

Aus dem

Department für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und
Pharmakogenomik an der Universität Tübingen

Abteilung Pharmakologie und Experimentelle Therapie und
Toxikologie

**Analyse der $G\alpha_i$ -abhängigen Migration von murinen
Neutrophilen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Grothe, Daniela

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. S. Beer-Hammer

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. F. Konrad

Tag der Disputation: 19.12.2023

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Zelluläre Signaltransduktion	1
1.2 GPCRs und heterotrimere G-Proteine	2
1.2.1 G α -Untereinheiten	4
1.3 Immunantwort und Neutrophile Granulozyten	5
1.3.1 G-Proteine in Neutrophilen	9
1.4 Ischämie - Reperfusionsschaden / Ischemia-Reperfusion Injury (IRI)	11
1.4.1 Die Rolle von G $_{i2}$ und G $_{i3}$ im IRI	13
1.5 Bildanalyse mit Bildgebenden Verfahren	14
1.5.1 Life Cell Imaging	14
1.5.2 Zellsegmentierung und Zellverfolgung (Tracking)	16
1.6 Ziel dieser Arbeit	18
2 Material und Methoden	20
2.1 Chemikalien	20
2.2 Reagenzien, Kits und Verbrauchsmaterial	21
2.3 Medien und Puffer	22
2.3.1 Zellkulturmedien und Zusätze	22
2.3.2 Puffer	23
2.4 Antikörper und Antiseren	23
2.5 Primer	24
2.6 Geräte	24
2.7 Software	26
2.8 Versuchstiere	26
2.8.1 Tierhaltung	27
2.8.2 Genehmigung	27
2.8.3 Genotypisierung	27
2.9 Zellbiologische Methoden	28
2.9.1 Gewinnung und immunomagnetische Isolation von murinen Neutrophilen	28
2.9.2 FACS-Färbung und Analyse	30
2.9.3 Gewinnung von humanen Neutrophilen	30

2.10 Untersuchung der Zellmigration, Bildgebende Methoden.....	31
2.10.1 Chemotaxis Kammern.....	31
2.10.2 Herstellung einer Kollagenmatrix	31
2.10.3 Vorbereitung der Kammern mit murinen Neutrophilen.....	32
2.10.4 Vorbereiten der Kammern mit humanen Neutrophilen.....	33
2.10.5 Bildgebung	33
2.10.6 Zellsegmentierung.....	34
2.10.7 Aufzeichnung und Bereinigung der Zellbewegung	35
2.10.8 Analyse der Zellmigration.....	36
2.11 Proteinbiochemische Methoden	36
2.11.1 Gewinnung von Zellysaten für Immunoblots	36
2.11.2 Proteinnachweis mittels Immunoblot.....	37
2.12 Statistik.....	38
3 Ergebnisse	39
3.1 Analyse der Reinheit der isolierten neutrophilen Granulozyten mittels Durchflusszytometrie	39
3.2 Nachweis des $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ -Knockouts mittels Immunoblot.....	40
3.3 Versuchsaufbau und Auswertung der Chemotaxis von murinen und humanen Neutrophilen.....	42
3.4 Analyse der Chemotaxis von murinen, $G\alpha_{i2}$ -defizienten Neutrophilen	44
3.5 Analyse der Chemotaxis von murinen, $G\alpha_{i3}$ -defizienten Neutrophilen	46
3.6 Analyse der Chemotaxis von murinen, $G\alpha_{i2/3}$ -defizienten Neutrophilen	48
3.7 Analyse der Chemotaxis von murinen Neutrophilen nach Behandlung mit spezifischem anti- $G\alpha_{i1/2}$ Antikörper.....	50
3.8 Analyse der Chemotaxis von humanen Neutrophilen nach Behandlung mit spezifischem anti- $G\alpha_{i1/2}$ Antikörper.....	52
4 Diskussion	54
4.1 Analyse der Reinheit der isolierten neutrophilen Granulozyten mittels Durchflusszytometrie	55
4.2 Nachweis des $G\alpha_{i2}/ G\alpha_{i3}$ -Knockouts mittels Immunoblot	56
4.3 Analyse der Chemotaxisparameter.....	56
4.3.1 Analyse der Chemotaxis von murinen, $G\alpha_{i2}$ -defizienten Neutrophilen.....	57
4.3.2 Analyse der Chemotaxis von murinen, $G\alpha_{i3}$ -defizienten Neutrophilen.....	58
4.3.3 Analyse der Chemotaxis von murinen, $G\alpha_{i2/3}$ -defizienten Neutrophilen.....	59

4.3.4 Analyse der Chemotaxis von murinen Neutrophilen nach Behandlung mit spezifischem anti-G $\alpha_{i1/2}$ Antikörper.....	60
4.3.5 Analyse der Chemotaxis von humanen Neutrophilen nach Behandlung mit spezifischem anti-G $\alpha_{i1/2}$ Antikörper.....	61
4.4 Diskussion des experimentellen Versuchssettings und der Auswertung	63
4.5 Diskussion der Bildauswertung.....	64
4.6 Ausblick	65
5 Zusammenfassung.....	67
6 Literaturverzeichnis.....	68
Anhang	73
Erklärung zum Eigenanteil.....	75
Veröffentlichungen	76
Danksagung.....	77

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: G-Protein gekoppelte Signaltransduktion	3
Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum der G-Protein- α -Untereinheiten	4
Abbildung 3: μ -Slide Chemotaxis Kammer.....	31
Abbildung 4: Brightfield-Aufnahme eines μ -Slides mit humanen Neutrophilen	34
Abbildung 5: Segmentierte Aufnahme von humanen Neutrophilen	35
Abbildung 6: Tracks von humanen Neutrophilen	36
Abbildung 7: Repräsentative FACS-Analyse	40
Abbildung 8: Immunoblot von Neutrophilen aus <i>Gnai2^{fl/fl}</i> LysM-Cre Mäusen	41
Abbildung 9: Immunoblot von Neutrophilen aus <i>Gnai3^{fl/fl}</i> LysM-Cre Mäusen	41
Abbildung 10: Die Parameter Track Length und Straightness	42
Abbildung 11: Beispieldiagramme aus dem Chemotaxis und Migration Tool 2.0.....	43
Abbildung 12: Analyse der Chemotaxisparameter von Neutrophilen aus <i>Gnai2</i> -LysM-Cre-negativen und -Cre-positiven Mäusen	45
Abbildung 13: Analyse der Chemotaxisparameter von Neutrophilen aus <i>Gnai3</i> -LysM-Cre-negativen und -Cre-positiven Mäusen	47
Abbildung 14: Analyse der Chemotaxisparameter von Neutrophilen aus <i>Gnai2/3</i> -LysM-Cre-negativen und -Cre-positiven Mäusen	49
Abbildung 15: Analyse der Chemotaxisparameter von murinen Neutrophilen mit spezifischem anti-G $\alpha_{i1/2}$ -IgG-Antikörper im Vergleich zu unspezifischem IgG.....	51
Abbildung 16: Analyse der Chemotaxisparameter von humanen Neutrophilen mit spezifischem anti-G $\alpha_{i1/2}$ -IgG-Antikörper im Vergleich zu unspezifischem IgG.....	53

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylylcyklase
ADP	Adenosindiphosphat
AFC	Adaptiv Fokus Control
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyklisches Guanosinmonophosphat
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscope
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FMI	Forward Migration Index
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
g	Gramm
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanosine Triphosphate Exchange Factor
GPCR	G-Protein Coupled Receptor
GTP	Guanosintriphosphat
GAP	GTPase-activating proteins
HF	Hellfeld
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IP ₃	Inositoltriphosphat
IRI	Ischemia Reperfusion Injury
mA	Milliampere
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
min.	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPO	Myeloperoxidasen
NADPH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI3K γ	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositoltriphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PNC	Platelete-Neutrophil-Complex
PTX	Pertussistoxin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
ROI	Region of Interest
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Drehzahl (engl.: revolutions per minute)

SO.....	<i>Superoxid</i>
SOD.....	<i>Superoxid-Dismutase</i>
TNF.....	<i>Tumornekrosefaktor</i>
V.....	<i>Volt</i>
WF.....	<i>Weitfeld</i>
WSIC.....	<i>Werner Siemens Imaging Center</i>
μl.....	<i>Mikroliter</i>
μm.....	<i>Mikrometer</i>
μM.....	<i>Mikromolar</i>

1 Einleitung

1.1 Zelluläre Signaltransduktion

Um das Überleben eines mehrzelligen Organismus zu gewährleisten, muss eine geregelte Kommunikation der einzelnen Zellen stattfinden können. Extrazelluläre Reize bedürfen einer systematischen Signalweitergabe, um die Funktionen der verschiedenen Zelltypen zu koordinieren und mit letztendlich einer, für den Organismus adäquaten Reizantwort zu reagieren. Die Wege dieser lebensnotwendigen Signalweiterleitung sind ebenso hochkomplex wie vielfältig. Die Signalübertragung beginnt bzw. erfolgt über Signalsubstanzen, wie Hormone, Wachstumsfaktoren, Zytokine, Chemokine und Neurotransmitter, oder über direkte Reizeinwirkungen von physikalischen (Strahlung, Wärme, Druck) oder chemischen (Geruchs-, Geschmacksstoffe) Umweltfaktoren. Ziel dieser sogenannten Signaltransduktion ist die Weiterleitung aufgenommener Signale zu intrazellulären Effektorproteinen, welche schlussendlich die erwünschten Prozesse, wie Gentranskription, Zellproliferation oder Immunantwort einleiten. Zur Aufnahme des Signals sind Rezeptoren notwendig, welche sich für kleinere, lipophile und damit membrangängige Substanzen intrazellulär befinden. Größere und hydrophile Moleküle benötigen membranständige Rezeptoren. Zu diesen gehören als größte Gruppe G-Protein gekoppelte Rezeptoren (*G-protein-coupled receptors*, GPCRs), sowie enzymgekoppelte Rezeptoren und Liganden-gesteuerte Ionenkanäle.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit spezifischen, nachgeschalteten Prozessen der GPCRs. Circa tausend verschiedene dieser homologen Rezeptoren kommen in Säugetieren vor und sind verantwortlich für die Reizweiterleitung zahlreicher Signalmoleküle, wie Hormone, Neurotransmitter, Lipide und Aminosäuren, aber auch sensorischer Reize wie Licht, Pheromone und geschmacksauslösender Substanzen. Sie besitzen sieben Transmembranhelices und bilden im inaktivierten Zustand einen Komplex mit heterotrimeren Guaninnukleotid-bindenden Proteinen (kurz: G-Proteinen) (Weis & Kobilka, 2018).

Letztendlich sind die Vorgänge in den Zellen als Reaktion auf die Signal- und Botenstoffe entscheidend für den Effekt. Verschiedene Zelltypen können daher unterschiedlich auf denselben Reiz reagieren. Die an der Zellmembran und im Zytosol stattfindende Transduktion über membranständige Rezeptoren bedingt die enzymatische Bildung

sekundärer Botenstoffe (*second messenger*). Typische second messenger sind bspw. cyclische Nucleotide, wie cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und Guanosinmonophosphat (cGMP), oder Inositoltriphosphat (IP₃). Im weiteren Verlauf der Transduktion werden durch die genannten messenger-Moleküle fortführende Reaktionen aktiviert, wie zum Beispiel die Aktivierung der Proteinkinasen A oder C (PKA/PKC), welche wiederum durch die Phosphorylierung von Proteinen des Zytosols die endgültige Signalantwort oder auch eine direkte Freisetzung intrazellulärer Ionenspeicher verursachen können. In diesem Schritt kann es außerdem zu einer physiologischen Signalamplifikation kommen, da jedes Kinase-Molekül mehrere nachgeschaltete Proteine phosphorylieren kann (Christen et al., 2016). Der Ausgang der Signalweiterleitung wird also bereits zu Beginn von der Art ihres membranständigen Rezeptors und seiner Bindungspartner beeinflusst. Dazu gehören auf intrazellulärer Seite der GPCRs insbesondere G-Proteine.

1.2 GPCRs und heterotrimere G-Proteine

Die an der Zelloberfläche befindlichen, heptahelikalen GPCRs leiten bei Ligandenbindung das Signal an G-Proteine auf der intrazellulären Seite der Membran weiter. Hierbei trägt der N-Terminus des GPCRs extrazellulär zur Bildung der Ligandenbindungsdomäne bei, während der intrazelluläre C-Terminus Auswirkung auf die Bindungsaffinität zum G-Protein hat (Gudermann et al., 1997). Diese heterotrimeren, GTP-bindenden Proteine bestehen aus drei Untereinheiten, wobei β und γ als eine funktionelle Einheit betrachtet werden können ($G\beta\gamma$), da sie unter physiologischen Bedingungen stets verbunden auftreten, während α von diesen dissoziieren kann. Im inaktivierten Zustand bindet das Protein an der α -Untereinheit mit hoher Affinität GDP und hat direkten Kontakt zu seinem Rezeptor. Bei dessen Aktivierung über einen Liganden oder einen Lichtreiz kommt es zum Austausch von GDP mit GTP und die Untereinheiten dissoziieren sowohl vom Rezeptor als auch $G\alpha$ von $G\beta\gamma$ (Hepler & Gilman, 1992). Dabei fördert die Bindung eines Agonisten mit dem Rezeptor nicht nur dessen Bindung an ein G-Protein, sondern die Affinität des Agonisten für den Rezeptor wird ebenso durch das G-Protein erhöht. GPCRs dürfen dabei nicht als simple An-/Ausschalter verstanden werden. Ein großer Teil besitzt vielmehr ein Grundniveau an GTP-Austausch-Aktivität, welche durch Agonisten verstärkt bzw. durch inverse

Agonisten gesenkt wird. Dieses Grundniveau wird außerdem durch Signalproteine beeinflusst. In deren Gruppe bewirken GTP-Austauschfaktoren (*guanosine triphosphate exchange factor*, GEF) den Austausch von GDP mit GTP, während er durch GTPase-aktivierende Proteine (*GTPase-activating proteins*, GAP) gehemmt wird (Weis & Kobilka, 2018).

Die beiden bei Aktivierung intrazellulär freigesetzten funktionellen Einheiten, $G\alpha$ -GTP und $G\beta\gamma$, können unabhängig voneinander verschiedene Effektoren modulieren und im Verlauf weiterführende Signalkaskaden aktivieren. Der kanonische Signalweg führt dabei von der Ligandenbindung, über den Nukleotidaustausch zu GTP- $G\alpha$, über dessen Freisetzung und die des $G\beta\gamma$ -Dimers zur Aktivierung und/oder Hemmung von Ionenkanälen und weiteren Enzyme wie zum Beispiel der Adenylylcyclase (siehe Abb. 1). Mit seiner intrinsischen GTPase-Aktivität bestimmt unter anderem die $G\alpha$ -Untereinheit das Ende der Signalweiterleitung. Durch die Hydrolyse des GTPs folgt die erneute Assoziation des gesamten Heterotrimeres an den Rezeptor.

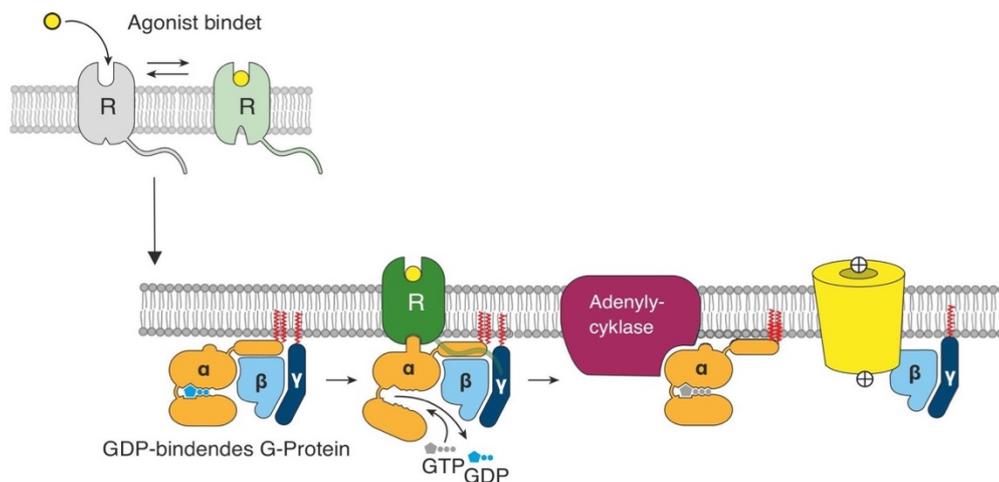


Abbildung 1: G-Protein gekoppelte Signaltransduktion. Der Austausch von GDP gegen GTP in der G-Protein- α -Untereinheit wird durch die Bindung eines Agonisten mit dem GPCR (R) ausgelöst. Dies führt zur Dissoziation des Heterotrimeres und Interaktion mit beispielhaft nachgeschalteten Effektoren wie der $G\alpha_i$ -Hemmung der Adenylylcyclase und der $G\beta\gamma$ -Aktivierung von Ionenkanälen (modifiziert und abgeleitet von Weis & Kobilka, 2018).

Weitgehend unerforscht ist in der Immunologie bisher die Existenz nicht-kanonischer G-Protein-Signalwege, die andere Proteine zur Aktivierung oder Modulation der Aktivität heterotrimerer G-Protein-Untereinheiten nutzen, wie bspw. Ric-8-Proteine und AGS3. Diese nicht-kanonischen Signalwege spielen soweit bekannt eine wichtige Rolle bei der asymmetrischen Zellteilung, der Ausrichtung der mitotischen Spindel, der Zytokinese

und der Zellproliferation. Außerdem scheinen sie sich mit GPCR-initiierten Signalwegen zu kreuzen (Boullaran & Kehrl, 2014).

1.2.1 $G\alpha$ -Untereinheiten

Zwar war schon früh bekannt, dass die $G\alpha_i$ -Isoformen 85-95 % ihrer Aminosäuresequenz teilen und dennoch sind ihre spezifischen Unterschiede bis heute nur teilweise erforscht (Simon et al., 1991). Jede der Untereinheiten, aus denen ein heterotrimeres G-Protein besteht, wird von einer Familie strukturell homologer Gene kodiert. Es sind 16 $G\alpha$ -, 5 $G\beta$ - und 11 $G\gamma$ -Gene bekannt, was die theoretische Möglichkeit von fast 1000 verschiedenen Heterotrimeren eröffnet. Die $G\alpha$ -Untereinheiten bilden mit einer Länge von 350 - 390 Aminosäuren die längsten der drei Untereinheiten (Birnbaumer, 2010). Benannt werden G-Proteine stets nach ihrer $G\alpha$ -Untereinheit. Diese werden in vier Subfamilien eingeteilt: G_s , G_q , $G_{12/13}$ und $G_{i/o}$, wobei die vorliegende Arbeit nur letztere Familie und auch davon lediglich einen Teil behandelt.

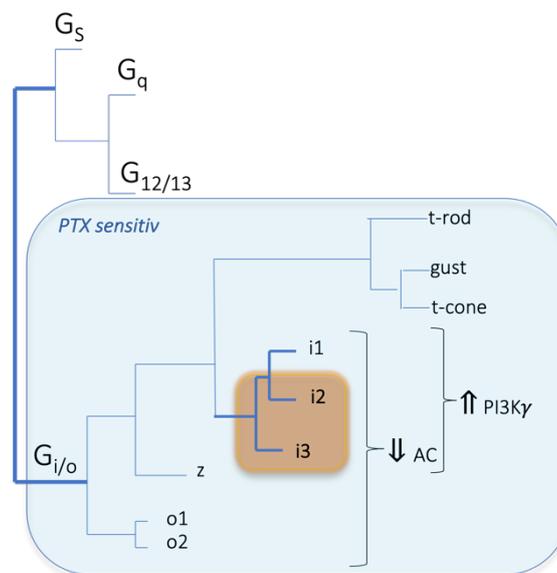


Abbildung 2: **Phylogenetischer Stammbaum der G-Protein- α -Untereinheiten.** Es sind strukturelle Unterteilungen, die funktionelle Korrelate haben, gezeigt (modifiziert nach Birnbaumer, 2010).

Die Familie der $G_{i/o}$ -Proteine bildet die größte der G-Proteingruppen und beinhaltet neben weiteren Subtypen die Proteine $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$, welche die Gemeinsamkeit besitzen während ihres Signalwegs die Adenylylcyclase (AC) hemmen und Phosphoinositid-3-Kinasen (spez. $PI3K\gamma$) aktivieren zu können. Den Subtypen der $G_{i/o}$ -Protein-Unterfamilie

ist die Sensitivität für Pertussistoxin (PTX) gemein. Dessen S1-Untereinheit ADP-ribosyliert den C-Terminus der $G\alpha$ -Untereinheit und verhindert damit den GDP zu GTP Austausch. Als Konsequenz kann die inaktive, mit GDP gebundene $G\alpha$ -Untereinheit die Adenylycyclase nicht hemmen und es kommt zu einer intrazellulären Anhäufung von cAMP (Hepler & Gilman, 1992).

Diese Arbeit versucht zu neuen Erkenntnissen über die Funktionen von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ mit besonderem Bezug zu ihren Aufgaben für die durch Botenstoffe induzierte Zellwanderung (Chemotaxis) beizutragen. Einfachheitshalber werden diese Isoformen im Folgenden als G_{i2} und G_{i3} bezeichnet.

1.3 Immunantwort und Neutrophile Granulozyten

Um sich vor Pathogenen und entarteten oder abgestorbenen Zellen zu schützen, generiert der Körper innerhalb von Stunden bis Tagen eine unspezifische Immunantwort. Die Immunzellen, welche dabei zum Einsatz kommen, sind Teil des angeborenen Immunsystems. Sie ermöglichen eine sofortige Reaktion auf körperfremde Materialien und werden zeitlebens nachgebildet. Das unspezifische Immunsystem vermag jedoch nicht, wie das spezifische, erworbene Immunsystem, bestimmte Pathogene (wieder) zu erkennen und spezifisch durch Klonierung spezieller Zellen zu bekämpfen. Da es eine gewisse Zeit dauert bis eine spezifische Immunantwort stattfinden kann, sind die Zellen des unspezifischen Immunsystems in den ersten Stunden bis Tagen nach dem Eindringen von Pathogenen entscheidend. Zu diesen gehören vor allem neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten und Mastzellen, sowie Monozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen. Neutrophile Granulozyten, kurz Neutrophile, bilden beim Menschen mit 50-65% den größten Anteil aller Leukozyten.

Sie entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark (Myelopoese). Während der Myelopoese durchlaufen sie mehrere morphologische Stadien, bis sie nach mehr als 10 Tagen ins Blut freigesetzt werden. Ein erwachsener Mensch produziert pro Tag $1 - 2 \times 10^{11}$ Neutrophile (Borregaard, 2010). Diese Zahl kann sich bei bestehenden Entzündungen schnell bis um das Zehnfache steigern (Ley et al., 2018).

Über 50% der Granulozyten befinden sich im interstitiellen Raum. Nur etwas weniger als 20% liegt intravasal vor, wovon die Hälfte bereits am Endothel haftend auf Signale zur Emigration wartet. Die restlichen 30% haben das Knochenmark noch nicht verlassen

(Hoth & Wischmeyer, 2021). Abhängig von ihrem Aufenthaltsort weisen Neutrophile verschiedenen lange Lebenszeiten auf. Besonders in entzündetem Gewebe beträgt ihre Lebensdauer mehr als 24 Stunden, während sie im Blut dagegen nur halb so lange zu sein scheint (Summers et al., 2010). Diese Zahlen beziehen sich speziell auf den Menschen. Murine PMNs (*polymorphonuclear neutrophil*), die Hauptbestandteil dieser Arbeit sind, weisen teils andere Eigenschaften und Verteilungen auf. So sind nur 5-25% der Leukozyten murinen Blutes neutrophile Granulozyten. Während die Mehrheit humaner Granulozyten im Knochenmark noch funktionell unreif ist, bevor sie in die Blutbahn übertritt, ist ein Großteil (bis zu 60%) der murinen Neutrophilen im Mark bereits ausreichend kompetent. Sie besitzen jedoch kürzere Lebenszeiten als humane Neutrophile und insbesondere murine PMNs des Blutes lassen sich mit einer Lebenszeit von 6 h schlecht in Zellkultur halten. Murine Neutrophile des Marks scheinen dagegen doppelt so lang lebensfähig zu sein, nicht vergleichbar mit humanen PMNs aus dem Blut, welche bis zu 24 h in Zellkultur lebensfähig bleiben (Boxio et al., 2004).

Um aus der Blutbahn zum Ort der Entzündung zu gelangen, bedarf es eines Signals des Endothels. Ins Gewebe eingedrungene Pathogene produzieren unter anderem Lipopolysaccharide und fMLP (Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin) und aktivieren ortsständige Makrophagen, welche in der Lage sind Signalmoleküle, wie $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ oder $IL-17$, zu produzieren. Diese stimulieren Endothelzellen Selektine (P-, E-Selektin) und Integrine an ihrer luminalen Oberfläche zu exprimieren, welche an Selektine neutrophiler Mikrovilli (P-Selektin-Ligand1, L-Selektin) binden. Dieser erste Kontakt zwischen Endothelzellen und Neutrophilen bringt Letztere dazu ihre Bewegung zu verlangsamen und auf dem Endothel zu ‚rollen‘ (*Rolling*). Zur festen Adhäsion kommt es, wenn sich der beschriebene Kontakt über Integrine festigt, indem die Neutrophilen ein Lamellipodium ausbilden, einen Aktinvorsprung mit einer hohen Dichte an Chemokin- und Phagozytoserezeptoren (Borregaard, 2010). Neuere Ergebnisse zeigen, dass Neutrophile Schlingen bzw. Seile, sog. *tethers*, bilden, welche sie zusätzlich an der Gefäßwand adhären und ihre Bewegung verlangsamen lassen (Marki et al., 2018). Die Transmigration kann sowohl para- als auch transzellulär stattfinden, wobei nur 20% der Neutrophilen den Weg durch die Endothelzelle selbst zu nehmen scheinen. Als entscheidend für die Art der endothelialen Transmigration wird das Vorkommen von Macrophage-1 Antigen (Mac-1) angenommen (Phillipson et al., 2008). Unabhängig

davon durchbrechen die Granulozyten im Verlauf der Migration die Basalmembran, indem sie deren Kollagen und Laminin mithilfe von Proteasen auflösen. Die Adhäsion und Transmigration geschieht aufgrund des geringen Gefäßdurchmessers vor allem in den postkapillären Venolen, da dort einerseits die Wahrscheinlichkeit eines Kontaktes von Neutrophilen mit Endothelzellen höher ist und andererseits Scherkräfte geringer wirken.

