

Molekulare Kardiologie der Inneren Medizin III  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Die Bedeutung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors  
GPRC5B für die Gefäßentzündung und Atherogenese

**DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Greta Verena Freundt**

Master of science

Kiel, Juli 2019

Erstgutachter: PD Dr. Hans-Jörg Hippe  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Thomas Roeder  
Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2019  
Druckgenehmigung: Kiel, 08.10.2019

gez.:  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass diese Abhandlung – abgesehen von der Beratung durch den Betreuer – nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist, soweit dies nicht explizit vermerkt ist. Ich erkläre weiterhin, dass die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist. Diese Arbeit wurde bisher, weder in Teilen noch vollständig, an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt, veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

---

Ort, Datum

---

Greta Freundt

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
Ad	Adenovirus
AF	Alexa Flour
AGE	glykiertes Reaktionsprodukt
ANOVA	analysis of variance
AP-1	Aktivatorprotein-1
ApoE <sup>-/-</sup>	Apolipoprotein-E-defizient
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	American Type Culture Collection
BOSS	bride of sevenless
BSA	bovines Serumalbumin
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cav-1	Caveolin-1
cDNA	complementary DNA
CMV	Cytomegalo-Virus
CRF	corticotropin-releasing factor
Ct	cycle threshold
Cy5	Cyanin 5
CZ	Chondrozyten
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethyldicarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Endothelzelle, endothelial cell
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Egr-1	early growth response protein 1 Egr-1
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
eNOS	endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase
ERK	extrazelluläre signalregulierte Kinase
EZ	Erythrozyten
EZM	Extrazellulärmatrix

FITC	Fluorescein isothiocyanate
FK	fibröse Kappe
FKS	fötales Kälberserum
Fw	forward
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gp130	Glykoprotein 130
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GPRC5B	GPCR der Klasse C, Gruppe 5, Subtyp B
GPRC5B <sup>-/-</sup>	GPRC5B-Knockout
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
HDL	Lipoprotein hoher Dichte
HG	Herzgewicht
hG5B	Humanes GPRC5B
HRP	horseradish peroxidase
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IF	Immunfluoreszenz
ifu	infektiöse Einheit
IgG	Immunglobulin G
IKK	IκB-Kinase-Komplex
IKK $\epsilon$	IKK-Subtyp epsilon
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-6	Interleukin-6
IL-6R	Interleukin-6-Rezeptor
IP	Immunpräzipitation
IκB	inhibitor of κB
JAK 1	Januskinase 1
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K	Kalzifizierung
KG	Körpergewicht
KMT	Knochenmarkstransplantation
LB-Medium	Lysogeny Broth Medium
LDL	Lipoprotein niederer Dichte
Ldlr <sup>-/-</sup>	LDL-Rezeptor-defizient
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF	Monozytenkolonie-stimulierender Faktor

MEK	MAPK/ERK Kinase
mG5B	GPRC5B der Maus
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA
mROSA	mouse reverse oriented splice acceptor
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
n	Anzahl
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Neo	Neovaskularisierung
NFAT	nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NRCF	primären, kardialen Fibroblasten der neonatalen Ratte
NZ	nekrotisches Zentrum
OD	optische Dichte
oxLDL	oxidiertes Lipoprotein niederer Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule-1
pERK 1/2	phosphoryliertes ERK 1/2
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
pSTAT3	phosphoryliertes STAT3
R	Plaqueruptur
raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
RAIG-2	retinoic acid inducible gene 2
RANKL	receptor activator of NFκB ligand
RGS	regulators of G protein signaling
RhoGEF	Rho guanine nucleotide exchange factors
RIPA	radio immunoprecipitation assay
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	ribosomale RNA
Rv	reverse
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	Standardfehler
sgp130	lösliches Glykoprotein 130
SH2	sarcoma-homology 2
siFyn	siRNA komplementär zur Fyn-mRNA

siG5B	siRNA komplementär zur GPRC5B-mRNA
siNeg	negative Kontroll-siRNA
siRNA	small interfering RNA
Smad3	mothers against decapentaplegic homolog 3
SNET	SDS-NaCl-EDTA-Tris
SOD2	Superoxid-Dismutase 2
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
SV40	Simian Virus 40
SZ	Schaumzellen
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	Tris-buffered saline with Tween 20
TC	Gesamtcholesterin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tg5B	GPRC5B-transgen
TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TL	Tibialänge
TLR	Toll-like-Rezeptor
TLR-4	toll-like-rezeptor-4
TNFR	Tumornekrosefaktor- $\alpha$ -Rezeptor
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRAF-2	TNFR-associated factor 2
TRG	Triglyceride
TRIF	toll-interleukin-1 receptor-domain-containing adapter-inducing interferon-beta
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
v/v	volume per volume
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VFD	Venus-Fliegenfallen-Domäne
VLA-4	very late antigen 4
VLDL	Lipoprotein sehr niedriger Dichte
VSMC	glatte Gefäßmuskelzelle, vascular smooth muscle cell
w/v	weight per volume
WB	Western Blot
Wt	Wildtyp
YT-Medium	Hefeextrakt-Trypton-Medium

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Aufbau der Gefäßwand .....	1
1.2	Arteriosklerose - Atherosklerose .....	2
1.2.1	Prädilektionsorte atherosklerotischer Gefäßverschlüsse .....	2
1.2.2	Pathogenese .....	3
1.2.3	Wirkmechanismen ausgewählter Mediatoren der Atherogenese .....	5
1.2.4	Akzeleration der Atherosklerose durch Diabetes mellitus .....	10
1.3	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren .....	10
1.3.1	Der neu entdeckte Rezeptor GPRC5B .....	11
1.4	Aufgabenstellung .....	13
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
2.1	Materialien .....	15
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	15
2.1.2	Chemikalien .....	17
2.1.3	Puffer und Lösungen .....	19
2.1.4	Enzyme .....	21
2.1.5	Zellen und Tiere .....	21
2.1.6	Antikörper .....	22
2.1.7	Sequenzen der verwendeten Primer .....	23
2.1.8	Vektoren, siRNAs und Mikroorganismen .....	23
2.1.9	Assays und Kits .....	24
2.1.10	Software .....	24
2.2	Methoden .....	25
2.2.1	Mikrobiologische Methoden .....	25
2.2.2	Zellkulturtechnik .....	26
2.2.3	Molekularbiologische Methoden .....	32
2.2.4	Tierversuch .....	42
2.2.5	Untersuchungen an Gewebeschnitten .....	46
2.2.6	Statistische Auswertung .....	47
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>48</b>
3.1	Untersuchung von GPRC5B <i>in vitro</i> .....	48
3.1.1	Regulation der GPRC5B-Expression durch inflammatorische Mediatoren .....	48



3.1.2	Vektorvermittelte Modulierung der GPRC5B-Expression .....	54
3.1.3	Einfluss von GPRC5B auf die Expression inflammatorischer Mediatoren .....	58
3.1.4	Einfluss von GPRC5B auf die Aktivierung proatherogener Signalwege.....	66
3.2	Einfluss von GPRC5B auf atherosklerotische Plaques <i>in vivo</i> .....	70
3.2.1	Untersuchung allgemeiner Parameter.....	71
3.2.2	Überprüfung des Erfolgs der Knochenmarkstransplantation .....	73
3.2.3	Einfluss von GPRC5B auf die Größe und Struktur der Plaques .....	74
3.2.4	Einfluss von GPRC5B auf die Infiltration von Makrophagen in die Plaques.....	77
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>78</b>
4.1	Untersuchung von GPRC5B <i>in vitro</i> .....	78
4.1.1	Expression von GPRC5B in ausgewählten Zellen des vaskulären Systems .....	78
4.1.2	Regulation der GPRC5B-Expression durch inflammatorische Mediatoren.....	79
4.1.3	Vektorvermittelte Modulierung der GPRC5B-Expression .....	82
4.1.4	Einfluss von GPRC5B auf die Expression inflammatorischer Mediatoren .....	83
4.1.5	Einfluss von GPRC5B auf die Aktivierung proatherogener Signalwege.....	86
4.1.6	Wirkmechanismus von GPRC5B in Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen .	88
4.2	Untersuchung von GPRC5B <i>in vivo</i> .....	90
4.2.1	Untersuchung allgemeiner Parameter.....	90
4.2.2	Einfluss von GPRC5B auf die Größe und Struktur der Plaques .....	92
4.2.3	Einfluss von GPRC5B auf die Infiltration von Makrophagen in die Plaques.....	94
4.3	Ausblick.....	96
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>100</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>102</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>104</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>117</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>118</b>
<b>10</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>119</b>

## 1 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen noch immer die Haupttodesursache in den westlichen Industrieländern dar und gewinnen auch global immer mehr an Bedeutung.<sup>1-4</sup> So ist beispielsweise in Amerika das Risiko an einer kardiovaskulären Erkrankung zu sterben um 50 % höher als die Wahrscheinlichkeit an Krebs zu sterben.<sup>5</sup> Dass die Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems auch in Zukunft eines der größten Gesundheitsprobleme unserer Gesellschaft bleiben wird, zeigt die stetig zunehmende Inzidenz. So stieg die Zahl der Neuerkrankungen innerhalb von 25 Jahren europaweit um ca. 20 % an, wobei Männer und Frauen gleichermaßen betroffen waren. In Deutschland liegt die Zahl der Neuerkrankungen bei 1 Million Menschen pro Jahr. Dabei handelt es sich in 53 % der Fälle um Patienten mit koronarer Herzkrankheit.<sup>4</sup>

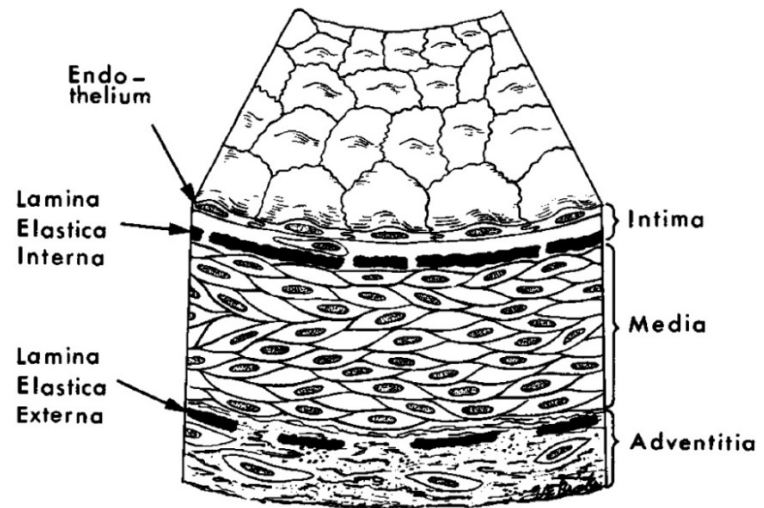
Als kardiovaskuläre Erkrankungen wird laut Weltgesundheitsorganisation eine Gruppe von Erkrankungen bezeichnet, die vom Herz-Kreislaufsystem ausgehen. Im engeren Sinn sind damit insbesondere die Erkrankungen gemeint, denen als gemeinsame pathologische Ursache eine Atherosklerose zu Grunde liegt. Zu diesen Erkrankungen zählen koronare Herzkrankheit, periphere arterielle Verschlusskrankheit, Herzinfarkt und Schlaganfall.<sup>6</sup>

Die hohe Mortalität sowie die zunehmende Beeinflussung von Lebensqualität und Lebenszeit durch atherosklerosebedingte kardiovaskuläre Erkrankungen verdeutlicht die Notwendigkeit der Entwicklung wirksamer Präventionen und neuer Strategien in der kardiovaskulären Medizin. Dazu ist es wichtig die Prozesse und Signalwege besser zu verstehen, die zur Veränderung der Gefäße und zur Entstehung von Atherosklerose beitragen.

### 1.1 Aufbau der Gefäßwand

Gesunde arterielle Gefäße sind allgemein aus drei konzentrischen Schichten aufgebaut (siehe Abb. 1). Die innere Gefäßwandschicht stellt die Tunica intima dar: Eine flache, einschichtige Endothelzellschicht, welche in direktem Kontakt mit dem Blutstrom steht. Die mittlere Gefäßwandschicht, die Tunica media, besteht aus mehreren Schichten glatter Muskelzellen und ist in eine elastin- und kollagenreiche Matrix eingebettet. Die äußerste Schicht bildet die Tunica adventitia. Es handelt sich dabei um eine lockere Bindegewebsschicht, welche verschiedene Zelltypen wie Fibroblasten, dendritische Zellen, Monozyten bzw. Makrophagen sowie Mast- und T-Zellen enthält. In diese Schicht ragen zudem kleinere

Blutgefäße (vasa vasorum) sowie Nervenendungen hinein. Die einzelnen Schichten werden jeweils durch eine dünne, fenstrierte Schicht dicht gelagerter, elastischer Fasern voneinander getrennt: Die Lamina elastica interna bildet die Grenze zwischen der Intima und der Media, während die Lamina elastica externa die Media von der Adventitia trennt.<sup>7-9</sup>



**Abb. 1: Struktureller Aufbau normaler Arterien.** Dargestellt sind die einzelnen Gefäßwandschichten. Modifiziert nach Ross et al.<sup>9</sup>

## 1.2 Arteriosklerose - Atherosklerose

Im deutschen Sprachraum werden die Begriffe Arteriosklerose und Atherosklerose oftmals synonym verwendet. Der Begriff Arteriosklerose wurde erstmals 1833 von Lobstein geprägt und gilt heute als Oberbegriff für drei verschiedenen Formen der Arterienerkrankung. Neben der häufigsten Form, der Atherosklerose, umfasst er auch die Mönckeberg-Sklerose und die Arteriosklerose.<sup>7,10,11</sup> Der Begriff Atherosklerose ist vom griechischen „athero“ für Brei und „skleros“ für hart abgeleitet und bezeichnet eine Gefäßerkrankung, die durch „breiartige“ cholesterinreiche Läsionen (Plaques) gekennzeichnet ist, welche das Gefäßlumen verengen.<sup>12</sup> Die Bedeutung der Silbe „skleros“ lässt sich mit einer „Verhärtung“ im Sinne eines Elastizitätsverlustes der betroffenen Gefäße erklären.

Frühe atherosklerotische Läsionen, sogenannte „fatty streaks“ (streifige subendotheliale Fettablagerungen), können bereits während der Kindheit entstehen. Über einen längeren Zeitraum, zunächst langsam und unbemerkt verlaufend, können sich atherosklerotische Läsionen meist plötzlich und oftmals erst in höherem Alter klinisch manifestieren.<sup>13,14</sup>

### 1.2.1 Prädilektionsorte atherosklerotischer Gefäßverschlüsse

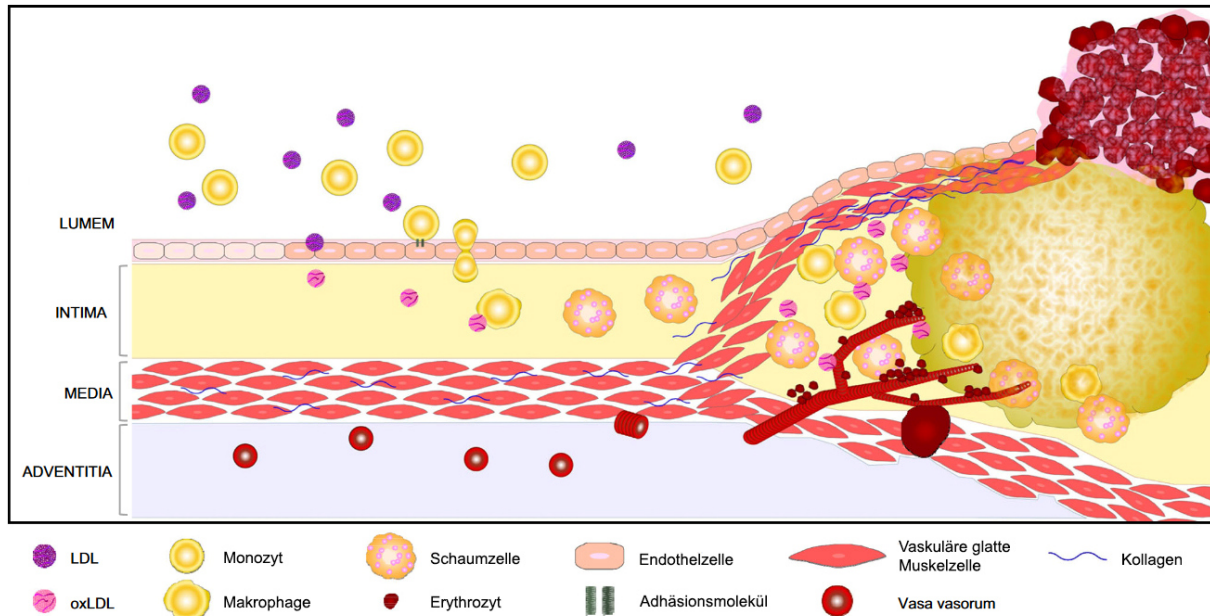
Atherosklerose tritt hauptsächlich an Gefäßverzweigungen und unregelmäßig verlaufenden Gefäßabschnitten von mittleren und großen Arterien wie beispielsweise an der

Karotisbifurkation und den proximalen ostiumnahen Abschnitten der Aorta renales auf.<sup>15,16</sup> In diesen Bereichen sind die Endothelzellen der Intima auf Grund der turbulenten Strömung des Blutes starkem Scherstress ausgesetzt, was die Struktur und Funktion der Zellen beeinflussen und zur Expression pathophysiologisch relevanter Gene führen kann.<sup>16</sup> So haben Untersuchungen an kultivierten Endothelzellen gezeigt, dass turbulenter Scherstress zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NFκB), Early growth response protein 1 (Egr-1), c-Jun und c-Fos), einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen (Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) und E-Selektin) sowie zu einer erhöhten Monozytenadhärenz führt.<sup>17,18</sup> Darüber hinaus zeigten Traub et al. eine durch Scherstress induzierte Aktivierung verschiedener Rezeptor-assoziiierter G-Proteine und Mitogen-aktivierter sowie Stress-aktivierter Kinase-Kaskaden.<sup>19</sup> Unverzweigte Arterienabschnitte mit laminarem Blutfluss scheinen hingegen vor Atherogenese relativ geschützt zu sein. Untersuchungen an primären humanen Endothelzellen haben ergeben, dass eine gleichbleibende laminare Strömung im Gegensatz zur turbulenten Strömung zu einer verstärkten Expression atheroprotektiver Proteine wie der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) und der Superoxid-Dismutase 2 (SOD2) führt.<sup>20,21</sup> Neben hämodynamischen Faktoren gibt es jedoch auch eine Reihe von biochemischen Stimuli, die zur endothelialen Dysfunktion beitragen und für die Atherogenese von besonderer Bedeutung sind. Dazu gehört die Aktivierung durch Zytokine und bakterielle oder virale Produkte, die Stimulierung durch glykierte Reaktionsprodukte (AGEs), welche bei Diabetes oder während des Alterungsprozesses generiert werden, chronische Hypercholesterinämie und die Akkumulation oxidiertes Lipoproteine in der Gefäßwand.<sup>16</sup>

### ***1.2.2 Pathogenese***

Seit der Mitte des 19. Jahrhunderts versuchen Wissenschaftler die Zusammenhänge der Entstehung von Atherosklerose zu entschlüsseln. Unter Berücksichtigung physikalischer, mechanischer, chemischer, mikrobiologischer und alimentärer Faktoren ist über die Zeit eine Vielzahl unterschiedlicher Theorien entstanden. Den heutigen Stand der Atheroskleroseforschung dominiert die Vorstellung von einer chronischen Entzündung der Gefäßwand, bei der verschiedene proinflammatorische Mediatoren eine zentrale Rolle für die Plaquebildung spielen.<sup>11,22,23</sup>

Als Ausgangspunkt für die Entstehung atherosklerotischer Läsionen gilt die endotheliale Dysfunktion sowie die Endothelaktivierung durch oxidierte Lipide. Aufgrund einer Verletzung der Endothelschicht, einer Veränderung ihrer Permeabilität oder via Transzytose, dringt Lipoprotein niederer Dichte (LDL) in die Tunica intima ein und wird durch Enzyme modifiziert bzw. durch freie Sauerstoffradikale oxidiert.<sup>16,24</sup> Die Akkumulation von modifiziertem bzw. oxidiertem LDL (oxLDL) führt zu einer verstärkten Expression von chemotaktischen Proteinen wie dem Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) und Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1. Es folgt die Rekrutierung und Infiltration von Monozyten und T-Zellen in das Subendothelium (siehe Abb. 2). Unter dem Einfluss des von Endothel- und glatten Muskelzellen sezernierten Monozytenkolonie-stimulierenden Faktors (M-CSF), kommt es zur Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen. Die Phagozytose von oxLDL führt schließlich zur Umwandlung der Makrophagen in Schaumzellen. Diese lipidbeladenen Makrophagen charakterisieren die frühe atherosklerotische Läsion, welche makroskopisch in Form von "fatty streaks" zu erkennen ist.<sup>24-27</sup> Die Kombination aus oxidativem Stress, Hypoxie und hohen Cholesterinkonzentrationen führt zum Absterben der Makrophagen und zur Ausbildung eines nekrotischen Kerns innerhalb der Läsion. Hyperproliferation und Migration glatter Muskelzellen tragen zur Bildung einer fibrotischen Kappe bei.<sup>28,29</sup> Dabei spielen Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) eine wichtige Rolle. Auf Grund ihrer Eigenschaft, Komponenten der extrazellulären Matrix abzubauen, erleichtern sie die Migration glatter Muskelzellen von Tunica media in die Tunica intima und tragen zudem zur Plaquestabilisierung bei.<sup>30</sup> In vorangeschrittenen Läsionen übersteigt die Zelltodrate die Phagozytoserate. Verbleibende Vesikel und Zellbruchstücke bilden das Gerüst für eine beginnende Kalzifizierung im nekrotischen Kern.<sup>28</sup> Im weiteren Verlauf kommt es im Zuge einer Neovaskularisierung zur Bildung kleiner, fragiler Gefäße (Vasa vasorum), welche charakteristisch für instabile Plaques sind. Undichte oder gerissene Gefäße innerhalb der Läsion führen zu Intraplaque-Blutungen, die die Konzentration von freiem Cholesterin erhöhen und die Entzündungsreaktion verstärken. Eine akute Plaqueruptur und der damit verbundene Gefäßverschluss durch Ausbildung eines Thrombus wird dadurch immer wahrscheinlicher.<sup>28</sup> In einer kürzlich veröffentlichten Studie an Patienten mit bereits aufgetretenem Myokardinfarkt und erhöhtem Risiko für weitere kardiovaskuläre Ereignisse konnte die Entzündungs-Hypothese der Atherogenese anhand einer antiinflammatorischen Therapie unter Verwendung eines Interleukin-1 $\beta$ -Antikörpers erstmals klinisch bestätigt werden.<sup>31</sup>



**Abb. 2: Pathogenese der Atherosklerose.** Endotheliale Dysfunktion und strukturelle Veränderungen der Arterienwand werden durch turbulente Strömung des Blutes und erhöhtes zirkulierendes Lipoprotein niedriger Dichte (LDL) ausgelöst, welches innerhalb der Intima akkumuliert. Oxidierte LDL-Partikel (oxLDL) in der Intima lösen die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Freisetzung von Chemokinen auf Endothelzellen aus, was zur Rekrutierung von Immunzellen führt. Die in die Intima infiltrierte Makrophagen phagozytieren oxLDL und entwickeln sich zu Schaumzellen. Makrophagen exprimieren verschiedene kostimulatorische Moleküle, die andere Immunzellen aktivieren, was die Entzündung innerhalb der Läsion weiter vorantreibt. Im weiteren Verlauf kommt es zur Bildung eines nekrotischen Kerns, Anhäufung von Cholesterinkristallen, Neovaskularisierung und Einblutungen in die Plaque, was schließlich zur Destabilisierung und Ruptur der Plaque führt. Modifiziert nach Park & Oh.<sup>27</sup>

### 1.2.3 Wirkmechanismen ausgewählter Mediatoren der Atherogenese

Atherosklerose ist eine chronische Erkrankung der Arterienwand, bei der sowohl angeborene als auch adaptive immunoinflammatorische Mechanismen beteiligt sind.<sup>29</sup> Sie werden durch eine Reihe von Mediatoren (Adhäsionsmoleküle, Zytokine, Enzyme und Transkriptionsfaktoren) gesteuert. Im Folgenden soll die Bedeutung einiger dieser Mediatoren für die Atherogenese näher erläutert werden.

#### 1.2.3.1 Adhäsionsmoleküle

Entzündlich aktivierte Endothelzellen weisen eine erhöhte Expression verschiedener Leukozyten-Adhäsionsmoleküle auf, welche das „Rollen“ von Monozyten auf dem Aortenendothel verlangsamen und letztlich zu dessen Anhaftung und Infiltration führen.<sup>21,32</sup> Sie lassen sich in vier Klassen einteilen: Selektine, Selektin Liganden, Integrine und

Immunglobuline. Die Superfamilie der Immunglobuline bilden die Transmembranproteine ICAM-1, -2 und -3, „platelet endothelial cell adhesion molecule-1“ (PECAM-1) und VCAM-1. Während PECAM-1 konstitutiv auf ruhenden Endothelzellen exprimiert wird, scheint insbesondere VCAM-1 im Rahmen der Leukozytenrekrutierung in das Atherom eine wichtige Rolle zu spielen.<sup>21,33</sup> In Kaninchenmodellen der Atherosklerose konnte gezeigt werden, dass eine cholesterinreiche Diät die Expression von VCAM-1 selektiv in den Bereichen des Aortenendothels stimuliert, die über frühen Schaumzellläsionen liegen.<sup>34</sup> Zudem konnte eine reduzierte Ausbildung früher Läsionen in LDL-Rezeptor-defizienten (*Ldlr*<sup>-/-</sup>) Mäusen mit verminderter VCAM-1 Expression nachgewiesen werden.<sup>35</sup> Einige Studien weisen darauf hin, dass auch ICAM-1 an der Unterstützung der Monozytenrekrutierung beteiligt sein könnte. Diesbezüglich ist die aktuelle Datenlage jedoch nicht eindeutig.<sup>36</sup> Die Rekrutierung von Immunzellen in das Subendothelium erfolgt über die Interaktion der Immunglobuline mit verschiedenen Integrinen. So interagiert VCAM-1 mit dem von Lymphozyten exprimierten „very late antigen 4“ (VLA-4) und ICAM-1 mit den auf Leukozyten exprimierten Integrinen  $\alpha_L\beta_2$  und  $\alpha_M\beta_2$ .<sup>33</sup>

#### 1.2.3.2 Matrix-Metalloproteinasen

Matrix-Metalloproteinasen werden von verschiedenen Zelltypen exprimiert, darunter Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Makrophagen und Lymphozyten.<sup>37</sup> Sie stellen eine Familie von extrazellulären Zinkproteasen mit unterschiedlichem Substratspektrum dar, welche gemeinsam alle Proteinkomponenten der Extrazellulären Matrix degradieren können. Unter physiologischen Bedingungen sind MMPs maßgeblich an Reparatur- und Umbauprozessen im Gewebe beteiligt.<sup>38</sup> Ihre Aktivität wird von sogenannten „tissue inhibitors of metalloproteinases“ (TIMPs) antagonisiert, welche das  $Zn^{2+}$ -Ion im katalytischen Zentrum der MMPs chelatieren.<sup>39</sup> Vor dem Hintergrund entstehender atherosklerotischer Läsionen kommt es durch die Exposition der Gefäßwandzellen mit verschiedenen Entzündungsmediatoren wie Lipopolysaccharide,  $TNF\alpha$  und diversen Interleukinen sowie reaktiven Sauerstoffspezies oder Hypoxie zu einer verstärkten MMP-Expression über die Aktivierung von  $NF\kappa B$ - und mitogenaktivierte Proteinkinase- (MAPK-) Signalkaskaden.<sup>38,40</sup> Nach aktuellem Wissensstand spielt die Hyperaktivierung von MMPs in allen Phasen der Atheroskleroseentstehung eine wichtige Rolle.<sup>38</sup> Von besonderer Bedeutung sind dabei die Gelatinasen A und B (MMP-2 und MMP-9), deren aktive Formen sowohl in murinen als auch in humanen atherosklerotischen Plaques verstärkt auftreten.<sup>41,42</sup> Sie sind bereits bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion und Initiierung der vaskulären Inflammation

beteiligt. Des Weiteren werden sie mit einer Intima-Verdickung in Verbindung gebracht, begünstigen das Plaquewachstum sowie die Neovaskularisierung und tragen zur Plaquestabilisierung bei.<sup>38</sup> Ebenfalls involviert in die Plaquestabilisierung ist die Metalloelastase MMP-12, deren Expression in vulnerablen Plaques signifikant höher ist als in stabilen Plaques und stark mit dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse korreliert.<sup>43,44</sup>

### *1.2.3.3 Interleukin-1 $\beta$*

Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ist eines von elf Mitgliedern der IL-1 Familie.<sup>45</sup> Als prototypisches proinflammatorisches Zytokin ist es bei einer Vielzahl entzündlicher Erkrankungen involviert und hat sich auch als wichtiger Entzündungsmediator bei der Entstehung der Atherosklerose erwiesen.<sup>29,46-49</sup> So konnte kürzlich gezeigt werden, dass durch eine regelmäßige, subkutane Verabreichung von 150 mg des IL-1 $\beta$ -Antikörpers Canakinumab die Rate wiederkehrender kardiovaskulärer Ereignisse im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant gesenkt werden konnte.<sup>31</sup> IL-1 $\beta$  wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen sezerniert und entfaltet seine Wirkung über die Bindung an seinen Rezeptor IL-1R und die Aktivierung von NF $\kappa$ B- und MAPK-Signalwegen.<sup>45</sup> Dies führt in Endothelzellen zu einer verstärkten Expression von ICAM-1, VCAM-1 und MCP-1. In glatten Gefäßmuskelzellen induziert IL-1 $\beta$  die phänotypische Umwandlung der Zellen vom kontraktilen Typ hin zum proliferierenden, proinflammatorischen Typ und stimuliert die Expression weiterer proatherogener Zytokine wie Interleukin-6.<sup>47</sup>

### *1.2.3.4 Interleukin-6*

Neben IL-1 $\beta$  spielt auch Interleukin-6 (IL-6) eine essenzielle Rolle in der Initiierung und Progression der Atherosklerose. Untersuchungen an Mäusen haben gezeigt, dass eine Behandlung gesunder C57Bl/6 Mäuse mit hohen IL-6 Konzentrationen signifikant die Ausbildung früher atherosklerotischer Läsionen verstärkt. Der Effekt war dabei deutlich stärker ausgeprägt als bei Apolipoprotein-E-defizienten (ApoE<sup>-/-</sup>) Mäusen mit fettreicher Diät ohne IL-6-Behandlung.<sup>50</sup> Die Sekretion von IL-6 wird durch akute Infektionen, chronische Entzündung, Fettleibigkeit und physiologischem Stress stimuliert und erfolgt durch Adipozyten, glatte Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen und Makrophagen.<sup>29,51</sup> Klassischerweise führt die Bindung von IL-6 an seinen membrangebundenen Rezeptor IL-6R über die Interaktion des ebenfalls membranständigen Glykoproteins 130 (gp130) zur Aktivierung der Januskinase 1 (JAK1) und des „Signal Transducer and Activator of Transcription 3“ (STAT3).<sup>52</sup> Über das sogenannte „trans-signaling“ können auch Zellen durch IL-6 stimuliert werden, die selbst keinen membranständigen IL-6R exprimieren. Dabei bindet



IL-6 an einen natürlicherweise vorkommenden löslichen IL-6R, welcher die Homodimerisierung von gp130 auf der Zelloberfläche der Zielzelle induziert und diese aktiviert. Endogen wird dieser alternative Aktivierungsweg über lösliches gp130 (sgp130) reguliert.<sup>53</sup> Über die Aktivierung von JAK1 und STAT3 übt IL-6 eine Vielzahl von Funktionen aus, die für die Entwicklung und Progression der Atherogenese von Bedeutung sind. Dazu gehört die Stimulation der hepatischen Synthese von Akute-Phase-Proteinen, die Aktivierung von Endothelzellen, die Steigerung der Koagulation durch Erhöhung der Gerinnungsfaktor-Synthese, die Expression des proinflammatorischen „corticotropin-releasing factor“ (CRF) und die Förderung der Lymphozytenproliferation und –differenzierung.<sup>29,51</sup>

#### *1.2.3.5 Tumornekrosefaktor- $\alpha$*

Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) ist ein pleiotropes Zytokin, dem sowohl eine pro- als auch eine antiinflammatorische Wirkung zugeschrieben wird. Im vaskulären System wird TNF $\alpha$  u.a. von Makrophagen, glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen nach Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (TLRs), MAPKs und NF $\kappa$ B exprimiert.<sup>29,32,54,55</sup> Auch hohe Cholesterinwerte und AGEs induzieren die Expression des Zytokins.<sup>54</sup> Seine Schlüsselfunktion bei chronischen Entzündungen vermittelt TNF $\alpha$  über die beiden Transmembranrezeptoren TNFR1 und -2 und die Aktivierung von NF $\kappa$ B und MAPKs, was die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle, MMPs und diverser Zytokine induziert.<sup>55</sup> Des Weiteren führt TNF $\alpha$  über die Aktivierung der Nicotinamidadenindinukleotidphosphat- (NADPH-) Oxidase zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und trägt somit zur endothelialen Dysfunktion bei.<sup>54</sup> Über die Bindung an den TNFR1 kann TNF $\alpha$  auch zur Aktivierung der Caspase-Kaskade und schließlich zur Apoptose-Induktion führen.<sup>56</sup> Dies trägt während der Atherogenese zur Vergrößerung des nekrotischen Kerns und Verdünnung der fibrotischen Kappe bei.<sup>29</sup>

#### *1.2.3.6 Lipopolysaccharide*

Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass nicht nur metabolische Faktoren, sondern auch bakterielle und virale Infektionen die Atherosklerose verstärken.<sup>32,57</sup> Lipopolysaccharide (LPS) sind Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien und führen über die Bindung an den Toll-like-Rezeptor-4 (TLR-4) zur Aktivierung NF $\kappa$ B-abhängiger proinflammatorischer Signalwege in einer Vielzahl von Zellen.<sup>58</sup> Dabei ist bereits der Lipidanteil von LPS für die Aktivierung des TLR-4 ausreichend.<sup>59</sup> Der Rezeptor erkennt somit nicht nur pathogen-assoziierte Strukturen, sondern auch einige wirtspezifische Faktoren wie im Blut zirkulierende gesättigte Fettsäuren oder oxidiertes LDL.<sup>60,61</sup> Auch die

Umwandlung von Makrophagen in Schaumzellen kann durch LPS-Stimulation TLR-abhängig induziert werden.<sup>62,63</sup> Die Expression von TLR-4 ist sowohl in humanen als auch in murinen lipidreichen atherosclerotischen Plaques nachweisbar und wird in Makrophagen durch oxLDL hochreguliert.<sup>64,65</sup>

#### 1.2.3.7 *NFκB*

Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NFκB) ist in die Pathogenese einer Vielzahl entzündlicher Krankheiten involviert und wird von einer Reihe Faktoren aktiviert, die auch an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt sind.<sup>66-69</sup> Dazu gehören hämodynamische Kräfte, Integrin/Matrix-Signalwege, Zytokine, bakterielle und virale Infektionen, oxidierte Lipide, Angiotensin II und AGEs.<sup>70-75</sup> Als Überbegriff steht NFκB für eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die sich aus den fünf Mitgliedern p50 und p52 sowie RelA, RelB und c-Rel zusammensetzt und ihre Wirkung als Homo- oder Heterodimere entfaltet.<sup>76</sup> Im ruhenden Zustand ist NFκB an den „inhibitor of κB“ (IκB) gebunden. Die Aktivierung von NFκB kann entweder über den klassischen „canonical“ oder den alternativen „non-canonical“ Signalweg erfolgen. In beiden Fällen kommt es letztlich zur Aktivierung eines IκB-Kinase-Komplexes (IKK), welcher nach Phosphorylierung von IκB zur Freisetzung unterschiedlicher NFκB-Dimere und deren Translokation in den Zellkern führt.<sup>76</sup> Diverse Zielgene, die in Prozessen wie Inflammation, Proliferation, Angiogenese und Apoptose beteiligt sind und die Initiation und Progression der Atherosklerose beeinflussen, stehen unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors.<sup>76,77</sup> Aktiviertes NFκB konnte in Makrophagen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen in humanen atherosclerotischen Läsionen sowie auch in Tiermodellen nachgewiesen werden.<sup>70,78,79</sup> In ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen mit cholesterinreicher Diät konnte zudem gezeigt werden, dass eine endothelspezifische Hemmung der NFκB-Aktivität zu einer signifikanten Reduktion atherosclerotischer Plaques führt. Begleitet wurde diese Beobachtung durch eine reduzierte Expression von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen in der Aorta sowie einer beeinträchtigten Makrophagenrekrutierung in die Plaques.<sup>69</sup>

#### 1.2.3.8 *Extrazelluläre signalregulierte Kinase*

Die extrazelluläre signalregulierte Kinase (ERK) gehört neben der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) und p38 zu den drei bedeutendsten Vertretern der MAPK-Familie. ERK setzt sich aus den zwei Isoformen ERK1 und ERK2 zusammen und wird im Allgemeinen auch als ERK 1/2 bezeichnet.<sup>80</sup> Die Aktivierung von ERK 1/2 steht am Ende einer Phosphorylierungskaskade unter Beteiligung der Kinasen Raf (rapidly accelerated fibrosarcoma) und MEK 1/2

(MAPK/ERK Kinase 1/2).<sup>81</sup> Initiiert wird diese Kinase-Kaskade durch das kleine G-Protein ras als Antwort auf verschiedene Mitogene, wie Wachstumsfaktoren, Thromboxan A<sub>2</sub>, Insulin, Endotoxine und oxidativen Stress. In Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass oxLDL über die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies zur Phosphorylierung und Aktivierung von ERK 1/2 führt, welche ihrerseits über die Phosphorylierung von Elk-1 und c-fos die Expression des Transkriptionsfaktors Aktivatorprotein-1 (AP-1) stimuliert.<sup>82,83</sup> Auf diese Weise reguliert ERK 1/2 die Expression proinflammatorischer Zytokine und MMPs vor dem Hintergrund der Atherogenese. Auch die Permeabilität der Endothelzellen gegenüber Makromolekülen wird durch ERK 1/2 reguliert.<sup>84</sup> Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen sind wichtige Ereignisse im Zuge der Atherogenese. In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von ERK 1/2 dafür verantwortlich ist und u.a. durch Insulin stimuliert werden kann.<sup>85</sup>

#### ***1.2.4 Akzeleration der Atherosklerose durch Diabetes mellitus***

Diabetes mellitus bezeichnet eine Gruppe von Stoffwechselerkrankungen, welche durch hohe Blutglucosewerte gekennzeichnet ist und neben Adipositas als klassischer Risikofaktor für die Entstehung von Atherosklerose gilt. Sowohl Diabetes mellitus als auch Adipositas korrelieren mit einem deutlich erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse wie Myokardinfarkt oder Schlaganfall.<sup>86,87</sup> Im Schnitt erkranken Patienten mit Diabetes mellitus zwei- bis dreimal häufiger an chronischen Gefäßkrankheiten als Nichtdiabetiker und weisen eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit auf, atherosklerotische Plaques zu entwickeln.<sup>88</sup> Diabetes mellitus und Adipositas sind ebenso wie die Atherosklerose selbst durch eine chronische systemische Inflammation gekennzeichnet, bei der sich erhöhte Serumspiegel von TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 und MCP-1 sowie verschiedener Adipokine wie Adiponectin, Leptin und Resistin nachweisen lassen.<sup>1,32,89</sup> Trotz diverser Hinweise auf eine enge Korrelation zwischen Hyperglykämie und Herz-Kreislauf-Erkrankungen, ist bisher wenig über den Mechanismus bekannt, durch den Hyperglykämie die Arteriosklerose beim Diabetiker beschleunigt.<sup>32,90-92</sup>

### **1.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren**

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) stellen die größte Familie der Membranproteine in Eukaryoten dar. Allein im Menschen sind derzeit etwa 800 Vertreter bekannt.<sup>93-96</sup> Aufgrund ihres vielfältigen Ligandenspektrums von Ionen über organische Duftstoffe, Amine, Peptide,

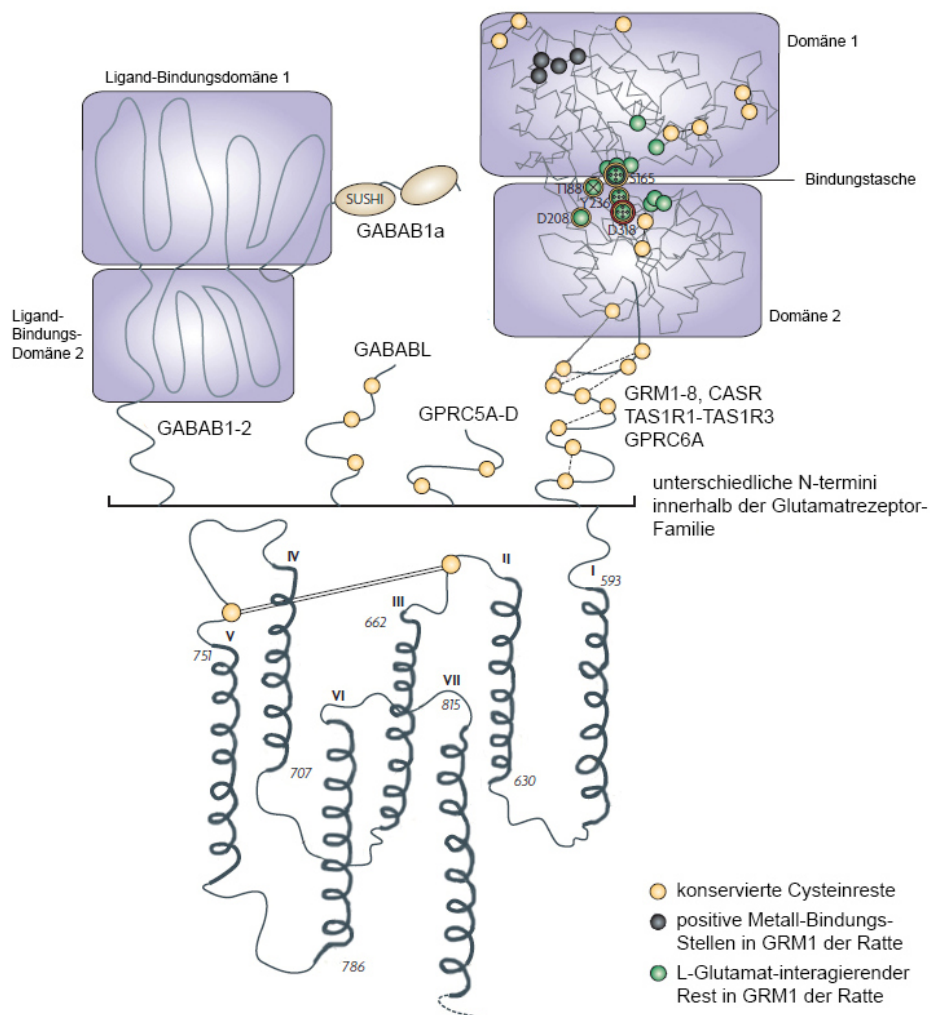
Proteine, Lipide bis hin zu Nukleotiden und Photonen, spielen GPCRs eine Schlüsselrolle bei der Signaltransduktion vieler physiologischer Prozesse und sind mit nahezu jedem Aspekt der menschlichen Pathophysiologie assoziiert.<sup>94,95,97</sup> Dies macht GPCRs, neben ihrer guten pharmakologischen Erreichbarkeit, zur bedeutendsten Zielgruppe von neuentwickelten Arzneien: Rund 34 % der von der *US Food and Drug Administration* im Jahre 2017 zugelassenen Medikamente sind Wirkstoffe, die an GPCRs angreifen. Weitere 321 Wirkstoffe befanden sich zu diesem Zeitpunkt bereits in klinischen Studien, die meisten davon zur Behandlung von Diabetes und Adipositas.<sup>97</sup> Derzeit befindet sich noch kein Arzneimittel zur Behandlung von Atherosklerose auf dem Markt, welches in GPCR-vermittelte Signalwege eingreift.

