

Aus der Klinik für Kardiologie und Angiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung von iRhom2-defizienten Makrophagen unter  
atherogenen Stimuli

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Alica Brettschneider

aus Berlin

Datum der Promotion: 17.09.2021

# Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis .....	1
Abbildungsverzeichnis .....	2
Zusammenfassung .....	3
Abstract .....	5
1. Einleitung.....	6
1.1. Die Atherosklerose .....	6
1.2. Die Atherogenese.....	7
1.3. Cholesterin-Efflux und Reverser Cholesterintransport .....	10
1.4. Monozyten und Makrophagen in der Atherosklerose .....	11
1.5. Monozyten und Makrophagen in der Entzündung .....	13
1.6. TNF- $\alpha$ und TACE in der Atherosklerose .....	14
2. Fragestellung .....	17
3. Material und Methoden .....	19
3.1. Materialien .....	19
3.1.1. Laborgeräte .....	19
3.1.2. Verbrauchsmaterialien .....	20
3.1.3. Chemikalien und Reagenzien .....	21
3.1.4. Medien .....	22
3.1.5. Antikörper Durchflusszytometrie .....	22
3.1.6. Lösungen .....	22
3.1.7. Kits.....	23
3.1.8. TaqMan®-Sonden für <i>Real-Time</i> PCR.....	23
3.1.9. Software .....	24
3.2. Methoden.....	24
3.2.1. Organentnahme.....	24
3.2.2. Zellkultur.....	25
(1) Herstellung LCCM.....	25
(2) Isolation der Bone Marrow Derived Macrophages (BMDM) .....	25
(3) Kultivierung der BMDM .....	26
(4) Zeitreihe mit IFN- $\gamma$ und LPS .....	26
(5) Makrophagenpolarisation .....	27
(6) Stimulation mit Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	28

3.2.3.	Durchflusszytometrie.....	28
3.2.4.	Gesamtcholesterin- und HDL-Cholesterin-Bestimmung .....	29
3.2.5.	Methoden zur Quantifizierung von <i>messenger</i> -Ribonukleinsäuren .....	29
(1)	RNA-Isolierung .....	29
(2)	Reverse Transkription .....	30
(3)	Quantitative Echtzeit PCR (TaqMan®-PCR).....	31
3.2.6.	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA).....	32
3.2.7.	MTT-Test.....	34
3.2.8.	Statistik .....	34
4.	Ergebnisse .....	36
4.1.	Expression von iRhom2, TACE und TNF- $\alpha$ in Makrophagen unter atherogenen Stimuli .....	36
4.2.	Expression von M1 und M2 Makrophagen Markern in iRhom2-defizienten Makrophagen nach Makrophagenpolarisation .....	41
4.3.	Expression von ABCA1, ABCG1 und SR-B1 in iRhom2-defizienten Makrophagen nach Stimulation mit IFN- $\gamma$ .....	46
4.4.	Zellviabilität von iRhom2-defizienten Makrophagen unter oxidativem Stress .....	49
5.	Diskussion .....	50
5.1.	Interpretation der Ergebnisse .....	51
5.1.1.	Expression von iRhom2, TACE und TNF- $\alpha$ in Makrophagen unter atherogenen Stimuli .....	51
5.1.2.	Expression typischer M1 und M2 Makrophagen Marker in iRhom2-defizienten Makrophagen.....	53
5.1.3.	Genexpression von ABCA1, ABCG1 und SR-B1 nativ und nach Stimulation mit IFN- $\gamma$ .....	56
5.1.4.	Zellviabilität von iRhom2-defizienten BMDM unter oxidativem Stress .....	57
5.2.	Limitationen .....	58
5.3.	Fazit und Ausblick .....	59
5.4.	Perspektiven .....	60
6.	Literaturverzeichnis .....	61
7.	Eidesstattliche Versicherung .....	73
8.	Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen.....	74
9.	Lebenslauf.....	75
10.	Publikationsliste .....	76
11.	Danksagung.....	77

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Histologische Stadien atherosklerotischer Gefäßveränderungen.....	8
<b>Tabelle 2:</b> Laborgeräte.....	19
<b>Tabelle 3:</b> Verbrauchsmaterialien .....	20
<b>Tabelle 4:</b> Chemikalien und Reagenzien.....	21
<b>Tabelle 5:</b> Medien .....	22
<b>Tabelle 6:</b> Antikörper Durchflusszytometrie.....	22
<b>Tabelle 7:</b> Lösungen .....	22
<b>Tabelle 8:</b> Kommerzielle Kits und Lösungen .....	23
<b>Tabelle 9:</b> TaqMan®-Sonden für - <i>Real Time</i> PCR.....	23
<b>Tabelle 10:</b> Software.....	24
<b>Tabelle 11:</b> Komponenten für die cDNA Synthese.....	30
<b>Tabelle 12:</b> Übersicht Reverse Transkription .....	31

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Skizze zur Plattenbelegung und Versuchsaufbau der Zeitreihe mit IFN- $\gamma$ und LPS. ....	27
<b>Abbildung 2:</b> Makrophagen - iRhom2, TACE, TNF- $\alpha$ mRNA-Expression und TNF- $\alpha$ Sekretion nach Stimulation mit LPS.....	37
<b>Abbildung 3:</b> Makrophagen - iRhom2, TACE, TNF- $\alpha$ mRNA-Expression und TNF- $\alpha$ Sekretion nach Stimulation mit IFN- $\gamma$ .....	39
<b>Abbildung 4:</b> Makrophagen - iRhom2, TACE, TNF- $\alpha$ mRNA-Expression und TNF- $\alpha$ Sekretion nach Stimulation mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	40
<b>Abbildung 5:</b> Expression typischer M1 Makrophagen Marker nach Makrophagenpolarisation.	42
<b>Abbildung 6:</b> Expression typischer M2 Makrophagen Marker nach Makrophagenpolarisation.	43
<b>Abbildung 7:</b> Sekretion von CCL2 und IL-10 von Makrophagen nach Stimulation mit IFN- $\gamma$ und LPS. ....	45
<b>Abbildung 8:</b> Lipide im Serum iRhom2-defizienter Mäuse.....	46
<b>Abbildung 9:</b> mRNA-Expression der Lipidtransporter in Makrophagen unter nativen Bedingungen und nach Stimulation mit IFN- $\gamma$ . ....	48
<b>Abbildung 10:</b> Zellviabilität von iRhom2-defizienten Makrophagen unter Behandlung mit steigenden Konzentrationen an H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	49

## Zusammenfassung

**Hintergrund:** Die Atherosklerose stellt eine entzündliche, Makrophagen-dominierte Gefäßerkrankung dar und ist weltweit für die meisten Todesfälle verantwortlich. Makrophagen sezernieren den Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), welcher zunächst als Vorläuferprotein an der Zellmembran vorliegt und durch das *TNF- $\alpha$  Converting Enzyme* (TACE) in eine bioaktive, lösliche TNF- $\alpha$  Form gespalten wird. Erst kürzlich wurde beschrieben, dass TACE für diesen Prozess auf das inaktive Rhomboid-Protein 2 (iRhom2) angewiesen ist.

**Ziel:** Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die phänotypische und funktionelle Charakterisierung von iRhom2-defizienten Makrophagen unter atherogenen Stimuli.

**Methoden:** Für die Versuche wurden *bone marrow derived macrophages* (BMDM) aus iRhom2<sup>+/+</sup> und iRhom2<sup>-/-</sup> Mäusen generiert und mit diversen Stimuli (Lipopolysaccharid = LPS, Interferon- $\gamma$  = IFN- $\gamma$  oder Wasserstoffperoxid = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) behandelt. Es erfolgte die Messung der Expression von iRhom2, TACE und TNF- $\alpha$ . Zudem wurde die Expression der für den reversen Cholesterintransport verantwortlichen Transporter quantifiziert. Die BMDM wurden zu M1 und M2 Makrophagen polarisiert und M1 und M2 Marker bestimmt. Die Zellviabilität wurde unter oxidativem Stress zwischen den beiden Genotypen verglichen.

**Ergebnisse:** Die Stimulation mit LPS, IFN- $\gamma$  und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bewirkte jeweils die Induktion der Boten-Ribonukleinsäure (mRNA)-Expression von iRhom2 in iRhom2<sup>+/+</sup> Makrophagen und von TNF- $\alpha$  in beiden Genotypen. Es zeigte sich in iRhom2-defizienten BMDM ein geringerer Gehalt von TNF- $\alpha$  im Zellüberstand nach der Stimulation mit LPS, IFN- $\gamma$  oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In der mRNA-Expression der für den reversen Cholesterintransport verantwortlichen Transporter wurden keine Unterschiede zwischen iRhom2<sup>+/+</sup> und iRhom2<sup>-/-</sup> Makrophagen festgestellt. Die iRhom2-defizienten Makrophagen und iRhom2-suffizienten Makrophagen unterschieden sich nicht in der mRNA-Expression typischer M1 und M2 Marker nach Polarisierung. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich in der Expression des M1 Marker TNF- $\alpha$ . Die Expression und Sekretion von antiinflammatorischem Interleukin-10 (IL-10) war in iRhom2<sup>-/-</sup> Makrophagen nach deren Aktivierung mit LPS und IFN- $\gamma$  im Vergleich zu den Wildtyp-Makrophagen erhöht. Die Viabilität der BMDM beider Genotypen nahm unter Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in gleichen Maßen ab.

**Diskussion:** iRhom2 wird durch inflammatorische Reize induziert und kann somit die inflammatorische Reaktion verstärken. Eine verminderte TNF- $\alpha$  Freisetzung von iRhom2-defizienten Makrophagen könnte im Milieu der atherosklerotischen Plaque einen geringeren inflammatorischen Status bedeuten und durch eine verminderte TNF-alpha-induzierte Apoptose und Induktion von Adhäsionsmolekülen atheroprotektiv wirken. iRhom2-defiziente Makrophagen können in M1 und M2 Makrophagen polarisiert werden und zeigen dabei eine vermehrte IL-10 Sekretion, die sich aufgrund der antiinflammatorischen Eigenschaften von IL-10 ebenfalls atheroprotektiv auswirken könnte.

## Abstract

**Background:** Atherosclerosis is an inflammatory and macrophage dominated vascular disease and is the main cause of death worldwide. Macrophages secrete tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE) is responsible for cleavage of the membrane-bound precursor TNF- $\alpha$  protein to soluble TNF- $\alpha$ . Maturation of TACE depends on recently discovered inactive rhomboid protein 2 (iRhom2).

**Objective:** The aim of this study is the phenotypic and functional characterization of iRhom2-deficient macrophages under atherogenic stimuli.

**Methods:** Bone marrow derived macrophages were generated from iRhom2<sup>+/+</sup> and iRhom2<sup>-/-</sup> mice and treated with different stimuli (lipopolysaccharide = LPS, interferon- $\gamma$  = IFN- $\gamma$  or hydrogen peroxide = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Gene expression of iRhom2, TACE and TNF- $\alpha$  was measured. Furthermore, gene expression of transporters involved in reverse cholesterol transport was quantified. BMDM polarization towards M1 and M2 macrophages was induced and M1 and M2 markers were measured. Cell viability under oxidative stress was determined.

**Results:** Stimulation with LPS, IFN- $\gamma$  and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced iRhom2 in iRhom2<sup>+/+</sup> macrophages and TNF- $\alpha$  in both genotypes. iRhom2-deficient BMDM secreted lower levels of TNF- $\alpha$  protein in response to stimulation with IFN- $\gamma$  or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. There was no difference in expression of transporters involved in reverse cholesterol transport between iRhom2<sup>+/+</sup> and iRhom2<sup>-/-</sup> macrophages. BMDM polarization led to expression of M1 and M2 marker proteins in iRhom2<sup>+/+</sup> and iRhom2<sup>-/-</sup> macrophages. iRhom2-deficient macrophages exhibited significantly lower expression of M1 marker protein TNF- $\alpha$ . Gene expression and secretion of anti-inflammatory interleukin-10 (IL-10) was higher in iRhom2<sup>-/-</sup> macrophages after activation compared to iRhom2<sup>+/+</sup> macrophages. Cell viability was not different between both genotypes after treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Discussion:** iRhom2 is induced by inflammatory stimuli and may amplify inflammatory processes. Diminished secretion of TNF- $\alpha$  in iRhom2-deficient macrophages may lead to a lower inflammatory status in atherosclerotic plaques. After polarization Rhom2-deficient macrophages showed an increased secretion of anti-inflammatory IL-10, which is atheroprotective.



# 1. Einleitung

## 1.1. Die Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine multifaktoriell bedingte, inflammatorische Erkrankung arterieller Gefäße.<sup>1</sup> Durch ihre Manifestation an den Herz- und Hirngefäßen ist sie die Hauptursache für den Myokardinfarkt und Schlaganfall und damit weltweit für die meisten Todesfälle verantwortlich.<sup>2</sup> Die Manifestation der Atherosklerose an den Koronararterien (Herzkranzgefäße) kann sich klinisch asymptomatisch, als Schmerz in der Brust (Angina pectoris Symptomatik), als Myokardinfarkt oder plötzlicher Herztod präsentieren. Eine Atherosklerose der hirnversorgenden Arterien kann zu neurologischen Symptomen in Form einer transitorischen ischämischen Attacke oder eines ischämischen Schlaganfalls führen. Eine Manifestation der Atherosklerose an peripheren Gefäßen kann die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) mit dem Hauptsymptom des belastungsabhängigen, ischämischen Muskelschmerzes der Extremitäten (Claudicatio intermittens) bewirken. Eine Manifestation der Atherosklerose an den gastrointestinalen Arterien kann z. B. einen Mesenterialinfarkt bedingen, der zu einer Nekrotisierung des Darmes führen kann.

Für die Atherosklerose sind modifizierbare und nicht-modifizierbare Risikofaktoren bekannt.<sup>1</sup> Die modifizierbaren Risikofaktoren stellen Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperlipoproteinämie, Adipositas und mangelnde körperliche Aktivität dar. Zu den nicht-modifizierbaren Risikofaktoren gehören eine familiäre Prädisposition, das Geschlecht und das Lebensalter. Heutzutage besteht das vorrangige Ziel der Therapie der Atherosklerose in der Modifikation der Risikofaktoren. Diese kann durch eine Lebensstiländerung und eine medikamentöse Therapie erreicht werden. Randomisierte, klinische Studien demonstrieren positive Effekte der Cholesterin-senkenden Statine, der Thrombozytenaggregationshemmer und einer antihypertensiven Therapie.<sup>3-7</sup> Sie verringern die Morbidität und Mortalität der Atherosklerose und sind daher Teil der aktuellen klinischen Leitlinien in der Therapie von atherosklerotischen Gefäßerkrankungen. Trotz der Korrektur der kardiovaskulären Risikofaktoren bleibt jedoch ein hohes residuales Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse.<sup>8,9</sup>

In den vergangenen zwanzig Jahren sind entzündliche Prozesse in der Pathogenese der Atherosklerose vermehrt in den Fokus der Atheroskleroseforschung gerückt.<sup>10,11</sup> Studien konnten zeigen, dass die Konzentration des Akute-Phase-Proteins C-reaktives Protein (CRP) mit kardiovaskulären und zerebrovaskulären Ereignissen assoziiert ist.<sup>12,13</sup> CRP wird in der Leber synthetisiert und in Folge einer Gewebeschädigung oder systemischen Entzündung ausgeschüttet. Es dient im klinischen Alltag als Serummarker einer Entzündung. Ridker et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass Statine neben einer Reduktion von *Low Density* Lipoproteinen (LDL) auch eine CRP-Reduktion hervorrufen und eine Senkung von LDL-Cholesterin und CRP - im Vergleich zu einer alleinigen Reduktion des LDL-Cholesterin - mit einem verbesserten Outcome (geringere Rate an erneuten Myokardinfarkten und geringere Mortalität) nach einem akuten Koronarsyndrom assoziiert ist.<sup>13</sup> Trotz der Assoziation zwischen der Atherosklerose und der Inflammation werden bis dato nur zwei Medikamente in der Standardtherapie der Atherosklerose eingesetzt, denen antiinflammatorische Effekte zugesprochen werden: Statine und Acetylsalicylsäure (ASS). 2017 wurde die CANTOS Studie (*Canakinumab Antiinflammatory Thrombosis Outcome Study*) zur Wirksamkeit des monoklonalen Antikörpers Canakinumab, welcher Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) bindet, veröffentlicht. Die spezifisch antiinflammatorische Wirkung durch Inhibierung von IL-1 $\beta$  reduzierte das Risiko für einen nicht-tödlichen Myokardinfarkt, nicht-tödlichen Schlaganfall oder kardiovaskulären Tod bei Patienten mit stattgehabtem Myokardinfarkt. Zudem konnten durch Canakinumab die inflammatorischen Biomarker *high sensitive CRP* (hsCRP) und Interleukin-6 (IL-6) gesenkt werden, unabhängig von der Zusammensetzung der Lipide im Blut.<sup>14</sup> Diese Studie konnte als Erste den Effekt einer isoliert antiinflammatorischen Therapie auf kardiovaskuläre Ereignisse zeigen. Die Ergebnisse unterstreichen die entzündliche Genese der Erkrankung und verdeutlichen die Möglichkeiten neuartiger, antiinflammatorischer Therapieoptionen in der weiteren Risikoreduktion kardiovaskulärer Ereignisse.

## 1.2. Die Atherogenese

Die Atherosklerose ist eine Erkrankung, die sich im Endothel und Subendothel arterieller Gefäße manifestiert. Das Endothel ist die biologische Grenzfläche zwischen

dem zirkulierenden Blut und dem Gewebe. Prädilektionsstellen für die Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen sind insbesondere die Aufzweigungen von Arterien. Der Verlust von laminaren Scherkräften an diesen Stellen und die Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führen zu einer Endotheldysfunktion mit erhöhter Endothelpermeabilität, die die Ansammlung von Lipiden und Immunzellen in der Innenschicht der arteriellen Gefäßwand, der Tunica Intima, ermöglicht.<sup>15</sup> Histologisch wird die Atherosklerose nach Stary in sechs Stadien unterteilt (siehe Tabelle 1).<sup>16,17</sup> Bereits im Kindesalter kommt es durch den Anstieg des Lipoproteingehaltes, verursacht durch die modifizierbaren und nicht-modifizierbaren Risikofaktoren, zu fokalen Verbreiterungen der Arterienwand, den *Fatty Streaks*.<sup>18</sup> Für deren Entstehung ist die subendotheliale Akkumulation von Apolipoproteinen notwendig.<sup>19</sup> Die Low Density Lipoproteine (LDL) werden im subendothelialen Raum in Anwesenheit von freien Radikalen (Hyperoxide, Wasserstoffperoxid und Stickstoffmonoxid) oxidativ modifiziert und aktivieren das über ihnen liegende Endothel.<sup>20</sup> Dieses sezerniert folglich Zytokine, Wachstumsfaktoren, Chemokine und exprimiert Adhäsionsmoleküle an seiner luminalen Zelloberfläche, was zur Rekrutierung von Monozyten und anderen Immunzellen führt<sup>21,22</sup>

Stadium	Läsionstyp	Morphologie
I	Initialläsion	Intimaverdickung mit geringfügiger Einlagerung von oxidativ modifizierten LDL-Partikeln und Makrophagen, z.T. Schaumzellen
II	<i>Fatty streaks</i>	Intimaverdickung mit meist intrazellulären Lipidtropfen in Schaumzellen und glatten Muskelzellen
III	Intermediärtyp (Präatherom)	Ver mehrt extrazelluläre Lipidansammlung in unscharf abgegrenzten Arealen
IV	Atherom	Großer atheromatöser Herd mit massiver extrazellulärer Lipidakkumulation, abgrenzbarer Lipidkern
V	Fibroatherom	Enthält vermehrt kollagene Fasern und modifizierte glatte Muskelzellen, teilweise Verkalkungen
VI	Komplizierte Läsion	Fibroatheromatöse Plaque mit Oberflächendefekten (Fissuren, Erosionen, Ulzerationen), Hämorrhagien und Thromben

**Tabelle 1:** Histologische Stadien atherosklerotischer Gefäßveränderungen; modifiziert nach Stary<sup>16,17</sup> und Hort<sup>23</sup>

Die Chemotaxis beschreibt die gerichtete Bewegung von Zellen anhand eines Konzentrationsgradienten, der z. B. durch die Ausschüttung von Botenstoffen (z. B. Chemokine) erzeugt wird.<sup>24</sup> Besonders wichtig bei der Chemotaxis der Monozyten im Milieu des atherosklerotischen Plaques ist das Zusammenspiel zwischen den durch Endothelzellen, Schaumzellen (lipidbeladene Makrophagen) und glatten Muskelzellen sezernierten Chemokinen und den Chemokinrezeptoren auf der Zelloberfläche der Monozyten: CC-Chemokinligand 2 (CCL2), auch *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) genannt, und CC-Chemokinrezeptor Typ 2 (CCR2), C-X3-C-Chemokinligand 1 (CX3CL1) und C-X3-C-Chemokinrezeptor 1 (CX3CR1), CC-Chemokinligand 5 (CCL5) und CC-Chemokinrezeptor Typ 5 (CCR5).<sup>25</sup> Mithilfe der Adhäsionsmoleküle E-Selektin, P-Selektin, interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und vaskuläres Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) können die Monozyten in den subendothelialen Raum eintreten und differenzieren in Anwesenheit des Wachstumsfaktors *Macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) zu Makrophagen.<sup>26</sup> Die Makrophagen exprimieren auf ihrer Oberfläche Scavenger Rezeptoren. Scavenger Rezeptoren sind membrangebundene Rezeptoren, die modifiziertes LDL-Cholesterin, Zelldetritus und Pathogene aufnehmen.<sup>27</sup> Insbesondere durch den Scavenger Rezeptor A (SR-A) und durch den Scavenger Rezeptor B Member 3 (auch *cluster of differentiation 36* [CD 36] genannt) nehmen Makrophagen vermehrt oxidativ modifiziertes LDL (oxLDL) auf.<sup>26</sup> Da die Aufnahme des oxLDL über die Scavenger Rezeptoren unkontrolliert erfolgt, werden die Makrophagen zu lipidbeladenen Schaumzellen,<sup>28</sup> die die frühe atherosklerotische Läsion kennzeichnen.