An den Entzündungsort im Gewebe gelangen Neutrophile über Chemotaxis. All ihre Chemokin-affinen Rezeptoren sind GPCRs, von welchen CXCR1 (kurz für CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 1) im Menschen und CXCR2 in der Maus in der Lage sind, die meisten Chemokine zu binden. Inzwischen konnte festgestellt werden, dass die Bindungen verschiedener Chemokine an die Rezeptoren die daraus resultierende Funktion bestimmen kann. Beispielsweise reagiert CXCR2 sowohl über G_{i2} als auch über G_{i3} . Der Signalweg über G_{i2} fördert dabei spezifisch die Aktivierung von $\beta 2$ -Integrin und das Festhalten von rollenden Neutrophilen an der Gefäßwand. Die Kopplung über G_{i3} ist für die chemotaktische Migration von Neutrophilen bedeutsam, nicht aber für die Adhäsion an der Gefäßlamina (Lämmermann et al., 2013; Sadik et al., 2011).

Im Gewebe angekommen generieren Neutrophile etliche Chemokine, um weitere Immunzellen anzulocken. Dass dieser Vorgang der Rekrutierung von funktionierenden Neutrophilen zur Bekämpfung von mikrobiellen Infektionen problemlos funktioniert, ist genauso wichtig wie die Kontrolle der Migration der Neutrophilen, um unnötige, durch Neutrophile verursachte Gewebeschädigungen zu verhindern. Dies wird durch eine negative Rückkopplung in mehreren Stufen gesteuert. Eine besondere Bedeutung kommt dabei Proteinen zu, welche Tyrosin-basierte, inhibitorische Sequenzmotive (ITIMs) besitzen, die wiederum durch die Rekrutierung von Phosphotyrosinphosphatasen durch Phosphotyrosin aktivierte Immunorezeptoren deaktivieren (Daëron et al., 2008). Außerdem wesentlich für die Regulierung der Bildung und damit Rekrutierung neuer Granulozyten ist die Ausschüttung des Zytokins G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*), welches im Fall der negativen Rückkopplung herunterreguliert wird (Croker et al., 2004).

Um am Zielort schnell und präzise auf Infektionen reagieren zu können, sind Neutrophile auf antimikrobielle Moleküle angewiesen, die in einer Vielzahl als intrazelluläre Granula gespeichert sind. Die darin enthaltenen Proteine regulieren Adhäsion, Transmigration,

Phagozytose und die Bildung sogenannter NETs (*neutrophil extracellular traps*). Diese sekretorischen Proteine gehören zu den giftigsten, leicht freisetzbaren Faktoren, die der menschliche Körper produziert. So kann die neutrophile Degranulation, obwohl sie für die Kontrolle von Infektionen unabdingbar ist, proinflammatorische Reaktionen auslösen (Ley et al., 2018). Daher findet nur bedingt antimikrobielle Exozytose statt. Vielmehr spielt sich die Infektionsbekämpfung intrazellulär ab, indem Granula und sekretorische Vesikel mit Phagosomen fusionieren. Die Aufnahme von Pathogenen und Zellabfall ins Innere der Neutrophilen geschieht aktiv und rezeptorvermittelt. Bereits durch Immunglobuline oder Faktoren des Komplementsystems opsonierte Partikel werden hauptsächlich durch Fc-Rezeptoren (besonders Fc γ RIIA (CD32) und Fc γ RIIIb (CD16)) und eine Untergruppe von β 2-Integrinen erkannt und gebunden (Lee et al., 2003). Die Liste der Phagozytoserezeptoren wächst stetig und beinhaltet außerdem Moleküle, die nicht-opsonierte Partikel über bspw. Integrine und Lektine erkennen können. Alle genannten möglichen Bindungen an Pathogene lösen dennoch als gemeinsame Folge die Polymerisation der lokalen Aktinfilamente aus, die essenziell für die Ausdehnung der Zellmembran und Bildung von Pseudopodien um die Mikroorganismen herum ist (DeLeo & Allen, 2020). Einmal aufgenommen, fusioniert das Phagosom mit den unterschiedlichen Granula des Neutrophilen, um schlussendlich Pathogene und Zellabfall abzubauen.

Die Granula lassen sich nach ihren Inhalten in drei Gruppen unterteilen. Zur den primären oder auch azurophil genannten Granula gehören sowohl Myeloperoxidasen (MPO), Lysozym, Elastasen als auch α -Defensine. Diese Gruppe stellt den Hauptbestandteil der molekularen Waffen der Neutrophilen und ermöglicht die Phagozytose von Erregern. Die sekundäre oder auch spezifische Gruppe der Granula zeichnet sich vor allem durch das Beinhalt von Lactoferrin aus, welches den Erregern das für ihr Wachstum essenzielle Eisen entzieht. Sie enthalten ebenfalls Lysozym. Die tertiären oder auch Gelatinase-Granula enthalten die kleinsten Bestandteile und besitzen die geringste antimikrobielle Wirkung. Sie dienen insbesondere als Speicherort von Metalloproteasen wie Gelatinasen und Leukolysin. Ihre Tendenz zur Fusion mit der Plasmamembran und dem Phagosom ist unter den Granulagruppen die größte. Diese Tendenz steigt mit dem Zeitpunkt der Granulabildung während der Reifung.

Neben diesen drei Gruppen besitzen Neutrophile eine Vielzahl weiterer sekretorischer Proteine, die jedoch nicht dem Golgiapparat entstammen. Diese sekretorischen Vesikel beinhalten neben Komplementfaktoren Plasmaproteine, Phosphatasen und einige Oberflächenproteine. Außerdem besitzen Neutrophile neben den antimikrobiellen Proteinen der Granula NADPH (reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat), welches durch die Reduktion von molekularem Sauerstoff reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produziert. Die entstehenden Superoxide leiten nachfolgende, zellschädigende Signalkaskaden ein (Amulic et al., 2012).

Ein weiterer wichtiger und charakteristischer Mechanismus der mikrobiellen Abwehr durch Neutrophile ist die Bildung von NETs. NETs binden, vermutlich mithilfe elektrostatischer Kräfte, Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten und verhindern so deren Ausbreitung und Besiedlung entfernter Organe. Bevor NETs in den extrazellulären Raum ausgestoßen werden, ist die Dekondensierung des Chromatins und anschließende Ausstattung dessen mit Proteinen des Zytoplasmas und der Granula nötig. Häufig geht dieser Prozess im Rahmen der NETosis mit dem Zelltod einher, auch wenn dieser anscheinend nicht die Konsequenz sein muss. Es konnte festgestellt werden, dass trotz der Ausstoßung des Chromatins und Zellkerns Neutrophile weiterhin lebensfähig bleiben (Yipp et al., 2012). Die entscheidenden Signalwege hinsichtlich der Entscheidung und Einleitung zur Phagozytose oder NETosis sind wenig bekannt. Die Größe des Pathogens scheint jedoch, gerade wenn dieses zur Phagozytose zu groß ist, eine tragende Rolle zu spielen (Branzk et al., 2014). NETs können durch DNAsen abgebaut werden, wie sie bspw. in Streptokokken des Typ A vorkommen, wodurch diese sich trotz neutrophiler Abwehrmechanismen im Organismus ausbreiten können.

1.3.1 G-Proteine in Neutrophilen

Die Signalkaskaden, die für die Migration von Neutrophilen zu Entzündungsorten verantwortlich sind, beruhen auf der Bindung von Liganden wie Chemokine an die GPCRs der Neutrophilenmembran. Diese Bindung löst über G-Protein- und β -Arrestin-gekoppelte Signalwege Konformationsänderungen aus. Daraus resultierende Änderungen des Zytoskeletts und der Membran sorgen für die gerichtete Zellmotilität, welche mit drei hauptsächlichen Ereignissen beschrieben werden kann. Dazu gehören die Ausdehnung von Pseudopodien, die Bildung intrazellulärer Polarität, welche die

Empfindlichkeit der Zelle an ihrem vorderen, dem Stimulus zugewandten Ende, im Vergleich zu ihrem hinteren Ende erhöht, und die Richtungserkennung, die die Zellreaktion mit dem externen Gradienten abgleicht. Um Pseudopodien am führenden Ende des Neutrophilen zu bilden und aufrecht zu erhalten, kommt es dort zu einer Ansammlung von Aktinfilamenten, während im seitlichen und hinteren Bereich besonders Aktin-Myosinfilamente zu finden sind (Van Haastert & Devreotes, 2004). Neben dem Einziehen des Uropods verhindern diese die Bildung weiterer Pseudopodien. Viele Signalwege der Chemotaxis, die durch die $G\beta\gamma$ -Untereinheit reguliert werden, wurden bislang beschrieben. Dabei galt die $G\alpha$ -Untereinheit häufig als eine Art Timer, welcher über die Reassoziierung mit GDP die Dauer der von der $G\beta\gamma$ -Untereinheit ausgehenden Signalweiterleitung bestimmt (Kamp et al., 2016). Die Dissoziation des Heterotrimers führt innerhalb von Sekunden bis Minuten zur Aktivierung der kleinen GTPasen Ras, Rho, Rac, Cdc42 und Rap, zur Zunahme oder Abnahme wichtiger *second messenger* wie Phosphatidylinositoltriphosphat (PIP3), Inositoltriphosphat (IP3), Arachidonsäure und cAMP; und zur Stimulierung verschiedener Kinasen, wie Proteinkinase A und C. Viele dieser Genannten befinden sich während der Migration intrazellulär in asymmetrischer Verteilung. Beispielsweise sammelt sich die Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3K), welche PIP2 zu PIP3 phosphoryliert, durch die Einwirkung eines Chemokins an der Plasmamembran des führenden Endes der Zelle, obwohl sie unstimuliert ubiquitär im Zytoplasma vorkommt. Somit bedingt sie das vermehrte Vorkommen des Phospholipids PIP3 am vorderen Ende migrierender Zellen, wo es weitere Downstream-Effekte auslöst. Dabei ist die Rekrutierung der PI3K γ -Untereinheit insbesondere abhängig von der Interaktion mit dem regulierenden Polypeptid p101 und wird außerdem durch das Vorkommen der $G\beta\gamma$ -Untereinheit (gebunden an $G\alpha$) und Ras reguliert, welches die Aktivität der PI3K vermutlich auf einen recht kleinen, spezifischen Bereich einschränkt (Franca-Koh et al., 2010).

Generell scheint die Rezeptorbesetzung der GPCRs und Aktivierung der heterotrimeren G-Proteine proportional zur Konzentration des Gradienten zu verlaufen, während die Aktivität kleiner G-Proteine am vorderen Ende der Zelle wesentlich höhere Level aufweist. Dies lässt darauf schließen, dass die Amplifikation der Signalkaskade und die Asymmetrie in der intrazellulären Verteilung zwischen trimerer und monomerer G-Protein-Signalübertragung entsteht (Liu et al., 2018).

In den letzten Jahren ist die Rolle von $G\alpha$ in der direkten Signalweiterleitung deutlicher geworden, da einige neue, $G\alpha$ -spezifische Effektorproteine während der Chemotaxis identifiziert werden konnten. Beispielsweise konnte Elmo1/Dock180 als ein wichtiger Downstream-Effektor von G_{i2} beschrieben werden (Li et al., 2013); genauso wie Homer3, welches sich als essenziell für die Polarität und Bildung des Aktinskeletts in Neutrophilen herausgestellt hat (Wu et al., 2015). Auch nicht-kanonische Signalwege über $G\beta\gamma$ -freies $G\alpha_i$ -GDP konnten identifiziert werden, wie beispielsweise im Fall des Effektorproteins mInsc, welches über LGN/AGS3 an freies $G\alpha_i$ -GDP bindet und im Downstream-Signalweg Auswirkungen auf die Direktionalität der Migration hat (Kamakura et al., 2013). Hinzukommend scheinen den strukturell verschiedenen $G\alpha$ -Untereinheiten spezifische Bereiche der Migration während der Immunantwort zuzukommen. Mit CXCL2 stimulierte, G_{i2} defiziente, murine Neutrophile weisen eine geringere Adhäsion am Endothel auf, wenn auch dadurch keine reduzierte Transmigration; ganz im Gegenteil zu G_{i3} defizienten Neutrophilen. G_{i3} lässt sich als verantwortlich für eine funktionierende Transmigration darstellen, wobei dieser Effekt auf seine Funktion für die Direktionalität der Chemotaxis und Migration ins und im Gewebe zurückzuführen sein kann (Kuwano et al., 2016).

All diese Bausteine liefern kleine Einblicke in die Komplexität und Vielfältigkeit der kanonischen und nicht-kanonischen Signalwege der Chemotaxis und lassen nur Vermutungen darüber entstehen, wie viele weitere Effektoren und Reaktionspartner es noch zu identifizieren und untersuchen gilt.

1.4 Ischämie - Reperfusionsschaden / *Ischemia-Reperfusion Injury* (IRI)

Reperfusionsschäden entstehen als Folge einer Minderdurchblutung (Ischämie) von Gewebe. Dabei kann es sich um Bereiche von Organen oder Areale des Körpers wie gesamte Extremitäten handeln, deren Blutzufuhr durch bspw. Arteriosklerose, Thrombosen oder Verletzungen spontan abgeschnitten wird. Durch die mit der Ischämie einhergehende Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr entsteht in kurzer Zeit ein beachtlicher Gewebsschaden. Paradoxerweise kann eine spontan oder operativ wiederhergestellte Reperfusion der betroffenen Gefäße diesen Schaden weder lindern noch aufhalten, sondern, ganz im Gegenteil, verstärkt ihn vielmehr. Diese zusätzliche

Schädigung ist im Besonderen bei myokardialen und zerebralen Ischämien von großer Bedeutung (Kalogeris et al., 2012).

Auf zellulärer Ebene sorgt die Ischämie bzw. der Sauerstoffmangel für das Überwiegen der anaeroben Stoffwechselwege und einem damit einhergehenden Absinken des intrazellulären pH-Werts. Um diesen abzupuffern, werden Protonen verstärkt aus der Zelle gepumpt, wodurch sich im Gegenzug Natrium-Ionen anreichern, die wiederum $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher aktivieren (Sanada et al., 2011). Außerdem kommt es zu einem wesentlichen ATP-Mangel, welcher unter anderem durch die Inaktivierung von ATPasen einen zusätzlichen Anstieg des intrazellulären Calciums (Ca^{2+}) zur Folge hat. Die Aufnahme von Calciumionen ins endoplasmatische Retikulum (ER) ist dabei ebenfalls gehemmt (Kalogeris et al., 2012). Die Schwellung der betroffenen Zellen ist die Folge und kann in deren Zelltod enden. Die Veränderungen und damit das Ausmaß der Gewebeschädigung variieren jedoch mit dem Ausmaß der Unterbrechung der Blutzufuhr und der Dauer der Ischämie. Hinzu kommt nun zusätzlich die mit der Reperfusion einhergehende Schädigung. Die Pathogenese des Ischämie-Reperfusionsschadens (ischemia-reperfusion-injury, IRI) ist komplex und multifaktoriell. Sie verstärkt den intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg, indem durch den Abtransport der extrazellulären H^+ -Ionen der Protonengradient über die Zellmembran und damit die Funktion des Na^+/H^+ -Austauschers erhöht wird. Eine Anreicherung von Natriumionen zieht erneut den Austausch mit extrazellulären Calciumionen nach sich (Sanada et al., 2011).

Die Wiederherstellung der Sauerstoffzufuhr ermöglicht zwar die Wiederaufnahme der ATP-Produktion, jedoch hat sie ebenso die Produktion von ROS zur Folge, indem verschiedene Enzyme in der Lage sind molekularen Sauerstoff zu Superoxid (SO) und/oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu reduzieren. Anschließend werden ROS in den Intra- und/oder Extrazellularraum freigesetzt, welche in der Lage sind zahlreiche Biomoleküle zu oxidieren und Enzyme zu inaktivieren.

Gerade Superoxid ist für einen großen Teil der Schädigung während der Reperfusion verantwortlich. Dies wird bestätigt, da sich der Schaden durch die Behandlung mit Superoxid-Dismutase (SOD) reduzieren lässt. Besonders entscheidende Enzyme und Systeme bei der Produktion von ROS während der Reperfusion scheinen die Xanthinoxidase, die NADPH-Oxidase, die Stickstoffmonoxid-Synthase und die Atmungskette zu sein (Granger & Kvietys, 2015).

Da es sich beim IRI um eine sterile Entzündung handelt, kommt es zu ähnlichen Erscheinungen wie bei der Infektion mit Mikroorganismen (Granja, Köhler, Leiss et al., 2022). Beide zeichnen sich durch die Rekrutierung von Neutrophilen und anderen Leukozyten in das betroffene Gewebe aus. Insbesondere die Migration von PNCs (*platelet-neutrophil-complexes*) ist typisch für ischämische Gewebeschäden und ein grundlegender Mechanismus, der die Hämostase und Entzündungsprozesse miteinander verbindet. Die Komplexbildung führt zu einer gegenseitigen Aktivierung von Plättchen und Neutrophilen (Mauler et al., 2016).

In Folge der Ischämie kommt es zu einem leichten Anstieg der an der Gefäßwand adhärenen Leukozytenanzahl, die sich mit der Dauer der Ischämie vergrößert. Eine dramatische Steigerung dieser Zahl geschieht jedoch bereits in den ersten Minuten der Reperfusion. Im Speziellen kann eine Zunahme an rollenden und adhärenen Neutrophilen in den postkapillären Venolen mit anschließender Transmigration beobachtet werden (Gute et al., 1998). Die PNC bildenden Thrombozyten sorgen durch die Hochregulierung von Integrinen außerdem für eine effizientere Adhäsion der Neutrophilen an das Gefäßendothel und eine erhöhte Reaktionsfähigkeit auf Chemokine, womit sie für die Rekrutierung von Neutrophilen in entzündetes Gewebe erforderlich sind (Page & Pitchford, 2013).

Hinzukommend folgen adhärenente Neutrophile bereits im Gefäßlumen einem Chemokingradienten, der, ausgehend von verletzten und sterbenden Zellen, sein Signal über das Endothel aufrechterhält, wodurch sich Leukozyten bereits vor dem Signal zur Diapedese in der Nähe der Verletzung ansiedeln (McDonald et al., 2011). Während der Migration und im Parenchym angekommen, setzen Neutrophile nahe bei funktionierenden und geschädigten Parenchymzellen ihre zytotoxischen Granula frei. Es handelt sich insbesondere um ROS, MPO-generierte hypochlorige Säure, zahlreiche Zytokine, Chemokine, Proteasen und Elastasen (Rodrigues & Granger, 2010).

1.4.1 Die Rolle von G_{i2} und G_{i3} im IRI

Die Behandlung mit kardiovaskulären Therapeutika zielt häufig auf die Interaktion mit GPCRs ab, da diese besonders im Herzen die Mehrheit der Rezeptoren darstellen. Diese Medikamente kommen bislang vor allem zur Prävention von schweren Schäden wie myokardialen Infarkten zum Einsatz. Obwohl heute die Zellbiologie des IRI

weitestgehend bekannt ist, sind noch immer keine vielversprechenden Therapeutika vorhanden. Daher beschäftigt sich die Forschung weiterhin damit, die Grundlagen der Prozesse des Reperfusionssyndroms im Detail zu verstehen und darin Ansatzpunkte für die Medikamentenentwicklung zu erschließen.

Bisherige Studien konnten in verschiedenen Mausmodellen die Funktionen der G_{i2} - und G_{i3} -Untereinheiten beim IRI untersuchen. Sie ergaben, dass G_{i2} -defiziente Mäuse vergrößerte, myokardiale Infarkte entwickeln, während eine G_{i3} -Defizienz vor diesen schützt (Köhler et al., 2014). Um diese Ergebnisse zu spezifizieren, wurden gewebe-spezifische Mäuse untersucht. Diese Experimente zeigten, dass die Wirkung der Proteine von ihrem Zelltyp abhängig ist. So zeigen Mäuse, welche eine G_{i2} -Defizienz in ihren Blutplättchen (und Megakaryozyten) aufweisen ($Gnai2^{fl/fl}/PF4-Cre$), zwar eine erhöhte Blutungsneigung, aber im Gegensatz zu einem globalen Knock-out, reduzierte Reperfusionsschäden nach myokardialen Infarkten und geringere Schlaganfallschäden (Devanathan et al., 2015). Ein spezifisches Defizit von G_{i2} in Neutrophilen ($Gnai2^{fl/fl}/Lyz2-Cre$) sorgte in einer weiteren Versuchsreihe ebenso für eine Reduzierung des myokardialen Reperfusionsschadens (mIRI) und dem Vorkommen von PNCs im betroffenen Gewebe. Da allerdings keine globale Reduktion oder eine beeinträchtigte Bildung der PNC-Anzahl im Vergleich zum Wildtyp gefunden werden konnte, scheint eine verminderte Migration der PNCs verantwortlich zu sein (Köhler, Beichert, Killinger, Grothe et al., in revision). Dass G_{i2} -defiziente PMNs eine verminderte Transmigration durchs Endothel aufweisen, konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden (Wiege et al., 2013). Um herauszufinden, inwieweit die Migration bzw. Chemotaxis der PMNs von ihren $G\alpha_i$ -Untereinheiten abhängt, untersucht die vorliegende Arbeit diese mithilfe des *Life Cell Imaging*.

1.5 Bildanalyse mit Bildgebenden Verfahren

1.5.1 Life Cell Imaging

Die Möglichkeiten Vorgänge in und mit lebenden Zellen festzuhalten und zu analysieren werden mit der stetigen Etablierung des *Life Cell Imaging* kontinuierlich verbessert. Seit Ende des letzten Jahrhunderts werden Mikroskope sowohl mit Kameras ausgestattet als auch mit der nötigen Technik, um die für Zellen spezifischen Umgebungsbedingungen herzustellen. Die rasche Weiterentwicklung dieser Systeme ermöglicht es heute Zellen

über große Zeiträume am Leben zu erhalten, während bspw. ihre Strukturen, ihr Teilungsverhalten oder ihre Interaktionen mit anderen Zellarten bis ins kleinste Detail kontrastreich aufgenommen werden können (Landecker, 2009).

Die Art der Zellen, die zu beobachtenden Parameter, sowie das Experimentdesign entscheiden darüber, welche Art der Mikroskopietechnik und Bildgebung zum Einsatz kommt. Bei Nutzung von lichtmikroskopischen Verfahren gelten der Dauer und Art der Belichtung besonderes Augenmerk, da die meisten Zellen sensibel gegenüber Schädigung durch Licht reagieren. Insbesondere bei der Nutzung von Fluorophoren wird Licht geringerer Wellenlänge verwendet, welches zusätzlich freie Radikale erzeugt.

Ebenso wichtig ist ein konstantes Zellmilieu. Zahlreiche Techniken in oder um die Mikroskopie bieten daher die Möglichkeit genaue Kontrolle über Temperatur, Druck und CO₂ - Konzentration auszuüben. Damit einhergehend zu beachten ist die gewünschte Dauer der Aufnahme und Lebensfähigkeit der Probe (Stephens & Allan, 2003). Natürlich müssen außerdem weitere technische Daten, wie Schnelligkeit der Datenerfassung und -verarbeitung und die resultierende Qualität bedacht werden. Letztendlich erfüllt meist kein Mikroskop alle Voraussetzung, sondern es handelt sich um einen Kompromiss aus den genannten und weiteren Aspekten.

In der Zellbildgebung werden heute häufig konfokale Mikroskope angewandt, welche durch minimale, punktförmige Beleuchtung des Präparats und einer Lochblende vor dem Detektor kontrastreiche, hochauflösende Bilder produzieren. Meist kombiniert mit integralen Lasereinheiten (*Confocal Laser Scanning Microscope*, CLSM) sind sie in der Lage Fluoreszenzfarbstoffe und Proteine in einem benutzerdefinierten Bereich anzuregen, ohne das gesamte Präparat einer hochenergetischen Lichtquelle auszusetzen. Eine weitere oft und auch für diese Arbeit angewandte Mikroskopietechnik ist die des Weitfeld (WF)-Mikroskops. Diese sind weniger komplex als konfokale Systeme und bestehen in der Regel aus einer Weiß- und Anregungslichtquelle, einem Mikroskop und einer Kamera, die wahlweise an einen Computer angeschlossen werden kann. Sie belichten in inverser Konfiguration einen großen Bereich des Präparates von oben, um so den Aufbau des Objektivs unterhalb des Objektisches und damit näher an bspw. Zellen in Kultur zu ermöglichen (Wilson, 2017). Da es durch die Art der Aufnahme zur Verschlechterung der Bildqualität durch Hintergrundlicht und -fluoreszenz kommt, werden durch die Technik der Dekonvolution in der Datenverarbeitung die Unschärfen

und der Fokus aufgelöst und die Photonen ihrem ursprünglichem Ort zugeordnet (Sibarita, 2005).

Die einfachste Form der Bildgebung mithilfe eines WF-Mikroskops sind Hellfeldaufnahmen (HF, *bright field*), wie sie auch für die vorliegenden Analysen angefertigt wurden. Da sich biologische Objekte wie Zellen im einfachen Hellfeld annähernd durchsichtig und kontrastarm darstellen, wird das Phasenkontrastverfahren angewandt, welches mithilfe von Interferenzen verschiedenphasiger Lichtwellen nach Objektdurchdringung in der Lage ist, Kontraste verstärkt wiederzugeben. Weiterentwickelt zur *Quantitative Phase Microscopy* können mithilfe dazugehöriger Software noch kontrastreichere Bilder erzeugt werden (Selinummi et al., 2009).