Als gemeinsames Merkmal wird die Gruppe der GPCRs durch sieben transmembrane  $\alpha$ -Helices sowie die Fähigkeit mit einem heterotrimeren Guaninnucleotid-bindenden Protein (G-Protein) zu interagieren charakterisiert.<sup>94,98</sup> Nach der Aktivierung des Rezeptors kommt es zur Dissoziation des gekoppelten G-Proteins in die aktiven Untereinheiten  $G\alpha$  und  $G\beta\gamma$ , welche wiederum die Aktivität verschiedener Effektormoleküle modulieren können. Welche Effektormoleküle aktiviert werden, ist dabei hauptsächlich vom jeweils an den Rezeptor gekoppelten  $G\alpha$ -Subtyp abhängig.<sup>98,99</sup> Anhand von phylogenetischen Analysen der sieben Transmembrandomänen, wird die Superfamilie der GPCRs in fünf Klassen unterteilt: Glutamat, Rhodopsin, Adhesion, Frizzled/Taste2 und Secretin.<sup>94</sup> Die Gruppe der Glutamatrezeptoren (Klasse C) umfasst insgesamt 22 Proteine, bestehend aus metabotropen Glutamatrezeptoren, GABA- (Gamma-Aminobuttersäure-) Rezeptoren, Geschmacksrezeptoren und dem calciumsensitiven Rezeptor sowie sieben sogenannten „orphan“ Rezeptoren, deren Ligand und zugehöriges G-Protein nach aktuellem Wissensstand noch nicht bekannt ist.<sup>100</sup>

### ***1.3.1 Der neu entdeckte Rezeptor GPRC5B***

Der „orphan“ Rezeptor der Klasse C, Gruppe 5, Subtyp B (GPRC5B) wurde im Jahre 2000 von Robbins und Kollegen entdeckt und aufgrund der Induzierbarkeit seiner mRNA-Expression durch all-trans-Retinsäure zunächst als RAIG-2 (retinoic acid inducible gene 2) bezeichnet.<sup>101</sup> Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der Klasse C, besitzen die „orphan“ Rezeptoren der RAIG-Unterfamilie (GPRC5A-D) nur eine kurze aminoterminal Region anstelle einer großen Venus-Fliegenfallen-Domäne (VFD) als extrazelluläre Ligandenbindungsstelle. Auch die cysteinreiche Region, welche die VFD mit der

transmembranen Domäne verbindet, fällt bei den „orphan“ Rezeptoren dieser Klasse deutlich kleiner aus (siehe Abb. 3).<sup>100</sup>



**Abb. 3: Schematische Darstellung der Glutamat-Rezeptorfamilie (Klasse C).** Der Untere Teil der Abbildung zeigt die schematischen Transmembrandomänen, während der obere Teil der Abbildung die unterschiedlichen Konformationen des extrazellulären Teils der Glutamatrezeptoren veranschaulicht. GPRC5B besitzt eine deutlich kleinere aminoterminal Domäne im Vergleich zu anderen Mitgliedern der Klasse C. Konservierte Cysteinreste sind als gelbe Kreise dargestellt. Modifiziert nach Lagerström et al.<sup>100</sup>

Die Transmembrandomänen sowie die C-terminale Domäne des humanen GPRC5B weisen eine hohe Sequenzidentität von 28 % mit dem im Fettkörper von *Drosophila melanogaster* exprimierten „orphan“ GPCR „Bride of sevenless“ (BOSS) auf. Obwohl auch bei diesem Rezeptor bisher keine Liganden identifiziert wurden, konnte kürzlich gezeigt werden, dass BOSS durch extrazelluläre Glucose aktiviert wird und den Zucker- und Lipidstoffwechsel in der Fruchtfliege reguliert. Der Rezeptor scheint zudem in den Insulinsignalweg einzugreifen.<sup>102</sup> Im Menschen wird GPRC5B nahezu ubiquitär exprimiert, u.a. in Zellen der Gefäßwand, einschließlich glatter Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen, aber auch in

Adipozyten und Makrophagen.<sup>103-105</sup> Evolutionär sind diese Zelltypen aus dem Fettkörper der Fruchtfliege hervorgegangen.<sup>106</sup> Dieser Zusammenhang legt nahe, dass der orthologe Rezeptor im Menschen ebenfalls in den Fettstoffwechsel eingreift: Eine genomweite Assoziationsstudie konnte den GPRC5B-Genort mit einer signifikant erhöhten Prädisposition für Adipositas in Verbindung bringen, dessen Ursache vermutlich in einer erhöhten Genkopienzahl liegt.<sup>107</sup> Unterstützt werden diese Daten durch Untersuchungen im Knockout-Mausmodell. So waren Tiere mit GPRC5B-Knockout (GPRC5B<sup>-/-</sup>) gegenüber den Wildtyp-Tieren vor diätinduzierter Fettleibigkeit und Insulinresistenz geschützt. GPRC5B<sup>-/-</sup> Mäuse wiesen zudem ein geringeres Ausmaß an infiltrierten Makrophagen sowie eine reduzierte Expression inflammatorischer Zytokine im weißen Fettgewebe auf. Mechanistisch waren diese Ergebnisse auf eine Interaktion zwischen GPRC5B und der Tyrosinkinase Fyn in Adipozyten zurückzuführen, was zu einer Aktivierung der IκBκ-NFκB-Signalkaskade führte.<sup>108</sup>

#### 1.4 Aufgabenstellung

Atherosklerose ist nach heutigem Kenntnisstand eine chronisch entzündliche Gefäßerkrankung. Die derzeit verfügbaren Therapeutika zur Behandlung von Atherosklerose beschränken sich weitgehend auf die Linderung von Bluthochdruck und Hyperlipidämie oder die Kontrolle der Hämostase zur Vermeidung thrombotischer Komplikationen. Sie greifen jedoch nicht direkt in die entzündlichen Mechanismen ein, welche die Atherosklerose vorantreiben.<sup>109-111</sup>

GPRC5B ist ein bisher wenig untersuchter „orphan“ Rezeptor, welcher u.a. in den Zellen des vaskulären Systems sowie in Makrophagen exprimiert wird. Er reguliert vermutlich NFκB-abhängige, inflammatorische Prozesse im Fettgewebe und greift in den Zucker- und Lipidstoffwechsel ein. Diabetes mellitus und Adipositas gelten als klassische Risikofaktoren für die Entstehung von Atherosklerose und sind, ebenso wie die Atherosklerose selbst, durch eine chronische systemische Inflammation gekennzeichnet.<sup>1,32,89</sup> Aufgrund der engen Verbindung der drei Erkrankungen, könnte GPRC5B möglicherweise auch im vaskulären System in entzündliche Prozesse involviert sein und auf diese Weise die Atherogenese beeinflussen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung eines möglichen Einflusses von GPRC5B auf die Entzündung der Gefäßwand und die Entstehung von Atherosklerose. Hierzu

sollten *in vitro* zunächst Untersuchungen an verschiedenen Zelltypen zur Klärung der folgenden Fragen durchgeführt werden:

- (1) Wird die Expression von GPRC5B durch proinflammatorische Zytokine oder Endotoxine reguliert?
- (2) Beeinflusst GPRC5B die Expression proatherogener Mediatoren?
- (3) Welche Signalwege sind bei einer möglichen proatherogenen Wirkung von GPRC5B beteiligt?

*In vivo* sollte der Einfluss von GPRC5B auf die atherosklerotische Plaquebildung im Mausmodell untersucht werden. Dazu sollte zunächst ein Knochenmarkstransfer von transgenen GPRC5B- und Wildtyp-Mäusen in *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse durchgeführt werden. Anschließend sollten Untersuchungen zur Klärung nachstehender Fragen erfolgen:

- (1) War der Knochenmarkstransfer erfolgreich?
- (2) Entwickeln *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse mit transgenem Knochenmark nach einer cholesterinreichen Diät größere atherosklerotische Läsionen im Bereich des Aortensinus als die Kontrolltiere?
- (3) Hat eine erhöhte GPRC5B-Expression in Knochenmark-abgeleiteten Zellen einen Einfluss auf die Infiltration von Monozyten/Makrophagen in die Plaques?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Anti-DDDK-tag mAb-Magnetic Beads	MBL
Axiovert 40 C Mikroskop	ZEISS
Cell Scraper 16cm 2-position blade	Sarstedt
Cellstar Zellkulturplatten 6-,12- und 24-well	Greiner Bio One
Cellstar Zellkulturschalen 10 cm Durchmesser	Greiner Bio One
CFX96 Real-Time PCR Detection System	BioRad
Chromatographie-Papier	Whatman
Cimarec™ Poly 15 Multipoint Rührer	Thermo Scientific
CM3050 S Kryostat	Leica Biosystems
CO <sub>2</sub> -Inkubator BBD 6220	Thermo Scientific
Coverslips 18 mm Durchmesser	Karl Hecht KG
DigiMax 29422 Digitaler Messschieber	Wiha
Duomax 1030 Plattformschüttler	Heidolph
DynaMag-2 Magnetic Particle Concentrator	Invitrogen
Elektroporationsküvette	PeqLab
Falcon™ Zellfilter 70 µm Porengröße	Thermo Scientific
FluorChemQ MultiImage III	Alpha Innotech
Fluoreszenzmikroskop BZ-9000	Keyence
Galaxy Ministar Mikrozentrifuge	VWR
Heraeus™ Brutschrank	Thermo Scientific
Heraeus™ Fresco 21 Zentrifuge	Thermo Scientific
Heraeus™ Megafuge™ 40R Refrigerated Centrifuge	Thermo Scientific
Heraeus™ Pico 17 Zentrifuge	Thermo Scientific
Herasafe KS 15 Klasse II Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific
Infinite M200 Pro Mikroplattenleser	Tecan Life Sciences
Laser Scanning Microscope 800	ZEISS
MaxQ 8000 inkubierter Orbitalschüttler	Thermo Scientific
MicroPulser™ Electroporator	BioRad



---

Mikroskop BX53	Olympus
Mini PROTEAN Tetra System	BioRad
Mr. Frosty™ Freezing Container	Thermo Scientific
NanoDrop 2000 Spektrophotometer	Thermo Scientific
Neubauer- Zählkammer	Assistent
Nitrozellulose-Membran	Protran
Objektträger Superfrost® Plus	Thermo Scientific
Pipetten Eppendorf-Reference	Eppendorf
Pipettenspitzen Biosphere Filter Tip	Eppendorf
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Power Pac HC	BioRad
Power Pack P25	Biometra
PP-Mikroplatte 96-well	Greiner Bio One
Precellys 24 homogenizer	PeqLab
Precellys Zirconiumoxid-Beads 1,4 mm	Bertin Bioreagent
qRT-PCR Platten, 96-well, semi-skirted	BioRad
Quantum ST5 Geldokumentation	Vilber
RCT Basic Magnetrührer	IKA
Reagiergefäße 0,5ml, 1,5ml, 2ml	Sarstedt
Röhrchen 15ml, 50ml	Sarstedt
Roller Mixer SRT9	Stuart
Rotator für Probenröhrchen SB3	Stuart
Serologische Pipetten	Sarstedt
Seven Easy pH-Messgerät	Mettler-Toledo
SterilGARD Hood	The Baker Company
Subcell® Model 192 Cell	BioRad
TE1502S Präzisionswaage	Sartorius
Thermal Personal Cyclor	Biometra
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Titan PCR-Arbeitsstation	Scanlaf
Vacusaft comfort Absaugsystem	Integra Biosciences
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad 3044	Köttermann
Western Typ Diät	Altromin
X-RAD 320ix - Precision X-Ray	Accela
Zellkulturflaschen 75cm <sup>2</sup> , 175cm <sup>2</sup>	Sarstedt
Zentrifuge 5810	Eppendorf

### 2.1.2 Chemikalien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
2-Mercaptoethanol	BioRad
2xYT-Medium	Carl Roth
Acid Fuchsin	Sigma-Aldrich
Agarose	Biozym
Albumin bovine Fraction V, pH 7	Merck KGaA
Alcian Powder	Sigma-Aldrich
Ammoniumhydroxid	Sigma-Aldrich
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth
Avertin	Sigma-Aldrich
Bouin's Solution	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Carbenicillin	Sigma-Aldrich
Ciprobay (Ciprofloxacin)	Bayer Vital
Crocein Scarlett 3B	Chempur
Cryo-SFM	PromoCell
Cytoseal Eindeckmedium	Thermo Scientific
DAPI	Sigma-Aldrich
DEPC	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid	Carl Roth
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Carl Roth
DMEM	PAA Laboratories
DreamTaq 10x Puffer grün	Thermo Scientific
EDTA	Serva Electrophoresis
Essigsäure	Carl Roth
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Invitrogen
FCS Gold	PAA Laboratories
Ferric Chlorid Hexahydrate	Sigma-Aldrich
Fluor <sup>TM</sup> Safe Eindeckmedium	Merck KGaA
G418 Sulfate (Geneticin)	InvivoGen
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific
Glycerin	Carl Roth
Glycin	Carl Roth

---

Hefeextrakt	Carl Roth
Hematoxylin	Sigma-Aldrich
Heparin-Natrium Injektionslösung	LEO Pharma
Hyper-IL-6	Prof. Rose-John
Immunoselect Antifading Mounting Medium DAPI	Dianova
Intraperitoneal Avertin anesthetic	Sigma-Aldrich
Iodine	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Carl Roth
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth
Kanamycin	Sigma-Aldrich
L-Glutamin	Invitrogen/ GIBCO
Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen
LPS	Santa Cruz
Methanol	Carl Roth
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumdeoxycholat	Carl Roth
Nonidet P40	AppliChem
Opti-MEM	Invitrogen/ GIBCO
PageRuler Plus prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Paraformaldehyd	Carl Roth
PBS	Invitrogen/ GIBCO
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen/ GIBCO
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Carl Roth
Phosphotungstic Acid	Sigma-Aldrich
PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat)	Sigma-Aldrich
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Potassium Iodide	Chempur
Recombinant Human Interleukin-6	InvivoGen
Recombinant Human TNF alpha	HumanZyme
Roti®-Block 10x	Carl Roth
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth
RPMI 1640 Medium ATCC Modification	Invitrogen/ GIBCO
Saffran	Sigma-Aldrich
Salzsäure	Carl Roth
SDS	Serva Electrophoresis

sgp130 Fc	Prof. Rose-John
siRfficient™ siRNA Transfection Reagent	MBL
Sodiumthiosulfat	Sigma-Aldrich
Spectinomycin	Sigma-Aldrich
Stop Solution for TMB Substrate	BioLegend
Sucrose	Sigma-Aldrich
TEMED 99% p.a. Electrophoresis	Carl Roth
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Science Services
Tris-Base	Carl Roth
Tris-HCl	Carl Roth
Triton X 100	Carl Roth
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Trypsin Neutralizing Solution (TNS)	PromoCell
Trypsin/EDTA Solution (10x)	Merck KGaA
Trypton	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich
Vascular Cell Basal Medium	ATCC
Xylol	Carl Roth

### 2.1.3 Puffer und Lösungen

#### Bezeichnung

2YT-Medium  
 Alcianblau-Lösung (1 %)  
 Alkalische Alkohollösung  
  
 Alkoholische Saffranlösung  
 Blockpuffer A  
 (für Immunhistochemie)  
 Blockpuffer B  
 (für Immunhistochemie)  
 BSA-Lösung (1 %)  
 Crocein-Scarlet Lösung  
  
 Crocein-Scarlet-Säurefuchsin-Lösung

#### Chemikalien

3,1 % (w/v) 2xYT-Medium in dest. H<sub>2</sub>O  
 1 % Alcian Blue in dest. H<sub>2</sub>O  
 90 % (v/v) Ethanol,  
 10 % (v/v) Ammonium Hydroxid  
 6 % (w/v) Saffran in Methanol  
 2,5 % (w/v) BSA in PBS,  
 0,1 % Triton X 100  
 3 % (w/v) BSA in PBS,  
 0,05 % Triton X 100  
 1 % (w/v) BSA in PBS  
 1 % (w/v) Crocein Scarlett 3B,  
 0,5 % (v/v) Essigsäure  
 80 % (v/v) Crocein-Scarlet Lösung,  
 20 % (v/v) Säurefuchsin-Lösung

---

Eisen-Chlorid-Lösung	2,5 % (w/v) Eisen-Chlorid Hexahydrat, 1 % (v/v) Salzsäure
Hematoxylin-Alkohol	2 % (w/v) Hematoxylin in Ethanol
Iodine-Lösung	2 % (w/v) Iodine, 4 % (w/v) Potassium Iodid
Laemmli-Puffer (4x)	250 mM Tris (pH 6,8), 5 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Glycerin, 0,005 % (w/v) Bromphenolblau, 10 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
Laufpuffer (10x)	250 mM Tris, 1,9 M Glycin, 1 % (w/v) SDS
LB-Medium (Luria-Bertani, pH 7)	1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % NaCl
Milch-Lösung (5 %)	5 % (w/v) Milchpulver in TBST
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,4)
PFA-Lösung (2 bzw. 4 %)	2 bzw. 4 % (w/v) PFA in PBS
RIPA-Puffer (pH 7,5)	50 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 % (v/v) Nonidet P40, 0,5 % (w/v) Natriumdeoxycholat, 1 % (v/v) Phosphataseinhibitor 2 und 3 1 Tablette Proteaseinhibitor pro 50 ml
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl (pH6,8)
Säurefuchsin-Lösung	1 % (w/v) Acid Fuchsin, 0,5 % (v/v) Essigsäure
SNET-Puffer (pH 8)	20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 400 mM NaCl, 1 % (w/v) SDS
TAE-Puffer (50x; pH 8)	3 M Tris,

	5,71 % (v/v) Essigsäure,
	0,05 M EDTA
TBST-Puffer (pH 7,5)	100 mM Tris (pH 7,5),
	0,9 % (w/v) NaCl,
	0,4 % (v/v) Tween 20
Transferpuffer	20 % Methanol,
	25 mM Tris,
	192 mM Glycin,
	0,037 % (w/v) SDS
Trenngelpuffer	1,5 M Tris (pH 8,8)
Weigert's-Lösung	50 % (v/v) Hematoxylin-Alkohol,
	33 % (v/v) Eisen-Chlorid-Lösung,
	16 % (v/v) Iodine-Lösung

### 2.1.4 Enzyme

Bezeichnung	Bezugsquelle
Complete Proteinase Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics
DreamTaq DNA-Polymerase	Thermo Scientific
<i>EcoRV</i> (40 U/ $\mu$ l)	Roche Diagnostics
Phosphatase-Inhibitor 2 und 3	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Invitrogen
Trypsin-EDTA-Lösung 0,25% (w/v)	Invitrogen/GIBCO

### 2.1.5 Zellen und Tiere

Bezeichnung	Bezugsquelle
bEnd.3	ATCC
GPRC5B-transgene (Tg5B) Mäuse	Hirabayashi (Japan)
Hek 293-A	DSMZ
HUVEC	ATCC
LDL-Rezeptor-defiziente ( <i>Ldlr</i> <sup>-/-</sup> ) Mäuse	Jackson Laboratory
MOVAS	ATCC
THP-1	ATCC

### 2.1.6 Antikörper

Nachstehend sind die in dieser Arbeit für Immunfluoreszenz (IF), Western Blot (WB) und Virustitration verwendeten primären und sekundären Antikörper aufgelistet. Dabei sind einige Antikörper an Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorescein isothiocyanate (FITC), Alexa Flour (AF), Cyanin 5 (Cy5)) oder an die Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) gekoppelt.

#### 2.1.6.1 Primäre Antikörper

Bezeichnung	Katalog Nr.	Spezies	Klonalität	Verdünnung	Bezugsquelle
Adenovirus Hexon, FITC	B65140F	Ziege	Poly	1:50 (Virustiter)	Meridian
Fyn	4023	Hase	Poly	1:1000 (WB)	Cell Signaling
GAPDH	G8795	Maus	Mono	1:20000 (WB)	Sigma-Aldrich
GPRC5B	-	Hase	Poly	1:8000 (WB)	Hirabayashi
GPRC5B	Sc-135260	Hase	Poly	1:20 (IF)	Santa Cruz
ICAM-1	sc-1511	Ziege	Poly	1:500 (WB)	Santa Cruz
ICAM-1	4915	Hase	Poly	1:1000 (WB)	Cell Signaling
IL-6		Hase		1:1000 (WB)	
Mac-2	ACL8942AP	Ratte	Mono	1:2000 (IF)	Accurate Chemical
MAPK p42/44	4696	Maus	Mono	1:2000 (WB)	Cell Signaling
MAPK p42/44 P	4370	Hase	Mono	1:2000 (WB)	Cell Signaling
MMP-9	Ab38898	Hase	Poly	1:500 (IF) 1:1000 (WB)	Abcam
pStat3 (Y705)	9145	Hase	Mono	1:2000 (WB)	Cell Signaling
VCAM-1	ab134047	Hase	Mono	1:7500 (WB)	Abcam
$\alpha$ -Tubulin	T5168	Maus	Mono	1:8000 (WB)	Sigma-Aldrich
$\beta$ -Aktin	A5441	Maus	Mono	1:20000 (WB)	Sigma-Aldrich

#### 2.1.6.2 Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Katalog Nr.	Spezies	Klonalität	Verdünnung	Bezugsquelle
anti-goat IgG, HRP	sc-2304	Affe	Poly	1:10000 (WB)	Santa Cruz
anti-mouse IgG, AF 546	A10036	Affe	Poly	1:2000 (WB)	Invitrogen
anti-mouse IgG, HRP	sc-2302	Ziege	Poly	1:10000 (WB)	Santa Cruz
anti-rabbit IgG, AF 488	A21441	Huhn	Poly	1:500 (IF)	Invitrogen
anti-rabbit IgG, AF 546	A10040	Affe	Poly	1:300 (IF)	Invitrogen
anti-rabbit IgG, HRP	sc-2305	Affe	Poly	1:10000 (WB)	Santa Cruz
anti-rat IgG, Cy5	112-175-167	Ziege	Poly	1:300 (IF)	Dianova

### 2.1.7 Sequenzen der verwendeten Primer

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics bezogen. Die Sequenzen sind in der nachstehenden Tabelle aufgeführt (siehe Tab. 1).

Tab. 1: Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer

Oligonukleotid	Oligonukleotidsequenz (5' → 3')	
18S rRNA	Fw:	GCACGGCCGGTACAGTGAAA
	Rv:	GCGCCCGTCGGCATGTATTA
hG5B	Fw:	CAGCTGCCGCGGGCCTATAT
	Rv:	GGGATGGTCCCACCGTTGAGC
hICAM-1	Fw:	TCCAGACCTTTGTCCTGCC
	Rv:	GTCGTTGCCATAGGTGACTG
hIL-1 $\beta$	Fw:	AATCTTCATTGCTCAAGTGTCTG
	Rv:	GTAGTGGTGGTCGGAGATTC
hVCAM-1	Fw:	GAATGGGAAGGTGACGAATG
	Rv:	AGATTCACAAGTTGCTGTGC
mG5B	Fw:	CTTACAGCTAGCACATCACCATGC
	Rv:	CACACAGCCCTAGCTTTCTTTCC
mICAM-1	Fw:	ACCAGGAATGTGTACCTGAC
	Rv:	TGAGTTTTATGGCCTCCTCC
mIL-6	Fw:	GGAAATGAGAAAAGAGTTGTGC
	Rv:	GTACTCCAGAAGACCAGAGG
mTNF $\alpha$	Fw:	GACCCTCACACTCAGATCATCTTCT
	Rv:	CCACTTGGTGGTTTGCTACGA
mVCAM-1	Fw:	TGAAGGGATTAACGAGGCTG
	Rv:	CATTTCCACAAGTGCAGGAG
Tg5B	Fw:	AAGAAGAGGCTGTGCTTTG
	Rv:	GATGATGAAGGCAAACGTC

### 2.1.8 Vektoren, siRNAs und Mikroorganismen

Bezeichnung	Bezugsquelle
AllStars Neg. Control siRNA	Qiagen
<i>E. coli</i> DH10B, electro-competent	Life-Technologies
Fyn siRNA (m, h)	Santa Cruz
GPRC5B Adenovirus	ABM
GPRC5B siRNA (m, h)	Santa Cruz
LacZ Adenovirus	ABM
pBROAD3-mcs	InvivoGen



pCMV6-Entry (C-terminal Myc and DDK Tagged)	OriGene
pCMV6-hFyn (C-terminal Myc and DDK Tagged)	OriGene
pCMV6-hG5B (C-terminal Myc and DDK Tagged)	OriGene
pGL4.32[luc2P/NFκB-RE/Hygro]	Promega
pRL-TK	Promega

### 2.1.9 Assays und Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega
ECL-Select detection system	GE Healthcare
ELISA MAX™ Deluxe	BioLegend
Endothelial Cell Growth Kit-VEGF	ATCC
EnzChek® Elastase Assay Kit (E-12056)	Thermo Scientific
EnzChek® Gelatinase/Collagenase Assay Kit	Thermo Scientific
Express Sybr® GreenER™ qPCR SuperMix	Thermo Scientific
Mycoplasmacheck	GATC Biotech
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Qiagen PLUS Plasmid Midi Kit	Qiagen
RNase-Free DNase Set	Qiagen
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
Superscript III First Strand Kit	Invitrogen

### 2.1.10 Software

Bezeichnung	Bezugsquelle
AlphaView v.3.0	ProteinSimple
BZ-II Analyzer v.1.0	Keyence
CorelDraw Graphics Suite X7	Corel Corporation
GraphPad PRISM™ v5.0	GraphPad Software, San Diego, USA
ImageJ	National Institutes of Health
Magellan v.7.2	Tecan Life Sciences
SigmaPlot v.11.1	Systat Software Inc.
Vision-Capt v.16.15	Analisis
ZEN v.2.3 (blue edition)	ZEISS

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mikrobiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Herstellung von LB-Agarplatten

Zur Herstellung von Agarplatten wurde LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar versetzt und autoklaviert. Anschließend war die Lösung im Wasserbad auf 55 °C herunterzukühlen um eine Zersetzung des im Folgenden hinzugegebenen Antibiotikums zu verhindern. Je nach Selektionswunsch wurden 100 µg/ml Carbenicillin oder 50 µg/ml Kanamycin bzw. Spectinomycin zur Lösung hinzugegeben und diese anschließend unter einer sterilen Werkbank in 10 cm Petrischalen gefüllt. Die Lagerung der abgekühlten Agarplatten erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C.

#### 2.2.1.2 Herstellung elektrokompenter *E. coli* DH10B

Für die Transformation mittels Elektroporation werden Bakterien benötigt, die in der Lage sind, Plasmide nach der Applikation hoher Spannungen aus dem Kulturmedium aufzunehmen. Hierzu wurde zunächst eine Vorkultur mit 30 ml 2YT-Medium und 30 µl *E. coli* DH10B angesetzt. Diese wurde über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Am Folgetag wurden vier 1L-Erlenmeyerkolben mit je 500 ml frischem 2YT-Medium befüllt und mit je 7 ml der Vorkultur beimpft. Die anfängliche optische Dichte (OD) wurde am Photometer bei 600 nm gemessen und sollte bei ca. 0,1 liegen. Der Ansatz wurde bei 37 °C und 200 rpm inkubiert bis eine OD zwischen 0,4 und 0,8 gemessen werden konnte (ca. 2 h). Anschließend wurde die Kultur auf vier 500 ml-Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und für 10 min auf Eis inkubiert. Durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C wurden die Bakterien sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden in je 250 ml eiskaltem destilliertem Wasser resuspendiert und jeweils zwei gelöste Pellets in einem 500 ml-Röhrchen vereint. Nach einer erneuten 15-minütigen Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C wurden die Pellets in je 20 ml 10 %iger Glycerinlösung resuspendiert und in einem 50 ml-Röhrchen vereint. Die Suspension wurde wie zuvor zentrifugiert und das Sediment in 3 ml steriler, 10 %iger Glycerinlösung resuspendiert. Die Bakterienlösung wurde nun in 50 µl Portionen in Reaktionsgefäße gefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 2.2.1.3 Transformation von *E. coli* DH10B

Für die Transformation eines Plasmids in das elektrokompetente Bakterium *E. coli* DH10B wurden 50 µl *E. coli* DH10B mit 5 ng Plasmid-DNA versetzt, durch Auf- und Abpipettieren gemischt und der Transformationsansatz in eine bei -20 °C vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte mittels Micro Pulser Electroporator bei einer Spannung von 1,8 V und einer Pulslänge von 3-5 ms. Anschließend wurde der Transformationsansatz mit 1 ml LB-Medium versetzt, in ein Reaktionsgefäß überführt und im Thermomixer für 1 h bei 37 °C und 700 rpm schüttelnd inkubiert. Schließlich wurde der Transformationsansatz zur Selektion erfolgreich transformierter *E. coli* DH10B mit einer Impföse auf eine das entsprechende Antibiotikum enthaltene LB-Agarplatte ausgestrichen und diese über Nacht bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Morgen wurde die bewachsene LB-Agarplatte mit Parafilm abgedichtet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

### 2.2.1.4 Kultivierung von Bakterien in Flüssigmedium

Die gewünschte Menge an LB-Medium wurde mit dem entsprechenden Antibiotikum in der oben genannten Konzentration versetzt. Die Beimpfung des Mediums erfolgte mit einer vereinzelt Bakterienkolonie, welche mit Hilfe einer Pipettenspitze von einer bewachsenen Agarplatte entnommen wurde, oder mit wenigen µl einer Bakterienlösung. Die Kultivierung erfolgte horizontal schüttelnd bei 37 °C und 180 rpm für 14-16 h oder über Nacht.

### 2.2.1.5 Ansetzen einer Bakterienstocklösung in Glycerol

Für die Lagerung des transformierten Bakteriums wurde eine Stocklösung in Glycerol angesetzt. Dazu wurden 500 µl LB-Medium mit 500 µl 60 %igem Glycerol versetzt. Anschließend wurde 1 ml der Bakterienkultur in ein Kryoröhrchen gegeben und mittels Zentrifugation sedimentiert. Der Mediumüberstand wurde abgenommen und das Sediment in 1 ml des zuvor angesetzten glycerolhaltigen Mediums gelöst. Die Lagerung der Bakterienstocklösung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

## 2.2.2 Zellkulturtechnik

### 2.2.2.1 Kultivierung muriner und humaner Zellen

Die Entstehung von Atherosklerose stellt einen komplexen Vorgang dar, bei dem verschiedene Zelltypen des vaskulären Systems sowie Zellen des Immunsystems involviert

sind. Zur Untersuchung der Rolle von GPRC5B bei der Entstehung von Atherosklerose wurden daher für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente verschiedene adhärenzwachsende Zelllinien (bEnd.3, MOVAS) und primäre Zellen (HUVEC) des vaskulären Systems sowie eine in Suspension wachsende Monozytenzelllinie (THP-1) verwendet. Sie stellen jeweils gängige Zellkulturmodelle zur Untersuchung der Atherosklerose *in vitro* dar.<sup>112-120</sup> Alle verwendeten Zellen sind kommerziell verfügbar und wurden eigens für diese Arbeit von der American Type Culture Collection (ATCC), der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bzw. von PromoCell bezogen (siehe Abschnitt 2.1.5).

### bEnd.3

Bei der Zelllinie bEnd.3 handelt es sich um eine mikrovasculäre Endothelzelllinie aus dem zerebralen Kortex einer 6 Wochen alten BALB/c-Maus. Sie wurde 1990 durch R. Montesano etabliert und besitzt eine für Endothelzellen typische „Kopfsteinpflaster-Morphologie“.<sup>121</sup> Die Kultivierung der bEnd.3 Zellen erfolgte in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 25 mM Glucose und 10 % Fötalem Kälberserum (FKS).

### MOVAS

Die Zelllinie MOVAS wurde aus der glatten Muskulatur der Aorta einer C57BL/6 Maus isoliert und erstmalig beschrieben von Afroze et al.<sup>122,123</sup> Sie weist eine für glatte Muskelzellen charakteristische spindelförmige Morphologie auf. Die Zelllinie MOVAS wurde in DMEM mit 25 mM Glucose, 10 % FKS und 0,2 mg/ml G418 kultiviert.

### HUVEC

Zur Validierung der mit Hilfe der bEnd.3 Zellen erhobenen Daten wurden zusätzlich primäre humane Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) verwendet. Die Kultivierung erfolgte in Vascular Cell Basal Medium, welches komplettiert mit dem Endothelial Cell Growth Kit-VEGF 2% FKS und 5,77 mM Glucose enthielt.

### THP-1

Die monozytäre Suspensionszelllinie THP-1 entstammt ursprünglich von einem 1-jährigen Jungen mit akuter Monozytenleukämie und wurde 1980 von S. Tsuchiya etabliert.<sup>124</sup> Die Kultivierung der Zellen erfolgte in ATCC-modifiziertem Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI-1640) mit 25 mM Glucose, 10 % FKS und 0,05 mM 2-Mercaptoethanol.

### Hek 293-A

Bei der Zelllinie Hek 293-A handelt es sich um eine humane, embryonale Nierenzelllinie, welche von Graham et al. mit dem Adenovirus Typ 5 transformiert wurde.<sup>125</sup> In der vorliegenden Arbeit diente sie zur Vervielfältigung von Adenoviren. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM Advanced mit 4 % FKS.

Die Kultivierung aller verwendeten Zellen erfolgte bei 37 °C, 80 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank. In regelmäßigen Abständen wurden die Zellkulturüberstände mittels Mycoplasmacheck Assay durch die GATC Biotech AG auf Mykoplasmenfreiheit geprüft. Die Entnahme und Aufbereitung der Zellkulturüberstände erfolgte dabei nach exakten Angaben der Firma. Für die durchgeführten Experimente wurden nur Zellen in niedrigen Passagen verwendet.

#### *2.2.2.2 Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen*

Die Kryokonservierung von Zellkulturen dient der Langzeitlagerung der Zellen bei -196 °C im Stickstofftank. Zum Schutz gegen Eiskristallbildung und Dehydratation der Zellen wurde das jeweilige Kulturmedium (Vollmedium) der Zelllinie mit 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt. Die Kryokonservierung der in dieser Arbeit verwendeten primären Zellen erfolgte hingegen mit dem chemisch definierten, serumfreien Cryo-SFM der Firma PromoCell.

Zur Volumenreduktion wurden die Zellen zunächst mittels Zentrifugation für 5 min bei 18.000 g sedimentiert und anschließend in der gewünschten Menge Einfriermedium resuspendiert. Pro Cryoröhrchen wurde 1 ml der Zellsuspension gegeben und im Mr. Frosty™ Freezing Container über Nacht bei -80 °C gelagert. Dies ermöglichte eine kontrollierte, langsame Einfrierphase, bei der die Temperatur der Zellsuspension um nur 1 °C pro Minute abnahm. Anschließend konnten die Cryoröhrchen zur Langzeitlagerung in den Stickstofftank überführt werden.

Zum Revitalisieren der Zellen wurde die gefrorene Zellsuspension bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und sofort in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Die DMSO-haltige Zellsuspension wurde anschließend mit zuvor auf 37 °C erwärmtem Vollmedium verdünnt. Die Verdünnung erfolgte langsam und tröpfchenweise um das Platzen der Zellen auf Grund von Osmose zu verhindern. Schließlich wurde die Zellsuspension in eine T75-Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach ca. 16 h wurde das Kulturmedium durch frisches Medium ersetzt um das für Zellen toxische DMSO zu entfernen.

### 2.2.2.3 Passagieren und Aussäen von Zellen

Zum Passagieren der adhären wachsenden Zelllinien bEnd.3 und MOVAS sowie der primären HUVECs wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml frischer phosphatgepufferter Saline (PBS) pro T75-Zellkulturflasche gewaschen. Das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden erfolgte mit 3 ml einfach konzentriertem Trypsin/EDTA für 3 min bei 37 °C im Brutschrank bei den Zelllinien bzw. bei Raumtemperatur bei den primären Zellen. Die Reaktion wurde mit 10 ml FKS-haltigem Medium abgestoppt und die Zellsuspension in ein Falconröhrchen überführt. Bei den in Suspension wachsenden Zellen der Linie THP-1 war eine Inkubation mit Trypsin/EDTA nicht notwendig, sodass die Zellsuspension direkt in ein Falconröhrchen gegeben werden konnte. Von der Zellsuspension wurden jeweils 10 µl entnommen, mit 10 µl Trypanblau versetzt und für die Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer verwendet. Die restliche Zellsuspension wurde für 5 min bei 18.000 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet entsprechend der gewünschten Zellkonzentration in frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden je nach Zelllinie und Experiment in unterschiedlicher Dichte in verschiedene Zellkulturplatten ausgesät (siehe Tab. 2).

Tab. 2: Versuchsabhängige Zellzahl und Volumina für die Aussaat in verschiedene Kulturplatten

Zelltyp	Plattentyp	Experiment	Zellen/ml	Medium/Vertiefung
bEnd.3	12-Loch-Platte	Luciferaseexperiment	$9 \cdot 10^4$	1 ml
	12-Loch-Platte mit Coverslips	Immunfluoreszenz	$1 \cdot 10^4$	1 ml
	6-Loch-Platte	RNA/Protein Isolierung	$9 \cdot 10^4$	2 ml
	10 cm Schale	Ko-Immunpräzipitation	$9 \cdot 10^4$	12 ml
HUVEC	12-Loch-Platte mit Coverslips	Immunfluoreszenz	$3 \cdot 10^4$	1 ml
	6-Loch-Platte	RNA/Protein Isolierung	$5,5 \cdot 10^4$	2 ml
MOVAS	6-Loch-Platte	virale Infektion	$5 \cdot 10^4$	2 ml
	12-Loch-Platte mit Coverslips	Immunfluoreszenz	$8 \cdot 10^4$	1 ml
THP-1	6-Loch-Platte	Differenzierung	$2 \cdot 10^5$	5 ml

### 2.2.2.4 Differenzierung von Monozyten in Makrophagen

THP-1 Zellen sind einzelne, runde Suspensionszellen, welche mittels Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) in Makrophagen differenziert werden können. Die Differenzierung zu Makrophagen geht mit einer Änderung des Phänotyps einher: Die Zellen adhäreren am Boden der Kulturplatten und weisen eine flache, amöboide Form auf mit ausgebildetem

Golgiapparat, rauem Endoplasmatischem Retikulum und einer Vielzahl an freien Ribosomen im Zytoplasma.<sup>126</sup> Untersuchungen zur Funktion von Makrophagen werden *in vitro* üblicherweise an PMA-behandelten THP-1 Zellen durchgeführt.<sup>120</sup> In der vorliegenden Arbeit wurden THP-1 Monozyten für die Differenzierung in ATCC-modifiziertem RPMI-1640 Medium mit 200 nM PMA ausgesät. Nach 72 h hatten sich die Suspensionszellen an den Boden der Kulturschale angeheftet. Das Medium wurde abgesaugt und durch frisches Medium ohne PMA ersetzt. Nach einer Inkubation von weiteren fünf Tagen zeigten die Zellen einen ausgeprägten, für Makrophagen typischen Phänotyp und konnten für weitere Versuche verwendet werden.

#### 2.2.2.5 *Stimulationsversuche*

Zur Untersuchung des Einflusses von proinflammatorischen Stimulanzien auf die GPRC5B-Expression wurden verschiedene Stimulationsversuche unter Verwendung der Zytokine IL-6 und TNF $\alpha$  sowie des Endotoxins LPS in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen durchgeführt. Jedoch exprimieren nicht alle Endothelzellen den membranständigen IL-6 Rezeptor.<sup>127</sup> Einige Endothelzellarten lassen sich nur in Kombination mit dem auch endogen vorkommenden löslichen IL-6R aktivieren.<sup>127</sup> Da diesbezüglich für die Zelllinie bEnd.3 keine Daten vorlagen, wurde zunächst die Stimulierbarkeit dieser Zelllinie mit IL-6 über die Analyse des Phosphorylierungsstatus von STAT3 überprüft. Dazu wurden bEnd.3-Zellen 24 h nach der Aussaat mit Kulturmedium ohne FKS gewaschen und anschließend für 3 h unter Verwendung des gleichen Mediums inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 15 min mit IL-6 bzw. Hyper-IL-6 (Fusionsprotein aus IL-6 und löslichem IL-6R) alleine oder in Kombination mit 500 ng/ml des Inhibitors sgp130Fc (Fusionsprotein aus sgp130 und Fc-Teil des humanen Immunglobulins G1) stimuliert und für die Proteinisolierung geerntet.

Für die Untersuchung des Einflusses verschiedener atheroskleroserelevanter proinflammatorischer Stimulanzien auf die Expression von GPRC5B wurde das Kulturmedium 24 h nach der Zellaussaat ohne vorherige „Hungerphase“ durch frisches Vollmedium ersetzt, welches zuvor mit IL-6, TNF $\alpha$  oder LPS versetzt worden war. Die Dauer der Inkubationszeit sowie die Konzentration der jeweils verwendeten Stimulantien variierten in Abhängigkeit des jeweiligen Experiments und der verwendeten Zellen (siehe Tab. 3). Als Kontrolle wurden unstimulierte Zellen verwendet.

Tab. 3: Konzentration und Inkubationsdauer der verwendeten proinflammatorischen Stimulanzen

<b>Stimulanz</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Inkubationsdauer</b>
LPS	0,1, 1 bzw. 10 µg/ml	2 h, 4 h, 5 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h
TNF $\alpha$	100 ng/ml	12 h, 24 h, 48 h
IL-6	5, 10 bzw. 100 ng/ml	24 h, 48h
Hyper-IL-6	10 ng/ml	24 h, 48 h
sgp130Fc	500 ng/ml	24 h, 48 h

#### 2.2.2.6 *Transfer von Nukleinsäuren mittels Transfektion*

Zur funktionellen Analyse von GPRC5B wurden verschiedene Gene durch den Transfer von Plasmiden bzw. kleinen nicht-kodierenden RNA-Sequenzen (hier: Small interfering RNA, siRNA) in Zellen überexprimiert bzw. herunterreguliert. Der Gentransfer mittels Transfektion erfolgte unter Verwendung von kationischen Lipiden und ist im Folgenden für die Durchführung in bEnd.3-Zellen und 6-Loch-Platten beschrieben. Für die Verwendung größerer bzw. kleinerer Kulturschalen wurde die eingesetzte Menge an Nukleinsäuren und Transfektionsreagenz der jeweils pro Vertiefung ausgesäten Gesamtzellzahl angepasst.

Unmittelbar vor der Transfektion wurde der Mediumüberstand in den Zellkulturplatten abgesaugt und durch frisches Medium ohne Antibiotikum ersetzt. Zur Überexpression von Genen wurden pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte 5 µg Plasmid-DNA und 15 µl des Transfektionsreagenzes Lipofectamine 2000 eingesetzt. Die Zellen wurden nach exakten Angaben des Herstellers transfiziert. Für die Präinkubation des DNA-Lipidgemisches wurde OptiMem verwendet. Zur RNA-Interferenz wurden pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte 400 pmol siRNA und 23 µl des Transfektionsreagenzes siRfficient eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach exakten Angaben des Herstellers. Um die Toxizität der Transfektionsreagenzien auf die Zellen möglichst gering zu halten wurde das Kulturmedium 5 h nach der Zugabe von Lipofectamine 2000 bzw. 18 Stunden nach der Zugabe von siRfficient durch frisches Medium mit 2 % FKS ersetzt. Die plasmid-transfizierten Zellen wurden für die RNA-Isolierung 24 h nach Gentransfer bzw. für die Proteinisolierung 48 h nach Gentransfer geerntet. SiRNA-transfizierte Zellen wurden jeweils 24 h länger inkubiert.

Jede Zelllinie besitzt eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber der Toxizität von Transfektionsreagenzien und lässt sich zudem unterschiedlich gut transfizieren. Daher ist eine Optimierung der Transfektionsbedingungen (Nukleinsäuremenge, Art und Menge des Transfektionsreagenzes) für jede Zellart von Nöten. Nachstehend sind die verwendeten,



optimierten Bedingungen für die Transfektion von HUVECs und MOVAS mit siRNA in 6-Loch-Platten aufgeführt (siehe Tab. 4).

Tab. 4: Benötigte Menge an Nukleinsäuren und Transfektionsreagenz pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte für die RNA-Interferenz

Zellart	Menge an Nukleinsäuren	Menge an Lipofectamine 2000
HUVECs	200 pmol siRNA	2 µl
MOVAS	200 pmol siRNA	5 µl

### 2.2.2.7 *Gentransfer mittels Infektion*

Der Gentransfer mittels viraler Infektion zeichnet sich gegenüber der Transfektion durch eine einfachere und weniger zeitaufwendige Durchführung, einfachere Optimierbarkeit, sowie eine höhere Transfereffizienz aus. Diese Methode wurde jedoch nur für den Gentransfer in MOVAS angewendet, da sich nur diese Zellen gut mit Adenoviren infizieren ließen. Vor der viralen Infektion wurden die Zellen einmal mit Hungermedium (DMEM ohne FKS und ohne Glucose) gewaschen. Die Infektion der Zellen erfolgte durch Zugabe von 150 MOI (multiplicity of infection) Adenoviren in einem Volumen von 800 µl Hungermedium pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte. Nach einer Inkubationszeit von 60 min im Brutschrank, wurde das Volumen pro Vertiefung mit 1,2 ml Vollmedium (DMEM mit 10 % FKS und 25 mM Glucose) aufgefüllt. Die Zellen wurden 48 h nach Viruszugabe zur Isolierung von RNA bzw. 72 h nach Viruszugabe zur Isolierung von Proteinen geerntet.

## 2.2.3 *Molekularbiologische Methoden*

### 2.2.3.1 *Plasmid DNA-Extraktion*

Die Plasmidisolierung aus dem transformierten *E. coli* DH10B erfolgte mit dem Plasmid *Plus* Midi Kit der Firma Qiagen nach exakten Angaben des Herstellers. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in 200 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und die DNA-Konzentration mittels NanoDrop gemessen.

### 2.2.3.2 *DNA-Extraktion aus Mausschwanzspitzen*

Der genaue genetische Status der Nachkommen ist bei der Vermehrung von transgenen Mäusen zunächst nicht bekannt. Aus diesem Grund ist es erforderlich, alle Nachkommen auf ihren Genotyp hin zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde den Nachkommen in den ersten

Tagen nach der Geburt eine ca. 5 mm lange Schwanzspitzenbiopsie entnommen und diese zur Extraktion von genomischer DNA verwendet.

