Aus dem Department für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen
Abteilung für Pharmakologie und Experimentelle Therapie
Direktor: Professor Dr. Dr. B. Nürnberg

Expression und Funktion von $G\alpha_i$-Proteinen in Entzündungszellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Ana Novakovic

aus
Skopje / Mazedonien

2013

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. Dr. B. Nürnberg
2. Berichterstatter:	Professor Dr. D. Hartl

Inhalt

1 Einleitung 1

1.1 Allgemeine Prinzipien der zellulären Signaltransduktion 1

1.2 G-Protein-abhängige Signaltransduktion 3

1.2.1 Struktur und Funktion von G-Proteinen 3

1.2.2 Gα-Untereinheiten 5

1.2.3 Gβγ-Untereinheiten 6

1.2.4 $G\alpha_i$-Familie 7

1.3 Das angeborene Immunsystem 8

1.3.1 Chemotaxis von Entzündungszellen am Beispiel der Migration neutrophiler Granulozyten 9

1.4 Entzündung 11

1.5 Rolle von $G\alpha_i$-Proteinen im Immunsystem 12

1.6 Die Lunge als immunologisches Organ 13

1.7 Autophagie 14

1.7.1 Molekulare Regulation der Autophagie 15

1.7.2 Patho-/Physiologische Bedeutung der Autophagie 17

1.7.3 Rolle von Autophagie in der Immunabwehr 18

1.8 *Listeria monocytogenes* 19

1.8.1 Zellbiologie der *L. monocytogenes* Infektion 20

1.8.2 Listerien und Autophagie 21

1.8.3 Immunologische Aspekte der Listeriose 22

1.9 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit 24

2 Material und Methoden 25

2.1 Materialien 25

2.1.1 Chemikalien 25

2.1.2 Antikörper und Antiseren 26

2.1.3 Inhibitoren und Antibiotika 27

2.1.4 Reagenzien, Kits und Verbrauchsmaterial 27

2.1.5 Geräte 27

2.1.6 Medien und Puffer 28

2.1.6.1 Stammlösungen und Puffer 28

2.1.6.2 Zellkulturmedien und Zusätze 29

2.1.6.3 Medien für die Bakterienkultur 29

2.1.7 Bakterienstämme und Zelllinien 30

2.2 Methoden 30
2.2.1 Zellbiologische Methoden 30
2.2.1.1 Zellkultur 30
2.2.1.2 Immunofluoreszenz 31
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden 32
2.2.2.1 Gewinnung von Organ- und Zelllysaten 32
2.2.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung 32
2.2.2.3 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 32
2.2.2.4 Immunoblot-Analyse 33
2.2.3 Versuchstiere 34
2.2.3.1 Organentnahme 34
2.2.3.2 Induktion einer Peritonitis, FACS Färbung und Analyse der peritonealen Flüssigkeit 35
2.2.3.3 Infektion mit *L. monocytogenes* 35
2.2.3.4 Bestimmung der Kolonienzahl in den Organen 36
2.2.4 Statistik 37

3 Ergebnisse 38
3.1 Expressionsanalyse von $G\alpha_i$- und $G\beta$-Isoformen in verschiedenen Geweben 38
3.1.1 Expressionsanalyse von $G\alpha_i$- und $G\beta$-Isoformen in der Lunge $G\alpha_{i2}$- und $G\alpha_{i3}$-defizienter Mäuse 38
3.2 Expressionsanalyse von $G\alpha_i$- und $G\beta$-Isoformen in Zellen der Peritonealflüssigkeit nach einer induzierten Peritonitis 46
3.2.1 Expressionsanalyse von $G\alpha_i$- und $G\beta$-Isoformen in peritonealen Zellen in der Frühphase der Peritonitis 46
3.2.2 Expressionsanalyse von $G\alpha_i$- und $G\beta$-Isoformen in der Spätphase der Peritonitis 52
3.3 Expressionsanalyse von $G\alpha_i$- und $G\beta$-Isoformen in RAW 264.7 Makrophagen 55
3.4 Expressionsanalyse von $G\alpha_i$- und $G\beta$-Isoformen in der fEnd.5 Zelllinie 59
3.5 Infektionsanalyse mit *L. monocytogenes* 63
3.5.1 *In vitro* Infektionsanalyse mit *L. monocytogenes* 64
3.5.2 *In vivo* Infektionsanalyse mit *L. monocytogenes* 65
3.5.2.1 Bestimmung der LD_{50} *L. monocytogenes* Dosis (Stamm ATCC 43251) in C57BL/6N Wildtyp Mäusen (Charles River) 65
3.5.2.2 Analyse der Immunabwehr gegen *L. monocytogenes* in Wildtyp Mäusen 66
3.5.2.3 Infektion von Wildtyp und $G\alpha_{i3}$-defizienten Mäusen 68