Der für die Ergebnisse dieser Arbeit benutzte THUNDER Imager (Leica, Wetzlar, Germany) verfügte außerdem über die Leica-Technologie des Computational Clearings, welche in Echtzeit eine sehr effektive Rauschreduzierung vornimmt. Diese Methode ermöglicht die Abbildung von normalerweise nicht für Standard-Weitfeldsysteme geeignete Proben (Schumacher & Bertrand, 2019).

Gerade bei der Verfolgung von Zellmigration wird die Segmentierung der Zellen im HF als Vorverarbeitung vorgenommen, gefolgt von den eigentlichen Algorithmen zur Zellverfolgung. Auch wenn keine Fluoreszenzfarbstoffe zur Färbung genutzt werden, kann mittlerweile eine recht genaue Segmentierung der Zellen vor ihrem Hintergrund und sogar zwischen verschiedenen Zellarten anhand binärer Klassifizierungsmethoden, wie Entscheidungsbäumen (*decision trees*) oder neuronalen Netzwerken, erfolgen (Long et al., 2008).

1.5.2 Zellsegmentierung und Zellverfolgung (*Tracking*)

Dennoch ist bisher kein System, keine alleinige Software in der Lage, die Zellsegmentierung sowie die Verfolgung der Zellen und Analyse der Migration im HF nach benötigten Parametern vorzunehmen. Einzelne Programme bieten die Möglichkeit Teilschritte durchzuführen, indem bspw. auf lernende Netzwerke zurückgegriffen wird oder eigene Modelle zur Segmentierung trainiert werden, während weitere Software das eigentliche *Tracking* der Zellen erst nach der Segmentierung vornehmen kann. Es gibt erste Versuche die Bilddaten mithilfe künstlicher Intelligenz automatisiert segmentieren und analysieren zu lassen; zu nennen wäre hier beispielsweise FastTrackAI™

(MetaviLabs, Austin, Texas). Jedoch sind diese bisher wenig anwenderfreundlich, da in den Prozess in keiner Weise eingegriffen und resultierende Daten schlecht bearbeitet werden können. Bis diese Probleme behoben und die Prozesse flexibler gestaltet werden, ist es vermutlich nur eine Frage der Zeit.

Dennoch, trotz der schnell fortschreitenden technischen Entwicklung müssen aktuell die meisten Experimente zur Zellmigration mit recht hohem Zeitaufwand bearbeitet und analysiert werden. Meist findet eine selektive, manuelle Zellsegmentierung mit wissenschaftlichen Bildanalyseprogrammen statt, die die Vorbereitung für Software zum eigentlichen *Tracking* ist (Schindelin et al., 2012). Um diese manuelle Selektion zu vermeiden und größere Zellzahlen analysieren zu können, werden kleine neuronale Netzwerke trainiert. Diese damit erstellten Klassifizierer-Modelle können auf das gesamte Bildmaterial angewandt werden und automatisieren so den Prozess der Segmentierung. Die Erstellung eines hochwertigen Trainingsdatensatzes ist ein entscheidender und empfindlicher Teil des Prozesses, da sie sich auf die Spezifität und Leistung des Modells auswirkt (Jacquemet et al., 2020). Ist die Segmentierung erfolgreich, ist das folgende *Tracking* meist die leichtere Aufgabe, da Partikelverfolgung in einer Abfolge von Bildern heutzutage bei ausreichendem Kontrast problemlos möglich ist. Verschiedene Programme und *Plug-Ins* bieten neben der manuellen die Möglichkeit zur automatisierten Zellverfolgung mit einigen einstellbaren, spezifischen Parametern und anschließender Darstellung der *Tracks* als Koordinaten über die Zeit. Diese müssen anschließend statistisch analysiert und weiterverarbeitet werden.

1.6 Ziel dieser Arbeit

GPCRs bilden die größte Gruppe membranständiger Rezeptoren und sind für die Signaltransduktion essenziell. Ihre Signalweitergabe erfolgt intrazellulär über G-Proteine, welche sich anhand ihrer $G\alpha$ -Untereinheiten in zahlreiche Subtypen einteilen lassen. Einen großen Anteil haben die $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -Untereinheiten, welche ebenfalls die größte Gruppe in Immunzellen, insbesondere in neutrophilen Granulozyten, repräsentieren. Diese sind die im Körper am häufigsten vertretenen Immunzellen und schützen diesen vor der Ausbreitung von Erregern. Sie können jedoch auch entscheidend zur Entstehung von Krankheiten beitragen und sind relevant für die Entstehung des Reperfusionsschadens nach Ischämien (IRI). Vorangegangene Experimente zeigten, dass die zwei genannten Isoformen direkte Auswirkungen auf das Ausmaß des mIRI haben. Es wurden Mauslinien genutzt, die mithilfe des Cre-loxP-Systems einen Neutrophilen-spezifischen Knockout für $G\alpha_{i2}$ und/oder $G\alpha_{i3}$ aufweisen. Diese spezifische Deletion zeigte eine Reduktion des mIRI. Die veränderte Transmigration dieser Neutrophilen ergibt die Annahme, dass die vor Infarkt schützenden Effekte der $G_{i2/3}$ -defizienten Neutrophilen durch veränderte Chemotaxisreaktionen hervorgerufen werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, diese Vermutung zu untersuchen und den Beitrag von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ in Neutrophilen auf den IRI zu beleuchten, indem deren Migration in Chemotaxismodellen *in vitro* untersucht werden soll. Dazu verwendet werden Neutrophile aus *Gnai2-LysM-Cre* bzw. *Gnai3-LysM-Cre* Mauslinien, welche die Deletion der $G\alpha_{i2}$ - bzw. $G\alpha_{i3}$ -Untereinheit nur in Neutrophilen und Makrophagen aufweisen. Es soll die Chemotaxis der Neutrophilen von Tieren mit Knockout mit denen ihrer Wurfgeschwister ohne Knockout verglichen werden, um mögliche Veränderungen festzustellen.

Oben genannte Ergebnisse bzgl. der schützenden Wirkung durch G_{i2} -defiziente Neutrophile konnten mit einem $G_{i1/2}$ -spezifischen Antikörper reproduziert werden. Dessen Auswirkung auf das Migrationsverhalten von murinen und humanen Neutrophilen soll ebenfalls untersucht werden. Außerdem bietet sich durch diesen Antikörper die Möglichkeit die G_{i2} -abhängige Chemotaxis von humanen Neutrophilen zu analysieren.

Die Ergebnisse sollen zum besseren Verständnis der Signalwege der G_{i2} - und G_{i3} -Untereinheiten beitragen und dabei helfen, zukünftig Aufschluss über mögliche

kanonische und nicht-kanonische Signalkaskaden während der Zellmigration zu geben. Die neu gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich der Signalketten genannter G-Proteine, könnten dazu beitragen, neue Ansatzpunkte in der Medikamentenentwicklung zu generieren.

Zudem soll die vorliegende Arbeit eine automatisierte Analyse von Zellmigration *in vitro* anhand von *Live Cell Imaging* weiterentwickeln. Aktuell ist keine Software bekannt, welche in der Lage ist sowohl Zellsegmentierung als auch *-tracking* von Sequenzen im *brightfield* in nachvollziehbarer und bearbeitbarer Weise vorzunehmen. Es soll daher die hier angewandte Software für einzelne Teilanalysen getestet und etabliert werden, welche schlussendlich eine gute Handhabung der Analysen und der damit einhergehenden Datenmengen ermöglicht.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Acrylamid 30%	Carl Roth (Karlsruhe)
Acrylamid 40%	Carl Roth (Karlsruhe)
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
FCS <i>Fetal Calf Serum</i>	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
fMLP (Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe)
Isofluran	CP Pharma (Burgdorf)
Kollagen <i>Collagen I, High Concentration, Rat Tail, 100mg</i>	Corning Inc. (Corning, NY, USA)
Lämmli-Puffer <i>Roti Load 1</i>	Carl Roth (Karlsruhe)
Methanol	Honeywell International (Morristown, NJ, USA)
Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumbicarbonat <i>Gibco Sodium Bicarbonate 7,5%</i>	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Natriumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe)

PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Ponceau S	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Proteinkinase K	GeneON (Ludwigshafen)
Salzsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth (Karlsruhe)
TEMED (Tetramethylethylenediamine)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Tris (Tris-hydroxymethyl-aminomethan)	Carl Roth (Karlsruhe)
Trypanblau	SERVA (Heidelberg)
Tween 20	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Urea	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

2.2 Reagenzien, Kits und Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
μ -Slide Chemotaxis Chamber (<i>Collagen IV</i>)	Ibidi (Gräfelfing)
μ -Slide Chemotaxis Chamber (<i>IbiTreat</i>)	Ibidi (Gräfelfing)
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
<i>BlueStar Prestained</i> Protein Marker	Nippon Genetics (Düren)
Direct PCR	Viagen (Los Angeles, CA, USA)
ECL-Lösung <i>Weststar Supernova</i>	Cyanagen (Bologna, Italien)
Erylysepuffer	C-C-Pro (Oberdorla)

FACS <i>Falcon 5 mL Round Bottom Polystyrene Test Tube</i>	Corning Inc. (Corning, NY, USA)
MACS LS-Säulen	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
MACS Neutrophil Isolation Kit	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
Multiplex PCR Mastermix	Qiagen (Hilden)
Proteinstandard <i>Precision Plus</i>	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran	Merck Millipore (Burlington, MA, USA)
Strippinglösung <i>Re-Blot Plus mild</i>	Merck Millipore (Burlington, MA, USA)
TopTaq PCR Master Mix	Qiagen (Hilden)
Zentrifugenröhrchen <i>Cellstar 15 ml</i>	Greiner Bio-One (Frickenhausen)

2.3 Medien und Puffer

2.3.1 Zellkulturmedien und Zusätze

Bezeichnung	Bezugsquelle
2-Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Biocoll 1.077g/ml	Bio & Sell (Feucht/Nürnberg)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
EDTA	Carl Roth (Karlsruhe)
Keratinocyte base medium	Lifeline (San Diego, CA, USA)
MEM <i>Minimum Essential Medium Eagle</i>	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
RPMI 1640 Medium	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

2.3.2 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Anodenpuffer I	37,4 g Tris, 400 ml Methanol, 600 ml Aqua bidest
Anodenpuffer II	3,02 g Tris, 400 ml Methanol, 600 ml Aqua bidest
DNA-Lysepuffer	50 µg/ml Proteinase K in <i>DirectPCR</i>
Kathodenpuffer	3,02 g Tris, 3 g Glycin, 100 ml Methanol, 900 ml Aqua bidest
Laufpuffer	25 mM Tris, 200 mM Glycin, 1 % SDS, Aqua bidest
MACS-Puffer	0,5 % BSA, 2,5 mM EDTA, PBS
Proteinlysepuffer	21 mM Tris, 0,67 % SDS, 19 mg/ml 2-Mercaptoethanol, 0,4 mM PMSF, Aqua bidest
Sammelgel	1 ml Acrylamid (30 %), 9 ml Sammelgelpuffer (s.u.), 10 µl TEMED, 70 µl APS (125 mg/ml)
Sammelgelpuffer	125 mM Tris, 0,1 % SDS, Aqua bidest., pH 6,8 mit HCl einstellen
TBST-T	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20
Trenngel	9 ml Acrylamid (40 %), 5 ml Trenngelpuffer (s.u.), 14,4 g Urea, 14 ml Aqua bidest, 10 µl TEMED, 80 µl APS (125 mg/ml)
Trenngelpuffer	3 M Tris, 0,8 % SDS, Aqua bidest., pH 8,8 mit HCl einstellen

2.4 Antikörper und Antiseren

Die in der Tabelle 1 aufgeführten Antikörper wurden zu Chemotaxis-Analysen, FACS-Färbungen und als primäre und sekundäre Antikörper im Immunoblot verwendet.

Tabelle 1: verwendete Antikörper

Antikörper	Spezies	Verwendung	Quelle
Anti-CD11b-PerCP	Ratte	FACS	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
Anti-CD45-APC	Ratte	FACS	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)

Anti-G $\alpha_{i1/2}$	Kaninchen	Chemotaxisexperiment, Immunoblot	Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA)
Anti-G α_{i3}	Kaninchen	Immunoblot	7Bioscience GmbH (Neuenburg am Rhein)
Anti-Ly6G-PE	Ratte	FACS	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
Anti- β -Aktin	Kaninchen	Immunoblot	Abcam (Cambridge, UK)
HRP-linked anti- IgG	Kaninchen	Immunoblot	Cell Signaling Technology (Danver, MA, USA)
IgG-Isotyp	Kaninchen	Chemotaxisexperiment	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)

2.5 Primer

Gen	Bezeichnung	Sequenz
LysM-Cre	wt + ko	5' CTT GGG CTG CCA GAA TTT CTC 3'
LysM-Cre	wt	5' TTA CAG TCG GCC AGG CTG AC 3'
LysM-Cre	ko	5' CCC AGA AAT GCC AGA TTA CG 3'
<i>Gnai2</i>	4	5' GAT CAT CCA TGA AGA TGG CTA CTC AGA AG 3'
<i>Gnai2</i>	5	5' CAG GAT CATCCATGAAGATGGCTA C 3'
<i>Gnai2</i>	6	5' CCC CTC TCA CTC TTG ATT TCC TAC TGA CAC 3'
<i>Gnai2</i>	7	5' GCA CTC AAA CCG AGG ACT TAC AGA AC 3'
<i>Gnai3</i>	EX7-R	5' ATG CTG TCA AAC AAT TTC ATG 3'
<i>Gnai3</i>	Int-F	5' TAG CAG TTG TCA TGG CTA CC 3'

2.6 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Biosicherheitsschrank	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)

Blottingkammer <i>Semi-Dry Blotter MAXI</i>	Carl Roth (Karlsruhe)
Durchflusszytometer <i>FACS Canto II</i>	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
Elektrophoresekammer <i>Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell</i>	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Gießvorrichtung <i>Mini-Protean Handcast System</i>	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Heizblock <i>Thermomixer</i>	Eppendorf (Hamburg)
Hochgeschwindigkeits-Tischzentrifuge <i>Centrifuge 5810R</i>	Eppendorf (Hamburg)
Kamerasystem <i>Versadoc 4000 MP Imager</i>	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Kapillarelektrophorese-System <i>QIAxcel</i>	Qiagen (Hilden)
Leica Thunder <i>THUNDER Imager Live Cell & 3D Cell Culture & 3D Assay</i>	Leica Microsystems (Wetzlar)
MACS-Magnete <i>QuadroMACS</i>	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
Magnetrührer <i>IKAMAG RCT</i>	IKA-Werke (Staufen)
Mikroskop <i>PrimoVert</i>	ZEISS (Oberkochen)
Netzteil <i>PowerPac Basic</i>	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Neubauer Zählkammer	Hecht Assistent (Sondheim)
pH-Meter <i>MP220 pH-Meter</i>	Mettler Toledo (Giessen)
pH-Meter Sonde <i>InLab Semi-Micro</i>	Mettler Toledo (Giessen)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Plattformschüttler <i>Rotamax</i>	Heidolph Instruments (Kelheim)
Rollenmischer <i>RM 5</i>	Ingenieurbüro CAT (Ballrechten-Dottingen)
Thermocycler <i>C1000 Touch</i>	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Zentrifuge <i>Centrifuge 5417R</i>	Eppendorf (Hamburg)

2.7 Software

Bezeichnung	Entwickler/ Vertrieb
<i>Chemotaxis and Migration Tool 2.0</i>	Ibidi GmbH (Gräfelfing)
<i>FlowJo 7.6.1</i>	FlowJo, BD (Ashland, OR, USA)
<i>GraphPad Prism 9</i>	GraphPad Software (San Diego, CA, USA)
<i>ImageJ (Fiji)</i>	Open source (Schindelin et al., 2012)
<i>Image Lab</i>	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
<i>Imaris</i>	Oxford Instruments (Abingdon, UK)
<i>LAS X (Leica Application Suite X)</i>	Leica Microsystems (Wetzlar)
<i>Quantity One®</i>	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
<i>Trainable Weka Segmentation v3.2.35</i> (ImageJ-Plugin)	Open source (Arganda-Carreras et al., 2017)

2.8 Versuchstiere

Für die vorliegenden Experimente wurden Mäuse mit *Gnai2*- und/oder *Gnai3*-defizienten Granulozyten und Makrophagen verwendet. Die Mauslinien wurden durch die Verpaarung von heterozygoten *LysM-Cre^{+/-}* Tieren mit homozygoten *Gnai2^{fl/fl}* bzw. *Gnai3^{fl/fl}* Tieren gezüchtet. Für die gleichzeitige Defizienz beider Proteine wurden zunächst homozygote *Gnai2^{fl/fl}* und *Gnai3^{fl/fl}* Tiere miteinander gekreuzt, um die resultierenden *Gnai2/3^{fl/fl}* Tiere ebenfalls mit heterozygoten *LysM-Cre^{+/-}* Tieren zu verpaaren. Zur Kontrolle zu einem transgenen Tier wurde je ein nicht-transgenes Wurfgeschwister genutzt. *LysM-Cre^{+/-}* Tiere wurden von *The Jackson Laboratories* (Bar Harbor, ME, USA) auf einem C57BL/6N-Hintergrund erworben. Diese Tiere wurden erstmals 1999 mit einem effektiven Knockout eines Beispielsgenes in Granulozyten (100%) und Makrophagen (83-98%) gezüchtet (Clausen et al., 1999). In nicht-myeloiden Zellen konnte kein Knockout nachgewiesen werden.

Für Experimente, die mit Wildtypzellen durchgeführt wurden, wurden Tiere aus der Zucht des globalen *Gnai2*-Knockouts verwendet, die das Wildtyp-Allel aufwiesen.

2.8.1 Tierhaltung

Die verwendeten Tiere wurden in der Tierhaltung Pharmakologie/Toxikologie der Medizinischen Fakultät Tübingen gezüchtet und im spezifisch, pathogenfreien Bereich gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Futter, Wasser und artgerechten Anreizen. Der Tag-Nacht-Rhythmus wechselte alle 12 Stunden. Gezüchtet wurde mit 8 bis 10 Wochen alten Tieren. Die Nachkommen wurden anhand Ohrlochung markiert und die dabei anfallende Ohrstanze wurde für die Genotypisierung verwendet. Für die Versuche wurden Tiere jeden Alters verwendet, da keine altersabhängigen Unterschiede bezüglich der Neutrophilenbildung im Knochenmark bestehen.

2.8.2 Genehmigung

Alle Versuche wurden unter Berücksichtigung der EU-Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere durchgeführt. Die Tierversuche erfolgten im Rahmen der §4 Mitteilungen PH03/19M; PH02/20M.

2.8.3 Genotypisierung

Um zu überprüfen, dass die Experimente mit Neutrophilen aus Knockout- und Wildtypen durchgeführt wurden, wurde eine DNA-Probe mittels PCR analysiert. Dazu wurde die nach der Tötung entnommene Schwanzspitze mit *PCR direct* und Proteinkinase K lysiert, indem sie für 4 h bei 55 °C und anschließend nochmals 45 min bei 85 °C im Heizblock inkubiert wurde. Es wurde jeweils für die Tiere mit spezifischem LysMCre-Knockout und für Wildtypen ein Ansatz aus den jeweiligen Primern erstellt (siehe Tab. 1 und Abschnitt 2.5). Es wurden 24 µl des Mastermix mit je 1 µl Probe versetzt. Für die Tiere der LysM-Cre-Zucht konnte das Vorhandensein bzw. Fehlen des transgenen Allels gezeigt und somit überprüft werden, ob ein Experiment je ein transgenes Tier mit einem nicht transgenen Wurfgeschwister beinhaltete. Da für die Versuche mit Antikörpern nicht-defizitäre Tiere der Zucht des globalen *Gnai2*-Knockouts entnommen wurden, wurde bei diesen die DNA auf das Fehlen des Knockout Allels hin untersucht. So sollte gewährleistet werden, dass ihre Neutrophilen keine veränderten G₁₂-Proteine aufwiesen, also denen von Wildtypen entsprachen. Als Kontrolle dienten Proben bekannter, bereits bestimmter Genotypen. Die Proben wurden

im *Thermocycler* in den jeweiligen Programmzyklen (siehe Tab. 2) erhitzt und anschließend mithilfe des *QiAxcel* Kapillarelektrophorese-Systems analysiert.

Tabelle 2: PCR-Ansätze

Ansatz	Zusammensetzung
<i>LysM-Cre</i> ^{+/tg}	12,5 µl Multiplex PCR Mastermix, 0,5 µl Primer wt+ko (10 pM), 0,5 µl Primer wt (10 pM), 0,5 µl Primer ko (10 pM), 10 µl H ₂ O, 1 µl DNA-Lysat
Gα ₁₂ wt + ko	12,5 µl TopTaq PCR Mastermix, 0,5 µl Primer 4 (10 pM), 0,5 µl Primer 5 (10 pM), 0,5 µl Primer 6 (10 pM), 0,5 µl Primer 7 (10 pM), 9,5 µl H ₂ O, 1 µl DNA-Lysat

Tabelle 3: Thermocycler PCR-Protokolle

Ansatz	PCR-Protokoll
<i>LysM-Cre</i>	LyzCreMUL 34: 15 min bei 95 °C 34 × (30 s bei 94 °C, 90 s bei 64 °C, 1 min bei 72 °C) 10 min bei 72 °C
Gα ₁₂ wt + ko, Gα ₁₃ wt + ko	TopTaq 34: 3 min bei 94 °C 34 × (30 s bei 94 °C, 30 s bei 60 °C, 1 min bei 72 °C) 10 min bei 72 °C

2.9 Zellbiologische Methoden

2.9.1 Gewinnung und immunomagnetische Isolation von murinen Neutrophilen

Die Neutrophilen wurden mittels magnetischer Zellseparation aus murinem Knochenmark gewonnen (*Magnetic Activated Cell Sorting*, MACS). Diese Art der Zellsortierung beruht auf dem Prinzip der Kennzeichnung spezifischer Zellen mit Antikörpern, welche wiederum mit sogenannten ‚*MicroBeads*‘ versehen sind.

Diese nanogroßen Partikel mit hohem Magnetfeldgradienten sorgen für die Sortierung der Zelltypen im magnetischen Feld.

Zur Isolation der neutrophilen Granulozyten wurde Knochenmark aus Femur und Tibia der Mäuse verwendet. Die beiden Knochen wurden freipräpariert, Gewebe und Muskeln entfernt und die Epiphysen jeweils abgetrennt. Das Knochenmark wurde mit PBS (*Phosphate Buffered Saline*) ausgespült und für 7 min bei 500 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert. Die Zellen wurden in einer Verdünnung von 1:10 mit Trypanblau gezählt, erneut zentrifugiert (300 x g, 10 min, 4 °C) und der Überstand komplett abgesaugt. Das weitere Vorgehen richtete sich nach dem Protokoll der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, DE) zur Isolation von Neutrophilen mithilfe des ‚Neutrophil Isolation Kit‘ für Mäuse. Nach genanntem Protokoll wurde ein Puffer auf der Basis von PBS hergestellt, mit einem pH-Wert von 7,2, 0,5% BSA und einer EDTA-Konzentration von 2 mM (MACS-Puffer). Die Zellen wurden in entsprechender Puffermenge resuspendiert (200 µl per 5×10^7 Zellen), mit 50 µl per 5×10^7 Zellen ‚*Neutrophil Biotin-Antibody Cocktail*‘ versetzt und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Knochenmarkszellen mit 5-10 ml MACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (300 x g, 10 min, 4 °C). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen nun in der doppelten Menge MACS-Puffer resuspendiert, mit 100 µl per 5×10^7 Zellen ‚*Anti-Biotin MicroBeads*‘ versehen und erneut für 15 min gekühlt inkubiert. Anschließend wurden sie mit 5-10 ml Puffer gewaschen, zentrifugiert und in 500 µl Puffer resuspendiert. Zur eigentlichen Zellsortierung kommen mit magnetischen Partikeln gefüllte Säulen zum Einsatz, welche in dafür vorgesehenen Halterungen mit starkem Magnetfeldgradienten positioniert werden (Fa. Miltenyi Biotec). Im vorliegenden Fall wurden LS-Säulen verwendet, die zuvor mit Puffer gespült wurden. Die sich im Puffer befindenden Zellen wurden auf die Magnetsäulen gegeben und der Durchfluss aufgefangen, in dem sich nicht markierte Zellen, im vorliegenden Fall Neutrophile, befinden sollten. Es wurde dreimalig mit 3 ml MACS-Puffer nachgespült. Die Zellen wurden im Anschluss mit PBS gewaschen und abschließend in 1ml RPMI resuspendiert. Es wurde ein Aliquot entnommen, um die Zellzählung vorzunehmen, sowie eines, um die Reinheit der Zellen im Durchflusszytometer (FACS) zu überprüfen. In Wartezeiten wurden die Zellen bei

37 °C inkubiert und ebenfalls warm zum WSIC (Werner Siemens Imaging Center) für die bildgebenden Verfahren transportiert.

2.9.2 FACS-Färbung und Analyse

Um die Reinheit der Neutrophilen nach der Isolation zu bestimmen, wurde die Durchflusszytometrie mit spezifisch für die Oberflächenmoleküle von Neutrophilen geeigneten Antikörpern vorgenommen. Anti-CD11b-PerCP wurde 1:200, anti-CD45-APC, 1:400, und anti-Ly6G-PE, 1:200, in PBS verdünnt. Proben der Zellpopulationen wurden 10:1 mit der Antikörpermischung versetzt und zur Färbung mindestens 10 min im Dunklen auf Eis inkubiert. Die Durchflusszytometrie nutzt die Anregung der verschiedenen Färbungen durch Laser, welche daraufhin Licht bestimmter Wellenlänge emittieren. Über dessen Detektion durch das FACS kann Aussage über die Art der Zellen und die Reinheit der Population getroffen werden. Die Auswertung dieser Ergebnisse erfolgte mittels *FlowJo 7.6.1*.