Neben Monozyten und Makrophagen sind im atherosklerotischen Plaque dendritische Zellen, Mastzellen, T-Zellen und B-Zellen zu finden.<sup>29</sup> Die Freisetzung inflammatorischer Moleküle durch die Immunzellen und die zelluläre Interaktion in der entstehenden Plaque erhält die entzündliche Reaktion aufrecht.<sup>15</sup> Ein wichtiger inflammatorischer und atherogener Mediator ist das Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), welches vorrangig durch T-Zellen und natürliche Killerzellen sowie Monozyten und Makrophagen in atherosklerotischen Plaques exprimiert wird.<sup>30,31</sup> IFN- $\gamma$  stimuliert die Expression von Adhäsionsmolekülen und hemmt das Wachstum und die Kollagensynthese glatter Muskelzellen.<sup>32</sup>

Ein weiterer Schritt in der Atherogenese ist die Rekrutierung von glatten Muskelzellen aus der Tunica Media, der mittleren Gefäßschicht, in die Tunica Intima. Glatte

Muskelzellen verfügen über eine phänotypische Plastizität.<sup>33</sup> In Abhängigkeit von ihrer Mikroumgebung entwickeln sie sich von rein kontraktile Zellen zu einem sezernierendem Phänotyp und fördern die Synthese von extrazellulärer Matrix (Kollagen und Elastin)<sup>29</sup>, die eine fibröse Kappe zur Abdeckung der Plaques bildet und deren Ruptur vorbeugt. Die Schicht aus glatten Muskelzellen und kollagenreicher Matrix umgibt folglich das Zentrum aus extrazellulären Lipiden und Schaumzellen. Aus der frühen atherosklerotischen Plaque entsteht eine reife Plaque, auch Atherom genannt. Vulnerable Plaques sind durch eine zarte fibröse Kappe gekennzeichnet, die durch verschiedene Faktoren (z. B. eine systemische Infektion) rupturieren kann.<sup>1</sup> Folglich gelangt thrombogenes Material ins Gefäßlumen, was zu der Formation eines Thrombus führt. Der Thrombus kann das Gefäß teilweise oder komplett verschließen und sich klinisch als Myokardinfarkt oder Schlaganfall präsentieren.<sup>34</sup>

### 1.3. Cholesterin-Efflux und Reverser Cholesterintransport

Die Akkumulation von Cholesterin in den Makrophagen induziert inflammatorische Prozesse und Apoptose.<sup>35</sup> Als Antwort auf eine exzessive Lipidakkumulation versuchen Schaumzellen Cholesterin und andere Lipide aus der Zelle zu entfernen. Der sogenannte Cholesterin-Efflux wird durch mehrere Transporter ermöglicht: *ATP-binding-cassette transporter A family member 1* (ABCA1) und *ATP-binding-cassette transporter G family member 1* (ABCG1) vermitteln einen aktiven Cholesterin-Efflux unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP).<sup>36</sup> Über den Scavenger Rezeptor Klasse B, Typ 1 (SR-B1) erfolgt eine passive Diffusion von freiem Cholesterin aus der Zelle. Zudem kann freies Cholesterin auch mittels einfacher Diffusion aus der Zelle gelangen.<sup>37</sup> ABCA1 fördert den Transfer von freiem Cholesterin zu lipidarmen Apolipoprotein A1 (ApoA1), welches das Hauptprotein des High Density Lipoprotein (HDL) darstellt.<sup>28</sup> ABCG1 vermittelt den Cholesterin-Efflux zu reiferen HDL-Partikeln. HDL stimuliert den Cholesterin-Efflux aus peripheren Geweben, transportiert das Cholesterin im Plasma zur Leber, wo es durch die Hepatozyten aufgenommen, katabolisiert und mit der Gallenflüssigkeit ausgeschieden werden kann. Dieser Prozess wird als reverser Cholesterintransport bezeichnet. Das Entfernen von übermäßigem Cholesterin und Oxysterolen, oxidierte Derivate des Cholesterins, aus

den Schaumzellen durch HDL reduziert das Absterben der Makrophagen und wirkt daher atheroprotektiv.<sup>38</sup>

#### 1.4. Monozyten und Makrophagen in der Atherosklerose

Makrophagen sind die hinsichtlich der Anzahl vorherrschenden Immunzellen in atherosklerotischen Plaques. Sie sind als Teil des angeborenen Immunsystems entscheidend für die inflammatorischen Prozesse. Gewebsmakrophagen stammen von zirkulierenden Monozyten ab, die aus dem Knochenmark und der Milz kommen, zudem wurde eine lokale Proliferation von Makrophagen in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen.<sup>26,39,40</sup> Es werden verschiedene Monozyten-Subtypen anhand von Oberflächenmarkern unterschieden: beim Menschen sind dies klassische (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), intermediäre (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) und nicht-klassische (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) Monozyten,<sup>41</sup> die sich jeweils hinsichtlich ihrer Funktion unterscheiden. Ihre Rolle in der Atherogenese ist von großem Interesse und wurde in den vergangenen Jahren erforscht.<sup>42</sup> Intermediäre Monozyten produzieren vermehrt Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und IL-1 $\beta$  als Antwort auf Lipopolysaccharide (LPS) im Vergleich zu den anderen beiden Subpopulationen<sup>43</sup> und gelten daher als besonders inflammatorische Monozyten. Mehrere Studien beschreiben eine Assoziation zwischen zirkulierenden intermediären Monozyten und den Manifestationsformen der Atherosklerose, wie Myokardinfarkt und Schlaganfall.<sup>44</sup>

Ein Großteil der Atherosklerose-Grundlagenforschung wird hingegen an Tiermodellen durchgeführt, wobei das Mausmodell am häufigsten gewählt wird.<sup>45</sup> Bei Mäusen werden im Vergleich zum Menschen üblicherweise nur zwei Untergruppen zirkulierender Monozyten anhand ihrer Expression des Lymphozytenantigen 6 Komplex (Ly6C) und der Chemokinrezeptoren CCR2 und CX3CR1 unterschieden, was eine Limitierung hinsichtlich der Übertragung der Erkenntnisse vom Mausmodell auf den Menschen darstellt.<sup>41</sup> Hypercholesterinämie in Mäusen führt zu einer Monozytose mit selektiver Expansion der Ly6C<sup>high</sup> Monozyten.<sup>40</sup> Diese Subpopulation der murinen Monozyten bindet bevorzugt an das aktivierte Endothel und infiltriert die Gefäßwand.<sup>25</sup>

Im Gewebe differenzieren Monozyten zu Makrophagen, die wiederum auch heterogene Immunzellen darstellen. In atherosklerotischen Plaques erhalten die Makrophagen Signale ihrer Umgebung, die ihre phänotypische Polarisation ausmachen. In der Literatur werden Makrophagen vereinfacht in M1 Makrophagen, die vorwiegend inflammatorische Zytokine sezernieren, und M2 Makrophagen, die antiinflammatorische, regulatorische und wundheilende Eigenschaften zeigen, unterteilt. In der Realität sind die Übergänge zwischen diesen beiden Phänotypen weniger scharf abgrenzbar.<sup>46,47</sup>

Makrophagen des M1 Phänotyps werden vermehrt in progredienten atherosklerotischen Plaques angereichert.<sup>28</sup> Ihre Aktivierung *in vitro* erfordert die Stimulation mit IFN- $\gamma$  und einem zweiten inflammatorischen Stimulus (LPS oder TNF- $\alpha$ ).<sup>48,49</sup> In den atherosklerotischen Plaques ist das vorherrschende Zytokin-Milieu verantwortlich für die Polarisierung der Makrophagen.<sup>46</sup> Aktivierte Makrophagen produzieren ROS, die zum Zelltod und zur Lipoproteinoxidation führen.<sup>50</sup> Zudem sezernieren M1 Makrophagen die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 und proteolytische Enzyme.<sup>45</sup> Dadurch werden inflammatorische Prozesse und die Degradation der extrazellulären Matrix initiiert. Das von den M1 Makrophagen sezernierte TNF- $\alpha$  führt zusätzlich zur Apoptose der glatten Muskelzellen der Intima, was in einer Verringerung der fibrösen Kappe resultiert.<sup>51</sup> Dies führt zu der Entwicklung von instabilen atherosklerotischen Plaques, die sich durch eine zarte fibröse Kappe und einen lipidreichen, nekrotischen Kern auszeichnen. Die proteolytischen Enzyme der M1 Makrophagen degradieren die extrazelluläre Matrix, was in einer Ruptur der fibrösen Kappe resultieren kann.<sup>52</sup> Thrombogenes Material tritt in das Gefäßlumen und aktiviert die Gerinnungskaskade, sodass es zur Bildung eines Thrombus kommt, der das betroffene Gefäß verschließen kann.<sup>34</sup>

Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-13 (IL-13) bewirken die Polarisation zu dem M2 Makrophagen-Phänotyp.<sup>48</sup> Murine M2 Makrophagen exprimieren Arginase-1, Mannose-Rezeptor und das Protein *Found in inflammatory zone 1* (Fizz1).<sup>53</sup> In humanen M2 Makrophagen wird in Reaktion auf eine Stimulation mit IL-4 und IL-13 insbesondere die Expression von Scavenger Rezeptoren, Galactose Rezeptoren und Mannose Rezeptoren induziert.<sup>53,54</sup> M2 Makrophagen sezernieren antiinflammatorisch wirkende Mediatoren wie den IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1Ra), Interleukin-10 (IL-10) und *Transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ).<sup>28,48</sup> Sie haben somit antientzündliche

Eigenschaften und spielen eine wesentliche Rolle in der Wundheilung.<sup>48,49</sup> Die Produktion von IL-10 wird zudem durch die Aktivierung der *Toll-like* Rezeptoren (TLR) in Makrophagen induziert.<sup>55</sup> IL-10 ist ein starker, antiinflammatorischer Mediator, der LPS-induzierte Zytokine und die antigenpräsentierenden Funktionen der Makrophagen inhibiert.<sup>48</sup> Eine vermehrte Anreicherung von M2 Makrophagen und der mit M2 Makrophagen assoziierten Markern findet sich typischerweise in regredienten atherosklerotischen Plaques und in der Adventitia.<sup>28,56,57</sup>

In murinen Studien helfen verschiedene Markerproteine die Phänotypen der M1/M2-Makrophagen zu differenzieren: Zytokine, Chemokine, Enzyme und Scavenger-Rezeptoren.<sup>58</sup> Zu den M1-typischen Markern zählen die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , das Chemokin CCL2 und die für Makrophagen spezifische Isoform der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS), die induzierbare NOS (iNOS). Zu den M2-Markerproteinen gehören das Enzym Arginase-1 (ARG1), der Mannose-Rezeptor (MR) und Fizz1.<sup>54,58,59</sup>

## 1.5. Monozyten und Makrophagen in der Entzündung

Das angeborene Immunsystem erkennt Fremdkörper und Pathogene über konservierte, charakteristische Strukturmerkmale bzw. Muster.<sup>60</sup> Diese werden Pathogenassoziierte molekulare Muster (PAMPs) genannt und können von spezifischen Mustererkennungsrezeptoren (*pattern-recognition receptors* = PRR), die auf Zellen des angeborenen Immunsystems wie Monozyten und Makrophagen exprimiert werden, erkannt werden.<sup>61</sup> Die Scavenger-Rezeptoren sind eine Gruppe von PRR, die von Makrophagen exprimiert werden und eine Schlüsselrolle in der Atherogenese einnehmen, da sie oxLDL erkennen und aufnehmen können.<sup>28</sup> Eine weitere wichtige Gruppe der PRR stellt die Familie der *Toll-like* Rezeptoren (TLR) dar. Bislang wurden 10 humane TLR identifiziert.<sup>62,63</sup> Der TLR4 wird vor allem von Monozyten und Makrophagen exprimiert und erkennt das Lipopolysaccharid (LPS), welches ein Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien ist.<sup>64</sup> LPS ist ein sehr starker und potenter inflammatorischer Stimulus. Nachdem der TLR4 LPS erkannt hat, werden in den Monozyten und Makrophagen Signalkaskaden aktiviert, die zur Produktion oder Freisetzung von verschiedenen Mediatoren führen. Diese Mediatoren sind größtenteils inflammatorisch (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12, Plättchen-aktivierender Faktor und ROS).



## 1.6. TNF- $\alpha$ und TACE in der Atherosklerose

Ein zentrales Zytokin, das von Monozyten und Makrophagen in atherosklerotischen Plaques sezerniert wird, ist der Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ). TNF- $\alpha$  wird nach seiner Translation als Vorläuferprotein an die Zelloberfläche gebunden und wird dort durch die transmembrane Matrix-Metalloprotease aus der Familie der ADAM-Metalloproteasen *TNF- $\alpha$  Converting Enzyme* (TACE, auch ADAM17 genannt) in seine lösliche Form gespalten.<sup>65</sup> Dieser Vorgang wird im Englischen als *Shedding* bezeichnet.

TNF- $\alpha$  ist ein pleiotropes Zytokin, das durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *Nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B) potente proinflammatorische Effekte in der Atherosklerose zeigt.<sup>66</sup> Es bindet in seiner löslichen Form an zwei TNF-Rezeptoren: TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) und TNF-Rezeptor 2 (TNFR2). Wie der Ligand werden auch die beiden TNF-Rezeptoren durch TACE proteolytisch von der Zelloberfläche gespalten.<sup>65</sup> Auf Endothelzellen findet der TNF- $\alpha$ -Signalweg vor allem über den TNFR1 statt.<sup>67</sup> Transmembranes TNF- $\alpha$  bindet vorzugsweise an den TNFR2.<sup>68</sup> Klassischerweise wird nach Bindung von TNF- $\alpha$  an den TNFR1 die Apoptose induziert.<sup>69,70</sup> Ein weiterer in der Atherogenese entscheidender, durch TNF- $\alpha$ -vermittelter Mechanismus ist die Induktion der Expression von den Adhäsionsmolekülen VCAM-1 und ICAM-1 in Endothelzellen und glatten Muskelzellen.<sup>71,72</sup>

Zirkulierendes TNF- $\alpha$  ist mit einem erhöhten Risiko für einen Myokardinfarkt, atherosklerotischer Verdickung der Arteria carotis, Störungen im Lipid- und Glukosemetabolismus sowie altersbedingter Atherosklerose assoziiert.<sup>31</sup> Anti-TNF- $\alpha$ -wirksame Medikamente werden in der Behandlung der Atherosklerose nicht angewandt, sind jedoch in Deutschland für die Behandlung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und rheumatischen Krankheiten zugelassen. Jacobsson et al. konnten anhand von Registerdaten zeigen, dass die Therapie mit TNF- $\alpha$ -Blockern bei Patienten mit rheumatoider Arthritis zu einer geringeren Inzidenz von kardiovaskulären Ereignissen führt als bei unbehandelten Patienten mit rheumatoider Arthritis.<sup>73</sup> In einem *in vivo*-Modell an Mäusen mit einem genetischen Knockout von TNF- $\alpha$  wurde eine signifikante Reduktion der Atherosklerose

beobachtet.<sup>74</sup> Canault et al. untersuchten in einem Mausmodell die Effekte von transmembranem TNF- $\alpha$  auf die Atherosklerose.<sup>75</sup> In TNF- $\alpha$ -defizienten Mäusen, die lediglich transmembranes TNF- $\alpha$  exprimieren, konnten sie eine geringere Akkumulation von Makrophagen in den atherosklerotischen Plaques nachweisen.<sup>75</sup> Auch andere Studien konnten eine proatherogene Wirkung von TNF- $\alpha$  in Mäusen nachweisen.<sup>76,77</sup>

Zusätzlich zu TNF- $\alpha$  ist auch TACE in humanen und murinen atherosklerotischen Gefäßveränderungen nachzuweisen.<sup>78,79</sup> TACE wird im Endoplasmatischen Retikulum (ER) als inaktives Zymogen gebildet und erst im Golgi-Apparat durch die Abspaltung einer hemmenden Prodomäne aktiviert. In der aktiven Form gelangt TACE an die Zelloberfläche und ist für das *Shedding* einer Vielzahl von Substraten (wie z.B. TNF- $\alpha$ ) verantwortlich.<sup>80,81</sup> TACE benötigt zur Funktionsfähigkeit zwei Proteine aus der Familie der Rhomboid Proteasen, die den Transport von TACE vom ER zum Golgi Apparat und zur Zelloberfläche begleiten: das inaktive Rhomboid Protein 1 (iRhom1) und das inaktive Rhomboid Protein 2 (iRhom2). Inzwischen ist bekannt, dass iRhom1 und iRhom2 nicht nur am Transport von TACE beteiligt sind, sondern auch gemeinsam mit der Metalloprotease an die Zelloberfläche gelangen. An der Zelloberfläche wird die Aktivität von TACE durch iRhom1/2 und dessen Phosphorylierung reguliert.<sup>82</sup> Im Vergleich zu iRhom1 wird iRhom2 überwiegend in Immunzellen, insbesondere in Makrophagen, exprimiert.<sup>83</sup> Eine iRhom2-Defizienz wird folglich in anderen Zellen durch die Aktivität von iRhom1 kompensiert.

Der Verlust von iRhom2 in Mäusen führt durch die Inaktivität von TACE zu einem fehlenden Abspalten von TNF- $\alpha$  von Makrophagen.<sup>84</sup> Adrain et al. konnten zeigen, dass iRhom2 spezifisch für TACE ist und nicht mit dessen engstem Verwandten ADAM10 interagiert.<sup>84</sup> iRhom2 ist wiederum nicht nur für das *Shedding* durch TACE von TNF- $\alpha$  verantwortlich, sondern ist auch an dem *Shedding* des Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) Rezeptorliganden durch TACE beteiligt, welches u.a. bei der Barrierefunktion der Haut und der intestinalen Schleimhaut eine Rolle spielt.<sup>85,86</sup> Im Menschen führt die TACE-Defizienz zu Hautläsionen, Diarrhö, Haardefekten und einer dilatativen Kardiomyopathie.<sup>87</sup> Mäuse mit einer vollständigen TACE-Defizienz sind nicht lebensfähig.<sup>88</sup> Aufgrund dieser Gegebenheit scheint TACE in der Atherosklerose kein optimales therapeutisches Target. Infolge des selektiven Vorkommens von

iRhom2 in Myeloidzellen scheint die Regulation der TACE-Aktivität über die Inhibition von iRhom2 eine spezifische Verminderung der TNF- $\alpha$ -Freisetzung durch Makrophagen zu ermöglichen.<sup>83</sup> Die selektive iRhom2-Inhibition in Immunzellen hätte keine nachteiligen Effekte auf Keratinozyten oder intestinale Zellen, da in diesen Zellen iRhom1 den Ausfall von iRhom2 kompensieren könnte.

## 2. Fragestellung

Nach der Entdeckung der Bedeutung von iRhom2 für die TACE-Reifung und folglich die Freisetzung von TNF- $\alpha$  von der Zelloberfläche wurde die Beeinflussung dieser Signalachse in Mausmodellen untersucht und in murinen und humanen Makrophagen validiert.<sup>89</sup> Mäuse mit einer genetischen Defizienz für iRhom2 (iRhom2<sup>-/-</sup>) weisen einen normalen Phänotypen auf, sind fruchtbar und zeigen keine morphologischen Defekte.<sup>84</sup> Sie überleben im Vergleich zu ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern (iRhom2<sup>+/+</sup>) vermehrt einen LPS-induzierten septischen Schock.<sup>90</sup>

Bis dato konnte eine protektive Wirkung einer iRhom2-Defizienz in der inflammatorischen Arthritis im Mausmodell nachgewiesen werden.<sup>86</sup> Da die Atherosklerose eine chronische, inflammatorische und Makrophagen-dominierte Erkrankung ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Signalachse aus iRhom2, TACE und TNF- $\alpha$  auch in der Atherogenese eine wichtige Rolle spielt. Bisher existieren jedoch kaum Daten zur Bedeutung von iRhom2 in der Atherosklerose.

Daher ist es das Ziel dieser Arbeit als Pilotstudie die phänotypische und funktionelle Charakterisierung von iRhom2-defizienten Makrophagen unter atherogenen Stimuli zu evaluieren. Folgende Fragestellungen sollen untersucht und beantwortet werden:

- Gibt es Unterschiede in der TNF- $\alpha$ -Sekretion zwischen iRhom2-defizienten Makrophagen und iRhom2-suffizienten-Makrophagen unter atherogenen Stimuli?
- Wird die *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA) Expression von iRhom2, TACE und TNF-  $\alpha$  in Makrophagen durch atherogene Stimuli beeinflusst?
- Wie ist die Expression typischer M1 und M2 Makrophagen Marker in iRhom2-defizienten Makrophagen nach Makrophagenpolarisation?
- Bestehen Unterschiede in der Expression von ABCA1, ABCG1 und SR-B1 unter nativen Bedingungen und nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  zwischen iRhom2<sup>+/+</sup> und iRhom2<sup>-/-</sup> Makrophagen?
- Ist die Zellviabilität iRhom2-defizienter Makrophagen unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Exposition im Vergleich zu den iRhom2-suffizienten Makrophagen verändert?

