu, X., Guan, Y., Su, L., & Zhao, S. (2017). Suppression of LASP-1 attenuates the carcinogenesis of prostatic cancer cell lines: Key role of the NF-kappaB pathway. *Oncology Reports*, *37*(1), 341-347. doi:10.3892/or.2016.5223
- Swirski, F. K., Libby, P., Aikawa, E., Alcaide, P., Luscinskas, F. W., Weissleder, R., & Pittet, M. J. (2007). Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytois and give rise to macrophages in atheromata. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(1), 195-205. doi:10.1172/JCI29950
- Tanaka, G., Nakase, I., Fukuda, Y., Masuda, R., Oishi, S., Shimura, K., . . . Futaki, S. (2012). CXCR4 stimulates macropinocytosis: implications for cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides and HIV. *Chemistry and Biology*, *19*(11), 1437-1446. doi:10.1016/j.chembiol.2012.09.011
- Tapia-Vieyra, J. V., Delgado-Coello, B., & Mas-Oliva, J. (2017). Atherosclerosis and Cancer; A Resemblance with Far-reaching Implications. *Archives of Medical Research*, *48*(1), 12-26. doi:10.1016/j.arcmed.2017.03.005
- Traenka, C., Remke, M., Korshunov, A., Bender, S., Hielscher, T., Northcott, P. A., . . . Pfister, S. M. (2010). Role of LIM and SH3 protein 1 (LASP1) in the metastatic dissemination of medulloblastoma. *Cancer Research*, *70*(20), 8003-8014. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0592
- Traenka, J., Hauck, C. R., Lewandrowski, U., Sickmann, A., Gambaryan, S., Thalheimer, P., & Butt, E. (2009). Integrin-dependent translocation of LASP-1 to the cytoskeleton of activated platelets correlates with LASP-1 phosphorylation at tyrosine 171 by Src-kinase. *Thrombosis and Haemostasis*, *102*(3), 520-528. doi:10.1160/TH09-03-0143
- van der Vorst, E. P., Doring, Y., & Weber, C. (2015). MIF and CXCL12 in Cardiovascular Diseases: Functional Differences and Similarities. *Frontiers in Immunology*, *6*, 373. doi:10.3389/fimmu.2015.00373
- Walker, J. M. (1994). The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods in Molecular Biology*, *32*, 5-8. doi:10.1385/0-89603-268-X:5
- Wang, D., Wang, Z., Zhang, L., & Wang, Y. (2017). Roles of Cells from the Arterial Vessel Wall in Atherosclerosis. *Mediators of Inflammation*, *2017*, 8135934. doi:10.1155/2017/8135934
- Wang, J., Si, Y., Wu, C., Sun, L., Ma, Y., Ge, A., & Li, B. (2012). Lipopolysaccharide promotes lipid accumulation in human adventitial fibroblasts via TLR4-NF-kappaB pathway. *Lipids in Health and Disease*, *11*, 139. doi:10.1186/1476-511X-11-139
- Wawro, K., Wawro, M., Strzelecka, M., Czarnek, M., & Bereta, J. (2019). The role of NF-kappaB and Elk-1 in the regulation of mouse ADAM17 expression. *Biol Open*, *8*(2). doi:10.1242/bio.039420
- Weber, C., Doring, Y., & Noels, H. (2016). Potential cell-specific functions of CXCR4 in atherosclerosis. *Hamostaseologie*, *36*(2), 97-102. doi:10.5482/HAMO-14-10-0054
- Weber, C., & Noels, H. (2011). Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nature Medicine*, *17*(11), 1410-1422. doi:10.1038/nm.2538
- Weischenfeldt, J., & Porse, B. (2008). Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. *CSH Protoc*, *2008*, pdb prot5080. doi:10.1101/pdb.prot5080