2.9.3 Gewinnung von humanen Neutrophilen

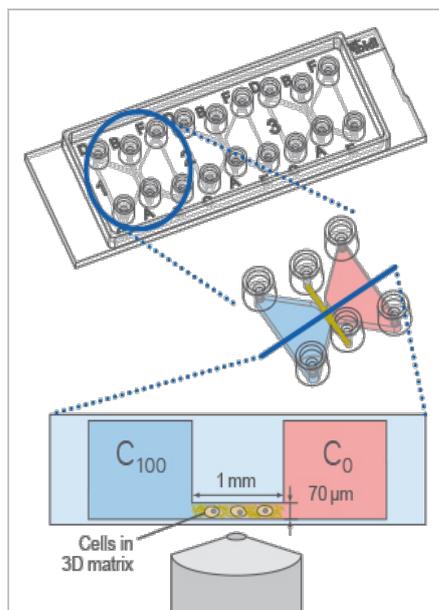
Die humanen neutrophilen Granulozyten wurden in Kooperation mit dem dermatologischen Institut der Uniklinik Tübingen (AG B. Schittek) gewonnen. Dazu wurde Vollblut mit derselben Menge Dextran (2% in 0,9%NaCl) in einem zuvor mit Dextran ausgewaschenen Falcon-Röhrchen gemischt und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. In dieser Zeit setzten sich Erythrozyten bodennah ab, während sich in einer oberen, klaren Phase Plasma und kernhaltige Zellen sammelten. Diese klare Phase wurde vorsichtig abpipettiert und über eine Biocoll Trennlösung (Dichte: 1,077 g/ml) gelegt. Das Verhältnis dieser zur klaren Phase betrug nach Anleitung 2:3. Anschließend wurde das Gefäß mit 1600 rpm für 30 min bei 20 °C ohne Bremse zentrifugiert. Dieser Vorgang trennt PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) von den restlichen Erythrozyten und mehrkernigen Leukozyten (*Polymorphnuclear Leukocytes*, PMNs), indem die mononukleären Zellen aufgrund der spezifischen Dichte der Trennlösung in dieser als milchige Schicht haften bleiben. Der Überstand konnte somit bis zum rötlichen Pellet, welches Erythrozyten und PMNs enthält, abgesaugt werden. Das Pellet wurde in 1 ml Erylysepuffer resuspendiert und auf 50 ml aufgefüllt, um es für 10 min bei Raumtemperatur zu inkubieren. Nach der Zentrifugierung bei 1600 rpm und 4°C für

7 min wurde der Überstand abdekantiert und das Pellet mit PBS gewaschen, bevor es in einem Keratinozytenmedium mit 1,7 mM CaCl₂ resuspendiert wurde.

2.10 Untersuchung der Zellmigration, Bildgebende Methoden

2.10.1 Chemotaxis Kammern

Um die Bedingungen für eine Form der Zellmigration zu schaffen, die mikroskopisch festgehalten werden kann, wurden speziell dafür geeignete Chemotaxis-Kammern (*μ-Slide chemotaxis*) der Firma Ibidi verwendet. Diese



(*Slide chemotaxis*) der Firma Ibidi verwendet. Diese werden in verschiedenen Ausführungen angeboten. Es handelt sich dabei im Wesentlichen um eine zentrale Kammer, in welche die zu untersuchenden Zellen eingebracht werden können, mit beidseits davon befindlichen Reservoirs. In diese kann das entsprechende Medium und ein *Chemoattractant* hinein pipettiert werden, um einen Gradienten zu erreichen (Abb.3).

Die ‚*μ-Slides*‘ (Ibidi) unterscheiden sich in ihren Ausführungen hinsichtlich der mittleren Kammer. In dieser können sowohl Zellen auf einer 2D-Oberfläche, als auch Zellen in einer zuvor hergestellten 3D-Kollagenmatrix beobachtet werden. Für letztere Option eignet sich vor allem die

Abbildung 3: *μ-Slide Chemotaxis Kammer*

(https://ibidi.com/img/cms/applications/chemotaxis/CH_assays_principle.jpg)

Ausführung mit einer von Ibidi hergestellten Beschichtung mit Gewebekulturmedium (*μ-Slide Chemotaxis ibiTreat*).

Die Nutzung des 3D-Kollagengels soll laut Hersteller zudem bessere Ergebnisse für nicht adhärente Zellen wie Neutrophile liefern. Es können pro Slide drei Chemotaxis-Versuche durchgeführt werden.

2.10.2 Herstellung einer Kollagenmatrix

Es wurde ein Kollagengel mit einer Dichte von 1,6 mg/ml auf der Basis von Rat-Tail-Collagen hergestellt. Für 1 ml Kollagengel wurden 50 μ l Bicarbonat (7,5 %) mit 100 μ l MEM und 320 μ l Rat-Tail-Collagen (10 mg/ml) versetzt und mit Wasser aufgefüllt. Gel

und Zelllösung wurden 1:1 (je 30 μ l) zu einer finalen Zellkonzentration von 3×10^6 Zellen / ml gemischt. Um eine frühzeitige Polymerisation des Gels zu vermeiden, wurde auf Eis gearbeitet.

2.10.3 Vorbereitung der Kammern mit murinen Neutrophilen

Aus mehreren Testläufen ergab sich für die Experimente mit murinen Zellen der Einsatz von μ -Slides (*ibiTreat*) mit beschriebenem, selbst hergestelltem Kollagengel. Die optimale Zellzahl in den Kammern beträgt laut Hersteller 3×10^6 Zellen / ml. Wie zuvor beschrieben wurde das Gel mit den Zellen hergestellt und in die mittleren Reservoirs der Chemotaxis-Kammern eingebracht. Eine genaue Anleitung zur Verwendung wird von Ibidi bereitgestellt (application note 17). Anschließend wurden die μ -Slides zur Polymerisation des Gels für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die beiden Reservoirs rechts und links der mittleren Kammer mit RPMI 1640 Medium befüllt und das Mikroskop entsprechend eingestellt. Der *Chemoattractant* wurde kurz vor Beginn der Bildgebung zum Medium im linken Reservoir hinzugegeben, sodass sich während der 30 min der Aufnahmen ein Gradient mit einer Endkonzentration von 10 μ M etablieren konnte. Als *Chemoattractant* wurde fMLP gewählt, da dies über $G\alpha_i$ -abhängige Signalwege operiert (Ye et al., 2009).

Da pro μ -Slide drei Experimente aufgenommen werden können, wurden in der Versuchsreihe mit anti- $G_{i1/2}$ Antikörper nebeneinander jeweils mit anti- $G_{i1/2}$ inkubierte Zellen, Zellen mit unspezifischem IgG und eine Kontrolle ohne jegliche Antikörper eingebracht. Die Antikörper wurden 1:100 in die Zellsuspension gegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Es wurden zwei dieser Slides vorbereitet und nach der Polymerisation Medium in die seitlichen Kammern gefüllt, jedoch nur auf einem Slide wurde der Chemokingradient hergestellt; Slides ohne *Chemoattractant* dienten als Kontrolle.

Der Versuchsaufbau der Experimente mit den LysM-Cre⁺ bzw. -Cre⁻ Neutrophilen war nur geringfügig anders. Hier wurden pro Slide die Zellen einer Maus in Kollagengel in zwei der drei Kammern mit Chemokingradient, neben einer Kammer mit Zellen in Gel ohne Chemokingradient zur Kontrolle untersucht. Auf einem zweiten Slide fand derselbe Versuchsaufbau des Wurfgeschwisters statt, sodass je eine Kontrollaufnahme und zwei Aufnahmen mit fMLP-Gradienten für jede Maus aufgenommen wurden.

2.10.4 Vorbereitung der Kammern mit humanen Neutrophilen

Der Ablauf des Experimentes zur humanen Messreihe verlief annähernd äquivalent zum Ablauf der murinen Versuche mit Antikörper. Jedoch ergaben sich die besseren Aufnahmen ohne eine Kollagenmatrix auf Kollagen IV-beschichteten μ -Slides (*Ibidi Collagen IV*). Die Zellen wurden dafür in ihrem Medium (*Keratinocyte based medium*, plus CaCl_2) auf eine Zellzahl von 3×10^6 Zellen / ml gebracht, in die mittleren Kammern pipettiert und ebenfalls 30 min zur Gas Equilibrierung und Anhaftung der Neutrophilen an den beschichteten Kammerboden inkubiert. Anschließend wurde analog zum murinen Versuchsaufbau verfahren. Allerdings wurde eine Chemokinkonzentration von $5 \mu\text{M}$ gewählt, da diese im humanen Versuch die beste Zellviabilität zeigte.

2.10.5 Bildgebung

Die Bildgebung fand mithilfe des Leica Thunder Mikroskops (*THUNDER Imager Live Cell & 3D Cell Culture & 3D Assay*, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) unter physiologischen Bedingungen statt. Es handelt sich dabei um ein inverses Epifluoreszenzmikroskop, mit welchem sowohl lichtmikroskopische als auch Fluoreszenzaufnahmen in 2D und 3D aufgenommen werden können. Der Aufbau des Mikroskops ermöglicht eine Inkubation bei 37°C und einer CO_2 -Konzentration von 5%. Eine Bildbetrachtung in Echtzeit und komplexere Einstellungen über die Grundeinstellungen des Mikroskops hinaus sind mit der *LAS X Life Science Software* (Leica Microsystems) möglich.

Die μ -Slides wurden mittels eines passenden Einsatzes (Ibidi) im Objektisch befestigt und mit einem 20x Objektiv (NA0.4) aufgenommen (siehe Abb.4). Die Automatisierung des Prozesses der Bildgebung wurde dabei über die Software gesteuert, sodass die gewünschten Bereiche der Chemotaxiskammern alle 60 Sekunden mit ‚*Adaptiv Fokus Control*‘ (AFC) aufgenommen wurden. So entstanden pro Well jede Minute 6 Bilder, welche eine Überlappung von 10% aufwiesen und im Folgenden mithilfe von *ImageJ* zusammengesetzt wurden. Die daraus entstandenen Videosequenzen sind die Grundlage für die Analyse der Zellmigration.

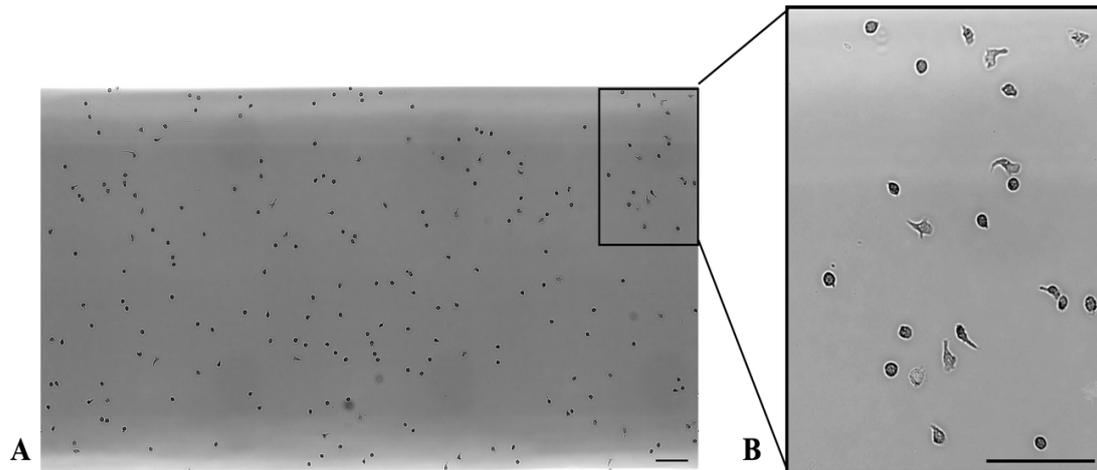


Abbildung 4: *A* Brightfield-Aufnahme eines μ -Slides mit humanen Neutrophilen, *B* Brightfield-Aufnahme von migrierenden Neutrophilen (Zoom aus *A*). Scale bar, 100 μ m.

2.10.6 Zellsegmentierung

Die Segmentierung der Zellen fand mithilfe des *ImageJ* Plug-ins ‚*Trainable Weka Segmentation*‘ statt (Arganda-Carreras et al., 2017). Dieses ermöglicht das Kennzeichnen und die Unterteilung in zwei verschiedene Kategorien. Zunächst müssen der Software Beispiele für Hintergrund und Zellen markiert werden, worauf diese den Algorithmus trainiert. Die Software kann anschließend alle zu einer Kategorie gehörenden Pixel farblich markieren. Die Segmentierung aller Bilder einer Zeitreihe wurde anhand eines *Image-J* Makros automatisiert. Die segmentierten Bilder wurden mithilfe eines weiteren Makros in binäre Bilder umgewandelt und die ROIs (*region of interest*) der Zellen wurden zu Kreisen formatiert, um den folgenden Trackingprozess zu vereinfachen (Abb. 5). Außerdem konnten anhand des Makros kleine Partikel, wie Zelltrümmer und Staub, oder falsch segmentierte Teile aussortiert werden. Die nun immer noch als Einzelbilder vorliegenden segmentierten Bilder wurden als Videosequenz zusammengefasst und in einer anderen Farbe über die Originale gelegt, um sie mit diesen abgleichen zu können (*merge*).

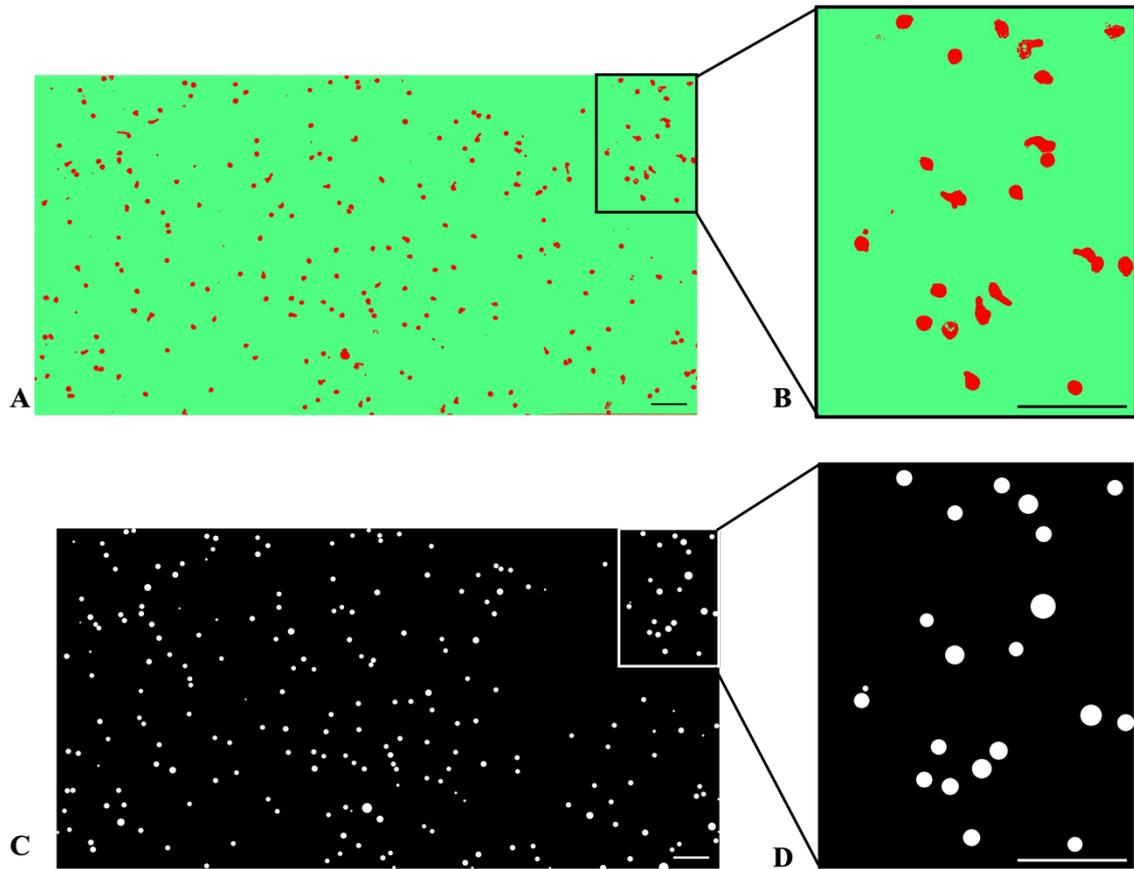


Abbildung 5: *A* Mithilfe des Trainable Weka Segmentation-Plug-Ins segmentierte Aufnahme eines μ -Slides mit humanen Neutrophilen, *B* Segmentierte Aufnahme von migrierenden Neutrophilen (Zoom aus *A*), *C* Binäres schwarz-weiß Bild der segmentierten Aufnahme von humanen Neutrophilen nach Umwandlung der ROIs in Kreise, *D* Zoom aus *C*. Scale bar, 100 μ m.

2.10.7 Aufzeichnung und Bereinigung der Zellbewegung

Die beiden übereinander gelegten Bilderfolgen wurden mit der Software *Imaris* weiterverarbeitet. Über den Reiter ‚spots‘ nahm *Imaris* eine Segmentierung und das Verfolgen von Partikeln vor. Es wurden entsprechende Parameter gewählt, die eine adäquate Erkennung der Zellen bzw. der segmentierten Kreise ermöglichten und die Zellbewegung präzise aufzeichneten. Durch das Ausschalten des Kanals mit den zuvor durch das *Weka-Tool* segmentierten Daten, konnte exakt bestimmt werden, ob die abgebildeten Tracks über der Zellbewegung der Originaldaten lagen (Abb. 6). Die erkannten Tracks konnten außerdem manuell bearbeitet werden. Tracks konnten zusammengeführt oder gelöscht werden, falls es sich bei der detektierten Bewegung nicht um Zellen handelte oder größere Abstände zwischen zwei Bildern dafür sorgten, dass die Software diese nicht als zu einer Zelle gehörig erkannte.

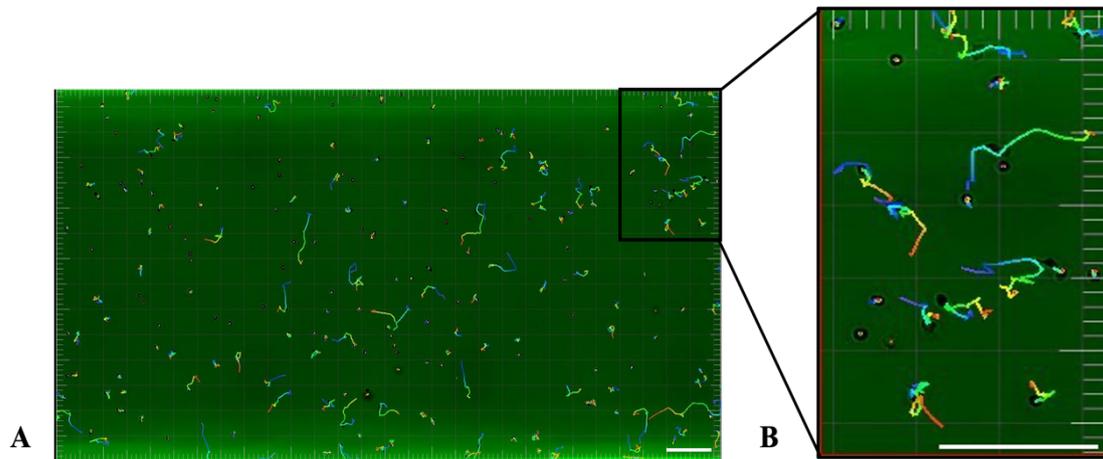


Abbildung 6: **A** Mithilfe von Imaris aufgezeichnete Tracks von humanen Neutrophilen, **B** Zoom aus A. Scale bar, 100µm.

2.10.8 Analyse der Zellmigration

Die Tracklänge, Geradlinigkeit der Tracks (*Straightness*) und die mittlere Zellgeschwindigkeit konnte direkt durch *Imaris* bestimmt werden. Zusätzlich wurden alle Zellkoordinaten (x- und y-Koordinate) zu jedem Zeitpunkt aufgezeichnet. Alle Daten wurden in Excel-Tabellen überführt und zur weiteren Bearbeitung anhand der Tracklänge vorsortiert. Da häufig kurze Zellbewegungen, von sich auf der Stelle bewegenden Zellen entstanden, wurde eine Grenze von 100 µm für murine und 220 µm für humane Neutrophile festgelegt. Nur Neutrophile mit längeren Tracks wurden in die statistische Auswertung miteinbezogen. Um Chemotaxis spezifische Parameter zu erhalten, wurde zusätzlich das von Ibidi bereitgestellte *Chemotaxis und Migration Tool 2.0* genutzt. Dieses konnte jegliche Koordinatenpunkte der Zellen über die gesamte Videosequenz in anschaulichen Diagrammen darstellen und ermöglichte außerdem die Analyse der *Velocity* (Distanz über die Zeit in Vektorgröße) und des *Forward Migration Index* (FMI) in Richtung des *Chemoattractants*.

2.11 Proteinbiochemische Methoden

2.11.1 Gewinnung von Zelllysaten für Immunoblots

Um das Vorkommen spezifischer Proteine sowohl in murinen als auch in humanen Zellen im Immunoblot nachzuweisen, wurden je 10^6 Zellen mit 50 µl Lysepuffer versehen. Die Zellsuspension wurde zur mechanischen Lyse eine halbe Stunde auf Eis gelagert und

zwischendurch gevortext. Danach wurde sie bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Mittels Bradfordanalyse wurden die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt.

2.11.2 Proteinnachweis mittels Immunoblot

Um die zu untersuchenden G-Proteine in Zellysaten nachzuweisen, wurden die Zellproteine elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurden harnstoffhaltige Acrylamidgele verwendet, da diese die Auftrennung der $G\alpha_i$ -Isoformen ermöglichen. Die Proteine wurden per Semi-Dry Verfahren auf PVDF-Membranen übertragen und im ‚*VersaDoc Imaging System*‘ mittels Enzym-gekoppelter Chemielumineszenz dargestellt.

Herstellung von harnstoffhaltigen Acrylamidgelen

Zum Gießen der Gele wurde das *Mini Protean Handcast System* genutzt. Für das Trenngel wurde Trenngelpuffer (siehe 2.3.2) mit Acrylamid 40% durch TEMED und 12,5% APS in 1,5 mm dicken Formen zur Polymerisation gebracht. Nach 45 min konnte das Sammelgel aus Sammelgelpuffer (siehe 2.3.2), Acrylamid 30%, TEMED und APS darüber geschichtet und mit 10er oder 15er Kämmen versehen werden. Nach weiteren 15 min wurden die Gele zur vollständigen Polymerisation über Nacht bei 4 °C gelagert und erst am folgenden Tag verwendet.

Gelelektrophorese

Für die Proteinauftrennung wurden die Gele in einer mit Laufpuffer (siehe 2.3.2) befüllten Elektrophoresekammer platziert. Die benötigte Menge der Proben wurde im Verhältnis 3:1 mit Lämmli-Puffer vermischt und für 5 min bei 95 °C erhitzt, bevor je 10 µl der Proben (= 5 µg Protein) in die Geltaschen pipettiert wurden. Als Komigrationsstandard wurden 10 µl des *Precision Plus* und 8 µl des *BlueStar* Proteinstandards jeweils in die seitlichen Taschen gefüllt. Freie Taschen wurden mit einfachem Lämmli-Puffer beladen. Anschließend wurde für ca. 3 Stunden eine Spannung von 100 V angelegt, bis die Lauffront gerade aus dem Gel austrat.

Proteintransfer auf PVDF-Membranen

Zum Proteintransfer wurde das *SemiDry*-Verfahren mit PVDF-Membranen angewandt. Dazu wurden drei in Anodenpuffer I (siehe 2.3.2) getränkte Filterpapiere mittig auf der unteren Elektrode der Blottingkammer platziert. Darauf wurden sechs weitere, in

Anodenpuffer II (siehe 2.3.2) getränkte Papiere und die für 10 Minuten in Methanol getränkte Membran gelegt. Auf dieser wurde das Gel luftblasenfrei platziert und mit neun Filterpapieren mit Kathodenpuffer (siehe 2.3.2) überdeckt. Pro Gel wurde eine Stromstärke von 60 mA für 70 min angeschlossen.

Proteindetektion

Die Membran wurde anschließend 5 min in Ponceau S geschwenkt, um die Banden vorerst sichtbar zu machen und fotografisch festzuhalten. Darauf folgte das Blocken für eine Stunde in fünfprozentiger Milch und ein einmaliges Waschen in TBS-T (0,05%) für 5 Minuten. Über Nacht wurden die Membranen bei 4 °C mit dem primären Antikörper auf einem Rollenmischer inkubiert (anti-G_{i1/2} oder anti-G_{i3}, 1:5000 in BSA 5%), um am folgenden Tag zuerst 3 x mit TBS-T für je 8 min gewaschen und anschließend für eine Stunde mit *HRP-linked Anti-Rabbit IgG* bei Raumtemperatur inkubiert zu werden. Der gleiche Waschprozess wurde wiederholt, bevor die Membranen mit ECL-Lösung benetzt und die Chemilumineszenz im *Versadoc* Kamerasystem detektiert wurde. Eine Ladekontrolle erfolgte nach demselben Prinzip anhand von β -Aktin. Dazu wurden die Membranen nach der Bildaufnahme für 15 min mit *Re-Blot Plus* Strippinglösung inkubiert, anschließend 6 x für 5 min in TBS-T gewaschen und erneut für eine Stunde mit Milch geblockt, bevor sie über Nacht mit anti- β -Aktin (1:100.000 in BSA) inkubiert wurden. Die Visualisierung erfolgte anschließend wie oben beschrieben. Die Auswertung der Aufnahmen der Membranen erfolgt mithilfe der Software *Image Lab*. Mit dieser wurde die Intensität der Banden analysiert und über β -Aktin geeicht, um die Effizienz des Knockouts festzustellen.

2.12 Statistik

Es wurden innerhalb der Chemotaxisexperimente jeweils vier unabhängige Versuche pro Gruppe durchgeführt, deren Ergebnisse gepoolt wurden. Die Daten wurden mittels *GraphPad Prism 9* nach der ROUT-Methode (Q= 1 %) nach Ausreißern untersucht. Um die verschiedenen Gruppen innerhalb eines Experiments miteinander vergleichen zu können, wurden mit den von Ausreißern bereinigten Daten Oneway-ANOVA-Analysen nach dem Kruskal-Wallis Test durchgeführt. P-Werte < 0,05 galten als signifikant.