Hierzu wurden pro Mausschwanzspitze 500  $\mu$ l SNET-Puffer und 5  $\mu$ l Proteinase K (20  $\mu$ g/ $\mu$ l) gegeben und für 2 h bei 55 °C und 700 rpm schüttelnd inkubiert. Nachdem die Biopsien komplett verdaut waren, wurden sie mit jeweils 500  $\mu$ l Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol versetzt und kräftig gevortext. Durch die anschließende Zentrifugation der Proben für 5 min bei 18.000 g, kam es zur Ausbildung von drei Phasen im Reaktionsgefäß: Eine DNA- und RNA-haltige klare Oberphase, eine proteinhaltige weißliche mittlere Phase und eine aus Zelltrümmern bestehende Unterphase. Die nukleinsäurehaltige Oberphase wurde entnommen, in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 500  $\mu$ l Isopropanol versetzt. Nach kurzem Mischen wurden die Proben zur Fällung der DNA für 1 h bei -20 °C inkubiert und anschließend für 5 min bei 18.000 g zentrifugiert. Anschließend war der Überstand zu verwerfen und das DNA-haltige Sediment mit 500  $\mu$ l 75 %igem Ethanol zu waschen. Nach erneuter Zentrifugation für 3 min bei 18.000 g wurde der Überstand so vollständig wie möglich entnommen und verworfen. Das DNA-Pellet wurde im offenen Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur getrocknet, mit 50  $\mu$ l DEPC behandeltem Wasser versetzt und zum Lösen über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurde die Konzentration der isolierten DNA mittels NanoDrop bestimmt und anschließend für die Genotypisierungs-PCR eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.3.3 *Genotypisierungs-PCR und Agarosegelelektrophorese*

Für die Genotypisierung der Tg5B-Mäuse wurden die Primerpaare pTg5B-Fw und Tg5B-Rv verwendet, wobei ersterer nur im Plasmid-Rückgrad transgener Mäuse bindet und zu einem 778 bp großem PCR-Produkt führt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tab. 1 aufgeführt. Als Positivkontrolle diente der für die Herstellung der transgenen Tiere verwendete Vektor pBROAD3-G5B, welcher für die PCR unter Verwendung des Restriktionsenzym *EcoRV* linearisiert wurde. Die Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt (siehe Tab. 5).

Tab. 5: Zusammensetzung pro Reaktionsansatz der Genotypisierungs-PCR

Komponente	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]	Endkonzentration im Gesamtansatz von 25 $\mu\text{l}$
Dream-TaqBuffer (10x)	2,5	1x
dNTPs (10 $\mu\text{M}$ )	1	0,4 $\mu\text{M}$
Primer (10 $\mu\text{M}$ )	je 1	je 0,4 $\mu\text{M}$
Taq Polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ )	0,2	0,04 U/ $\mu\text{l}$
RNase-freies Wasser	ad 24	-
$\Sigma$	24	

Die Amplifikation erfolgte im Thermal Personal Cycler. Das Reaktionsschema der Genotypisierungs-PCR ist in der folgenden Tabelle aufgeführt (siehe Tab. 6).

Tab. 6: Reaktionsverlauf der Genotypisierungs-PCR

Reaktion	Temperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95	3 min	1
Zyklische Denaturierung	95	1 min	34
Hybridisierung der Oligonukleotide	50	1 min	
Elongation	72	1 min	
Finale Elongation	72	7 min	1

Anschließend wurden die PCR-Produkte zusammen mit einem 1 kb DNA-Molekulargewichtsmarker in einem 1 %igen Agarosegel bei 110 V aufgetrennt, im Quantum VilberLourmat unter UV-Licht detektiert und mit Hilfe der Software Vision-Capt (Version 16.15) dokumentiert.

#### 2.2.3.4 RNA-Extraktion

Für die Isolation von RNA aus Zellen, wurden diese zunächst einmal mit PBS gewaschen und anschließend lysiert. Die Zelllyse erfolgte pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte mit je 350  $\mu\text{l}$  RLT-Lysepuffer, welcher zuvor durch die Zugabe von  $\beta$ -Merkaptoethanol komplettiert wurde. Die RNA wurde aus dem Zelllysats unter Verwendung des RNeasy Kits der Firma Qiagen mit anschließender DNase-Behandlung nach exakten Angaben des Herstellers isoliert und mit je 40  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser eluiert. Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte am NanoDrop bei einer Wellenlänge von 260 nm. Von der isolierten RNA wurde 1  $\mu\text{g}$  für die Reverse Transkription eingesetzt und der Rest bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.2.3.5 Reverse Transkription

Für die Umschreibung der isolierten RNA in cDNA wurde jeweils 1 µg RNA in 12 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und mit 1 µl dNTPs (je 10 mM) und 0,5 µl Random Hexamer Primer (50-250 ng) versetzt. Der Ansatz wurde zur initialen Denaturierung für 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend zur Vermeidung einer Renaturierung für 1 min auf Eis gestellt. Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurden zu diesem Ansatz jeweils 6,5 µl Master-Mix (siehe Tab. 7) hinzugegeben.

Tab. 7: Reaktionsansatz für den Mastermix der reversen Transkription

Komponente	Volumen [µl]	Endkonzentration im Gesamtansatz von 20 µl
5x First Strand RT-Buffer	4	5 mM
DTT (0,1 M)	1	5 mM
RNaseOUT (40 U/µl)	1	20 U/µl
SuperScript™ III RT (200 U/µl)	0,5	50 U/µl
Σ	6,5	

Die Umschreibung der mRNA in cDNA erfolgte im Thermal Personal Cycler. Für das Annealing der Primer wurde der Ansatz für 10 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend folgte die Elongation bei 50 °C für 60 min und die Enzymaktivierung bei 70 °C für 15 min. Schließlich wurde die Reaktion bei 4 °C abgestoppt und der Ansatz mit RNase-freiem Wasser auf 100 µl aufgefüllt um eine cDNA-Konzentration von 10 ng/µl zu erhalten. Die Lagerung der gewonnenen cDNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C.

### 2.2.3.6 Genexpressionsbestimmung mittels quantitativer Real-Time PCR

Die Quantifizierung des mRNA-Expressionsniveaus verschiedener Zielgene sowie des Housekeeping Gens 18S rRNA erfolgte mittels vergleichender  $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Diese Methode setzt eine annähernd gleiche Effizienz der PCR-Reaktionen von Ziel- und Referenzgen voraus. Die Effizienzbestimmung für die verwendeten Primer erfolgte in Vorversuchen anhand einer cDNA-Verdünnungsreihe. Die Genexpressionsbestimmung der Zielgene mittels quantitativer Real-Time PCR wurde unter Verwendung des Express Sybr® GreenER™ qPCR SuperMix durchgeführt. Die verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics synthetisiert (Sequenzen siehe Tab. 1). Die Sequenzen der Primer wurden, sofern dies möglich war, exonübergreifend gewählt, um während der Quantifizierung eine Amplifikation möglicher kontaminierender genomischer DNA zu vermeiden. Zudem konnten Kontaminationen mit genomischer DNA über eine DNase-Behandlung und eine „-RT-

Kontrolle“ ausgeschlossen werden. Für die Quantifizierung wurde ein Reaktionsvolumen von 20  $\mu\text{l}$  eingesetzt. Die Zusammensetzung eines Ansatzes ist der Tab. 8 zu entnehmen.

Tab. 8: Zusammensetzung pro Reaktionsansatz der quantitativen Real-Time PCR

Komponente	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]	Endkonzentration im Gesamtansatz pro Vertiefung
Express Sybr <sup>®</sup> GreenER <sup>™</sup> SuperMix	10	1x
Primer forward/reverse (10 $\mu\text{M}$ )	je 0,4	0,2 $\mu\text{M}$
RNase-freies Wasser	7,2	-
$\Sigma$	18	

Die pro Zielgen mitgeführten Negativkontrollen enthielten Wasser bzw. RNA nach DNase-Behandlung („-RT-Kontrolle“) an Stelle von cDNA. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. In eine 96-Loch-Platte wurden 18  $\mu\text{l}$  des Mastermix vorgelegt, 2  $\mu\text{l}$  der jeweiligen cDNA hinzu pipettiert und die Platte mit einer Folie abgeklebt. Im Anschluss war die 96-Loch-Platte für ca. 10 s bei 4000 g zu zentrifugieren und eventuell entstandene Luftblasen in den Reaktionsansätzen durch Schnipsen und erneutes Zentrifugieren zu eliminieren.

Die quantitative Real-Time PCR wurde unter Verwendung des CFX96<sup>™</sup> Real-Time Systems durchgeführt, beginnend mit einem Zyklus zur Hydrolyse möglicher kontaminierender Uracilhaltiger PCR-Fragmente aus früheren PCR-Reaktionen mittels Uracil-N-Glycosidase bei 50 °C für 2 Minuten. Das darauf folgende Programm ist in der nachstehenden Tabelle dargestellt (siehe Tab. 9).

Tab. 9: Reaktionsverlauf der quantitativen Real-Time PCR

Reaktion	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95	30 s	1
Zyklische Denaturierung	95	5 s	39
Hybridisierung der Oligonukleotide und Elongation	60	30 s	

Die Detektion der Amplifikate erfolgte über die Messung der Fluoreszenzintensität bei 530 nm und basiert auf der Eigenschaft des Fluoreszenzfarbstoffes Sybr Green I, welches sich nur in doppelsträngige DNA einlagert und dessen basale Fluoreszenz durch die Interkalation in die DNA stark erhöht wird.

Die Änderung der Fluoreszenzsignale ( $\Delta R_n$ ) wurde jeweils am Ende der Annealin-Phase eines PCR-Zyklus gemessen, in einem Diagramm gegen die Zyklenzahl aufgetragen und der „cycle threshold“ (Ct) ermittelt. Der Ct-Wert gibt die PCR-Zyklus-Nummer an, ab der das Fluoreszenzsignal höher als das „Hintergrundrauschen“ (threshold) ist. Die Berechnung des mRNA-Expressionsniveaus erfolgte durch eine relative Quantifizierung nach der vergleichenden  $\Delta\Delta CT$ -Methode.<sup>128</sup>

#### 2.2.3.7 Proteinisolierung aus Zellen und Geweben

Für die Isolierung von Proteinen aus Zellen wurden letztere zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte 100  $\mu$ l des eisgekühlten und mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren versetzten Proteinlysepuffers gegeben. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen von der Wachstums Oberfläche gelöst und anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellyse erfolgte sowohl für homogenisierte Gewebeproben als auch für Zellkulturproben für 30 min auf Eis, wobei die Proben alle 10 min für 5 sec gevortext wurden. Durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 15.000 g und 4 °C erfolgte die Abtrennung der Zelltrümmer (Sediment). Der Überstand wurde für die Bestimmung des Proteingehaltes eingesetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.3.8 Proteinquantifizierung

Die Proteinquantifizierung wurde mit dem Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit nach exakten Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer Verdünnungsreihe von bovinem Serumalbumin (BSA) im Bereich von 20 - 2000  $\mu$ g/ml. Die Proben wurden vorverdünnt und in Doppelbestimmungen zu je 5  $\mu$ l in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte pipettiert. Nach der Zugabe von 200  $\mu$ l Arbeitslösung folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C. Die Messung der Absorbtion erfolgte bei 562 nm mit Leerwertreduktion am Photometer für Mikrotiterplatten.

#### 2.2.3.9 Ko-Immunpräzipitation

Für die Ko-Immunpräzipitation wurden bEnd.3-Zellen verwendet, welche zuvor mit Plasmiden zur Überexpression von DDK-getagtem GPRC5B bzw. Fyn transfiziert wurden. 48 h nach der Transfektion, wurden die Zellen zunächst mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 200  $\mu$ l RIPA Puffer (versetzt mit Protease- und Phosphataseinhibitoren) lysiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Assay bestimmt und 1 mg Protein in einem Gesamtvolumen von 1 ml in RIPA Puffer verdünnt. Pro Ansatz wurden 50  $\mu$ l Anti-

DDDK-tag mAb-Magnetic Beads dreimal mit je 1 ml RIPA Puffer gewaschen und anschließend den Proteinproben hinzugefügt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit Beads und ohne Proteinprobe. Die Ansätze wurden über Nacht bei 4 °C im Rotator inkubiert und anschließend fünfmal mit je 1 ml RIPA Puffer gewaschen. Alle Waschschritte erfolgten für 5 min bei 4 °C im Rotator. Nach jedem Waschschritt wurde das Reaktionsgefäß an einen magnetischen Reaktionsgefäßhalter geklemmt und der Überstand verworfen. Schließlich wurden die präzipitierten Proteine durch die Zugabe von je 50 µl 2-fach konzentriertem Lämmli-Puffer und einer Inkubation von 5 min bei 95 °C von den Beads eluiert. Die Analyse der Proteine erfolgte über die elektrophoretische Auftrennung des Eluats in einem SDS-Polyacrylamidgel, gefolgt von einem Western Blot und Immundetektion.

#### 2.2.3.10 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen, Western Blot und Immundetektion

Zur Untersuchung der Proteinexpression, wurden jeweils 25 – 30 µg Gesamtprotein, versetzt mit 1x Laemmli-Puffer, für 5 min bei 95 °C denaturiert und nach einer weiteren Inkubation der Proben für 5 min auf Eis in einem Polyacrylamidgel bei 120 V in Laufpuffer entsprechend des Molekulargewichtes aufgetrennt.

Für die Herstellung des Polyacrylamidgels wurde zunächst ein 11 %iges Trenngel (Zusammensetzung siehe Tab. 10) zwischen eine Glasplatte mit Spacer und eine Deckplatte gegossen, mit Isopropanol überschichtet und bei Raumtemperatur auspolymerisiert. Anschließend wurde das Isopropanol entfernt und das Trenngel mit einem frisch angesetzten 4,7 %igen Sammelgel (Zusammensetzung siehe Tab. 10) überschichtet.

Tab. 10: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

Komponente	Trenngel 11 %	Sammelgel 4,7 %
Trenngelpuffer	2,6 ml	-
Sammelgelpuffer	-	1,4 ml
destilliertes Wasser	3,5 ml	2,9 ml
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	3,7 ml	0,8 ml
10 % APS	60 µl	30 µl
TEMED	30 µl	15 µl

Der Probenkamm wurde luftblasenfrei eingesetzt und die Glaskassette nach Auspolymerisierung des Gels in die Elektrophoresekammer des Mini PROTEAN Tetra Systems eingesetzt. Zusätzlich zu den Proben, wurden pro Gel 6 µl eines

Proteinmolekulargewichtsmarkern (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder) aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran bei 400 mA in Transferpuffer nach dem Prinzip des Tank-Blotverfahrens. Die Transferdauer betrug 90 min. Zur Überprüfung des Transfererfolges wurden die Proteine auf der Membran anschließend reversibel mit Ponceau S gefärbt. Durch das Waschen der Membranen in TBST konnten diese wieder entfärbt werden. Nach dem Blockieren der Membranen in Blocklösung (5 % fettfreies Milchpulver in TBST bzw. 1x Roti®-Block) für 60 min bei Raumtemperatur erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen primären Antikörpern über Nacht bei 4 °C. Die Antikörper wurden in 5 % Milch/TBST bzw. 1x Roti®-Block verdünnt (Verdünnungsfaktor siehe Abschnitt 2.1.6.1). Anschließend wurden die Membranen dreimal für 10 min in TBST gewaschen und für 90 min schüttelnd mit dem zum Wirtstier des Erstantikörpers passenden sekundären Antikörper inkubiert (siehe Abschnitt 2.1.6.2). Die sekundären Antikörper wurden 1:10000 in 5 % Milch/TBST verdünnt. Nach erneutem Waschen der Membranen in TBST erfolgte die Detektion der gebundenen, peroxidasemarkierten Zweitantikörper mittels ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe des FluorChem Q Imager und der AlphaView Software. Für die densitometrische Bildanalyse wurde die Software ImageJ verwendet.

#### 2.2.3.11 Vermehrung von Adenoviren

Zur Generierung größerer Mengen an Viruspartikeln wurden die in dieser Arbeit verwendeten Adenoviren in Hek293-A Zellen vermehrt. Diese Zelllinie liefert die Gene, die für die Verpackung der deletierten Adenoviren benötigten Proteine kodieren und ermöglicht die lytische Virusproduktion.

Dazu wurden pro Virus zwei T175 Kulturflaschen mit Hek293-A Zellen angelegt und bis zu einer Konfluenz von 100 % inkubiert. Die Flaschen wurden dann mit je 25 µl Virus-Stock oder 2-5 ml Virusüberstand infiziert und für 1-2 Tage inkubiert bis die Zellen erste Anzeichen der lytischen Virusproduktion aufwiesen. Die Zellen wurden durch Klopfen der Flasche vom Boden abgelöst, wenn sie begannen sich abzukugeln und erste Löcher im Zellrasen entsanden, die meisten Zellen aber noch intakte Membranen aufwiesen. Die Zellsuspensionen von zwei T175 Flaschen wurden in einem 50 ml Röhrchen vereint und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment in 1,5 ml PBS resuspendiert und die Zellen durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen lysiert. Zur Abtrennung der Zellbruchstücke wurde das Lysat für weitere 10 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der



Virusüberstand wurde schließlich in 50 µl-Portionen aliquotiert und bei -80 °C gelagert, wobei eine der Virusportionen für die Bestimmung des Virustiters verwendet wurde.

#### 2.2.3.12 Viruspartikel Titration

Der Virustiter wird als infektiöse Einheiten pro ml (ifu/ml) angegeben und wird benötigt, um den Einsatz konstanter Mengen an infektiösen Viruspartikeln verschiedener Viruschargen und Kontrollviren zu gewährleisten. Für die Bestimmung des Virustiters wurden  $3 \cdot 10^5$  Hek293-A Zellen/ml in je 500 µl Medium (Advanced DMEM) pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte ausgesät und 24 h später mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen infiziert. Die Virusstocklösung wurde zu diesem Zweck in 10er Schritten in einem Konzentrationsbereich von  $10^{-2}$  bis  $10^{-7}$  seriell verdünnt und je Verdünnungsstufe 50 µl Virus zu den Zellen pipettiert. Als Negativkontrolle diente ein nicht infizierter Ansatz, während die geringste Verdünnungsstufe ( $10^{-2}$ ) als Positivkontrolle verwendet wurde. Nach einer Inkubationszeit von 48 h im Brutschrank, wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit 1 ml -20 °C kaltem Methanol für 10 min bei -20 °C fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1 % BSA/PBS, wurden die Zellen mit 100 µl FITC-markiertem anti-Hexon Antikörper pro Vertiefung für 1 h lichtgeschützt bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem, dreimaligem Waschen mit 1 % BSA/PBS, wurde die Zahl der infizierten Zellen unter UV-Licht am Mikroskop bestimmt. Dazu wurden die grün fluoreszierenden Zellen pro Vertiefung der Zellkulturplatte in 10 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern unter Verwendung des 20 x Objektivs gezählt. Der Mittelwert der infizierten Zellen pro Gesichtsfeld wurde berechnet und mit der maximalen Anzahl an Gesichtsfeldern pro Vertiefung multipliziert. Bei der Verwendung des 20 x Objektivs werden 313 Gesichtsfelder benötigt, um die gesamte Vertiefung abzudecken. Die Division des resultierenden Wertes durch die jeweils verwendete Verdünnungsstufe des Virus, multipliziert mit dem eingesetzten Virusvolumen ergibt schließlich den Titer des untersuchten Virus:

$$ifu/ml = \frac{\text{infizierte Zellen/Gesichtsfeld} \cdot \text{Gesichtsfelder/Vertiefung}}{\text{Virusvolumen [ml]} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}$$

#### 2.2.3.13 NFκB-Reportergen Assay

Die Analyse der NFκB-Aktivität erfolgte unter Verwendung eines dualen Luciferase Reporter Assays. Dazu wurden bEnd.3 Zellen in 12-Loch-Platten kultiviert und mit verschiedenen Plasmiden oder siRNAs (aufgelistet in Tab. 1) in Kombination mit zwei Plasmiden

transfiziert, welche für zwei verschiedene Luciferasen kodieren. Das Plasmid pGL4.32[*luc2P/NFκB-RE/Hygro*] enthält das NFκB-responsive Element sowie nachgeschaltet das Luciferasegen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* (Firefly-Luciferase). Somit kann die Intensität der NFκB-Aktivierung über die Messung der Firefly-Luciferaseaktivität bestimmt werden. Das Plasmid pRL-TK enthält die kodierende Sequenz der Luciferase der Seefeder *Renilla reniformis* (Renilla-Luciferase) unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors. Die Messung der Renilla-Luciferaseaktivität dient als interne Kontrolle zur Normalisierung der Transfektionseffizienz. Für die Detektion der NFκB-Aktivierung, wurden die Zellen 48 bzw. 72 h nach der Transfektion mit kaltem PBS gewaschen und mit 100 µl des im Kit enthaltenen Lysepuffers lysiert. Anschließend wurden die Zellen für 15 min bei maximaler Geschwindigkeit auf einem horizontalen Plattenschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Pro Vertiefung einer chemilumineszenzkompatiblen 96-Loch-Platte wurden 20 µl des Zelllysates pipettiert und die Platte in das Photometer für Mikrotiterplatten infinite M200 PRO plaziert. Nach automatischer Injektion der Chemilumineszenz-Lösung A erfolgte zunächst die Messung der Firefly-Luciferaseaktivität. Im Anschluss wurde Lösung B injiziert, welche die Lumineszenz der Firefly-Luciferase quencht. Darauf folgend wurde die Chemilumineszenz der Renilla-Luciferase gemessen.

#### 2.2.3.14 ELISA

Die Bestimmung der Menge an verschiedenen exprimierten und sekretierten humanen bzw. murinen Zytokinen erfolgte im Zellkulturüberstand unter Verwendung der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)MAX<sup>TM</sup> Standard Kits der Firma BioLegend nach exakten Angaben des Herstellers. Die Konzentration des jeweiligen Zytokins wurde in einer Doppelbestimmung anhand einer Standardkurve im Bereich von 0 bis 500 pg/ml bestimmt. Die Messung der optischen Dichte bei 450 nm erfolgte am Photometer für Mikrotiterplatten mit der Software Magellan v.7.2.

#### 2.2.3.15 Nachweis aktiver Matrix-Metalloproteinasen

Zur Untersuchung eines möglichen Effekts von GPRC5B auf die Expression aktiver MMPs, wurden GPRC5B- bzw. LacZ-überexprimierende MOVAS 48 h nach der Infektion für 24 h mit 10 µg/ml LPS stimuliert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 µl Fluorescein-gekoppelter Gelatine bzw. Elastin und eine weitere Inkubation der Zellen für 5 h im Brutschrank. Schließlich wurden die Zellen fixiert und für zusätzliche Immunfluoreszenzfärbungen verwendet (Durchführung siehe 2.2.3.16).

Das Prinzip des hier verwendeten Nachweises proteolytisch aktiver MMPs beruht darauf, dass die Fluoreszenz der intakten Proteinkonjugate gequenched wird und proportional mit ihrer Proteolyse ansteigt. Die Dokumentation des Ergebnisses erfolgte am konfokalen Laserscan Mikroskops LSM 800 der Firma Zeiss unter Verwendung der zugehörigen ZEN-Software. Das Ausmaß der Spaltung von Elastin bzw. Gelatine wurde über die Bestimmung der spezifischen, fluoreszierenden Fläche mittels ImageJ quantifiziert.

#### *2.2.3.16 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen*

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die auf gläsernen Coverslips ausgesäten Zellen wie beschrieben behandelt und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur in 4 % Paraformaldehyd. Anschließend wurden die Coverslips dreimal mit PBS gewaschen und in Blockpuffer A für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem einmaligem Waschen mit PBS folgte die Inkubation der Coverslips mit den in Blockpuffer A verdünnten, primären Antikörpern (siehe Abschnitt 2.1.6.1) in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C. Am Folgetag wurden die Coverslips zunächst dreimal für je 10 min in PBS gewaschen und dann mit den jeweiligen in Blockpuffer A verdünnten, sekundären Antikörpern (siehe Abschnitt 2.1.6.2) sowie 1 µl des Kernfarbstoffs DAPI inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Coverslips, welche nur mit sekundären Antikörpern inkubiert wurden. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer für 1 h bei Raumtemperatur. Es folgten drei weitere Waschschrte für jeweils 10 min in PBS und ein anschließendes kurzes Schwenken der Coverslips in destilliertem Wasser. Schließlich wurden die gefärbten Coverslips mit Fluor<sup>TM</sup>Safe Eindeckmedium auf Objektträgern fixiert und lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. Die Dokumentation erfolgte unter Verwendung des Laserscan Mikroskops LSM 800 der Firma Zeiss und der zugehörigen ZEN-Software.

### **2.2.4 Tierversuch**

#### *2.2.4.1 Verwendete Mausmodelle*

Für das Tierexperiment wurden GPRC5B-transgene Mäuse sowie *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse verwendet. Die GPRC5B-transgene Mauslinie besitzt einen FVB/N-Hintergrund und wurde in der Arbeitsgruppe von Yoshio Hirabayashi erstellt (RIKEN Brain Science Institute, Saitama, Japan). Die Mauslinie weist eine konstitutive Überexpression von humanem GPRC5B unter dem ubiquitären mROSA-Promotor auf. *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse stellen ein etabliertes Mausmodell der Atherosklerose dar. Aufgrund des fehlenden LDL-Rezeptors haben sie einen erhöhten

Plasmacholesterinspiegel und entwickeln unter einer fettreichen Ernährung atherosklerotische Plaques. Die in dieser Arbeit verwendeten *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse wurden von Jackson Laboratory bezogen und besitzen einen C57BL/6-Hintergrund. Die Durchführung des Tierexperiments erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. med. Michael Preusch nach den geltenden rechtlichen und ethischen Bestimmungen.

#### 2.2.4.2 Knochenmarkstransplantation

Zur Analyse der pathophysiologischen Relevanz von GPRC5B *in vivo* wurde eine autologe Knochenmarkstransplantation von *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäusen mit Knochenmark der GPRC5B-Mauslinie durchgeführt. Diese Methode wurde gewählt, da sie gegenüber einer Kreuzung der beiden Mauslinien sowohl zeit- als auch ressourcenschonender ist.

Vor der eigentlichen Transplantation erfolgte zunächst die Eliminierung des Knochenmarks der Empfängertiere. Dazu wurden 50 weibliche *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse im Alter von acht Wochen mit einer Dosis von 9 Gy bestrahlt. Um eine Infektion der bestrahlten Empfängertiere zu vermeiden, wurde diesen Tieren prophylaktisch ab drei Tage vor der Bestrahlung für insgesamt fünf Wochen täglich 50 mg Ciprofloxacin pro kg Körpergewicht über das Trinkwasser verabreicht. Am Tag nach der Bestrahlung erfolgten die Isolation des Knochenmarks aus Wildtyp- bzw. transgenen GPRC5B-Mäusen und die Transplantation in die Empfängertiere. Dazu wurden die Spendertiere zunächst durch Genickbruch getötet und die Hinterläufe herausgelöst. Tibia und Femur wurden voneinander getrennt und jeweils die Gelenkflächen an beiden Enden entfernt. Das Knochenmark wurde mit 10 % hitzeinaktiviertem FKS in PBS mit einer Kanüle aus den Röhrenknochen der Spendertiere gespült und in einem Falcon auf Eis aufgefangen. Das isolierte Knochenmark wurde anschließend durch einen 70 µm Filter passiert und für 10 min bei 300 g und 4 °C abzentrifugiert. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS und erneuter Zentrifugation wurden die Knochenmarkszellen in Erythrozytenlysepuffer aufgenommen und die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellsediment in PBS resuspendiert. Die Transplantation der isolierten Knochenmarkszellen erfolgte per Schwanzveneninjektion. Pro Tier wurden  $4 \cdot 10^6$  Zellen in einem Volumen von 120 µl appliziert.

Zur Kontrolle der Strahlungseffizienz und der Überprüfung einer vollständigen Zerstörung des empfängereigenen Knochenmarks erhielten zwei bestrahlte Empfängertiere keine Knochenmarkstransplantation.

#### 2.2.4.3 Arterioskleroseinduktion

Fünf Wochen nach der Knochenmarkstransplantation (KMT) wurde das Futter der Tiere für weitere 16 Wochen auf eine fettreiche „Western Typ Diät“ umgestellt (21 % Fett, 0,15 % Cholesterin, 19,5 % Casein). Anschließend wurden die Tiere zur Analyse der Arterioskleroseentwicklung getötet.

#### 2.2.4.4 Probenentnahme und Gewebepräparation

Zur Proben- und Organentnahme wurden die Mäuse durch die intraperitoneale Applikation von jeweils 500 µl Avertin tief sediert und durch Ausbluten euthanasiert. Das Blut wurde unter Verwendung einer zuvor mit Heparin-Natrium-Lösung benetzten Kanüle aus der vena cava entnommen und für 10 min bei 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde bis zur Analyse bei -80 °C gelagert. Des Weiteren wurden Leber, Niere, Milz und Tibia entnommen und jeweils in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Mäuse wurden anschließend über den linken Ventrikel mit 10 ml PBS perfundiert, gefolgt von einer Perfusion mit 4 % PFA. Vor der Fixierung mit PFA wurde die thorakoabdominelle Aorta entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Herz wurde inklusive Aortenbogen entnommen. Nach einer 48-stündigen Fixierung bei 4 °C in 4 % PFA wurde das Gewebe mit PBS gewaschen und schließlich jeweils für 12 h zunächst in 15 %, dann in 30 % Sucrose/PBS inkubiert. Unter dem Mikroskop wurde anschließend jeweils der Herzsinus von den Herzkammern getrennt, der Sinus mit der Schnittfläche nach unten in Tissue-Tek® eingebettet, die Herzkammern gewogen und anschließend ebenfalls eingebettet. Die eingebetteten Sinusse wurden am Kryomikrotom mit einer Schnittdicke von 5 µm seriell geschnitten. Es wurden jeweils vier Gewebeschnitte auf einen Objektträger gezogen und bis zur Färbung bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.4.5 Gewebhomogenisierung

Für die weitere Aufarbeitung wurde je eine Organhälfte bzw. 40-80 mg Gewebe in ein 2 ml Schraubdeckelgefäß mit 0,6 g Zirconiumoxid-Beads (1,4 mm) gegeben und zur RNA-Isolierung mit 500 µl RLT-Puffer mit 2-Mercaptoethanol bzw. für die Proteinisolierung mit 500 µl RIPA versetzt. Die Homogenisierung der Gewebe erfolgte mittels Precellys®24 Homogenisator für 20 s bei 5500 rpm. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt und für die RNA- bzw. Proteinisolierung verwendet oder bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.4.6 *Tibia Längenbestimmung*

Neben der Ermittlung des Körpergewichts der Mäuse gilt auch die Bestimmung des Verhältnisses von Herzgewicht zur Tibialänge als routinemäßig untersuchter Parameter in der kardiovaskulären Forschung zur Einschätzung des Gesundheitszustandes der Mäuse. Das berechnete Verhältnis gibt Auskunft darüber, ob die Behandlung der Tiere als Nebenwirkung zu einer Hypertrophie des Herzens geführt hat.<sup>129</sup> Dazu erfolgte die Entnahme der Unterschenkel oberhalb des Kniegelenks, um eine ungewollte Kürzung der Tibia zu vermeiden. Pro Unterschenkel wurde 1 ml SNET-Puffer, versetzt mit 0,2 µg/µl Proteinase K, in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Der enzymatische Verdau von Muskelgewebe und Weichteilen erfolgte während einer 24-stündigen Inkubation der Proben im Thermomixer bei 55 °C und 700 rpm. Anschließend konnte die Tibia von den Gelenken gelöst und mit Hilfe eines Messschiebers vermessen werden.

#### 2.2.4.7 *Lipidbestimmung im Blutplasma*

Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses von GPRC5B-transgenem Knochenmark auf die Lipidzusammensetzung im Blut, wurde die Konzentration von Gesamtcholesterin (TC), Triglyceriden (TRG), Lipoprotein hoher Dichte (HDL) und Lipoprotein niederer Dichte (LDL) bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung der jeweiligen Lipide erfolgte stichprobenartig in den gewonnenen Plasmaproben jedes zweiten Versuchstieres und wurde von der Firma Siemens Healthcare Diagnostics GmbH in Eschborn durchgeführt. Dabei beruht das Prinzip der Quantifizierung von Cholesterin und Triglyceriden auf der Messung von enzymatisch freigesetztem Wasserstoffperoxid, welches in einer Peroxidasereaktion zusammen mit Aminophenazon und Phenol einen roten Farbstoff bildet. Die Farbintensität kann am Photometer bei 546 nm gemessen werden und ist direkt proportional zur Wasserstoffperoxidkonzentration. Für die Freisetzung von Wasserstoffperoxid ist bei der Gesamtcholesterin- bzw. der Triglyceridbestimmung die Cholesterin-Oxidase bzw. die Glycerol-3-Phosphat-Oxidase verantwortlich.

Die Bestimmung von HDL erfolgt hingegen indirekt über die Subtraktion der nach LDL-Fällung im Überstand zurückbleibenden Cholesterinmenge von der zuvor bestimmten Gesamtcholesterinmenge. Die Menge an LDL kann anschließend nach der Friedewald-Formel berechnet werden:

$$LDL = TC - HDL - \frac{TRG}{5}$$

## 2.2.5 Untersuchungen an Gewebeschnitten

### 2.2.5.1 Movat-Färbung

Die Movat-Färbung ist eine pentachrome Färbetechnik, welche 1955 von Henry Zoltan Movat entwickelt und 1972 von Russel modifiziert wurde.<sup>130,131</sup> Sie ermöglicht die Darstellung und Unterscheidung verschiedener Hart- und Weichgewebekomponenten in nur einem Gewebeschnitt und wird meist zur Untersuchung von Herz, Blutgefäßen und Bindegewebe eingesetzt.<sup>130,132</sup>

Pro seriell geschnittenem Herzsinus wurde jeder dritte Objektträger für die Movat-Färbung verwendet. Dazu wurden die gefrorenen Gewebeschnitte zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und getrocknet. Anschließend erfolgte die Fixierung der Schnitte für 10 min in 50 °C warmer Boin's-Lösung. Nach 10-minütigem Waschen unter fließendem, destilliertem Wasser wurden die Schnitte für 5 min in 5 % Natrium Thiosulfat inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift für 2x 2 min und 1x 1 min in destilliertem Wasser, bevor die Schnitte für 5 min in 1 % Alcianblau gefärbt wurden. Anschließend wurden die Schnitte für 3,5 min unter fließendem, destilliertem Wasser gewaschen und für 10 min in 60 °C warmen, alkalischen Alkohol inkubiert. Nach einem erneuten 3,5-minütigen Waschschrift unter fließendem Wasser erfolgte die Färbung in Weigert's-Lösung für 30 min, gefolgt von einem Waschschrift von 2x 2 min und 1x 1 min. Anschließend wurden die Schnitte für 1,5 min mit Crocein-Scarlet-Säurefuchsin gefärbt, für 2x 2 min und 1x 1 min gewaschen und für 5 min in 5 %iger Phosphorwolframsäure inkubiert. Aus dieser Lösung wurden die Schnitte direkt in 1 %ige Essigsäure übertragen, für 5 min darin inkubiert und anschließend für 2x 2 min und 1x 1 min gewaschen. Darauf folgte die Dehydrierung der Schnitte für je 1 min in 95 %igem Ethanol und anschließend 2x in absolutem Ethanol. Abschließend wurden die Schnitte für 3 min in alkoholischer Safranlösung gefärbt, 2x für je 1 min in absolutem Ethanol und 3x für je 5 min in Xylol inkubiert. Die Schnitte wurden schließlich mit Cytoseal und Deckglas eingedeckt und die Färbung im Hellfeld unter Verwendung des Keyence BZ-9000 Mikroskops und der Software BZ-II Analyzer dokumentiert. Für die Auswertung wurde mit ImageJ die Fläche der atherosklerotischen Läsionen pro Schnitt bestimmt und anschließend die mittlere Plaquegröße pro Tier und Versuchsgruppe berechnet.

### 2.2.5.2 Immunfluoreszenzfärbung von Geweben

Pro seriell geschnittenem Herzsinus wurde jeder dritte Objektträger für den Nachweis von in die Läsionen eingewanderten proinflammatorischen Makrophagen verwendet. Dazu wurden

die gefrorene Gewebeschnitte für 5 min bei Raumtemperatur in 2 % PFA fixiert. Nach dreimaligem Waschen der Schnitte für jeweils 5 min in PBS wurden sie für 1 h in Blockpuffer B bei Raumtemperatur inkubiert. Der primäre Mac-2 Antikörper wurde im Verhältnis 1:2000 in Blockpuffer verdünnt, auf die Gewebe gegeben und diese über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem Waschen der Gewebeschnitte für 3x 5 min in PBS erfolgte die Inkubation mit dem Cy5-gekoppelten und in Blockpuffer verdünnten sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur (siehe Abschnitt 2.1.6.2). Als Negativkontrolle dienten Gewebeschnitte, welche nur mit sekundärem Antikörper inkubiert wurden. Nach dem Waschen der Schnitte für 3x 5 min in PBS wurden sie schließlich mit Immunoselect Antifading Mounting Medium DAPI eingedeckt. Dieses Eindeckmedium soll das Ausbleichen der Schnitte reduzieren und enthält zudem den Kernfarbstoff DAPI. Die Dokumentation der spezifischen Fluoreszenzfärbung erfolgte am Keyence BZ-9000 Mikroskop unter Verwendung der Software BZ-II Analyzer. Die Größe der spezifisch gefärbten Bereiche pro Gewebeschnitt wurde mittels ImageJ bestimmt und anschließend die mittlere Fläche pro Tier berechnet. Schließlich wurde pro Tier der Anteil der Mac-2 gefärbten Fläche an der mittels Movat-Färbung bestimmten Plaquegröße berechnet und pro Versuchsgruppe gemittelt.

### **2.2.6 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der in den Versuchen gewonnenen Daten erfolgte unter Verwendung der Software SigmaPlot v.11.1. Es wurde dazu die Abweichung der Standardfehler (SEM = Standardabweichung/Wurzel (n)) der einzelnen Werte innerhalb einer Versuchsgruppe berechnet und die Signifikanz der Mittelwerte jeder Versuchsgruppe geprüft. Bei Normalverteilung der Werte wurden zwei Gruppen unter Anwendung des 2-Seiten-t-Tests miteinander verglichen. Für mehr als zwei Gruppen wurde ein ANOVA-Test mit anschließendem Bonferroni-Test angewendet. Waren die Daten nicht normalverteilt, so wurden zwei Gruppen unter Verwendung des Mann-Whitney-Tests bzw. mehrere Gruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test miteinander verglichen. Dabei wurde ein Signifikanzwert von  $\leq 0,05$  als signifikant, ein Wert von  $\leq 0,01$  als hoch signifikant und ein Wert von  $\leq 0,001$  als höchst signifikant bezeichnet und mit den Symbolen \*, \*\* bzw. \*\*\* gekennzeichnet. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism v.5.0 und CorelDraw Graphics Suite X7.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Untersuchung von GPRC5B *in vitro*

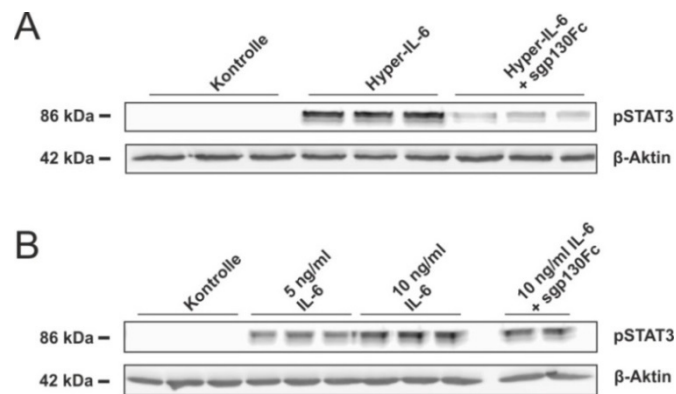
Zur Untersuchung der Rolle von GPRC5B in der Atherogenese wurden zunächst *in vitro* zellspezifische Analysen zur Regulation des Rezeptors sowie die durch ihn vermittelten Funktionen und Signalwege durchgeführt.

#### 3.1.1 Regulation der GPRC5B-Expression durch inflammatorische Mediatoren

Entzündungen definieren eine Vielzahl der Mechanismen, die an der Entstehung atherosklerotischer Plaques beteiligt sind. Zur Bewertung der pathophysiologischen Relevanz von GPRC5B, wurde zunächst ein möglicher Einfluss eines proinflammatorischen Milieus auf die Expression des Rezeptors in Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen untersucht.

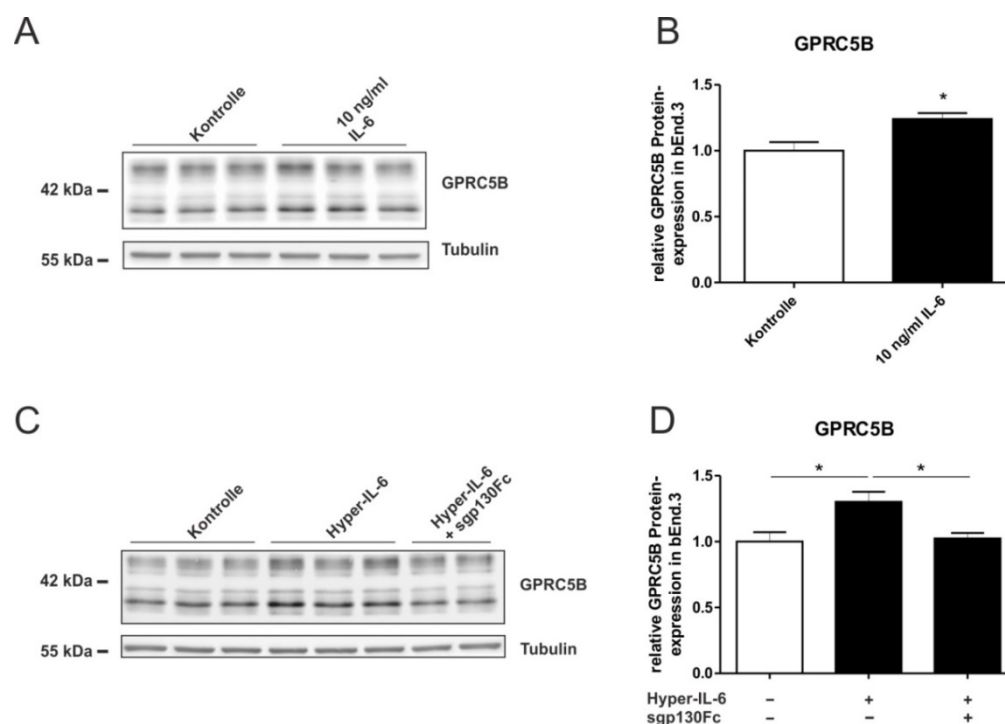
##### 3.1.1.1 Induktion der endogenen GPRC5B-Expression in Endothelzellen

Eines der Zytokine, denen eine essenzielle Rolle bei der Initiierung und Progression der Atherosklerose zugeschrieben wird, ist IL-6. Wie in Kapitel 1.2.3.4 beschrieben, ist das Zytokin u.a. zu Beginn der sich entwickelnden Gefäßveränderungen für die Aktivierung von Endothelzellen verantwortlich. Da für die Zelllinie bEnd.3 keine Informationen bezüglich der Stimulierbarkeit mit IL-6 vorlagen, wurde dies zunächst über den Phosphorylierungsstatus von STAT3 (pSTAT3) überprüft. Als Positivkontrolle diente die Stimulierung der Zellen mit 10 ng/ml Hyper-IL-6, einem Fusionsprotein aus IL-6 und löslichem IL-6R. Mittels Western Blot konnte gezeigt werden, dass die Expression von pSTAT3 sowohl durch die Stimulation mit Hyper-IL-6, als auch durch IL-6 stark ansteigt. Die kombinierte Stimulation der Zellen mit 500 ng/ml des Inhibitors sgp130Fc führte zur Hemmung der durch Hyper-IL-6 vermittelten STAT3-Phosphorylierung, während der Effekt von IL-6 nicht beeinträchtigt wurde (siehe Abb. 4).



**Abb. 4: Expression von pSTAT3 in bEnd.3-Zellen nach Stimulation mit IL-6 bzw. Hyper-IL-6.** Für die Analyse der pSTAT3-Expression wurden die Zellen 24 h nach der Aussaat zunächst für 3 h in Medium ohne FKS inkubiert und anschließend für 15 min mit Hyper-IL-6 (A) oder verschiedenen IL-6 Konzentrationen (B) allein oder in Kombination mit dem Inhibitor sgp130Fc stimuliert. Anschließend wurden die Proteine isoliert und mittels Western Blot analysiert. Dargestellt sind jeweils die spezifischen Banden für pSTAT3 sowie der als Ladekontrolle verwendeten Banden für  $\beta$ -Aktin im Western Blot. N = 1 in Triplikaten.