4 Diskussion **70**
4.1 Expression von $G\alpha_i$- und Gβ-Isoformen: *in vitro* versus *in vivo* Modelle .. 70
4.2 Migration neutrophiler Granulozyten und Makrophagen nach Thioglykollat-induzierter Peritonitis 72
4.3 Die Rolle von $G\alpha_{i3}$ in der Immunabwehr gegen *L. monocytogenes* 73

5 Zusammenfassung **78**

6 Literaturverzeichnis **80**

I Eigene Publikationen **92**

II Posterpräsentationen **92**

III Danksagung **94**

IV Lebenslauf **95**

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Prinzipien der zellulären Signaltransduktion

Einzelne Zellen, verschiedene Gewebe und Organe müssen miteinander kommunizieren, um eine koordinierte Regulation und Funktion des Organismus zu gewährleisten. Es existieren verschiedene Möglichkeiten dieser Kommunikation, z.B. über einen direkten Kontakt, durch elektrische Signale oder über Signalmoleküle (Lee *et al.*, 2004). Letztere gehören klassischerweise zu den Hormonen und Neurotransmittern. Die Wirkung von Hormonen erfolgt nach Freisetzung auf die sezernierende Zelle selbst (autokrin), auf Nachbarzellen (parakrin) oder auf entfernte Gewebe nach der Sekretion in die Blutbahn (endokrin). Auch alle anderen Botenstoffe wirken in ähnlicher Weise. Die chemische Struktur dieser Substanzen zeigt eine große Diversität auf. Es kann sich dabei unter anderem um Proteine, Nukleotide, Lipide, Isoprenderivate, Kohlenhydrate sowie lösliche Gase handeln. Zusätzlich können auch Umweltfaktoren, wie Geruch- und Geschmacksstoffe, Licht, Kälte, Wärme, Druck und Schmerz wahrgenommen und in Signale umgewandelt werden (Kroeze *et al.*, 2003).

Ein wichtiges Kriterium für die Art der Wirkung der verschiedenen chemischen Signalmoleküle ist ihre Lipo- oder Hydrophilie. Die meisten dieser Substanzen sind hydrophil und deswegen nicht in der Lage, die Plasmamembran zu überwinden. Sie binden als Liganden an membranständige Rezeptoren, die das extrazelluläre Signal weiterleiten und intrazelluläre Effekte bewirken. Im Gegensatz dazu können lipophile Liganden in die Zelle eindringen und an intrazelluläre Rezeptoren binden, die dann wiederum im Zellkern transkriptionelle genomische zelluläre Antworten auslösen (McKenna *et al.*, 2001).

Als Signaltransduktion wird die Weiterleitung eines Stimulus und seine Überführung in intrazelluläre Signale bezeichnet, die letztlich in einer biologischen Antwort münden. Der Mechanismus der Signaltransduktion wird durch die Klasse des membranständigen Rezeptors bestimmt.