Hypothese: Die Expression von iRhom2 wird durch atherogene Stimuli gesteigert und iRhom2-defiziente Makrophagen zeigen im Vergleich zu iRhom2-suffizienten Makrophagen ein geringeres inflammatorisches Potenzial.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Materialien

##### 3.1.1. Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Absorptions-Reader <i>Spectra max 340PC384</i>	Molecular Devices
Brutschränke	WTC Binder
Durchflusszytometer <i>CyAn ADP</i>	Dako Cytomation
Eis-Gerät	Scotsman Ice Systems
Kühlschrank 4°C, Tiefkühlschrank -20°C	Liebherr
Tiefkühlschrank -80°C	Heraeus Instruments
Lichtmikroskop <i>DM IL</i>	Leica
Multisteppipette, Multipette	Eppendorf
Nanodrop 2000	Thermo Scientific
Pipetten 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf
Pipetboy acu	Integra Biosciences
<i>Real-Time PCR QuantStudio 7 Flex</i>	Applied Biosystems
Sicherheitswerkbank <i>Holten LaminAir</i>	Heraeus Instruments
Schüttelapparat <i>Vortex-Genie 2</i>	Scientific Industries
Thermocycler <i>UNO II</i>	Biometra
Tischabzug	Köttermann
Wasserbad	Memmert
Zählkammer <i>Neubauer</i>	Hecht Assistent
Zentrifugen <i>Centrifuge 5415 R, Centrifuge 5417 C, Centrifuge 5810R, Centrifuge 5430R</i>	Eppendorf
<i>Universal 32 R</i>	Hettich Zentrifugen

**Tabelle 2:** Laborgeräte

### 3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Labormaterial	Spezifikation	Hersteller
Abdeckfolie für RT-PCR	MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems
Deckglas	Deckglas für Haemacytometer, 20 x 26 mm	Menzel
Einmalhandschuhe	Vasco Nitril white	B. Braun
ELISA-Platte	Nunc Maxisorp Flachboden 96-Loch-Platten	eBioscience
FACS-Röhrchen	5ml Polystyren Rundboden-Röhrchen	BD Biosciences
Glaswaren	verschiedene	Schott
Kanülen	Sterican Gr.2, G 21 x 1 ½ / 0,80 x 40 mm	B. Braun
	Sterican Safety G 19 x 1 ½ 1.1 x 40 mm	B. Braun
Petrischalen	92 x 16 mm	Falcon
Pipettenspitzen	10 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf
	Safe Seal SurPhob Spitzen 20 µl und 100 µl, steril	Biozym
	Safe Seal Tips Premium 100 µl	Biozym
	Serological Pipet 10 ml, 25 ml, steril	Falcon
Platte für RT-PCR	MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems
Spritzen	BD Discardit II 5 ml, 10 ml, 20 ml	BD Biosciences
Zellkulturschale	Tissue Culture Dish 100 x 20 mm, steril	Falcon
	Multiwell 6 Well, steril	
Zellkulturflasche	T75	Falcon
Zellsieb	40 µm Nylon, steril	Falcon
Combitips	2,5 ml, 10 ml, 50 ml	Eppendorf
Assay Platte	Mikrotestplatte 96 Well	Sarstedt
Reaktionsgefäß	Röhre 50 ml	Sarstedt
	Safe-Lock Tubes 0,5 ml; 1,5 ml	Eppendorf
Vakuumfilter	Vakuumfilter (500 ml), steril	Nalge Nunc International
Zellschaber		Sarstedt

**Tabelle 3:** Verbrauchsmaterialien

### 3.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Aqua ad iniectabilia	Braun
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Ethanol	Roth
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG
IFN- $\gamma$ (rm IFN-gamma)	Biomol
IL-4 (rm IL-4)	PromoCell
Isofluran	Abbott AG
Isopropanol	Merck
LPS (Lipopolysaccharide aus E.coli)	Sigma
Magnesiumchlorid	Carl Roth
Methanol	Merck
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Penicillin / Streptomycin (P/S)	Biochrom AG
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (1x) ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , steril	Invitrogen
Phosphowolframsäure (pH = 6,1-7,6; 2880,17 + x H <sub>2</sub> O g/mol)	Carl Roth
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck
TriZol	Ambion
Tween 20	Thermo Fisher
Trypsin	Carl Roth
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) <i>EMPROVE exp.</i>	Merck

**Tabelle 4:** Chemikalien und Reagenzien



### 3.1.4. Medien

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium 1640 (+L-Glutamin)	10%; 7,5%; 1% FCS 1% Penicillin/Streptomycin (P/S)	Gibco Life Technologies
<i>L Cell Conditioned Medium</i> (LCCM)	Überstand aus kultivierten L929-Zellen, siehe Abschnitt 3.3.1.	

**Tabelle 5:** Medien

### 3.1.5. Antikörper Durchflusszytometrie

Zielantigen	Farbstoff	Hersteller
CD 11b	V450	BD Horizon
CD 45	APC	BioLegend
F4/80	PE	Abcam

**Tabelle 6:** Antikörper Durchflusszytometrie

### 3.1.6. Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Magnesiumchloridlösung	2 mol/l MgCl <sup>2+</sup>
Phosphorwolframsäurelösung	40 g/l Phosphorwolframsäure 1 mol/l NaOH Destilliertes Wasser
Waschpuffer	PBS + 0,05% Tween 20

**Tabelle 7:** Lösungen

### 3.1.7. Kits

Bezeichnung	Hersteller
Fluitest Totalcholesterin	Analyticon
Mouse TNF- $\alpha$ High Sensitivity ELISA Kit	eBiosciences
Mouse TNF- $\alpha$ ELISA Set	BD Biosciences
BD OptEIA Reagent Set A	BD Biosciences
Mouse IL-10 ELISA MAX™ Deluxe Set	BioLegend
LEGEND MAX™ Mouse MCP-1 ELISA Kit	BioLegend
TMB Substrate Reagent Set	BD Biosciences
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems

**Tabelle 8:** Kommerzielle Kits und Lösungen

### 3.1.8. TaqMan®-Sonden für *Real-Time* PCR

Gen	Assay on Demand	Hersteller
ABCA1	Mm00442646_m1	Alle Applied Biosystems
ABCG1	Mm00437390_m1	
ADAM17 (TACE)	Mm00456428_m1	
Arg-1	Mm00475988_m1	
CCL2	Mm00441242_m1	
IL-1b	Mm00434228_m1	
IL-6	Mm00446190_m1	
IL-10	Mm00439614_m1	
iNos	Mm00440502_m1	
iRhom2	Mm00553470_m1	
Mrc1 (MR)	Mm00485148_m1	
Retnla (Fizz1)	Mm00445109_m1	
RPL19	Mm02601633_g1	
SCARB1 (SR-B1)	Mm00450234_m1	
TNF- $\alpha$	Mm00443260_g1	

**Tabelle 9:** TaqMan®-Sonden für - *Real Time* PCR

### 3.1.9. Software

Software	Hersteller
Microsoft Excel (2010, 2016)	Microsoft Corporation
Prism Version 7.0	GraphPad Software
SoftMax ® Pro Software	Molecular Devices
Summit 4.4	Beckmann Coulter Inc.
Zotero 5.0.55	Roy Rosenzweig Center for History and New Media
QuantStudio™ Software	<i>Real-Time</i> PCR Applied Biosystems

**Tabelle 10:** Software

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Organentnahme

Zur Entnahme verschiedener Organe wurden Mäuse des Stammes C57BL/6 verwendet. Aus iRhom2<sup>-/-</sup> Mäusen (freundlicherweise von Prof. Dr. Philipp Lang, Universitätsklinikum Düsseldorf, zur Verfügung gestellt) und Wildtyp-Mäusen wurden nach Verpaarung iRhom2<sup>-/-</sup> und iRhom2<sup>+/+</sup> Wurfgeschwister generiert. Es wurden stets alle Arbeitsschritte pro Genotyp analog durchgeführt. Nach Anästhesie mit Isofluran wurden die Mäuse durch Entbluten geopfert. Zur Vollblutgewinnung wurde das Herz mit Kanüle und Spritze punktiert. Das Blut wurde in einem Reaktionsgefäß gesammelt und zur Serumgewinnung für 10 Minuten bei 8000 Umdrehung pro Minute (U/min) zentrifugiert. Der Überstand (Serum) wurde in ein Reaktionsgefäß überführt.

Für die Entnahme von Femur- und Tibia-Knochen wurde mit einer Präparierschere das Hüftgelenk freipräpariert. Im nächsten Schritt wurden die Knochen freigelegt, an den Gelenken herausgelöst und von Sehnen- und Muskelgewebe befreit. Die präparierten Knochen wurden mit Ethanol desinfiziert, zweimal mit sterilem PBS gespült und in

sterilem PBS auf Eis gelagert. Alle weiteren Schritte zur Knochenmarksgewinnung werden in Abschnitt **3.2.2(2)** beschrieben.

### 3.2.2. Zellkultur

Alle *in-vitro* Versuche wurden unter einer keimarmen Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt, um das Risiko einer Kontamination zu vermeiden.

#### (1) Herstellung LCCM

L929-Zellen sind eine M-CSF-produzierende murine Fibroblasten-Zelllinie. Ihr Überstand wird aufgrund des darin enthaltenden, von den L929-Zellen produzierten M-CSF zur Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu Makrophagen verwendet.<sup>91</sup> Für die Herstellung des LCCM wurden L929-Zellen nach folgendem Schema kultiviert und deren Überstände gesammelt:

Am ersten Tag wurden  $1,2 \times 10^5$  Zellen in einer T 75 Zellkulturflasche mit 50 ml Medium (RPMI 1640 mit 7,5% FCS, 1% P/S) ausplattiert.

Nach sieben Tagen wurde der Medium-Überstand abgenommen und durch einen sterilen Vakuumfilter filtriert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Nach Erreichen einer ausreichenden Konfluenz wurden die Zellen durch Trypsin geerntet, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und erneut wie am ersten Tag ausplattiert. Nach sieben Tagen wurde der Medium-Überstand erneut abgenommen und mit einem sterilen Vakuumfilter filtriert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

#### (2) Isolation der Bone Marrow Derived Macrophages (BMDM)

Unter der Sicherheitswerkbank wurden die Knochen mit sterilem PBS gespült und mit Besteck jeweils an den Epiphysen eröffnet und das Knochenmark mithilfe einer 10 ml-Spritze und einer 21 G-Kanüle mit 5 ml RPMI Medium herausgespült. Die Zellsuspension wurde in einem Falcon Röhrchen bei 1200 U/min für drei Minuten zentrifugiert. Der Medium-Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml RPMI Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde durch ein  $40\ \mu\text{m}$  Zellsieb gefiltert. Anschließend wurde die gefilterte Zellsuspension erneut für drei Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert, die Flüssigkeit abgesaugt und in 50 ml RPMI Medium (10% FCS, 1% P/S, 15% LCCM) resuspendiert. Für die Zellzählung unter dem

Lichtmikroskop wurden 40 µl der Zellsuspension entnommen. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen gezählt und die Zellsuspension so auf die 6-Well-Platten ausplattiert, dass sich eine Zellzahl von  $1,4 \times 10^6$  Zellen pro Well ergab.

### (3) Kultivierung der BMDM

Tag 1: Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. In der Zellsuspension der Knochenmarkszellen sind es vor allem Makrophagen, die sich an die Oberfläche der Zellkulturschale anheften. Daher kann die Adhärenz u. a. als ein Selektionsfaktor gewertet werden.

Tag 3: Es wurden pro Well 2 ml RPMI Medium (10% FCS, 1% P/S) mit einem Anteil von 30% LCCM vorsichtig hinzugefügt, um eine Endkonzentration von 15% LCCM zu erhalten.

Tag 5: Das Medium wurde abgesaugt und mit 2 ml frischem Medium (10%FCS, 15% LCCM, 1% P/S) erneuert.

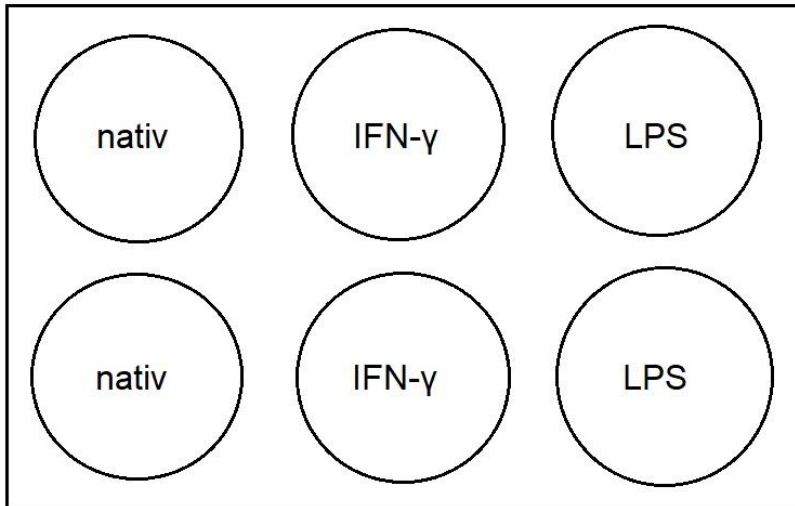
Tag 7: Das Medium wurde abgesaugt und mit 2 ml frischem und serumreduziertem Medium (1% FCS, 15% LCCM, 1% P/S) erneuert.

Tag 8: Ein Teil der adhärennten Zellen wurde nach Resuspension anhand von Oberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie als Makrophagen bestimmt (siehe Abschnitt **3.2.3**). Für alle Experimente wurden BMDM des achten Tages verwendet.

### (4) Zeitreihe mit IFN-γ und LPS

An Tag 8 der Kultivierung der BMDM (siehe Abschnitt **3.2.2 (3)**) wurde erneut ein serumreduzierter Mediumwechsel mit 1,5 ml Medium pro Well (1% FCS, 15% LCCM, 1% P/S) durchgeführt. Die Zytokine wurden wie folgt zum Medium hinzugegeben.

- a) Ohne Zusatz = Medium (als Kontrolle)
- b) 100 U/ml IFN-γ
- c) 1 µg/ml LPS



**Abbildung 1: Skizze zur Plattenbelegung und Versuchsaufbau der Zeitreihe mit IFN- $\gamma$  und LPS.** Die linken Vertiefungen (Wells) werden mit 1,5ml Medium ohne Zytokine behandelt, die mittleren Wells erhalten 1,5ml Medium mit 100U/ml IFN- $\gamma$  und die rechten Wells erhalten 1,5ml Medium mit 1  $\mu$ g/ml LPS. Pro Genotyp und Zeitpunkt wird jeweils eine 6-Well-Platte verwendet.

Es wurden folgende Zeitpunkte untersucht: eine Stimulation über 24h, sechs Stunden und drei Stunden. Es wurden nach oben genanntem Schema die Zytokine zum Medium hinzugefügt.

24 Stunden nach dem Beginn des Experiments wurden die Medium-Überstände aller Wells in jeweils ein 1,5 ml Eppendorfgefäß aufgenommen und bei 8000 U/min für fünf Minuten zentrifugiert. Der klare Überstand wurde ohne Zelldebris in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren experimentellen Verarbeitung gelagert. Die Wells der Zellkulturschalen wurden einmal mit sterilem PBS gewaschen. Unter einer Abzugsbank wurden 1 ml TRIzol pro Well zugefügt und die Zellen mit einem Zellschaber vom Untergrund abgelöst. Die Suspension aus TRIzol und Zellen wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gefüllt und bei -20°C gelagert.

#### (5) Makrophagenpolarisation

An Tag 8 wurden die BMDM mit den jeweiligen Zytokinen behandelt, nachdem 24 Stunden zuvor ein serumreduzierter Mediumswechsel (Medium mit 1% FCS) stattfand. Die Polarisation der nativen BMDM zu einem M1 Makrophagen Phänotyp erfolgte durch eine Inkubation der BMDM mit IFN- $\gamma$  und LPS (50 ng/ml murines IFN- $\gamma$  + 1  $\mu$ g/ml

LPS). Für die Polarisation zu M2 Makrophagen erfolgte die Inkubation der BMDM mit 10 U/ml (bzw. 20 ng/ml) IL-4. Parallel zu der Behandlung mit den Zytokinen erfolgte jeweils eine Kontrolle mit Medium ohne Zytokine. Nach einer sechsstündigen Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und bei -80°C gelagert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für die Ribonukleinsäure (RNA) Isolierung mit 1 ml Trizol pro Well behandelt, mit einem Zellschaber abgelöst und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß bei -20°C gelagert.

#### (6) Stimulation mit Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Die BMDM wurden an Tag 8 mit verschiedenen Konzentrationen von Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) stimuliert: 125 µM, 250 µM und 500 µM. Es erfolgte eine Inkubation von sechs Stunden im Brutschrank, bevor das Medium abgenommen und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß bei -80°C gelagert wurde. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die RNA isoliert.

#### 3.2.3. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, mit der die Eigenschaften einzelner Zellen mittels Laser analysiert werden können. Während der Messung wird jede Zelle einzeln von den Laserstrahlen bestrahlt. Je nach Eigenschaften der Zelle wird der Laserstrahl anders gestreut: Es wird das von den Zellen vorwärts (Vorwärtsstreulicht; *Forward Scatter* [FSC]) und seitwärts gestreute Licht (*Side Scatter* [SSC]) gemessen. Das FSC gibt Information über die Zellgröße und das SSC über die Granularität der Zelle. Zusätzlich können mittels fluoreszierender Antikörper Oberflächenstrukturen und intrazelluläre Strukturen der Zellen angefärbt und quantifiziert werden.<sup>92</sup>

Zur durchflusszytometrischen Charakterisierung der BMDM wurden diese mit einem Zellschaber aus der Zellkulturschale abgetrennt, in 1000 µl RPMI Medium resuspendiert und in ein 5 ml Rundboden-Röhrchen überführt. 500 µl der Zellsuspension wurden als native Kontrolle gemessen. 500 µl der Zellsuspension wurden zuvor mit der Antikörpermischung (0,5 µl CD45 + 0,5 µl CD11b + 0,5 µl F4/80) versetzt. Die Proben wurden für 15 min im Dunkeln auf Eis inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometer unter der Verwendung der Software Summit 4.4 gemessen.

### 3.2.4. Gesamtcholesterin- und HDL-Cholesterin-Bestimmung

Die Bestimmung des Gesamtcholesterins in Maus-Seren (siehe Abschnitt **3.2.1**) erfolgte mittels Fluitests CHOL der Firma Analyticon nach Herstellerangaben. Dazu wurden 4 µl einer Serumprobe, der Standardlösung oder Aqua als Kontrolle mit 400 µl der Arbeitsreagenz R1 versetzt. Jeweils 190 µl dieses Gemisches wurden von jeder Probe in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte pipettiert (Doppelwerte pro Probe). Die 96-Well-Platte wurde anschließend für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Probenmessung mittels Absorptionsreader bei einer Wellenlänge von 546 nm.

Zur Bestimmung der HDL-Cholesterin Konzentration wurden die im Serum enthaltenden Chylomikronen, Very Low Density Lipoproteine (VLDL) und LDL mittels Phosphorwolframsäure und Magnesiumionen ausgefällt. Diese Methode wurde 1977 von Lopes-Virella et al. beschrieben.<sup>93</sup> Dazu wurden 25 µl des Mausserums mit 2,5 µl Phosphorwolframsäure (siehe Abschnitt **3.1.6**) und 0,62 µl zweimolarer Magnesiumchloridlösung zusammengebracht und anschließend bei 4°C für 10 Minuten bei 9300 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und als Probe für die HDL-Cholesterin-Messung verwendet. Die HDL-Cholesterin-Messung erfolgte analog zur Gesamtcholesterinbestimmung mittels Fluitest CHOL der Firma Analyticon nach Herstellerangaben.

### 3.2.5. Methoden zur Quantifizierung von *messenger*-Ribonukleinsäuren

#### (1) RNA-Isolierung

Zur Extraktion der Gesamt-RNA aus den Zellen wurde TRIzol-Reagenz verwendet. Dazu wurden in jede Vertiefung einer 6-Well-Zellkulturplatte jeweils 1 ml TRIzol-Reagenz gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber gelöst. Die Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die gereinigte RNA wurde in 30 µl Aqua ad iniectabilia gelöst und die Konzentration mit Hilfe des Spektralphotometers *Nanodrop 2000* der Firma Fisher Scientific gemessen. Hierbei wurde die Absorption bei folgenden Wellenlängen gemessen: 230, 260 und 280 nm. Die Konzentration der RNA wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Die Reinheit wurde durch das Verhältnis der Wellenlängen 260 nm zu 230 nm ermittelt, welches eine Aussage über mögliche



Lösemittel im Eluat geben kann sowie der Wellenlängen 260 nm zu 280 nm, welches einen Hinweis auf eine mögliche Proteinkontamination im Eluat gibt.

## (2) Reverse Transkription

Die Reverse Transkription beschreibt die Übersetzung einer RNA in eine komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) mit Hilfe einer Reversen Transkriptase. Es wurde die *Moloney Murine Leukemia Virus* (MMLV) Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase verwendet. Der komplementäre DNA-Strang kann in der *Real-Time* Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) vervielfältigt werden.

Reagenz	Konzentration	Hersteller
RNA	500 ng	
Aqua ad iniectabilia		Braun
DNase I	2 U/μl	Ambion
Hexamere	0,5 μg/μl	TIB MOLBIOL
5x Reverse Transkriptase Puffer		Invitrogen
DTT		Sigma
dNTP Mix (dATP, aCTP, dGTP, dTTP)	10 mM	Roche
RNase Inhibitor	40 U/μl	Roche
MMLV Reverse Transkriptase	200 U/μl	Invitrogen

**Tabelle 11:** Komponenten für die cDNA Synthese

Es wurden jeweils 500 ng Gesamt-RNA mit Aqua ad iniectabilia zu einem Volumen von 9 μl aufgefüllt. Dann erfolgte die Herstellung der cDNA-Stränge in drei Schritten nach folgendem Schema (siehe Tabelle 12: Übersicht Reverse Transkription). Die Lagerung der cDNA fand bis zur Verwendung in der RT-PCR bei -20°C statt. Eine längerfristige Aufbewahrung der cDNA erfolgte bei -80°C.