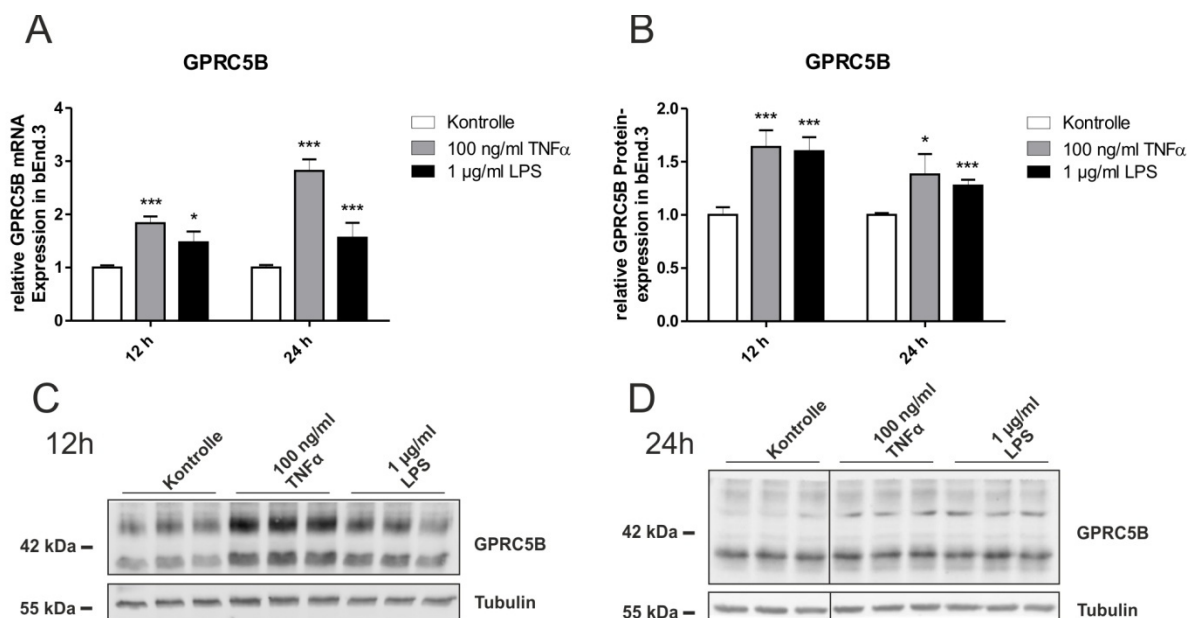
Anschließend wurde der Effekt von IL-6 und Hyper-IL-6 auf die Expression von GPRC5B untersucht. Mittels Western Blot konnte gezeigt werden, dass sowohl die Stimulation mit IL-6, als auch mit Hyper-IL-6 in bEnd.3-Zellen nach 24 h zu einer signifikanten Hochregulierung der GPRC5B-Expression um etwa den Faktor 1,3 führt. Der Effekt von Hyper-IL-6 konnte durch die Kombination mit sgp130Fc gehemmt werden (siehe Abb. 5).



**Abb. 5: Einfluss von IL-6 und Hyper-IL-6 auf die GPRC5B-Expression in bEnd.3-Zellen.** Die Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-6 (A) bzw. 10 ng/ml Hyper-IL-6 alleine oder in Kombination mit 500 ng/ml sgp130Fc (C) inkubiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Nach 24 h wurden die Zellen für die Proteinisolierung lysiert. Die Expressionsanalyse von GPRC5B erfolgte mittels Western Blot über die Auswertung der Bandendensität. Dargestellt sind die GPRC5B-spezifischen Banden der Western Blots (A, C) sowie die gegen die  $\beta$ -Aktin Ladekontrolle normalisierte Expressionsstärke von GPRC5B relativ zu dessen Expression in der Kontrolle (B, D). N = 1 in Triplikaten; Mittelwert relativ zur Kontrolle  $\pm$  SEM.

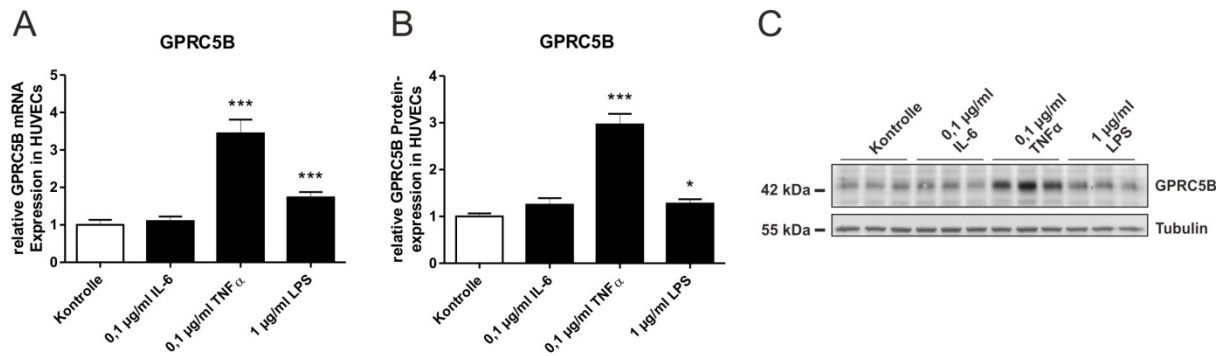
Zusätzlich zu IL-6 wurde auch die Wirkung des Zytokins TNF $\alpha$  und des Endotoxins LPS auf die Expression von GPRC5B in Endothelzellen untersucht. Diese beiden Stimulanzen wurden gewählt, da sie als prototypische Entzündungsmediatoren gelten. Während der Serumspiegel von TNF $\alpha$  bei vielen Entzündungskrankheiten erhöht ist und dem Zytokin eine Schlüsselfunktion bei der Entstehung der Atherosklerose zugeschrieben wird, simuliert LPS die Wirkung atherogener Fettsäuren am TLR-4 (siehe Kapitel 1.2.3). Mittels Western Blot und Real-Time PCR konnte gezeigt werden, dass die Expression von GPRC5B in bEnd.3-Zellen durch die Stimulation mit TNF $\alpha$  bzw. LPS signifikant nach 12 und 24 h hochreguliert wurde (siehe Abb. 6).<sup>133</sup> Dabei war die Stärke des erzielten Effektes abhängig von der Inkubationszeit und der Wahl des jeweiligen Stimulus. Während die Stimulation der Zellen mit TNF $\alpha$  auf RNA-Ebene nach 12 h Inkubation zu einem Anstieg der GPRC5B-Expression um das 1,8-fache führte, war der Effekt nach 24 h Stimulation mit einer Hochregulation der GPRC5B-Expression um das 2,8-fache deutlich stärker ausgeprägt. Der regulatorische Effekt von LPS auf die Expression von GPRC5B fiel etwas schwächer aus als bei TNF $\alpha$  und zeigte

auf RNA-Ebene keine zeitliche Abhängigkeit. Die Stimulation mit LPS führte auf RNA-Ebene sowohl nach 12 h als auch nach 24 h zu einer gesteigerten Expression des Rezeptors um etwa das 1,5-fache (siehe Abb. 6A). Auf Proteinebene führten beide Stimulanzen zu einer etwa gleich starken Hochregulation von GPRC5B. Die relative GPRC5B-Expression lag nach 12 h Stimulation jeweils bei etwa 1,6 und nach 24 h bei etwa 1,3 (siehe Abb. 6B-D).



**Abb. 6: Einfluss von TNF $\alpha$  und LPS auf die GPRC5B-Expression in bEnd.3-Zellen.** Die Zellen wurden mit 100 ng/ml TNF $\alpha$  oder 1  $\mu$ g/ml LPS stimuliert und nach 12 bzw. 24 h für die RNA- und Proteinisolierung lysiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Mittels Real-Time PCR wurde die Expression der GPRC5B mRNA analysiert und jede Probe zur gemessenen 18S rRNA normalisiert (A). Die Expressionsanalyse von GPRC5B auf Proteinebene erfolgte mittels Western Blot über die Auswertung der Bandendensität. Dargestellt sind die GPRC5B-spezifischen Banden der Western Blots nach 12 und 24 h (C, D) sowie die gegen die Tubulin Ladekontrolle normalisierte Expressionsstärke von GPRC5B relativ zu dessen Expression in der Kontrolle (B). Jeweils n = 3 in Triplikaten; Mittelwert relativ zur Kontrolle  $\pm$  SEM. Die Versuche zu dieser Abbildung wurden von dem Arbeitsgruppenmitglied Jan-Thorge Nitz durchgeführt.<sup>133</sup>

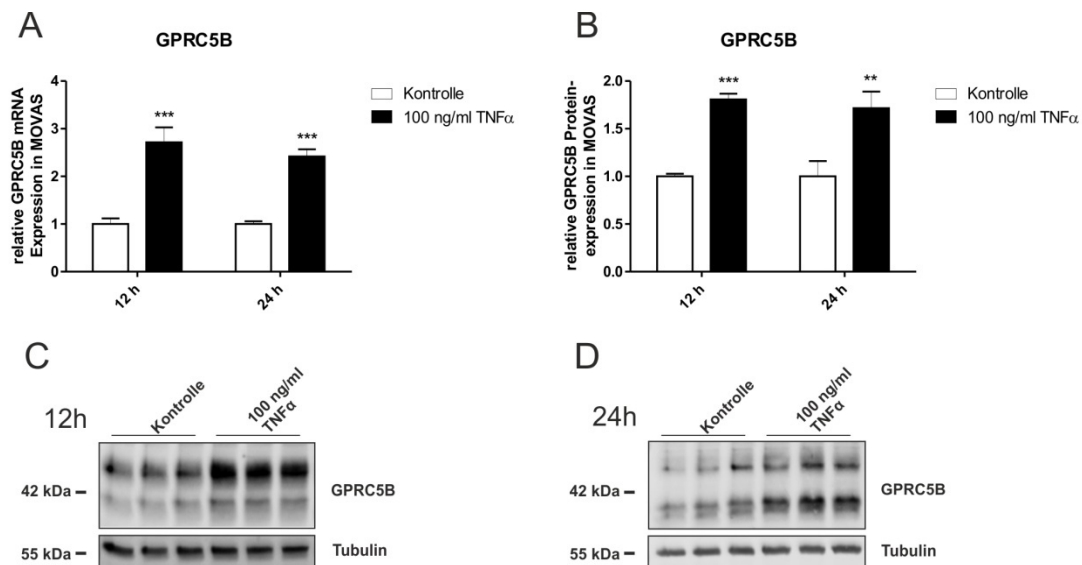
Zur Verifizierung der mittels bEnd.3-Zellen gewonnenen Daten, wurde der Einfluss von IL-6, TNF $\alpha$  und LPS auf die Regulation der GPRC5B-Expression zusätzlich in primären humanen Endothelzellen der Nabelschnur untersucht. Im Gegensatz zu den mittels bEnd.3-Zellen gewonnenen Daten, konnte in HUVECs kein Effekt von IL-6 auf die Expression von GPRC5B nachgewiesen werden. Der Effekt von TNF $\alpha$  und LPS konnte jedoch bestätigt werden. Sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene führten beide Stimulanzen zu einer signifikanten Hochregulation von GPRC5B, wobei durch die Stimulation mit TNF $\alpha$  ein deutlich stärkerer Effekt auf die Expression des Rezeptors erzielt werden konnte: TNF $\alpha$  3,5-fach (RNA) bzw. 3-fach (Protein) versus LPS 1,7-fach (RNA) bzw. 1,3-fach (Protein) (siehe Abb. 7).



**Abb. 7: Einfluss von IL-6, TNF $\alpha$  und LPS auf die GPRC5B-Expression in primären Endothelzellen.** HUVECs wurden mit 0,1 µg/ml IL-6, 0,1 µg/ml TNF $\alpha$  oder 1 µg/ml LPS stimuliert. Nach 12 h wurden die Zellen für die Isolation von RNA und nach 24 h für die Isolation von Proteinen lysiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Mittels Real-Time PCR wurde die Expression der GPRC5B mRNA nach 12 h Inkubation analysiert und jede Probe zur gemessenen 18S rRNA normalisiert (A). Die Expressionsanalyse von GPRC5B auf Proteinebene erfolgte mittels Western Blot über die Auswertung der Bandendensität. Dargestellt sind die GPRC5B-spezifischen Banden der Western Blots nach 24 h Stimulation (C). Die Expressionsstärke von GPRC5B wurde auf Proteinebene gegen die Tubulin Ladekontrolle normalisiert und in Relation zur GPRC5B-Expression in der Kontrolle dargestellt (B). Jeweils n = 3 in Triplikaten; Mittelwert relativ zur Kontrolle  $\pm$  SEM.

### 3.1.1.2 Induktion der endogenen GPRC5B-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen

In den Prozess der Atherogenese sind neben den Endothelzellen der inneren Gefäßwandschicht noch weitere Zelltypen involviert. Zu diesen gehören u.a. die glatten Gefäßmuskelzellen, welche die darunter liegende Tunica media bilden. Während der Atherogenese sind auch diese Zellen einem proinflammatorischen Milieu ausgesetzt. In MOVAS führte eine 12-stündige Stimulation mit TNF $\alpha$  sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zu einer signifikant verstärkten Expression von GPRC5B um das 2,7- bzw. 1,8-fache. Auch nach 24 h war dieser Effekt in etwa der gleichen Intensität nachweisbar (siehe Abb. 8).<sup>133</sup>

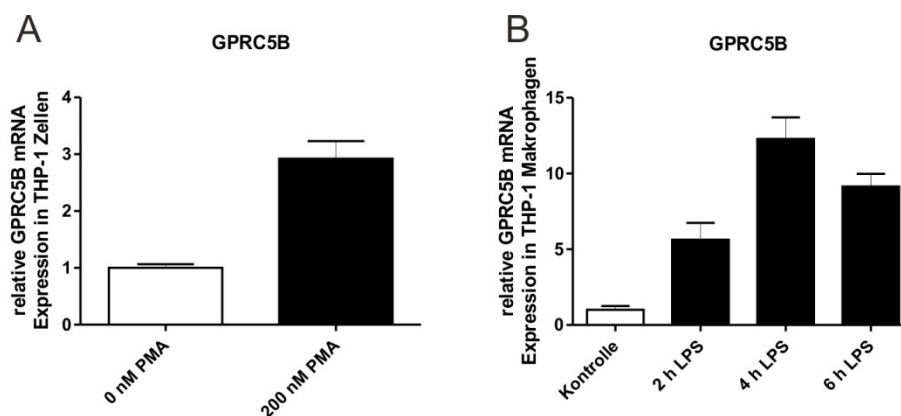


**Abb. 8: Einfluss von TNF $\alpha$  und LPS auf die GPRC5B-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen.** MOVAS wurden für 12 bzw. 24 h mit 100 ng/ml TNF $\alpha$  stimuliert und anschließend für die RNA- und Proteinisolierung lysiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Mittels Real-Time PCR wurde die Expression der GPRC5B mRNA analysiert und jede Probe zur gemessenen 18S rRNA normalisiert (A). Die Expressionsanalyse von GPRC5B auf Proteinebene erfolgte mittels Western Blot über die Auswertung der Bandendensität. Dargestellt sind die GPRC5B-spezifischen Banden der Western Blots nach 12 und 24 h (C, D) sowie die gegen die Tubulin Ladekontrolle normalisierte Expressionsstärke von GPRC5B relativ zu dessen Expression in der Kontrolle (B). Jeweils n = 3 in Triplikaten; Mittelwert relativ zur Kontrolle  $\pm$  SEM. Die Versuche zu dieser Abbildung wurden von dem Arbeitsgruppenmitglied Jan-Thorge Nitz durchgeführt.<sup>133</sup>

### 3.1.1.3 Induktion der endogenen GPRC5B-Expression in Monozyten und Makrophagen

Zur Analyse des Einflusses einer entzündlichen Aktivierung von Makrophagen auf die Expression von GPRC5B, wurde die monozytäre Zelllinie THP-1 zunächst mit PMA zu Makrophagen differenziert. Die erfolgreiche Differenzierung der Zellen konnte lichtmikroskopisch nachgewiesen werden. So führte die Stimulation mit PMA zur Adhäsion der sonst in Suspension wachsenden Monozyten an den Boden der Kulturschale. Zudem zeigten die Zellen einen für Makrophagen typischen Phänotyp mit flachem, amöboiden Zellkörper und sichtbaren Granula im Zytoplasma. Bei der Analyse der GPRC5B-Expression viel auf, dass THP-1 Makrophagen eine deutlich höhere Expression des Rezeptors aufwiesen, als THP-1 Monozyten vor der Differenzierung. Die Differenzierung der Zellen war mit einer Steigerung der mRNA-Expression von GPRC5B um nahezu das Dreifache verbunden (siehe Abb. 9A). Anschließend wurde der Effekt von LPS auf die Expression des Rezeptors in THP-1 Makrophagen untersucht. Die Stimulation der Zellen mit LPS führte zu einer deutlichen, zeitabhängigen Hochregulierung der GPRC5B-Expression auf mRNA-Ebene mit einem

Maximum nach 4 h. Zu diesem Zeitpunkt war die Expression von GPRC5B um das 12-fache erhöht (siehe Abb. 9B).



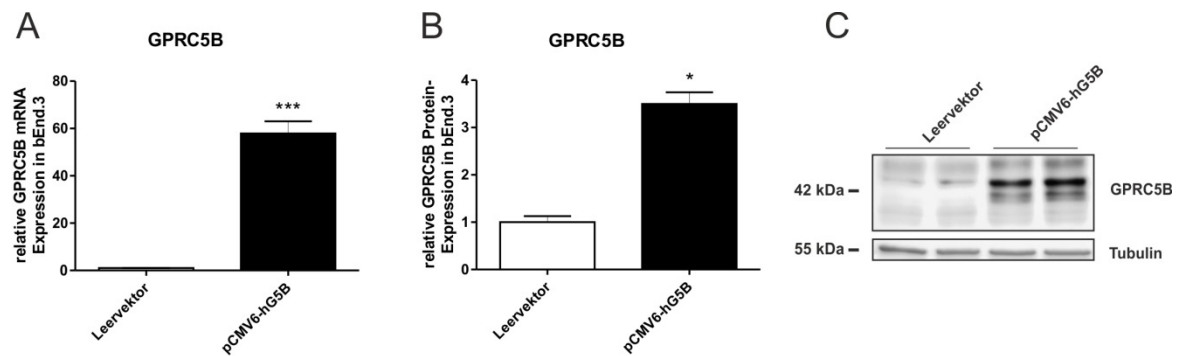
**Abb. 9: Einfluss von PMA und LPS auf die GPRC5B-Expression in THP-1 Zellen.** Die Zellen wurden zur Differenzierung in Makrophagen für 72 h mit 200 nM PMA inkubiert. Nach einer weiteren fünftägigen Kultivierung ohne PMA wurden die Zellen für die RNA-Isolierung lysiert oder zuvor für 2, 4 und 6 h mit 10 µg/ml LPS stimuliert. Mittels Real-Time PCR wurde die Expression der GPRC5B mRNA analysiert und jede Probe zur gemessenen 18S rRNA normalisiert. Dargestellt ist der Einfluss einer PMA-vermittelten Differenzierung von THP-1 Monozyten auf die GPRC5B-Expression (A) sowie der Einfluss von LPS auf die GPRC5B-Expression in differenzierten THP-1 Makrophagen (B). Jeweils n = 1 in Duplikaten; Mittelwert relativ zur Kontrolle ± SEM.

### 3.1.2 Vektorvermittelte Modulation der GPRC5B-Expression

Zur funktionellen Analyse von GPRC5B, wurde der Rezeptor zunächst in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen mittels Transfektion bzw. viralem Gentransfer überexprimiert sowie mittels RNA-Interferenz herunterreguliert.

#### 3.1.2.1 Überexpression von GPRC5B

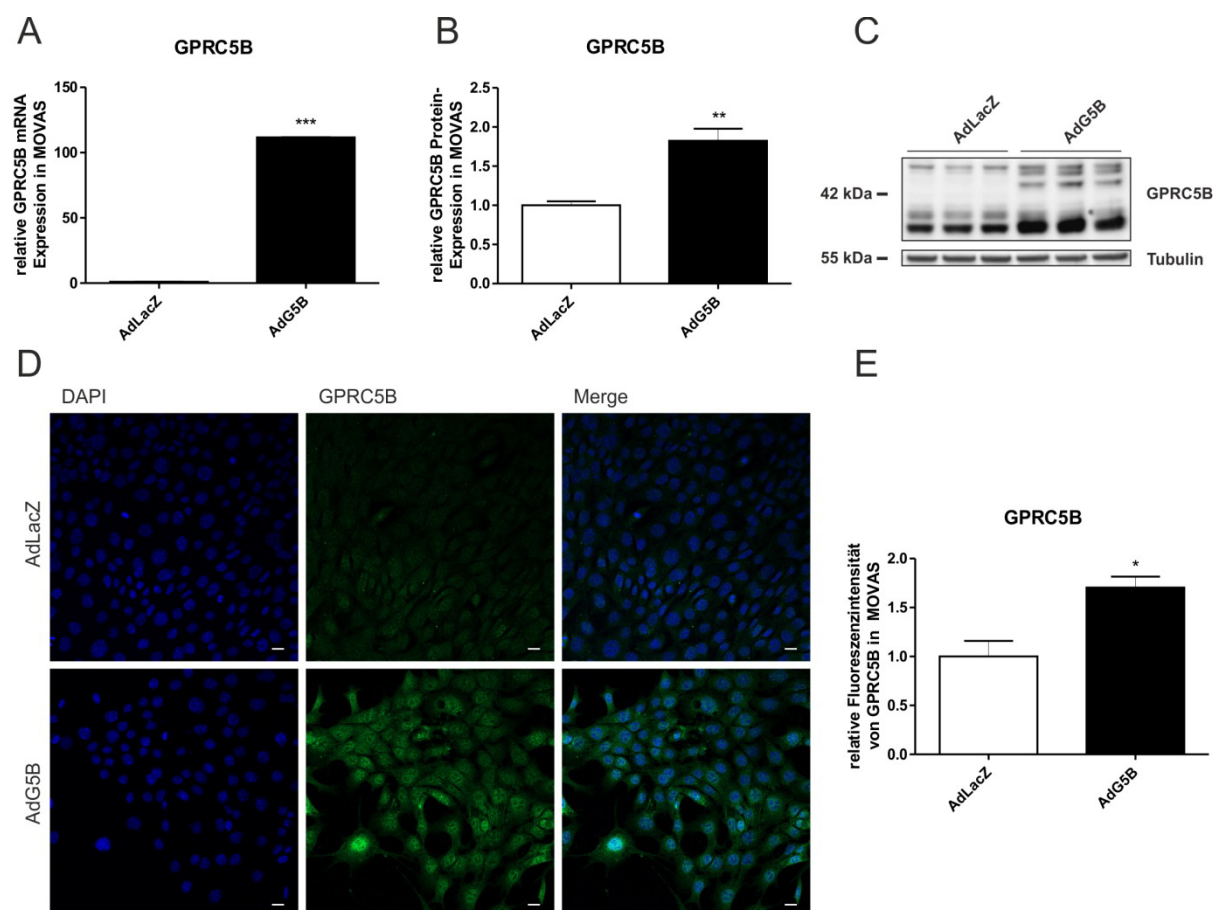
Die Überexpression von GPRC5B erfolgte in bEnd.3-Zellen durch Transfektion mit dem Plasmid pCMV6-hG5B. Der Gentransfer führte zu einer signifikanten Steigerung der GPRC5B-Expression auf mRNA-Ebene um das 58-fache und auf Proteinebene um das 3,5-fache (siehe Abb. 10).



**Abb. 10: Analyse der GPRC5B-Überexpression in bEnd.3-Zellen.** Die Zellen wurden mit dem für GPRC5B kodierenden Plasmid pCMV6-hG5B oder dem Leervektor pCMV6-Entry transfiziert und 24 bzw. 48 h nach Gentransfer für die RNA- bzw. Proteinisolierung lysiert. Mittels Real-Time PCR wurde die Expression der GPRC5B mRNA analysiert und jede Probe zur gemessenen 18S rRNA normalisiert (A). Die Expressionsanalyse von GPRC5B auf Proteinebene erfolgte mittels Western Blot über die Auswertung der Bandendensität. Dargestellt sind die GPRC5B-spezifischen Banden im Western Blot (C) sowie die gegen die Tubulin Ladekontrolle normalisierte Expressionsstärke von GPRC5B relativ zu dessen Expression in der Leervektor-transfizierten Kontrolle (B). Jeweils  $n = 3$  in Triplikaten; Mittelwert relativ zur Kontrolle  $\pm$  SEM.

In MOVAS wurde die Überexpression des Rezeptors über die Infektion der Zellen mit Adenoviren erreicht. Der Nachweis einer erfolgreichen Überexpression wurde mittels Real-Time PCR und Western Blot sowie zusätzlich beispielhaft für diese Zelllinie auch mittels Immunfluoreszenz erbracht. Der virale Gentransfer führte in MOVAS zu einer signifikanten Hochregulierung von GPRC5B auf mRNA-Ebene um das 100-Fache sowie auf Proteinebene um das 8-Fache. Mittels Immunfluoreszenzfärbung konnte gezeigt werden, dass GPRC5B sowohl endogen, als auch nach Überexpression nicht ausschließlich in der Zellmembran exprimiert ist, sondern auch im Zytoplasma und im Kern der Zellen (siehe Abb. 11).





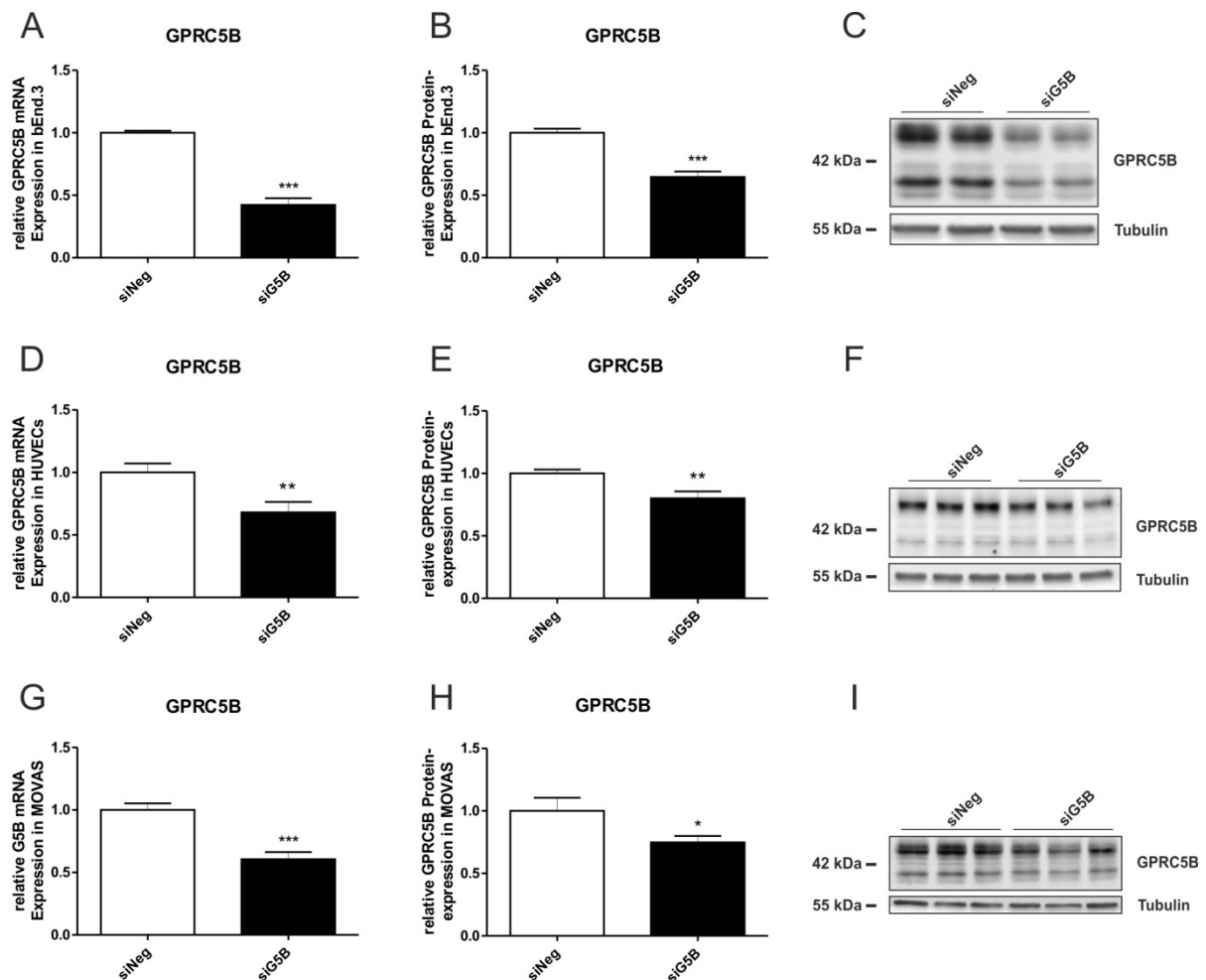
**Abb. 11: Analyse der GPRC5B-Überexpression in MOVAS.** Die Zellen wurden mit Adenoviren (Ad) infiziert, welche entweder die Expressionskassette des GPRC5B-Gens (AdG5B) oder des Gens für das Enzym  $\beta$ -Galactosidase (AdLacZ) enthielten, und 48 h später für die RNA-Isolierung lysiert. Mittels Real-Time PCR wurde die Expression der GPRC5B mRNA analysiert und jede Probe zur gemessenen 18S rRNA normalisiert (A). Für die Expressionsanalyse von GPRC5B auf Proteinebene wurden die Zellen 72 h nach der Infektion für die Proteinisolierung lysiert bzw. für die Immunfluoreszenzfärbung fixiert. Die Expressionsanalyse mittels Western Blot erfolgte über die Auswertung der Bandendensität. Dargestellt sind die GPRC5B-spezifischen Banden im Western Blot (C) sowie die gegen die Tubulin Ladekontrolle normalisierte Expressionsstärke von GPRC5B relativ zu dessen Expression in der LacZ-Kontrolle (B). Die Analyse der GPRC5B-Expression mittels Immunfluoreszenz erfolgte am konfokalen Laserscan Mikroskop. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der GPRC5B-spezifischen Immunfluoreszenz in GPRC5B- bzw. LacZ-überexprimierenden MOVAS mit Zellkernen in blau (DAPI) und GPRC5B in grün (D, Skala 100  $\mu$ m). Die Analyse der GPRC5B-spezifischen, fluoreszierenden Fläche wurde mittels ImageJ bestimmt und im Vergleich zur LacZ-Kontrolle dargestellt (E). Mittelwert relativ zur Kontrolle  $\pm$  SEM.

Endothelzellen sind allgemein für ihre schwere Transfizierbarkeit bekannt.<sup>134</sup> Primäre Zellen wie HUVECs sind zudem deutlich empfindlicher als immortalisierte Zelllinien, was die Transfektionseffizienz zusätzlich beeinträchtigt.<sup>135</sup> So konnte in HUVECs keine Überexpression von GPRC5B mittels Transfektion erreicht werden. Auch eine Infektion der Zellen mit Adenoviren war wenig erfolgreich. Aus diesem Grund erfolgte die funktionelle

Analyse von GPRC5B in HUVECs nur über die Herunterregulierung der GPRC5B-Expression.

#### 3.1.2.2 *Knockdown von GPRC5B*

Die Reduzierung der endogenen GPRC5B-Expression in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen erfolgte über die Transfektion von siRNA. Mittels Real-Time PCR und Western Blot wurde der Erfolg und das Ausmaß des Knockdowns überprüft (siehe Abb. 12). In allen verwendeten Zellen konnte das mRNA-Level sowie deren Translation signifikant reduziert werden. Dabei wurde in bEnd.3-Zellen, mit einer Reduktion der GPRC5B mRNA um 58 % und einer Verminderung ihrer Translation um 36 %, der stärkste Knockdown erreicht (siehe Abb. 12A-C). In den schwer transfizierbaren HUVECs konnte die mRNA des Rezeptors hingegen nur um 32 % und die Proteinexpression um 20 % reduziert werden (siehe Abb. 12D-F). In MOVAS wurde auf mRNA-Ebene ein Knockdown von 40 % und auf Proteinebene eine Reduktion der GPRC5B-Expression um 26 % erzielt (siehe Abb. 12G-I).



**Abb. 12: Analyse des GPRC5B-Knockdowns in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen.** Die Zellen wurden mit einer der GPRC5B-mRNA komplementären siRNA (siG5B) bzw. einer negativen Kontroll-siRNA (siNeg) transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 bzw. 72 h wurden die Zellen für die RNA- bzw. Proteinisolierung lysiert. Mittels Real-Time PCR wurde die Expression der GPRC5B mRNA analysiert und jede Probe zur gemessenen 18S rRNA normalisiert. Dargestellt ist die siRNA-vermittelte Reduktion der GPRC5B-mRNA in bEnd.3-Zellen (A), HUVECs (D) und MOVAS (G). Die Expressionsanalyse von GPRC5B auf Proteinebene erfolgte mittels Western Blot über die Auswertung der Bandendensität. Dargestellt sind die GPRC5B-spezifischen Banden im Western Blot für bEnd.3-Zellen (C), HUVECs (F) und MOVAS (I) sowie die gegen die Tubulin Ladekontrolle normalisierte Expressionsstärke von GPRC5B relativ zu dessen Expression in der Kontrolle (B, E, F). Jeweils  $n = 3$  in Triplikaten; Mittelwert relativ zur Kontrolle  $\pm$  SEM.

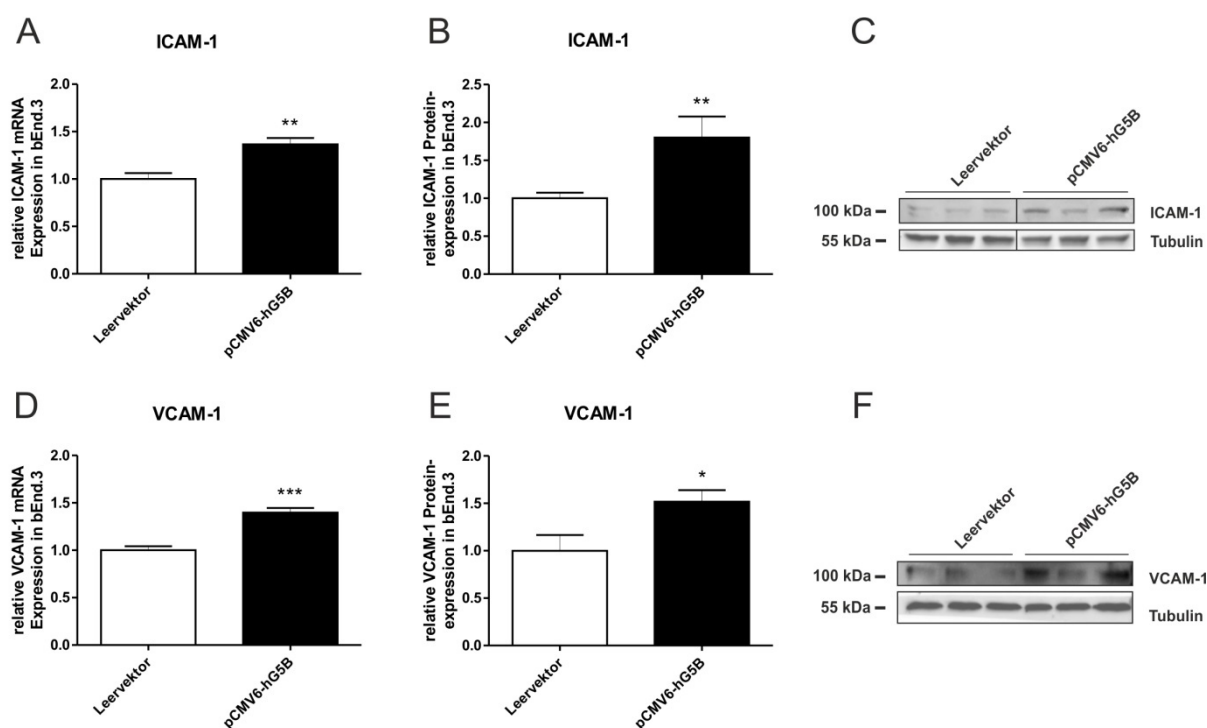
### 3.1.3 Einfluss von GPRC5B auf die Expression inflammatorischer Mediatoren

Die pathophysiologische Exposition der Gefäßwandzellen durch eine Kombination aus oxidativem Stress, Hypoxie, hohen Cholesterinkonzentrationen und Entzündung führt zur inflammatorischen Aktivierung der Zellen, was die Synthese weiterer proinflammatorischer und proatherogener Mediatoren zur Folge hat. Zur Untersuchung der Fragestellung, ob eine

erhöhte Expression von GPRC5B die Synthese proatherogener Mediatoren beeinflusst, wurde der Rezeptor in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen überexprimiert und das Expressionslevel verschiedener Adhäsionsmoleküle, Zytokine und Enzyme analysiert. Es wurde außerdem der Einfluss einer reduzierten GPRC5B-Expression auf die Expression dieser Mediatoren geprüft.

### 3.1.3.1 GPRC5B verstärkt die Expression von Adhäsionsmolekülen

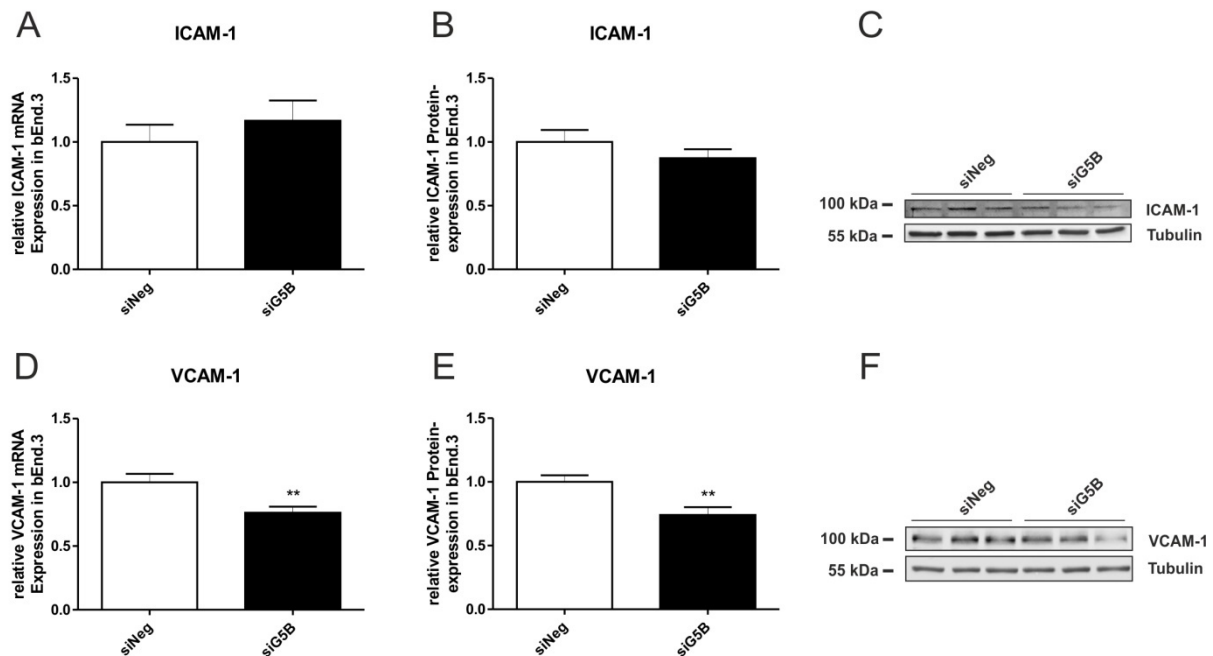
Die Überexpression von GPRC5B führte in bEnd.3-Zellen zu einer signifikant verstärkten Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 auf RNA-Ebene jeweils um den Faktor 1,4 und auf Proteinebene um den Faktor 1,8 bzw. 1,5 (siehe Abb. 13).



**Abb. 13: Expression von Adhäsionsmolekülen nach GPRC5B-Überexpression in bEnd.3-Zellen.** GPRC5B wurde in bEnd.3-Zellen überexprimiert und die Zellen 24 bzw. 48 h nach dem Gentransfer für die RNA- bzw. Proteinisolierung lysiert. Mittels Real-Time PCR wurde die zur 18S rRNA normalisierte mRNA-Expression von ICAM-1 (A) und VCAM-1 (D) analysiert. Die Expressionsanalyse der Adhäsionsmoleküle auf Proteinebene erfolgte mittels Western Blot über die Auswertung der Bandendensität. Dargestellt sind die spezifischen Banden für ICAM-1 (C) und VCAM-1 (F) im Western Blot sowie die gegen die Tubulin Ladekontrolle normalisierte Expressionsstärke des jeweiligen Adhäsionsmoleküls relativ zu dessen Expression in der Leervektor-transfizierten Kontrolle (B, E). Jeweils  $n = 3$  in Triplikaten; Mittelwert relativ zur Kontrolle  $\pm$  SEM.

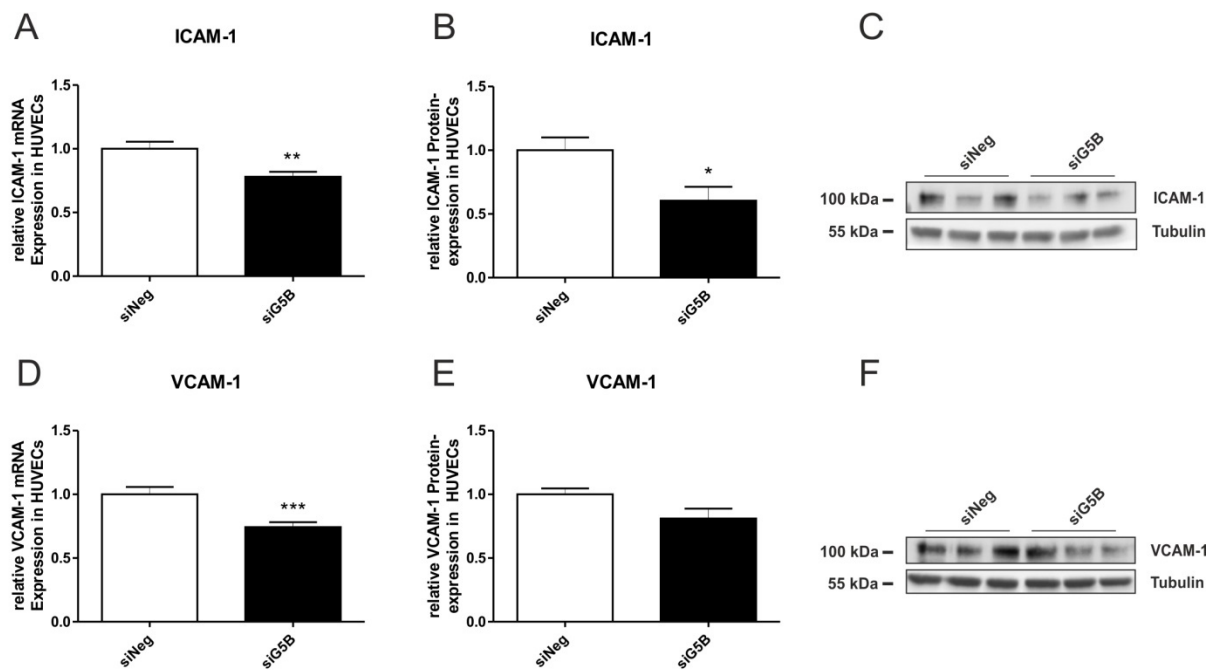
Im Knockdown-Experiment konnte der Effekt von GPRC5B auf die Expression von VCAM-1 bestätigt werden. Die verminderte Expression des Rezeptors führte in bEnd.3-Zellen zu einem signifikant reduzierten mRNA-Level von VCAM-1 um 24 %. Auf

Proteinebene führte der GPRC5B-Knockdown zu einer signifikant reduzierten Expression von VCAM-1 um 26 % (siehe Abb. 14D-F). Die Expression von ICAM-1 wurde hingegen nicht signifikant beeinflusst (siehe Abb. 14A-C).



**Abb. 14: Expression von Adhäsionsmolekülen nach GPRC5B-Knockdown in bEnd.3-Zellen.** In bEnd.3-Zellen wurde die GPRC5B-Expression mittels siRNA herunterreguliert und die Zellen 48 bzw. 72 h nach der Transfektion für die RNA- bzw. Proteinisolierung lysiert. Mittels Real-Time PCR wurde die zur 18S rRNA normalisierte mRNA-Expression von ICAM-1 (A) und VCAM-1 (D) analysiert. Die Expressionsanalyse der Adhäsionsmoleküle auf Proteinebene erfolgte mittels Western Blot über die Auswertung der Bandendensität. Dargestellt sind die spezifischen Banden für ICAM-1 (C) und VCAM-1 (F) im Western Blot sowie die gegen die Tubulin Ladekontrolle normalisierte Expressionsstärke des jeweiligen Adhäsionsmoleküls relativ zu dessen Expression in der Kontrolle (B, E). Jeweils  $n = 3$  in Triplikaten; Mittelwert relativ zur Kontrolle  $\pm$  SEM.