Liganden-gesteuerte Ionenkanäle sind an der schnellen chemischen Erregungsweiterleitung der neuronalen Synapse beteiligt. Sie weisen eine multimere

Struktur auf und existieren als exzitatorische und inhibitorische Ionenkanäle. Die exzitatorischen Ionenkanäle (z.B. die nikotinergen Acetylcholinrezeptoren, die Glutamatrezeptoren, der ionotrope Serotoninrezeptor 5-HT_3-R) kontrollieren die Durchlässigkeit der synaptischen Membran für bestimmte Kationen. Die inhibitorischen Ionenkanäle (z.B. der Glycinrezeptor, der γ-Aminobuttersäurerezeptor ($GABA_A$)) transportieren im aktivierten Zustand Chloridionen und verringern die Depolarisation-Wahrscheinlichkeit der Zielzelle (Blitzer, 2005).

Eine andere große, heterogene Familie membranständiger Rezeptoren beinhaltet **die Enzym-gekoppelten-Rezeptoren**. Sie durchspannen die Plasmamembran mit einer Transmembranhelix und besitzen auf der extrazellulären Seite eine Ligandenbindungsstelle. Intrazellulär befindet sich eine enzymatische Domäne. Zu der Familie der Enzym-gekoppelten-Rezeptoren gehören die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die Tyrosinreste spezifischer Proteinsubstrate phosphorylieren bzw. nach Autophosphorylierung Adaptorproteine an ihre phosphorylierten Domänen binden (Fantl *et al.*, 1993), Rezepor-Serin/Threonin-Kinasen, welche Serin- oder Threoninreste bestimmter Proteine phosphorylieren (ten Dijke *et al.*, 2004) und Rezeptor-Tyrosin-Phosphatasen, die Phosphatgruppen spezifischer Proteine entfernen (Huntington *et al.*, 2004), aber auch Rezeptor-Guanylyl-Zyklasen, die die Generierung von zyklischem cGMP im Zytosol katalysieren (Pyriochou *et al.*, 2005).

Die größte Familie der Zelloberflächen-Rezeptoren sind **G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren** (GPCRs), die in fünf Subfamilien (Rhodopsin-, Adhesion-, Frizzled/Smoothened-, Glutamat- und Sekretin-Familie) unterteilt werden (Kobilka, 2007; Nürnberg, 2004; Rohrer *et al.*, 1998). Sie besitzen sieben transmembranäre α-Helixstrukturen und werden deshalb auch heptahelikale oder 7-Transmembranrezeptoren (7TM) genannt. Der strukturell sehr variable, extrazelluläre, N-terminale Bereich trägt häufig zur Bildung der Liganden-Bindungsdomäne bei, während der C-Terminus zytosolisch lokalisiert ist (Gudermann *et al.*, 1997). Durch die Ligand-induzierten Konformationsänderungen wird die anschließende Signalweiterleitung auf der intrazellulären Seite der Membran durch die Interaktion mit assoziierten GTPasen vom Typ der heterotrimeren Guaninnukleotid-bindenden Proteine (G-Proteine) transduziert. Das vermittelte Signal wird durch G-Proteine über die Modulation intrazellulärer Effektoren, wie Ionenkanäle, Adenylylzyklasen (AC), Phospholipase C (PLC) oder

Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) amplifiziert und propagiert. Dabei kommt es zur Konzentrationsänderung intrazellulärer, sekundärer Botenstoffe, die durch das Zytoplasma diffundieren (z.B. Ca^{2+}, zyklisches AMP, Inositoltrisphosphat) oder membranständig sind (Diacylglycerol (DAG), Phophatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3)). Es gibt mehr als 1000 Gene im Säugetiergenom für die Kodierung von GPCRs (Wettschureck *et al.*, 2005). Die größte Gruppe von ca. 400 Rezeptoren stellen die olfaktorischen Rezeptoren dar (Fredriksson *et al.,* 2003). Weitere ca. 200 GPCRs sind an anderen sensorischen Funktionen wie Geschmack beteiligt, oder sie können auch nicht-sensorische Liganden binden, wie z.B. Hormone, Neurotransmitter und Chemokine. Für die sogenannten „Orphanrezeptoren" sind die endogenen Liganden noch nicht beschrieben worden (Wise *et al.*, 2004).