- Woollard, K. J., & Geissmann, F. (2010). Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nature Reviews: Cardiology*, 7(2), 77-86. doi:10.1038/nrcardio.2009.228
- Xu, D., Li, R., Wu, J., Jiang, L., & Zhong, H. A. (2016). Drug Design Targeting the CXCR4/CXCR7/CXCL12 Pathway. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(13), 1441-1451. doi:10.2174/1568026615666150915120218
- Yu, J., Qiu, Y., Yang, J., Bian, S., Chen, G., Deng, M., . . . Huang, L. (2016). DNMT1-PPARgamma pathway in macrophages regulates chronic inflammation and atherosclerosis development in mice. *Scientific Reports*, 6, 30053. doi:10.1038/srep30053
- Yu, X. H., Fu, Y. C., Zhang, D. W., Yin, K., & Tang, C. K. (2013). Foam cells in atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta*, 424, 245-252. doi:10.1016/j.cca.2013.06.006
- Zengel, P., Nguyen-Hoang, A., Schildhammer, C., Zantl, R., Kahl, V., & Horn, E. (2011). mu-Slide Chemotaxis: a new chamber for long-term chemotaxis studies. *BMC Cell Biology*, 12, 21. doi:10.1186/1471-2121-12-21
- Zhang, H., Chen, X., Bollag, W. B., Bollag, R. J., Sheehan, D. J., & Chew, C. S. (2009). Lasp1 gene disruption is linked to enhanced cell migration and tumor formation. *Physiological Genomics*, 38(3), 372-385. doi:10.1152/physiolgenomics.00048.2009
- Zhao, L., Varghese, Z., Moorhead, J. F., Chen, Y., & Ruan, X. Z. (2018). CD36 and lipid metabolism in the evolution of atherosclerosis. *British Medical Bulletin*, 126(1), 101-112. doi:10.1093/bmb/ldy006
- Zhao, T., Ren, H., Li, J., Chen, J., Zhang, H., Xin, W., . . . Hao, J. (2015). LASP1 is a HIF1alpha target gene critical for metastasis of pancreatic cancer. *Cancer Research*, 75(1), 111-119. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2040

8 Anhang

Single Cell Analyse einer atherosklerotisch veränderten Aorta in Bezug auf die LASP1-Expression

Die hier präsentierten Daten wurden nicht im Zuge dieser Arbeit erhoben, sondern wurden freundlicherweise von Dr. Clement Cochain zur Verfügung gestellt.



Anhang 8- 1: LASP1-Expression in verschiedenen Zellarten einer atherosklerotisch-veränderten Aorta. Eine Single Cell Analyse mit atherosklerotisch veränderter Aorta, entnommen aus einer *Ldlr^{-/-}* Maus nach 6 Wochen HFD wurde durchgeführt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung und Bearbeitung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich Frau Prof. Dr. Elke Butt für die hervorragende Betreuung und liebe sowie tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung und Umsetzung der gesamten Arbeit.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Prof. Michaela Kuhn und Frau PD Heike Hermanns für die Anregungen und produktiven Gespräche während des Entstehungsprozesses meiner Doktorarbeit.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Dr. Jesús Gil-Pulido, Dr. Nuria Amézaga Solé, Sarah Schäfer, Petra Talheimer, Petra Hönig-Liedl, Melanie Rösch, Elfride Walter, Prof. Dr. Alma Zerneck-Madsen und dem gesamten Team der AG Zerneck bedanken, die mir bei der Datenerhebung, Versuchsdurchführung und der Ausarbeitung meiner Dissertation mit Rat und Tat beigestanden haben. Auch Michaela Kapp aus der AG Kämmerer möchte ich in diesem Zuge meinen Dank aussprechen.

Danken möchte ich außerdem meinen Doktorarbeitsmitstreitern Malte A. Lippert, Thorsten Günder und Felix Wolf für die gemeinsamen, lustigen Stunden im Labor und die gegenseitige Hilfe und Unterstützung sowie meinen Mitstudenten, die während meines gesamten Studiums an meiner Seite waren.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern für die stetige Ermutigung während der Arbeit an meiner Dissertation und für die liebe Begleitung durch mein Studium.

Für die finanzielle Unterstützung und der Ermöglichung der Teilnahme an dem strukturierten Promotionsprogramm möchte ich der *Graduate School of Life Science* der Universität Würzburg meinen Dank aussprechen.

Lebenslauf

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Die Rolle von LASP1 in der Pathogenese der Atherosklerose im murinen Modell“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “The role of LASP1 in the pathogenesis of atherosclerosis in mice” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/ or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signatur