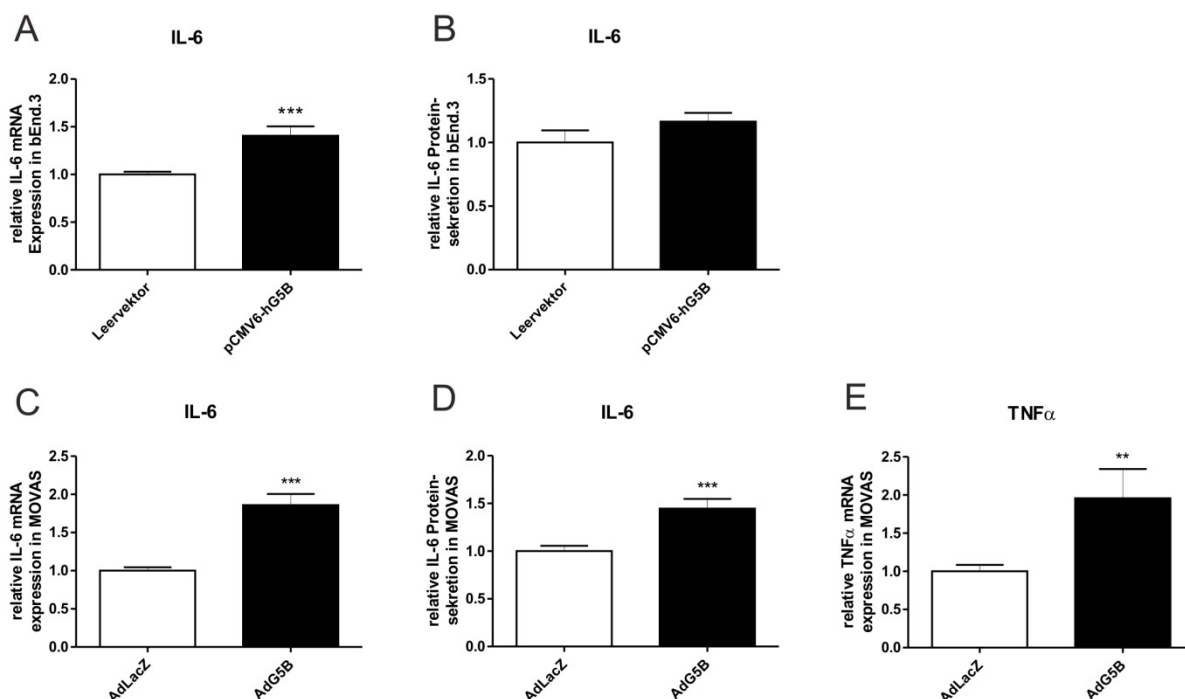
Zur Verifizierung der Daten wurde der Effekt des GPRC5B-Knockdowns zusätzlich in HUVECs untersucht. In den primären Endothelzellen führte die verminderte Expression des Rezeptors zu einer signifikant reduzierten Expression von ICAM-1 um 22 % auf RNA-Ebene sowie um 40 % auf Proteinebene. Die Expression von VCAM-1 war auf mRNA-Ebene signifikant um 26 % reduziert. Auf Proteinebene konnte nur eine tendenziell reduzierte Expression von VCAM-1 um 19 % nachgewiesen werden (siehe Abb. 15).



**Abb. 15: Expression von Adhäsionsmolekülen nach GPRC5B-Knockdown in HUVECs.** HUVECs wurden 48 bzw. 72 h nach siRNA-Transfektion für die RNA- bzw. Proteinisolierung lysiert. Mittels Real-Time PCR wurde die zur 18S rRNA normalisierte mRNA-Expression von ICAM-1 (A) und VCAM-1 (D) analysiert. Jeweils  $n = 6$  in Tripplikaten. Die Expressionsanalyse der Adhäsionsmoleküle auf Proteinebene erfolgte mittels Western Blot über die Auswertung der Bandendensität. Dargestellt sind die spezifischen Banden für ICAM-1 (C) und VCAM-1 (F) im Western Blot sowie die gegen die Tubulin Ladekontrolle normalisierte Expressionsstärke der Proteine relativ zu dessen Expression in der Kontrolle (B, E). Jeweils  $n = 2$  in Tripplikaten; Mittelwert relativ zur Kontrolle  $\pm$  SEM.

### 3.1.3.2 GPRC5B verstärkt die Expression von inflammatorischen Zytokinen

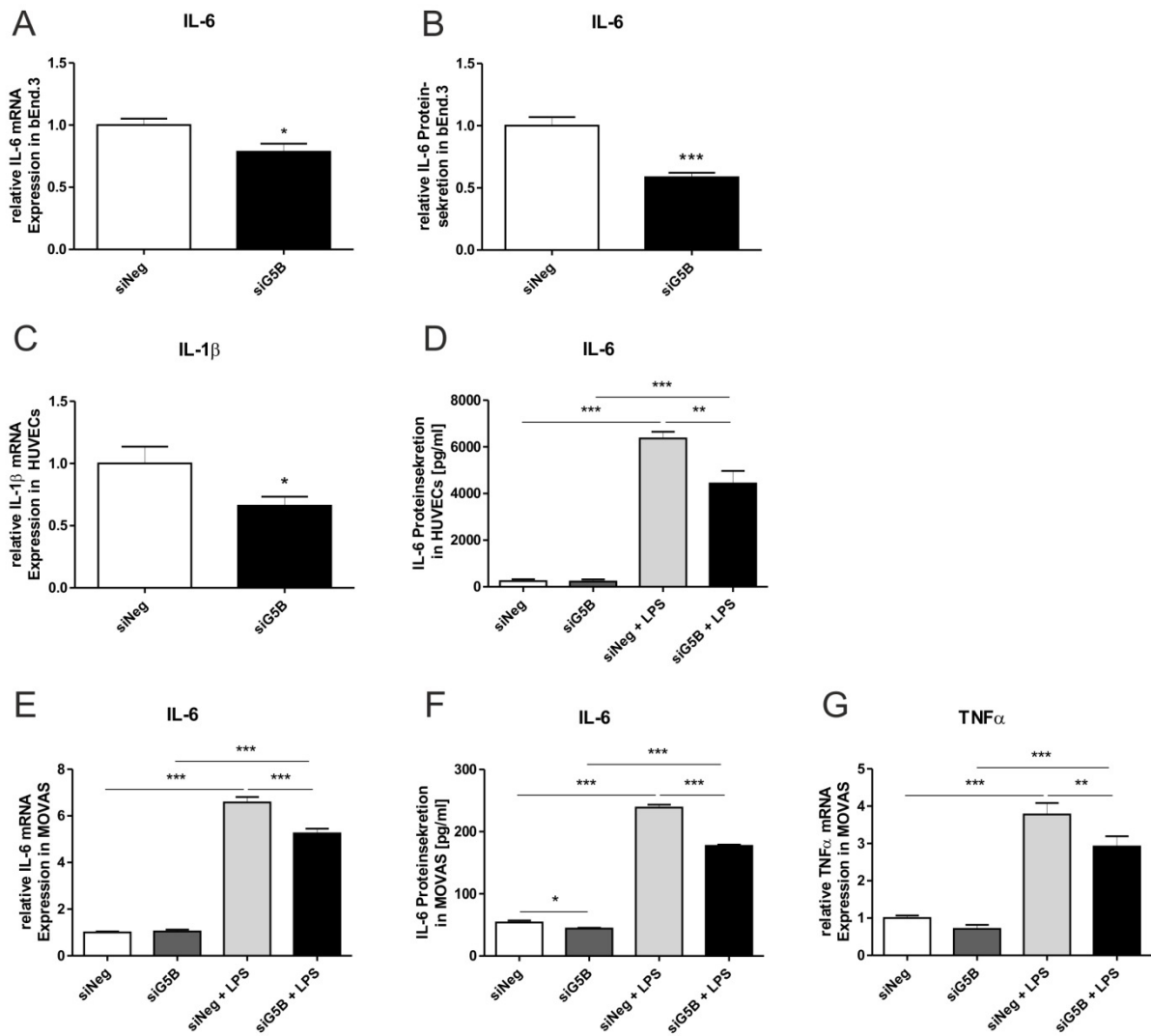
Neben dem Einfluss von GPRC5B auf die Expression von Adhäsionsmolekülen, wurde auch ein möglicher Einfluss des Rezeptors auf die Expression von inflammatorischen Zytokinen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von GPRC5B in bEnd.3-Zellen und MOVAS zu einer signifikant erhöhten Expression inflammatorischer Zytokine führt. In bEnd.3-Zellen wurde die Transkription von IL-6 im Vergleich zur Kontrolle signifikant auf 140 % gesteigert. Auf Proteinebene konnte eine tendenziell verstärkte Sekretion des Zytokins auf 116 % nachgewiesen werden. In glatten Gefäßmuskelzellen führte die Überexpression des Rezeptors zu einer signifikant erhöhten Transkription von IL-6 auf 186 % und von TNF $\alpha$  auf 196 %. Auf Proteinebene wurde die Sekretion von IL-6 signifikant auf 145 % gesteigert (siehe Abb. 16). Die TNF $\alpha$ -Sekretion war sowohl auf basalem Niveau, als auch nach GPRC5B-Überexpression zu gering für die Detektion mittels Western Blot oder ELISA.



**Abb. 16: Expression von inflammatorischen Zytokinen nach GPRC5B-Überexpression in bEnd.3-Zellen und MOVAS.** GPRC5B wurde in bEnd.3-Zellen und MOVAS überexprimiert und die Zellen 24 h nach Transfektion (bEnd.3) bzw. 48 h nach Infektion (MOVAS) für die RNA-Isolierung lysiert. Mittels Real-Time PCR wurde die zur 18S rRNA normalisierte mRNA-Expression von IL-6 (A, C) und TNF $\alpha$  (E) analysiert. Jeweils  $n = 3$  in Triplikaten. Die Expressionsanalyse auf Proteinebene erfolgte 48 bzw. 72 h nach Gentransfer über die Quantifizierung der sekretierten Zytokine im Zellkulturüberstand mittels ELISA. Dargestellt ist die IL-6-Sekretion in bEnd.3-Zellen (B;  $n = 3$  in Triplikaten) und MOVAS (E;  $n = 5$  in Triplikaten) nach GPRC5B-Überexpression relativ zur LacZ-Kontrolle. Mittelwerte relativ zur Kontrolle  $\pm$  SEM.

Umgekehrt führte der siRNA-vermittelte GPRC5B-Knockdown in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen zu einer signifikant verminderten Expression inflammatorischer Zytokine. So wurde in bEnd.3-Zellen die basale Transkription von IL-6 signifikant um 22 % und die Sekretion des Zytokins um 42 % gesenkt. In HUVECs führte der GPRC5B-Knockdown zu einer signifikanten Reduktion der basalen Transkription von IL-1 $\beta$  um 34 %. Die Menge an sekretiertem IL-1 $\beta$  lag jedoch unterhalb der Nachweisgrenze von Western Blot und ELISA. Die basale Sekretion von IL-6 konnte hingegen mittels ELISA nachgewiesen werden. Jedoch hatte der Knockdown von GPRC5B keinen signifikanten Effekt auf die basale Expression des Proteins. Durch die Stimulation der Zellen mit 0,1  $\mu$ g/ml LPS für 5 h stieg die Menge an sekretiertem IL-6 um das 26-fache an. In Zellen mit verminderter GPRC5B-Expression fiel dieser Anstieg signifikant geringer aus und betrug nur das 18-fache der basalen IL-6-Sekretion. In MOVAS konnte die basale Transkription von IL-6 und TNF $\alpha$  durch den Knockdown von GPRC5B nicht signifikant reduziert werden. Die Erhöhung der mRNA-

Expression von IL6 und TNF $\alpha$  durch LPS-Stimulation fiel jedoch in Zellen mit GPRC5B-Knockdown signifikant um etwa 20 % geringer aus. Auf Proteinebene konnte die Sekretion von IL-6 sowohl auf basalem Niveau, als auch nach LPS-Stimulation signifikant durch den Knockdown von GPRC5B um 18 % bzw. 26 % reduziert werden (siehe Abb. 17).

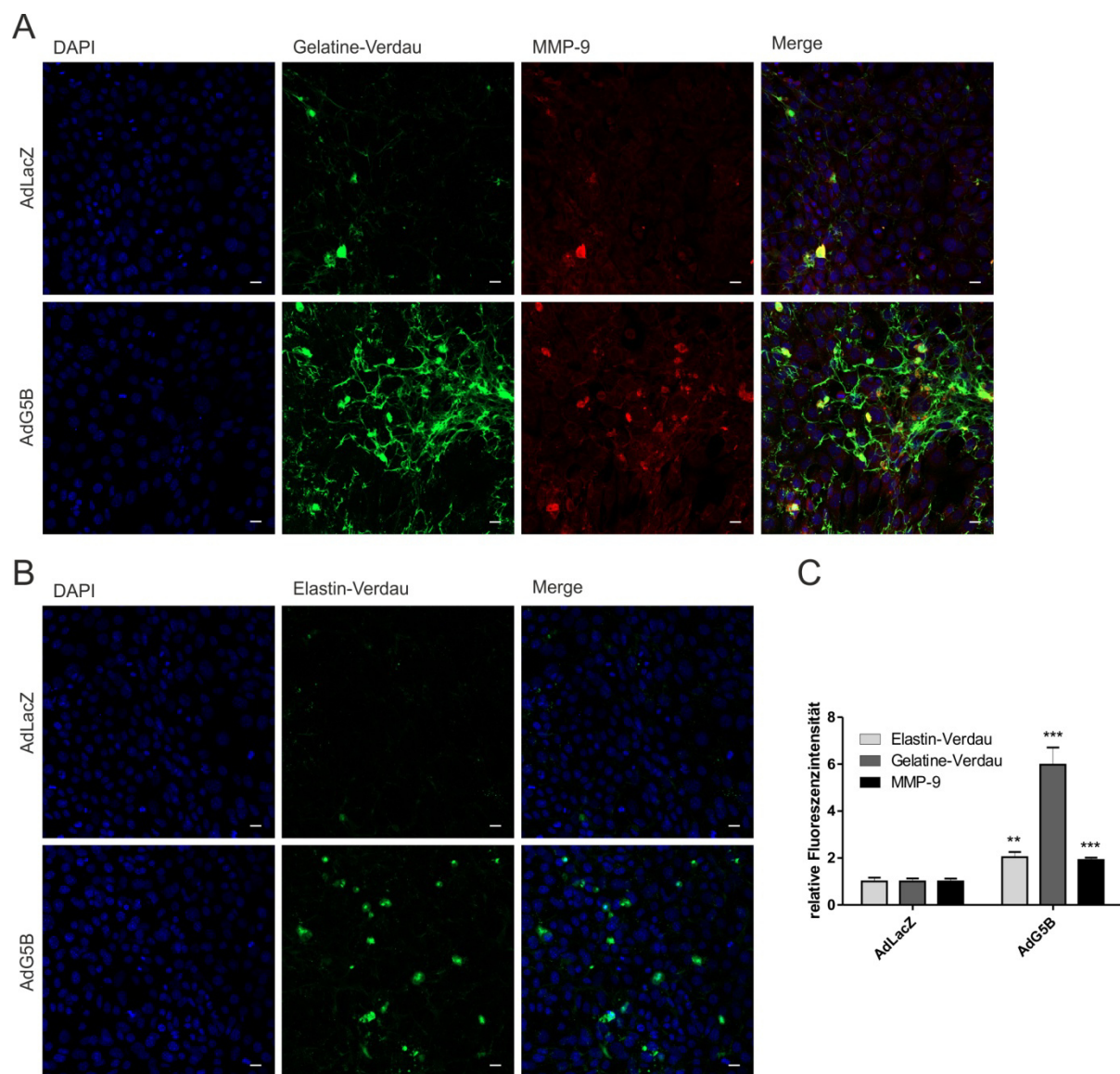


**Abb. 17: Expression von inflammatorischen Zytokinen nach GPRC5B-Knockdown in bEnd.3-Zellen, HUVECs und MOVAS.** Die Zellen wurden 48 h nach siRNA-Transfektion für die RNA-Isolierung lysiert. Zellkulturüberstände wurden 72 h nach Transfektion entnommen. Während der letzten 5 h vor der Ernte wurden die Zellen jeweils mit bzw. ohne 0,1  $\mu$ g/ml LPS stimuliert. Mittels Real-Time PCR wurde die zur 18S rRNA normalisierte mRNA-Expression von IL-6 in bEnd.3-Zellen (A, n = 2 in Triplikaten), die Expression von IL-1 $\beta$  in HUVECs (C, n = 4 in Triplikaten) sowie in MOVAS die Expression von IL-6 (E) und TNF $\alpha$  (G) mit und ohne LPS-Stimulation analysiert (n = 3 in Triplikaten). Die Expressionsanalyse auf Proteinebene erfolgte über die Quantifizierung der sekretierten Zytokine im Zellkulturüberstand mittels ELISA. Dargestellt ist die absolute Sekretion von IL-6 in bEnd.3-Zellen (B, n = 4 in Triplikaten) sowie mit und ohne LPS-Stimulation in HUVECs (D, n = 3 in Triplikaten) und MOVAS (F, n = 3 in Triplikaten) in pg/ml. Mittelwerte  $\pm$  SEM.



### 3.1.3.3 *GPRC5B* erhöht die Expression aktiver Matrix-Metalloproteinasen

Aufgrund ihrer Fähigkeit, Komponenten der extrazellulären Matrix abzubauen, erleichtern MMPs die Migration proliferierender glatter Gefäßmuskelzellen von den Tunica media in die Tunica intima und tragen u.a. zur Plaquestabilisierung bei.<sup>38</sup> Um den Einfluss von GPRC5B auf die Expression aktiver MMPs zu untersuchen, wurde der Rezeptor in glatten Gefäßmuskelzellen überexprimiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie die Menge an gespaltenen Gelatine sowie gespaltenem Elastin bestimmt. Zusätzlich wurde die Expression von MMP-9 direkt über die Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass die Spaltung von Gelatine und Elastin in Zellen mit vermehrter GPRC5B-Expression signifikant höher ist als in den Kontrollzellen. So war die Menge an gespaltenem Elastin im Vergleich zur LacZ-Kontrolle verdoppelt und die Menge an gespaltenen Gelatine sogar um das 6-fache erhöht. Der gesteigerte Gelatineverdau ging dabei mit einer signifikant erhöhten Expression von MMP-9 einher, welche in GPRC5B-überexprimierenden Zellen doppelt so hoch war wie in den Kontrollzellen. Das Fluoreszenzsignal der gespaltenen Gelatine war dabei teilweise mit dem Fluoreszenzsignal von MMP-9 kolokalisiert (siehe Abb. 18).



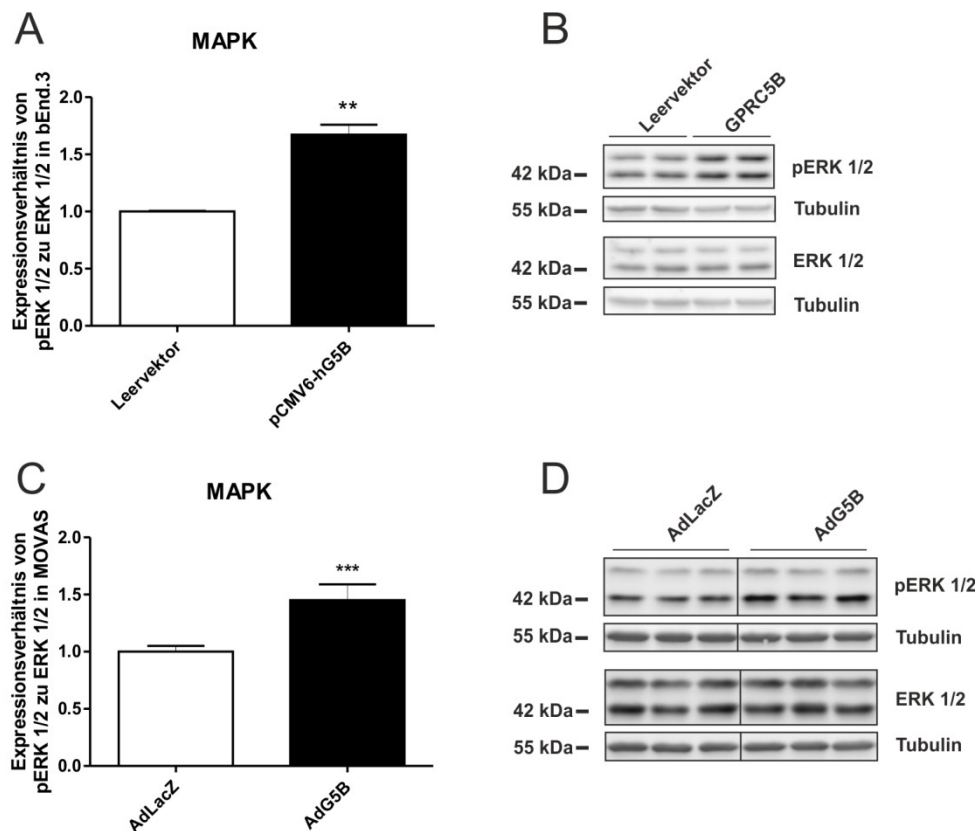
**Abb. 18: Expression aktiver Matrix-Metalloproteinasen nach GPRC5B-Überexpression in MOVAS.** GPRC5B- bzw. LacZ-überexprimierende MOVAS wurden 48 h nach der Infektion für 24 h mit 10 µg/ml LPS stimuliert und anschließend für 5 h in Gegenwart von Fluorescein-gekoppelter Gelatine bzw. Elastin inkubiert. Der Nachweis aktiver MMPs erfolgte über die Analyse der fluoreszierenden Abbauprodukte von Gelatine und Elastin am konfokalen Laserscan Mikroskop. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit Hilfe des Kernfarbstoffs DAPI sichtbar gemacht und die Expression von MMP-9 immunhistochemisch nachgewiesen. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der spezifischen Immunfluoreszenz von MMP-9 (rot) und proteolytisch gespaltenen Gelatine (A, grün) sowie verdaulichem Elastin (B, grün) in GPRC5B- bzw. LacZ-überexprimierenden MOVAS. Die Zellkerne wurden jeweils mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt und sind in blau dargestellt (Skala 100 µm). Die Auswertung erfolgte über die jeweils spezifische fluoreszierende Fläche in GPRC5B-überexprimierenden Zellen in Relation zur LacZ-Kontrolle (C). Jeweils n = 4; Mittelwerte relativ zur Kontrolle ± SEM.

### ***3.1.4 Einfluss von GPRC5B auf die Aktivierung proatherogener Signalwege***

Die Expression von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und MMPs wird durch die Aktivierung spezifischer Signalwege in den Zellen initiiert. Zur Analyse des Mechanismus, über den GPRC5B die Expression proatherogener Mediatoren beeinflussen könnte, wurde die rezeptorabhängige Aktivierung zweier Schlüsselproteine sowie eine mögliche Interaktion von GPRC5B mit der Tyrosinkinase Fyn untersucht.

#### ***3.1.4.1 GPRC5B aktiviert die extrazelluläre signalregulierte Kinase***

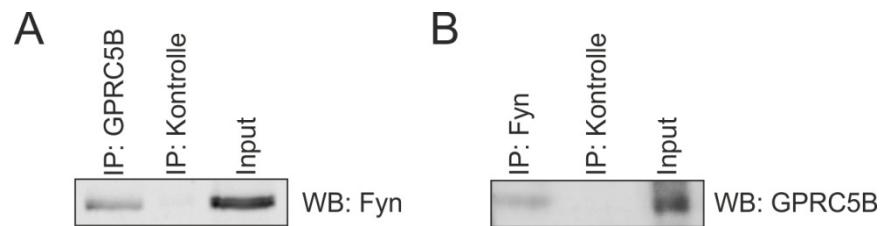
Die Phosphorylierung und somit Aktivierung von MAPK wie beispielsweise ERK 1/2 führt u.a. zur Proliferation, einem wichtigen zellulären Ereignis bei der Entstehung atherosklerotischer Plaques.<sup>85</sup> In bEnd.3-Zellen und MOVAS resultierte die Überexpression von GPRC5B in einem signifikant erhöhten Level an phosphoryliertem ERK 1/2 (pERK 1/2). Das Expressionsverhältnis der phosphorylierten Kinase zur nicht-phosphorylierten Kinase war im Vergleich zur Kontrolle in bEnd.3-Zellen um den Faktor 1,7 und in MOVAS um den Faktor 1,5 erhöht (siehe Abb. 19).



**Abb. 19: Phosphorylierung von ERK 1/2 durch GPRC5B-Überexpression in bEnd.3-Zellen und MOVAS.** GPRC5B wurde in bEnd.3-Zellen und MOVAS überexprimiert und die Zellen 48 h nach Transfektion (bEnd.3) bzw. 72 h nach Infektion (MOVAS) für die Proteinisolierung lysiert. Die Expressionsanalyse von pERK 1/2 und ERK 1/2 erfolgte mittels Western Blot über die Auswertung der Bandendensität. Dargestellt sind die spezifischen Banden für pERK 1/2 und ERK 1/2 in bEnd.3-Zellen (B, n = 2 in Triplikaten) und MOVAS (D, n = 3 in Triplikaten) sowie das gegen die Tubulin Ladekontrolle normalisierte Expressionsverhältnis von pERK 1/2 zu ERK 1/2 im Vergleich zur Kontrolle (A, B). Mittelwerte relativ zur Kontrolle  $\pm$  SEM.

#### 3.1.4.2 GPRC5B interagiert direkt mit der Tyrosinkinase Fyn

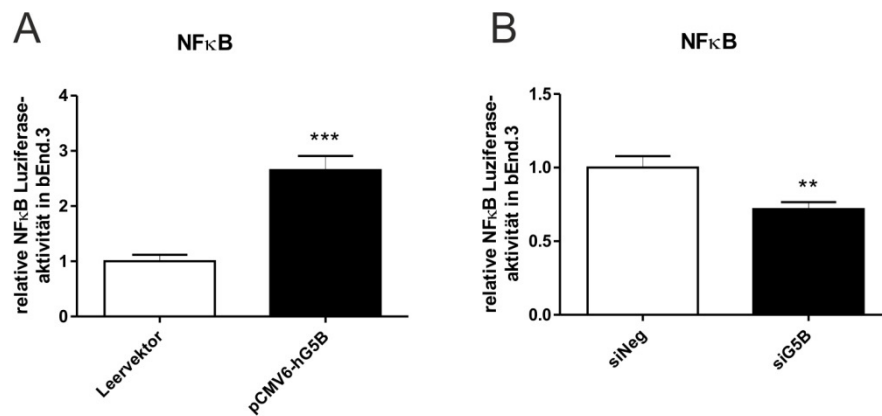
In Adipozyten ist nachgewiesen worden, dass GPRC5B mit der Tyrosinkinase Fyn interagiert.<sup>108</sup> Mittels Ko-Immünpräzipitation konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine direkte Interaktion zwischen GPRC5B und Fyn auch in Endothelzellen stattfindet (siehe Abb. 20).



**Abb. 20: Interaktion von GPRC5B und Fyn in bEnd.3-Zellen.** DDK-getagtes GPRC5B bzw. Fyn wurde in bEnd.3 Zellen überexprimiert und die Zellen 48 h nach der Transfektion für die Proteinisolierung lysiert. Für die Immunpräzipitation (IP) wurden Anti-DDDK-tag mAb-Magnetic Beads zusammen mit dem Proteinlysate bzw. dem Lysepuffer (Kontrolle) inkubiert und anschließend die überexprimierten und spezifisch an die Beads gebundenen Proteine zusammen mit ihrem Interaktionspartner präzipitiert. Die Analyse der präzipitierten Proteine erfolgte mittels Western Blot. Als Positivkontrolle diente das Input-Lysat (Input). Dargestellt sind die spezifischen Banden für Fyn in GPRC5B-überexprimierenden Zellen (A) sowie die spezifischen Banden für GPRC5B in Fyn-überexprimierenden Zellen (B) im Western Blot (WB).

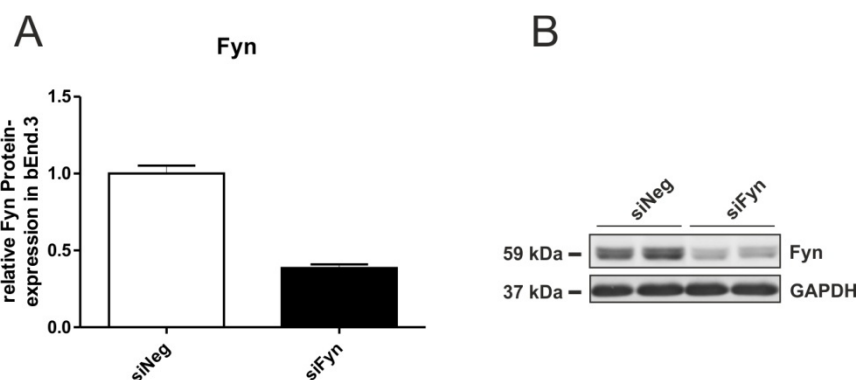
#### 3.1.4.3 GPRC5B aktiviert den NF $\kappa$ B-Signalweg in Abhängigkeit von Fyn

Da NF $\kappa$ B die Expression vieler proinflammatorischer und proatherogener Gene reguliert, wurde mittels Luciferase-Assay der Einfluss von GPRC5B auf die Aktivität von NF $\kappa$ B untersucht. In bEnd.3-Zellen führte die Überexpression von GPRC5B zu einer signifikanten Hochregulierung der NF $\kappa$ B-Aktivität um den Faktor 2,7. Im Knockdown-Experiment konnte der Einfluss von GPRC5B auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors bestätigt werden. So war die NF $\kappa$ B-Aktivität in Zellen mit GPRC5B-Knockdown signifikant um 28 % reduziert (siehe Abb. 21).



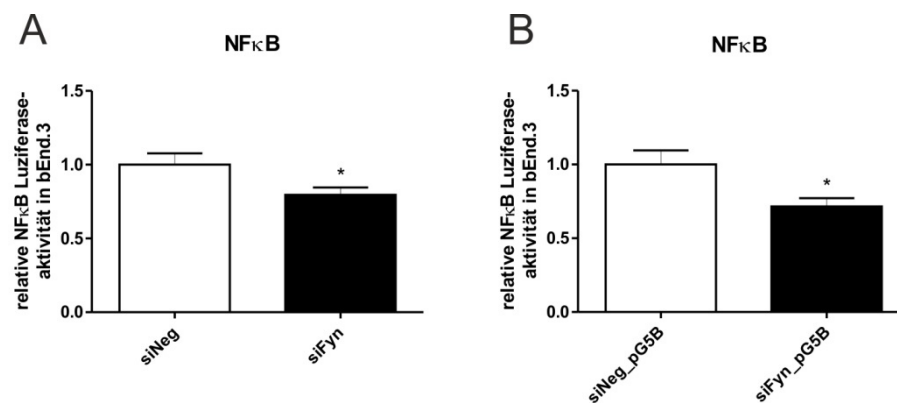
**Abb. 21: Analyse der NFκB-Aktivität nach Überexpression bzw. Knockdown von GPRC5B in bEnd.3-Zellen.** Der Einfluss von GPRC5B auf die Aktivität von NFκB wurde 48 bzw. 72 h nach Überexpression bzw. Knockdown von GPRC5B unter Verwendung eines dualen Luciferase Reporter Assays untersucht. Dazu wurden die Zellen zusätzlich mit zwei Plasmiden transfiziert, welche für die Renilla-Luciferase (interne Kontrolle) kodieren bzw. das NFκB-responsive Element mit dem nachgeschalteten Gen für die Firefly-Luciferase enthält. Die Analyse der NFκB-Aktivität erfolgte im Zelllysate über die Messung der Firefly-Luciferaseaktivität. Dargestellt ist die gegen die Renilla-Luciferaseaktivität normalisierte Aktivität der Firefly-Luciferase als Maß für die Aktivierung von NFκB in Zellen mit GPRC5B-Überexpression (A) bzw. GPRC5B-Knockdown (B) im Vergleich zur Kontrolle. Jeweils  $n = 3$  in Hexaplikaten; Mittelwerte relativ zur Kontrolle  $\pm$  SEM.

Es wurde anschließend untersucht, ob die Aktivierung von NFκB durch GPRC5B von der Interaktion des Rezeptors mit der Tyrosinkinase Fyn abhängig ist. Dazu wurde Fyn zunächst mittels RNA-Interferenz in bEnd.3-Zellen herunterreguliert. Es wurde eine Reduktion der Fyn-Expression um 62 % erreicht (siehe Abb. 22).



**Abb. 22: Analyse des Fyn-Knockdowns in bEnd.3-Zellen.** Die Zellen wurden 72 h nach siRNA-Transfektion für die Proteinisolierung lysiert. Der Nachweis einer erfolgreichen Herunterregulierung von Fyn erfolgte mittels Western Blot und Analyse der Bandendensität. Dargestellt sind die Fyn-spezifischen Banden im Western Blot (A) sowie die gegen die GAPDH Ladekontrolle normalisierte Expressionsstärke von Fyn relativ zu dessen Expression in der Kontrolle (B).  $N = 1$  in Duplikaten; Mittelwerte relativ zur Kontrolle  $\pm$  SEM.

Ein möglicher Einfluss von Fyn auf die Aktivität von NF $\kappa$ B wurde mittels Luciferase-Assay in bEnd.3-Zellen mit Fyn-Knockdown sowie mit bzw. ohne zusätzlicher GPRC5B-Überexpression untersucht. Tatsächlich führte der Knockdown von Fyn in bEnd.3-Zellen zu einer um 21 % signifikant reduzierten Aktivierung von NF $\kappa$ B. Auch in GPRC5B-überexprimierenden Zellen, konnte die Aktivierung von NF $\kappa$ B durch eine verminderte Expression von Fyn signifikant um 29 % reduziert werden (siehe Abb. 23).



**Abb. 23: Knockdown von Fyn hemmt die NF $\kappa$ B-Aktivierung in bEnd.3-Zellen.** Der Einfluss von Fyn auf die Aktivierung von NF $\kappa$ B wurde unter Verwendung eines dualen Luciferase Reporter Assays 72 h nach Fyn-Knockdown und mit bzw. ohne paralleler GPRC5B-Überexpression untersucht. Die Analyse der NF $\kappa$ B-Aktivität erfolgte im Zelllysate über die Messung der Firefly-Luciferaseaktivität. Dargestellt ist die gegen die Renilla-Luciferaseaktivität normalisierte Aktivität der Firefly-Luciferase als Maß für die Aktivierung von NF $\kappa$ B in Zellen mit alleinigem Fyn-Knockdown (A) sowie mit zusätzlicher Überexpression von GPRC5B (B) im Vergleich zur Kontrolle. Jeweils  $n = 3$  in Hexaplikaten; Mittelwerte relativ zur Kontrolle  $\pm$  SEM.

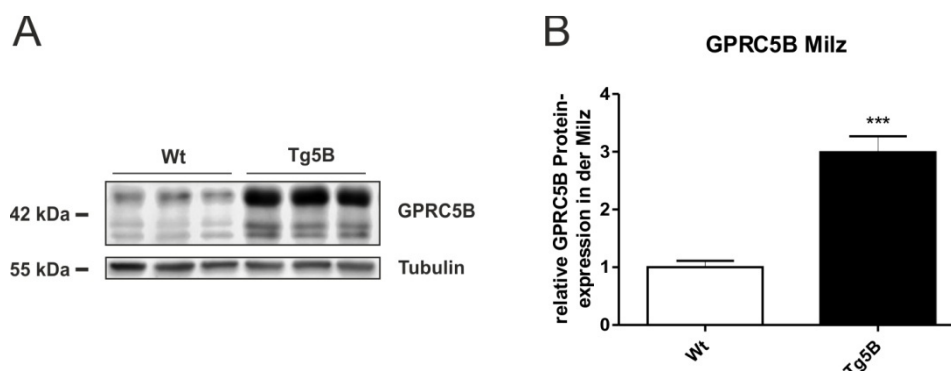
### 3.2 Einfluss von GPRC5B auf atherosklerotische Plaques *in vivo*

Die pathophysiologische Relevanz der *in vitro* erhobenen Daten für die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen wurde anschließend im Mausmodell untersucht. Dazu erfolgte eine autologe Knochenmarkstransplantation von  $Ldlr^{-/-}$  Mäusen mit Knochenmark von Wildtyp- bzw. transgenen Mäusen der GPRC5B-Linie. Der Effekt von transgenem GPRC5B in Knochenmarks-abgeleiteten Zellen des Monozyten/Makrophagen-Systems wurde nach Atheroskleroseinduktion durch eine fettreiche Diät in Gewebeschnitten des Aortensinus untersucht. Zusätzlich erfolgte die Erhebung einiger allgemeiner Parameter zur Analyse der transgenen Mauslinie sowie des in dieser Arbeit verwendeten Atherosklerosemodells.

### 3.2.1 Untersuchung allgemeiner Parameter

#### 3.2.1.1 Nachweis der Überexpression im transgenen Mausmodell

Die transgene GPRC5B-Mauslinie weist eine konstitutive und ubiquitäre Expression des humanen GPRC5B-Gens auf. In eigenen Vorarbeiten konnte die GPRC5B-Überexpression bereits im Herzen der transgenen Tiere nachgewiesen werden.<sup>136</sup> Darüber hinaus wurde die Überexpression des Rezeptors in dieser Arbeit exemplarisch auch in der Milz von transgenen Mäusen und Wildtyp-Mäusen der GPRC5B-Linie untersucht. Mittels Western Blot konnte gezeigt werden, dass transgene GPRC5B-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren auch in der Milz eine signifikant um das ca. 3-fache erhöhte Expression des Rezeptors aufwiesen (siehe Abb. 24).

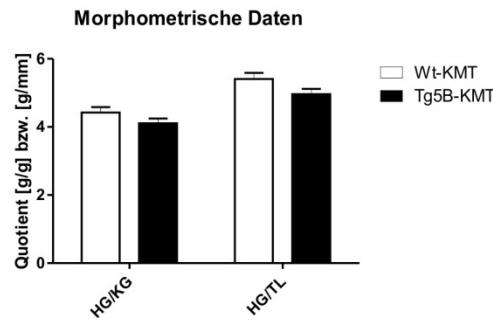


**Abb. 24: Nachweis der GPRC5B-Expression im transgenen Mausmodell.** Zur Überprüfung der GPRC5B-Überexpression im transgenen Mausmodell wurde die Expression des Rezeptors beispielhaft in den Proteinlysaten von jeweils fünf Milzen heterozygot transgener Mäuse bzw. homozygoter Wildtyp-Mäuse der GPRC5B-Linie im Western Blot untersucht. Dargestellt sind die GPRC5B-spezifischen Banden im Western Blot (A) sowie die gegen die Tubulin Ladekontrolle normalisierte Expressionsstärke von GPRC5B in den transgenen Tieren (Tg5B) relativ zur Expression in den Wildtyp-Tieren (Wt) (B). Jeweils  $n = 5$ ; Mittelwerte relativ zur Kontrolle  $\pm$  SEM.

#### 3.2.1.2 Morphometrische Analyse von $Ldlr^{-/-}$ Mäusen nach Knochenmarkstransplantation

Zu den charakterisierenden Parametern eines Tiermodells gehören die Bestimmung der Verhältnisse Herzgewicht zu Körpergewicht (HG/KG) sowie Herzgewicht zu Tibialänge (HG/TL). Diese Parameter geben Auskunft darüber, ob die Behandlung der Tiere als Nebenwirkung zu einer Hypertrophie des Herzens geführt hat.<sup>129</sup> Bezüglich der oben genannten Verhältnisse konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den  $Ldlr^{-/-}$  Mäusen mit Wildtyp-Knochenmark und den Tieren mit transgenem Knochenmark festgestellt werden (siehe Abb. 25).

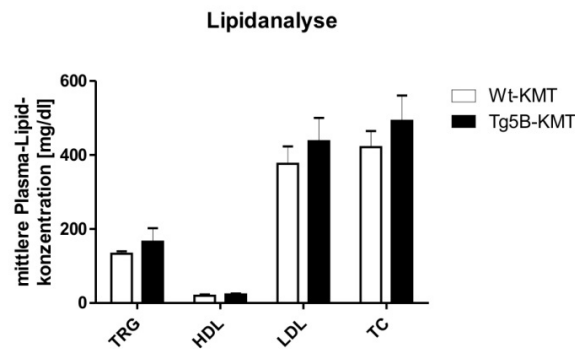




**Abb. 25: Morphometrische Analyse transplanteder  $Ldlr^{-/-}$  Mäuse nach fettreicher Diät.** Nach Beendigung des Tierversuchs wurden die Herzen entnommen, die Herzkammern nach Separation des Herzsinus gewogen und das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht (HG/KG) sowie von Herzgewicht zu Tibialänge (HG/TL) berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte der Quotienten HG/KG in g/g bzw. der Quotienten HG/TL in g/ml der Mäuse nach Knochenmarkstransplantation von GPRC5B-transgenen Spendertieren (Tg5B-KMT) sowie der Mäuse mit transplantiertem Knochenmark von Wildtyp-Tieren (Wt-KMT). Wt-KMT n = 18, Tg5B-KMT n = 20; Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 3.2.1.3 Lipidzusammensetzung im Blutplasma

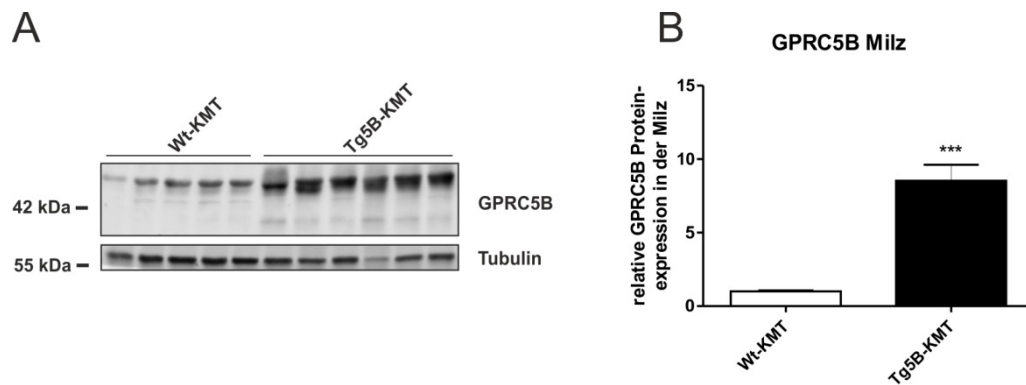
Um einen möglichen Einfluss von transgenem GPRC5B auf die Lipidzusammensetzung im Blut der transplantierten  $Ldlr^{-/-}$  Tiere zu untersuchen, wurden stichprobenartig in beiden Versuchsgruppen die Konzentrationen von Triglyceriden, HDL, LDL und Gesamtcholesterin bestimmt. Die  $Ldlr^{-/-}$  Mäuse wiesen nach einer fettreichen Diät eine mittlere Triglyceridkonzentration von etwa 150 mg/dl, eine HDL-Konzentration von ca. 20 mg/dl sowie eine LDL-Konzentration von ca. 410 mg/dl auf. Die mittlere Konzentration des gesamten Cholesterins lag bei rund 460 mg/dl. Bezüglich der Lipidzusammensetzung im Blutplasma, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen nachgewiesen werden (siehe Abb. 26).



**Abb. 26: Analyse der Lipidzusammensetzung im Blutplasma transplantiertter  $Ldl^{-/-}$  Mäuse nach fettreicher Diät.** Dargestellt sind die enzymatisch colorimetrisch bestimmten mittleren Konzentrationen der im Blutplasma der Mäuse enthaltenen Triglyceride (TRG), Lipoproteine hoher Dichte (HDL), Lipoproteine niedriger Dichte (LDL) sowie des gesamten Cholesterins (TC) in mg/dl. Wt-KMT n = 5, Tg5B-KMT n = 7; Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 3.2.2 Überprüfung des Erfolgs der Knochenmarkstransplantation

Als Negativkontrolle erhielten zwei der bestrahlten  $Ldl^{-/-}$  Tiere kein autologes Knochenmark. Sie dienten der Überprüfung einer vollständigen Zerstörung des empfängereigenen Knochenmarks. Die beiden Tiere starben ca. zwei Wochen nach der Bestrahlung, während der Großteil der transplantierten Tiere überlebte. Dies stellte gleichzeitig ein Indiz dafür dar, dass bei den überlebenden Tieren das transplantierte Knochenmark vermutlich angewachsen war. Zur direkten Überprüfung des Erfolges der Knochenmarkstransplantation, wurde zusätzlich die GPRC5B-Expression in der Milz der transplantierten Mäuse untersucht. Dieses Organ gilt als wichtigster Speicherort der im Knochenmark gebildeten Monozyten. Mittels Western Blot konnte gezeigt werden, dass die Tiere, welche das GPRC5B-transgene Knochenmark erhalten hatten, eine signifikant um das etwa 9-fache höhere Expression des Rezeptors aufwiesen als die Kontrolltiere mit Wildtyp-Knochenmark (siehe Abb. 27).