1.2 G-Protein-abhängige Signaltransduktion

1.2.1 Struktur und Funktion von G-Proteinen

Die an GPCRs koppelnden heterotrimeren G-Proteine setzen sich aus den Untereinheiten Gα, Gβ und Gγ zusammen. Sie werden durch Gene für 16 α-, 5 β- und 12 γ-Untereinheiten kodiert (Clapham *et al.*, 1997; Simon *et al.*, 1991; Wettschureck *et al.*, 2005). Die Gα-Untereinheit, die dem jeweiligen G-Protein den Namen gibt, weist eine intrinsische GTPase-Aktivität auf und kann Guanosintriphosphat (GTP) binden und zu Guanosindiphosphat (GDP) hydrolisieren. Unter physiologischen Bedingungen existiert die Gβγ-Untereinheit als undissoziierbarer Komplex. Die membranäre Lokalisation der Gα- und Gβγ-Untereinheiten wird z.T. durch Lipidmodifikationen sichergestellt, was die Interaktion mit membranständigen Proteinen wie GPCRs oder der Adenylyl-Zyklase erleichtert. Die G-Proteine lassen sich auch auf Endomembranen und im Zellkern nachweisen (Gohla *et al.,* 2007a; Gohla *et al.,* 2007b; Marrari *et al.,* 2007; Nürnberg *et al.,* 1996). Die Weiterleitung der Signale eines aktivierten GPCR an einen Effektor wird durch einen Aktivierungs-Inaktivierungs-Zyklus der G-Proteine reguliert (Abb. 1.1). Durch Stimulation des Rezeptors kommt es zu einer Öffnung der Guaninnukleotid-Bindungstasche und zu einer Freisetzung von GDP aus der Gα-Untereinheit, die anschließend GTP bindet, das intrazellulär in wesentlich höheren Konzentrationen als GDP vorliegt. Nachfolgend dissoziiert zumindest funktionell das Trimer in die

GTP-gebundene Gα-Untereinheit und das Gβγ Dimer (Gilman, 1987). Unabhängig voneinander können die zwei Einheiten mit Effektoren wechselwirken und diese modulieren. Die Signaltransduktion wird durch die Hydrolyse des GTP zu GDP durch die intrinsische GTPase Aktivität der Gα-Untereinheit beendet. In GDP-gebundenem Zustand kommt es zu einer Reassoziation der Gα-Untereinheit mit dem Gβγ Dimer und nach Bindung an den Rezeptor können weitere Zyklen durchlaufen werden. Dabei kann ein Agonist-besetzter-Rezeptor mehrere G-Proteine aktivieren und somit eine Signalverstärkung induzieren (Nürnberg, 1997).