3 Ergebnisse

Vorangegangene Versuche der Arbeitsgruppe zeigten, dass die Defizienz von $G\alpha_{i2}$ - oder $G\alpha_{i3}$ -Proteinen einen Effekt auf den myokardialen, ischämischen Reperfusionsschaden (mIRI) hat (Köhler et al., 2014). Während ein globaler Knockout von *Gnai2* in einem vergrößerten IRI resultierte, zeigte ein globaler *Gnai3*-Knockout eine protektive Wirkung. Nachfolgend wurde festgestellt, dass ein selektiver Knockout in Neutrophilen und Makrophagen sowohl von *Gnai2* als auch *Gnai3* ebenfalls einen schützenden Effekt auf den IRI hat (unveröffentlichte Daten). Es ist sowohl der infarzierte Bereich kleiner, es können aber auch weniger Plättchen-Neutrophil-Komplexe (PNCs) in diesem Gewebe gefunden werden. Da die generelle PNC-Bildung jedoch nicht gestört ist (Dissertation Killinger), scheint die Migration der PNCs ins betroffene Gebiet vermindert zu sein. Um diese Hypothese zu untersuchen, soll in der vorliegenden Arbeit zunächst die Zellbewegung der Neutrophilen aus *Gnai2*-, *Gnai3*- und *Gnai2/Gnai3*-defizienten Mäusen und entsprechenden Kontrolltieren untersucht werden. Es wurden dazu murine und humane neutrophile Granulozyten isoliert und anschließend wie unter 2.10. beschrieben untersucht.

3.1 Analyse der Reinheit der isolierten neutrophilen Granulozyten mittels Durchflusszytometrie

Um die Reinheit der murinen neutrophilen Granulozyten nach der Isolation aus dem Knochenmark zu überprüfen, wurde stichprobenartig eine Antikörper-Färbung und Durchflusszytometrie durchgeführt. Neutrophile wurden als der Anteil aller Zellen identifiziert, die sich als $CD11b^+$ $Ly6G^+$ darstellten (Abb. 7). Es ergab sich eine durchschnittliche Reinheit von 90%.

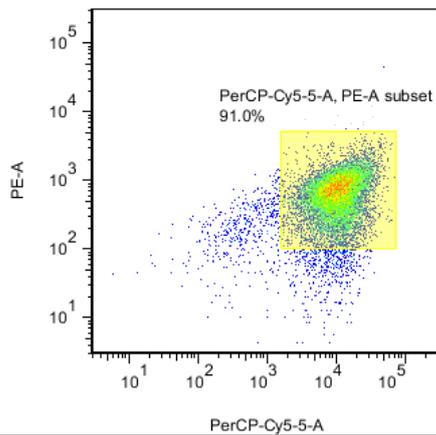


Abbildung 7: **Repräsentative Analyse von isolierten, murinen Neutrophilen aus dem Knochenmark einer Wildtypmaus.** Das gelbe Viereck stellt die als $CD11b^+Ly6G^+$ definierten Neutrophilen dar.

3.2 Nachweis des $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ -Knockouts mittels Immunoblot

Um die Defizienz in Neutrophilen mittels Immunoblot nachzuweisen, wurden Zellen wie beschrieben aus dem Knochenmark isoliert und mit Zellen eines nicht-transgenen Wurfgeschwisters verglichen. Als weitere Kontrolle diente Lungengewebe einer Maus mit globalem Knockout (KO) und einer Wildtyp-Geschwistermaus. Die G-Proteine wurden mit den jeweiligen spezifischen $G\alpha_i$ -Antikörpern und einem sekundären HRP-gekoppelten anti-Rabbit IgG nachgewiesen. Dessen Chemilumineszenz wurde detektiert und über eine Ladekontrolle mit β -Aktin mittels *Image Lab* normalisiert.

Zunächst wurden Neutrophile aus *Gnai2*-LysM-Cre-negativen (WT) und -Cre-positiven (TG) Tieren untersucht. Die Analyse der Intensität der $G\alpha_{i2}$ -spezifischen Banden über die Normalisierung mit β -Aktin ergab einen Knockout von 55% des $G\alpha_{i2}$ -Proteins in den Neutrophilen des *Gnai2*-LysM-Cre-positiven Tieres ($Cre^{+/tg}$) (Abb. 8).

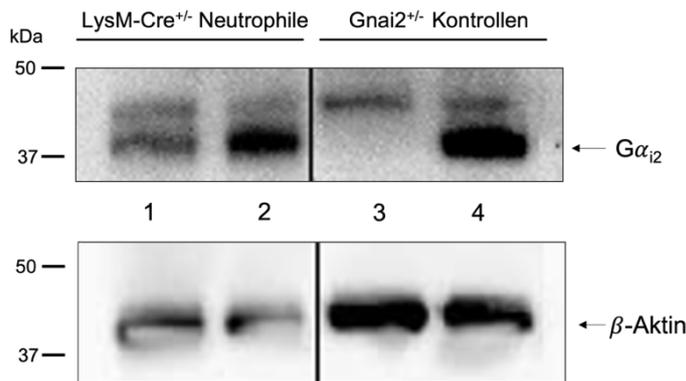


Abbildung 8: Immunoblot von Neutrophilen aus *Gnai2^{fl/fl}* LysM-Cre Mäusen
 Dargestellt ist ein Immunoblot zum Nachweis des $G\alpha_{12}$ Knockouts in den isolierten Neutrophilen. Zu sehen ist die Membran nach Inkubation mit anti- $G\alpha_{1/2}$ IgG (1:5000) (oben), sowie anschließender Inkubation mit β -Aktin Antikörper (1:100.000) (unten). 1 *Gnai2^{fl/fl}* LysM-Cre^{+tg} Neutrophile, 2 *Gnai2^{fl/fl}* LysM-Cre^{+/+} Neutrophile, 3 *Gnai2^{-/-}* Lungengewebe (KO-Kontrolle), 4 *Gnai2^{+/+}* Lungengewebe (WT-Kontrolle)

Nachfolgend wurden auch Neutrophile aus *Gnai3*-LysM-Cre-negativen (WT) und -Cre-positiven (TG) Tieren untersucht. Die Analyse der Banden stellte hier ein Knockout des $G\alpha_{i3}$ -Proteins in den Neutrophilen des *Gnai3*-LysM-Cre-positiven Tieres von 63% fest (Abb. 9).

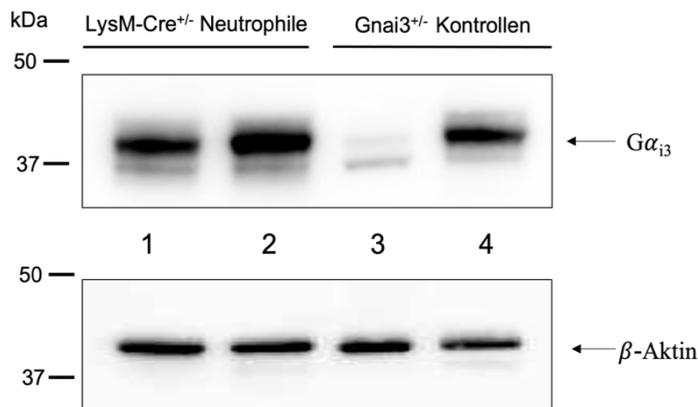


Abbildung 9: Immunoblot von Neutrophilen aus *Gnai3^{fl/fl}* LysM-Cre Mäusen
 Dargestellt ist ein Immunoblot zum Nachweis des $G\alpha_{i3}$ Knockouts in den isolierten Neutrophilen. Zu sehen ist die Membran nach Inkubation mit anti- $G\alpha_{i3}$ IgG (1:5000) (oben), sowie anschließender Inkubation mit β -Aktin Antikörper (1:100.000) (unten). 1 *Gnai3^{fl/fl}* LysM-Cre^{+tg} Neutrophile, 2 *Gnai3^{fl/fl}* LysM-Cre^{+/+} Neutrophile, 3 *Gnai3^{-/-}* Lungengewebe (KO-Kontrolle), 4 *Gnai3^{+/+}* Lungengewebe (WT-Kontrolle)

3.3 Versuchsaufbau und Auswertung der Chemotaxis von murinen und humanen Neutrophilen

Die Analyse der Chemotaxis soll Rückschlüsse auf die unterschiedlichen Rollen von $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ während der Neutrophilenmigration geben.

Während die untersuchten Parameter, wie zurückgelegte Strecke (*Track Length*), mittlere Migrationsgeschwindigkeit (*Mean Track Speed*) und Geradlinigkeit der Zellbewegung (*Straightness*) generelle Aussagen über die Viabilität und Bewegung der Zellen zulassen, kann über die Geschwindigkeit (*Velocity*) und den *Forward Migration Index* in Richtung des fMLP die Effektivität der Migration bzw. Chemotaxis beurteilt werden.

Eine unabhängige Betrachtung aller Parameter ist wichtig, da diese nicht zwingend korrelieren. Insbesondere die Länge der Zellbewegungen lässt keine Schlussfolgerung über die Effektivität der Migration und Chemotaxis der Zellen zu (siehe Abb. 10).

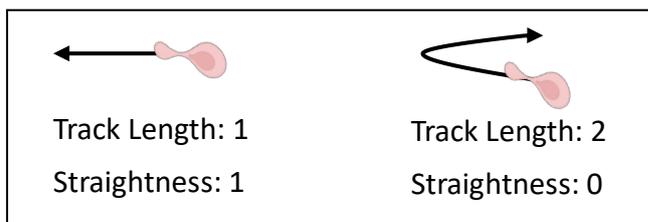


Abbildung 10: **Beispiel für die Parameter Track Length und Straightness**

Es liegt keine Korrelation zwischen Track Length und Straightness vor. Links: Die Zelle legt eine Strecke nur in eine Richtung zurück, damit ist sowohl die Track Length als auch die Straightness 1. Rechts: Die Länge des Tracks hat sich zwar verdoppelt (2), da die Zelle dieselbe Strecke in die andere Richtung zurücklegt, es ergibt sich jedoch eine Straightness von 0.

Bei der *Velocity* handelt es sich um einen Vektor, der die Geschwindigkeit, mit der ein Objekt seine Position ändert, wiedergibt. Bewegt sich eine Zelle bspw. mit einer gewissen Geschwindigkeit im Kreis und kehrt zu ihrem Ausgangspunkt zurück, zeigt sich dies zwar in einer erhöhten mittleren Migrationsgeschwindigkeit, jedoch nicht in erhöhter *Velocity*. Diese läge im Beispiel weiterhin bei 0, da es zu keiner Positionsänderung kommt. Je geradliniger und je schneller sich eine Zelle in eine bestimmte Richtung bewegt, desto höher ist damit ihre *Velocity*. Der *Forward Migration Index* (*FMI*) setzt die Bewegung einer Zelle in Richtung der x- ($FMI(x)$) oder y-Achse ($FMI(y)$) in Bezug zu deren zurückgelegter Strecke. Da sich im vorliegenden Versuchsaufbau der Gradient des *Chemoattractant* stets rechts aufbaute, wurde der $FMI(x)$ betrachtet und ausgewertet.

Somit ist der Indexwert höher, je direkter eine Zelle in Richtung des fMLP wandert. Ein Wert von 1 entspricht einer Zellmigration in Richtung des fMLP, die parallel zur x-Achse ist, während ein Wert von -1 die Bewegung in die entgegengesetzte Richtung abbildet. Eine Bewegung, die zu ihrem Ausgangspunkt auf der x-Achse zurückkehrt, hat einen Wert von 0.

Sämtliche Zellen eines Versuchs wurden im Programm *Chemotaxis und Migration Tool 2.0* innerhalb eines Koordinatensystems graphisch erfasst, indem der Start der Migration bei 0/0 beginnt. Als roter Punkt dargestellt ergibt sich der *Center of Mass* aller sich bewegenden Partikel (Abb. 11). Diese Graphiken lassen eine erste Kontrolle und Einschätzung zu, ob der jeweilige Versuch funktioniert hat. Sie wurden für weitere Analysen jedoch nicht verwendet.

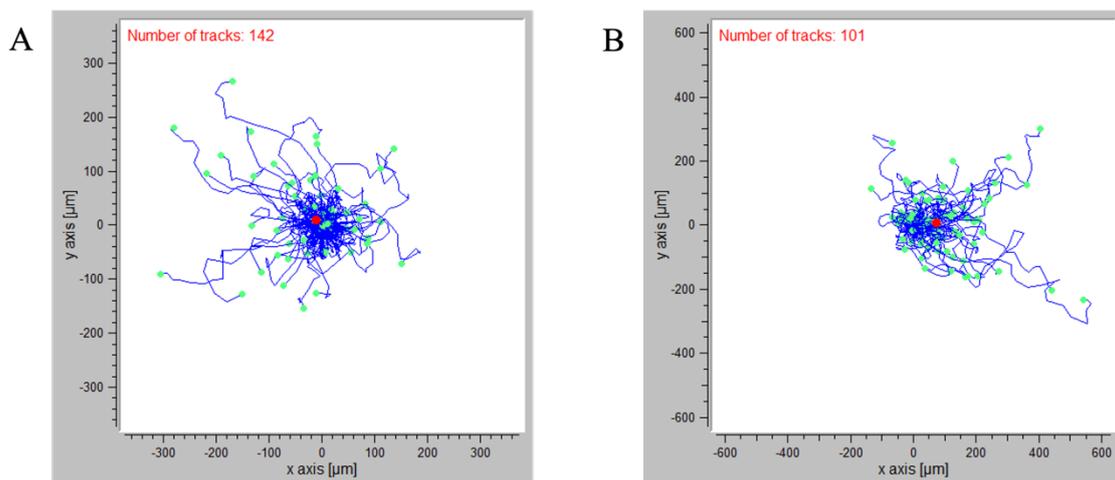


Abbildung 11: Beispieldiagramme aus Chemotaxis und Migration Tool 2.0

Der Forward Migration Index (FMI) von Wildtypneutrophilen **A** mit PBS (Kontrolle) ($n=142$ Zellen) und **B** mit fMLP-Behandlung ($n=101$ Zellen). Der rote Punkt stellt den Center of Mass dar.

In den nachfolgend gezeigten Graphen sind stets sämtliche Zellen einer Versuchsreihe der jeweiligen Gruppe abgebildet, die mehr als 100 µm (murin) bzw. mehr als 220 µm (human) zurückgelegt haben. Um signifikante Unterschiede festzustellen, die Aussagen über die Folgen einer *Gnai*-Defizienz auf die Migration ermöglichen, wurde statistisch der Kruskal-Wallis-Test angewendet.

3.4 Analyse der Chemotaxis von murinen, $G\alpha_{i2}$ -defizienten Neutrophilen

Um auf vorangegangenen Versuchen aufzubauen, wurden zunächst Neutrophile von *Gnai2*-LysM-Cre-negativen (WT) und -Cre-positiven (TG) Tieren isoliert und untersucht. Von den transgenen, *Gnai2*-defizienten Mäusen ist bereits bekannt, dass sie im *in vivo* Modell einen geringeren cardialen IRI aufweisen (Beer-Hammer, unveröffentlichte Daten). Es wurden Neutrophile aus vier transgenen Mäusen mit den Neutrophilen aus Cre-negativen Wurfgeschwistern untersucht (Abb. 12).

Während die Zellen der wildtypischen Tiere eine Steigerung der Parameter um ca. 70 % durch fMLP erfahren, zeigt sich jedoch für die Werte der transgenen Zellen nur eine Steigerung um ca. 15,3 %.

Im Vergleich der beiden Hauptgruppen miteinander lassen sich verschiedene Signifikanzen festhalten. Die mit fMLP stimulierten, transgenen Neutrophilen weisen deutlich kürzere Tracks auf als die Zellen der Wildtypen. Letztere legen im Durchschnitt 16,75 μm längere Strecken zurück als die Neutrophilen der transgenen Tiere (Abb. 12A). Die $G\alpha_{i2}$ -Defizienz scheint jedoch nicht die mittlere Zellgeschwindigkeit sowie die *Velocity* zu beeinflussen (Abb. 12B, C). Betrachtet man die *Straightness* (Abb. 12D) der Zellbewegung, lässt sich zwischen den mit fMLP stimulierten Zellen kein Unterschied feststellen. Jedoch scheinen die Zellen der transgenen Tiere unstimuliert geradliniger zu migrieren. Ein besonderer Unterschied ist innerhalb des FMI(x) sichtbar (Abb. 12E). Die gerichtete Migration der transgenen Neutrophilen in Richtung des fMLP ist mit einem Wert von 0,026 stark signifikant geringer als die der Wildtypen mit einem Wert von 0,112, was auf eine weniger effiziente Chemotaxis hindeutet.

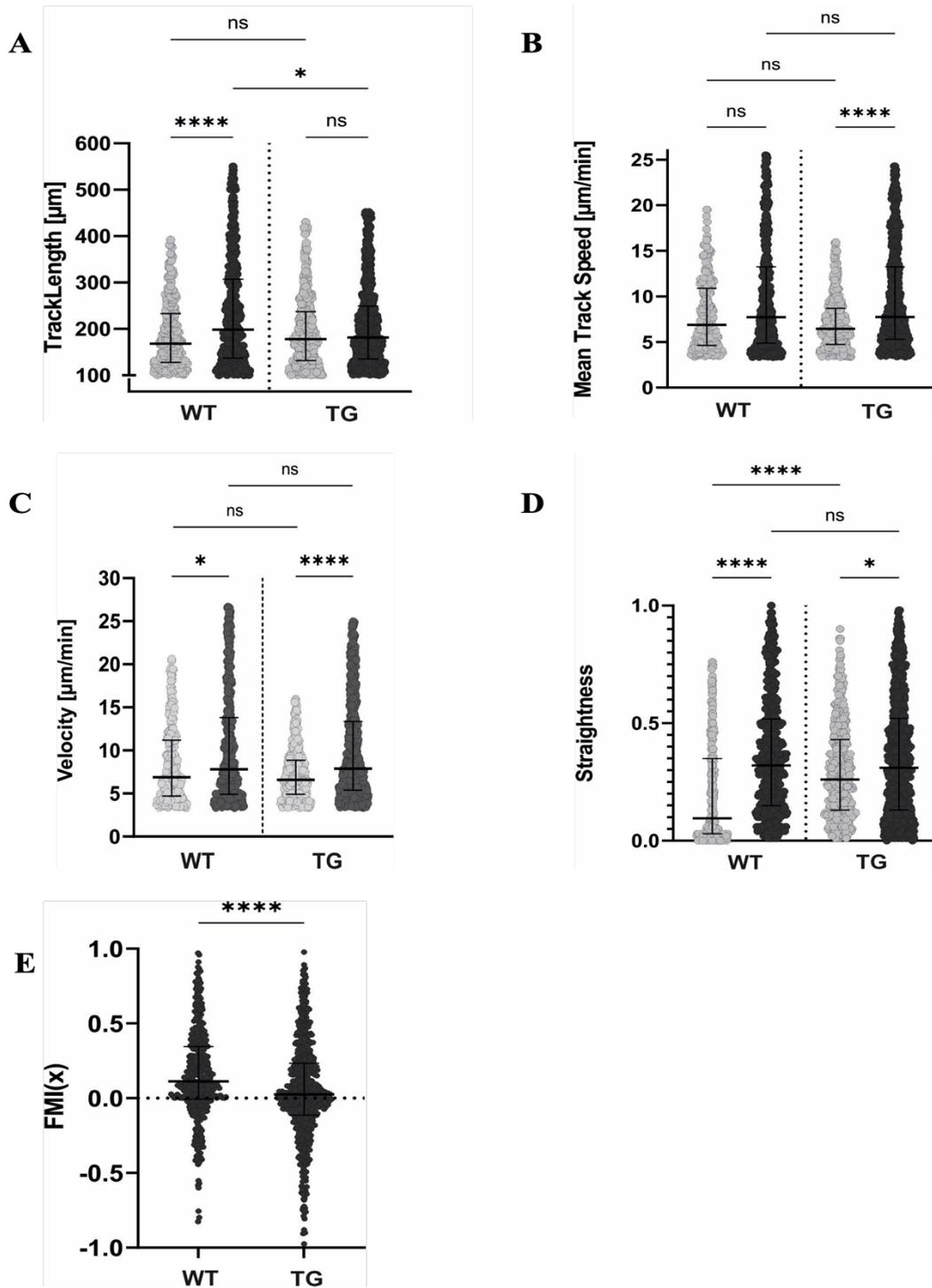


Abbildung 12: Analyse der Chemotaxisparameter von Neutrophilen aus *Gnai2-LysM-Cre*-negativen und -*Cre*-positiven Mäusen

Dargestellt sind unstimulierte (hellgrau) und mit fMLP stimulierte (dunkelgrau) Neutrophile aus *Gnai2^{fl/fl} Cre^{+/+}* (WT) und *Cre^{+Lg}* (TG) Mäusen ($n=4$ pro Genotyp). Die Zellzahlen sind für die jeweiligen Parameter in Tabelle 4 (Anhang) aufgeführt. **A** Tracklength (Tracklänge) der Zellbewegung in μm (ab $100 \mu\text{m}$) **B** Mean Track Speed (Mittlere Zellgeschwindigkeit) in $\mu\text{m}/\text{min}$ **C** Velocity (Geschwindigkeit), Distanz der Migration über die Zeit in $\mu\text{m}/\text{min}$ **D** Straightness (Geradlinigkeit) der Zellbewegung (Wert von 0 bis 1) **E** Forward Migration Index towards fMLP, Effizienz der Migration in Richtung fMLP (Wert -1 bis +1)

3.5 Analyse der Chemotaxis von murinen, $G\alpha_{i3}$ -defizienten Neutrophilen

Nachfolgend wurde derselbe Versuchsaufbau für *Gnai3*-LysM-Cre Tiere gewählt. Ein Neutrophilen-spezifischer Knockout zeigte in vorangegangenen Versuchen, ähnlich wie für *Gnai2*-defiziente Neutrophile, ein reduziertes Ausmaß des IRI im *in vivo* Modell (Beer-Hammer, unveröffentlichte Daten).

Es wurden vier transgene Mäuse mit je einem nicht-transgenen Wurfgeschwister untersucht.

Bei der Betrachtung des Knockouts der α -Untereinheit des G_{i3} -Proteins in murinen Neutrophilen ergeben sich weniger signifikante Ergebnisse (Abb. 13). Die Länge der Tracks (Abb. 13A), die mittlere Geschwindigkeit (Abb. 13B), sowie die *Velocity* (Abb. 13C) dieser zeigen keine Unterschiede im Vergleich zu den Zellen der nicht-transgenen Tiere. Ein signifikanter Unterschied lässt sich dafür in der *Straightness* (0,365 für den Wildtyp und 0,2 für transgene Zellen; Abb. 13D) und im *Forward Migration Index(x)* (Abb. 13E) erkennen. Dieser liegt mit 0,22 für den Wildtyp deutlich über dem Wert des FMI(x) der transgenen Neutrophilen mit 0,068. Wobei zu erwähnen ist, dass die mit fMLP stimulierten, transgenen Zellen keine signifikant geradlinigeren Tracks im Vergleich zu den unstimulierten aufweisen. Generell zeigt der Vergleich der stimulierten zu unstimulierten Neutrophilen nicht für alle Parameter ausreichende Signifikanz.

Im Durchschnitt aller Parameter ergeben sich für die stimulierten Zellen der Wildtypen 29,9 % höhere Werte, während die stimulierten, transgenen Zellen um nur 2,9 % über den Werten der unstimulierten liegen.