Prozess	Reagenz	Cycler-Einstellung
DNA Abbau	0,5 µl DNase	15 min 37°C, 5 min 95°C
Anlagerung ( <i>Annealing</i> )	2 µl Hexamere	10 min 70°C, 5 min RT
Umschreibung RNA zu cDNA	4 µl 5x Puffer 2 µl DTT 1 µl dNTP 0,5 µl RNase Inhibitor  1 µl MMLV	60 min 37°C, 15 min 70°C

**Tabelle 12:** Übersicht Reverse Transkription (RT = Raumtemperatur)

### (3) Quantitative Echtzeit PCR (TaqMan®-PCR)

Die quantitative *Real-Time* Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation und Quantifizierung von Nukleinsäuren mittels fluoreszierender Sonden. Die PCR ist ein Verfahren zur Vervielfältigung von DNA und verläuft in mehreren Schritten. Zunächst kommt es zur Denaturierung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge. Es folgt die Hybridisierung (*Annealing*) der Primer und die Elongation durch die DNA-Polymerase. Simultan wird durch die Abspaltung von fluoreszierenden Sonden Fluoreszenz messbar und ermöglicht die Quantifizierung der Nukleinsäuren.<sup>94</sup> In dieser Arbeit wurde das Verfahren der TaqMan®-PCR verwendet. Hierbei kommen spezielle fluoreszenzmarkierte TaqMan-Sonden (siehe Tabelle 9) zum Einsatz, die am 5'-Ende ein Donorfluorochrom (Reporter) und am 3'-Ende den Quencherfarbstoff Tetramethylrhodamine (TAMRA) tragen.<sup>95</sup> Beruhend auf dem Prinzip des Förster-Resonanzenergietransfers gibt ein durch Lichtenergie angeregtes Donorfluorochrom seine Energie an ein Akzeptorfluorochrom (Quencher) ab.<sup>95</sup> Bei der PCR-Reaktion lagern sich die Taqman-Sonden an die einsträngige DNA an. Die DNA-Polymerase baut durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität die Taqman-Sonde am 5'-Ende ab, sodass Quencherfarbstoff und Reporter räumlich voneinander getrennt werden und die Reporter-Fluoreszenz messbar wird.<sup>95</sup> Das Signal des fluoreszierenden Reporter nimmt folglich proportional zur Amplifikation zu, was die Quantifizierung der PCR-Produkte erlaubt.<sup>95</sup>

In der vorliegenden Arbeit wurde eine relative Quantifizierung von Nukleinsäuren durchgeführt. Die relative Quantifizierung beschreibt, wie stark ein Gen in Bezug auf ein *Housekeeping*-Gen exprimiert wird. Das *Housekeeping*-Gen besitzt die Eigenschaft, unabhängig von äußeren Einflüssen konstant in Zellen exprimiert zu werden. Als *Housekeeping*-Gen wurde das Ribosomale Protein L19 (RPL19) verwendet. In dieser Arbeit wurden von den in Abschnitt **3.2.5(2)** gewonnenen cDNA-Probe Doppelwerte bestimmt. Es wurde stets eine Negativkontrolle (*Non Template Control*) in Form von destilliertem Wasser, anstelle von cDNA mitgeführt. Es wurden Ct-Werte (Ct = *Cycle Threshold*) gemessen, die in Relation zu dem *Housekeeping*-Gen gesetzt wurden. Der Ct-Wert beschreibt den Zyklus in der PCR, in dem die Signalstärke zum ersten Mal die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Die quantitative Differenz zwischen zwei Proben wurde mit Microsoft Excel (Office Version 2016) nach der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode oder  $2^{-\Delta Ct}$  Methode berechnet.

### 3.2.6. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)* ist ein immunologisches Nachweisverfahren für z. B. Proteine, das auf einem photometrisch messbaren, enzymvermittelten Farbumschlag beruht. Dabei wird das zu analysierende Antigen mittels Antikörper gebunden. Diese Bindung wird von einem Detektionsantikörper gebunden, der mit einem Enzym gekoppelt ist. Nach Zugabe eines Substrates setzt das gekoppelte Enzym das farblose Substrat in ein farbiges Produkt um.<sup>96</sup> Die Produkte können folglich photometrisch quantifiziert werden. Dieses Verfahren wurde zur Quantifizierung von TNF- $\alpha$ , CCL2 und IL-10 Protein im Medium von Zellkulturen verwendet. Es wurden das TNF- $\alpha$  ELISA-Set (BD Biosciences) mit dem dazugehörigen BD OptEIA Reagent Set A sowie das TNF- $\alpha$  High Sensitivity Kit (eBiosciences) verwendet. Der Nachweis von CCL2 erfolgte mittels LEGEND MAX Mouse MCP-1/CCL2 ELISA Kit (BioLegend) und der Nachweis von IL-10 mittels Mouse IL-10 ELISA MAX Deluxe Set (BioLegend). Die Experimente erfolgten jeweils nach dem Protokoll des jeweiligen Herstellers.

Zur Vorbereitung der Experimente wurden die zu untersuchenden Zellüberstände vor der Verwendung zentrifugiert, um restlichen Zelldebris zu entfernen. Für den TNF- $\alpha$  ELISA von BD Biosciences wurde der Antikörper im Beschichtungspuffer gelöst, jeweils 100  $\mu$ l in die Vertiefungen einer Nunc MaxiSorp 96-Well ELISA-Platte gegeben

und bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 10% FCS für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden jeweils 100 µl des Standards, einer Probe (Zellüberstand) oder einer Kontrolle in ein Well gegeben und die Platte für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden jeweils Vierfachwerte bestimmt. Als Kontrolle diente RPMI Medium mit 10% FCS. Es erfolgte das fünfmalige Waschen der Platte, danach wurden die Wells eine Stunde mit einem biotinyliertem Detektionsantikörper und Streptavidin-Meerrettichperoxidase (Streptavidin-HRP) bei Raumtemperatur inkubiert. Es schloss sich ein siebenmaliger Waschschrift an. Nun wurden 100 µl einer Lösung aus Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid in jedes Well pipettiert und die Platte im Dunklen für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach dem Beenden der Reaktion durch 50 µl 1M Schwefelsäure konnte die Absorption im Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm bzw. 570 nm gemessen werden. Die nachgewiesenen Extinktionen der Zellüberstände konnten über die Standardkurve mit den TNF- $\alpha$ -Konzentrationswerten korreliert werden.

Für die IL-10 ELISA-Experimente wurde der Antikörper im vom Hersteller bereitgestellten Beschichtungspuffer gelöst und jeweils 100 µl der Lösung in eine Vertiefung der Nunc MaxiSorp 96-Well Platte gegeben. Die Platte wurde versiegelt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Danach wurde die Platte viermal mit dem Waschpuffer (PBS + 0,05% Tween 20) gewaschen und anschließend mit dem im Kit enthaltenem Assay Diluent A für eine Stunde geblockt. Die Platte wurde danach erneut viermal mit dem Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 100 µl des Standards, der Proben (Zellüberstand) oder der Kontrolle (Assay Diluent A), in ein Well gegeben und die Platte für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden jeweils 100 µl einer Lösung aus Detektionsantikörper und Assay Diluent A für eine Stunde in die Wells gegeben. Es erfolgte erneut ein Waschschrift, bevor die Wells mit einer Lösung aus Avidin-HRP und Assay Diluent A für 30 Minuten inkubiert wurden. Die Platte wurde fünfmal gewaschen. Daraufhin wurden 100 µl einer Lösung aus Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid in jedes Well pipettiert und die Platte für 20 Minuten im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Beenden der Reaktion durch 100 µl 1M Schwefelsäure wurde die Absorption im Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm bzw. 570 nm gemessen.

Der hochsensitive TNF- $\alpha$  ELISA von eBiosciences sowie der CCL2 ELISA von BioLegend wurden mit bereits vom Hersteller beschichteten Platten durchgeführt.

### 3.2.7. MTT-Test

Zur Beurteilung der Zellviabilität unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stimulation wurde der MTT-Test durchgeführt, der eine Aussage über die metabolische Aktivität von lebenden Zellen gibt.<sup>97</sup> Namensgebend für den Test ist der gelbe, wasserlösliche Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT), der durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen, eines zur Atmungskette zählenden Enzyms, zu dem blauvioletten, unlöslichen Farbstoff Formazan reduziert wird.<sup>98</sup> Da diese Reaktion in den Mitochondrien der lebenden Zellen erfolgt, ist das Auftreten von Formazan proportional zur metabolischen Aktivität der Zellen.<sup>97</sup> Formazan hat ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 570 nm.

Für die Versuche wurde MTT in PBS gelöst und steril filtriert, sodass eine Konzentration von 5 mg/ml resultierte. Undifferenzierte hämatopoetische Stammzellen wurden in 12-Well-Platten zu  $0,6 \times 10^6$  Zellen pro Kammer ausgesät und nach Protokoll zu BMDM differenziert (siehe Abschnitt **3.2.2(2)**). An Tag 8 wurden dem RPMI Medium der BMDM 125  $\mu$ M, 250  $\mu$ M, 500  $\mu$ M oder 1000  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für sechs Stunden hinzugefügt. Nach der Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurden jeweils 10  $\mu$ l der MTT-Lösung in die Vertiefungen der 12-Well-Platten gegeben. Die 12-Well-Platten wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert, bevor das Medium abgesaugt wurde. Anschließend wurden 250  $\mu$ l Isopropanol (versetzt mit 0,004M Salzsäure (HCl)) auf die Zellen gegeben, um eine Lyse der Zellen zu erzielen und die wasserunlöslichen Formazankristalle freizusetzen und zu lösen. Mit einer Pipette wurden anschließend die 250  $\mu$ l aus jedem Well in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte zur Messung im Mikroplattenlesegerät überführt. Die Absorption des gelösten Formazan wurde im Mikroplattenlesegerät mit Hilfe der SoftMax Pro Software bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen.

### 3.2.8. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen GraphPad Prism Software (Version 7.0, Firma GraphPad Software Inc.) und Microsoft Excel Office Version 2016. Diagramme und Graphen wurden mit der Software GraphPad Prism erstellt.

Bei jedem Experiment wurden Doppelwerte gemessen. Für die Auswertung der erhobenen Daten wurden folgende statistische Verfahren verwendet: Berechnung von Mittelwerten und Standardfehlern (SEM) sowie die Durchführung einer Ausreißeranalyse mittels ROUT Methode. Bei kleinen Stichproben von  $n \leq 5$  wurde eine Normalverteilung angenommen. Zum Vergleich der Mittelwerte wurde ein ungepaarter T-Test oder eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Sidak-Mehrfachvergleichstest eingesetzt. Der F-Test wurde verwendet, um zu testen, ob die Varianzen der normalverteilten Variablen gleichmäßig oder ungleichmäßig verteilt sind. Der ungepaarte T-Test wurde für normalverteilte Variablen gewählt und der Welch-Test wurde bei fehlender Varianzhomogenität angewendet. Für Experimente mit zwei unabhängigen Variablen wurde eine zweifaktorielle ANOVA gefolgt von einem Sidak-Mehrfachvergleichstest durchgeführt. Die Ergebnisse werden prinzipiell als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Ein p-Wert von  $<0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Expression von iRhom2, TACE und TNF- $\alpha$ in Makrophagen unter atherogenen Stimuli

Um zu untersuchen, ob sich analog zu den Arbeiten von Adrain et al.<sup>84</sup> und McIlwain et al.<sup>90</sup> Unterschiede in der Expression von iRhom2, TACE und TNF- $\alpha$  zwischen iRhom2-suffizienten und iRhom2-defizienten Makrophagen unter LPS-Stimulation in unserer Makrophagen-Zelllinie nachweisen lassen, wurden die BMDM beider Genotypen sieben Tage nach ihrer Ausplattierung für null, drei, sechs und 24 Stunden mit LPS stimuliert.

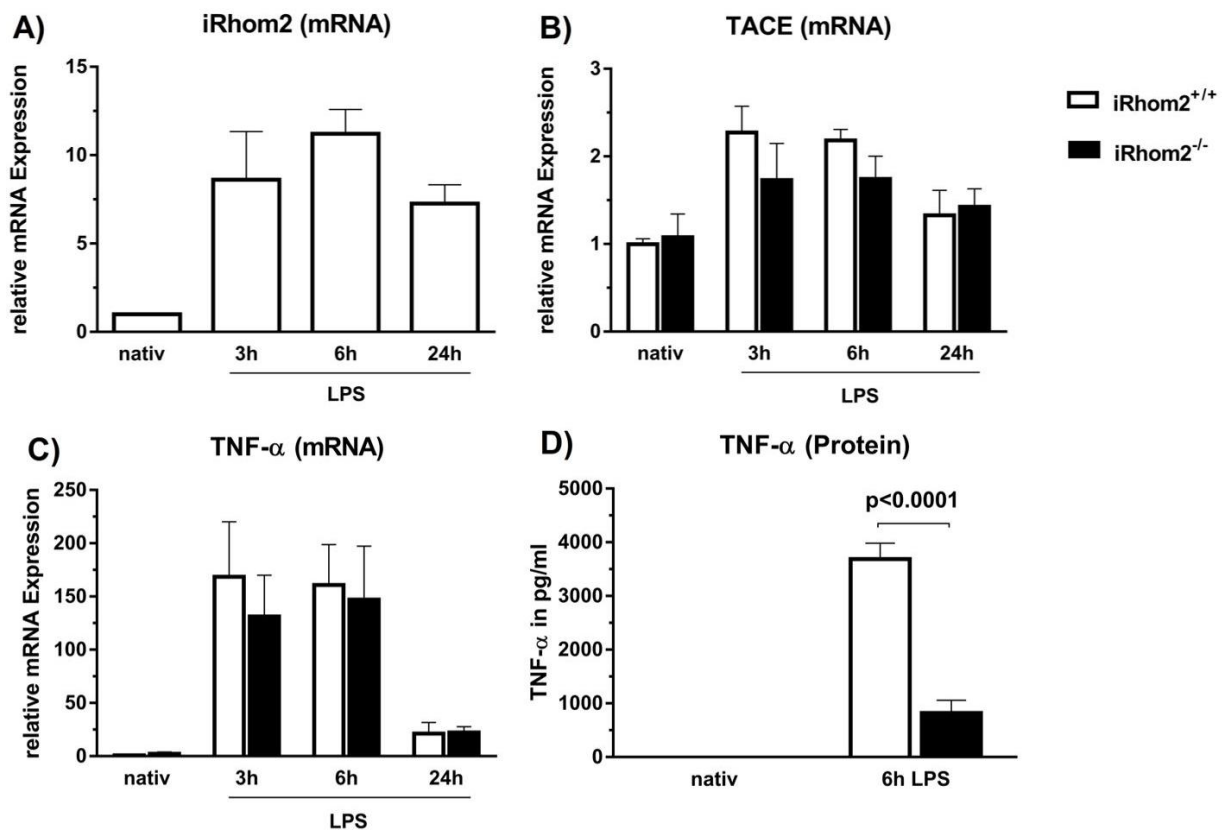
In der *Real-Time* PCR wurde die mRNA-Expression von iRhom2, TACE und TNF- $\alpha$  quantifiziert. Die n-fache mRNA-Expression wurde in Bezug zu der unbehandelten Kontrolle von iRhom2-suffizienten BMDM (iRhom2<sup>+/+</sup>) gesetzt.

Die Stimulation mit LPS führte zu einem Anstieg der iRhom2-Expression in iRhom2<sup>+/+</sup> Makrophagen mit maximaler Expression nach sechs Stunden bei einer ca. zwölf-fachen Steigerung der mRNA-Expression gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abbildung **2A**). Die mRNA-Expression von TACE und TNF- $\alpha$  stieg nach Stimulation mit LPS in iRhom2<sup>+/+</sup> und iRhom2<sup>-/-</sup> BMDM an, dabei unterschied sich die Genexpression nicht signifikant zwischen den Genotypen (Abbildung **2B** und **2C**).

Anschließend wurde die Auswirkung der iRhom2-Defizienz auf die TNF- $\alpha$  Sekretion der Makrophagen untersucht. Dazu wurden die Überstände der BMDM nach Behandlung mit LPS über sechs Stunden mittels TNF- $\alpha$ -ELISA analysiert.

Nativ sezernierten die BMDM beider Genotypen nur geringfügige Mengen von TNF- $\alpha$ . Nach Stimulation mit LPS stieg die Sekretion von TNF- $\alpha$  in beiden Genotypen an.

Im Vergleich zu iRhom2<sup>+/+</sup> BMDM war der Anstieg der TNF- $\alpha$ -Konzentration im Überstand der iRhom2-defizienten Makrophagen signifikant geringer (etwa vierfach) (Abbildung **2D**).



**Abbildung 2: Makrophagen - iRhom2, TACE, TNF- $\alpha$  mRNA-Expression und TNF- $\alpha$  Sekretion nach Stimulation mit LPS.** BMDM aus iRhom2<sup>+/+</sup> und iRhom2<sup>-/-</sup> Mäusen: relative mRNA-Expression für **A)** iRhom2, **B)** TACE und **C)** TNF- $\alpha$  nativ und nach 3, 6 und 24 Stunden Behandlung mit LPS im Vergleich zur nativen Kontrolle der iRhom2<sup>+/+</sup> BMDM. Ergebnisse aus 2 individuellen Experimenten. Die Auswertung erfolgte mit der 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> Methode. Housekeeping Gen: RLP19. **D)** TNF- $\alpha$  Sekretion (in pg/ml) von BMDM nativ und unter Stimulation mit LPS über 6h, n = 3 individuelle Experimente. Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angezeigt. Ein p-Wert von <0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.



Diese Ergebnisse waren in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Adrain et al.<sup>84</sup> und McIlwain et al.<sup>90</sup>, sodass im nächsten Experiment die Auswirkungen von IFN- $\gamma$  und oxidativem Stress auf die mRNA-Expression von iRhom2, TACE und TNF- $\alpha$  in Makrophagen mittels *Real-Time* PCR untersucht wurden. Dazu wurden BMDM sieben Tage nach der Ausplattierung für null, drei, sechs und 24 Stunden mit IFN- $\gamma$  oder für sechs Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt.

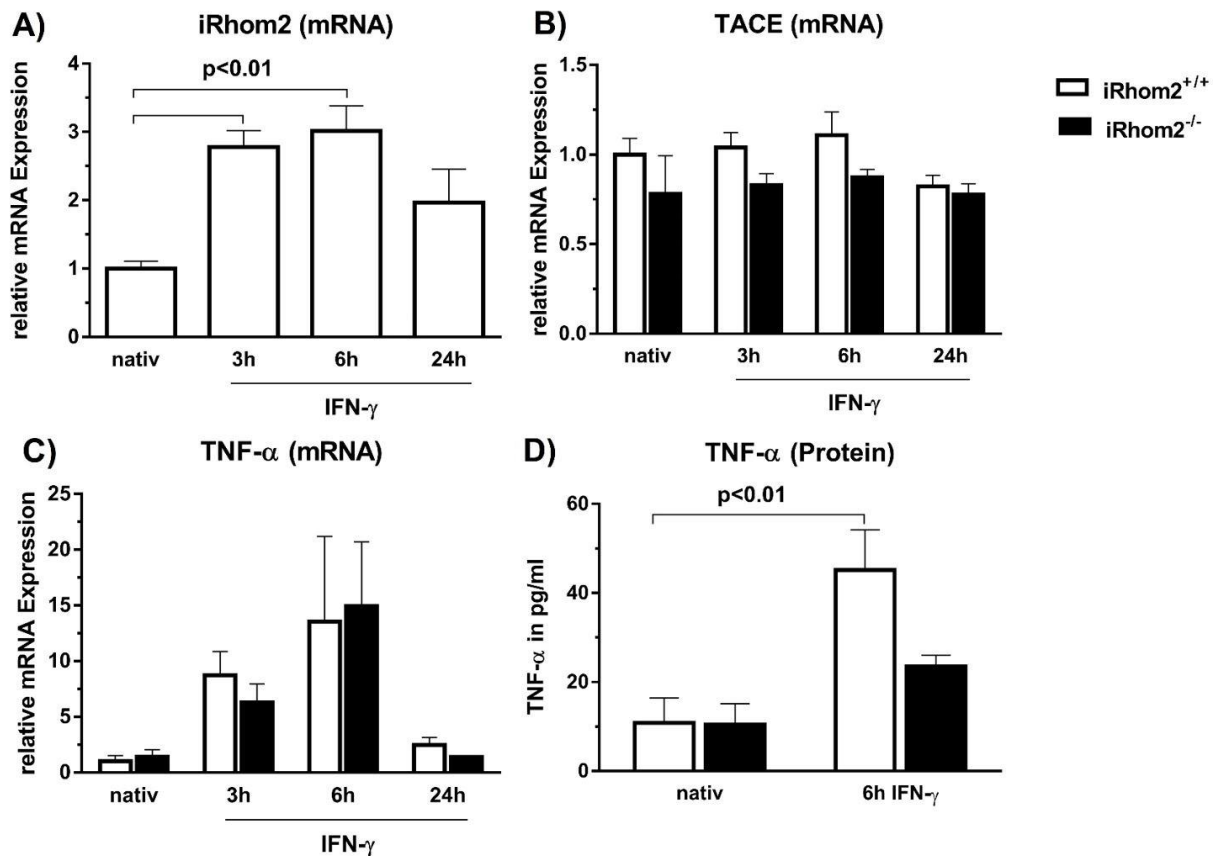
Die Behandlung mit IFN- $\gamma$  für drei und sechs Stunden führte zu einem signifikanten Anstieg der Expression von iRhom2 in den iRhom2<sup>+/+</sup> BMDM (Abbildung **3A**). Die Expression von TACE zeigte unter der IFN- $\gamma$ -Stimulation keine wesentliche Veränderung in beiden Genotypen (Abbildung **3B**) während die mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  nach drei und sechs Stunden Stimulation mit IFN- $\gamma$  in beiden Genotypen deutlich anstieg (Abbildung **3C**). Zwischen BMDM aus iRhom2<sup>-/-</sup> und iRhom2<sup>+/+</sup> Mäusen konnte kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression von TACE und TNF- $\alpha$  beobachtet werden.