**Abb. 27: Analyse der GPRC5B-Expression in der Milz transplantierter  $Ldlr^{-/-}$  Mäuse.** Der Nachweis einer erfolgreichen Knochenmarkstransplantation erfolgte mittels Western Blot über die Analyse der GPRC5B-Expression in der Milz von Tieren mit transplantiertem Wildtyp-Knochenmark (Wt-KMT) bzw. GPRC5B-transgenem Knochenmark (Tg5B-KMT). Dargestellt sind die GPRC5B-spezifischen Banden im Western Blot (A) sowie die gegen die Tubulin Ladekontrolle normalisierte Expressionsstärke von GPRC5B relativ zu dessen Expression in der Kontrolle (B). Wt-KMT n = 16, Tg5B-KMT n = 20; Mittelwerte relativ zur Kontrolle  $\pm$  SEM.

### 3.2.3 Einfluss von GPRC5B auf die Größe und Struktur der Plaques

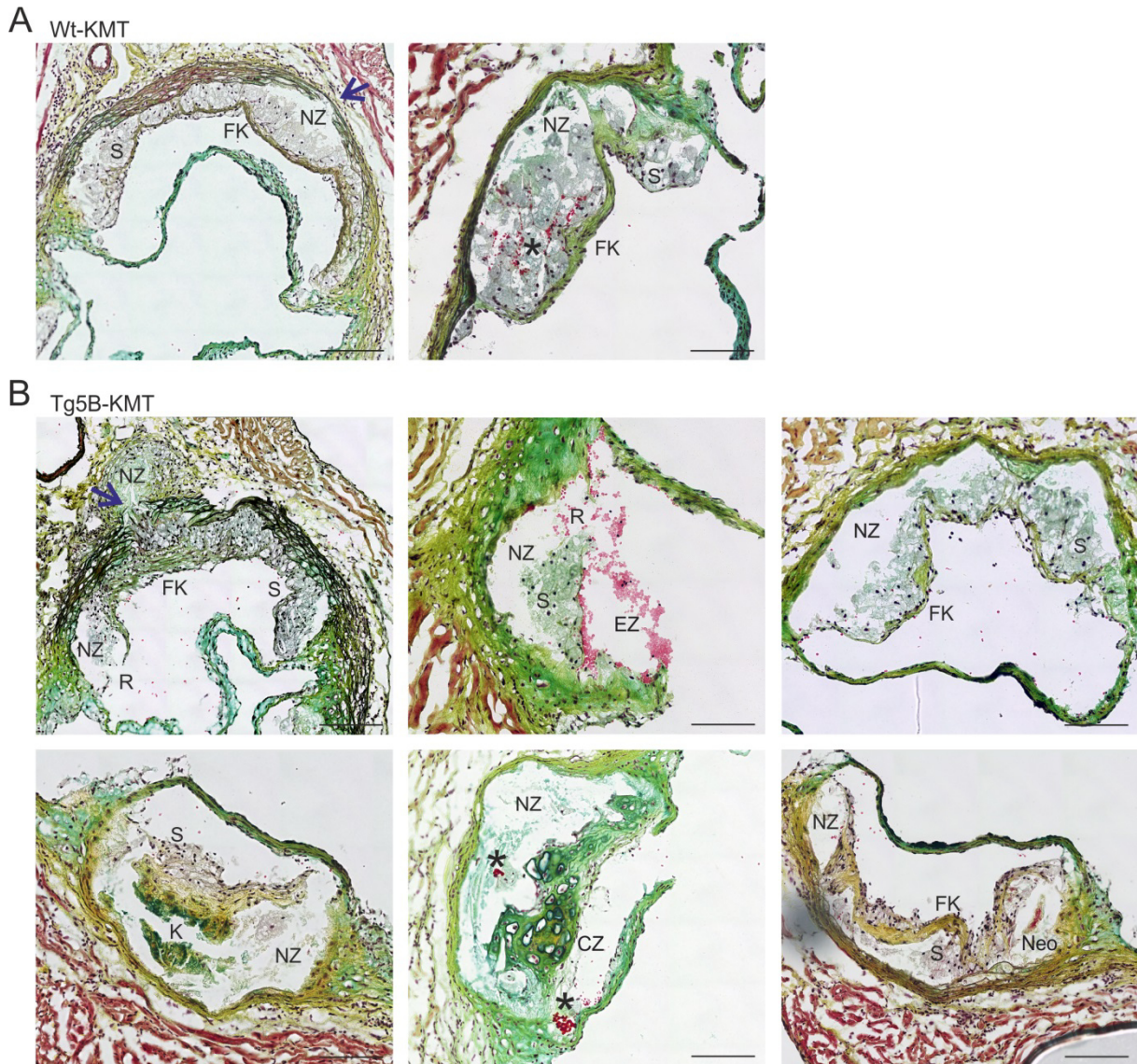
Die Ausbildung atherosklerotischer Plaques wurde in  $Ldlr^{-/-}$  Mäusen durch die Umstellung der Ernährung auf eine fettreiche Diät erreicht. Zur Analyse eines möglichen proatherogenen Einflusses einer verstärkten GPRC5B-Expression in Knochenmarks-abgeleiteten Zellen, wurden Gewebeschnitte im Bereich des Aortensinus angefertigt. Pro Tier wurde jeder dritte Objektträger einer Movat-Pentachromfärbung unterzogen und die Schnitte im Hinblick auf Plaquegröße und -struktur untersucht. Durch die Färbetechnik werden Zellkerne und elastische Fasern in schwarz, Knorpel und Mucopolysaccharide in blaugrün, Muskelgewebe und Zytoplasma in rot, Fibrinoid und Fibrin in intensivem rot und Kollagen in gelb dargestellt. Die Gewebeschnitte beider Versuchsgruppen zeigten ein klassisches Bild atherosklerotischer Läsionen, welche das Gefäßlumen im Bereich der Herzklappen verengten (siehe Abb. 28A). Die Analyse der Läsionsgröße zeigte, dass die Tiere mit Tg5B-KMT in der Tendenz etwas größere Plaques aufwiesen als die Kontrolltiere mit Wt-KMT. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (siehe Abb. 28B).



**Abb. 28: Analyse der Läsionsgröße in Gewebeschnitten des Aortensinus nach Movat-Färbung.** *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse erhielten nach der Transplantation von Wildtyp-Knochenmark (Wt-KMT) bzw. GPRC5B-transgenem Knochenmark (Tg5B-KMT) für 16 Wochen eine fettreiche Diät. Anschließend wurden die Herzen entnommen, der Bereich des Aortensinus separiert und am Kryomikrotom mit einer Schnittdicke von 5  $\mu$ m seriell geschnitten. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Gewebeschnitte beider Versuchsgruppen nach Movat-Pentachromfärbung (A; Skala 200  $\mu$ m). Die Größe der Plaques jedes Gewebeschnittes wurde mittels ImageJ bestimmt und die mittlere Plaquegröße pro Versuchstier berechnet. Die mittlere Plaquegröße pro Versuchsgruppe wurde berechnet und die mittlere Läsionsgröße der Tiere mit GPRC5B-transgenem Knochenmark relativ zur mittleren Läsionsgröße der Kontrollgruppe mit transplantiertem Wildtyp-Knochenmark dargestellt (B). Wt-KMT n = 15, Tg5B-KMT n = 18; Mittelwerte relativ zur Kontrolle  $\pm$  SEM.

Morphologisch waren die Plaques durch eine Verdickung der Intima, eingewanderte lipidbeladene Makrophagen (Schaumzellen), einer fibrösen Kappe sowie nekrotische Zentren gekennzeichnet. In einigen Gewebeschnitten konnte auch eine Degradation elastischer Fasern beobachtet werden, welche in den Tieren mit GPRC5B-transgenem Knochenmark etwas stärker vorangeschritten war als in den Kontrolltieren. Manche Gewebeschnitte wiesen zudem intensiv rote Aggregate auf, bei denen es sich möglicherweise um Fibrin handeln könnte. Diese Aggregate konnten bei beiden Versuchsgruppen beobachtet werden. In mehreren Gewebeschnitten der Versuchsgruppe mit Tg5B-KMT waren zudem hellrote Punkte zu erkennen, welche an Erythrozyten erinnerten. Diese waren insbesondere bei Läsionen zu erkennen, bei denen die Oberfläche aufgebrochen war. Fortgeschrittene atherosklerotische Plaques zeichnen sich u.a. durch eine beginnende Kalzifizierung sowie eine ausgedünnte, rupturanfällige fibröse Kappe aus. Beide Merkmale waren in den Gewebeschnitten der Mäuse mit GPRC5B-transgenem Knochenmark häufiger zu beobachten als in den Gewebeschnitten der Mäuse mit Wildtyp-Knochenmark. In vier Gewebeschnitten konnten Anzeichen einer möglichen Plaqueruptur beobachtet werden, während dies in der Kontrollgruppe nur halb so oft auftrat. In einem der Gewebeschnitte aus der Gruppe mit Tg5B-KMT war zudem ein

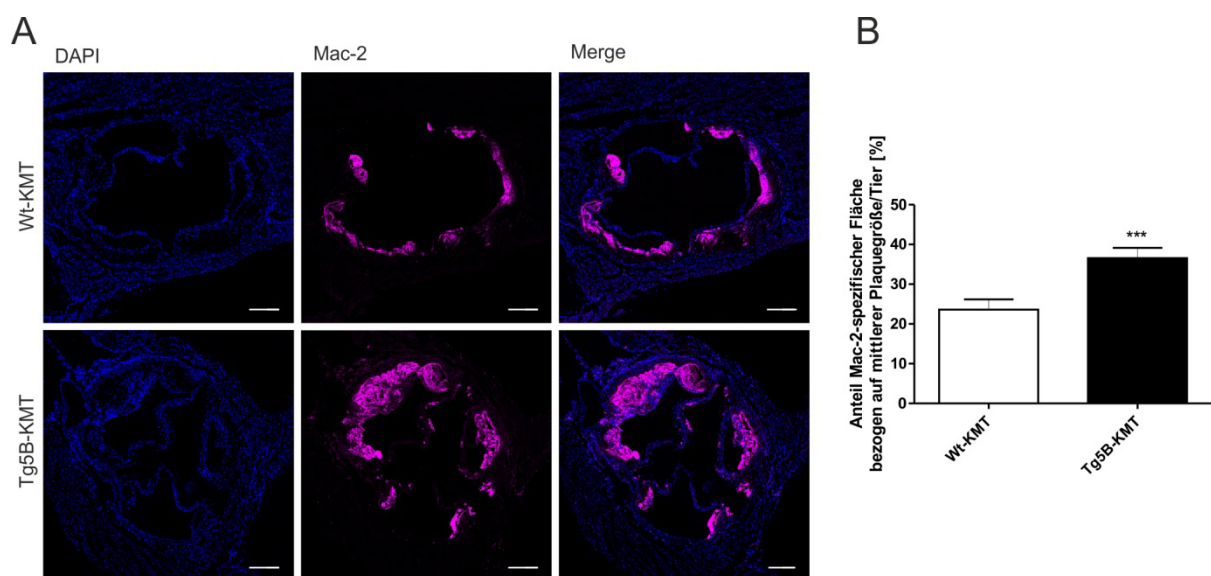
angeschnittenes Blutgefäß zu erkennen, was auf eine Neovaskularisierung der Läsion schließen lässt. In einem anderen Gewebeschnitt der gleichen Versuchsgruppe konnten Chondrozyten im Kern der Läsion beobachtet werden (siehe Abb. 29).



**Abb. 29: Morphologische Analyse der Läsionen im Bereich des Aortensinus nach Movat-Färbung.**  $Ldlr^{-/-}$  Mäuse erhielten nach der Transplantation von Wildtyp-Knochenmark (Wt-KMT) bzw. GPRC5B-transgenem Knochenmark (Tg5B-KMT) für 16 Wochen eine fettreiche Diät. Anschließend wurden die Herzen entnommen, der Bereich des Aortensinus separiert und am Kryomikrotom mit einer Schnittdicke von 5  $\mu\text{m}$  seriell geschnitten. Dargestellt sind Aufnahmen auffälliger Strukturen innerhalb der Läsionen der Gewebeschnitte nach Movat-Pentachromfärbung in Mäusen mit Wt-KMT (A) und Tg5B-KMT (B). Zu beachten sind Schaumzellen (SZ), nekrotische Zentren (NZ), fibröse Kappe (FK), rote Aggregate (\*), Erythrozyten (EZ), Degradation elastischer Fasern (Pfeil), Plaqueruptur (R), Neovaskularisierung (Neo), Kalzifizierung (K) und Chondrozyten (CZ). Skala 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.4 Einfluss von GPRC5B auf die Infiltration von Makrophagen in die Plaques

Mittels Immunfluoreszenzfärbung von Mac-2 positiven Zellen, wurde die Infiltration inflammatorischer Makrophagen in die atherosklerotischen Läsionen im Bereich des Aortensinus untersucht. *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse mit GPRC5B-transgenem Knochenmark wiesen nach einer fettreichen Diät im Vergleich zu den Kontrolltieren mit Wildtyp-Knochenmark einen signifikant um das 1,5-fache erhöhten Makrophagengehalt in den Plaques auf. Dies konnte anhand einer morphometrischen Analyse der Mac-2 spezifischen Färbefläche bestimmt werden (siehe Abb. 30).



**Abb. 30: Analyse des Makrophagengehalts innerhalb der atherosklerotischen Läsionen im Bereich des Aortensinus.** *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse erhielten nach der Transplantation von Wildtyp-Knochenmark (Wt-KMT) bzw. GPRC5B-transgenem Knochenmark (Tg5B-KMT) für 16 Wochen eine fettreiche Diät. Anschließend wurden die Herzen entnommen, der Bereich des Aortensinus separiert und am Kryomikrotom mit einer Schnittdicke von 5  $\mu$ m seriell geschnitten. Die Infiltration inflammatorischer Mac-2 positiver Makrophagen in die atherosklerotischen Läsionen wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen des Aortensinus beider Versuchsgruppen mit Mac-2 positiven Zellen in violett und Zellkernen nach DAPI-Färbung in blau (A; Skala 200  $\mu$ m). Die Bestimmung des Makrophagengehaltes innerhalb der Läsionen erfolgte über die morphometrische Analyse der spezifischen Färbefläche jedes Gewebeschnittes. Pro Tier wurde der prozentuale Anteil der Mac-2 positiven Fläche bezogen auf die jeweilige gesamte Plaquerfläche pro Tier und anschließend die mittlere prozentuale Mac-2 positive Fläche pro Versuchsgruppe berechnet (B). Wt-KMT n = 15, Tg5B-KMT n = 18; Mittelwerte relativ zur Kontrolle  $\pm$  SEM.

## 4 Diskussion

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren stellen die größte Familie der Membranproteine in Eukaryoten dar.<sup>93</sup> Aufgrund ihrer erheblichen Beteiligung in der Pathophysiologie des Menschen sowie ihrer guten pharmakologischen Erreichbarkeit, zählen GPCRs zur bedeutendsten Zielgruppe neuentwickelter Arzneien.<sup>94,95,97</sup> Insbesondere „orphan“ Rezeptoren, deren Ligand und zugehöriges G-Protein noch nicht bekannt sind, bieten die Möglichkeit eines bisher noch unentdeckten therapeutischen Potentials.

Wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben, greift der „orphan“ Rezeptor GPRC5B in den Zucker- und Lipidstoffwechsel ein und scheint eine Rolle in der Pathogenese von Adipositas und Diabetes mellitus zu spielen. Da diese beiden Erkrankungen, ebenso wie die Atherosklerose selbst, durch eine chronische systemische Inflammation gekennzeichnet sind und für GPRC5B bereits eine Beteiligung an inflammatorischen Prozessen im Fettgewebe nachgewiesen werden konnte, besitzt der Rezeptor ein großes Potential, auch in die Pathogenese der Atherosklerose involviert zu sein.<sup>1,32,89,108</sup> Zur Klärung der Frage, ob GPRC5B einen Einfluss auf die Entzündung der Gefäßwand und die Entstehung von Atherosklerose hat, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* durchgeführt.

### 4.1 Untersuchung von GPRC5B *in vitro*

#### 4.1.1 Expression von GPRC5B in ausgewählten Zellen des vaskulären Systems

Eine wichtige Voraussetzung für eine mögliche proatherogene Wirkung von GPRC5B stellt die Expression des Rezeptors in den an der Atherogenese beteiligten Zelltypen dar. Sowohl im menschlichen Körper als auch in der Maus, wird GPRC5B von nahezu allen Zellen exprimiert, u.a. auch in Zellen der Gefäßwand, einschließlich glatter Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen sowie auch in Makrophagen.<sup>103-105</sup> Auch in dieser Arbeit konnte die endogene Expression von GPRC5B in den verwendeten Endothelzellen (bEnd.3 und HUVECs) sowie in glatten Gefäßmuskelzellen (MOVAS) und der Monozytenzelllinie THP-1 nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte eine starke Zunahme der GPRC5B-Expression in THP-1 Zellen nach PMA-induzierter Differenzierung zu Makrophagen festgestellt werden. Diese Beobachtung ist kongruent zu den Ergebnissen von Hohenhaus et al., wonach GPRC5B einer

von wenigen GPCRs ist, dessen Expression während der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen hochreguliert wird.<sup>137</sup>

#### ***4.1.2 Regulation der GPRC5B-Expression durch inflammatorische Mediatoren***

Entzündungen definieren eine Vielzahl der Mechanismen, die an der Entstehung atherosklerotischer Plaques beteiligt sind. Die Ergebnisse der auf mRNA- und Proteinebene durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die endogene Expression von GPRC5B durch verschiedene proinflammatorische Mediatoren in Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen signifikant hochreguliert wird.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie an aus Mäusen isolierten Endothelzellen, konnte der in dieser Arbeit beobachtete regulatorische Effekt einer LPS-Stimulation auf mRNA-Ebene bestätigt werden.<sup>105</sup> So zeigten Kaur et al. eine Hochregulierung der GPRC5B mRNA in primären Endothelzellen des Gehirns um den Faktor 1,5. Das Ergebnis stimmt mit den in dieser Arbeit gezeigten mRNA-Daten in bEnd.3-Zellen und HUVECs gut überein (bEnd.3-Zellen 1,5-fach; HUVECs 1,7-fach). In zwei weiteren Studien wurde zudem der Effekt einer LPS-Stimulation auf die mRNA-Expression von GPRC5B in Makrophagen untersucht. Die Ergebnisse dieser beiden Studien zeigen jedoch ein differenzielles Bild: Während Hohenhaus et al. eine durch LPS induzierte, verstärkte Transkription von GPRC5B in primären, humanen, Monozyten-abgeleiteten Makrophagen nachweisen konnten, beobachteten Lattin et al. hingegen eine verringerte mRNA-Expression von GPRC5B nach LPS-Stimulation in primären, Monozyten-abgeleiteten Makrophagen der Maus.<sup>104,137</sup> In beiden Studien erfolgte die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen unter Verwendung von M-CSF. Die Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der beiden Studien sind vermutlich auf die Unterschiede in der jeweiligen Zellisolierungsmethode sowie möglicher Unterschiede zwischen humanen und murinen Monozyten bzw. Makrophagen zurückzuführen. Während die Monozyten in der Studie von Lattin et al. aus murinem Knochenmark isoliert worden sind, verwendeten Hohenhaus et al. isolierte Monozyten aus humanen Blutproben. Letztere können bereits vor der Isolierung durch im Blut zirkulierende Faktoren wie beispielsweise Zytokine stimuliert und möglicherweise inflammatorisch aktiviert worden sein, was das Transkriptom der Zellen beeinflusst haben könnte. Ähnlich wie bei Hohenhaus et al., konnte in der vorliegenden Arbeit eine durch LPS-Stimulation signifikant verstärkte Expression von GPRC5B in humanen Makrophagen nachgewiesen werden. Dabei wurde die Differenzierung der THP-1 Monozyten durch eine Stimulation mit PMA erreicht. Makrophagen werden



anhand ihrer funktionellen Eigenschaften in M1 und M2 Makrophagen unterteilt. Während PMA-stimulierte Monozyten eher den proinflammatorischen Makrophagen vom Typ M1 ähneln, führt eine Stimulation der Zellen mit dem Zytokin M-CSF zur Differenzierung in homöostatische bzw. antiinflammatorische Makrophagen des M2 Phänotyps.<sup>138,139</sup> Aus diesen Erkenntnissen lassen sich zwei Erklärungsansätze ableiten: 1) LPS führt nur in humanen Makrophagen zu einer verstärkten Expression von GPRC5B oder 2) Ein regulatorischer Effekt von LPS auf die GPRC5B-Expression tritt nur in inflammatorischen Makrophagen auf. Die zweite Hypothese wird durch eine Studie an isolierten peritonealen Makrophagen von Thioglykolat-behandelten Mäusen unterstützt. Die Applikation von Thioglykolat verursacht bei Mäusen eine aseptische Peritonitis, bei der inflammatorische Makrophagen in die entzündete Bauchfellhöhle einwandern.<sup>140</sup> Die Stimulation dieser inflammatorischen Makrophagen mit LPS resultierte in einer verstärkten Transkription von GPRC5B.<sup>104</sup> In den erwähnten Studien wurde der Einfluss von LPS auf die Expression von GPRC5B ausschließlich auf mRNA Ebene untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte der regulatorische Effekt einer LPS-Stimulation nun erstmalig auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Zudem wurde zum ersten Mal gezeigt, dass LPS die Expression des Rezeptors auch in primären Endothelzellen des Menschen sowie in glatten Gefäßmuskelzellen signifikant verstärkt und dass dieser Effekt auch auf andere inflammatorische Mediatoren wie TNF $\alpha$  und IL-6 übertragbar ist. Des Weiteren konnte ein regulatorischer Effekt von IL-6 nur in bEnd.3-Zellen nachgewiesen werden. In diesen Zellen führte sowohl die Stimulation mit IL-6 als auch mit Hyper-IL-6 (Fusionsprotein aus IL-6 und löslichem IL-6R) zur Aktivierung von STAT3 sowie einer signifikant verstärkten GPRC5B-Expression. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass bEnd.3-Zellen einen membranständigen Rezeptor für IL-6 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Unter Verwendung von sgp130Fc wurde der Effekt von Hyper-IL-6 gehemmt, während die IL-6-abhängige Aktivierung von STAT3 und die Hochregulierung von GPRC5B nicht beeinträchtigt wurden. Das Fusionsprotein sgp130Fc besteht aus dem extrazellulären Teil von gp130 und dem konstanten Teil des humanen IgG1-Antikörpers. Nach seiner Dimerisierung besitzt sgp130Fc noch immer keine messbare Affinität zu IL-6, jedoch eine hohe Affinität zu dem natürlicherweise vorkommenden Komplex aus IL-6 und dem löslichen IL-6R sowie zu der synthetischen Variante namens Hyper-IL-6.<sup>52</sup> Auf diese Weise blockiert sgp130Fc selektiv das sogenannte „trans-signaling“, ohne den in Kapitel 1.2.3.4 beschriebenen klassischen IL-6-Signalweg zu beeinflussen. Wie in einer Studie von Lo et al. gezeigt werden konnte, führt in HUVECs nur die Stimulation mit Hyper-IL-6, nicht jedoch mit IL-6 zu einer Aktivierung von STAT3.<sup>141</sup> Das

Ergebnis legt einen fehlenden, membranständigen IL-6R in diesen Zellen nahe und erklärt, warum die Stimulation von HUVECs mit IL-6 in der vorliegenden Arbeit nicht wie in den bEnd.3-Zellen mit einer Hochregulierung der GPRC5B-Expression verbunden war.

Mechanistisch können alle der in dieser Arbeit untersuchten inflammatorischen Mediatoren die NF $\kappa$ B-Signalkaskade aktivieren. Dies erfolgt im Falle von TNF $\alpha$  über die Bindung an den TNFR1 oder -2 und die darauf folgende Interaktion mit weiteren Proteinen, wie dem TRAF-2 (TNFR-associated factor 2).<sup>55</sup> LPS kann durch die Bindung an den TLR-4 entweder über die Rekrutierung des Adapterproteins MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) oder über TRIF (Toll-interleukin-1 receptor-domain-containing adapter-inducing interferon-beta) die Aktivierung von NF $\kappa$ B induzieren.<sup>58,142,143</sup> Auch IL-6 ist in der Lage die Aktivität von NF $\kappa$ B zu beeinflussen. Über die Aktivierung von STAT3 und dessen Interaktion mit RelA, kann IL-6 die Acetylierung von RelA bewirken und somit die Aktivität des Transkriptionsfaktors im Zellkern verlängern. Ohne vorangeschaltete NF $\kappa$ B-aktivierende Signale scheint STAT3 jedoch nicht in der Lage zu sein, die NF $\kappa$ B-Signalkaskade zu aktivieren.<sup>144</sup> Möglicherweise ist dies der Grund, für den in dieser Arbeit im Vergleich zu TNF $\alpha$  und LPS beobachteten, geringeren Effekt einer IL-6-Stimulation. Neben dem hier untersuchten Einfluss inflammatorischer Mediatoren auf die endogene Expression von GPRC5B wurden in dieser Arbeitsgruppe auch Untersuchungen zum Einfluss von Hyperglykämie auf die Expression des Rezeptors in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der Zellen mit hohen Glucosekonzentrationen ebenfalls zu einer signifikant erhöhten GPRC5B-Expression auf RNA- und Proteinebene führt.<sup>145</sup> Interessanterweise können auch hohe Glucosekonzentrationen, wie sie bei Diabetes mellitus vorkommen, die transkriptionelle Aktivität von NF $\kappa$ B sowie die katalytische Aktivität von IKK erhöhen.<sup>146,147</sup> Basierend auf diesen Erkenntnissen kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Expression von GPRC5B durch eine Aktivierung der NF $\kappa$ B-Signalkaskade induziert werden kann.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten erweitern das Bild der in eigenen Vorarbeiten an Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen sowie an primären, kardialen Fibroblasten der neonatalen Ratte (NRCF) erworbenen Erkenntnisse zum regulatorischen Einfluss von Hyperglykämie und entzündlichen Mediatoren auf die endogene GPRC5B-Expression.<sup>136,145</sup> Sie bestätigen somit eine mögliche pathophysiologische Relevanz des Rezeptors in Bezug auf Diabetes-beschleunigte und durch chronische Entzündungen gekennzeichnete Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems. Die Hochregulierung der

endogenen GPRC5B-Expression durch Glucose und inflammatorische Mediatoren in Zellen des vaskulären Systems sowie in inflammatorischen Makrophagen zeigt zudem, dass eine vektorvermittelte Überexpression des Rezeptors zur Untersuchung seines funktionellen Einflusses auf die Gefäßentzündung und Atherogenese nicht artifiziell ist.

#### **4.1.3 Vektorvermittelte Modulierung der GPRC5B-Expression**

GPRC5B konnte mittels Transfektion bzw. adenoviral vermittelter Transduktion in bEnd.3-Zellen und MOVAS überexprimiert werden. Der spezifische Nachweis der GPRC5B-Expression mittels Immunfluoreszenzfärbung in MOVAS zeigte, dass der Transmembranrezeptor sowohl endogen als auch nach Überexpression in der Zellmembran sowie auch im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert ist. Kongruent zu den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit ist GPRC5B nach den Informationen des „Human Protein Atlas“ in diversen Zelltypen hauptsächlich in Vesikeln sowie zusätzlich auch im Kern und den Nukleoli lokalisiert.<sup>148</sup> In Hek293-Zellen und 3T3-L1 Adipozyten konnte gezeigt werden, dass GPRC5B nach dessen Überexpression überwiegend in sogenannten „Lipid Rafts“ angereichert ist.<sup>108,149</sup> Dabei handelt es sich um Mikrodomänen innerhalb von Membranen mit hohem Gehalt an Cholesterin und Sphingolipiden. Sie lassen sich in Plasmamembranen finden, können jedoch auch in endocytischen und sekretorischen Kompartimenten auftreten.<sup>150</sup> Auch für eine Vielzahl anderer GPCRs konnte bereits eine intrazelluläre Lokalisation nachgewiesen werden. Die Rezeptoren waren dabei in unterschiedlichen intrazellulären Kompartimenten wie Endosomen, Lysosomen und Vesikeln, aber auch im endoplasmatischen Retikulum, in Mitochondrien und sogar im Nukleoplasma oder den Kernkörperchen lokalisiert. Entgegen der klassischen Sichtweise, wonach die GPCR-vermittelte Signalweiterleitung ausschließlich von der Zelloberfläche ausgeht, konnte bereits für einige GPCRs eine intrazelluläre Funktionsweise nachgewiesen werden.<sup>151</sup> Ob GPRC5B spezifische Funktionen in Vesikeln oder im Zellkern übernimmt ist, jedoch bisher unklar. Mittels RNA-Interferenz konnte die endogene Expression von GPRC5B in allen untersuchten Zellen erfolgreich reduziert werden. Insgesamt wurde jedoch auf Proteinebene mit verschiedenen siRNA-Sequenzen jeweils nur ein gering ausgeprägter Knockdown erreicht mit einer mittleren Reduktion der GPRC5B-Expression um 27 %. Dieser Knockdown war dennoch ausreichend für die Detektion signifikanter Effekte im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten funktionellen Untersuchungen.

#### ***4.1.4 Einfluss von GPRC5B auf die Expression inflammatorischer Mediatoren***

Bei der Entstehung von Atherosklerose sind verschiedene inflammatorische Mediatoren wie Adhäsionsmoleküle, Zytokine und Enzyme beteiligt. In Kapitel 3.1.3 wurde der Einfluss von GPRC5B exemplarisch auf die Expression von ICAM-1, VCAM-1, IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  sowie auf die Expression und Aktivität ausgewählter MMPs untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass GPRC5B die Expression bzw. die Aktivität aller genannten Mediatoren in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen signifikant beeinflusst.

##### *4.1.4.1 GPRC5B verstärkt die Expression von Adhäsionsmolekülen*

Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1 werden von entzündlich aktivierten Endothelzellen verstärkt exprimiert und spielen eine wichtige Rolle bei der Leukozytenrekrutierung in das sich bildende Atherom.<sup>21,32</sup> In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine verstärkte GPRC5B-Expression die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 in Endothelzellen auf RNA- und Proteinebene signifikant erhöht. Dieser Effekt konnte im Knockdown-Versuch umgekehrt werden. Bisher existiert nur eine Studie an glatten Gefäßmuskelzellen, in denen der Einfluss von GPRC5B auf die Expression der beiden Adhäsionsmoleküle untersucht worden ist. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, führte der Knockdown von GPRC5B in dieser Studie jedoch zu einem Anstieg der ICAM-1-Expression, während die Expression von VCAM-1 nicht signifikant beeinflusst wurde.<sup>105</sup> Tatsächlich werden beide Adhäsionsmoleküle in atherosklerotischen Plaques nicht nur von Endothelzellen exprimiert, sondern lassen sich auch auf Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen nachweisen.<sup>33</sup> Die unterschiedlichen Ergebnisse basieren möglicherweise auf Expressionsunterschieden zwischen Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen sowie auf Unterschieden im Versuchsdesign. So wurde die Expression der Adhäsionsmoleküle in der Studie von Kaur et al. erst sieben Tage nach dem Knockdown des Rezeptors untersucht, während die Expressionsanalyse in der vorliegenden Arbeit bereits drei Tage nach GPRC5B-Knockdown erfolgte. Möglicherweise bildet das Ergebnis von Kaur et al. eine erst zu einem späteren Zeitpunkt eintretende zelluläre Gegenregulation ab, welche den Folgen eines GPRC5B-Knockdowns entgegenwirkt. Zudem untersuchte die Autorengruppe den Effekt von GPRC5B lediglich auf RNA-Ebene. Es ist bekannt, dass, aufgrund von diversen translationalen und post-translationalen Prozessen, die Expression eines Proteins nicht immer mit der Expression seiner mRNA korreliert. Die Regulation eines Gens auf transkriptioneller Ebene muss daher nicht zwangsläufig auf die Expression des zugehörigen Proteins übertragbar sein.<sup>152-154</sup> Zu erwähnen ist, dass der Knockdown von GPRC5B in

bEnd.3-Zellen keinen signifikanten Effekt auf die Expression von ICAM-1 hatte, und in HUVECs die Expression von VCAM-1 auf Proteinebene durch den Knockdown von GPRC5B nicht signifikant reduziert wurde. Vermutlich lag dies am bereits erwähnten, gering ausgeprägten GPRC5B-Knockdown. GPRC5B ist nicht der einzige GPCR, für den ein regulatorischer Effekt auf die Expression von Adhäsionsmolekülen nachgewiesen werden konnte. Auch der zunächst als „orphan“ Rezeptor identifizierte Apelinrezeptor reguliert in HUVECs die Expression von ICAM-1 und VCAM-1. Interessanterweise erfolgte dies über die Aktivierung der NF $\kappa$ B/JNK-Signalkaskade.<sup>155,156</sup>

#### 4.1.4.2 *GPRC5B verstärkt die Expression von inflammatorischen Zytokinen*

In der vorliegenden Arbeit konnte außerdem zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Überexpression von GPRC5B in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen die Transkription und Sekretion der Zytokine IL-6 und TNF $\alpha$  erhöht. Dieser Effekt war für IL-6 in beiden Zelltypen auf RNA-Ebene signifikant. Ein signifikanter Anstieg von IL-6 auf Proteinebene sowie von TNF $\alpha$  auf RNA-Ebene konnte nur in MOVAS, nicht jedoch in bEnd.3-Zellen nachgewiesen werden. Möglicherweise hätte sich der Effekt von GPRC5B auf die Zytokinexpression durch eine zusätzliche inflammatorische Aktivierung der Zellen mit LPS noch verstärken lassen.

Der Knockdown von GPRC5B führte in bEnd.3-Zellen und MOVAS zu einer signifikanten Reduktion der basalen IL-6-Expression. Dabei konnte ein signifikanter Effekt in MOVAS nur auf Proteinebene, nicht jedoch auf RNA-Ebene nachgewiesen werden. Auch Kaur et al. konnten auf RNA-Ebene keine Reduktion der IL-6-Expression nach GPRC5B-Knockdown beobachten. Sie berichteten hingegen von einer verstärkten Transkription des Zytokins in glatten Gefäßmuskelzellen nach GPRC5B-Knockdown.<sup>105</sup> Wie bereits beschrieben, sind diese Diskrepanzen wahrscheinlich auf das unterschiedliche Versuchsdesign zurückzuführen. Zudem verwendete die Autorengruppe frisch isolierte, primäre Zellen, welche ohne vorherige Kultivierung direkt transfiziert wurden. Denkbar wäre, dass es in diesen Zellen beispielsweise durch den Isolationsprozess, die Umstellung auf künstliche Nährmedien sowie den zusätzlichen zellulären Stress einer sofortigen Transfektion zur Aktivierung weiterer Signalkaskaden kam, welche das Ergebnis beeinflusst haben könnten.

In der vorliegenden Arbeit lässt sich das teilweise geringe Ausmaß eines GPRC5B-Knockdowns auf die Zytokinexpression mit einem bereits sehr geringen basalen Expressionsniveau der Zytokine erklären. Das basale Niveau war vermutlich bereits zu niedrig, um nach einem Knockdown von GPRC5B noch weiter sinken zu können. Mittels

zusätzlicher LPS-Stimulation wurde eine inflammatorische Aktivierung der Zellen simuliert, was einen Anstieg der basalen Zytokinexpression zur Folge hatte. Dies führte dazu, dass in MOVAS auch auf RNA-Ebene eine signifikante Reduktion von IL-6 sowie eine signifikante Reduktion der TNF $\alpha$ -Sekretion nachgewiesen werden konnte. In HUVECs konnte durch den Knockdown von GPRC5B bereits die basale Expression von IL-1 $\beta$  signifikant herunterreguliert werden, während eine signifikante Reduktion in der Sekretion von IL-6 erst nach inflammatorischer Aktivierung der Zellen nachweisbar war.

Bestätigt werden diese Daten durch vorangegangene, eigene Untersuchungen an kardialen Fibroblasten. Auch in diesen Zellen führte die Überexpression von GPRC5B zu einer signifikant erhöhten Expression von IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ , während der Knockdown von GPRC5B eine signifikant reduzierte Zytokinexpression nach inflammatorischer Aktivierung der Zellen zur Folge hatte.<sup>136</sup> Dass der Knockdown von GPRC5B auch im Tierexperiment zu einer reduzierten Transkription von TNF $\alpha$  führt, konnte anhand der von Kim et al. durchgeführten Untersuchungen an GPRC5B<sup>-/-</sup> Mäusen bestätigt werden. Die Ergebnisse dieser Autorengruppe beziehen sich jedoch auf die Expression des Zytokins im weißen Fettgewebe der Mäuse und nicht auf dessen Expression im vaskulären System.<sup>108</sup>

#### 4.1.4.3 GPRC5B erhöht die Expression aktiver Matrix-Metalloproteinasen

Wie in Kapitel 1.2.3 beschrieben, sind während der Atherogenese nicht nur Adhäsionsmoleküle und Zytokine von großer Bedeutung, sondern auch Enzyme, welche die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix beeinflussen. So spielt die Hyperaktivierung von MMPs in allen Phasen der Atheroskleroseentstehung eine wichtige Rolle.<sup>38</sup> Exemplarisch für die Familie der MMPs wurde in Kapitel 3.1.3.3 der Einfluss von GPRC5B auf die Expression und Aktivität der Gelatinase B (MMP-9) und der Metalloelastase MMP-12 in glatten Gefäßmuskelzellen untersucht. Anhand der Spaltung von Gelatine bzw. Elastin konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von GPRC5B zu einer signifikant verstärkten Expression der aktiven Formen von MMP-9 und -12 führt. Gelatine, welche zum Großteil aus Kollagen Typ I besteht, wird jedoch nicht nur von MMP-9 gespalten, sondern auch von MMP-2.<sup>38</sup> Dies erklärt, warum die direkt mittels fluoreszenzmarkiertem Antikörper nachgewiesene Expression von MMP-9 nur teilweise mit dem Fluoreszenzsignal der gespaltenen Gelatine kolokalisiert war. Demnach ist davon auszugehen, dass auch die Expression der aktiven Form von MMP-2 durch GPRC5B hochreguliert wird. Da jedoch MMP-2 und MMP-9 auch im Verdacht stehen, Elastin zu degradieren, wäre ein zusätzlicher Expressionsnachweis von MMP-2 und MMP-12 notwendig gewesen, um den Einfluss von

GPRC5B auf diese beiden Enzyme zu bestätigen.<sup>157</sup> In eigenen Untersuchungen an kardialen Fibroblasten konnte ein regulatorischer Einfluss von GPRC5B auf die mRNA-Expression von MMP-9 bestätigt werden. Eine Regulation von MMP-2 war hingegen nicht zu beobachten. Zusätzlich wurde der Einfluss von GPRC5B auf die Expression von MMP-9 *in vivo* bestätigt. Untersuchungen an GPRC5B-transgenen Mäusen zeigten, dass die Tiere mit verstärkter GPRC5B-Expression eine signifikant höhere MMP-9-Expression im Herz aufwiesen als die Wildtyp-Tiere. Begleitet wurde diese Beobachtung von einer signifikant verringerten Menge an Kollagen-1A1 in den Herzen der GPRC5B-transgenen Mäuse.<sup>136</sup> Kollagen vom Typ I macht unter physiologischen Bedingungen etwa 65 % des gesamten Kollagengehalts der Gefäßwände aus. Gegenüber gesunden Gefäßen ist die Menge an Kollagen Typ I in atherosklerotischen Plaques, insbesondere in der fibrösen Kappe, stark erhöht.<sup>158</sup> MMP-2, -9 und -12 werden in atherosklerotischen Plaques ebenfalls verstärkt exprimiert und tragen durch die Degradation extrazellulärer Matrixkomponenten, wie Kollagen Typ I und Elastin, zur Destabilisierung atherosklerotischer Plaques bei.<sup>38,41-44</sup>

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von GPRC5B auf die Expression und Aktivität von MMPs in glatten Gefäßmuskelzellen erstmalig beschrieben. Abgesehen von eigenen Untersuchungen an kardialen Fibroblasten, ist ein Zusammenhang zwischen GPRC5B und MMPs generell noch nicht zuvor untersucht worden.

#### ***4.1.5 Einfluss von GPRC5B auf die Aktivierung proatherogener Signalwege***

Basierend auf den im vorangegangenen Kapitel diskutierten Ergebnissen, kann eine proinflammatorische Funktion von GPRC5B angenommen werden, welche die Atheroskleroseentstehung vorantreiben könnte. Zur Analyse des Mechanismus, über den GPRC5B die Expression der beschriebenen Mediatoren beeinflusst, wurde eine mögliche rezeptorabhängige Aktivierung des MAPK/ERK- Signalwegs sowie der NFκB-Signalkaskade untersucht. Wie in den Kapiteln 1.2.3.7 und 1.2.3.8 beschrieben, kommt diesen beiden Signalwegen eine wichtige Rolle bei der Atherogenese zu.

##### ***4.1.5.1 GPRC5B aktiviert die extrazelluläre signalregulierte Kinase***

ERK 1/2 ist das letzte Effektorprotein einer typischen MAPK-Phosphorylierungskaskade und wird klassischerweise durch Rezeptor-Tyrosinkinasen aktiviert. Darüber hinaus existieren jedoch verschiedene Mechanismen, über die auch GPCRs die Aktivierung von ERK 1/2 vermitteln können.<sup>159</sup> In der vorliegenden Arbeit konnte über die Analyse des

Phosphorylierungsstatus von ERK 1/2 erstmalig gezeigt werden, dass auch GPRC5B die MAPK ERK 1/2 aktiviert. So führte eine verstärkte GPRC5B-Expression in bEnd.3-Zellen und MOVAS zu einem signifikant erhöhten Level der aktiven phosphorylierten Form der Kinase. Es ist bekannt, dass die Aktivierung von ERK 1/2 eine entscheidende Rolle für die Induktion der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen spielt und dass dies ein wichtiges Ereignis bei der Entstehung der Atherosklerose darstellt.<sup>85</sup> Erst kürzlich konnte ein die Proliferation induzierender Effekt von GPRC5B in einer an  $\beta$ -Zellen durchgeführten Studie bestätigt werden. In diesen Zellen führte die Re-Expression des Rezeptors nach vorherigem Knockdown zu einer verstärkten Proliferation im Bromdesoxyuridin-Assay sowie einer erhöhten Expression des proproliferativen Transkriptionsfaktors E2F.<sup>160</sup> Wie in Kapitel 1.2.3.8 beschrieben, kann die Aktivierung von ERK 1/2 über die Phosphorylierung von Elk-1 und c-fos auch die Expression des Transkriptionsfaktors AP-1 induzieren und auf diese Weise die Expression von proinflammatorischen Zytokinen und MMPs beeinflussen. Somit kann die GPRC5B-vermittelte Aktivierung von ERK 1/2 gut mit der im vorangegangenen Kapitel diskutierten proinflammatorischen Wirkungsweise von GPRC5B in Einklang gebracht werden. Zusätzlich zu den bereits erwähnten Funktionen von ERK 1/2, ist in der Literatur auch eine stromaufwärts von NF $\kappa$ B liegende Wirkungsweise der Kinase beschrieben.<sup>161</sup> Demnach kann die Kinase ERK 1/2 nach ihrer Aktivierung auch den NF $\kappa$ B-Inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylieren, was zu dessen Degradation und zur Translokation von NF $\kappa$ B in den Zellkern führt.<sup>162</sup> Auf diese Weise könnte GPRC5B zusätzlich die Aktivierung NF $\kappa$ B-vermittelter Signalwege initiieren.