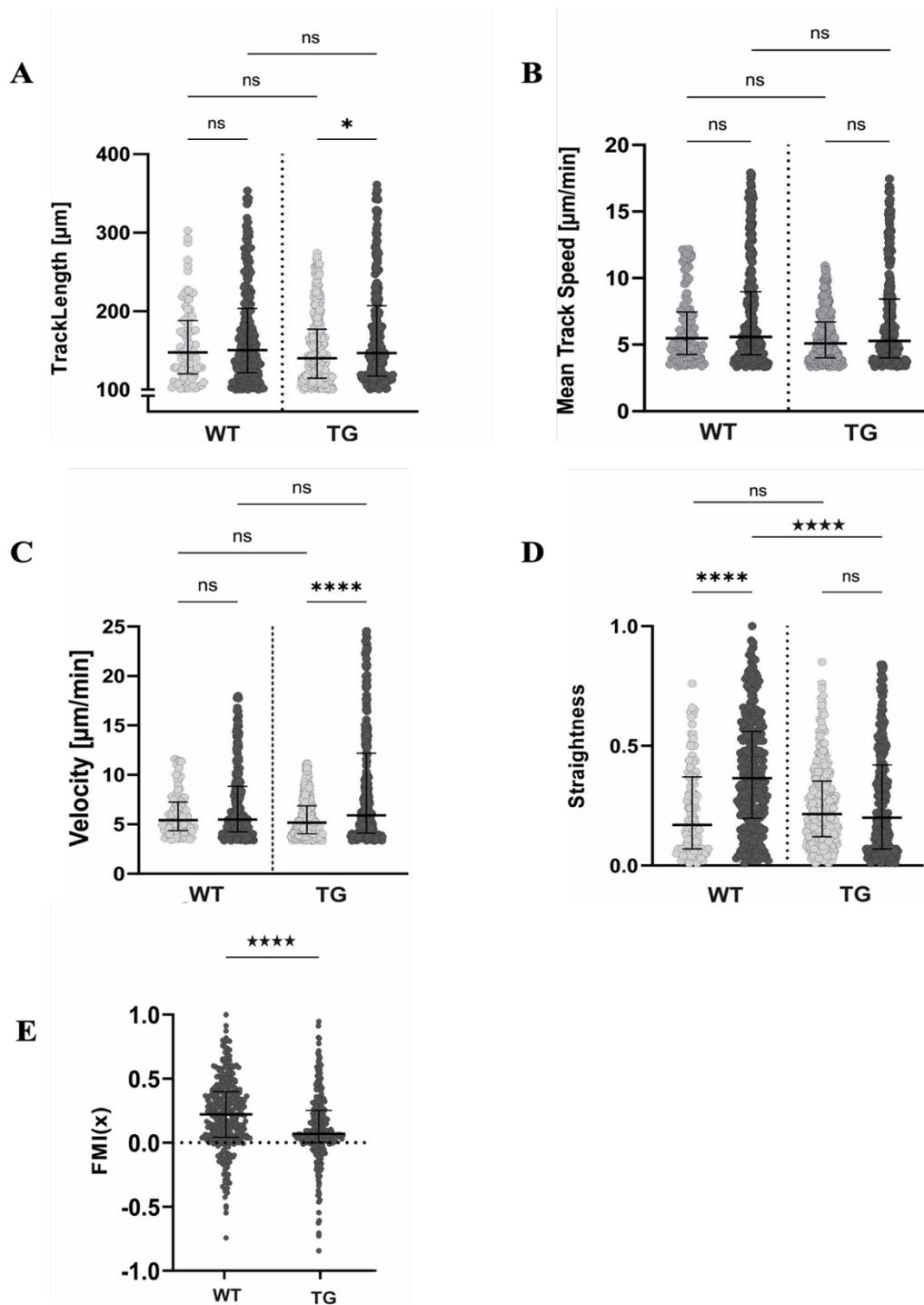


Abbildung 13: Analyse der Chemotaxisparameter von Neutrophilen aus *Gnai3-LysM-Cre*-negativen und -*Cre*-positiven Mäusen

Dargestellt sind unstimulierte (hellgrau) und mit fMLP stimulierte (dunkelgrau) Neutrophile aus *Gnai3^{fl/fl} Cre^{+/+}* (WT) und *Cre^{+/-}* (TG) Mäusen (n=4 pro Genotyp). Die Zellzahlen für die jeweiligen Parameter sind in Tabelle 5 (Anhang) aufgeführt. **A** Tracklength (Tracklänge) der Zellbewegung in μm (ab $100 \mu\text{m}$) **B** Mean Track Speed (Mittlere Zellgeschwindigkeit) in $\mu\text{m}/\text{min}$ **C** Velocity, Distanz der Migration über die Zeit in $\mu\text{m}/\text{min}$ **D** Straightness (Geradlinigkeit) der Zellbewegung (Wert von 0 bis 1) **E** Forward Migration Index towards fMLP, Effizienz der Migration in Richtung fMLP (Wert -1 bis +1)

3.6 Analyse der Chemotaxis von murinen, $G\alpha_{i2/3}$ -defizienten Neutrophilen

Es wurde eine transgene Maus der *Gnai2/3*-LysM-Cre Mauslinie mit einem ihrer nicht transgenen Wurfgeschwister verglichen. Über das Verhalten der Neutrophilen dieser Tiere ist bisher wenig bekannt. Allerdings sind die Tiere mit einem doppelten Knockout ebenfalls vor einem IRI geschützt und dies sogar in stärkerem Ausmaß als die Tiere der einzelnen Knockouts (Beer-Hammer, unveröffentlichte Daten). Da die Charakterisierung dieser Tiere noch nicht vollständig abgeschlossen ist, soll ein erster Versuch eine gewisse Orientierung zum Migrationsverhalten der Neutrophilen geben, denen die α -Untereinheit sowohl des G_{i2} - als auch des G_{i3} -Proteins fehlt.

Die Neutrophilen der *Gnai2/3*-LysM-Cre Mäuse zeigen vielfach eine Stimulation durch fMLP (Abb. 14). Das *Chemoattractant* sorgt bei den Zellen aus Wildtyp-Tieren für eine Steigerung der Werte um durchschnittlich 67,6 % und bei denen der transgenen Neutrophilen um 63 %. Die Länge der Tracks (Abb. 14A), deren mittlere Geschwindigkeit (Abb. 14B), sowie die *Velocity* (Abb. 14C) weisen im Vergleich der Zellen aus Cre^+ -Tieren zu denen aus Cre^- -Tieren signifikant höhere Werte auf. Diese signifikanten Unterschiede lassen sich in diesen Parametern auch im Vergleich der unstimulierten Neutrophilen feststellen. Die *Straightness* dagegen zeigt für die stimulierten Zellen für WT und TG ein ähnliches Niveau, während sie für die unstimulierten, transgenen Zellen deutlich niedriger ausfällt im Vergleich zu den unstimulierten Wildtyp-Zellen. Obwohl die transgenen Zellen also weiter und schneller zu migrieren scheinen, deuten die Werte des *FMI(x)* (Abb. 14E) und der *Straightness* auf eine weniger gerichtete und effiziente Zellmigration hin, da diese signifikant niedriger sind.

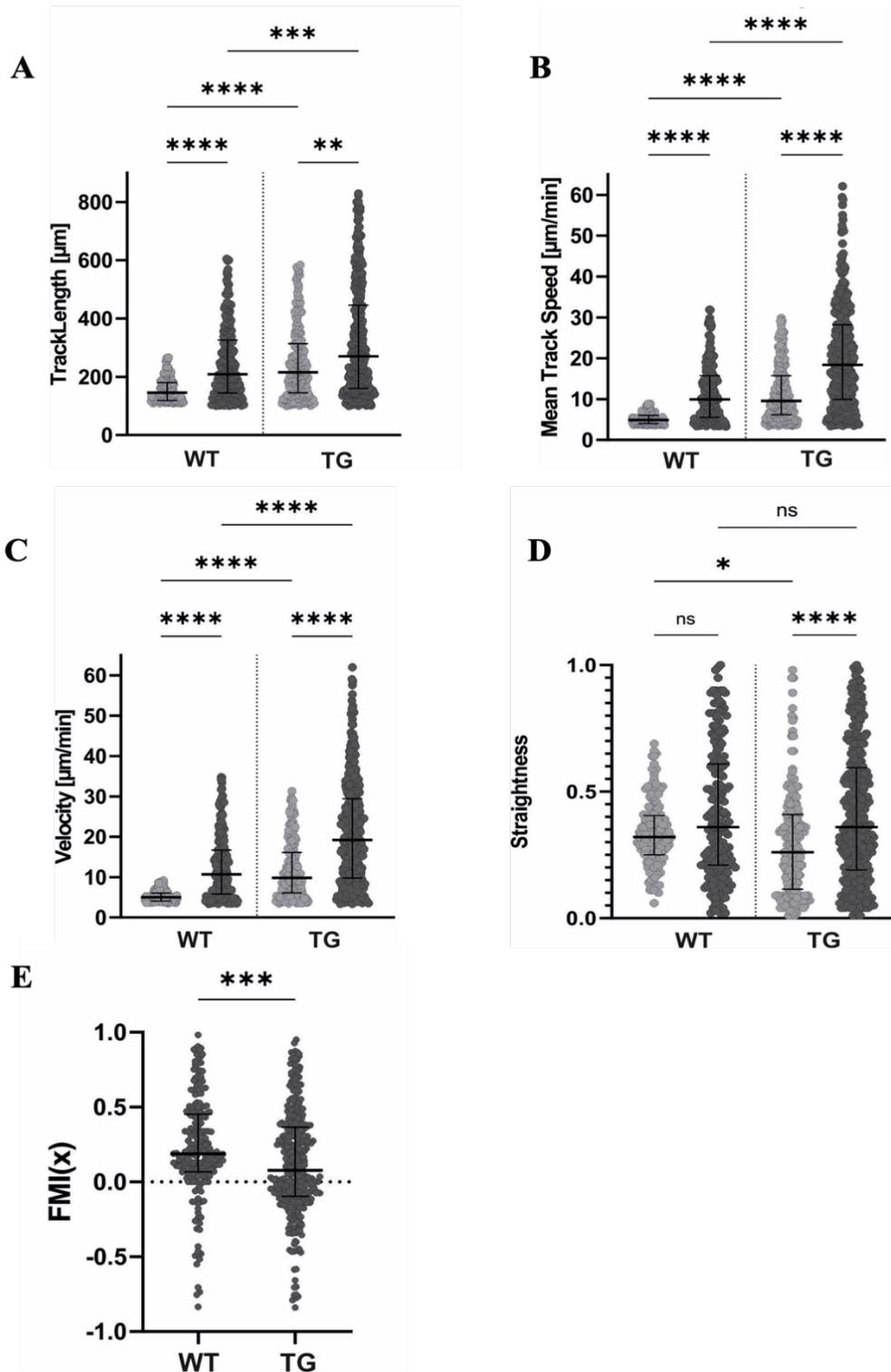


Abbildung 14: Analyse der Chemotaxisparameter von Neutrophilen aus *Gnai2/3-LysM-Cre*-negativen und -*Cre*-positiven Mäusen

Ergebnisse der unstimulierten (hellgrau) und mit fMLP stimulierten Zellen (dunkelgrau). Die Ergebnisse resultieren aus je einem Versuchstier. Die Zellzahlen für die jeweiligen Parameter sind in Tabelle 6 (Anhang) aufgeführt. **A** Tracklength (Tracklänge) der Zellbewegung in µm (ab 100 µm) **B** Mean Track Speed (Mittlere Zellgeschwindigkeit) in µm/min **C** Velocity, Distanz der Migration über die Zeit in µm/min **D** Straightness (Geradlinigkeit) der Zellbewegung (Wert von 0 bis 1) **E** Forward Migration Index towards fMLP, Effizienz der Migration in Richtung fMLP (Wert -1 bis +1)

3.7 Analyse der Chemotaxis von murinen Neutrophilen nach Behandlung mit spezifischem anti-G $\alpha_{i1/2}$ Antikörper

Neutrophile aus Wildtyp-Tieren wurden isoliert und ihr Migrationsverhalten nach Behandlung mit unspezifischem IgG und spezifischem anti-G $\alpha_{i1/2}$ Antikörper untersucht. Neben diesen mit Antikörper inkubierten Zellen wurde jeweils eine Gruppe von Neutrophilen ohne Antikörper (control) analysiert. Der anti-G $\alpha_{i1/2}$ spezifische Antikörper wurde bereits in vorherigen Versuchen hinsichtlich seiner Auswirkung auf die PNC-Bildung, sowie des Effekts auf das Ausmaß des IRI getestet (Köhler, Beichert, Killinger, Grothe et al., in revision). Die PNC-Bildung wurde durch die Gabe der anti-G $\alpha_{i1/2}$ spezifischen Antikörper nicht verändert, jedoch konnte sowohl das Ausmaß des IRI als auch die Anzahl der PNCs im infarzierten Gewebe deutlich reduziert werden.

Die Stimulation mit fMLP sorgt für einen signifikanten Anstieg der untersuchten Parameter im Vergleich zu den unstimulierten Zellen derselben Gruppe (Abb. 15). Dieses lässt die Werte aller Parameter der Kontrollgruppe um 17,9 % steigen, während es für den IgG-Antikörper eine Steigerung von 26,3 % und für den G $\alpha_{i1/2}$ -Antikörper von 24,1 % ausmacht. Als Ausnahme ist die *Straightness* zu nennen, in der keinerlei Signifikanzen sichtbar werden. Die Vergleiche der Gruppen innerhalb eines Parameters (Kontrolle, IgG, anti-G $\alpha_{i1/2}$ -IgG) ergeben ebenfalls fast keine signifikanten Unterschiede. Lediglich bei der mittleren Migrationsgeschwindigkeit (Abb.15B) lässt sich ein um 1 $\mu\text{m}/\text{min}$ signifikant erhöhter Wert für die mit fMLP stimulierten und anti-G $\alpha_{i1/2}$ behandelten Zellen im Vergleich zu den stimulierten Kontrollen feststellen.

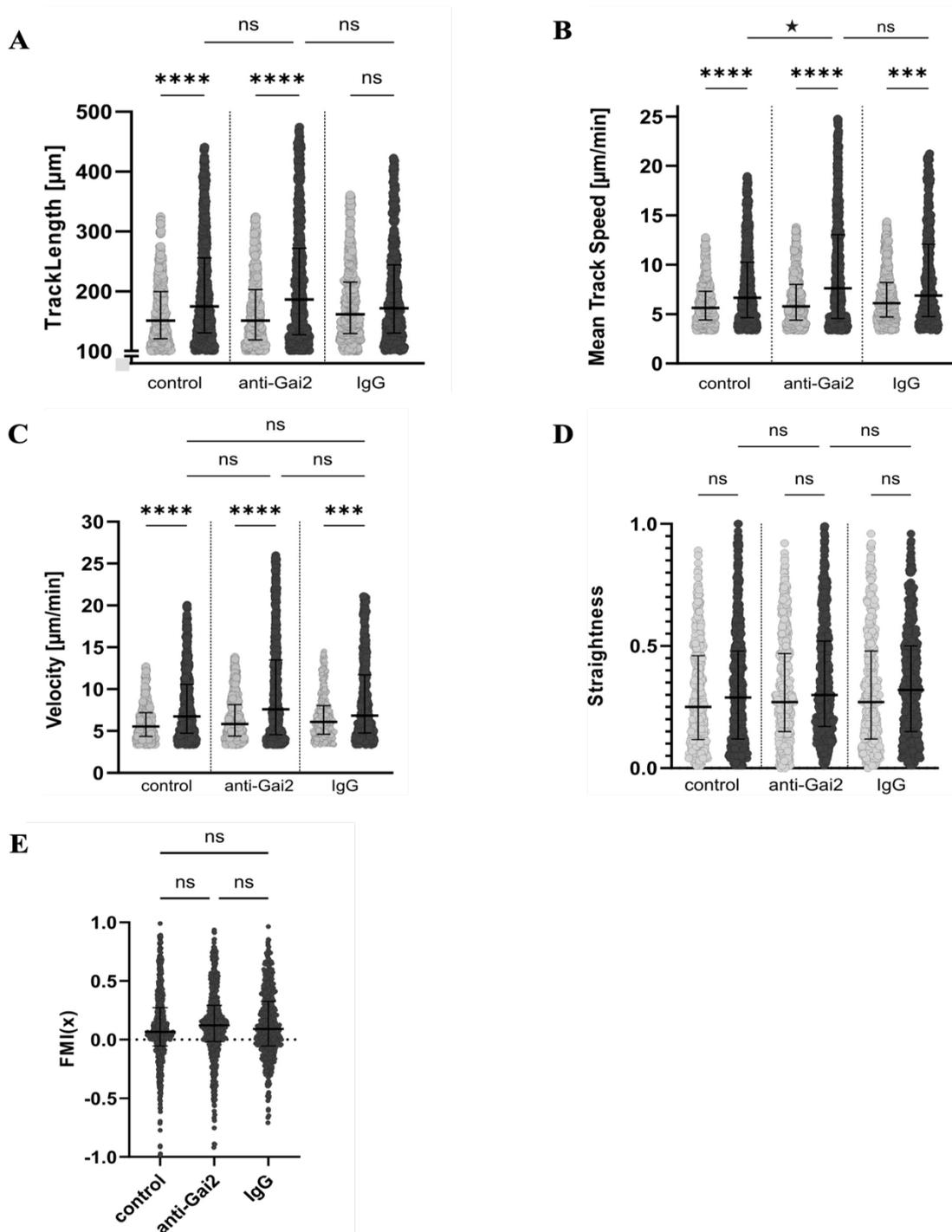


Abbildung 15: Analyse der Chemotaxisparameter von murinen Neutrophilen mit spezifischem anti- $G\alpha_{i2}$ -IgG-Antikörper im Vergleich zu unspezifischem IgG

Ergebnisse der unstimulierten (hellgrau) und mit fMLP stimulierten Zellen (dunkelgrau) in den drei untersuchten Gruppen: control (PBS), 10 min Inkubation mit anti- $G\alpha_{i2}$, 10 min Inkubation mit unspezifischem IgG. Die Ergebnisse resultieren aus 4 Versuchstieren. Die Zellzahlen für die jeweiligen Parameter sind in Tabelle 7 (Anhang) aufgeführt. **A** Tracklength (Tracklänge) der Zellbewegung in μm (ab $100 \mu\text{m}$) **B** Mean Track Speed (Mittlere Zellgeschwindigkeit) in $\mu\text{m}/\text{min}$ **C** Velocity, Distanz der Migration über die Zeit in $\mu\text{m}/\text{min}$ **D** Straightness (Geradlinigkeit) der Zellbewegung (Wert von 0 bis 1) **E** Forward Migration Index towards fMLP, Effizienz der Migration in Richtung fMLP (Wert -1 bis +1)

3.8 Analyse der Chemotaxis von humanen Neutrophilen nach Behandlung mit spezifischem anti-G $\alpha_{i1/2}$ Antikörper

Um die Ergebnisse der bisherigen, murinen Versuche mit menschlichen Zellen vergleichen zu können, wurde der Antikörperversuch auf gleiche Weise mit humanen Neutrophilen durchgeführt.

Die Stimulation mit fMLP zeigt innerhalb der drei Gruppen (control, IgG, anti-G $\alpha_{i1/2}$) einen deutlichen Anstieg der Parameter (Abb. 16). Für die Kontrollgruppe steigert fMLP die Parameter durchschnittlich um 40 %, während diese mit anti-G $\alpha_{i1/2}$ um 42 % und mit unspezifischem IgG um 39,5 % gesteigert werden. Im Vergleich der Gruppen miteinander ergeben sich für die Länge der Tracks keine signifikanten Unterschiede (Abb. 16A). Im Gegensatz dazu zeigen die mit unspezifischem IgG versetzten Zellen eine signifikant höhere mittlere Zellgeschwindigkeit von 23 $\mu\text{m}/\text{min}$ als die Neutrophilen der Kontrollgruppe mit 20 $\mu\text{m}/\text{min}$ und der mit anti-G $\alpha_{i1/2}$ Antikörper behandelten Zellen (19,9 $\mu\text{m}/\text{min}$) (Abb. 16B). Die *Velocity* betrachtend ergibt sich dieselbe Beobachtung. Auch hier weisen die mit unspezifischem IgG inkubierten und fMLP stimulierten Neutrophilen signifikant schnellere Bewegungen auf als die Kontrollgruppe und die mit anti-G $\alpha_{i1/2}$ inkubierten Zellen. Gleiche Signifikanzen gelten für die *Straightness* und den *FMI(x)* (Abb. 16D, E). Mit 0,22 zeigen die mit fMLP stimulierten und IgG inkubierten Neutrophilen eine wesentlich geradlinigere Zellbewegung als die Kontrollgruppe (0,12) oder die mit anti-G $\alpha_{i1/2}$ inkubierten Zellen (0,13).

Während zwischen den Zellen der Kontrollgruppe und denen mit spezifischen Antikörpern inkubierten Zellen in keinem Parameter signifikante Differenzen sichtbar werden, zeigen sich die deutlichen signifikanten Unterschiede insbesondere zwischen dem spezifischen und dem unspezifischen Antikörper.

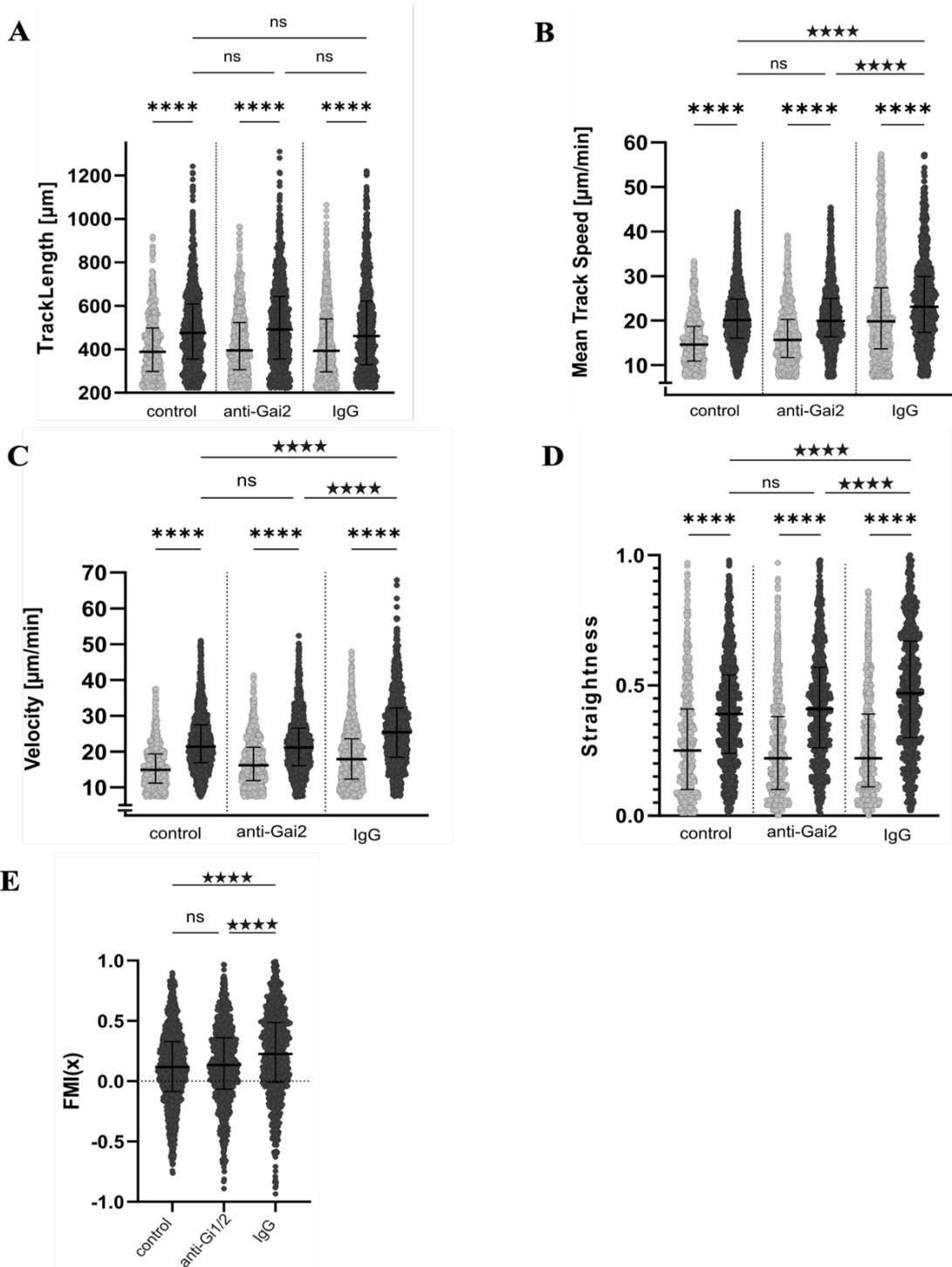


Abbildung 16: Analyse der Chemotaxisparameter von humanen Neutrophilen mit spezifischem anti-G α_{i2} -IgG-Antikörper im Vergleich zu unspezifischem IgG

Ergebnisse der unstimulierten (hellgrau) und mit fMLP stimulierten Zellen (dunkelgrau) in den drei untersuchten Gruppen: control (PBS), 10 min Inkubation mit anti-G α_{i2} , 10 min Inkubation mit unspezifischem IgG. Die Ergebnisse resultieren aus 4 Versuchen mit Zellen von 4 unterschiedlichen Spendern. Die Zellzahlen für die jeweiligen Parameter sind in Tabelle 8 (Anhang) aufgeführt. **A** Tracklength (Tracklänge) der Zellbewegung in μm (ab $220 \mu\text{m}$) **B** Mean Track Speed (Mittlere Zellgeschwindigkeit) in $\mu\text{m}/\text{min}$ **C** Velocity, Distanz der Migration über die Zeit in $\mu\text{m}/\text{min}$ **D** Straightness (Geradlinigkeit) der Zellbewegung (Wert von 0 bis 1) **E** Forward Migration Index towards fMLP, Effizienz der Migration in Richtung fMLP (Wert -1 bis +1)

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Funktion der G_{i2} - und G_{i3} -Proteine für die Chemotaxis. Bisherige Experimente der Arbeitsgruppe zeigten eine Verkleinerung des Infarktareals sowohl bei einer G_{i2} - als auch bei einer G_{i3} -Defizienz in Neutrophilen (Köhler, Beer-Hammer et al., unveröffentlicht). Besonders der doppelte Knockout zeigte einen starken Schutz vor dem Ausmaß des myokardialen IRI (mIRI). Zusätzlich konnte der Einsatz eines anti- $G\alpha_{i1/2}$ -Antikörpers etabliert werden, der bei Wildtyptieren ähnlich reduzierende Auswirkungen auf das Ausmaß des mIRI zeigte. Die Versuche der Arbeitsgruppe analysierten außerdem das Erscheinen und Vorkommen von PNCs im Blut und im Areal des mIRI (Köhler, Beichert, Killinger, Grothe et al., in revision). Besonders im infarzierten Gewebe war das PNC-Vorkommen bei allen Defizienzen geringer.

Um die Rolle von humanen und murinen Neutrophilen und ihren G_{i2} - und G_{i3} -Proteine beim mIRI besser zu verstehen, wurde ihr Chemotaxisverhalten *in vitro* untersucht. Es wurden dazu Neutrophile aus dem Knochenmark von *Gnai2*- und *Gnai3*-defizienten Mäusen isoliert (LysM-Cre-positiv) und mit denen ihrer nicht-defizienten Wurfgeschwister (LysM-Cre-negativ) verglichen. Auch die doppelte Defizienz wurde exemplarisch untersucht. Die Zellen wurden dafür zunächst aus murinem Knochenmark per MACS isoliert. Ihre Reinheit wurde über FACS kontrolliert und der Knockout mittels Immunoblots verifiziert. Ihre Migration in Richtung eines *Chemoattractants* wurde in Chemotaxiskammern über bildgebende und -analytische Verfahren betrachtet und ausgewertet. Um die Annahme zu stützen, dass die Defizienzen für eine veränderte Chemotaxis sorgen, wurden verschiedene Chemotaxisparameter und Indikatoren der Zellbewegung untersucht. Vorangegangene Daten legten nahe, dass weniger eine Veränderung in der Beweglichkeit der Zellen, sondern vielmehr eine beeinträchtigte Gerichtetheit der Zellmigration, für den Schutz vor einem mIRI verantwortlich ist.

Um die Wirkung des genannten anti- $G\alpha_{i1/2}$ -Antikörpers auf die Chemotaxis der Neutrophilen zu untersuchen, wurden die Parameter ebenfalls bei murinen, mit diesem Antikörper inkubierten Neutrophilen aufgezeichnet und ausgewertet. Als Kontrolle wurde zusätzlich ein unspezifischer anti-IgG-Antikörper verwendet. Der spezifische Antikörper bot außerdem die Möglichkeit den Versuch mit humanen Neutrophilen

durchzuführen, welche aus dem Blut gesunder Probanden isoliert wurden. Die aufgenommenen Bilddaten der migrierenden Zellen wurden mithilfe verschiedener Software prozessiert. Letztendlich konnten so alle Zellbewegungen dargestellt und deren Koordinaten analysiert werden. Die gewonnenen Daten wurden statistisch ausgewertet und innerhalb der Gruppen miteinander verglichen, um die verschiedenen Aufgaben und Funktionsweisen der $G\alpha$ -Isoformen spezifizieren zu können.