Unter der Stimulation mit 250  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kam es zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Expression von iRhom2 in den iRhom2<sup>+/+</sup> Mäusen (Abbildung **4A**). Die Expression von TACE blieb unter der Einwirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in iRhom2-suffizienten und iRhom2-defizienten BMDM im Wesentlichen unverändert (Abbildung **4B**), jedoch stieg die Expression der TNF- $\alpha$  mRNA nach Stimulation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> deutlich an (maximal mit 250  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Abbildung **4C**). Zwischen den beiden Genotypen ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von TACE und TNF- $\alpha$  unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Stimulation erkennen.

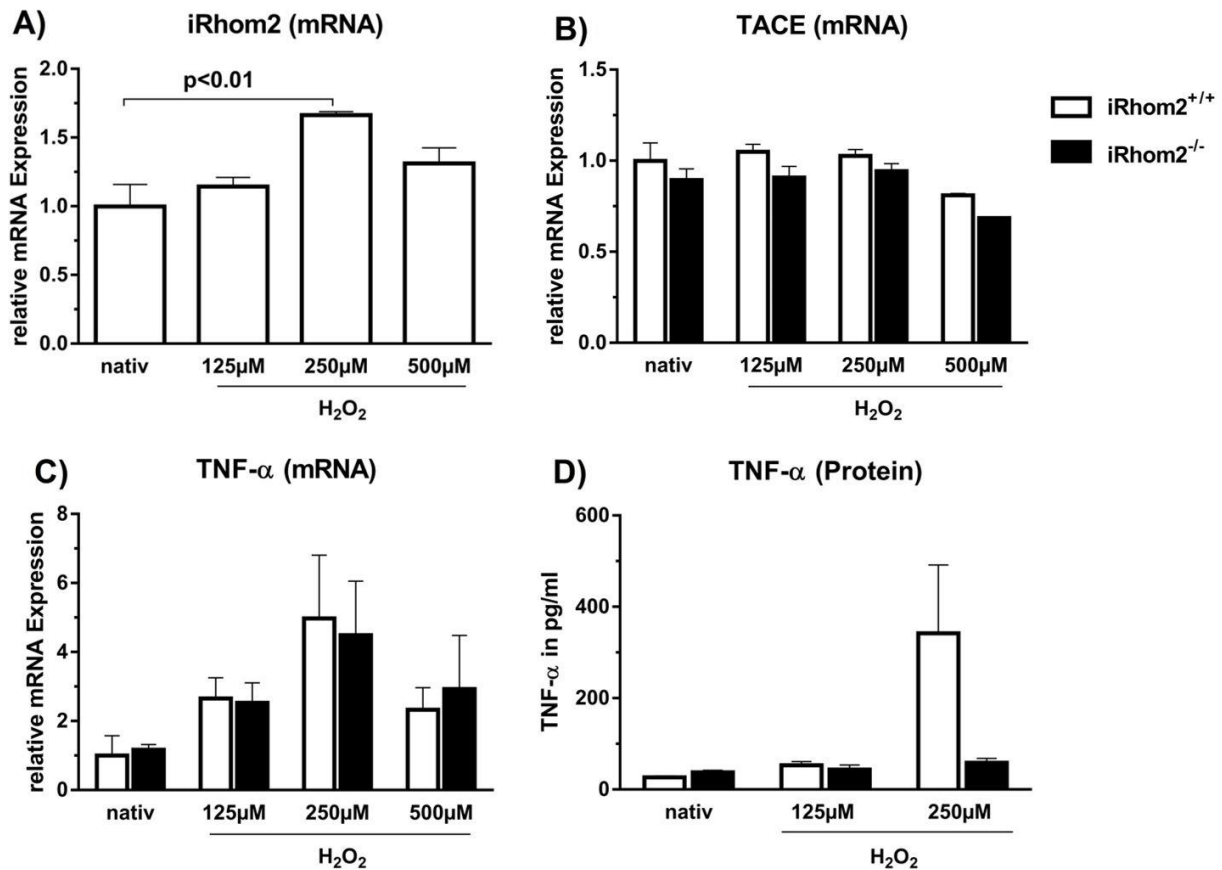
Die TNF- $\alpha$  Sekretion von iRhom2-suffizienten und iRhom2-defizienten BMDM unter IFN- $\gamma$  und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Stimulation für sechs Stunden wurde mittels TNF- $\alpha$  ELISA analysiert.

Unbehandelt sezernierten die BMDM beider Genotypen nur geringfügige Mengen an TNF- $\alpha$ . Die Behandlung mit IFN- $\gamma$  führte zu einem Anstieg der TNF- $\alpha$  Sekretion in beiden Gruppen (Abbildung **3D**). Der Anstieg der TNF- $\alpha$  Sekretion zwischen der Nativbehandlung und der IFN- $\gamma$  Stimulation war nur bei iRhom2<sup>+/+</sup> BMDM statistisch signifikant.

Unter Stimulation von BMDM mit  $H_2O_2$  nahm der Gehalt an  $TNF-\alpha$  im Überstand der BMDM beider Genotypen zu (Abbildung 4D). Bei der Stimulation mit  $250\mu M H_2O_2$  zeigte sich dabei eine wesentlich geringere  $TNF-\alpha$  Sekretion der  $iRhom2^{-/-}$  BMDM im Vergleich zu den  $iRhom2^{+/+}$  BMDM.



**Abbildung 3: Makrophagen - iRhom2, TACE, TNF- $\alpha$  mRNA-Expression und TNF- $\alpha$  Sekretion nach Stimulation mit IFN- $\gamma$ .** BMDM aus  $iRhom2^{+/+}$  und  $iRhom2^{-/-}$  Mäusen: relative mRNA-Expression von **A)**  $iRhom2$ , **B)** TACE und **C)**  $TNF-\alpha$  nativ und nach 3, 6 und 24 Stunden Behandlung mit IFN- $\gamma$  im Vergleich zur Nativ-Kontrolle der  $iRhom2^{+/+}$  BMDM. Ergebnisse aus 4 unabhängigen Experimenten. Die Auswertung erfolgte mit der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode. Housekeeping Gen: RLP19. **D)**  $TNF-\alpha$  Sekretion (in pg/mL) von BMDM nativ und unter Stimulation mit IFN- $\gamma$  über 6h, n = 3 individuelle Experimente. Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angezeigt. Ein p-Wert von  $<0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.



**Abbildung 4: Makrophagen - iRhom2, TACE, TNF-α mRNA-Expression und TNF-α Sekretion nach Stimulation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** BMDM aus iRhom2<sup>+/+</sup> und iRhom2<sup>-/-</sup> Mäusen: relative mRNA-Expression von **A)** iRhom2, **B)** TACE und **C)** TNF-α nativ und 6 Stunden Behandlung mit 125 μM, 250 μM und 500 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Vergleich zur Nativ-Kontrolle der iRhom2<sup>+/+</sup> BMDM. Ergebnisse aus 3 individuellen Experimenten (bei 500 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n = 2). Die Auswertung erfolgte mit der 2<sup>-ΔΔCt</sup> Methode. Housekeeping Gen: RLP19. **D)** TNF-α Sekretion (in pg/mL) von BMDM nativ und nach Stimulation mit 125 μM und 250 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> über 6 Stunden, n = 2 individuelle Experimente, eine statistische Auswertung erfolgte aufgrund der geringen Fallzahl nicht. Daten werden als Mittelwerte ± Standardfehler angezeigt. Ein p-Wert von <0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

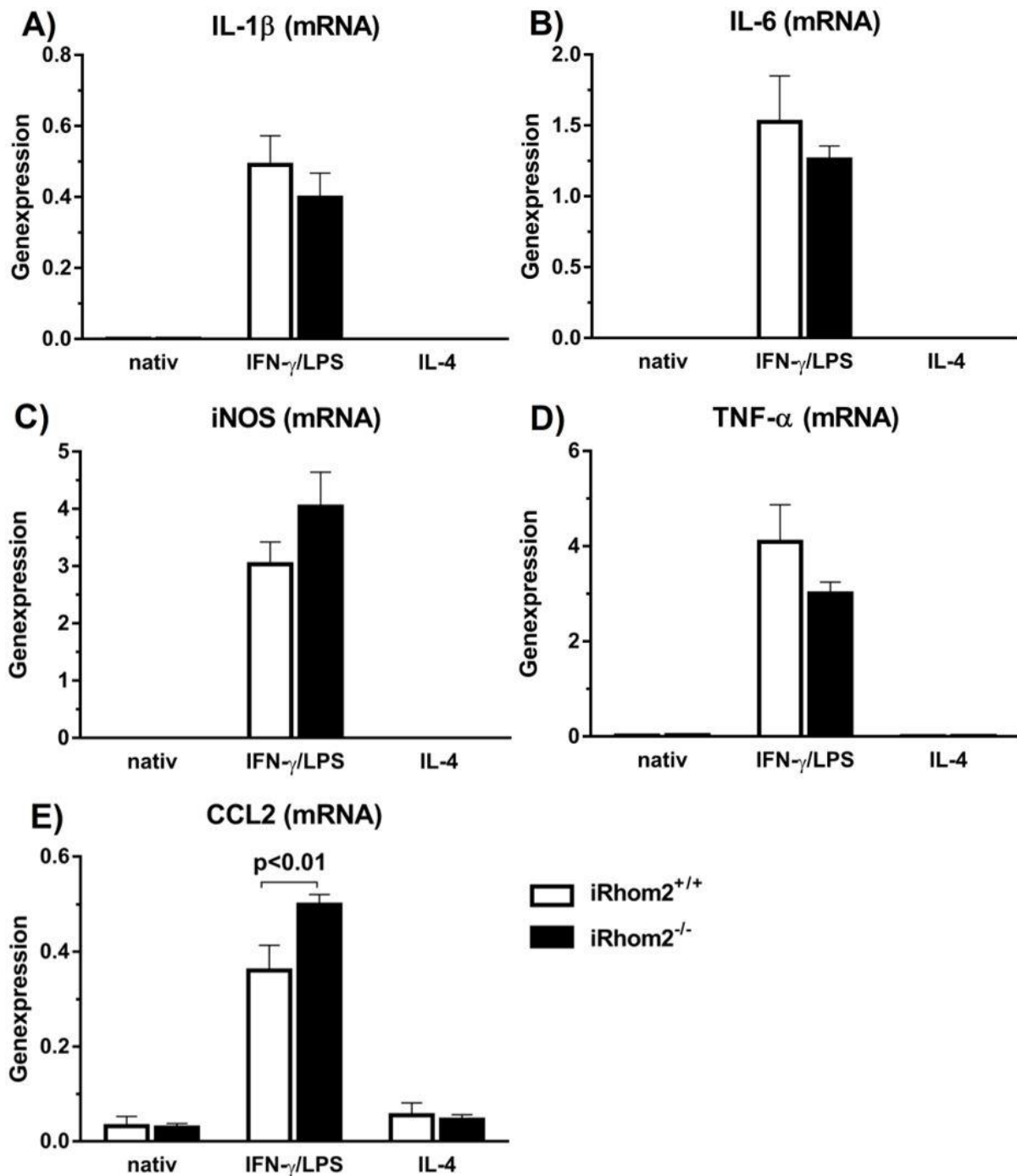
#### 4.2. Expression von M1 und M2 Makrophagen Markern in iRhom2-defizienten Makrophagen nach Makrophagenpolarisation

Zur Charakterisierung der Makrophagen hinsichtlich ihrer Eigenschaften nach Polarisierung zu M1 oder M2 Makrophagen wurden BMDM von iRhom2<sup>+/+</sup> und iRhom2<sup>-/-</sup> Mäusen an Tag 8 nach der Ausplattierung für sechs Stunden mit IFN- $\gamma$ /LPS (für eine Polarisierung zu M1 Makrophagen) oder IL-4 (für eine Polarisierung zu M2 Makrophagen) inkubiert.

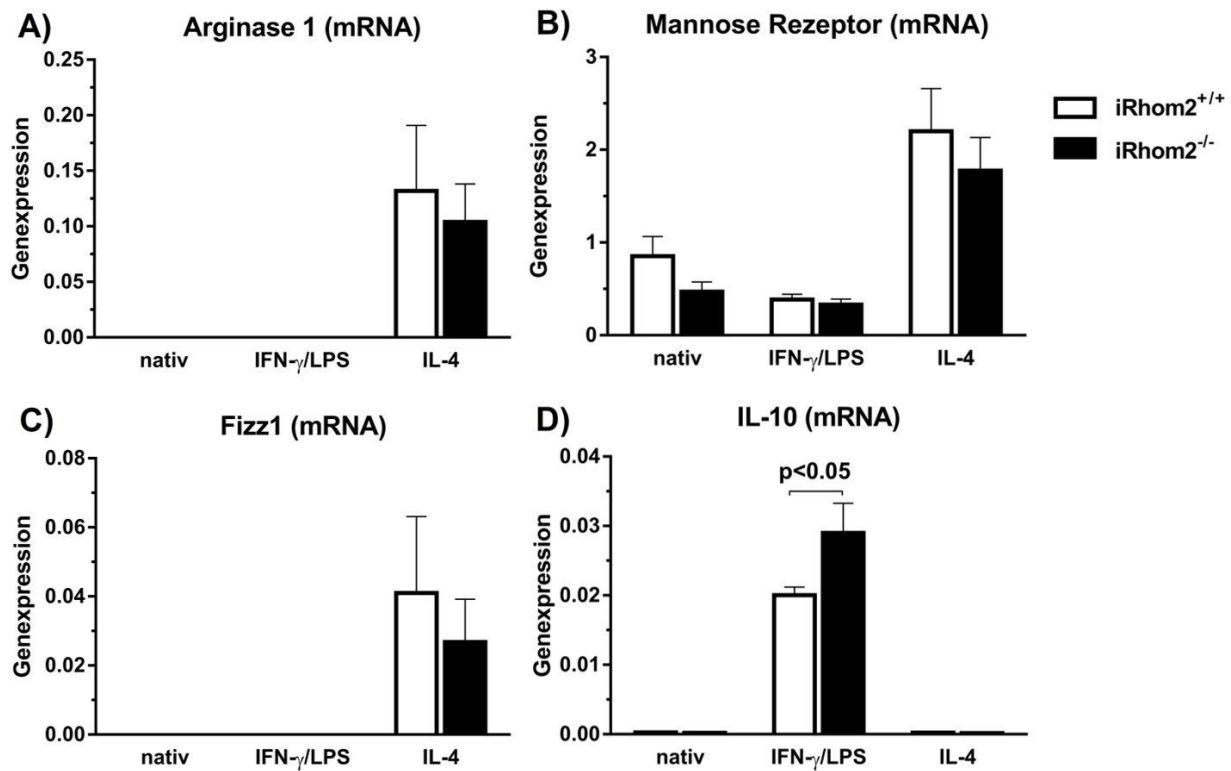
Mittels *Real-Time* PCR wurde anschließend die Genexpression typischer M1 (IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS, TNF- $\alpha$  und CCL2) und M2 (Arginase 1, Mannose Rezeptor, Fizz1 und IL-10) Makrophagen Marker bestimmt. Die BMDM beider Genotypen exprimierten nach der Stimulation mit IFN- $\gamma$ /LPS IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS, TNF- $\alpha$  und CCL2 (Abbildung 5). Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expression von CCL2 zwischen den beiden Genotypen mit erhöhter CCL2 mRNA Expression in iRhom2<sup>-/-</sup> BMDM im Vergleich zu den iRhom2<sup>+/+</sup> BMDM (Abbildung 5E). Die TNF- $\alpha$  mRNA Expression war in den iRhom2<sup>-/-</sup> BMDM im Vergleich zu den iRhom2<sup>+/+</sup> BMDM geringer (Abbildung 5D).

Unter der Stimulation mit IFN- $\gamma$ /LPS kam es zu einer erhöhten Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 in BMDM beider Genotypen, dabei war die Induktion der IL-10-Expression in iRhom2<sup>-/-</sup> BMDM im Vergleich zu iRhom2<sup>+/+</sup> BMDM signifikant höher (Abbildung 6D).

Die Behandlung mit IL-4 führte in iRhom2<sup>+/+</sup> und iRhom2<sup>-/-</sup> BMDM zu einer Zunahme der mRNA-Expression der M2 Makrophagenmarker Arginase 1, Mannose Rezeptor und Fizz1 (Abbildung 6A, 6B, 6C). Hinsichtlich der Expressionshöhe der M2 Makrophagen Marker konnte keine signifikante Differenz zwischen den BMDM beider Genotypen beobachtet werden.



**Abbildung 5: Expression typischer M1 Makrophagen Marker nach Makrophagenpolarisation.** mRNA-Expression muriner iRhom2<sup>+/+</sup> und iRhom2<sup>-/-</sup> BMDM von **A)** IL-1 $\beta$ , **B)** IL-6, **C)** iNOS, **D)** TNF- $\alpha$ , **E)** CCL2 unter nativen Bedingungen und nach sechsstündiger Behandlung mit IFN- $\gamma$ /LPS (50 ng/ml murines IFN- $\gamma$  + 1  $\mu$ g/ml LPS) oder IL-4 (20 ng/ml). Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angezeigt, Ergebnisse aus 4 individuellen Experimenten. Die Auswertung erfolgte mittels 2<sup>- $\Delta$ Ct</sup> Methode. Hierbei findet ein Abgleich zum Referenzgen (Housekeeping-Gen) statt. Housekeeping Gen: RLP19. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

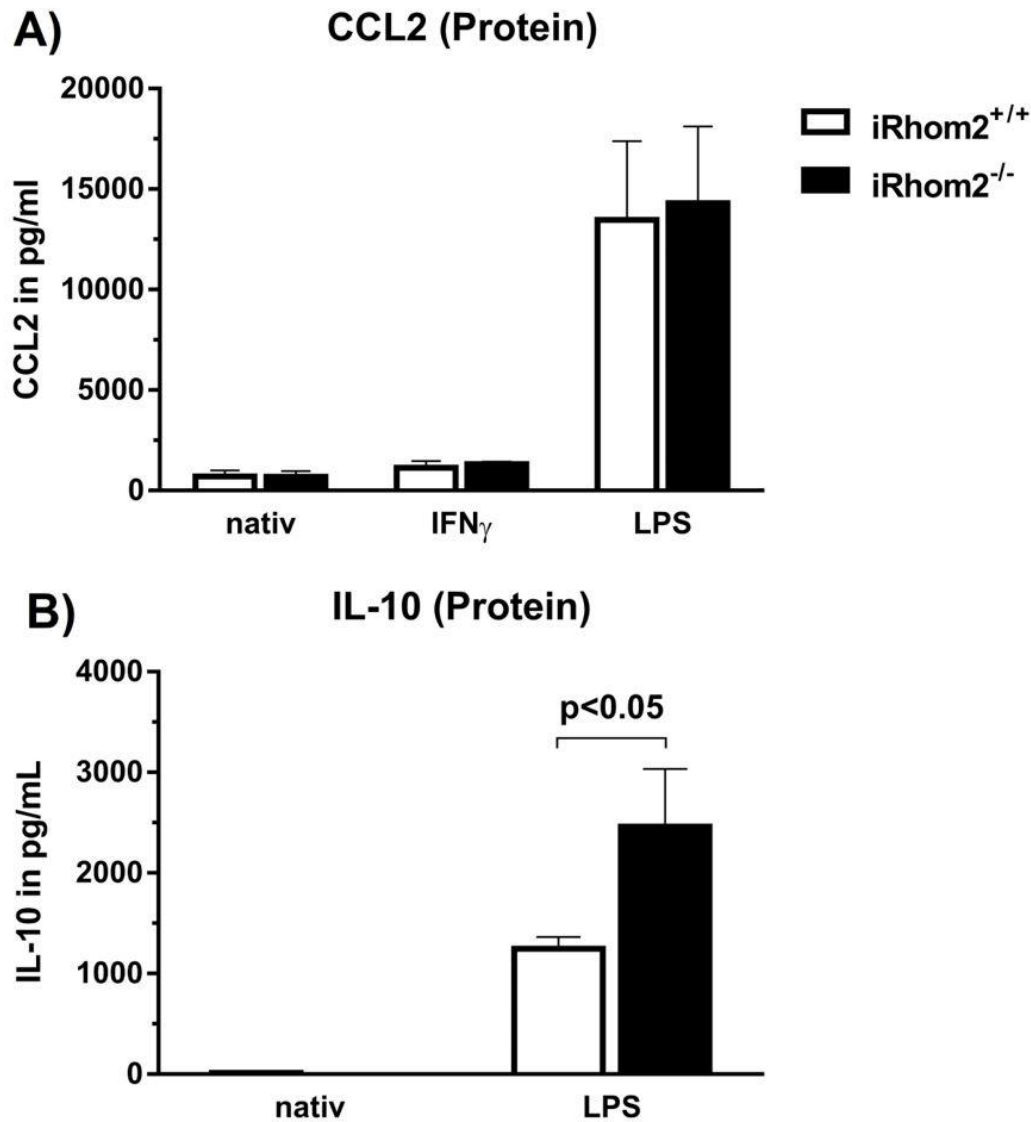


**Abbildung 6: Expression typischer M2 Makrophagen Marker nach Makrophagenpolarisation.** mRNA-Expression muriner iRhom2<sup>+/+</sup> und iRhom2<sup>-/-</sup> BMDM von **A)** Arginase 1, **B)** Mannose Rezeptor, **C)** Fizz1 und **D)** IL-10 unter nativen Bedingungen und nach sechsständiger Behandlung mit IFN- $\gamma$ /LPS (50 ng/ml murines IFN- $\gamma$  + 1  $\mu$ g/ml LPS) oder IL-4 (20 ng/ml). Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angezeigt, Ergebnisse aus 4 individuellen Experimenten. Die Auswertung erfolgte mittels 2<sup>- $\Delta$ Ct</sup> Methode. Hierbei findet ein Abgleich zum Referenzgen (Housekeeping-Gen) statt. Housekeeping Gen: RLP19. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Aufgrund der Unterschiede in der mRNA-Expression von CCL2 und IL-10 nach Stimulation mit IFN- $\gamma$ /LPS wurde im nächsten Schritt die Expression auf Proteinebene unter dem individuellen Stimulanz (IFN- $\gamma$  oder LPS) untersucht. Dazu wurden iRhom2<sup>+/+</sup> und iRhom2<sup>-/-</sup> BMDM am Tag 8 nach der Ausplattierung für 24 Stunden jeweils mit IFN- $\gamma$  oder LPS inkubiert und der Gehalt an CCL2 und IL-10 Protein im Zellüberstand mittels ELISA gemessen.