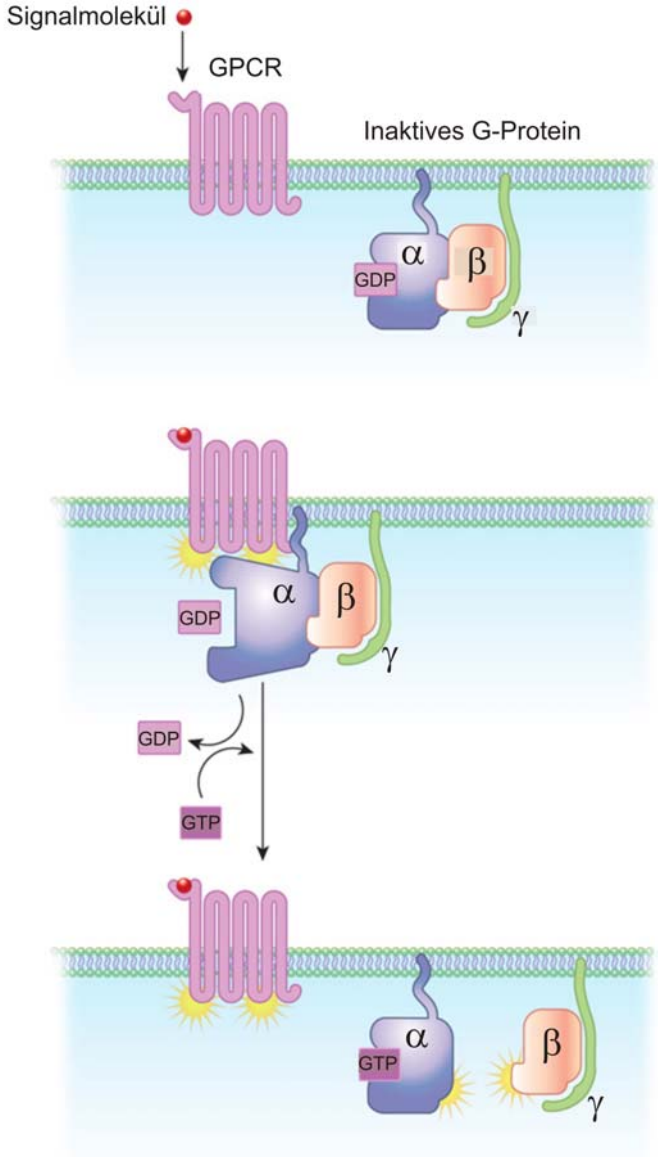


Abb. 1.1: G-Protein-gekoppelte Rezeptor-induzierte Signaltransduktion. Die G-Protein Aktivierung wird durch Bindung eines Agonisten an den Rezeptor ausgelöst. Dabei tauscht die Gα-Untereinheit GDP gegen GTP aus und es kommt zur Dissoziation des Gβγ-Komplexes. Sowohl Gα-GTP als auch Gβγ-Komplexe können mit Effektormolekülen interagieren. Schema modifiziert und abgeleitet nach *2010 Nature Education* (http://www.nature.com/scitable/topicpage/gpcr-14047471).

Die Geschwindigkeit der GTP-Hydrolyse bestimmt die Signaldauer und wird unter anderem durch die Familie der **RGS-Proteine** (*regulators of G-protein signaling*) gesteigert, was zu einer früheren Terminierung der Signalübertragung führt (De Vries *et al.*, 2000). Durch sogenannte **AGS-Proteine** (*activators of G-protein mediated signaling*) können G-Proteine Rezeptor-unabhängig durch unterschiedliche Mechanismen stimuliert werden (Cismowski *et al.*, 2001).
Als wichtige und wertvolle Werkzeuge in der Analyse des Aktivierungs-Inaktivierungs Zyklus der G-Proteine dienen zwei bakterielle Toxine. Das *Bordetella pertussis* Exotoxin Pertussistoxin (PTX) katalysiert Adenosindiphosphat (ADP)-Ribosylierungen an einem Cysteinrest am C-Terminus fast aller Mitglieder der G_i-Protein-Familie, was zu einer funktionellen Entkopplung des G-Proteins vom Rezeptor führt (Nürnberg *et al*., 1997). Das *Vibrio cholerae* Exotoxin Choleratoxin ADP-ribosyliert die Gα-Untereinheiten von G_s- und G_{olf}-Proteinen an einem Argininrest im aktiven Zentrum, was die GTPase Aktivität der Gα-Untereinheit blockiert, und damit zu ihrer konstitutiven Aktivierung führt (Zhang, 1997).