#### 4.1.5.2 GPRC5B aktiviert den NF $\kappa$ B-Signalweg in Abhängigkeit von Fyn

Aufgrund seiner Bedeutung für die Pathogenese einer Vielzahl entzündlicher Krankheiten, stellt NF $\kappa$ B einer der am umfassendsten untersuchten inflammatorischen Signalwege dar.<sup>66-69</sup> Diverse Zielgene, die auch die Initiation und Progression der Atherosklerose beeinflussen können, stehen unter der Kontrolle dieses Transkriptionsfaktors.<sup>76,77</sup> Dazu gehören u.a. auch die in dieser Arbeit untersuchten Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1, die Zytokine IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  sowie verschiedene Matrix-Metalloproteinasen.<sup>76,77,163-165</sup> In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von GPRC5B zu einer signifikant erhöhten NF $\kappa$ B-Aktivität in Endothelzellen führt, während ein Knockdown von GPRC5B die Aktivität des Transkriptionsfaktors in diesen Zellen signifikant reduziert. Ein Zusammenhang zwischen GPRC5B und der Aktivierung von NF $\kappa$ B wurde auch im Mausmodell beobachtet. So wiesen GPRC5B<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren

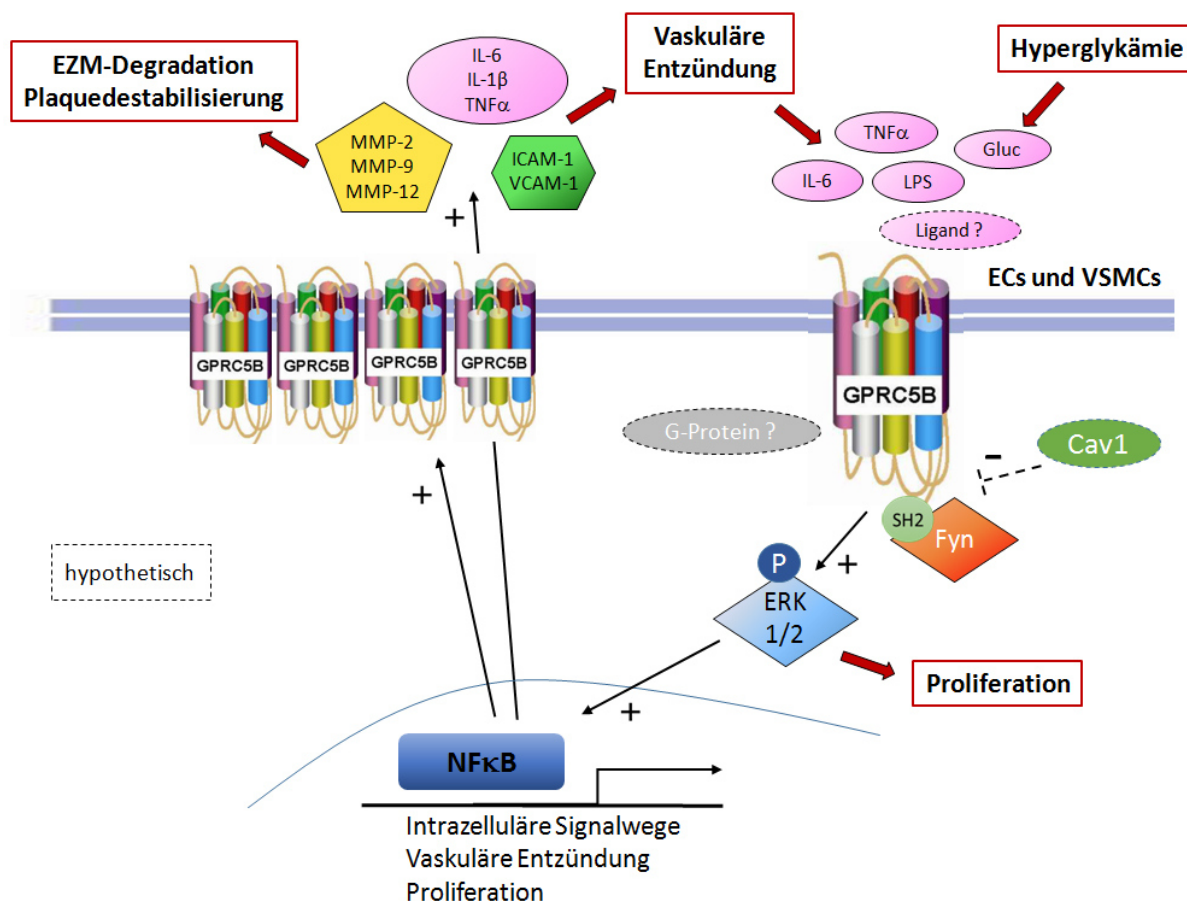


eine Reduktion des IKK-Subtyps epsilon (IKK $\epsilon$ ) im weißen Fettgewebe auf, was mit einer reduzierten Transkription inflammatorischer Marker einherging. In der gleichen Studie konnte gezeigt werden, dass eine TNF $\alpha$ -induzierte IKK $\epsilon$ -Expression in Adipozyten durch den Knockdown von GPRC5B gehemmt wird.<sup>108</sup> Die Autorengruppe entdeckte zudem eine Interaktion von GPRC5B mit den ebenfalls in „Lipid Rafts“ vorkommenden Proteinen Flotillin-1, Caveolin-1 und Fyn in Adipozyten und Fibroblasten. Es wurde nachgewiesen, dass die Tyrosinkinase Fyn durch reaktive Sauerstoffspezies aktiviert wird und anschließend über ihre SH2 (sarcoma-homology 2)-Domäne phosphorylierungsabhängig an den C-Terminus von GPRC5B koppelt. Die Autorengruppe postulierte, dass diese Interaktion zu einer Stimulierung der Kinaseaktivität von Fyn führt, was schließlich in der Aktivierung des I $\kappa$ BK-NF $\kappa$ B-Signalwegs resultiert.<sup>108</sup> In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass eine direkte Interaktion zwischen GPRC5B und Fyn auch in Endothelzellen stattfindet und die GPRC5B-vermittelte NF $\kappa$ B-Aktivierung durch den Knockdown von Fyn signifikant reduziert werden kann. Die GPRC5B-vermittelte Aktivierung von NF $\kappa$ B scheint jedoch nicht nur abhängig von Fyn zu sein. Auch Caveolin-1 beeinflusst diesen Signalweg. Kim et al. fanden heraus, dass Caveolin-1 die GPRC5B-vermittelte Aktivierung von NF $\kappa$ B reduziert, indem es durch Bindung von Fyn die Phosphorylierung des Rezeptors blockiert.<sup>149</sup>

Neben der Aktivierung von ERK 1/2 und NF $\kappa$ B können durch GPRC5B auch weitere Signalwege mit potenziell proatherogener Wirkung aktiviert werden. So beschrieben Atanes et al. in pankreatischen  $\beta$ -Zellen die Aktivierung eines „transforming growth factor  $\beta$ “ (TGF- $\beta$ )/mothers against decapentaplegic homolog 3 (Smad3)- und JAK-STAT/Interferon- $\gamma$ -Signalwegs in Zusammenhang mit GPRC5B, welcher ebenfalls mit der Induktion von Zytokinen und MMPs assoziiert wird.<sup>160,166,167</sup> Es könnte sich dabei jedoch auch um einen Signalweg handeln, der durch GPRC5B spezifisch nur in  $\beta$ -Zellen aktiviert wird.

#### **4.1.6 Wirkmechanismus von GPRC5B in Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen**

Auf Grundlage der Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche an Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen, kann eine proinflammatorische und proatherogene Wirkung von GPRC5B über die Aktivierung von ERK 1/2 sowie des NF $\kappa$ B-Signalwegs angenommen werden. Da die Expression des Rezeptors offenbar durch entzündliche Reize induziert wird, selbst jedoch auch die entzündliche Aktivität der Zellen erhöht, erscheint eine positive Rückkopplung möglich zu sein (siehe Abb. 31).



**Abb. 31: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von GPRC5B in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen.** Entzündungsmediatoren und hohe Glucosekonzentrationen führen zu einer Hochregulierung der GPRC5B-Expression in Endothelzellen (ECs) und glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs). Eine erhöhte Expression des Rezeptors hat wiederum eine verstärkte Aktivierung von ERK1/2 und NFκB zur Folge, was einen potenziellen Rückkopplungskreislauf darstellt. GPRC5B erhöht die vaskuläre Entzündungsreaktion durch eine verstärkte Sekretion proinflammatorischer Zytokine sowie eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen. Vor dem Hintergrund entstehender atherosklerotischer Läsionen trägt GPRC5B potenziell zu Umbauprozessen der Extrazellulärmatrix (EZM) bei, indem er den proliferativen MAPK/ERK-Signalweg aktiviert und die Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) induziert. Die Aktivierung GPRC5B-vermittelter Signalwege scheint dabei abhängig von der Interaktion des Rezeptors mit der Tyrosinkinase Fyn zu sein und wird durch Caveolin-1 (Cav-1) reguliert. Die Grafik wurde teilweise adaptiert von Kim et al.<sup>108, 149</sup>

Wie bereits erwähnt, konnte in eigenen Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe auch eine Induktion der GPRC5B-Expression durch hohe Glucosekonzentrationen, wie sie auch bei Diabetes mellitus vorkommen, nachgewiesen werden.<sup>145</sup> Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten könnten einen Hinweis auf den zugrunde liegenden Mechanismus liefern, durch den Hyperglykämie die Atherosklerose beim Diabetiker beschleunigen könnte. Ob

GPRC5B tatsächlich die Entstehung von Atherosklerose begünstigt, kann jedoch erst im Tierversuch eindeutig geklärt werden.

## 4.2 Untersuchung von GPRC5B *in vivo*

Die Verwendung von *in vitro*-Modellen wie Zellkulturen ermöglicht eine vergleichsweise überschaubare, funktionale Analyse eines Zielproteins, bei der sich viele Störfaktoren und nicht abschätzbare zusätzliche Einflüsse beseitigen lassen. Dennoch können Untersuchungen an Zellkulturen die Verwendung von Tiermodellen nicht gänzlich ersetzen. Insbesondere die Involvierung des Immunsystems in physiologische und pathophysiologische Vorgänge lässt sich aufgrund seiner Komplexität bisher nur im lebenden Organismus untersuchen. Um verlässliche Aussagen treffen zu können, ist es daher wichtig, die aus *in vitro*-Versuchen gewonnenen Erkenntnisse *in vivo* anhand von Tiermodellen zu überprüfen.

### 4.2.1 Untersuchung allgemeiner Parameter

#### 4.2.1.1 Nachweis der Überexpression im transgenen Mausmodell

Über die Analyse der GPRC5B-Expression in der Milz und im Herzen der hier verwendeten Mauslinie, konnte gegenüber den Wildtyp-Tieren eine signifikant erhöhte Expression des Rezeptors in GPRC5B-transgenen Mäusen bestätigt werden.<sup>136</sup>

Zur Analyse der pathophysiologischen Relevanz von GPRC5B *in vivo*, konnte die GPRC5B-transgene Mauslinie jedoch nicht direkt verwendet werden. Stattdessen wurde das Knochenmark dieser Mauslinie isoliert und in *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse mit C57BL/6-Hintergrund transplantiert. Aufgrund des fehlenden LDL-Rezeptors sind *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse in der Lage, unter einer fettreichen Diät atherosklerotische Plaques zu entwickeln.<sup>168,169</sup>

#### 4.2.1.2 Morphometrische Analyse von *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäusen nach Knochenmarkstransplantation

Zu den charakterisierenden Parametern eines Tiermodells gehören die Bestimmung der Verhältnisse Herzgewicht zu Körpergewicht (HG/KG) sowie Herzgewicht zu Tibialänge (HG/TL). Diese Parameter geben Auskunft darüber, ob die Behandlung der Tiere als Nebenwirkung zu einer Hypertrophie des Herzens geführt hat.<sup>129</sup>

Basierend auf den in Zellkulturversuchen gewonnenen Daten, wonach GPRC5B den NFκB-Signalweg aktiviert, wäre ein Einfluss des Rezeptors auf die kardiomyozytäre Hypertrophie durchaus denkbar. So konnten Liu et al. in kardialen Myozyten und Fibroblasten nachweisen,

dass die NFκB-Untereinheit RelA direkt mit dem nukleären Faktor aktivierter T-Zellen (NFAT) interagiert und dessen Aktivität positiv beeinflusst.<sup>170</sup> Die Aktivierung von NFAT kann wiederum, aufgrund seiner Beteiligung am Calcineurin-NFAT-Signalweg, zur Induktion des fetalen hypertrophen Genprogramms in Kardiomyozyten führen.<sup>171,172</sup> Darüber hinaus konnte bereits im Tierversuch gezeigt werden, dass eine 12-wöchige fettreiche Diät zu einer leichten kardialen Hypertrophie mit diastolischer Dysfunktion in Mäusen führt.<sup>173</sup>

In dem in dieser Arbeit verwendeten Tiermodell hatte GPRC5B jedoch keinen Einfluss auf die Ausbildung einer Hypertrophie des Herzens. Zumindest scheint eine verstärkte GPRC5B-Expression, welche sich ausschließlich auf Knochenmark-abgeleitete Zellen bezieht, nicht ausreichend zu sein, um eine kardiale Hypertrophie nach einer fettreichen Diät zu induzieren bzw. gegenüber den Mäusen mit Wildtyp-Knochenmark zu verstärken.

#### 4.2.1.3 Lipidzusammensetzung im Blutplasma

Cholesterin ist u.a. ein essenzieller Bestandteil von Zellmembranen und wird sowohl über die Nahrung aufgenommen als auch vom Körper selbst produziert.<sup>174,175</sup> Im Blutplasma wird Cholesterin in Form von Lipoproteinen transportiert, welche neben Cholesterin auch Triglyceride, Cholesterinester und Phospholipide enthalten.<sup>176</sup> Die Messung von Cholesterin und Triglyceriden im Blutplasma dient der Diagnose von Fettstoffwechselstörungen. Dabei werden erhöhte VLDL- (Lipoprotein sehr niedriger Dichte), LDL- und Gesamtcholesterinwerte sowie auch erhöhte Triglyceridkonzentrationen als Risikofaktoren für die Entstehung von Atherosklerose gewertet.<sup>116,174,176</sup>

Das Fehlen eines funktionalen LDL-Rezeptors, welcher für die Aufnahme von LDL in die Zellen verantwortlich ist, führt zu einer massiven Cholesterinakkumulation im Blutplasma, wodurch das Atheroskleroserisiko steigt.<sup>15,174</sup> Die in dieser Arbeit verwendeten *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse wiesen nach einer fettreichen Diät eine mittlere Konzentration des gesamten Cholesterins von etwa 460 mg/dl sowie eine mittlere Triglyceridkonzentration von etwa 150 mg/dl auf. Parallel zu den Mäusen mit fettreicher Diät, wurden in dieser Arbeit keine Blutwerte von Tieren mit normaler Ernährung untersucht, sodass kein direkter Vergleich zur Einschätzung der gemessenen Werte herangezogen werden kann. Verglichen mit anderen Studien, bei denen *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse nach einer regulären Ernährung eine mittlere Plasmacholesterinkonzentration von 233 mg/dl im Alter von 7 Wochen bzw. von 300 mg/dl im Alter von 44 Wochen aufwiesen, ist die in dieser Arbeit bestimmte Cholesterinkonzentration durch eine 16-wöchige fettreiche Diät deutlich erhöht.<sup>168,177</sup> Im Vergleich zu den Daten der vorliegenden Arbeit, konnten Hartvigsen et al. nach einer fettreichen Diät mit ähnlicher Zusammensetzung, etwas

höhere Blutwerte messen. So stieg die Triglyceridkonzentration nach 14 Wochen auf ca. 877 mg/dl und die Gesamtcholesterinkonzentration auf ca. 1900 mg/dl an.<sup>177</sup> In der vorliegenden Arbeit lag die mittlere LDL-Konzentration um das ca. 20-fache über der mittleren HDL-Konzentration, was auf ein hohes Atheroskleroserisiko hindeutet. Auch in der Studie von Hartvigsen et al. wurde ein, gegenüber der HDL-Konzentration, erhöhter LDL-Wert gemessen. Dieser lag nach 28 Wochen fettreicher Diät um das ca. 10-fache über dem HDL-Wert.<sup>177</sup> Die Unterschiede zwischen den in dieser Arbeit und in der Studie von Hartvigsen et al. gemessenen Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen sind vermutlich auf die Altersunterschiede der verwendeten *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse (13 Wochen versus 44 Wochen), die unterschiedlichen Messzeitpunkte sowie auf geringe Abweichungen in der Futterzusammensetzung (0,15 % Cholesterin versus 0,06 % Cholesterin) zurückzuführen. In der vorliegenden Arbeit wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der untersuchten Lipide zwischen den *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäusen mit GPRC5B-transgenem Knochenmark und den Kontrolltieren nachgewiesen. Ein Einfluss des GPRC5B-transgenen Knochenmarks auf die Lipidzusammensetzung im Blutplasma musste ausgeschlossen werden, da der Rezeptor bereits in verschiedenen Studien in Verbindung mit Adipositas und Insulinresistenz gebracht werden konnte (siehe Kapitel 1.3.1). Darüber hinaus wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie der GPRC5B-Genort mit einem höheren BMI im Kindesalter sowie einem niedrigeren HDL-Cholesterinspiegel bei Erwachsenen assoziiert, nicht jedoch mit erhöhten LDL-Cholesterinwerten.<sup>178</sup>

#### ***4.2.2 Einfluss von GPRC5B auf die Größe und Struktur der Plaques***

Die nach einer fettreichen Diät erhöhten Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen im Plasma der verwendeten *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse, führten zur Ausbildung atherosklerotischer Plaques, welche das Gefäßlumen im Bereich des Aortenbulbus verengten. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig der Einfluss von GPRC5B auf die Entstehung atherosklerotischer Plaques im Tiermodell untersucht. Die Analyse der Läsionsgröße im Aortensinus zeigte, dass die Tiere mit GPRC5B-transgenem Knochenmark in der Tendenz größere Plaques aufwiesen als die Kontrolltiere mit Wildtyp-Knochenmark. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Bei der Bewertung der Ergebnisse muss in Betracht gezogen werden, dass bei dem verwendeten Tiermodell nur die Knochenmark-abgeleiteten Zellen GPRC5B-transgen waren. Dazu zählen Leukozyten (Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten), Thrombozyten und Erythrozyten.<sup>15</sup> Die ebenfalls an der Atherogenese beteiligten Zellen der Gefäßwand wiesen

in dem hier verwendeten Tiermodell jedoch keine erhöhte GPRC5B-Expression auf. Zur Klärung der Frage, ob GPRC5B einen Einfluss auf die Größe atherosklerotischer Plaques hat, sollte der Versuch an *Ldlr*<sup>-/-</sup> bzw. *ApoE*<sup>-/-</sup> Mäusen mit ubiquitärer oder zellspezifischer GPRC5B-Überexpression wiederholt werden. Alternativ könnte untersucht werden, ob die Plauegröße durch den Knockout von GPRC5B im Tiermodell reduziert werden kann.

In einer Studie, bei der verschiedene Diäten zur Induktion atherosklerotischer Läsionen in *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäusen miteinander verglichen wurden, kamen die Autoren zu dem Schluss, dass eine cholesterinreiche Diät in diesem Atherosklerosemodell gegenüber der weit verbreiteten fettreichen Diät bevorzugt werden sollte.<sup>177</sup> Zwar waren die Läsionen im Aortensinus nach einer fettreichen Diät größer als nach einer cholesterinreichen Diät, jedoch könnten die nach einer fettreichen Diät auftretenden Extreme, wie Hypercholesterinämie, Hypertriglycerinämie und Hyperinsulinämie, die modulierende Wirkung von Immunfunktionen überstrahlen, welche oftmals besser bei moderat erhöhten Cholesterinwerten nachgewiesen werden können.<sup>177,179</sup>

Möglich wäre auch, dass der Analysezeitpunkt von 16 Wochen nach Beginn der Ernährungsumstellung auf eine fettreiche Diät zu früh gewählt wurde, und sich Größenunterschiede erst im Endstadium manifestieren, oder der Zeitpunkt zu spät gewählt wurde, falls sich signifikante Unterschiede in der Läsionsgröße vor allem in der frühen Entstehungsphase beobachten lassen. Bei einer Wiederholung des Versuchs sollte die Läsionsgröße daher in einer zusätzlichen Versuchsgruppe bereits nach 8 Wochen sowie in einer weiteren Versuchsgruppe erst nach 25 Wochen analysiert werden. Zu dem in dieser Arbeit untersuchten Zeitpunkt waren die Läsionen in einem mittleren Entwicklungsstadium und zeigten ein klassisches Bild atherosklerotischer Plaques: Sie wiesen, verglichen mit anderen Studien, eine mittlere Größe auf und zeigten morphologisch sowohl Merkmale früher Läsionen (Schaumzellen, keine fibröse Kappe) als auch Merkmale vorangeschrittener Läsionen (dicke fibröse Kappe mit teilweise ausgedünnten Bereichen, große zellarme und nekrotische Bereiche, Kalzifizierung, Degradation elastischer Fasern und Neovaskularisierung sowie Fibrin und mögliche Thromben).<sup>24-26,28,168</sup> Die Analyse der Plauestruktur ergab, dass in der Versuchsgruppe mit transgenem GPRC5B-Knochenmark die Merkmale vorangeschrittener Läsionen häufiger auftraten und stärker ausgeprägt waren als in der Kontrollgruppe. Besonders auffällig war eine Struktur innerhalb der Läsion eines Tieres mit GPRC5B-transgenem Knochenmark, welche aufgrund ihrer Morphologie als Chondrozytenansammlung identifiziert werden konnte. Die Zellen waren von einer typischen, dichten Bindegewebsschicht umgeben und grenzten im Bereich der fibrösen Kappe an einen

großen, nekrotischen Kern mit ausgeprägten, zellfreien Bereichen an. Eine Studie an *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäusen mit fettreicher Diät zeigte, dass chondrozytenähnliche Zellen erst in mittleren und vorangeschrittenen Plaques vorkommen. Wie in der vorliegenden Arbeit, waren diese Zellen ebenfalls überwiegend innerhalb der fibrösen Kappe angesiedelt und zeigten zudem eine räumliche Überlappung mit kalzifizierten Bereichen. Darüber hinaus konnte in dieser Studie nachgewiesen werden, dass die chondrozytenähnlichen Zellen durch Transdifferenzierung aus infiltrierten Knochenmarks-abgeleiteten Zellen myeloiden Ursprungs entstanden sind und dass dieser Differenzierungsprozess durch die Induktion des NFκB-Liganden RANKL (receptor activator of NFκB ligand) vermittelt wird.<sup>180</sup> *In vitro* konnte gezeigt werden, dass GPRC5B ebenfalls die Aktivierung von NFκB verstärkt. Möglicherweise begünstigte in dem hier verwendeten Tiermodell eine verstärkte GPRC5B-Expression in Knochenmark-abgeleiteten Zellen die Transdifferenzierung zu Chondrozyten-ähnlichen Zellen.

Insgesamt weisen die morphologisch weiter vorangeschrittenen und tendenziell größeren Plaques der Tiere mit Tg5B-KMT auf eine proatherogene Wirkung von GPRC5B hin. Vermutlich sind die beobachteten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf eine, vom Monozyten/Makrophagen System ausgehende und durch GPRC5B vermittelte, verstärkte Entzündungsreaktion in den atherosklerotischen Läsionen der Tiere mit GPRC5B-transgenem Knochenmark zurückzuführen. Es ist anzunehmen, dass transgenes GPRC5B zu einer verstärkten Aktivierung der NFκB-Signalkaskade in Monozyten und Makrophagen geführt hat, was die Infiltration dieser Immunzellen in die Plaques und somit das Voranschreiten der Läsionen verstärkt haben könnte.

#### **4.2.3 Einfluss von GPRC5B auf die Infiltration von Makrophagen in die Plaques**

Zur Überprüfung des Einflusses von GPRC5B auf die Infiltration inflammatorischer Makrophagen wurde der Gehalt an Mac-2 positiven Zellen innerhalb der atherosklerotischen Läsionen mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Murines Mac-2 wurde erstmals von Ho und Springer beschrieben und als Antigen identifiziert, welches von entzündlichen Makrophagen stark exprimiert wird, nicht aber von residenten Makrophagen.<sup>181</sup> Zudem korreliert die Expression von Mac-2 mit der Makrophagenreifung und steigt während ihrer Differenzierung deutlich an.<sup>182</sup> In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die spezifische Färbefläche für Mac-2 positive Makrophagen in den Plaques von *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäusen mit GPRC5B-transgenem Knochenmark signifikant größer war als in den Plaques der Kontrolltiere mit Wildtyp-Knochenmark. Dabei korrelierten die Mac-2 positiven Areale mit

den Bereichen, in denen mittels Movat-Färbung Schaumzellen identifiziert werden konnten. Es kann somit die Schlussfolgerung gezogen werden, dass eine verstärkte GPRC5B-Expression in Knochenmark-abgeleiteten Zellen des Monozyten/Makrophagen Systems zu einer verstärkten Infiltration dieser Zellen in die entzündeten Gefäßwände führt und auf diese Weise die Atherogenese vorantreibt. Dabei könnte die Infiltration von Monozyten durch GPRC5B über eine NFκB-vermittelte Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 in Monozyten verstärkt worden sein.<sup>183</sup>

Mac-2 wird jedoch nicht ausschließlich von Makrophagen exprimiert. Auch eosinophile Granulozyten und neutrophile Granulozyten sowie dendritische Zellen, Langerhans-Zellen und Epithelzellen exprimieren diesen Antigen.<sup>184-188</sup> Somit könnten neben infiltrierten Monozyten/Makrophagen auch die genannten Leukozyten zur größeren Mac-2 positiven Färbefläche in den Läsionen der Tiere mit Tg5B-KMT beigetragen haben. Zumindest neutrophile Granulozyten und vaskuläre dendritische Zellen konnten bereits in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden.<sup>32</sup> Dendritische Zellen wurden in Kontakt mit T-Zellen in den atherosklerotischen Plaques innerhalb der Neovaskularisierungszonen und in der Nähe der Vasa vasorum beobachtet. Im Immunsystem werden dendritische Zellen allgemein als Zellen definiert, welche Antigene gegenüber naiven T-Zellen präsentieren können.<sup>32</sup> Vaskuläre dendritische Zellen scheinen einerseits antiinflammatorisch zu wirken und eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase zu spielen, andererseits scheinen sie während der Atherogenese auch proinflammatorische Funktionen bei der Aktivierung inflammatorischer Makrophagen zu übernehmen.<sup>189</sup>

In einer Studie von Kim et al. wurde der Einfluss von GPRC5B auf die Rekrutierung von Monozyten bzw. Makrophagen in entzündliche Gewebe bestätigt. Demnach wiesen GPRC5B<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen nach einer fettreichen Diät eine signifikant reduzierte mRNA-Expression des Makrophagenmarkers F4/80 im weißen Fettgewebe auf.<sup>108</sup> F4/80 gilt als relativ spezifischer Marker für den Nachweis von Makrophagen.<sup>182</sup> Somit legt das Ergebnis dieser Studie nahe, dass es sich bei der GPRC5B-verstärkten Rekrutierung von Mac-2 positiven Zellen in der vorliegenden Arbeit ebenfalls um Makrophagen gehandelt hat. In Verbindung mit den zuvor diskutierten Ergebnissen bezüglich Plauegröße und -struktur, demonstriert diese Beobachtung, dass Knochenmark-abgeleitete Zellen des Monozyten/Makrophagen-Systems einen direkten Effekt auf die Plaueentstehung haben und dass GPRC5B diesen Effekt verstärkt.



### 4.3 Ausblick

Wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, geht man heute davon aus, dass der Atherosklerose eine chronische Entzündung zugrunde liegt, bei der verschiedene proinflammatorische Mediatoren eine zentrale Rolle für die Plaquebildung spielen. Dennoch existiert bisher keine antiinflammatorische Therapie zur Behandlung der Erkrankung.

#### 4.3.1.1 *Therapeutisches Potential einer GPRC5B-Inhibition*

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der „orphan“ Rezeptor GPRC5B über die Aktivierung von ERK 1/2 sowie des NFκB-Signalwegs zu einer verstärkten Expression proinflammatorischer Zytokine, Adhäsionsmoleküle und Matrix-Metalloproteinasen in den Zellen des vaskulären Systems führt. Im Tierexperiment verstärkte GPRC5B die Infiltration inflammatorischer Makrophagen in die entzündete Gefäßwand und förderte das Voranschreiten sowie tendenziell auch das Wachstum atherosklerotischer Läsionen.

Diese Erkenntnisse weisen auf ein therapeutisches Potential des Rezeptors hin. So könnte das Voranschreiten der Atherosklerose möglicherweise über die Blockierung der proinflammatorischen Wirkung von GPRC5B verlangsamt oder gar verhindert werden. Zur Überprüfung dieser Hypothese sollte zunächst der Einfluss eines GPRC5B-Knockouts im Tiermodell der Atherosklerose untersucht werden. Das Potential einer antiinflammatorischen Therapie zur Reduktion Atherosklerose-bedingter kardiovaskulärer Ereignisse konnte erst kürzlich anhand des IL-1β-Antikörpers Canakinumab eindrucksvoll demonstriert werden. Als unerwünschte Nebenwirkung führte die subkutane Verabreichung des Antikörpers jedoch zu einer Beeinträchtigung des Immunsystems. So erkrankten die Patienten der Canakinumab-Gruppe häufiger an Sepsis, Neutropenie und Thrombozytopenie als die Kontrollgruppe.<sup>31</sup> Zur Reduzierung bzw. Vermeidung von unerwünschten Nebenwirkungen, sollte zur Behandlung der Atherosklerose die Entzündungsreaktion möglichst nicht systemisch, sondern gezielt nur in den Gefäßwänden reduziert werden. Darüber hinaus birgt eine ubiquitäre GPRC5B-Inhibition die Gefahr vor weiteren schwerwiegenden Folgen, da der Rezeptor wichtige Funktionen bei der Neurogenese und synaptischen Plastizität im Gehirn übernimmt.<sup>190,191</sup> Dabei scheint GPRC5B insbesondere in der Entwicklungsphase von Bedeutung zu sein, da ein Großteil homozygoter GPRC5B<sup>-/-</sup> Mäuse am Tag der Geburt oder innerhalb der ersten vier Lebenswochen stirbt. Die überlebenden Nachkommen dieses Genotyps sind körperlich gesund und vermehrungsfähig, zeigen jedoch leichte Verhaltensauffälligkeiten.<sup>192</sup>

Eine gezielte Modulation der GPRC5B-Funktion in den Gefäßen könnte beispielsweise über die Verwendung endothelzellspezifischer adeno-assoziiierter Viren erfolgen. Auf diese Weise

könnte die Expression des Rezeptors in Endothelzellen gezielt herunterreguliert oder seine Funktion über die lokal begrenzte Expression eines Antagonisten gehemmt werden.<sup>193,194</sup> Für die Wahl eines geeigneten Antagonisten ist die Charakterisierung der Ligandenbindungsstelle von GPRC5B sowie die Identifizierung des endogenen Liganden von großem Interesse.

#### 4.3.1.2 Die Suche nach dem endogenen Ligand

Bisher ist nicht bekannt, welcher Ligand an GPRC5B bindet, wo sich die Bindungstasche befindet und welche Struktur sie aufweist. Diesbezügliche bioinformatische Vorhersagen werden bisher durch das Fehlen von Röntgenstrukturdaten des Rezeptors erschwert. Die Identifizierung eines Liganden ist ein Prozess, der als Deorphanisierung bezeichnet wird.<sup>195</sup> Dabei stellte das begrenzte Wissen über den Rezeptor bisher die größte Herausforderung dar. Insbesondere die fehlenden Informationen in Bezug auf die physiologischen Funktionen des Rezeptors und die durch ihn aktivierten Signalwege erschwerten die experimentelle Herangehensweise sowie die Wahl von geeigneten Signaltransduktionsassays und Positivkontrollen.<sup>196</sup>

In *Drosophila melanogaster* konnte bereits gezeigt werden, dass der zu GPRC5B orthologe Rezeptor BOSS durch die Stimulation mit extrazellulärer Glucose aktiviert und in den Zellen des Fettkörpers nach Glucosestimulation internalisiert wird.<sup>102</sup> Die Internalisierung ist ein bei GPCRs häufig beobachteter Prozess, welcher nach Bindung des jeweiligen Agonisten auftritt.<sup>197</sup> Somit deuten die bisherigen Erkenntnisse darauf hin, dass BOSS möglicherweise ein glucosebindender Rezeptor ist. In eigenen Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Expression von GPRC5B in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen durch die Stimulation mit hohen Glucosekonzentrationen induziert wird.<sup>145</sup> Dennoch ist es unwahrscheinlich, dass Glucose als Ligand von GPRC5B fungiert. Im Gegensatz zu dem im Fettkörper der Fruchtfliege hauptsächlich in der Plasmamembran lokalisierten Rezeptor BOSS, wird GPRC5B in den Zellen des vaskulären Systems überwiegend intrazellulär in Vesikeln sowie im Zellkern exprimiert. Darüber hinaus verfügt GPRC5B im Vergleich zu BOSS sowie auch im Vergleich zu anderen Rezeptoren der Klasse C nur über eine sehr kurze aminoternale Domäne als extrazelluläre Ligandenbindungsstelle.<sup>100,102,198</sup> Möglich wäre, dass die Ligandenbindungsstelle von GPRC5B während der Evolution verloren gegangen ist. In der vorliegenden Arbeit wurde von einer ligandenunabhängigen, konstitutiven Aktivität des Rezeptors ausgegangen. Eine solche konstitutive Aktivität ist bereits für mehrere „orphan“ GPCRs beschrieben worden.<sup>199</sup> Klassischerweise wird der Aktivierungszustand von GPCRs durch die Bindung eines Liganden reguliert. Da jedoch ligandenunabhängige „orphan“

GPCRs frei von dieser Art von Modulation sind, wird vermutet, dass die Kontrolle der Proteinexpression den wichtigsten Regulationsmechanismus dieser Proteine darstellt.<sup>199</sup> So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Expression von GPRC5B in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen nicht nur durch Glucose, sondern auch durch inflammatorische Zytokine und LPS induziert wird.

Typisch für die GPCR-Mitglieder der Klasse C ist, dass sie Rezeptordimere bilden, um nach Agonistenbindung Signale in das Zellinnere weiterzuleiten.<sup>200,201</sup> Somit könnte GPRC5B seine Wirkung auch über die Dimerisierung mit einem „non-orphan“ Rezeptor der Klasse C oder einem GPCR einer anderen Unterfamilie entfalten, für den bereits ein spezifischer Ligand identifiziert worden ist.<sup>199</sup> Strategien zur Deorphanisierung von GPRC5B sollten daher auch die Untersuchung möglicher Interaktionen mit anderen GPCRs einschließen.

Die Mehrheit der Ansätze zur Deorphanisierung basiert auf dem Nachweis von intrazellulären Konzentrationsänderungen sekundärer Botenstoffe nach Rezeptoraktivierung. Die Freisetzung sekundärer Botenstoffe wie Kalzium und cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) wird durch G-Proteine reguliert und ist abhängig vom jeweils an den GPCR gekoppelten  $G\alpha$ -Subtyp.<sup>196,202,203</sup> Die Wahl dieser Deorphanisierungsstrategie setzt jedoch voraus, dass das gekoppelte G-Protein bereits bekannt ist oder zumindest ausreichend Informationen über die durch den Rezeptor aktivierten Signalwege vorliegen. Um dieses Problem zu lösen, kann man sich die Fähigkeit des humanen  $G\alpha 16$ , die Selektivität der Rezeptor-G-Protein-Interaktion zu umgehen, zunutze machen.<sup>204</sup> Nach Überexpression des „orphan“ Rezeptors zusammen mit  $G\alpha 16$  oder eines Fusionsproteins der beiden Interaktionspartner, kann die Bindung eines Liganden über die intrazelluläre Freisetzung von  $Ca^{2+}$  nachgewiesen werden. Auf diese Weise können zwar Liganden-Rezeptor-Interaktionen identifiziert werden, die Frage, welcher endogene  $G\alpha$ -Subtyp mit dem Rezeptor interagiert, bleibt jedoch unbeantwortet.<sup>195,202</sup>

#### 4.3.1.3 Identifizierung der beteiligten G-Proteine

GPCRs besitzen keine intrinsische Enzymaktivität. Für die Signalweiterleitung ist daher im Allgemeinen die Kopplung mit einem G-Protein notwendig.<sup>159</sup> In Säugetieren sind 16 verschiedene  $G\alpha$ -Subtypen bekannt, welche aufgrund der von ihnen aktivierten Signalkaskaden in vier Familien eingeteilt werden. Die stimulatorischen G-Proteine der *Gas*-Familie aktivieren die Adenylylcyclase, was zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels führt. Im Gegensatz dazu führt die Aktivierung von Mitgliedern der *Gai/o*-Familie zu einer Hemmung der Adenylylcyclase und einer damit verbundenen Reduzierung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Die Familienmitglieder der  $G\alpha$  q/11-Gruppe bewirken

hingegen eine Aktivierung der Phospholipase C $\beta$ , was in einem Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels resultiert. G $\alpha$ 12/13 ist schließlich dafür bekannt, RhoGEFs (Rho guanine nucleotide exchange factors) zu aktivieren, was zur Aktivierung von RhoA (ras homolog family member A) führt.<sup>195,202</sup> Dabei kann ein GPCR mit Vertretern mehrerer G $\alpha$ -Familien interagieren.<sup>195</sup> Inzwischen ist jedoch bekannt, dass einige GPCRs auch über G-Protein-unabhängige Mechanismen, wie beispielsweise durch Interaktion mit G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRKs) oder  $\beta$ -Arrestin wirken.<sup>159</sup>

Für GPRC5B konnte bisher nicht abschließend geklärt werden, mit welchem G-Protein der Rezeptor interagiert. Dies mag daran liegen, dass die Identifizierung des gekoppelten G-Proteins, durch die fehlenden Informationen bezüglich eines den Rezeptor aktivierenden Liganden, zusätzlich erschwert wird.<sup>202</sup> Andererseits konnte gezeigt werden, dass in vielen Fällen bereits die Überexpression des jeweiligen GPCRs ausreicht, um eine Liganden-unabhängige Aktivierung des zugehörigen G-Proteins zu bewirken.<sup>205</sup> Ersten Hinweisen zufolge, scheint GPRC5B in neuronalen Zellen an G $\alpha$ 12/13 gekoppelt zu sein, während der orthologe Rezeptor BOSS im Fettkörper von *Drosophila melanogaster* offenbar G $\alpha$ q-gekoppelt ist.<sup>102,191</sup> Eine mögliche Interaktion von GPRC5B mit den heterotrimeren G-Proteinen G $\alpha$ 12/13 und G $\alpha$ q sollte in den Zellen des vaskulären Systems noch einmal überprüft werden. Zusätzlich sollte in diesen Zellen auch die Aktivierung weiterer G-Proteine untersucht werden. Dazu könnte zunächst die beteiligte G-Protein-Familie identifiziert werden. Dies kann über den Nachweis intrazellulärer Konzentrationsänderungen sekundärer Botenstoffe nach GPRC5B-Überexpression erfolgen. Zur weiteren Differenzierung der einzelnen G-Proteine könnten diese in einem weiteren Experiment selektiv gehemmt werden. Dazu könnte beispielsweise eine Ko-Expression von GPRC5B mit verschiedenen RGS-Proteinen (regulators of G protein signaling) erfolgen. Über die ausbleibende Konzentrationsänderung des jeweiligen sekundären Botenstoffs nach GPRC5B-Überexpression kann schließlich die Beteiligung des entsprechenden G-Proteins nachgewiesen werden.

## 5 Zusammenfassung

Atherosklerose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Gefäße, welche aufgrund der weltweit steigenden Inzidenz ihrer Folgeerkrankungen, wie Herzinfarkt und Schlaganfall, zunehmend an Bedeutung gewinnt. Die bisher verfügbaren Therapien beschränken sich überwiegend auf die symptomatische Behandlung der Atherosklerose, greifen jedoch nicht in die entzündlichen Mechanismen ein, welche die Gefäßveränderungen vorantreiben. Der neu entdeckte G-Protein-gekoppelte „orphan“ Rezeptor GPRC5B ist in den Zucker- und Lipidstoffwechsel involviert, reguliert inflammatorische Prozesse im Fettgewebe und wird auch in den Zellen des vaskulären Systems sowie in Makrophagen endogen exprimiert. In der vorliegenden Arbeit wurde ein möglicher Einfluss von GPRC5B auf die Entzündung der Gefäßwand *in vitro* sowie auf die atherosklerotische Plaquebildung *in vivo* untersucht.

Auf mRNA- und Proteinebene konnte gezeigt werden, dass die endogene Expression des Rezeptors in Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen durch die Stimulation der Zellen mit den inflammatorischen Mediatoren  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 und LPS signifikant hochreguliert wird. Auch die PMA-vermittelte Differenzierung von THP-1 Monozyten in Makrophagen war mit einer signifikanten Expressionssteigerung von GPRC5B verbunden. Die Überexpression des Rezeptors in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen führte seinerseits zu einer signifikant verstärkten Produktion der Zytokine  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$  sowie der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1, während der Knockdown von GPRC5B in einer signifikant reduzierten Expression der genannten inflammatorischen Mediatoren resultierte. Dies konnte mittels Real-Time PCR, Western Blot und ELISA nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde auch die Expression der aktiven Matrix-Metalloproteinasen MMP-2, -9 und -12 durch die Überexpression des Rezeptors in glatten Gefäßmuskelzellen signifikant verstärkt, was mittels Immunfluoreszenzfärbung bzw. über die Degradation der Fluorescein-gekoppelten extrazellulären Matrixkomponenten Gelatine und Elastin nachgewiesen werden konnte. Mittels Western Blot bzw. unter Verwendung eines dualen Luciferase Reporter Assays konnte die proinflammatorische Wirkung von GPRC5B auf die Aktivierung von ERK 1/2 und  $\text{NF}\kappa\text{B}$  zurückgeführt werden. Dabei war die  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung abhängig von der Expression von der Tyrosinkinase Fyn, für die in dieser Arbeit mittels Ko-Immunpräzipitation eine direkte Interaktion mit GPRC5B in Endothelzellen nachgewiesen werden konnte. Die pathophysiologische Relevanz der *in vitro* erhobenen Daten wurde anschließend im Mausmodell untersucht. Dazu erfolgte eine autologe

Knochenmarkstransplantation von  $Ldlr^{-/-}$  Mäusen mit dem Knochenmark von Wildtyp- bzw. transgenen Mäusen der GPRC5B-Linie. Der Effekt von transgenem GPRC5B in Knochenmarks-abgeleiteten Zellen des Monozyten/Makrophagen-Systems wurde nach Atheroskleroseinduktion durch eine fettreiche Diät in Gewebeschnitten des Aortensinus untersucht. Mittels Movat-Färbung konnte gezeigt werden, dass GPRC5B das Voranschreiten sowie in der Tendenz auch das Wachstum atherosklerotischer Läsionen fördert. Darüber hinaus konnte mittels Immunfluoreszenzfärbung bei den Tieren mit GPRC5B-transgenem Knochenmark eine signifikant verstärkte Infiltration inflammatorischer Makrophagen in die Plaques nachgewiesen werden. Ein signifikanter Einfluss von GPRC5B auf die Lipidzusammensetzung im Blutplasma sowie auf die Verhältnisse Herzgewicht zu Körpergewicht und Herzgewicht zu Tibialänge konnte nicht beobachtet werden.

Die Untersuchungen zeigten, dass ein proatherogenes, inflammatorisches Milieu zu einer verstärkten Expression von GPRC5B in den Zellen des vaskulären Systems führt und dass der Rezeptor über die Aktivierung entsprechender Signalwege die inflammatorische Antwort der Zelle und das Voranschreiten der Atherosklerose im Sinne einer positiven Rückkopplung verstärkt. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse decken neue Funktionen des noch wenig untersuchten „orphan“ Rezeptors im Rahmen der Gefäßentzündung und Atherogenese auf und weisen auf ein therapeutisches Potential einer GPRC5B-Hemmung für die Behandlung dieser Erkrankung hin.

## 6 Summary

Atherosclerosis is a chronic vascular inflammatory disease, which is becoming more and more important due to the increasing incidence of its secondary diseases, such as myocardial infarction and stroke. The therapies available so far are mainly limited to the symptomatic treatment of atherosclerosis, but do not interfere with the inflammatory mechanisms that drive vascular lesions. The newly discovered G-protein coupled orphan receptor GPRC5B is involved in sugar and lipid metabolism, regulates inflammatory processes in adipose tissue and is also expressed endogenously in vascular cells and macrophages. The present study investigated the regulation of GPRC5B in the cells of the vascular wall and the impact of GPRC5B on vascular inflammation *in vitro* and on atherosclerotic plaque formation *in vivo*.

At the mRNA and protein level it was shown that the endogenous expression of GPRC5B in endothelial cells (ECs), vascular smooth muscle cells (VSMCs) and macrophages is significantly upregulated by stimulation with TNF $\alpha$ , IL-6 and LPS. In addition, PMA-mediated differentiation of THP-1 monocytes into macrophages was also associated with a significant increase in GPRC5B expression. The overexpression of the receptor in ECs and VSMCs led to a significantly increased expression of the cytokines TNF $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ , as well as the adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1, while the knockdown of GPRC5B resulted in the significant reduction of these inflammatory mediators. This was demonstrated by real-time PCR, western blot and ELISA. In addition, the expression of the active matrix metalloproteinases MMP-2, -9 and -12 was significantly enhanced by GPRC5B overexpression in VSMCs, which was demonstrated by immunofluorescence staining and degradation of the fluorescein-coupled extracellular matrix components gelatin and elastin. The western blot analysis and dual luciferase assays attributed the pro-inflammatory effects of GPRC5B to the activation of ERK1/2 and NF $\kappa$ B. The activation of NF $\kappa$ B was dependent on the expression of the tyrosine kinase Fyn, for which a direct interaction with GPRC5B in ECs could be demonstrated by co-immunoprecipitation. *In vivo*, the effect of transgenic GPRC5B overexpression in monocytes was investigated in tissue sections of the aortic sinus after autologous bone marrow transplantation of Ldlr<sup>-/-</sup> mice with bone marrow from wild-type or GPRC5B-transgenic mice followed by atherosclerosis induction by a high-fat diet. It was shown by Movat staining that GPRC5B promotes the progression and growth of atherosclerotic lesions. In addition, immunofluorescence staining in animals with GPRC5B-transgenic bone marrow revealed significantly increased infiltration of inflammatory

---

macrophages into the plaques. On the other hand, no significant influence of GPRC5B could be observed on the lipid composition in blood plasma as well as on the heart weight to body weight and heart weight to tibia length ratios.

The investigations in the current study showed that a pro-atherogenic inflammatory signaling leads to an increased expression of GPRC5B in the cells of the vascular wall, with the receptor sequentially enhancing the inflammatory response of the cell and the progression of atherosclerosis via activation of corresponding signaling pathways pointing to a positive feedback loop. The findings obtained in this study reveal novel functions of the orphan receptor GPRC5B in vascular inflammation and atherogenesis, might leading to a specific therapeutic target in the treatment of atherosclerosis.