Die Stimulation mit IFN- $\gamma$  führte in beiden Genotypen zu einem geringen Anstieg des CCL2 Gehalts im Zellüberstand im Vergleich zur Nativ-Behandlung (etwa 1,2-fach in iRhom2<sup>+/+</sup> BMDM und etwa 1,3-fach in iRhom2<sup>-/-</sup> BMDM). Nach der Behandlung mit LPS kam es zu einer deutlichen Steigerung der CCL2 Proteinsekretion (etwa 20-fach in iRhom2<sup>+/+</sup> und in iRhom2<sup>-/-</sup> BMDM, Abbildung **7A**). Es bestand kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des CCL2-Proteingehalts zwischen den beiden Genotypen unter der jeweiligen Behandlung.

Unter nativen Bedingungen war im Zellüberstand von iRhom2<sup>+/+</sup> und iRhom2<sup>-/-</sup> BMDM nur ein sehr geringer Gehalt von IL-10 nachweisbar. Nach der Stimulation mit LPS stieg die IL-10 Sekretion von BMDM beider Genotypen bedeutend an (Abbildung **7B**). In dem Zellüberstand der iRhom2<sup>-/-</sup> BMDM zeigte sich ein signifikant höherer IL-10 Gehalt im Vergleich zu den iRhom2<sup>+/+</sup> BMDM.



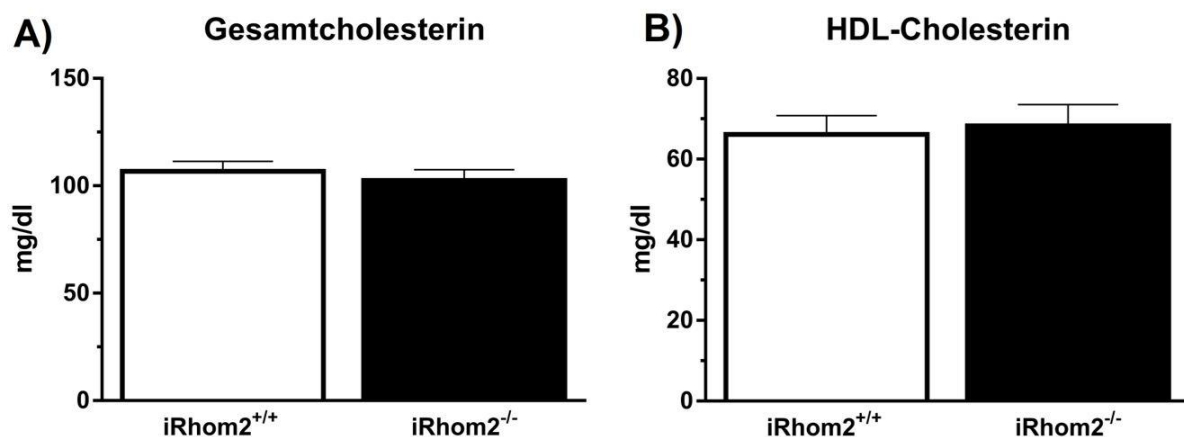
**Abbildung 7: Sekretion von CCL2 und IL-10 von Makrophagen nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  und LPS.** Proteinsekretion (in pg/mL) in murinen iRhom2<sup>+/+</sup> und iRhom2<sup>-/-</sup> BMDM von **A)** CCL2 unter nativen Bedingungen und nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  oder LPS über 24 Stunden und **B)** IL-10 unter nativen Bedingungen und nach Stimulation mit LPS über 24 Stunden. Ergebnisse aus 3 individuellen Experimenten. Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angezeigt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.



#### 4.3. Expression von ABCA1, ABCG1 und SR-B1 in iRhom2-defizienten Makrophagen nach Stimulation mit IFN- $\gamma$

Der Serumgehalt an Gesamtcholesterin und an HDL-Cholesterin unterschied sich nicht zwischen iRhom2<sup>+/+</sup> und iRhom2<sup>-/-</sup> Mäusen unter einer Normalfettdiät (Abbildung 8).

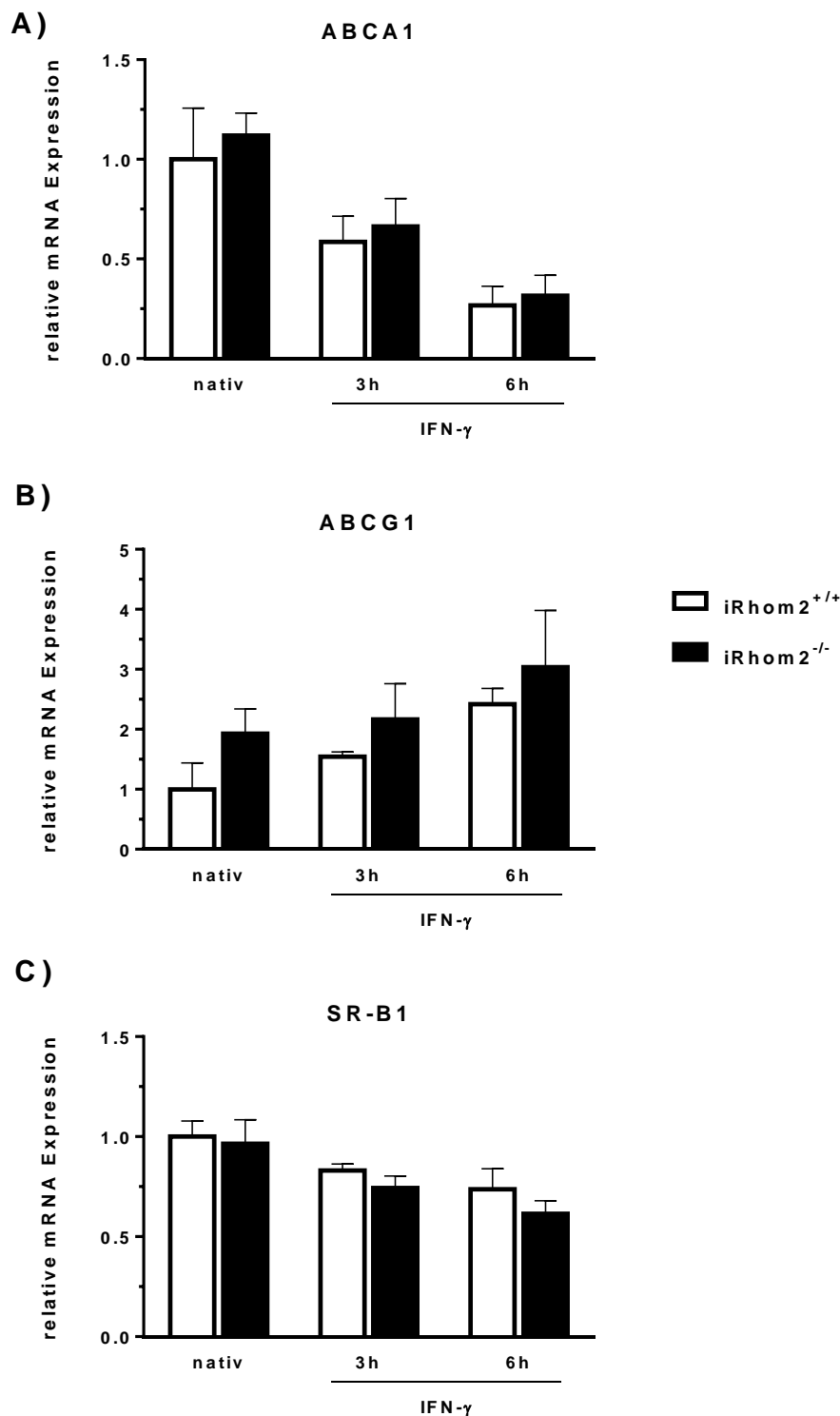
Der Gehalt an Gesamtcholesterin betrug im Serum der iRhom2<sup>+/+</sup> und iRhom2<sup>-/-</sup> Mäuse unter Normalfettdiät etwa 100 mg/dL (Abbildung 8A) und an HDL-Cholesterin etwa 65 mg/dL (Abbildung 8B). Es bestand kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Gesamtcholesterin- oder des HDL-Cholesteringehalts zwischen den beiden Genotypen.



**Abbildung 8: Lipide im Serum iRhom2-defizienter Mäuse.** Serumgehalt (in mg/dL) an **A)** Gesamtcholesterin und **B)** HDL-Cholesterin von männlichen iRhom2<sup>+/+</sup> und iRhom2<sup>-/-</sup> Mäusen unter einer Normalfettdiät. n = 7 pro Gruppe. Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angezeigt.

Um zu untersuchen, ob iRhom2 einen Einfluss auf die mRNA-Expression zentraler Transporter (ABCA1, ABCG1 und SR-B1) des reversen Cholesterintransports in Makrophagen unter inflammatorischen Bedingungen (wie z. B. bei der Atherosklerose) hat, wurden iRhom2<sup>+/+</sup> und iRhom2<sup>-/-</sup> BMDM an Tag 8 nach der Ausplattierung für drei oder sechs Stunden mit IFN- $\gamma$  oder Medium (nativ) behandelt. Die Genexpression der Lipidtransporter ABCA1, ABCG1 und SR-B1 wurde mittels *Real-Time* PCR analysiert.

Nach der Behandlung mit IFN- $\gamma$  nahm die Expression von ABCA1 in BMDM beider Genotypen gegenüber der Nativkontrolle ab (Abbildung **9A**). Die Expression von ABCG1 nahm in BMDM beider Genotypen nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  gering zu (Abbildung **9B**). Unter Stimulation mit IFN- $\gamma$  ließ sich eine geringe Abnahme der mRNA-Expression von SR-B1 in BMDM beider Genotypen beobachten (Abbildung **9C**). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen hinsichtlich der Genexpression von ABCA1, ABCG1 oder SR-B1 unter nativen Bedingungen oder nach der jeweiligen Stimulation.

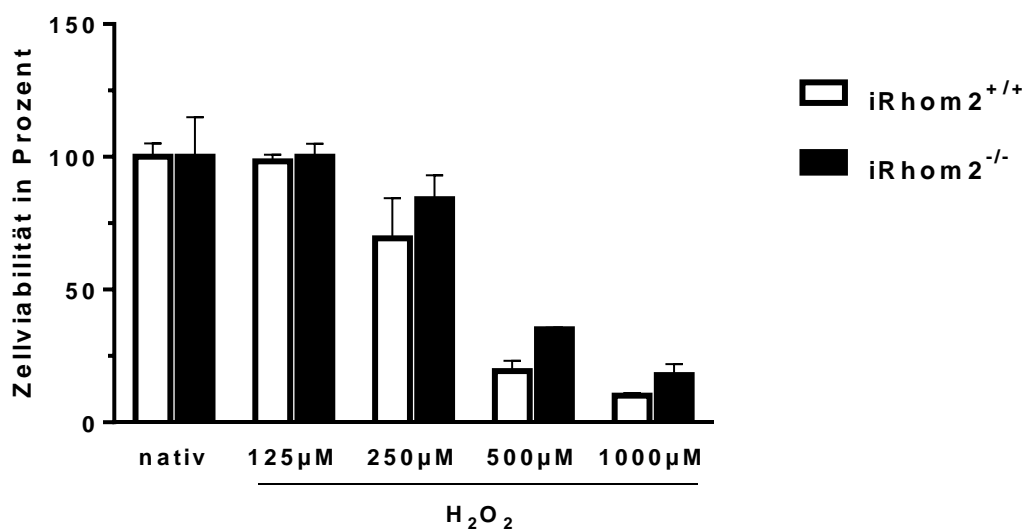


**Abbildung 9: mRNA-Expression der Lipidtransporter in Makrophagen unter nativen Bedingungen und nach Stimulation mit IFN- $\gamma$ .** Relative mRNA-Expression muriner BMDM für **A) ABCA1**, **B) ABCG1** und **C) SR-B1** unter nativen Bedingungen und nach 3 oder 6 Stunden Behandlung mit IFN- $\gamma$  (100 U/ml). Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angezeigt, Ergebnisse aus 4 individuellen Experimenten. Die Auswertung erfolgte mit der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode. Housekeeping Gen: RLP19. Die relative mRNA-Expression beschreibt die Expression in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle (nativ) von iRhom2<sup>+/+</sup> BMDM.

#### 4.4. Zellviabilität von iRhom2-defizienten Makrophagen unter oxidativem Stress

Die Auswirkung einer iRhom2-Defizienz auf die Zellviabilität von Makrophagen unter  $\text{H}_2\text{O}_2$  Exposition wurde an BMDM untersucht, die sieben Tage nach der Ausplattierung für sechs Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt wurden. Im anschließenden MTT-Test wurde der Gehalt des Farbstoffes Formazan photometrisch gemessen. Die Eigenschaft der Zellen MTT in Formazan reduzieren zu können, ist ein Maß für die metabolische Aktivität und ist assoziiert mit der Zellviabilität.

Ab einer Konzentration von  $250\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  verminderte sich der Anteil lebender BMDM zunehmend. Bei einer  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration von  $500\mu\text{M}$  waren etwa 20% der Zellen im Vergleich zum Ausgangsniveau (nativ) vital (Abbildung 10). Dabei zeigten iRhom2<sup>-/-</sup> BMDM einen Trend zu einer verbesserten Zellviabilität im Vergleich zu iRhom2<sup>+/+</sup> BMDM. Dieser Unterschied wies jedoch keine statistische Signifikanz auf (Zellviabilität: 35% vs. 19% unter  $500\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ).



**Abbildung 10: Zellviabilität von iRhom2-defizienten Makrophagen unter Behandlung mit steigenden Konzentrationen an  $\text{H}_2\text{O}_2$ .** Dargestellt ist die Zellviabilität muriner iRhom2<sup>+/+</sup> und iRhom2<sup>-/-</sup> BMDM nach sechsstündiger Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  bezogen auf den Wert der unbehandelten Nativ-Kontrolle (in Prozent). Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, n = 4 individuelle Experimente.

## 5. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, als Pilotstudie die Auswirkungen einer iRhom2-Defizienz auf die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften von Makrophagen unter atherogenen Stimuli zu beschreiben. Dabei wurde die Signalachse aus iRhom2, TACE und TNF- $\alpha$  sowie die Sekretion des löslichen TNF- $\alpha$  untersucht. Zudem wurden die Eigenschaften von iRhom2-defizienten Makrophagen nach Polarisierung in M1 und M2 Makrophagen anhand typischer M1 und M2 Marker untersucht. Aufgrund des atheroprotektiven Potenzials der am Cholesterinstoffwechsel beteiligten Transporter ABCA1, ABCG1 und SR-B1 wurde deren Expression in Makrophagen unter der Einwirkung von IFN- $\gamma$  bestimmt. Abschließend wurde das Überleben der iRhom2-defizienten Makrophagen unter oxidativem Stress analysiert.

Makrophagen haben eine zentrale Rolle in der Atherogenese und stellen die vorrangige Immunzelle in atherosklerotischen Plaques dar.<sup>99</sup> In der vorliegenden Arbeit wurden die Experimente mithilfe von *bone marrow derived macrophages* (BMDM) aus iRhom2<sup>+/+</sup> und iRhom2<sup>-/-</sup> Mäusen durchgeführt. BMDM reifen mit Hilfe von M-CSF, welches auch in atherosklerotischen Plaques zu finden ist.<sup>100</sup> Somit wird ein Stimulus angewendet, der auch in der Atherogenese eine Rolle spielt.<sup>31,101</sup> Ein anderes häufig in Experimenten verwendetes Makrophagenmodell sind die Peritonealmakrophagen. Diese werden *in vivo* aus dem Peritoneum gewonnen, indem man zuvor durch Injektion einer Substanz eine Peritonitis verursacht. Folglich stammen die Makrophagen aus einem inflammatorischen Umfeld, was sich auf deren funktionelle Eigenschaften auswirkt. Peritonealmakrophagen weisen im Vergleich zu BMDM eine höhere Phagozytoserate auf und produzieren mehr reaktive Sauerstoffspezies (ROS).<sup>102</sup> Beide Makrophagenmodelle sind in der Atheroskleroseforschung etabliert. Da BMDM besonders geeignet sind, um den Einfluss inflammatorischer Stimuli zu untersuchen,<sup>103</sup> wurden in dieser Arbeit BMDM gewählt.

## 5.1. Interpretation der Ergebnisse

### 5.1.1. Expression von iRhom2, TACE und TNF- $\alpha$ in Makrophagen unter atherogenen Stimuli

Die Hauptfragestellung der Arbeit war es, zu untersuchen, ob es Unterschiede in der Sekretion des Zytokins TNF- $\alpha$  zwischen iRhom2-defizienten und iRhom2-suffizienten Makrophagen als Antwort auf atherogene Stimuli gibt. Dazu wurde zunächst die mRNA-Expression der Gene für iRhom2, TACE und TNF- $\alpha$  in Makrophagen unter atherogenen Stimuli untersucht und daraufhin die Proteinsekretion des Zytokins TNF- $\alpha$  durch Makrophagen in Antwort auf atherogene Stimuli bestimmt.

Analog zu Adrain et al.<sup>84</sup> konnte unter der Einwirkung von LPS ein deutlicher Anstieg der iRhom2 mRNA-Expression in iRhom2-suffizienten Makrophagen und eine geringfügige Induktion der mRNA-Expression von TACE sowie ein deutlicher Anstieg von TNF- $\alpha$  in beiden Genotypen beobachtet werden.

Die Induktion von iRhom2 als Antwort auf einen inflammatorischen Reiz legt nahe, dass die Rhomboid Protease an einem positiven Feedback der LPS-induzierten entzündlichen Reaktion beteiligt ist. In den Arbeiten von Adrain et al. und McIlwain et al. zeigten sich in der mRNA-Expression von TACE zwischen iRhom2<sup>+/+</sup> und iRhom2<sup>-/-</sup> Makrophagen nativ und nach LPS-Stimulation keine signifikanten Unterschiede.<sup>84,104</sup> Dies könnte darauf hinweisen, dass die Regulation von TACE durch iRhom2 nicht auf mRNA-Ebene, sondern posttranslational stattfindet. Adrain et al. konnten die Abwesenheit von reifem TACE an der Zelloberfläche von iRhom2<sup>-/-</sup> Makrophagen zeigen.<sup>84</sup> Die Genexpression von TACE scheint folglich kein Maß für die Aktivität von TACE zu sein.

Adrain et al. und McIlwain et al. sahen eine starke Induktion der mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  nach LPS-Stimulation in iRhom2<sup>+/+</sup> und iRhom2<sup>-/-</sup> Makrophagen.<sup>84,104</sup> LPS als potenter inflammatorischer Stimuli induziert die mRNA-Expression des Zytokins TNF- $\alpha$ . In der TNF- $\alpha$  Proteinsekretion der iRhom2<sup>+/+</sup> und iRhom2<sup>-/-</sup> Makrophagen zeigte sich in der vorliegenden Arbeit analog zu den Arbeiten von Adrain et al. und McIlwain et al. nach der Stimulation mit LPS ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen: Makrophagen mit einer iRhom2-Defizienz sezernieren deutlich

weniger TNF- $\alpha$  in Antwort auf LPS als iRhom2-suffiziente Makrophagen bedingt durch das verminderte TNF- $\alpha$  *Shedding* aufgrund des fehlenden Einflusses von iRhom2 auf TACE.

Durch die Reproduzierbarkeit der Versuche von Adrain et al. und McIlwain et al. konnte das in der vorliegenden Arbeit verwendete iRhom2-defiziente Zellsystem validiert werden.

Unter der Behandlung mit IFN- $\gamma$  und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression von iRhom2 in den iRhom2-suffizienten Makrophagen beobachtet. Keine Veränderung zeigte sich hinsichtlich der mRNA-Expression von TACE in iRhom2-suffizienten und iRhom2-defizienten Makrophagen nach der Stimulation mit IFN- $\gamma$  oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die Behandlung mit IFN- $\gamma$  oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte zu einer Induktion der mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  in beiden Genotypen. Ein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression von TACE und TNF- $\alpha$  zwischen den beiden Genotypen wurde nicht beobachtet. IFN- $\gamma$  und das Sauerstoff-Radikal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sind an den inflammatorischen und oxidativen Prozessen in der Atherosklerose beteiligt. In der atherosklerotischen Läsion wird IFN- $\gamma$  vorrangig von T-Zellen und natürlichen Killerzellen freigesetzt.<sup>30</sup> Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> werden vorrangig durch Makrophagen produziert.<sup>28,105</sup>

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten daher darauf hin, dass in der Atherogenese vermehrt iRhom2 in Makrophagen (insbesondere in Plaquemakrophagen) exprimiert wird.

Die Behandlung mit IFN- $\gamma$  und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte zu einem geringeren Gehalt an TNF- $\alpha$ -Protein im Zellüberstand von iRhom2-defizienten BMDM im Vergleich zu iRhom2-suffizienten BMDM. Eine Runterregulierung von iRhom2 in Makrophagen in atherosklerotischen Plaques könnte somit zu einer verminderten Freisetzung von TNF- $\alpha$  im atherosklerotischem Plaquemilieu führen. Dadurch könnten TNF- $\alpha$  assoziierte Prozesse, wie z. B. Apoptose, die Induktion von Adhäsionsmolekülen sowie die Proliferation von glatten Muskelzellen, reduziert werden und somit möglicherweise die Atherogenese abgeschwächt werden.