1.2.2 Gα-Untereinheiten

Es werden 23 Gα-Untereinheiten durch 16 bekannte Gene kodiert und nach der Sequenzähnlichkeit in vier Subfamilien eingeteilt: $G\alpha_s$, $G\alpha_q$, $G\alpha_{12/13}$ und $G\alpha_{i/o}$. Ihr relatives molekulares Gewicht beträgt 39-52 kDa und sie können posttranslational durch Myristoylierungen und/oder Palmytoylierungen modifiziert werden.
Das **$G\alpha_s$** wird ubiquitär exprimiert und bewirkt eine Rezeptor-abhängige Stimulation der Adenylyl-Zyklasen und somit eine Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration (Pfeuffer, 1977). Es existieren mehrere Spleißvarianten des $G\alpha_s$ Gens. Ein zweites Mitglied der $G\alpha_s$-Familie ist das überwiegend im olfaktorischen Epithel exprimierte G_{olf}.
Die vier Mitglieder der **$G\alpha_q$**-Familie, $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$ und $G\alpha_{15}/G\alpha_{16}$, vermitteln die PTX-insensitive Stimulation der Phospholypase Cβ (PLCβ) und somit der intrazellulären Kalziumkonzentration. Während $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ breit exprimiert werden, weisen $G\alpha_{14}$ und $G\alpha_{15}$ in der Maus und $G\alpha_{16}$ beim Menschen ein restriktiveres Expressionsmuster auf (Offermanns, 2000). $G\alpha_q$-defiziente Mäuse zeigen eine gestörte motorische Koordination mit Symptomen der zerebellaren Ataxie (Offermanns *et al.*, 1997a), eine verlängerte Blutungszeit durch die gestörte

Blutplättchen-Aktivierung (Offermanns *et al.*, 1997b) sowie kraniofaziale und kardiale Malformationen (Offermanns *et al.*, 1998).

Die **$G\alpha_{12/13}$** Familie als zuletzt entdeckte (Strathmann *et al.*, 1991) umfasst die zwei Mitglieder $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$, die in geringen Mengen ubiquitär exprimiert werden (Harhammer *et al.*, 1994; Spicher *et al.*, 1994). Ihre Haupteffektoren sind die Rho-spezifischen Guaninnukleotid-Austausch-Faktoren (Gohla *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2003).

Die Familie der **$G\alpha_i$**-Proteine und ihre Funktionen werden in Abschnitt 1.2.4 vorgestellt.

1.2.3 Gβγ-Untereinheiten

Der Gβγ-Komplex besitzt im Gegensatz zu den Gα-Untereinheiten keine intrinsische enzymatische Aktivität. Durch die Kodierung von fünf (Gβ) bzw. zwölf (Gγ) Genen gibt es eine hohe Anzahl potentieller Kombinationen an Gβγ-Dimeren (mit der Ausnahme, dass $G\beta_2$ und $G\beta_5$ keine Dimere mit $G\gamma_1$ bilden können). Das relative molekulare Gewicht der Gβ-Untereinheiten beträgt 35-39 kDa. Die ersten vier Isoformen, $G\beta_1$-$G\beta_4$, zeigen eine hohe Aminosäuresequenzidentität (78-88%) (Smrcka, 2008). Strukturell unterschiedlich ist die vorwiegend neuronal exprimierte $G\beta_5$-Isoform, die mit Mitgliedern der C-Subfamilie der RGS-Proteine Dimere bildet (Witherow *et al.*, 2003). Darüber hinaus konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* $G\beta_5\gamma_2$-Komplexe (Maier *et al.,* 2000; Yost *et al.,* 2007) nachgewiesen werden. Deutlich kleiner sind die Gγ-Untereinheiten mit einem Molekulargewicht zwischen 6-8 kDa und einer geringeren Aminosäuresequenzidentität von 20-76% (Schwindinger *et al.*, 2001). Hier sind auch wieder drei Subfamilien klassifiziert.

Nach der Dissoziation von der Gα-Untereinheit ist das Gβγ-Dimer an der Regulation vieler Effektoren beteiligt. Die langjährige Vorstellung, dass Gβγ-Komplexe lediglich bei der Aktivierung/Inaktivierung sowie der Membranassoziation der Gα-Untereinheit eine Rolle spielen wurde aufgegeben (Sternweis, 1986). Sie modulieren die Aktivität G-Protein-regulierter Kaliumkanäle, bestimmter Isoformen der Adenylylzyklase und PLC, sowie spannungsgesteuerte Kalziumkanäle und die PI3Kβ und PI3Kγ (Wettschureck *et al.*, 2005). Allerdings zeigen Gβγ-Komplexe nur eine sehr geringe Konformationsänderung im Rahmen der G-Protein-Aktivierung. Die Terminierung der