Hervorzuheben ist, dass sich die vorliegende Arbeit auf die Migration der Neutrophilen fokussiert hat, da diese die entsprechenden Defizienzen aufweisen. Noch ist wenig über den genauen Mechanismus der Interaktion von Thrombozyten mit Immunzellen, insbesondere mit Neutrophilen, und den Ablauf der PNC-Bildung bekannt. Aktuelle Studien deuten jedoch darauf hin, dass Thrombozyten ischämische Entzündungsreaktionen regulieren, indem sie PNCs bilden und die Neutrophilen in das ischämische Gewebe leiten, was zum mIRI führt (Granja et al., 2022; Mauler et al., 2016). Es bleibt in nachfolgenden Versuchen zu untersuchen, inwieweit die vorliegenden Ergebnisse auf das Chemotaxisverhalten der PNCs übertragen werden können.

4.1 Analyse der Reinheit der isolierten neutrophilen Granulozyten mittels Durchflusszytometrie

Da anhand der Bilddaten nicht festgestellt werden konnte, ob es sich um neutrophile Granulozyten handelte, war es notwendig bereits vorher die Reinheit der Zellpopulation festzustellen. Für aussagekräftige Ergebnisse musste diese möglichst hoch sein. Daher wurden stichprobenartig Aliquots der isolierten Zellen mittels FACS analysiert. Nach der MACS-Isolation mit dem *Neutrophil Isolation Kit* konnten per Durchflusszytometrie durchschnittlich 90,0% der Zellen als $CD11b^+ Ly6G^+$ erkannt werden.

Da bei der MACS-Isolation die neutrophilen Granulozyten Teil der negativen, nicht mit Microbeads markierten Fraktion waren, kann keine vorherige Sättigung von CD11b oder Ly6G stattgefunden haben und eine Färbung mit den FACS-Antikörpern ist ausreichend möglich gewesen. Der Wert der Reinheit von 90% kann daher als genau angenommen werden.

4.2 Nachweis des $G\alpha_{i2}$ / $G\alpha_{i3}$ -Knockouts mittels Immunoblot

Um den Neutrophilen-spezifischen Knockout exemplarisch nachzuweisen, wurden Immunoblots mit Neutrophilen der *Gnai2*-LysM-Cre⁺ und *Gnai3*-LysM-Cre⁺ Tiere angefertigt und mit Neutrophilen ihrer Cre-negativen Wurfgeschwister verglichen. Als Kontrolle diente Lungengewebe aus global *Gnai2*- und *Gnai3*-defizienten Tieren.

Es ergab sich eine Verringerung von 55% für das $G\alpha_{i2}$ -Protein und 63% für das $G\alpha_{i3}$ -Protein. Vorangegangene Versuche der Arbeitsgruppe konnten etwas höhere Prozentanteile nachweisen (66-78%) (Köhler, Beichert, Killinger, Grothe et al., in revision). Dennoch wird für die LysM-Cre-Mauslinie eine Deletion der geflochtenen Gene in Granulozyten von 99% angegeben (Clausen et al., 1999). Weshalb sich die Diskrepanz zu dem Knockout der vorliegenden Arbeit so groß darstellt, ist zu diskutieren. Die Reinheit der Proben ergab durchschnittlich 90% neutrophile Granulozyten. Der restliche Anteil an anderen Zellen in der Probe erklärt daher nur einen geringen Teil der Abweichung. Da die Zellen aus dem Knochenmark stammen, befinden sich vermutlich einige frühe Neutrophile unter den isolierten Zellen. Weil das LysM-Gen erst zu einem späteren Zeitpunkt angeschaltet wird, verfügen diese Neutrophile noch über keine Expression der Cre-Rekombinase und ein vollständiger Knockout kann noch nicht erzielt werden. Dies könnte die Abweichung der vorliegenden Werte von den Literaturwerten zusätzlich erklären.

Da der Knockout nur in 60% der Zellen erfolgreich war, muss dies natürlich bei der Auswertung der anschließenden Experimente bedacht werden. Dies könnte bedeuten, dass die folgenden Ergebnisse deutlicher ausfallen würden, wenn mit einer annähernd vollständigen Deletion gearbeitet werden könnte.

4.3 Analyse der Chemotaxisparameter

Um das Chemotaxisverhalten der verschiedenen Neutrophilen aussagekräftig vergleichen zu können, wurden Migrations-spezifische Parameter und eine große Anzahl an Zellen analysiert (siehe 2.10.8. und Anhang). Die Ergebnisse der Parameter der defizienten bzw. mit Antikörper inkubierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen wurden statistisch ausgewertet.

4.3.1 Analyse der Chemotaxis von murinen, $G\alpha_{i2}$ -defizienten Neutrophilen

Die Analyse der Daten der $G\alpha_{i2}$ -defizienten Neutrophilen ergab signifikante Unterschiede in der *Track Length* ($p < 0,05$) und dem *Forward Migration Index(x)* ($p < 0,0001$) im Vergleich der stimulierten Cre-positiven (TG) mit den Cre-negativen Zellen (WT) (siehe 3.4). In diesen beiden Parametern wiesen die transgenen Zellen deutlich geringere Werte auf, während in den anderen Parametern keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten.

Vor allem der sehr viel niedrigere *FMI(x)* lässt die Schlussfolgerung zu, dass $G\alpha_{i2}$ eine wesentliche Aufgabe bei der gerichteten Chemotaxis spielt. Zu bedenken ist dennoch, dass keine Signifikanz in der *Straightness* gemessen werden konnte. Diese Diskrepanz der beiden Parameter kann mit einer zwar ähnlich geradlinigen Zellbewegung von Cre-negativen und -positiven Neutrophilen erklärt werden, die sich in der *Straightness* zeigt, aber nicht gleich effizient in Richtung des *Chemoattractants* zu verlaufen scheint.

Gleichzeitig kann von einer Wirkung des G-Proteins auf die Länge der Zellbewegung ausgegangen werden. Die Ergebnisse können durchaus erklären, weshalb der mIRI der *Gnai2*-Cre-positiven Tiere geringer ausfiel und stützen die Untersuchungen zum PNC-Vorkommen im Infarktgewebe. Während die PNC-Bildung im Blut gleichbleibend war, konnten weniger PNCs im Infarktgewebe festgestellt werden (Köhler, Beichert, Killinger, Grothe et al., in revision). Die durch die $G\alpha_{i2}$ -Defizienz inhibierte Chemotaxis könnte eine verminderte Migration der PNCs ins Gewebe erklären. Weitere Studien beobachten jedoch insbesondere eine gestörte Transmigration der $G\alpha_{i2}$ -defizienten Neutrophilen, durch eine verminderte Adhäsion (*arrest*) der Neutrophilen am Endothel (Kuwano et al., 2016; Zarbock et al., 2007). In den vorliegenden Versuchen wurde allein die freie Migration in einer gewebeähnlichen Kollagenmatrix untersucht. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass sowohl die schlechter gerichtete Migration, als auch die verminderte Transmigration, dazu beitragen, dass weniger Neutrophile im infarzierten Gewebeanteil beobachten werden können. Ergebnisse von Kuwano et al., welche ebenfalls die Chemotaxis von $G\alpha_{i2}$ -defizienten Neutrophilen untersucht hatten, zeigten allerdings keine signifikanten Unterschiede in der Tracklänge und dem *Chemotactic index* im Vergleich zum Wildtyp (Kuwano et al., 2016). Es sollte jedoch bedacht werden, dass diese Ergebnisse aus einer wesentlich kleineren Stichprobe resultieren (80-110 Zellen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen) und das Versuchssetting unter

grundsätzlich anderen Bedingungen durchgeführt wurde. Beispielsweise wurde nicht fMLP, sondern CXCL1 als *Chemoattractant* verwendet. Die Neutrophilen wurden außerdem nicht in eine Kollagenmatrix eingebracht, sondern auf einer mit ICAM1 und Casein beschichteten Glasoberfläche beobachtet und manuell segmentiert und verfolgt. Dies kann für die Unterschiede zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit verantwortlich sein. Die Auswertung der Migration der Neutrophilen von Kuwano et al. beinhaltet zudem nur die Länge der Zellpfade sowie den Chemotaxisindex (Gradient / totale Tracklänge).

4.3.2 Analyse der Chemotaxis von murinen, $G\alpha_{i3}$ -defizienten Neutrophilen

Analog durchgeführte Experimente mit *Gnai3*-LysM Tieren (siehe 3.5) ergaben stark signifikante Unterschiede für die Stimulation mit fMLP in der *Straightness* und dem *Forward Migration Index(x)* (für beide $p < 0,0001$). Letzterer liegt mit einem Wert von 0,22 für die Cre-negativen Neutrophilen 0,157 über dem Wert der Cre-positiven Zellen. Die $G\alpha_{i3}$ -defizienten Zellen weisen eine sehr viel weniger gerichtete Motilität und weniger effiziente Chemotaxis auf. In den Parametern *Track Length*, *Speed* und *Velocity* konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Motilität selbst scheint daher durch den Knockout nicht unbedingt eingeschränkt zu sein. Zu beachten ist jedoch, dass nicht von einer vollständig funktionierenden Stimulation der Zellen durch das *Chemoattractant* ausgegangen werden kann. Leider zeigt der Vergleich der stimulierten zu unstimulierten Neutrophilen innerhalb einer Gruppe nicht immer einen signifikanten Anstieg des Parameters. Vor allem die Stimulation der Cre-negativen Zellen (WT) mit fMLP zeigt in *Track Length*, *Speed* und *Velocity* keine Veränderung der Parameter. Gleiches gilt für die transgenen Zellen in *Speed* und *Straightness*. Die Aussagekraft über die veränderte Motilität der transgenen Neutrophilen ist damit recht gering. Dennoch konnten Kuwano et al. bereits ähnliche Ergebnisse präsentieren, in denen eine $G\alpha_{i3}$ -Defizienz in Neutrophilen deren Chemotaxis um 50% verringerte, während die zufällige Migration keinen Unterschied zu der von Wildtypen zeigte. Die veränderte Chemotaxis konnten sie durch eine verringerte Transmigration *in vitro* stützen (Kuwano et al., 2016).

4.3.3 Analyse der Chemotaxis von murinen, $G\alpha_{i2/3}$ -defizienten Neutrophilen

Auch die Tiere mit doppelt-defizienten Neutrophilen sind deutlich vor einem starken Ausmaß des IRI geschützt, wie in vorherigen Studien der Arbeitsgruppe festgestellt werden konnte. Die durch ADP-induzierte PNC-Bildung im Blut ist bei ihnen allerdings deutlich stärker als bei den einzelnen Knockouts (Dissertation Killinger, unveröffentlicht).

Um einen ersten Eindruck zu gewinnen, wie sich die Zellen des doppelten Knockouts während der Chemotaxis verhalten, wurde ein Versuchspaar im genannten Setting untersucht. Interessanterweise ergaben sich deutlich andere Ergebnisse als in den Einzelknockouts (siehe 3.6). In den Parametern der generellen Zellbewegung lagen die Werte der transgenen stark signifikant über denen der nicht-transgenen Neutrophilen ($p < 0,001$). Die Zellen scheinen weitere Strecken mit höherer Geschwindigkeit zurückzulegen. Im interessanten Gegensatz dazu war der *Forward Migration Index* (x) der transgenen Zellen stark signifikant kleiner als der Index der nicht-transgenen Zellen ($p < 0,001$). Die *Straightness* zeigte keinen signifikanten Unterschied. Die doppelt-defizienten Neutrophilen zeigten also eine gesteigerte Zellmotilität, jedoch fast keine koordinierte Chemotaxis. Dies könnte nochmals ein Anhaltspunkt dafür sein, dass sowohl $G\alpha_{i2}$ als auch $G\alpha_{i3}$ für die gerichtete Zellbewegung essenziell sind. Sie scheinen im Bereich der Chemotaxis ähnliche Funktionen zu besitzen. Gleichzeitig ist durch den doppelten Knockout die Hochregulation des jeweils in den vorherigen Versuchen noch vorhandenen G-Proteins ausgeschlossen. Dass die Unterschiede zum Wildtyp stärker ausfielen als in den vorangegangenen Versuchen, stützt die Annahme, dass beim Einzelknockout die noch vorhandene Isoform hochreguliert wird. Dies sollte in zukünftigen Untersuchungen analysiert werden.

Jegliche Signalwege durch $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ sind durch den doppelten Knockout unterbrochen. Die Steigerung der Zellmotilität durch die doppelte Defizienz kann im Umkehrschluss auf eine regulierende Funktion der Zellbewegung durch die G-Proteine hinweisen. Dies könnte auch zur PNC-Bildung beitragen, die sich bei diesen Tieren als deutlich stärker herausgestellt hat. Auch ohne Stimulation durch das *Chemoattractant* bewegten sich die Cre-positiven Neutrophilen deutlich weiter und schneller als die Cre-negativen. $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ könnten also insbesondere dafür sorgen, dass eine ineffektive Zellbewegung durch negative Rückkopplungsmechanismen herunterreguliert wird.

Damit und durch eine direktere Migration tragen sie zur effizienteren Energieverwendung und Chemotaxis bei.

Zu bedenken ist, dass zwar einige hundert Neutrophile (siehe Tabelle 6, Anhang) in diesem Versuch betrachtet und analysiert wurden, jedoch nur ein Versuchstierpaar verwendet wurde. Um endgültigere Aussagen zu treffen und diese mit den vorangestellten Versuchen zu vergleichen, müssten mindestens drei weitere Versuchstierpaare untersucht werden.

4.3.4 Analyse der Chemotaxis von murinen Neutrophilen nach Behandlung mit spezifischem anti- $G\alpha_{i1/2}$ Antikörper

Wie bereits erwähnt, konnte in vorangegangenen Versuchen ein anti- $G\alpha_{i1/2}$ Antikörper etabliert werden, dessen i.v. Applikation bei Mäusen das Ausmaß des mIRI um 50% und das PNC-Vorkommen im infarzierten Gewebe im Vergleich zu Kontrollen deutlich reduzierte (Köhler, Beichert, Killinger, Grothe et al., in revision). Um zu untersuchen, ob der $G\alpha_{i1/2}$ Antikörper auch die Migration von Neutrophilen beeinflusst, wurden Neutrophile aus Wildtyptieren isoliert und vor Versuchsbeginn mit dem spezifischen Antikörper inkubiert. Als Kontrollen dienten Neutrophile, welche mit unspezifischem IgG-Antikörper inkubiert wurden und Neutrophile ohne jegliche Antikörperinkubation (siehe 3.7).

Die Stimulation der Zellen durch fMLP erscheint in diesem Versuch erfolgreich, da sie für alle Gruppen die Parameter, bis auf die *Straightness* aller Gruppen und die *Track Length* der mit IgG-inkubierten Zellen, signifikant ansteigen lässt ($p < 0,0001$). Interessant zu diskutieren ist die Beobachtung, dass keine signifikante Veränderung der *Straightness* durch fMLP stattfand. Es ist nur ein leichter Anstieg des Medians in allen Gruppen zu sehen und auch die Werte für den $FMI(x)$ befinden sich durch die Stimulation im positiven Bereich. Es kann die Vermutung aufgestellt werden, dass die murinen Zellen anders als in den vorherigen Versuchen geringer auf das *Chemoattractant* reagierten. Zwar kam es zu einer Steigerung der Parameter der generellen Zellbeweglichkeit, jedoch nicht zu einer ausreichend gesteigerten Gerichtetheit der Migration. Da dies in allen drei Gruppen ähnlich auftritt, kann die Antikörperinkubation nicht als einzige Ursache dienen. Ob die Antikörperaufnahme einen Effekt auf die Reaktion der Zellen auf fMLP gehabt

hat, wird aber unter Umständen hier zu wenig sichtbar, da sich kein Unterschied zur Kontrollgruppe abzeichnete.

Es wurde eine Antikörperkonzentration von 1:100 gewählt und die Neutrophilen mit diesem für 10 min auf Eis inkubiert. Eventuell war Dauer und Konzentration der Inkubation nicht ausreichend, bevor die Zellen in die Kollagenmatrix gegeben wurden. Außerdem könnten die zwischenzeitlichen Temperaturunterschiede durch die Inkubation der Zellen auf Eis und anschließende Inkubation bei 37°C zu viel Stress für die murinen Neutrophilen dargestellt haben. Ihre Viabilität könnte damit so weit verschlechtert gewesen sein, dass keine signifikanten Unterschiede mehr messbar waren.

Im Vergleich der Gruppen miteinander ließ sich nur ein signifikanter Unterschied feststellen. Die mittlere Zellgeschwindigkeit der mit anti-G $\alpha_{i1/2}$ inkubierten, stimulierten Zellen war leicht signifikant größer als die der stimulierten Neutrophilen der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Leider lassen sich daraus keine aussagekräftigen Rückschlüsse über die Auswirkung des spezifischen Antikörpers auf die Chemotaxis der murinen Neutrophilen ziehen. Es können ebenfalls keine Parallelen zu den Ergebnissen der G α_{i2} -defizienten Zellen gezogen werden.

In den Versuchen mit humanen Neutrophilen zeigte der spezifische-IgG-Antikörper dagegen deutlichere Wirkung. Da also die generelle Wirkung des Antikörpers bestätigt ist, könnten im vorliegenden Fall genannte Probleme im Versuchssetting verantwortlich gewesen sein.

4.3.5 Analyse der Chemotaxis von humanen Neutrophilen nach Behandlung mit spezifischem anti-G $\alpha_{i1/2}$ Antikörper

Die bereits genannten vorangegangenen Versuche der Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die Wirkung des spezifischen Antikörpers zu Teilen auf humane Neutrophile übertragbar ist. Die Inkubation mit dem Antikörper sorgte für eine verminderte transendotheliale Migration der Neutrophilen *in vitro* im Vergleich zu unspezifischem IgG (Köhler, Beichert, Killinger, Grothe et al., in revision). Auch die vorliegende Analyse der Chemotaxisparameter zeigte signifikante Unterschiede zwischen den beiden Antikörpern (siehe 3.8).

Über alle Gruppen und Parameter hinweg, zeigte fMLP eine signifikante Steigerung der Werte. Die Neutrophilen haben somit deutlich auf das *Chemoattractant* reagiert ($p < 0,0001$).

Für die mittlere Zellgeschwindigkeit, die *Velocity*, die *Straightness* und den *FMI(x)* zeigte der Vergleich der stimulierten mit unspezifischem IgG inkubierten Zellen zur Kontrollgruppe und zu den mit anti- $G\alpha_{i1/2}$ inkubierten Zellen durchgehend stark signifikant höhere Werte ($p < 0,0001$). In der *Track Length* ließen sich zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede feststellen. Außerdem ergaben sich für keinen Parameter signifikante Werteunterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den mit spezifischem-IgG inkubierten Neutrophilen.

Im entscheidenden Vergleich des anti- $G\alpha_{i1/2}$ Antikörpers zum unspezifischem IgG kann von einer weniger schnellen und weniger effizienten Migration der Neutrophilen gesprochen werden. Dass dieser wie vermutet für eine Minderung der Migrationseffizienz sorgt, kann damit bestätigt werden, da er nicht wie das unspezifische IgG die Migration der Neutrophilen zu verstärken scheint. *In vivo* opsoniert IgG fremde Erreger, indem es mit seinem Fab-Fragment an Antigene bindet. Die Fc-Fragmente der Immunglobuline können von Neutrophilen erkannt und gebunden werden, um die Phagozytose der Erreger auszulösen (Schütt & Bröker, 2011). Gleichzeitig steigern sie dadurch die Migration der Neutrophilen in Richtung der opsonierten Partikel. Wie Neutrophile exprimieren auch alle anderen myeloischen Zellen FcRs (Fc-Rezeptoren) und sind in der Lage, auf Antikörper zu reagieren. Spezifische Antigen-gebundene IgGs binden nicht nur FcRs und aktivieren diese, sondern können auch die Aktivierung der Komplementkaskade auslösen.

Die in der Kaskade entstehenden Produkte können Komplementrezeptoren (CRs) binden. Neutrophile exprimieren verschiedene CRs, die nach der Bindung von Komplementprodukten die Zellaktivierung und Chemotaxis auslösen können. Es wird bisher vermutet, dass die FcR-Signalwege und die CR-Signalwege miteinander verbunden sind und ihre Interaktion eine additive Wirkung auf die Chemotaxis hat (Jönsson et al., 2013). Dies kann eine erklärende Ursache für die gesteigerten Parameter durch IgG in den vorliegenden Ergebnissen sein.

4.4 Diskussion des experimentellen Versuchssettings und der Auswertung

Zur Gewinnung der murinen Neutrophilen wurden mehrere Verfahren getestet. Bei den humanen Zellen handelt es sich um reife Neutrophile aus dem Blut. Gerade deshalb ist es erstrebenswert die murinen Zellen zur besseren Vergleichbarkeit ebenfalls aus Blut zu gewinnen. Leider konnten aus der geringen Menge Blut der Tiere nicht ausreichend Neutrophile für das Experiment isoliert werden. Es wurden pro Experiment zwar nur 60.000 bis 120.000 Neutrophile benötigt, jedoch musste eine Konzentration von mindestens 6×10^6 Neutrophile / ml Medium erreicht werden. Bei sehr geringen Zellzahlen ergab sich daher eine zu geringe Menge Medium, um die Neutrophilen vernünftig weiterzuverarbeiten und transportieren zu können. Als geeigneter erwiesen sich Zellzahlen von mindestens 200.000 Neutrophilen. Diese Zahl konnte nur über die Isolierung aus dem Knochenmark erreicht werden. Dabei ist zu bedenken, dass sich dort auch unreife Neutrophile unter den isolierten Zellen befanden, die noch keinen vollständigen Knockout aufwiesen.

Ob murine Neutrophile aus Blut aktiver auf den *Chemoattractant* reagieren und damit zu den humanen Zellen besser vergleichbar wären, müsste in weiteren Versuchen mit eventuell geringeren Zellzahlen geklärt werden. Allerdings zeigen Studien, dass murine Neutrophile aus dem Blut nur halb so lange in Zellkultur überleben wie Zellen des Knochenmarks (Boxio et al., 2004).

Außerdem ist zu diskutieren, ob humane und murine Zellen unter denselben Bedingungen beobachtet werden können. Bei der Etablierung des Versuchssettings ergab sich unter denselben Umständen eine viel geringere Viabilität bzw. Beweglichkeit für die murinen Neutrophilen. Daher wurde, auch auf Empfehlung des Herstellers der Chemotaxiskammern, eine Kollagenmatrix erstellt, die außerdem eine gewisse Vergleichbarkeit zum Kollagengeflecht *in vivo* darstellte.

Humane Neutrophile wurden in ihrem Medium in unbeschichteten Kammern untersucht. Inwieweit dies Auswirkung auf die Chemotaxisparameter hat, müsste in weiterführenden Versuchen beurteilt werden. Man kann sich vorstellen, dass eine Kollagenmatrix sowohl die Richtung als auch die Geschwindigkeit der Zellbewegungen beeinflusst.

4.5 Diskussion der Bildauswertung

Bislang ist leider keine Software verfügbar, welche sowohl die Segmentierung der Zellaufnahmen im *brightfield* als auch ein anschließendes Tracking der Zellbewegung in Videosequenzen vornehmen kann. Daher wurden einige Programme getestet und kombiniert. Die gewählte Methode über die Segmentierung mit dem *ImageJ* Plug-in ‚Trainable Weka Segmentation‘ und das Tracking per *Imaris* bot die beste Bearbeitungsweise. Dennoch bietet dieser Bereich einige Optimierungsmöglichkeiten. Der häufig limitierende Faktor ist wie in der vorliegenden Arbeit die große Anzahl der zu analysierenden Zellen. Kleinere Mengen an Zellen werden häufig immer noch manuell von Bild zu Bild verfolgt. Um stärkere Signifikanzen zu erhalten, Zeit zu sparen und manuelle Fehler zu beseitigen, ist eine Automatisierung des Prozesses erstrebenswert. Die meisten „Zellverfolgungstools“ gehen jedoch davon aus, dass die Zellen als helle Bereiche vor einem dunkleren Hintergrund modelliert werden können (das Szenario der Fluoreszenzmikroskopie). Wenn dies nicht der Fall ist oder die Bilder zu stark verrauscht sind, müssen geeignete Filter angewendet werden (Meijering et al., 2012). Da die vorliegende Arbeit kontrastarme *brightfield* Aufnahmen nutzte, mussten diese erst bearbeitet werden, um einen ausreichenden Kontrast zur Partikelverfolgung zu erzeugen. Einfacher wäre daher ein Experimentaufbau mit fluoreszierenden Neutrophilen. Es gilt genauer herauszufinden, wie eine Fluoreszenz möglich ist, ohne die Migration und Viabilität der Neutrophilen und die Wirkung der Versuchsantikörper zu beeinflussen. Ein Ansatz ist eine genauere Untersuchung von Neutrophilen der Ly6G-Cre-(„Catchup“-) Mauslinie, deren Neutrophile über das Protein tdTomato rot fluoreszieren (Hasenberg et al., 2015). Für intravitale Zwei-Photonen-Mikroskopie haben sich diese Neutrophile bereits als sehr gut darstellbar erwiesen. *In Vitro* zeigten die Neutrophilen lediglich eine insignifikant höhere *Velocity* als die Kontrollen. Eine andere Möglichkeit bietet das grün fluoreszierende Protein (GFP), das über das Einschleusen in den Lysozym M-Lokus der Maus für grün fluoreszierende Granulozyten und Makrophagen sorgt (Faust et al., 2000). Allerdings ist in diesem Modell die Deletion der $G\alpha$ -Untereinheiten nicht zusätzlich möglich. Diese Versuchstiere könnten aber für weitere Antikörperversuche sinnvoll eingesetzt werden. Inwieweit die Zellen dieser Tiere über *Live Cell Imaging* zu untersuchen sind, gilt zu überprüfen. Wenn dies möglich ist, könnte mithilfe einer Software wie bspw. *Imaris* sowohl Segmentierung als auch Tracking erfolgen.