### 5.1.2. Expression typischer M1 und M2 Makrophagen Marker in iRhom2-defizienten Makrophagen

Die Genexpression von typischen M1 Makrophagen Markern wie IL1- $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  und iNOS war in iRhom2-defizienten Makrophagen vergleichbar mit den iRhom2-suffizienten Makrophagen nach Polarisierung mittels IFN- $\gamma$ /LPS Stimulation. iRhom2-defiziente Makrophagen zeigten eine höhere Genexpression von dem Chemokin CCL2, welches eine bedeutende Rolle bei der Rekrutierung von Monozyten in atherosklerotischen Plaques spielt,<sup>21,106</sup> nach Stimulation mit IFN- $\gamma$ /LPS im Vergleich zu iRhom2-suffizienten Makrophagen. Auf Proteinebene ließ sich hingegen kein Unterschied mehr in der CCL2-Expression zwischen den beiden Genotypen nachweisen, sodass kein vermehrtes CCL2-*Signaling* durch die iRhom2-Defizienz zu erwarten ist. Die Genexpression typischer M2 Marker wie Arginase 1 und Fizz1 war nach der Stimulation mit IL-4 durch eine iRhom2-Defizienz nicht verändert.

Ähnliche Ergebnisse zur Makrophagenpolarisation zeigt die Arbeit von Barnette et al.<sup>107</sup>, in der BMDM aus iRhom2<sup>-/-</sup> und iRhom2<sup>+/+</sup> Mäusen (hier mit einem SV/129 Hintergrund) mit IFN- $\gamma$ /LPS oder IL-4 zu einem M1 oder M2 Makrophagen Phänotyp polarisiert wurden. Hinsichtlich der mRNA-Expression der M1 Marker IL1- $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  konnte, wie in der vorliegenden Arbeit, kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen nachgewiesen werden. Es wurde eine erhöhte mRNA-Expression von IL-10 (nach Stimulation mit IFN- $\gamma$ /LPS) und Arginase 1 (nach Stimulation mit IL-4) in iRhom2-defizienten Makrophagen im Vergleich zu den Wildtyp Makrophagen nach Polarisation festgestellt.<sup>107</sup> Arginase 1 wird in einer zeitabhängigen Weise exprimiert, sodass möglicherweise die im Vergleich zur vorliegenden Arbeit längere Inkubationszeit von 16 Stunden den Unterschied hinsichtlich der Arginase 1-Expression erklären könnte.<sup>108</sup> Weitere methodische Unterschiede zwischen der Arbeit von Barnette et al.<sup>107</sup> und der vorliegenden Arbeit stellen der genetischen Hintergrund der Mäuse (SV/129 versus C57BL/6J) sowie die Tatsache dar, dass in der Arbeit von Barnette et al. keine Wurfgeschwister, sondern ein kommerziell erworbener SV/129 Wildtyp-Mausstamm als Kontrolle eingesetzt wurden. Trotz dieser Unterschiede zeigen die beiden Arbeiten übereinstimmend eine höhere Genexpression an IL-10 durch iRhom2-defiziente Makrophagen nach der Behandlung mit IFN- $\gamma$ /LPS im Vergleich zu iRhom2-suffizienten Makrophagen. In der vorliegenden Arbeit konnte



über die mRNA-Ebene hinaus eine erhöhte Proteinsekretion von IL-10 (nach der Stimulation mit LPS) in iRhom2-defizienten Makrophagen im Vergleich zu den iRhom2-suffizienten Makrophagen demonstriert werden. TNF- $\alpha$  induziert die Synthese von IL-10 über die zwei Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 in Monozyten.<sup>109–112</sup> Da IL-10 wiederum die Produktion von TNF- $\alpha$  inhibiert,<sup>113</sup> wird dieser Signalweg als ein negativer Feedbackmechanismus für die TNF- $\alpha$  Synthese gesehen.<sup>109</sup> Ein Grund für die vermehrte Expression von IL-10 in iRhom2-defizienten Zellen nach Aktivierung durch inflammatorische Mediatoren könnte die vermehrte Aktivierung des TNFR2 sein. Es wurde eine Korrelation der TNFR2-Expression und IL-10 Freisetzung in verschiedenen Zellen (humane B-Lymphozyten, murine Mikrogliazellen) beschrieben.<sup>114,115</sup> TNFR2 wird in Immunzellen, Endothelzellen, Kardiomyozyten und Gliazellen exprimiert.<sup>116</sup> Über TNFR2 werden NF- $\kappa$ B und verschiedene Kinasen aktiviert und neben inflammatorischen auch anti-inflammatorische und regenerative Signalwege induziert.<sup>116</sup> Während inflammatorischer Prozesse wird die Expression von TNFR2 induziert und könnte als ein negativer Feedbackmechanismus funktionieren, der dazu beiträgt, Zellschäden zu minimieren, die durch die Aktivierung von TNFR1 hervorgerufen wurden.<sup>114</sup> TNFR2 wird effektiv nur durch membrangebundenes TNF- $\alpha$  (mTNF- $\alpha$ ) aktiviert.<sup>68</sup> Da in den iRhom2-defizienten Makrophagen kein effektives *Shedding* des membrangebundenen TNF- $\alpha$  und der TNF-Rezeptoren (TNFR) stattfindet, kann es (zumindest intermittierend) zu einem vermehrten Gehalt an membrangebundenen TNF- $\alpha$  und den TNFR auf der Zelloberfläche kommen. Anhand von TACE-defizienten Makrophagen konnten Nicolaou et al. eine Akkumulierung von membrangebundenen TNF- $\alpha$  und TNFR nachweisen; dies führte zu einer verstärkten Aktivierung der TNFR2 vermittelten Signalwege.<sup>117</sup> Daher kann spekuliert werden, dass der gesteigerte IL-10 Gehalt in iRhom2-defizienten Makrophagen auf die membrangebundene TNF- $\alpha$ -TNFR2-Achse zurückzuführen ist. IL-10 wirkt protektiv auf die Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen.<sup>118</sup> So konnte im Mausmodell (LDL-Rezeptor-Knockout) gezeigt werden, dass eine IL-10-Defizienz zu einer vergrößerten Plaquelast, einer vermehrten Akkumulation von Makrophagen und einem verminderten Kollagengehalt in den atherosklerotischen Plaques führte.<sup>118</sup>

In der Studie von Chaohui et al. wurde die Genexpression und Proteinsekretion von TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$  nach der Stimulation mit oxLDL in einer murinen Makrophagen-

ähnlichen Zelllinie (RAW 264.7) und einer humanen monozytären Zelllinie (THP-1) untersucht.<sup>119</sup> Die Aktivität von iRhom2 wurde durch *small interfering* RNA (siRNA) reduziert. In den iRhom2-defizitären Zellen waren sowohl Genexpression als auch Proteinsekretion der inflammatorischen Zytokine nach der Behandlung mit oxLDL im Vergleich zu den iRhom2-kompetenten Zellen erniedrigt. In den Makrophagen wurde nach der Stimulation mit oxLDL die Produktion von ROS bestimmt, die in den iRhom2-defizienten Makrophagen geringer war als in den iRhom2-suffizienten Makrophagen.<sup>119</sup> Die Studie gibt wie die vorliegende Arbeit Hinweise darauf, dass iRhom2 einen Einfluss auf die Atherogenese zu haben scheint und damit als therapeutisches Target in Frage kommen könnte.

Lu et al. untersuchten in ihrer Studie die Rolle von iRhom2 in dem LPS-induziertem Multiorganversagen und kamen zu dem Ergebnis, dass eine iRhom2-Defizienz die Expression von TLR4 inhibiert und folglich zu einer Reduktion des proinflammatorischen Potenzials führt. In Herzmuskelzellen aus iRhom2<sup>-/-</sup> Mäusen wurde die Expression proinflammatorischer Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-6 und TNF- $\alpha$ ) durch die Stimulation mit LPS schwächer induziert als in den iRhom2-suffizientem Herzgewebe.<sup>120</sup> Die Studie sieht iRhom2 als Regulator der LPS-induzierten Entzündung auf Basis einer TLR4-Aktivierung. Wenngleich in der vorliegenden Arbeit mit einem anderen Zelltyp gearbeitet wurde, ergeben sich keine Hinweise für eine generelle Inhibition proinflammatorischer Zytokine durch eine iRhom2-Defizienz. In dieser Arbeit lässt sich eine spezifische Hemmung von TNF- $\alpha$  darstellen.

Zusammenfassend exprimieren iRhom2-defiziente Makrophagen typische M1 und M2 Makrophagen Marker nach Polarisierung. iRhom2-defiziente Makrophagen sezernieren weniger TNF- $\alpha$ , jedoch vermehrt IL-10 in einem inflammatorischen Milieu, was auf einen atheroprotektiven Effekt hinweist. Eine kompensatorische Überexpression anderer M1 Marker als Ausgleich für die reduzierte TNF- $\alpha$  Sekretion war nicht nachzuweisen.

### 5.1.3. Genexpression von ABCA1, ABCG1 und SR-B1 nativ und nach Stimulation mit IFN- $\gamma$

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter einer Standarddiät die iRhom2-Defizienz keinen Einfluss auf den Gesamt- und HDL-Cholesterin-Gehalt im Serum der Mäuse hat.

Des Weiteren wurde die Genexpression der Lipidtransporter ABCA1, ABCG1 und SR-B1 in iRhom2-defizienten Makrophagen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die iRhom2-Defizienz keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von ABCA1, ABCG1 und SR-B1 in Makrophagen hat. Damit geben die Daten erste Hinweise dafür, dass eine iRhom2-Defizienz keinen Einfluss auf den Vorgang des Cholesterin-Efflux in Makrophagen hat.

ABCA1, ABCG1 und SR-B1 werden über den Leber-X-Rezeptor alpha (LXR- $\alpha$ ) reguliert.<sup>121,122</sup> Für ABCA1 wurde bereits eine Abnahme der Genexpression nach der Stimulation mit IFN- $\gamma$  beschrieben.<sup>123</sup> Die Expression von ABCA1 ist streng reguliert und wird hauptsächlich posttranskriptional gesteuert.<sup>124</sup> Daher wäre eine Ergänzung der Daten um die Proteinexpression von ABCA1 für zukünftige Untersuchungen sinnvoll.

Die Beeinflussung der *ATP-binding-cassette* Transporter (ABC-Transporter) in Monozyten und Makrophagen durch TNF- $\alpha$  ist bis dato noch nicht vollständig untersucht. Voloshyna et al. konnten in Monozyten einen signifikanten Rückgang der ABCA1 mRNA-Expression nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  beobachten. Die mRNA-Expression von ABCG1 blieb dabei unverändert.<sup>125</sup> In J774 murinen Makrophagen fanden Khovidhunkit et al. ebenso eine verminderte ABCA1-mRNA-Expression nach TNF- $\alpha$ -Exposition. Zusätzlich war die mRNA-Expression von ABCG1 nach Stimulation in diesem Zelltyp vermindert.<sup>126</sup> In murinen Peritonealmakrophagen führte die Stimulation mit TNF- $\alpha$  zu keiner Veränderung oder einem Anstieg der Expression von ABCA1 mRNA und Protein.<sup>127,128</sup> Zusammenfassend zeigen diese Studien einen unterschiedlichen Effekt von TNF- $\alpha$  auf die Expression von ABCA1 und ABCG1 in den verschiedenen Zelltypen. Möglichkeiten zur weiteren Evaluierung der Bedeutung der iRhom2-Defizienz auf die Expression der Lipidtransporter stellen die Quantifizierung

von ABCA1, ABCG1 und SR-B1 auf Proteinebene sowie die Evaluierung des Effektes auf den Cholesterin-Efflux dar.

#### 5.1.4. Zellviabilität von iRhom2-defizienten BMDM unter oxidativem Stress

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass sich die Zellviabilität iRhom2-defizienter und iRhom2-suffizienter Makrophagen unter oxidativem Stress nicht statistisch signifikant unterscheidet. Es bestand jedoch ein Trend zu einer besseren Zellviabilität in iRhom2-defizienten Makrophagen.

Es wäre durchaus vorstellbar, dass iRhom2-defiziente Makrophagen resistenter gegenüber dem Zelltod wären, da die verminderte Freisetzung von löslichem TNF- $\alpha$  durch iRhom2-defiziente Makrophagen durch eine geringere Aktivierung des Tumornekrosefaktor-Rezeptors Typ 1 (TNFR1) zu einer reduzierten Induktion von Apoptose führen könnte.<sup>69,70</sup> In der Studie von Nicolaou et al. wurde eine verminderte Apoptose in TACE-hypomorphen BMDM nach der Stimulation mit Staurosporin und Cycloheximid beschrieben.<sup>117</sup> Nicolau et al. stellen in ihrer Arbeit die Hypothese auf, dass die verminderte Apoptose auf eine verminderte Aktivität des TNFR1 zurückführt.<sup>117</sup> In der atherosklerotischen Plaque könnte die durch eine iRhom2-Defizienz bedingte verminderte Apoptose der glatten Muskelzellen und Makrophagen atheroprotektiv wirken, indem apoptotische Zellen durch effiziente Efferozytose der vitalen Makrophagen abgebaut werden. Ist die Efferozytose z. B. durch ein vermehrtes Absterben von Makrophagen und anderen Zellen der atherosklerotischen Plaques beeinträchtigt, destabilisiert die Zellmembran der apoptotischen Zellen und gibt den intrazellulären Inhalt, bestehend aus Proteasen und Zytokinen, frei und initiiert somit inflammatorische Signalwege.<sup>129,130</sup> Des Weiteren könnte eine verminderte Apoptose von glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix die Wahrscheinlichkeit einer Plaque-Ruptur vermindern.

## 5.2. Limitationen

Bei der Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit müssen einige Limitationen berücksichtigt werden. Die vorliegende Arbeit umfasst das Teilprojekt einer explorativen Charakterisierung der iRhom2-defizienten Makrophagen unter atherogenen Stimuli im Rahmen einer umfassenden Analyse zur Auswirkung von iRhom2 auf die Atherosklerose. Sie ist demnach als eine Pilotstudie zu bewerten, die Anlass zu weiterführenden Studien gibt.

In den Experimenten wurden ausschließlich Primärzellen verwendet, deren Herstellung material-, arbeits- und zeitintensiv ist. Nicht eindeutige Ergebnisse sollten daher in Folgestudien mit höheren Fallzahlen weiter untersucht und Ergebnisse der Genexpression um die Analyse der Proteinexpression ergänzt werden.

Mäuse und murine Makrophagen werden schon seit vielen Jahren in der medizinischen Grundlagenforschung zur Atherosklerose verwendet. Das Mausmodell bietet viele Vorteile, wie geringe Zucht- und Haltungskosten.<sup>131</sup> Es gilt jedoch zu berücksichtigen, dass Unterschiede zwischen dem Immunsystem von Mäusen und Menschen bestehen und somit die Übertragbarkeit der Erkenntnisse aus den Studien mit Mausmodellen auf den Menschen limitiert ist.<sup>132</sup> Zum Beispiel unterscheiden sich die Monozyten Subpopulationen sowie die Marker von M1 und M2 Makrophagen zwischen Maus und Mensch.<sup>58</sup>

### 5.3. Fazit und Ausblick

Atherogene Stimuli induzieren die Expression von iRhom2 in Makrophagen. Die iRhom2-defizienten Makrophagen scheinen ein geringeres inflammatorisches Potenzial unter atherogenen Stimuli aufzuweisen, indem sie weniger TNF- $\alpha$  sezernieren und vermehrt anti-inflammatorisches IL-10-exprimieren. Es gibt keinen Hinweis auf eine kompensatorische Erhöhung der Expression anderer inflammatorischer Zytokine in iRhom2-defizienten Makrophagen, um die verminderte TNF- $\alpha$ -Sekretion auszugleichen. Das geringere inflammatorische Potenzial iRhom2-defizienter Makrophagen deutet auf einen atheroprotektiven Effekt der iRhom2-Defizienz hin. Die Modulation von iRhom2 sollte daher als eine potenzielle therapeutische Strategie in der Atheroskleroseforschung weiterverfolgt werden.

#### 5.4. Perspektiven

Die aktuellen Daten zur Bedeutung einer iRhom2-Defizienz in der Atherosklerose bestehen aus *in vitro*-Studien.

Aktuell liegen noch keine *in vivo*-Atherosklerose-Daten zur iRhom2-Defizienz vor. Dies wird aktuell durch unsere Arbeitsgruppe untersucht. Dazu werden Mäuse mit einer Defizienz für den LDL-Rezeptor (LDLR<sup>-/-</sup>) mit zusätzlicher Defizienz für iRhom2 für einige Wochen mit einer fettreichen Diät gefüttert, um Atherosklerose zu initiieren. Anschließend werden Plauegröße und -komposition sowie der Gehalt und Phänotyp der Plauemakrophagen in den Aortas der Mäuse untersucht. Es kann spekuliert werden, dass das in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene geringere inflammatorische Potenzial iRhom2-defizienter Makrophagen *in vivo* zu einer abgeschwächten Atherogenese führt.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233–241.
2. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *The Lancet*. 2006;367:1747–1757.
3. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*. 1994;344:1383–1389.
4. Weisman SM, Graham DY. Evaluation of the benefits and risks of low-dose aspirin in the secondary prevention of cardiovascular and cerebrovascular events. *Arch Intern Med*. 2002;162:2197–2202.
5. Law MR, Morris JK, Wald NJ. Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies. *BMJ*. 2009;338:b1665.
6. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy--I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. Antiplatelet Trialists' Collaboration. *BMJ*. 1994;308:81–106.
7. Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators, Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med*. 2000;342:145–153.
8. Bayturan O, Kapadia S, Nicholls SJ, Tuzcu EM, Shao M, Uno K, Shreevatsa A, Lavoie AJ, Wolski K, Schoenhagen P, Nissen SE. Clinical Predictors of Plaque Progression Despite Very Low Levels of Low-Density Lipoprotein Cholesterol. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;55:2736–2742.
9. Libby P. The Forgotten Majority: Unfinished Business in Cardiovascular Risk Reduction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;46:1225–1228.
10. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*. 2006;6:508–519.
11. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in Atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;54:2129–2138.
12. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *The Lancet*. 2010;375:132–140.
13. Ridker PM, Cannon CP, Morrow D, Rifai N, Rose LM, McCabe CH, Pfeffer MA, Braunwald E, Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-



- Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 (PROVE IT-TIMI 22) Investigators. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl J Med*. 2005;352:20–28.
14. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, Fonseca F, Nicolau J, Koenig W, Anker SD, Kastelein JJP, Cornel JH, Pais P, Pella D, Genest J, Cifkova R, Lorenzatti A, Forster T, Kobalava Z, Vida-Simiti L, Flather M, Shimokawa H, Ogawa H, Dellborg M, Rossi PRF, Troquay RPT, Libby P, Glynn RJ, CANTOS Trial Group. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med*. 2017;377:1119–1131.
  15. Ross R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *New England Journal of Medicine*. 1999;340:115–126.
  16. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1994;89:2462–2478.
  17. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:1512–1531.
  18. McGill HC, McMahan CA, Zieske AW, Tracy RE, Malcom GT, Herderick EE, Strong JP. Association of Coronary Heart Disease Risk Factors With Microscopic Qualities of Coronary Atherosclerosis in Youth. *Circulation*. 2000;102:374–379.
  19. Williams KJ, Tabas I. The Response-to-Retention Hypothesis of Early Atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1995;15:551–561.
  20. Miller YI, Choi S-H, Wiesner P, Fang L, Harkewicz R, Hartvigsen K, Boullier A, Gonen A, Diehl CJ, Que X, Montano E, Shaw PX, Tsimikas S, Binder CJ, Witztum JL. Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity. *Circ Res*. 2011;108:235–248.
  21. Mestas J, Ley K. Monocyte-Endothelial Cell Interactions in the Development of Atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2008;18:228–232.
  22. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: The Road Ahead. *Cell*. 2001;104:503–516.
  23. Hort W. Pathologie des Endokards, der Kranzarterien und des Myokards. 1st ed. Heidelberg: Springer; 2000.

24. Lauffenburger DA, Zigmond SH. Chemotactic factor concentration gradients in chemotaxis assay systems. *J Immunol Methods*. 1981;40:45–60.
25. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, Garin A, Liu J, Mack M, van Rooijen N, Lira SA, Habenicht AJ, Randolph GJ. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 2007;117:185–194.
26. Woollard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol*. 2010;7:77–86.
27. Murphy JE, Tedbury PR, Homer-Vanniasinkam S, Walker JH, Ponnambalam S. Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. *Atherosclerosis*. 2005;182:1–15.
28. Moore K, Sheedy F, Fisher E. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:709–721.
29. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473:317–325.
30. Harvey EJ, Ramji DP. Interferon-gamma and atherosclerosis: pro- or anti-atherogenic? *Cardiovasc Res*. 2005;67:11–20.
31. Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovascular Research*. 2008;79:360–376.
32. Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb*. 1991;11:1223–1230.
33. Gomez D, Owens GK. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2012;95:156–164.
34. Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *N Engl J Med*. 2013;368:2004–2013.
35. Tabas I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2255–2264.
36. Yvan-Charvet L, Wang N, Tall AR. Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:139–143.
37. Phillips MC. Molecular Mechanisms of Cellular Cholesterol Efflux. *J Biol Chem*. 2014;289:24020–24029.