## 7 Literaturverzeichnis

- 1 Kraakman, M. J., Dragoljevic, D., Kammoun, H. L. & Murphy, A. J. Is the risk of cardiovascular disease altered with anti-inflammatory therapies? Insights from rheumatoid arthritis. *Clinical & translational immunology* **5**, e84, doi:10.1038/cti.2016.31 (2016).
- 2 Collaborators, G. M. a. C. o. D. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* **385**, 117-171, doi:10.1016/S0140-6736(14)61682-2 (2015).
- 3 Lopez, A. D., Mathers, C. D., Ezzati, M., Jamison, D. T. & Murray, C. J. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* **367**, 1747-1757, doi:10.1016/S0140-6736(06)68770-9 (2006).
- 4 Timmis, A. *et al.* European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2017. *European heart journal* **39**, 508-579, doi:10.1093/eurheartj/ehx628 (2018).
- 5 Xu, J., Kochanek, K. D., Murphy, S. L. & Tejada-Vera, B. Deaths: final data for 2007. *National vital statistics reports : from the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System* **58**, 1-19 (2010).
- 6 Mendis, S. *et al.* *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control.* (World Health Organization in collaboration with the World Heart Federation and the World Stroke Organization, 2011).
- 7 W. Böcker, H. Denk & Ph. U. Heitz. *Pathologie.* (Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag 2004).
- 8 Pinto, Y. M., Pinto, S. J., Paul, M. & Merker, H. J. The electron microscopic morphology of the common carotid artery in rats. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* **180**, 223-235, doi:10.1016/S0940-9602(98)80078-2 (1998).
- 9 Ross, R. & Glomset, J. A. The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *The New England journal of medicine* **295**, 420-425, doi:10.1056/NEJM197608192950805 (1976).
- 10 Lobstein, J. *Traité d'Anatomie Pathologique II.* , <<https://archive.org/details/traitedanatomiepa01lobs/page/n5>> (1833).
- 11 Ackerknecht, E. H. Zur Geschichte der Arteriosklerose. *Gesnerus: Swiss Journal of the history of medicine and sciences* **32** (1975).
- 12 Toma, I. & McCaffrey, T. A. Transforming growth factor-beta and atherosclerosis: interwoven atherogenic and atheroprotective aspects. *Cell and tissue research* **347**, 155-175, doi:10.1007/s00441-011-1189-3 (2012).
- 13 Tervaert, J. W. C. Cardiovascular disease due to accelerated atherosclerosis in systemic vasculitides. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* **27**, 33-34, doi:doi.org/10.1016/j.berh.2012.12.004 (2013).
- 14 Tuzcu, E. M. *et al.* High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular ultrasound. *Circulation* **103**, 2705-2710, doi:10.1161/01.cir.103.22.2705 (2001).
- 15 K. Arasteh, H.-W. Baenkler & C. Bieber. *Innere Medizin.* (Thieme Verlag KG, 2009).
- 16 Gimbrone, M. A., Jr., Topper, J. N., Nagel, T., Anderson, K. R. & Garcia-Cardena, G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **902**, 230-239; discussion 239-240, doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06318.x (2000).

- 17 Nagel, T., Resnick, N., Dewey, C. F., Jr. & Gimbrone, M. A., Jr. Vascular endothelial cells respond to spatial gradients in fluid shear stress by enhanced activation of transcription factors. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **19**, 1825-1834 (1999).
- 18 Chappell, D. C., Varner, S. E., Nerem, R. M., Medford, R. M. & Alexander, R. W. Oscillatory shear stress stimulates adhesion molecule expression in cultured human endothelium. *Circulation research* **82**, 532-539 (1998).
- 19 Traub, O. & Berk, B. C. Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **18**, 677-685 (1998).
- 20 Topper, J. N., Cai, J., Falb, D. & Gimbrone, M. A., Jr. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 10417-10422, doi:10.1073/pnas.93.19.10417 (1996).
- 21 Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* **420**, 868-874, doi:10.1038/nature01323 (2002).
- 22 Hanke, H., Lenz, C. & Finking, G. The discovery of the pathophysiological aspects of atherosclerosis--a review. *Acta chirurgica Belgica* **101**, 162-169 (2001).
- 23 Gaudio, E., Carpino, G., Grassi, M. & Musca, A. [Morphological aspects of atherosclerosis lesion: past and present]. *La Clinica terapeutica* **157**, 135-142 (2006).
- 24 Hansson, G. K. & Libby, P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature reviews. Immunology* **6**, 508-519, doi:10.1038/nri1882 (2006).
- 25 Hansson, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The New England journal of medicine* **352**, 1685-1695, doi:10.1056/NEJMra043430 (2005).
- 26 P. Libby & P. M. Ridker. Inflammation and Atherothrombosis: From Population Biology and Bench Research to Clinical Practice. *Elsevier* **48**, A33-A46, doi:10.1016/j.jacc.2006.08.011 (2006).
- 27 Park, J. G. & Oh, G. T. Current pharmacotherapies for atherosclerotic cardiovascular diseases. *Archives of pharmacal research* **42**, 206-223, doi:10.1007/s12272-019-01116-1 (2019).
- 28 Nakahara, T. *et al.* Coronary Artery Calcification: From Mechanism to Molecular Imaging. *JACC. Cardiovascular imaging* **10**, 582-593, doi:10.1016/j.jcmg.2017.03.005 (2017).
- 29 Tedgui, A. & Mallat, Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiological reviews* **86**, 515-581, doi:10.1152/physrev.00024.2005 (2006).
- 30 Vacek, T. P. *et al.* Matrix metalloproteinases in atherosclerosis: role of nitric oxide, hydrogen sulfide, homocysteine, and polymorphisms. *Vascular health and risk management* **11**, 173-183, doi:10.2147/VHRM.S68415 (2015).
- 31 Ridker, P. M. *et al.* Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *The New England journal of medicine* **377**, 1119-1131, doi:10.1056/NEJMoa1707914 (2017).
- 32 Galkina, E. & Ley, K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (\*). *Annual review of immunology* **27**, 165-197, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132620 (2009).
- 33 Huo, Y. & Ley, K. Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta physiologica Scandinavica* **173**, 35-43, doi:10.1046/j.1365-201X.2001.00882.x (2001).

- 34 Cybulsky, M. I. & Gimbrone, M. A., Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* **251**, 788-791, doi:10.1126/science.1990440 (1991).
- 35 Cybulsky, M. I. *et al.* A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation* **107**, 1255-1262, doi:10.1172/JCI11871 (2001).
- 36 Galkina, E. & Ley, K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**, 2292-2301, doi:10.1161/ATVBAHA.107.149179 (2007).
- 37 Visse, R. & Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research* **92**, 827-839, doi:10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D (2003).
- 38 Myasoedova, V. A., Chistiakov, D. A., Grechko, A. V. & Orekhov, A. N. Matrix metalloproteinases in pro-atherosclerotic arterial remodeling. *Journal of molecular and cellular cardiology* **123**, 159-167, doi:10.1016/j.yjmcc.2018.08.026 (2018).
- 39 Raffetto, J. D. & Khalil, R. A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochemical pharmacology* **75**, 346-359, doi:10.1016/j.bcp.2007.07.004 (2008).
- 40 Woo, C. H., Lim, J. H. & Kim, J. H. Lipopolysaccharide induces matrix metalloproteinase-9 expression via a mitochondrial reactive oxygen species-p38 kinase-activator protein-1 pathway in Raw 264.7 cells. *J Immunol* **173**, 6973-6980, doi:10.4049/jimmunol.173.11.6973 (2004).
- 41 Wagsater, D., Zhu, C., Bjorkegren, J., Skogsberg, J. & Eriksson, P. MMP-2 and MMP-9 are prominent matrix metalloproteinases during atherosclerosis development in the Ldlr(-/-)Apob(100/100) mouse. *International journal of molecular medicine* **28**, 247-253, doi:10.3892/ijmm.2011.693 (2011).
- 42 Galis, Z. S., Sukhova, G. K., Lark, M. W. & Libby, P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *The Journal of clinical investigation* **94**, 2493-2503, doi:10.1172/JCI117619 (1994).
- 43 Johnson, J. L., George, S. J., Newby, A. C. & Jackson, C. L. Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9, and 12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 15575-15580, doi:10.1073/pnas.0506201102 (2005).
- 44 Hu, W. *et al.* Correlations of MMP-1, MMP-3, and MMP-12 with the degree of atherosclerosis, plaque stability and cardiovascular and cerebrovascular events. *Experimental and therapeutic medicine* **15**, 1994-1998, doi:10.3892/etm.2017.5623 (2018).
- 45 Sims, J. E. & Smith, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nature reviews. Immunology* **10**, 89-102, doi:10.1038/nri2691 (2010).
- 46 Garlanda, C., Dinarello, C. A. & Mantovani, A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* **39**, 1003-1018, doi:10.1016/j.immuni.2013.11.010 (2013).
- 47 Khan, R., Rheaume, E. & Tardif, J. C. Examining the Role of and Treatment Directed at IL-1beta in Atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports* **20**, 53, doi:10.1007/s11883-018-0754-6 (2018).
- 48 Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine* **340**, 115-126, doi:10.1056/NEJM199901143400207 (1999).
- 49 Dinarello, C. A. A clinical perspective of IL-1beta as the gatekeeper of inflammation. *European journal of immunology* **41**, 1203-1217, doi:10.1002/eji.201141550 (2011).

- 50 Huber, S. A., Sakkinen, P., Conze, D., Hardin, N. & Tracy, R. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **19**, 2364-2367 (1999).
- 51 Hartman, J. & Frishman, W. H. Inflammation and atherosclerosis: a review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy. *Cardiology in review* **22**, 147-151, doi:10.1097/CRD.000000000000021 (2014).
- 52 Rose-John, S. Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **10**, doi:10.1101/cshperspect.a028415 (2018).
- 53 Calabrese, L. H. & Rose-John, S. IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease. *Nature reviews. Rheumatology* **10**, 720-727, doi:10.1038/nrrheum.2014.127 (2014).
- 54 Zhang, H. *et al.* Role of TNF-alpha in vascular dysfunction. *Clin Sci (Lond)* **116**, 219-230, doi:10.1042/CS20080196 (2009).
- 55 Parameswaran, N. & Patial, S. Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* **20**, 87-103 (2010).
- 56 Hehlhans, T. & Pfeffer, K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* **115**, 1-20, doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02143.x (2005).
- 57 Rosenfeld, M. E. & Campbell, L. A. Pathogens and atherosclerosis: update on the potential contribution of multiple infectious organisms to the pathogenesis of atherosclerosis. *Thrombosis and haemostasis* **106**, 858-867, doi:10.1160/TH11-06-0392 (2011).
- 58 Lu, Y. C., Yeh, W. C. & Ohashi, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **42**, 145-151, doi:10.1016/j.cyto.2008.01.006 (2008).
- 59 Lee, J. Y., Sohn, K. H., Rhee, S. H. & Hwang, D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *The Journal of biological chemistry* **276**, 16683-16689, doi:10.1074/jbc.M011695200 (2001).
- 60 Huang, S. *et al.* Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *Journal of lipid research* **53**, 2002-2013, doi:10.1194/jlr.D029546 (2012).
- 61 Stewart, C. R. *et al.* CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nature immunology* **11**, 155-161, doi:10.1038/ni.1836 (2010).
- 62 Byrne, G. I. & Kalayoglu, M. V. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis: links to the disease process. *American heart journal* **138**, S488-490, doi:10.1016/s0002-8703(99)70282-6 (1999).
- 63 Joffe, J. *et al.* Genetic and Pharmacological Inhibition of TREM-1 Limits the Development of Experimental Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* **68**, 2776-2793, doi:10.1016/j.jacc.2016.10.015 (2016).
- 64 Xu, X. H. *et al.* Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation* **104**, 3103-3108, doi:10.1161/hc5001.100631 (2001).
- 65 Edfeldt, K., Swedenborg, J., Hansson, G. K. & Yan, Z. Q. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation* **105**, 1158-1161 (2002).
- 66 Barnes, P. J. & Adcock, I. M. NF-kappa B: a pivotal role in asthma and a new target for therapy. *Trends in pharmacological sciences* **18**, 46-50 (1997).

- 67 Chen, F., Castranova, V., Shi, X. & Demers, L. M. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clinical chemistry* **45**, 7-17 (1999).
- 68 Ghosh, S., May, M. J. & Kopp, E. B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology* **16**, 225-260, doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.225 (1998).
- 69 Gareus, R. *et al.* Endothelial cell-specific NF-kappaB inhibition protects mice from atherosclerosis. *Cell metabolism* **8**, 372-383, doi:10.1016/j.cmet.2008.08.016 (2008).
- 70 Hajra, L. *et al.* The NF-kappa B signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 9052-9057, doi:10.1073/pnas.97.16.9052 (2000).
- 71 Orr, A. W. *et al.* The subendothelial extracellular matrix modulates NF-kappaB activation by flow: a potential role in atherosclerosis. *The Journal of cell biology* **169**, 191-202, doi:10.1083/jcb.200410073 (2005).
- 72 Molestina, R. E., Miller, R. D., Lentsch, A. B., Ramirez, J. A. & Summersgill, J. T. Requirement for NF-kappaB in transcriptional activation of monocyte chemoattractant protein 1 by *Chlamydia pneumoniae* in human endothelial cells. *Infection and immunity* **68**, 4282-4288, doi:10.1128/iai.68.7.4282-4288.2000 (2000).
- 73 Liao, F., Andalibi, A., deBeer, F. C., Fogelman, A. M. & Lusis, A. J. Genetic control of inflammatory gene induction and NF-kappa B-like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice. *The Journal of clinical investigation* **91**, 2572-2579, doi:10.1172/JCI116495 (1993).
- 74 Hernandez-Presa, M. *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation* **95**, 1532-1541, doi:10.1161/01.cir.95.6.1532 (1997).
- 75 Rodriguez-Ayala, E. *et al.* Enhanced RAGE-mediated NFkappaB stimulation in inflamed hemodialysis patients. *Atherosclerosis* **180**, 333-340, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.12.007 (2005).
- 76 Pamukcu, B., Lip, G. Y. & Shantsila, E. The nuclear factor--kappa B pathway in atherosclerosis: a potential therapeutic target for atherothrombotic vascular disease. *Thrombosis research* **128**, 117-123, doi:10.1016/j.thromres.2011.03.025 (2011).
- 77 de Winther, M. P., Kanters, E., Kraal, G. & Hofker, M. H. Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **25**, 904-914, doi:10.1161/01.ATV.0000160340.72641.87 (2005).
- 78 Brand, K. *et al.* Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *The Journal of clinical investigation* **97**, 1715-1722, doi:10.1172/JCI118598 (1996).
- 79 Wilson, S. H. *et al.* Nuclear factor-kappaB immunoreactivity is present in human coronary plaque and enhanced in patients with unstable angina pectoris. *Atherosclerosis* **160**, 147-153 (2002).
- 80 Cuschieri, J. & Maier, R. V. Mitogen-activated protein kinase (MAPK). *Critical care medicine* **33**, S417-419 (2005).
- 81 Kolch, W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *The Biochemical journal* **351 Pt 2**, 289-305 (2000).
- 82 Xu, H. *et al.* Reactive oxygen species mediate oxidized low-density lipoprotein-induced endothelin-1 gene expression via extracellular signal-regulated kinase in vascular endothelial cells. *Journal of hypertension* **26**, 956-963, doi:10.1097/HJH.0b013e3282f56bb7 (2008).

- 83 Bryk, D., Olejarz, W. & Zapolska-Downar, D. [Mitogen-activated protein kinases in atherosclerosis]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **68**, 10-22, doi:10.5604/17322693.1085463 (2014).
- 84 Varma, S. *et al.* p42/44MAPK regulates baseline permeability and cGMP-induced hyperpermeability in endothelial cells. *Microvascular research* **63**, 172-178, doi:10.1006/mvre.2001.2381 (2002).
- 85 Isenovic, E. R. *et al.* Involvement of ERK1/2 kinase in insulin-and thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation. *Angiology* **61**, 357-364, doi:10.1177/0003319709358693 (2010).
- 86 Cho, N. H. *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes research and clinical practice* **138**, 271-281, doi:10.1016/j.diabres.2018.02.023 (2018).
- 87 Van Gaal, L. F., Mertens, I. L. & De Block, C. E. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* **444**, 875-880, doi:10.1038/nature05487 (2006).
- 88 Matheus, A. S. *et al.* Impact of diabetes on cardiovascular disease: an update. *International journal of hypertension* **2013**, 653789, doi:10.1155/2013/653789 (2013).
- 89 Tilg, H. & Moschen, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature reviews. Immunology* **6**, 772-783, doi:10.1038/nri1937 (2006).
- 90 Khaw, K. T. *et al.* Glycated haemoglobin, diabetes, and mortality in men in Norfolk cohort of european prospective investigation of cancer and nutrition (EPIC-Norfolk). *BMJ* **322**, 15-18, doi:10.1136/bmj.322.7277.15 (2001).
- 91 Ross, S. *et al.* Mendelian randomization analysis supports the causal role of dysglycaemia and diabetes in the risk of coronary artery disease. *European heart journal* **36**, 1454-1462, doi:10.1093/eurheartj/ehv083 (2015).
- 92 Danaei, G., Lawes, C. M., Vander Hoorn, S., Murray, C. J. & Ezzati, M. Global and regional mortality from ischaemic heart disease and stroke attributable to higher-than-optimum blood glucose concentration: comparative risk assessment. *Lancet* **368**, 1651-1659, doi:10.1016/S0140-6736(06)69700-6 (2006).
- 93 Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. & Kobilka, B. K. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459**, 356-363, doi:10.1038/nature08144 (2009).
- 94 Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G. & Schioth, H. B. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology* **63**, 1256-1272, doi:10.1124/mol.63.6.1256 (2003).
- 95 Gloriam, D. E., Fredriksson, R. & Schioth, H. B. The G protein-coupled receptor subset of the rat genome. *BMC genomics* **8**, 338, doi:10.1186/1471-2164-8-338 (2007).
- 96 Wellendorph, P. & Brauner-Osborne, H. Molecular basis for amino acid sensing by family C G-protein-coupled receptors. *British journal of pharmacology* **156**, 869-884, doi:10.1111/j.1476-5381.2008.00078.x (2009).
- 97 Hauser, A. S., Attwood, M. M., Rask-Andersen, M., Schioth, H. B. & Gloriam, D. E. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nature reviews. Drug discovery* **16**, 829-842, doi:10.1038/nrd.2017.178 (2017).
- 98 Dorsam, R. T. & Gutkind, J. S. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature reviews. Cancer* **7**, 79-94, doi:10.1038/nrc2069 (2007).
- 99 Flock, T. *et al.* Selectivity determinants of GPCR-G-protein binding. *Nature* **545**, 317-322, doi:10.1038/nature22070 (2017).
- 100 Lagerstrom, M. C. & Schioth, H. B. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery* **7**, 339-357, doi:10.1038/nrd2518 (2008).

- 101 Robbins, M. J. *et al.* Molecular cloning and characterization of two novel retinoic acid-inducible orphan G-protein-coupled receptors (GPRC5B and GPRC5C). *Genomics* **67**, 8-18, doi:10.1006/geno.2000.6226 (2000).
- 102 Kohyama-Koganeya, A., Kim, Y. J., Miura, M. & Hirabayashi, Y. A Drosophila orphan G protein-coupled receptor BOSS functions as a glucose-responding receptor: loss of boss causes abnormal energy metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 15328-15333, doi:10.1073/pnas.0807833105 (2008).
- 103 Regard, J. B., Sato, I. T. & Coughlin, S. R. Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression. *Cell* **135**, 561-571, doi:10.1016/j.cell.2008.08.040 (2008).
- 104 Lattin, J. E. *et al.* Expression analysis of G Protein-Coupled Receptors in mouse macrophages. *Immunome research* **4**, 5, doi:10.1186/1745-7580-4-5 (2008).
- 105 Kaur, H. *et al.* Single-cell profiling reveals heterogeneity and functional patterning of GPCR expression in the vascular system. *Nature communications* **8**, 15700, doi:10.1038/ncomms15700 (2017).
- 106 Hotamisligil, G. S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**, 860-867, doi:10.1038/nature05485 (2006).
- 107 Speliotes, E. K. *et al.* Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nature genetics* **42**, 937-948, doi:10.1038/ng.686 (2010).
- 108 Kim, Y. J., Sano, T., Nabetani, T., Asano, Y. & Hirabayashi, Y. GPRC5B activates obesity-associated inflammatory signaling in adipocytes. *Science signaling* **5**, ra85, doi:10.1126/scisignal.2003149 (2012).
- 109 Weber, C. & Noels, H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nature medicine* **17**, 1410-1422, doi:10.1038/nm.2538 (2011).
- 110 R. Erbel *et al.* *ESC Pocket Guidelines. Aortenerkrankungen, Version 2014.*, Vol. 69 (Börm Bruckmeier Verlag GmbH, Grünwald, 2015).
- 111 C. Espinola-Klein, J. B. Dahm, C. Heiss, C. Tiefenbacher & R. Zahn. *ESC Pocket Guidelines: Diagnose und Therapie der peripheren arteriellen Erkrankung, Version 2017.* Vol. 46 (Börm Bruckmeier Verlag GmbH, Grünwald, 2018).
- 112 Mao, X., Xie, L. & Greenberg, D. A. Effects of flow on LOX-1 and oxidized low-density lipoprotein interactions in brain endothelial cell cultures. *Free radical biology & medicine* **89**, 638-641, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.403 (2015).
- 113 Yan, F. *et al.* Magnetic Resonance Imaging of Atherosclerosis Using CD81-Targeted Microparticles of Iron Oxide in Mice. *BioMed research international* **2015**, 758616, doi:10.1155/2015/758616 (2015).
- 114 Mackenzie, N. C. *et al.* MOVAS-1 cell line: a new in vitro model of vascular calcification. *International journal of molecular medicine* **27**, 663-668, doi:10.3892/ijmm.2011.631 (2011).
- 115 Choi, K. W. *et al.* Inhibition of TNF-alpha-induced adhesion molecule expression by diosgenin in mouse vascular smooth muscle cells via downregulation of the MAPK, Akt and NF-kappaB signaling pathways. *Vascular pharmacology* **53**, 273-280, doi:10.1016/j.vph.2010.09.007 (2010).
- 116 Peng, J. *et al.* TET2 Protects against oxLDL-Induced HUVEC Dysfunction by Upregulating the CSE/H2S System. *Frontiers in pharmacology* **8**, 486, doi:10.3389/fphar.2017.00486 (2017).
- 117 Di, M. *et al.* Dickkopf1 destabilizes atherosclerotic plaques and promotes plaque formation by inducing apoptosis of endothelial cells through activation of ER stress. *Cell death & disease* **8**, e2917, doi:10.1038/cddis.2017.277 (2017).
- 118 Lan, G. *et al.* MicroRNA-134 activates lipoprotein lipase-mediated lipid accumulation and inflammatory response by targeting angiotensin-like 4 in THP-1 macrophages.

- Biochemical and biophysical research communications* **472**, 410-417, doi:10.1016/j.bbrc.2015.10.158 (2016).
- 119 Ye, Z. *et al.* A Peptide Analogue of Selectin Ligands Attenuated Atherosclerosis by Inhibiting Monocyte Activation. *Mediators of inflammation* **2019**, 8709583, doi:10.1155/2019/8709583 (2019).
- 120 Qin, Z. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis* **221**, 2-11, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.003 (2012).
- 121 Montesano, R. *et al.* Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenetic behavior of endothelial cells expressing the middle T oncogene. *Cell* **62**, 435-445 (1990).
- 122 Afroze, T. & Husain, M. c-Myb-binding sites mediate G(1)/S-associated repression of the plasma membrane Ca(2+)-ATPase-1 promoter. *The Journal of biological chemistry* **275**, 9062-9069, doi:10.1074/jbc.275.12.9062 (2000).
- 123 Afroze, T. *et al.* Calcineurin-independent regulation of plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase-4 in the vascular smooth muscle cell cycle. *American journal of physiology. Cell physiology* **285**, C88-95, doi:10.1152/ajpcell.00518.2002 (2003).
- 124 Tsuchiya, S. *et al.* Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International journal of cancer* **26**, 171-176 (1980).
- 125 Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* **36**, 59-74, doi:10.1099/0022-1317-36-1-59 (1977).
- 126 Tsuchiya, S. *et al.* Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer research* **42**, 1530-1536 (1982).
- 127 Galun, E. & Rose-John, S. The regenerative activity of interleukin-6. *Methods Mol Biol* **982**, 59-77, doi:10.1007/978-1-62703-308-4\_4 (2013).
- 128 Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408, doi:10.1006/meth.2001.1262 (2001).
- 129 Yin, F. C., Spurgeon, H. A., Rakusan, K., Weisfeldt, M. L. & Lakatta, E. G. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *The American journal of physiology* **243**, H941-947, doi:10.1152/ajpheart.1982.243.6.H941 (1982).
- 130 Movat, H. Z. Demonstration of all connective tissue elements in a single section; pentachrome stains. *A.M.A. archives of pathology* **60**, 289-295 (1955).
- 131 Russell, H. K., Jr. A modification of Movat's pentachrome stain. *Archives of pathology* **94**, 187-191 (1972).
- 132 Histalim. *Modified Russel-Movat*, <<https://www.histalim.com/home/activities/our-services/histology/modified-russel-movat/>> (o.J.).
- 133 Nitz, J.-T. *Private Mitteilung und wird veröffentlicht.*
- 134 Yang, J. *et al.* Multitargeting Gene Delivery Systems for Enhancing the Transfection of Endothelial Cells. *Macromolecular rapid communications* **37**, 1926-1931, doi:10.1002/marc.201600345 (2016).
- 135 Gresch, O. *et al.* New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods* **33**, 151-163, doi:10.1016/j.ymeth.2003.11.009 (2004).
- 136 von Samson-Himmelstjerna, F. A. *et al.* The orphan receptor GPRC5B modulates inflammatory and fibrotic pathways in cardiac fibroblasts and mice hearts. *Biochemical and biophysical research communications* **514**, 1198-1203, doi:10.1016/j.bbrc.2019.05.038 (2019).
- 137 Hohenhaus, D. M. *et al.* An mRNA atlas of G protein-coupled receptor expression during primary human monocyte/macrophage differentiation and lipopolysaccharide-



- mediated activation identifies targetable candidate regulators of inflammation. *Immunobiology* **218**, 1345-1353, doi:10.1016/j.imbio.2013.07.001 (2013).
- 138 Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K. & Dockrell, D. H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PloS one* **5**, e8668, doi:10.1371/journal.pone.0008668 (2010).
- 139 Italiani, P. & Boraschi, D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Frontiers in immunology* **5**, 514, doi:10.3389/fimmu.2014.00514 (2014).
- 140 Layoun, A., Samba, M. & Santos, M. M. Isolation of murine peritoneal macrophages to carry out gene expression analysis upon Toll-like receptors stimulation. *Journal of visualized experiments : JoVE*, e52749, doi:10.3791/52749 (2015).
- 141 Lo, C. W. *et al.* IL-6 trans-signaling in formation and progression of malignant ascites in ovarian cancer. *Cancer research* **71**, 424-434, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1496 (2011).
- 142 Palsson-McDermott, E. M. & O'Neill, L. A. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* **113**, 153-162, doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01976.x (2004).
- 143 Chow, J. C., Young, D. W., Golenbock, D. T., Christ, W. J. & Gusovsky, F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *The Journal of biological chemistry* **274**, 10689-10692, doi:10.1074/jbc.274.16.10689 (1999).
- 144 Grivennikov, S. I. & Karin, M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine & growth factor reviews* **21**, 11-19, doi:10.1016/j.cytogfr.2009.11.005 (2010).
- 145 Nitz, J.-T. *wird veröffentlicht.*
- 146 Mohan, S., Konopinski, R., Yan, B., Centonze, V. E. & Natarajan, M. High glucose-induced IKK-Hsp-90 interaction contributes to endothelial dysfunction. *American journal of physiology. Cell physiology* **296**, C182-192, doi:10.1152/ajpcell.00575.2007 (2009).
- 147 Wu, X. *et al.* Adiponectin suppresses IkappaB kinase activation induced by tumor necrosis factor-alpha or high glucose in endothelial cells: role of cAMP and AMP kinase signaling. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **293**, E1836-1844, doi:10.1152/ajprenal.00096.2007 (2007).
- 148 *Human Protein Atlas. GPRC5B*, <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000167191-GPRC5B/cell>> (o.J.).
- 149 Kim, Y. J. & Hirabayashi, Y. Caveolin-1 prevents palmitate-induced NF-kappaB signaling by inhibiting GPRC5B-phosphorylation. *Biochemical and biophysical research communications* **503**, 2673-2677, doi:10.1016/j.bbrc.2018.08.022 (2018).
- 150 Simons, K. & Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews. Molecular cell biology* **1**, 31-39, doi:10.1038/35036052 (2000).
- 151 Jong, Y. I., Harmon, S. K. & O'Malley, K. L. GPCR signalling from within the cell. *British journal of pharmacology* **175**, 4026-4035, doi:10.1111/bph.14023 (2018).
- 152 Duan, G. & Walther, D. The roles of post-translational modifications in the context of protein interaction networks. *PLoS computational biology* **11**, e1004049, doi:10.1371/journal.pcbi.1004049 (2015).
- 153 Tian, Q. *et al.* Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **3**, 960-969, doi:10.1074/mcp.M400055-MCP200 (2004).
- 154 Shebl, F. M. *et al.* Comparison of mRNA and protein measures of cytokines following vaccination with human papillomavirus-16 L1 virus-like particles. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association*

- for *Cancer Research*, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology **19**, 978-981, doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0064 (2010).
- 155 O'Carroll, A. M., Lolait, S. J., Harris, L. E. & Pope, G. R. The apelin receptor APJ: journey from an orphan to a multifaceted regulator of homeostasis. *The Journal of endocrinology* **219**, R13-35, doi:10.1530/JOE-13-0227 (2013).
- 156 Lu, Y. *et al.* Apelin-APJ induces ICAM-1, VCAM-1 and MCP-1 expression via NF-kappaB/JNK signal pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Amino acids* **43**, 2125-2136, doi:10.1007/s00726-012-1298-7 (2012).
- 157 Van Doren, S. R. Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* **44-46**, 224-231, doi:10.1016/j.matbio.2015.01.005 (2015).
- 158 Rekhter, M. D. *et al.* Type I collagen gene expression in human atherosclerosis. Localization to specific plaque regions. *The American journal of pathology* **143**, 1634-1648 (1993).
- 159 Jain, R., Watson, U., Vasudevan, L. & Saini, D. K. ERK Activation Pathways Downstream of GPCRs. *International review of cell and molecular biology* **338**, 79-109, doi:10.1016/bs.ircmb.2018.02.003 (2018).
- 160 Atanes, P. *et al.* Identifying Signalling Pathways Regulated by GPRC5B in beta-Cells by CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **45**, 656-666, doi:10.1159/000487159 (2018).
- 161 Dhawan, P. & Richmond, A. A novel NF-kappa B-inducing kinase-MAPK signaling pathway up-regulates NF-kappa B activity in melanoma cells. *The Journal of biological chemistry* **277**, 7920-7928, doi:10.1074/jbc.M112210200 (2002).
- 162 Chen, B., Liu, J., Ho, T. T., Ding, X. & Mo, Y. Y. ERK-mediated NF-kappaB activation through ASIC1 in response to acidosis. *Oncogenesis* **5**, e279, doi:10.1038/onsis.2016.81 (2016).
- 163 Wang, F., Guan, M., Wei, L. & Yan, H. IL18 promotes the secretion of matrix metalloproteinases in human periodontal ligament fibroblasts by activating NFkappaB signaling. *Molecular medicine reports* **19**, 703-710, doi:10.3892/mmr.2018.9697 (2019).
- 164 Iademarco, M. F., McQuillan, J. J., Rosen, G. D. & Dean, D. C. Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *The Journal of biological chemistry* **267**, 16323-16329 (1992).
- 165 van de Stolpe, A. *et al.* 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and tumor necrosis factor alpha-mediated induction of intercellular adhesion molecule-1 is inhibited by dexamethasone. Functional analysis of the human intercellular adhesion molecular-1 promoter. *The Journal of biological chemistry* **269**, 6185-6192 (1994).
- 166 Morris, R., Kershaw, N. J. & Babon, J. J. The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway. *Protein science : a publication of the Protein Society* **27**, 1984-2009, doi:10.1002/pro.3519 (2018).
- 167 Sinpitaksakul, S. N., Pimkhaokham, A., Sanchavanakit, N. & Pavasant, P. TGF-beta1 induced MMP-9 expression in HNSCC cell lines via Smad/MLCK pathway. *Biochemical and biophysical research communications* **371**, 713-718, doi:10.1016/j.bbrc.2008.04.128 (2008).
- 168 Ishibashi, S., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Herz, J. & Burns, D. K. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *The Journal of clinical investigation* **93**, 1885-1893, doi:10.1172/JCI117179 (1994).

- 169 Getz, G. S. & Reardon, C. A. Animal models of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **32**, 1104-1115, doi:10.1161/ATVBAHA.111.237693 (2012).
- 170 Liu, Q., Chen, Y., Auger-Messier, M. & Molkenin, J. D. Interaction between NFkappaB and NFAT coordinates cardiac hypertrophy and pathological remodeling. *Circulation research* **110**, 1077-1086, doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.260729 (2012).
- 171 Molkenin, J. D. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovascular research* **63**, 467-475, doi:10.1016/j.cardiores.2004.01.021 (2004).
- 172 Dirx, E., da Costa Martins, P. A. & De Windt, L. J. Regulation of fetal gene expression in heart failure. *Biochimica et biophysica acta* **1832**, 2414-2424, doi:10.1016/j.bbadis.2013.07.023 (2013).
- 173 Nguyen, S. *et al.* The effects of fatty acid composition on cardiac hypertrophy and function in mouse models of diet-induced obesity. *The Journal of nutritional biochemistry* **46**, 137-142, doi:10.1016/j.jnutbio.2017.05.009 (2017).
- 174 Glass, C. K. & Witztum, J. L. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* **104**, 503-516, doi:10.1016/s0092-8674(01)00238-0 (2001).
- 175 Perego, C. *et al.* Cholesterol metabolism, pancreatic beta-cell function and diabetes. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, doi:10.1016/j.bbadis.2019.04.012 (2019).
- 176 H. Lehnert & K. Werdan. *Innere Medizin – essentials*. (Thieme Verlag, 2006).
- 177 Hartvigsen, K. *et al.* A diet-induced hypercholesterolemic murine model to study atherogenesis without obesity and metabolic syndrome. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**, 878-885, doi:10.1161/01.ATV.0000258790.35810.02 (2007).
- 178 Tekola-Ayele, F., Lee, A., Workalemahu, T. & Sanchez-Pozos, K. Shared genetic underpinnings of childhood obesity and adult cardiometabolic diseases. *Human genomics* **13**, 17, doi:10.1186/s40246-019-0202-x (2019).
- 179 Reardon, C. A. *et al.* Effect of immune deficiency on lipoproteins and atherosclerosis in male apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **21**, 1011-1016 (2001).
- 180 Doehring, L. C. *et al.* Myeloid CD34+CD13+ precursor cells transdifferentiate into chondrocyte-like cells in atherosclerotic intimal calcification. *The American journal of pathology* **177**, 473-480, doi:10.2353/ajpath.2010.090758 (2010).
- 181 Ho, M. K. & Springer, T. A. Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J Immunol* **128**, 1221-1228 (1982).
- 182 Leenen, P. J., de Bruijn, M. F., Voerman, J. S., Campbell, P. A. & van Ewijk, W. Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies. *Journal of immunological methods* **174**, 5-19 (1994).
- 183 Winning, S., Splettstoesser, F., Fandrey, J. & Frede, S. Acute hypoxia induces HIF-independent monocyte adhesion to endothelial cells through increased intercellular adhesion molecule-1 expression: the role of hypoxic inhibition of prolyl hydroxylase activity for the induction of NF-kappa B. *J Immunol* **185**, 1786-1793, doi:10.4049/jimmunol.0903244 (2010).
- 184 Flotte, T. J., Springer, T. A. & Thorbecke, G. J. Dendritic cell and macrophage staining by monoclonal antibodies in tissue sections and epidermal sheets. *The American journal of pathology* **111**, 112-124 (1983).
- 185 Haines, K. A., Flotte, T. J., Springer, T. A., Gigli, I. & Thorbecke, G. J. Staining of Langerhans cells with monoclonal antibodies to macrophages and lymphoid cells.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**, 3448-3451, doi:10.1073/pnas.80.11.3448 (1983).
- 186 Truong, M. J. *et al.* Human neutrophils express immunoglobulin E (IgE)-binding proteins (Mac-2/epsilon BP) of the S-type lectin family: role in IgE-dependent activation. *The Journal of experimental medicine* **177**, 243-248, doi:10.1084/jem.177.1.243 (1993).
- 187 Nabarra, B. & Papiernik, M. Phenotype of thymic stromal cells. An immunoelectron microscopic study with anti-IA, anti-MAC-1, and anti-MAC-2 antibodies. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **58**, 524-531 (1988).
- 188 Walker, E. B., Akporiaye, E. T., Warner, N. L. & Stewart, C. C. Characterization of subsets of bone marrow-derived macrophages by flow cytometry analysis. *Journal of leukocyte biology* **37**, 121-136, doi:10.1002/jlb.37.2.121 (1985).
- 189 Alberts-Grill, N., Denning, T. L., Rezvan, A. & Jo, H. The role of the vascular dendritic cell network in atherosclerosis. *American journal of physiology. Cell physiology* **305**, C1-21, doi:10.1152/ajpcell.00017.2013 (2013).
- 190 Sano, T. *et al.* Loss of GPRC5B impairs synapse formation of Purkinje cells with cerebellar nuclear neurons and disrupts cerebellar synaptic plasticity and motor learning. *Neuroscience research* **136**, 33-47, doi:10.1016/j.neures.2018.02.006 (2018).
- 191 Kurabayashi, N., Nguyen, M. D. & Sanada, K. The G protein-coupled receptor GPRC5B contributes to neurogenesis in the developing mouse neocortex. *Development* **140**, 4335-4346, doi:10.1242/dev.099754 (2013).
- 192 Sano, T. *et al.* Comparative characterization of GPRC5B and GPRC5CLacZ knockin mice; behavioral abnormalities in GPRC5B-deficient mice. *Biochemical and biophysical research communications* **412**, 460-465, doi:10.1016/j.bbrc.2011.07.118 (2011).
- 193 Varadi, K. *et al.* Novel random peptide libraries displayed on AAV serotype 9 for selection of endothelial cell-directed gene transfer vectors. *Gene therapy* **19**, 800-809, doi:10.1038/gt.2011.143 (2012).
- 194 Naso, M. F., Tomkowicz, B., Perry, W. L., 3rd & Strohl, W. R. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* **31**, 317-334, doi:10.1007/s40259-017-0234-5 (2017).
- 195 Hanlon, C. D. & Andrew, D. J. Outside-in signaling--a brief review of GPCR signaling with a focus on the Drosophila GPCR family. *Journal of cell science* **128**, 3533-3542, doi:10.1242/jcs.175158 (2015).
- 196 Tang, X. L., Wang, Y., Li, D. L., Luo, J. & Liu, M. Y. Orphan G protein-coupled receptors (GPCRs): biological functions and potential drug targets. *Acta pharmacologica Sinica* **33**, 363-371, doi:10.1038/aps.2011.210 (2012).
- 197 Tsao, P., Cao, T. & von Zastrow, M. Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors. *Trends in pharmacological sciences* **22**, 91-96 (2001).
- 198 Hart, A. C., Kramer, H., Van Vactor, D. L., Jr., Paidhungat, M. & Zipursky, S. L. Induction of cell fate in the Drosophila retina: the bride of sevenless protein is predicted to contain a large extracellular domain and seven transmembrane segments. *Genes & development* **4**, 1835-1847, doi:10.1101/gad.4.11.1835 (1990).
- 199 Levoye, A., Dam, J., Ayoub, M. A., Guillaume, J. L. & Jockers, R. Do orphan G-protein-coupled receptors have ligand-independent functions? New insights from receptor heterodimers. *EMBO reports* **7**, 1094-1098, doi:10.1038/sj.embor.7400838 (2006).
- 200 Kniazeff, J., Prezeau, L., Rondard, P., Pin, J. P. & Goudet, C. Dimers and beyond: The functional puzzles of class C GPCRs. *Pharmacology & therapeutics* **130**, 9-25, doi:10.1016/j.pharmthera.2011.01.006 (2011).

- 
- 201 El Moustaine, D. *et al.* Distinct roles of metabotropic glutamate receptor dimerization in agonist activation and G-protein coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 16342-16347, doi:10.1073/pnas.1205838109 (2012).
- 202 Wise, A., Jupe, S. C. & Rees, S. The identification of ligands at orphan G-protein coupled receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology* **44**, 43-66, doi:10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121419 (2004).
- 203 Gudermann, T. & Bader, M. Receptors, G proteins, and integration of calcium signalling. *J Mol Med (Berl)* **93**, 937-940, doi:10.1007/s00109-015-1330-y (2015).
- 204 Offermanns, S. & Simon, M. I. G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C. *The Journal of biological chemistry* **270**, 15175-15180, doi:10.1074/jbc.270.25.15175 (1995).
- 205 Milligan, G. Constitutive activity and inverse agonists of G protein-coupled receptors: a current perspective. *Molecular pharmacology* **64**, 1271-1276, doi:10.1124/mol.64.6.1271 (2003).

## 8 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei all denjenigen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich mit Rat und Tat unterstützt haben.

Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. Norbert Frey und Herrn PD Dr. Hans-Jörg Hippe dafür, dass sie mir die Durchführung der Untersuchungen im Rahmen meiner Dissertation in den Laboren der Arbeitsgruppe für Molekulare Kardiologie/G-Protein-gekoppelte Rezeptoren des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein ermöglicht haben. Außerdem bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Hans-Jörg Hippe für die Vergabe und Finanzierung des Themas, das in mich gesetzte Vertrauen und die stets freundliche Betreuung und Unterstützung bei diesem Projekt sowie die Begutachtung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Thomas Roeder danke ich für die Übernahme der universitätsinternen Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit.

Bei Jan-Thorge Nitz möchte ich mich für die Durchführung des TNF $\alpha$ - und LPS-Stimulationsversuchs in bEnd.3-Zellen und MOVAS bedanken.

Dr. Michael Preusch danke ich für die Kooperation im Rahmen des Tierversuches und die Hilfe bei der Durchführung der Knochenmarkstransplantation. In diesem Zusammenhang bedanke ich mich auch bei Annette Buttler für die schöne Zeit in der Arbeitsgruppe Atherosklerose und Restenose am Universitätsklinikum Heidelberg und die Unterstützung bei den Gewebefärbungen.

Ich möchte mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für Molekulare Kardiologie/G-Protein-gekoppelte Rezeptoren für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit am Institut bedanken. Insbesondere Linda Weder, Lucia Kilian und Ankush Borlepawar danke ich für die vielen interessanten und anregenden Diskussionen und die schöne Zeit in und außerhalb des Labors.

Meinen Eltern Petra und Wolfgang sowie meiner Schwester Johanna danke ich für die liebevolle Unterstützung über all die Jahre hinweg.

## **9 Lebenslauf**

Aus Datenschutzgründen ist der Lebenslauf online nicht verfügbar.

## 10 Publikationen

### Kongressteilnahmen

Poster im Rahmen der *Basic Cardiovascular Sciences Scientific Sessions 2017*  
Portland, Oregon, 10-13.07.2017

Vortrag im Rahmen der 81. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung e.V.  
Mannheim, 08-11.04.2015

Poster im Rahmen des 2. Symposiums des Deutschen Zentrums für Herz-Kreislauf-Forschung e.V.  
Berlin, 20-22.11.2014

### Originalartikel

von Samson-Himmelstjerna FA\*, **Freundt G\***, Nitz JT, Stelter F, Luedde M, Wieland T, Frey N, Hippe HJ. The orphan receptor GPRC5B modulates inflammatory and fibrotic pathways in cardiac fibroblasts and mice hearts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 Jul 5;514(4):1198-1203. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.05.038. Epub 2019 May 16. \*Geteilte Erstautorenschaft

Kobelt D, Aumann J, Schmidt M, Wittig B, Fichtner I, Behrens D, Lemm M, **Freundt G**, Schlag PM, Walther W. Preclinical study on combined chemo- and nonviral gene therapy for sensitization of melanoma using a human TNF-alpha expressing MIDGE DNA vector. *Mol Oncol.* 2014 May;8(3):609-19. doi: 10.1016/j.molonc.2013.12.019. Epub 2014 Jan 18.



Der Artikel „The orphan receptor GPRC5B modulates inflammatory and fibrotic pathways in cardiac fibroblasts and mice hearts“ (DOI:10.1016/j.bbrc.2019.05.038) ist in der Zeitschrift Biochemical and Biophysical Research Communications veröffentlicht und aus urheberrechtlichen Gründen im Anhang dieser Dissertation nicht abgedruckt.