Auch wenn mit den hier genutzten Methoden die Kombination von Segmentierung und *Tracking* erfolgreich war, gilt es diesen Prozess in der Zukunft zu vereinfachen, adaptiver zu gestalten und in einer Software zu integrieren. Besonders um *brightfield* - Aufnahmen analysieren und auf Fluoreszenzen verzichten zu können. Die Techniken dafür sind bereits gegeben, müssen aber unter Anderem weiter kombiniert und ausgearbeitet werden. Beispielsweise können über das Trainieren von neuronalen Netzwerken mit hochwertigen Datensätzen Klassifiziermethoden etabliert werden. Je besser diese trainiert und spezifiziert sind, desto genauer ist eine Zellsegmentierung, welche Grundlage für die erfolgreiche Zellverfolgung ist.

4.6 Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse konnten die Hypothese stützen, dass den $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -Untereinheiten wesentliche Rollen in der Chemotaxis und Migration von Neutrophilen zukommen. Diese scheinen sich teilweise zu decken, teilweise zu unterscheiden. Um die Funktion für die Chemotaxis zu spezifizieren und Signalwege auszumachen, sollten zukünftige Experimente mögliche Bindungspartner der G-Proteine untersuchen. Diese sollten hinsichtlich ihrer Expressionslevel und Lokalisation in den Zellen beobachtet werden. Interessant zu untersuchen ist dabei der Vergleich zwischen defizienten und wildtypischen Zellen. Beispielsweise können Versuche in Immunoblots, aber auch nach Polarisation der Zellen Aufschluss über die Signalkaskaden der beiden verschiedenen $G\alpha$ -Isoformen geben. Bisherige Studien konnten bereits für die Migration wesentliche Bindungspartner ausmachen, wie bspw. das Protein mINSC, welches über LGN/AGS3 (Gpsm1) an $G\alpha_i$ -Proteine bindet und den Par3-Par6-aPKC Komplex ans führende Zellende navigiert (Kamakura et al., 2013). Als spezifischer Bindungspartner für $G\alpha_{i2}$ wurde Homer3 entdeckt, welches ebenfalls essenziell für die Ausbildung des Aktinskeletts und die Polarität von Neutrophilen zu sein scheint (Wu et al., 2015). Die Studienlage zeigt, dass es neben den kanonischen, weitere nicht-kanonische Signalwege gibt, welche wesentliche Aufgaben in der Chemotaxis übernehmen. Es gilt diese zu identifizieren, um in Zukunft Zellmigration besser zu verstehen und mit oder innerhalb dieser neue Ansatzpunkte für Medikamente zu finden. So könnte zukünftig eventuell auch der Reperfusionsschaden durch spezifische Medikamentenintervention behandelt werden.

Ein weiterer Schritt ist die Beobachtung der Zellen in ihrer natürlichen Umgebung. Mittlerweile ist dies über intravital Mikroskopie möglich und kann genauere Ergebnisse hinsichtlich Zellbewegung und insbesondere Transmigration durchs Endothel *in vivo* liefern (Giampetraglia & Weigelin, 2021). Um die Migration der Neutrophilen im IRI *in vivo* verfolgen zu können, wird eine Kombination der intravital Mikroskopie mit einem *in vivo* IRI-Modell durchgeführt. Beispielsweise sollen G_{i2} - und G_{i3} - defiziente Mäuse in einem TMCAO-Modell (*transient middle cerebral artery occlusion*) *in vivo* untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Während neutrophile Granulozyten einerseits als wichtige Immunzellen den Organismus vor der Ausbreitung von Erregern schützen, sind sie andererseits relevant für die Entwicklung von Krankheiten und tragen wesentlich zur Entstehung des Reperfusionsschadens nach Ischämien bei. Vorangegangene Experimente zeigten, dass spezifische Knockouts bzw. ein spezifischer Antikörper für die $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -Untereinheiten der in Neutrophilen vorkommenden G-Proteine eine Reduktion des mIRI bewirken. Die vorliegende Arbeit konnte die Vermutung bestätigen, dass eine veränderte Chemotaxis und Migration zum schützenden Effekt durch den Knockout und den anti- $G\alpha_{i1/2}$ -IgG beiträgt bzw. für diesen verantwortlich ist. $G\alpha_{i2}$ -defiziente Neutrophile zeigten *in vitro* eine deutlich schlechtere Gerichtetheit und kürzere Zellbewegungen als ihre Kontrollen, womit sich die $G\alpha_{i2}$ -Isoformen als essenziell für eine effektive Chemotaxis herausstellte. Ebenfalls unabdingbar für eine funktionierende Migration ist die $G\alpha_{i3}$ -Isoformen. Dessen Knockout veränderte zwar nicht die Motilität der Neutrophilen, sorgte jedoch für eine stark signifikant verringerte Gerichtetheit der Chemotaxis. Der Knockout beider Untereinheiten zeigte überraschende Ergebnisse. Die Neutrophilen wiesen eine deutlich stärkere Motilität bei gleichzeitig völlig ungerichteter Migration auf. Der Einsatz des spezifischen anti- $G\alpha_{i1/2}$ -Antikörpers konnte an vorangegangenen Versuchen anknüpfen. Humane Neutrophile zeigten unter seinem Einfluss eine langsamere und weniger effiziente Migration, während murine Zellen zu gering auf den Antikörper reagierten, um endgültige Aussagen treffen zu können.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Funktionalität der Migration von murinen und humanen Neutrophilen auf die Signalwege der $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -Untereinheiten angewiesen ist. Die Einschränkung der Migration kann verantwortlich sein für eine Reduktion des mIRI, indem es die Chemotaxis und Transmigration von Neutrophilen in infarzierte Areale behindert. Inwieweit diese Ergebnisse auf Neutrophile *in vivo* und insbesondere auf PNCs übertragbar sind, bleibt zu klären. Es gilt außerdem die Signalwege der Untereinheiten bei der Migration zu untersuchen und genauer zu verstehen, um mögliche, spezifische Ansatzpunkte zur medikamentösen Intervention zu identifizieren. Dazu ist es ebenfalls nötig die Prozessierung von *Life Cell Imaging* zu optimieren und zugänglicher für Daten, wie sie in dieser Arbeit genutzt wurden, zu gestalten.

6 Literaturverzeichnis

- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D., & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: From mechanisms to disease. *Annual Review of Immunology*, 30, 459–489. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074942>
- Arganda-Carreras, I., Kaynig, V., Rueden, C., Eliceiri, K. W., Schindelin, J., Cardona, A., & Sebastian Seung, H. (2017). Trainable Weka Segmentation: a machine learning tool for microscopy pixel classification. *Bioinformatics*, 33(15), 2424–2426. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx180>
- Birnbaumer, L. (2010). Signal transduction by G proteins. basic principles, molecular diversity, and structural basis of their actions. *Handbook of Cell Signaling*, 2/E, 2, 1597–1614. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374145-5.00197-2>
- Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity*, 33(5), 657–670. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.011>
- Boullaran, C., & Kehrl, J. H. (2014). Implications of non-canonical G-protein signaling for the immune system. *Cellular Signalling*, 26(6), 1269–1282. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.02.010>
- Boxio, R., Bossenmeyer-Pourié, C., Steinckwich, N., Dournon, C., & Nüße, O. (2004). Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(4), 604–611. <https://doi.org/10.1189/jlb.0703340>
- Branzk, N., Lubojemska, A., Hardison, S. E., Wang, Q., Gutierrez, M. G., Brown, G. D., & Papayannopoulos, V. (2014). Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nature Immunology*, 15(11), 1017–1025. <https://doi.org/10.1038/ni.2987>
- Christen, P., Jaussi, R., & Benoit, R. (2016). Rezeptoren und Signaltransduktion. In *Biochemie und Molekularbiologie* (pp. 331–344). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-46430-4_27
- Clausen, B. E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R., & Förster, I. (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Research*, 8(4), 265–277. <https://doi.org/10.1023/A:1008942828960>
- Crocker, B. A., Metcalf, D., Robb, L., Wei, W., Mifsud, S., DiRago, L., Cluse, L. A., Sutherland, K. D., Hartley, L., Williams, E., Zhang, J.-G., Hilton, D. J., Nicola, N. A., Alexander, W. S., & Roberts, A. W. (2004). SOCS3 Is a Critical Physiological Negative Regulator of G-CSF Signaling and Emergency Granulopoiesis. *Immunity*, 20(2), 153–165. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(04\)00022-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1074-7613(04)00022-6)
- Daëron, M., Jaeger, S., Du Pasquier, L., & Vivier, E. (2008). Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: A quest in the past and future. *Immunological Reviews*, 224(1), 11–43. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00666.x>
- DeLeo, F. R., & Allen, L.-A. H. (2020). Phagocytosis and neutrophil extracellular traps. *Faculty Reviews*, 9. <https://doi.org/10.12703/r/9-25>
- Devanathan, V., Hagedorn, I., Köhler, D., Pexa, K., Cherpokova, D., Kraft, P., Singh, M., Rosenberger, P., Stoll, G., Birnbaumer, L., Piekorz, R. P., Beer-Hammer, S., Nieswandt, B., & Nürnberg, B. (2015). Platelet Gi protein Gai2 is an essential mediator of thrombo-inflammatory organ damage in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(20), 6491–6496. <https://doi.org/10.1073/pnas.1505887112>
- Faust, N., Varas, F., Kelly, L. M., Heck, S., & Graf, T. (2000). Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent

- granulocytes and macrophages. *Blood*, 96(2), 719–726. <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/blood.V96.2.719>
- Franca-Koh, J., Willard, S. S., & Devreotes, P. N. (2010). G-protein signaling in chemotaxis. *Handbook of Cell Signaling*, 2/E, 2, 1705–1712. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374145-5.00207-2>
- Giampetraglia, M., & Weigelin, B. (2021). Recent advances in intravital microscopy for preclinical research. *Current Opinion in Chemical Biology*, 63(Ivm), 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.05.010>
- Granger, D. N., & Kvietys, P. R. (2015). Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biology*, 6, 524–551. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.020>
- Granja, T. F., Köhler, D., Leiss, V., Eggstein, C., Nürnberg, B., Rosenberger, P., & Beer-Hammer, S. (2022). Platelets and the Cybernetic Regulation of Ischemic Inflammatory Responses through PNC Formation Regulated by Extracellular Nucleotide Metabolism and Signaling. *Cells*, 11(19). <https://doi.org/10.3390/cells11193009>
- Gudermann, T., Schöneberg, T., & Schultz, G. (1997). FUNCTIONAL AND STRUCTURAL COMPLEXITY OF SIGNAL TRANSDUCTION VIA G-PROTEIN-COUPLED RECEPTORS. *Annual Review of Neuroscience*, 20(1), 399–427. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.20.1.399>
- Gute, D. C., Ishida, T., Yarimizu, K., & Korhous, R. J. (1998). Inflammatory responses to ischemia, and reperfusion in skeletal muscle. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 179(1), 169–187. <https://doi.org/10.1023/A:1006832207864>
- Hasenberg, A., Hasenberg, M., Männ, L., Neumann, F., Borkenstein, L., Stecher, M., Kraus, A., Engel, D. R., Klingberg, A., Seddigh, P., Abdullah, Z., Klebow, S., Engelmann, S., Reinhold, A., Brandau, S., Seeling, M., Waisman, A., Schraven, B., Göthert, J. R., ... Gunzer, M. (2015). Catchup: A mouse model for imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes. *Nature Methods*, 12(5), 445–452. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3322>
- Hepler, J. R., & Gilman, A. G. (1992). G-proteins. *ElsevierSciencePublishers*, 5(1). <https://doi.org/10.1016/j.cacc.2004.02.004>
- Hoth, M., & Wischmeyer, E. (2021). *Unspezifisches Immunsystem* (J. Behrends, J. Bischofberger, R. Deutzmann, H. Ehmke, S. Frings, S. Grissmer, M. Hoth, A. Kurtz, J. Leipziger, F. Müller, C. Pedain, J. Rettig, C. Wagner, & E. Wischmeyer (eds.); 4., unverä.). Georg Thieme Verlag KG. <https://doi.org/10.1055/b000000462>
- Jacquemet, G., Fazeli, E., Roy, N. H., Follain, G., Laine, R. F., von Chamier, L., Hänninen, P. E., Eriksson, J. E., & Tinevez, J. Y. (2020). Automated cell tracking using StarDist and TrackMate. *F1000Research*, 9, 1–12. <https://doi.org/10.12688/f1000research.27019.1>
- Jönsson, F., Mancardi, D. A., Albanesi, M., & Bruhns, P. (2013). Neutrophils in local and systemic antibody-dependent inflammatory and anaphylactic reactions. *Journal of Leukocyte Biology*, 94(4), 643–656. <https://doi.org/10.1189/jlb.1212623>
- Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., & Korhous, R. J. (2012). *Cell Biology of Ischemia Reperfusion* (Vol. 298).
- Kamakura, S., Nomura, M., Hayase, J., Iwakiri, Y., Nishikimi, A., Takayanagi, R., Fukui, Y., & Sumimoto, H. (2013). The cell polarity protein minsc regulates neutrophil chemotaxis via a noncanonical G protein signaling pathway. *Developmental Cell*, 26(3), 292–302. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.06.008>

- Kamp, M. E., Liu, Y., & Kortholt, A. (2016). Function and regulation of heterotrimeric G proteins during chemotaxis. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(1). <https://doi.org/10.3390/ijms17010090>
- Köhler, D., Devanathan, V., De Franz, C. B. O., Eldh, T., Novakovic, A., Roth, J. M., Granja, T., Birnbaumer, L., Rosenberger, P., Beer-Hammer, S., & Nürnberg, B. (2014). Gai2 - and Gai3-deficient mice display opposite severity of myocardial ischemia reperfusion injury. *PLoS ONE*, *9*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098325>
- Kuwano, Y., Adler, M., Zhang, H., Groisman, A., & Ley, K. (2016). Gai2 and Gai3 Differentially Regulate Arrest from Flow and Chemotaxis in Mouse Neutrophils. *The Journal of Immunology*, *196*(9), 3828–3833. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500532>
- Lämmermann, T., Afonso, P. V., Angermann, B. R., Wang, J. M., Kastenmüller, W., Parent, C. A., & Germain, R. N. (2013). Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo. *Nature*, *498*(7454), 371–375. <https://doi.org/10.1038/nature12175>
- Landecker, H. (2009). Seeing things: from microcinematography to live cell imaging. *Nature Methods*, *6*(10), 707–709. <https://doi.org/10.1038/nmeth1009-707>
- Lee, W. L., Harrison, R. E., & Grinstein, S. (2003). Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection*, *5*(14), 1299–1306. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.09.014>
- Ley, K., Hoffman, H. M., Kubes, P., Cassatella, M. A., Zychlinsky, A., Hedrick, C. C., & Catz, S. D. (2018). Neutrophils: New insights and open questions. *Science Immunology*, *3*(30). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat4579>
- Li, H., Yang, L., Fu, H., Yan, J., Wang, Y., Guo, H., Hao, X., Xu, X., Jin, T., & Zhang, N. (2013). Association between Gai2 and ELMO1/Dock180 connects chemokine signalling with Rac activation and metastasis. *Nature Communications*, *4*(1), 1706. <https://doi.org/10.1038/ncomms2680>
- Liu, Y., Lacal, J., Firtel, R. A., & Kortholt, A. (2018). Connecting G protein signaling to chemoattractant-mediated cell polarity and cytoskeletal reorganization. *Small GTPases*, *9*(4), 360–364. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1235390>
- Long, X., Cleveland, W. L., & Yao, Y. L. (2008). Multiclass cell detection in bright field images of cell mixtures with ECOC probability estimation. *Image and Vision Computing*, *26*(4), 578–591. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.imavis.2007.07.004>
- Marki, A., Buscher, K., Mikulski, Z., Pries, A., & Ley, K. (2018). Rolling neutrophils form tethers and slings under physiologic conditions in vivo. *June 2017*, 67–70. <https://doi.org/10.1189/jlb.1AB0617-230R>
- Mauler, M., Seyfert, J., Haenel, D., Seeba, H., Guenther, J., Stallmann, D., Schoenichen, C., Hilgendorf, I., Bode, C., Ahrens, I., & Duerschmied, D. (2016). Platelet-neutrophil complex formation—a detailed in vitro analysis of murine and human blood samples. *Journal of Leukocyte Biology*, *99*(5), 781–789. <https://doi.org/10.1189/jlb.3ta0315-082r>
- Mcdonald, B., Pittman, K., Menezes, G. B., Hirota, S. a, Slaba, I., Waterhouse, C. C. M., Beck, P. L., Muruve, D. a, & Kubes, P. (2011). *Sterile Inflammation*. *330*(October 2010), 362–367.
- Meijering, E., Dzyubachyk, O., & Smal, I. (2012). Methods for cell and particle tracking. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 504). Elsevier Inc.

- <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391857-4.00009-4>
- Page, C., & Pitchford, S. (2013). Neutrophil and platelet complexes and their relevance to neutrophil recruitment and activation. *International Immunopharmacology*, 17(4), 1176–1184. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.06.004>
- Phillipson, M., Kaur, J., Colarusso, P., Ballantyne, C. M., & Kubes, P. (2008). Endothelial domes encapsulate adherent neutrophils and minimize increases in vascular permeability in paracellular and transcellular emigration. *PLoS ONE*, 3(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001649>
- Rodrigues, S. F., & Granger, D. N. (2010). Role of blood cells in ischaemia–reperfusion induced endothelial barrier failure. *Cardiovascular Research*, 87(2), 291–299. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq090>
- Sadik, C. D., Kim, N. D., & Luster, A. D. (2011). Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends in Immunology*, 32(10), 452–460. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.it.2011.06.008>
- Sanada, S., Komuro, I., & Kitakaze, M. (2011). Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: Preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 301(5), 5–7. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00553.2011>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schumacher, J., & Bertrand, L. (2019). *THUNDER Technology Note, THUNDER Imagers: How Do They Really Work?* <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/thunder-technology-note/>
- Schütt, C., & Bröker, B. (2011). *Grundwissen Immunologie*.
- Selinummi, J., Ruusuvoori, P., Podolsky, I., Ozinsky, A., Gold, E., Yli-Harja, O., Aderem, A., & Shmulevich, I. (2009). Bright field microscopy as an alternative to whole cell fluorescence in automated analysis of macrophage images. *PLoS ONE*, 4(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007497>
- Sibarita, J.-B. (2005). Deconvolution Microscopy. In J. Rietdorf (Ed.), *Microscopy Techniques: -/-* (pp. 201–243). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/b102215>
- Simon, M. I., Strathmann, M. P., & Gautam, N. (1991). Diversity of g proteins. *Science (New York, N.Y.)*, 252(1971), 802–808.
- Stephens, D. J., & Allan, V. J. (2003). Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science*, 300(5616), 82–86. <https://doi.org/10.1126/science.1082160>
- Summers, C., Rankin, S. M., Condliffe, A. M., Singh, N., Peters, A. M., & Chilvers, E. R. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology*, 31(8), 318–324. <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.05.006>
- Van Haastert, P. J. M., & Devreotes, P. N. (2004). Chemotaxis: signalling the way forward. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(8), 626–634. <https://doi.org/10.1038/nrm1435>
- Weis, W. I., & Kobilka, B. K. (2018). The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Annual Review of Biochemistry*, 87, 897–919. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033910>
- Wiege, K., Ali, S. R., Gewecke, B., Novakovic, A., Konrad, F. M., Pexa, K., Beer-

- Hammer, S., Reutershan, J., Piekorz, R. P., Schmidt, R. E., Nürnberg, B., & Gessner, J. E. (2013). α i2 Is the Essential α i Protein in Immune Complex–Induced Lung Disease . *The Journal of Immunology*, *190*(1), 324–333. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201398>
- Wilson, M. (2017). *Introduction to Widefield Microscopy*. <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/introduction-to-widefield-microscopy/>
- Wu, J., Pipathsouk, A., Keizer-Gunnink, A., Fusetti, F., Alkema, W., Liu, S., Altschuler, S., Wu, L., Kortholt, A., & Weiner, O. D. (2015). Homer3 regulates the establishment of neutrophil polarity. *Molecular Biology of the Cell*, *26*(9), 1629–1639. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-07-1197>
- Ye, R. D., Boulay, F., Ji, M. W., Dahlgren, C., Gerard, C., Parmentier, M., Serhan, C. N., & Murphy, P. M. (2009). International union of basic and clinical pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacological Reviews*, *61*(2), 119–161. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001578>
- Yipp, B. G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C. N., Scott, B. N. V., Zbytnuik, L. D., Pittman, K., Asaduzzaman, M., Wu, K., Meijndert, H. C., Malawista, S. E., de Boisfleury Chevance, A., Zhang, K., Conly, J., & Kubes, P. (2012). Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nature Medicine*, *18*(9), 1386–1393. <https://doi.org/10.1038/nm.2847>
- Zarbock, A., Deem, T. L., Burcin, T. L., & Ley, K. (2007). α i2 is required for chemokine-induced neutrophil arrest. *Blood*, *110*(10), 3773–3779. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-094565>

Anhang

Tabelle 4: analysierte Zellbewegungen für $Gnai2$ -LysM-Cre^{+/-} Mäuse

Untersuchte Gruppen	Anzahl Zellbewegungen
LysM-Cre ⁻ Kontrolle (WT)	282
LysM-Cre ⁻ fMLP (WT)	448
LysM-Cre ⁺ Kontrolle (TG)	438
LysM-Cre ⁺ fMLP (TG)	723

Tabelle 5: analysierte Zellbewegungen für $Gnai3$ -LysM-Cre^{+/-} Mäuse

Untersuchte Gruppen	Anzahl Zellbewegungen
LysM-Cre ⁻ Kontrolle (WT)	105
LysM-Cre ⁻ fMLP (WT)	297
LysM-Cre ⁺ Kontrolle (TG)	338
LysM-Cre ⁺ fMLP (TG)	295

Tabelle 6: analysierte Zellbewegungen für $Gnai2/3$ -LysM-Cre^{+/-} Mäuse

Untersuchte Gruppen	Anzahl Zellbewegungen
LysM-Cre ⁻ Kontrolle (WT)	145
LysM-Cre ⁻ fMLP (WT)	204
LysM-Cre ⁺ Kontrolle (TG)	201
LysM-Cre ⁺ fMLP (TG)	361

Tabelle 7: analysierte Zellbewegungen von murinen Neutrophilen mit und ohne Antikörper

Untersuchte Gruppen	Anzahl Zellbewegungen
Kontrolle	426
Kontrolle fMLP	635
anti-G _{i1/2} -IgG Kontrolle	575
anti-G _{i1/2} -IgG fMLP	622
anti-IgG Kontrolle	444
anti-IgG fMLP	480

Tabelle 8: analysierte Zellbewegungen von humanen Neutrophilen mit und ohne Antikörper

Untersuchte Gruppen	Anzahl Zellbewegungen
Kontrolle	725
Kontrolle fMLP	1315
anti-G _{i1/2} -IgG Kontrolle	1047
anti-G _{i1/2} -IgG fMLP	1098
anti-IgG Kontrolle	1060
anti-IgG fMLP	920

Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde in der Abteilung für Pharmakologie, Experimentelle Therapie und Toxikologie des Departments für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Pharmakogenomik der Universität Tübingen durchgeführt. Die Betreuung der Arbeit und ihres Aufbaus erfolgte durch Frau Prof. Dr. Beer-Hammer. Die Experimente und Auswertungen fanden in Zusammenarbeit mit dem Werner Siemens Imaging Center in der Abteilung der präklinischen Bildgebung und Radiopharmazie unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Weigelin statt.

Alle Versuche und Analysen der Daten, sowie die statistische Auswertung und die Erstellung der Abbildungen wurden eigenständig von mir durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Veröffentlichungen

Ergebnisse dieser Arbeit sind bereits eingereicht:

David Köhler, Lukas Beichert, Simon Killinger, Veronika Leiss, Daniela Grothe, Claudia Eggstein, Vasudharani Devanathan, Jule Focken, Birgit Schitteck, Bettina Weigelin, Peter Rosenberger, Bernd Nürnberg, Sandra Beer-Hammer

“Targeting $G\alpha_{i2}$ in neutrophils protects from myocardial ischemia reperfusion injury”

Danksagung

Ich bedanke mich herzlichst bei allen, die zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Nürnberg danke ich für die Möglichkeit, meine Arbeit am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Pharmakogenomik anfertigen zu können.

Ein ganz besonderer Dank geht an Prof. Dr. Sandra Beer-Hammer für die Bereitstellung des Themas und ihre exzellente Betreuung und Unterstützung. Ich denke, dass eine so enge und sorgfältige Betreuung keine Selbstverständlichkeit ist und bin überaus dankbar dafür, dass ich mich mit allen Fragen an sie wenden konnte. Ich habe mich sehr herzlich aufgenommen gefühlt in ihrer Arbeitsgruppe.

Ein ebenfalls sehr großer Dank geht an Prof. Dr. Bettina Weigelin für die tolle Co-Betreuung und Einarbeitung am WSIC. Sie hat trotz großem Stress immer Zeit für mich finden können und mir bei dem ein oder anderen sich ergebenden Problem zur Seite gestanden.

Ich danke den Arbeitsgruppen an beiden Instituten für die herzliche Aufnahme und sowohl praktische als auch theoretische Unterstützung in zahlreichen Situationen. Es hat mir viel Spaß bereitet mit allen zusammenzuarbeiten.

Schließlich danke ich meiner Familie, die mir immer zur Seite steht und mich ungefragt unterstützt in dem, was ich tue und vorhabe. Ohne sie wäre ich niemals bis hierher gekommen.

Gleiches gilt für meine Freund*innen, die mich durch diese Arbeit hinweg begleitet haben und mir das Selbstvertrauen geben, alle Hürden anzugehen; insbesondere Carla, der ich gar nicht genug danken kann, für eine wunderbare Freundschaft und dafür dass sie immer an meiner Seite steht.