38. Tall AR. Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. *J Intern Med.* 2008;263:256–273.
39. Cochain C, Zerneck A. Macrophages and immune cells in atherosclerosis: recent advances and novel concepts. *Basic Res Cardiol.* 2015;110:34.
40. Swirski FK, Libby P, Aikawa E, Alcaide P, Luscinskas FW, Weissleder R, Pittet MJ. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest.* 2007;117:195–205.
41. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJM, Liu Y-J, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood.* 2010;116:e74–e80.
42. Hristov M, Weber C. Differential role of monocyte subsets in atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2011;106:757–762.
43. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang S-Y, Senechal B, Puel A, Biswas SK, Moshous D, Picard C, Jais J-P, D’Cruz D, Casanova J-L, Trouillet C, Geissmann F. Human CD14<sup>dim</sup> Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity.* 2010;33:375–386.
44. Stansfield BK, Ingram DA. Clinical significance of monocyte heterogeneity. *Clinical and Translational Medicine.* 2015;4:5.
45. Hewing B, Fisher EA. Preclinical mouse models and methods for the discovery of the causes and treatments of atherosclerosis. *Expert Opinion on Drug Discovery.* 2012;7:207–216.
46. Colin S, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. Macrophage phenotypes in atherosclerosis. *Immunol Rev.* 2014;262:153–166.
47. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:953–964.
48. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:23–35.
49. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 2008;13:453–461.
50. Sugiyama S, Okada Y, Sukhova GK, Virmani R, Heinecke JW, Libby P. Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am J Pathol.* 2001;158:879–891.

51. Boyle JJ, Weissberg PL, Bennett MR. Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes macrophage-induced vascular smooth muscle cell apoptosis by direct and autocrine mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1553–1558.
52. Newby AC. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res.* 2006;69:614–624.
53. Liberale L, Dallegri F, Montecucco F, Carbone F. Pathophysiological relevance of macrophage subsets in atherogenesis. *Thromb Haemost.* 2017;117:7–18.
54. Mantovani A, Garlanda C, Locati M. Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:1419–1423.
55. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:71–109.
56. Feig JE, Vengrenyuk Y, Reiser V, Wu C, Statnikov A, Aliferis CF, Garabedian MJ, Fisher EA, Puig O. Regression of atherosclerosis is characterized by broad changes in the plaque macrophage transcriptome. *PLoS ONE.* 2012;7:e39790.
57. Stöger JL, Gijbels MJJ, van der Velden S, Manca M, van der Loos CM, Biessen EAL, Daemen MJAP, Lutgens E, de Winther MPJ. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2012;225:461–468.
58. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege J-L, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Ginderachter JA, Vogel SN, Wynn TA. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity.* 2014;41:14–20.
59. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004;25:677–686.
60. Medzhitov R, Janeway C. Innate immunity. *N Engl J Med.* 2000;343:338–344.
61. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 2007;449:819–826.
62. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:499–511.
63. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11:373–384.

64. Alexander C, Rietschel ETh. Invited review: Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *Journal of Endotoxin Research*. 2001;7:167–202.
65. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*. 1997;385:729–733.
66. Moreira DM, da Silva RL, Vieira JL, Fattah T, Lueneberg ME, Gottschall CAM. Role of Vascular Inflammation in Coronary Artery Disease: Potential of Anti-inflammatory Drugs in the Prevention of Atherothrombosis: Inflammation and Anti-Inflammatory Drugs in Coronary Artery Disease. *American Journal of Cardiovascular Drugs*. 2015;15:1–11.
67. Clauss M, Grell M, Fangmann C, Fiers W, Scheurich P, Risau W. Synergistic induction of endothelial tissue factor by tumor necrosis factor and vascular endothelial growth factor: functional analysis of the tumor necrosis factor receptors. *FEBS Lett*. 1996;390:334–338.
68. Grell M, Douni E, Wajant H, Löhden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Scheurich P. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*. 1995;83:793–802.
69. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:745–756.
70. Brenner D, Blaser H, Mak TW. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol*. 2015;15:362–374.
71. Stannard AK, Riddell DR, Bradley NJ, Hassall DG, Graham A, Owen JS. Apolipoprotein E and regulation of cytokine-induced cell adhesion molecule expression in endothelial cells. *Atherosclerosis*. 1998;139:57–64.
72. Couffignal T, Dupl a C, Labat L, Lamaziere JM, Moreau C, Printseva O, Bonnet J. Tumor necrosis factor-alpha stimulates ICAM-1 expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:407–414.
73. Jacobsson LTH, Turesson C, G lfe A, Kapetanovic MC, Petersson IF, Saxne T, Geborek P. Treatment with tumor necrosis factor blockers is associated with a lower incidence of first cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2005;32:1213–1218.
74. Br n n L, Hovgaard L, Nitulescu M, Bengtsson E, Nilsson J, Jovinge S. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:2137–2142.

75. Canault M. Exclusive expression of transmembrane TNF- $\alpha$  in mice reduces the inflammatory response in early lipid lesions of aortic sinus. *Atherosclerosis*. 2004;172:211–218.
76. Ohta H, Wada H, Niwa T, Kirii H, Iwamoto N, Fujii H, Saito K, Sekikawa K, Seishima M. Disruption of tumor necrosis factor-alpha gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2005;180:11–17.
77. Xiao N, Yin M, Zhang L, Qu X, Du H, Sun X, Mao L, Ren G, Zhang C, Geng Y, An L, Pan J. Tumor necrosis factor-alpha deficiency retards early fatty-streak lesion by influencing the expression of inflammatory factors in apoE-null mice. *Mol Genet Metab*. 2009;96:239–244.
78. Rus HG, Niculescu F, Vlaicu R. Tumor necrosis factor-alpha in human arterial wall with atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1991;89:247–254.
79. Canault M, Peiretti F, Kopp F, Bonardo B, Bonzi M-F, Coudeyre J-C, Alessi M-C, Juhan-Vague I, Nalbone G. The TNF alpha converting enzyme (TACE/ADAM17) is expressed in the atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice: possible contribution to elevated plasma levels of soluble TNF alpha receptors. *Atherosclerosis*. 2006;187:82–91.
80. Adrain C, Freeman M. New lives for old: evolution of pseudoenzyme function illustrated by iRhoms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012;13:489–498.
81. Scheller J, Chalaris A, Garbers C, Rose-John S. ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends Immunol*. 2011;32:380–387.
82. Cavadas M, Oikonomidi I, Gaspar CJ, Burbridge E, Badenes M, Félix I, Bolado A, Hu T, Bileck A, Gerner C, Domingos PM, von Kriegsheim A, Adrain C. Phosphorylation of iRhom2 Controls Stimulated Proteolytic Shedding by the Metalloprotease ADAM17/TACE. *Cell Rep*. 2017;21:745–757.
83. RHBDF2 (rhomboid 5 homolog 2) | Gene Report | BioGPS [Internet]. [cited 2018 Oct 25]; Available from: <http://biogps.org/#goto=genereport&id=79651>
84. Adrain C, Zettl M, Christova Y, Taylor N, Freeman M. Tumor Necrosis Factor Signaling Requires iRhom2 to Promote Trafficking and Activation of TACE. *Science*. 2012;335:225–228.
85. Saftig P, Reiss K. The “A Disintegrin And Metalloproteases” ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential? *Eur J Cell Biol*. 2011;90:527–535.
86. Issuree PDA, Maretzky T, McIlwain DR, Monette S, Qing X, Lang PA, Swendeman SL, Park-Min K-H, Binder N, Kallioliias GD, Yarilina A, Horiuchi K, Ivashkiv LB, Mak TW, Salmon JE, Blobel CP. iRHOM2 is a critical pathogenic mediator of inflammatory arthritis. *J Clin Invest*. 2013;123:928–932.

87. Blaydon DC, Biancheri P, Di W-L, Plagnol V, Cabral RM, Brooke MA, van Heel DA, Ruschendorf F, Toynbee M, Walne A, O'Toole EA, Martin JE, Lindley K, Vulliamy T, Abrams DJ, MacDonald TT, Harper JI, Kelsell DP. Inflammatory skin and bowel disease linked to ADAM17 deletion. *N Engl J Med*. 2011;365:1502–1508.
88. Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL, Sunnarborg SW, Lee DC, Russell WE, Castner BJ, Johnson RS, Fitzner JN, Boyce RW, Nelson N, Kozlosky CJ, Wolfson MF, Rauch CT, Cerretti DP, Paxton RJ, March CJ, Black RA. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*. 1998;282:1281–1284.
89. Haxaire C, Blobel CP. With blood in the joint - what happens next? Could activation of a pro-inflammatory signalling axis leading to iRhom2/TNF $\alpha$ -convertase-dependent release of TNF $\alpha$  contribute to haemophilic arthropathy? *Haemophilia*. 2014;20 Suppl 4:11–14.
90. McIlwain DR, Lang PA, Maretzky T, Hamada K, Ohishi K, Maney SK, Berger T, Murthy A, Duncan G, Xu HC, Lang KS, Haussinger D, Wakeham A, Itie-Youten A, Khokha R, Ohashi PS, Blobel CP, Mak TW. iRhom2 Regulation of TACE Controls TNF-Mediated Protection Against Listeria and Responses to LPS. *Science*. 2012;335:229–232.
91. Weischenfeldt J, Porse B. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. *CSH Protoc*. 2008;2008:pdb.prot5080.
92. Renz H, Gierten B. Durchflusszytometrie [Internet]. In: Gressner AM, Arndt T, editors. Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Berlin, Heidelberg: Springer; 2019 [cited 2020 Oct 27]. p. 735–735. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4\\_945](https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_945)
93. Lopes-Virella MF, Stone P, Ellis S, Colwell JA. Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods. *Clin Chem*. 1977;23:882–884.
94. Arnemann J. PCR (Polymerase-Kettenreaktion) [Internet]. In: Gressner AM, Arndt T, editors. Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Berlin, Heidelberg: Springer; 2019 [cited 2020 Oct 27]. p. 1841–1842. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4\\_3554](https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_3554)
95. Arnemann J. Taqman-Sonden [Internet]. In: Gressner AM, Arndt T, editors. Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Berlin, Heidelberg: Springer; 2019 [cited 2020 Jul 25]. p. 2260–2261. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4\\_3591](https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_3591)
96. Töpfer G. Enzyme-linked Immunosorbent Assay [Internet]. In: Gressner AM, Arndt T, editors. Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Berlin, Heidelberg: Springer; 2019 [cited 2020 Oct 27]. p. 789–790. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4\\_1013](https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_1013)

97. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65:55–63.
98. Slater TF, Sawyer B, Straeuli U. STUDIES ON SUCCINATE-TETRAZOLIUM REDUCTASE SYSTEMS. III. POINTS OF COUPLING OF FOUR DIFFERENT TETRAZOLIUM SALTS. *Biochim Biophys Acta*. 1963;77:383–393.
99. Moore KJ, Tabas I. The Cellular Biology of Macrophages in Atherosclerosis. *Cell*. 2011;145:341–355.
100. Brochériou I, Maouche S, Durand H, Braunersreuther V, Naour GL, Gratchev A, Koskas F, Mach F, Kzhyskowska J, Ninio E. Antagonistic regulation of macrophage phenotype by M-CSF and GM-CSF: Implication in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2011;214:316–324.
101. Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:8264–8268.
102. Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol*. 2008;Chapter 14:Unit 14.1.
103. Zajd CM, Ziemba AM, Miralles GM, Nguyen T, Feustel PJ, Dunn SM, Gilbert RJ, Lennartz MR. Bone Marrow-Derived and Elicited Peritoneal Macrophages Are Not Created Equal: The Questions Asked Dictate the Cell Type Used. *Front Immunol* [Internet]. 2020 [cited 2020 Aug 4];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00269/full>
104. Mcllwain DR, Lang PA, Maretzky T, Hamada K, Ohishi K, Maney SK, Berger T, Murthy A, Duncan G, Xu HC, Lang KS, Haussinger D, Wakeham A, Itie-Youten A, Khokha R, Ohashi PS, Blobel CP, Mak TW. iRhom2 Regulation of TACE Controls TNF-Mediated Protection Against Listeria and Responses to LPS. *Science*. 2012;335 (Suppl.):229–232.
105. Bae YS, Lee JH, Choi SH, Kim S, Almazan F, Witztum JL, Miller YI. Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized LDL: TLR4- and Syk-dependent activation of Nox2. *Circ Res*. 2009;104:210–218.
106. Rahman K, Fisher EA. Insights From Pre-Clinical and Clinical Studies on the Role of Innate Inflammation in Atherosclerosis Regression. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* [Internet]. 2018 [cited 2018 Jun 22];5. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcvm.2018.00032/full>
107. Barnette DN, Cahill TJ, Gunadasa-Rohling M, Carr CA, Freeman M, Riley PR. iRhom2-mediated proinflammatory signalling regulates heart repair following myocardial infarction. *JCI Insight*. 2018;3.



108. Pauleau A-L, Rutschman R, Lang R, Pernis A, Watowich SS, Murray PJ. Enhancer-mediated control of macrophage-specific arginase I expression. *J Immunol.* 2004;172:7565–7573.
109. Wanidworanun C, Strober W. Predominant role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human monocyte IL-10 synthesis. *J Immunol.* 1993;151:6853–6861.
110. Daftarian PM, Kumar A, Kryworuchko M, Diaz-Mitoma F. IL-10 production is enhanced in human T cells by IL-12 and IL-6 and in monocytes by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Immunol.* 1996;157:12–20.
111. Huynh L, Kusnadi A, Park SH, Murata K, Park-Min K-H, Ivashkiv LB. Opposing regulation of the late phase TNF response by mTORC1-IL-10 signaling and hypoxia in human macrophages. *Sci Rep.* 2016;6:31959.
112. Gane JM, Stockley RA, Sapey E. TNF- $\alpha$  Autocrine Feedback Loops in Human Monocytes: The Pro- and Anti-Inflammatory Roles of the TNF- $\alpha$  Receptors Support the Concept of Selective TNFR1 Blockade In Vivo. *J Immunol Res.* 2016;2016:1079851.
113. Chan CS, Ming-Lum A, Golds GB, Lee SJ, Anderson RJ, Mui AL-F. Interleukin-10 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  translation through a SHIP1-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2012;287:38020–38027.
114. Ticha O, Moos L, Wajant H, Bekeredjian-Ding I. Expression of Tumor Necrosis Factor Receptor 2 Characterizes TLR9-Driven Formation of Interleukin-10-Producing B Cells. *Front Immunol.* 2017;8:1951.
115. Veroni C, Gabriele L, Canini I, Castiello L, Coccia E, Remoli ME, Columba-Cabezas S, Aricò E, Aloisi F, Agresti C. Activation of TNF receptor 2 in microglia promotes induction of anti-inflammatory pathways. *Mol Cell Neurosci.* 2010;45:234–244.
116. Medler J, Wajant H. Tumor necrosis factor receptor-2 (TNFR2): an overview of an emerging drug target. *Expert Opin Ther Targets.* 2019;23:295–307.
117. Nicolaou A, Zhao Z, Northoff BH, Sass K, Herbst A, Kohlmaier A, Chalaris A, Wolfrum C, Weber C, Steffens S, Rose-John S, Teupser D, Holdt LM. Adam17 Deficiency Promotes Atherosclerosis by Enhanced TNFR2 Signaling in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37:247–257.
118. Potteaux S, Esposito B, van Oostrom O, Brun V, Ardouin P, Groux H, Tedgui A, Mallat Z. Leukocyte-derived interleukin 10 is required for protection against atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1474–1478.
119. Chaohui C, Wei H, Hongfeng W, Yueliang Z, Xiaoqin P, Pingli Z, Zhibing A. iRhom2 promotes atherosclerosis through macrophage inflammation and induction of oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;

120. Lu X-L, Zhao C-H, Zhang H, Yao X-L. iRhom2 is involved in lipopolysaccharide-induced cardiac injury in vivo and in vitro through regulating inflammation response. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;86:645–653.
121. Sabol SL, Brewer HB, Santamarina-Fojo S. The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver. *J Lipid Res*. 2005;46:2151–2167.
122. Norata GD, Ongari M, Uboldi P, Pellegatta F, Catapano AL. Liver X receptor and retinoic X receptor agonists modulate the expression of genes involved in lipid metabolism in human endothelial cells. *Int J Mol Med*. 2005;16:717–722.
123. Hao X, Cao D, Hu Y, Li X, Liu X, Xiao J, Liao D, Xiang J, Tang C. IFN-gamma down-regulates ABCA1 expression by inhibiting LXRalpha in a JAK/STAT signaling pathway-dependent manner. *Atherosclerosis*. 2009;203:417–428.
124. Tang C, Oram JF. The cell cholesterol exporter ABCA1 as a protector from cardiovascular disease and diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2009;1791:563–572.
125. Voloshyna I, Seshadri S, Anwar K, Littlefield MJ, Belilos E, Carsons SE, Reiss AB. Infliximab reverses suppression of cholesterol efflux proteins by TNF- $\alpha$ : a possible mechanism for modulation of atherogenesis. *Biomed Res Int*. 2014;2014:312647.
126. Khovidhunkit W, Moser AH, Shigenaga JK, Grunfeld C, Feingold KR. Endotoxin down-regulates ABCG5 and ABCG8 in mouse liver and ABCA1 and ABCG1 in J774 murine macrophages: differential role of LXR. *J Lipid Res*. 2003;44:1728–1736.
127. Castrillo A, Joseph SB, Vaidya SA, Haberland M, Fogelman AM, Cheng G, Tontonoz P. Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Mol Cell*. 2003;12:805–816.
128. Gerbod-Giannone M-C, Li Y, Holleboom A, Han S, Hsu L-C, Tabas I, Tall AR. TNFalpha induces ABCA1 through NF-kappaB in macrophages and in phagocytes ingesting apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:3112–3117.
129. Thorp E, Tabas I. Mechanisms and consequences of efferocytosis in advanced atherosclerosis. *J Leukoc Biol*. 2009;86:1089–1095.
130. Martinet W, Schrijvers DM, De Meyer GRY. Necrotic cell death in atherosclerosis. *Basic Res Cardiol*. 2011;106:749–760.
131. Kapourchali FR, Surendiran G, Chen L, Uitz E, Bahadori B, Moghadasian MH. Animal models of atherosclerosis. *World J Clin Cases*. 2014;2:126–132.
132. Mestas J, Hughes CCW. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*. 2004;172:2731–2738.



## 7. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, [Alica Brettschneider], versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [Charakterisierung von iRhomb2-defizienten Makrophagen unter atherogenen Stimuli] selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## 8. Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Alica Brettschneider hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

C. Hannemann, A. Ludwig, A. Brettschneider, V. Stangl, K. Stangl, B. Hewing  
The role of iRhom2 in atherosclerosis  
4<sup>th</sup> Young DZHK Retreat, Rostock 14.-15.09.2017 (Vortrag)  
Beitrag im Einzelnen: Abbildung TNF- $\alpha$  im Zellüberstand von Bone Marrow Derived Macrophages nach LPS Stimulation (Erheben dieser Daten, statistische Auswertung dieser Daten und Anfertigung der Abbildung)

C. Hannemann, A. Ludwig, A. Brettschneider, V. Stangl, K. Stangl, B. Hewing  
Impact of inactive rhomboid protein 2 (iRhom2)-deficiency on atherosclerosis development  
DZHK Partner Site Retreat, Berlin, 19.10.2018 (Vortrag)  
Beitrag im Einzelnen: Abbildung TNF- $\alpha$  im Zellüberstand von Bone Marrow Derived Macrophages nach LPS Stimulation (Erheben dieser Daten, statistische Auswertung dieser Daten und Anfertigung der Abbildung)

C. Hannemann, A. Ludwig, A. Brettschneider, V. Stangl, K. Stangl, B. Hewing  
Deficiency of inactive rhomboid protein 2 (iRhom2) attenuates atherosclerosis development  
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie 2019, Mannheim, 27.04.2019 (Abstract und Vortrag)  
Beitrag im Einzelnen: Abbildung TNF- $\alpha$  im Zellüberstand von Bone Marrow Derived Macrophages nach LPS und IFN- $\gamma$  Stimulation (Erheben dieser Daten, statistische Auswertung dieser Daten und Anfertigung der Abbildung)

PD Dr. Bernd Hewing

Alica Brettschneider

## 9. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 10. Publikationsliste

C. Hannemann, A. Ludwig, A. Brettschneider, V. Stangl, K. Stangl, B. Hewing  
The role of iRhom2 in atherosclerosis  
4th Young DZHK Retreat, Rostock 14.-15.09.2017 (Vortrag)

C. Hannemann, A. Ludwig, A. Brettschneider, V. Stangl, K. Stangl, B. Hewing  
Impact of inactive rhomboid protein 2 (iRhom2)-deficiency on atherosclerosis  
development  
DZHK Partner Site Retreat, Berlin, 19.10.2018 (Vortrag)

C. Hannemann, A. Ludwig, A. Brettschneider, V. Stangl, K. Stangl, B. Hewing  
Deficiency of inactive rhomboid protein 2 (iRhom2) attenuates atherosclerosis  
development  
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie 2019, Mannheim,  
27.04.2019 (Abstract und Vortrag)

## 11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich gerne den Menschen danken, die am Entstehen dieser Arbeit mitgewirkt haben.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. med. Bernd Hewing für die Bereitstellung des spannenden Themas sowie für die zuverlässige, geduldige und kompetente Betreuung. Seine Begeigerungsfähigkeit und tatkräftige Unterstützung haben mich stets begleitet.

Ebenso möchte ich Frau Prof. Dr. med. Verena Stangl und Herrn Prof. Dr. med. Karl Stangl danken für die Möglichkeit in der Arbeitsgruppe „Atherogenese“ im CCR und in der Medizinischen Klinik für Kardiologie arbeiten zu können.

Bei Carmen Hannemann möchte ich mich bedanken für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit und den regen wissenschaftlichen Austausch. Für die Einarbeitung und Unterstützung im Labor sowie gute wissenschaftliche Zusammenarbeit geht mein Dank ebenfalls an Frau PD Dr. rer. nat. Antje Ludwig. Ein großer Dank gilt ebenfalls Frau Andrea Weller und Frau Nicole Rösener sowie allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Atherogenese“ im CCR.

Des Weiteren möchte ich mich bei dem Deutschen Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung (DZHK) für die Förderung meiner Arbeit bedanken.

Und nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und Großeltern, die mir konstant mit Liebe, Unterstützung und vor allem Motivation zur Seite standen.