Signalübertragung erfolgt durch Reassoziation von Gβγ mit der GDP-gebundenen Gα-Untereinheit (Sadja *et al.*, 2001). Ihre Verankerung in der Membran wird durch die posttranslationale Modifikation der Gγ-Untereinheit im Sinne einer Isoprenylierung ermöglicht. Allerdings wurde keine eindeutige Spezifität für Gβγ-vermittelte Signale nachgewiesen und die Frage welche Kombinationen von Gβ- und Gγ-Isoformen tatsächlich *in vivo* zu finden sind, bleibt bislang unbeantwortet, aber intensiv diskutiert (Robishaw *et al.*, 2004). Es wird vermutet, dass die Selektivität der Gβγ-Komplexe durch die Gγ-Isoformen bestimmt wird, weil sie eine wesentlich stärkere Diversität ihrer Isoformen zeigen, im Gegensatz zu den Gβ-Untereinheiten.

1.2.4 $G\alpha_i$-Familie

Die Mitglieder der $G\alpha_i$-Familie sind $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, $G\alpha_{o1}$, $G\alpha_{o2}$, $G\alpha_z$, $G\alpha_{gust}$, $G\alpha_{tr}$ und $G\alpha_{tc}$. Mit Ausnahme von $G\alpha_z$ ist die Familie durch die Sensitivität gegenüber PTX gekennzeichnet.

$G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$, die an der Inhibition verschiedener Isoformen der Adenylylzyklasen (Offermanns, 2003) beteiligt sind, zeigen ein partiell überlagerndes Expressionsmuster. Die prädominante und ubiquitär exprimierte Isoform ist $G\alpha_{i2}$. $G\alpha_{i1}$ scheint primär neuronal exprimiert zu werden, während $G\alpha_{i3}$ bevorzugt in nicht-neuronalem Gewebe vorkommt. Die Aminosäuresequenzidentität zwischen den drei Isoformen beträgt 85-95% (Wilkie *et al.*, 1994). Diese G-Proteine stellen eine wichtige Quelle für Gβγ-Komplexe dar, weil sie in relativ hohen zellulären Konzentrationen in der Zelle vorhanden sein sollen.

Die prädominant exprimierten Isoformen in neuronalem Gewebe sind **$G\alpha_{o1}$** und **$G\alpha_{o2}$**. Es handelt sich um Spleißvarianten eines Gens. Daneben kommt durch posttranslationale Deamidierung noch eine dritte Isoform, **$G\alpha_{o3}$**, vor (Exner *et al.*, 1999). In geringeren Mengen wird es auch im Herzen, in der Hypophyse und in Pankreas gefunden. Die meisten Effekte nach $G\alpha_o$-Aktivierung scheinen durch ihre Gβγ-Untereinheiten vermittelt zu werden.

Befunde **$G\alpha_z$**-defizienter Mäuse weisen auf eine Rolle dieser Isoform in der Thrombozytenaktivierung und der Übertragung von Signalen verschiedener Neurotransmitter im zentralen Nervensystem hin (Hendry *et al.,* 2000; Yang *et al.*, 2002).

Gustduzin (**$G\alpha_{gust}$**) vermittelt vorwiegend in Sinneszellen der Zunge die Geschmacksqualitäten bitter und süß (Wong *et al.*, 1996). Nach Stimulation des Licht-sensitiven GPCR Rhodopsin führt **Transduzin** (Stäbchen-Transduzin **$G\alpha_{tr}$**, (*rod*), Zapfen-Transduzin **$G\alpha_{tc}$** (*cone*)) durch die Aktivierung einer cGMP-Phosphodiesterase zur Weiterleitung des Signals (Arshavsky *et al.*, 2002).

1.3 Das angeborene Immunsystem

Die Abwehrmechanismen des Organismus beginnen an seinen äußeren Grenzflächen und werden innerhalb des Organismus differenziert fortgesetzt. Dabei werden angeborene (unspezifische, nicht adaptive) von adaptiven (spezifischen, erworbenen) Abwehrmechanismen unterschieden. Werden sie durch Plasmaproteine ausgeübt, heißen sie humorale, werden sie von Zellen ausgeübt, zelluläre Abwehrmechanismen (Litman *et al.*, 2005).

Ist ein Mikroorganismus ins Gewebe eingedrungen, wird er von Zellen und Faktoren abgewehrt, die bereits im Gewebe vorhanden sind. Sie erkennen das Fremdmaterial mithilfe konstitutiv exprimierter (angeborener) Rezeptoren, sogenannter **Pattern Recognition Receptors** (*PRR*), deren Diversität nicht weiter variiert wird. Relativ unspezifische Strukturen dienen zur Fremderkennung, die sogenannten **Pathogen-assoziierten molekularen Pattern** (*PAMP*), die typisch für Mikroorganismen, aber nicht spezifisch für einzelne Erreger sind.

Gewebemakrophagen, neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen sind Teil der zellulär-unspezifischen Abwehr. Das Komplementsystem, die Interferone und weitere Akute-Phase-Proteine sind Mediatoren der humoral-unspezifischen Abwehr.

Im Gewebe vor Ort sind **Makrophagen** von entscheidender Bedeutung, die als erste Abwehrzellen Kontakt mit eingedrungenen Mikroorganismen haben. Sie koordinieren viele der nachfolgenden Abwehrvorgänge und können als antigenpräsentierende Zellen (*APC*) an der Induktion einer spezifischen Immunantwort maßgeblich beteiligt sein. Ihre Fähigkeit zur Phagozytose bleibt auch nach dem Einsetzen spezifischer Abwehrmechanismen wichtig zur Beseitigung von Mikroorganismen. Makrophagen können sich in unterschiedlichen Aktivierungszuständen befinden. Nicht aktivierte **reaktive Makrophagen** können migrieren und phagozytieren und lassen sich durch unterschiedliche Signale (z.B. durch Zytokine oder Bestandteile von Bakterien) aktivieren. **Aktivierte Makrophagen** exprimieren MHC-II (*major histocompatibility*

complex class II) Moleküle und sind professionelle APC, zudem produzieren sie reaktive Sauerstoffspezies. Unter dem Einfluss von T_H1-Lymphozyten erhöhen sie ihre antimikrobiellen und zytotoxischen Eigenschaften und als **hyperaktivierte Makrophagen** werden sie zu wichtigen Effektorzellen der spezifischen Immunantwort.

Neutrophile Granulozyten werden erst bei Entzündungsvorgängen massenhaft aus der Blutbahn ins Gewebe rekrutiert. Während der frühen neutrophilen Abwehrphase spielen sie eine zentrale Rolle, weil sie besser als Makrophagen in der Lage sind, Mikroorganismen zu töten.

1.3.1 Chemotaxis von Entzündungszellen am Beispiel der Migration neutrophiler Granulozyten

Die gezielte Migration der neutrophilen Granulozyten (polymorphnukleären Neutrophilen (PMNs)) in die Zielregionen verschiedener Gewebe ist sehr wichtig für eine effiziente Antwort der angeborenen Immunität während einer akuten Entzündung. Die PMNs sind die ersten Leukozyten an Ort der Entzündung und sind verantwortlich für die Elimination mikrobieller Pathogene und zellulären Debris. Diese Zellen sind auch wichtig für die Wundheilungsprozesse, und für die Kontrolle und Regulation der adaptiven Immunantwort durch die Modulation der Funktion von T- und B-Lymphozyten (Pillay *et al.*, 2012).

Neutrophile Granulozyten sind mit Abstand die häufigste Leukozytenpopulation des peripheren Blutes (zirkulierender Pool). Ein weiteres Reservoir dieser Zellen stellt die Lunge dar, wo diese durch reversible Anheftung an venoläre Endothelzellen „geparkt“ werden (marginierter Pool) und von dort schnell ins periphere Blut gelangen können. Sie wandern im Rahmen einer Entzündungsreaktion massenhaft aus dem Blut in das entzündete Gewebe.

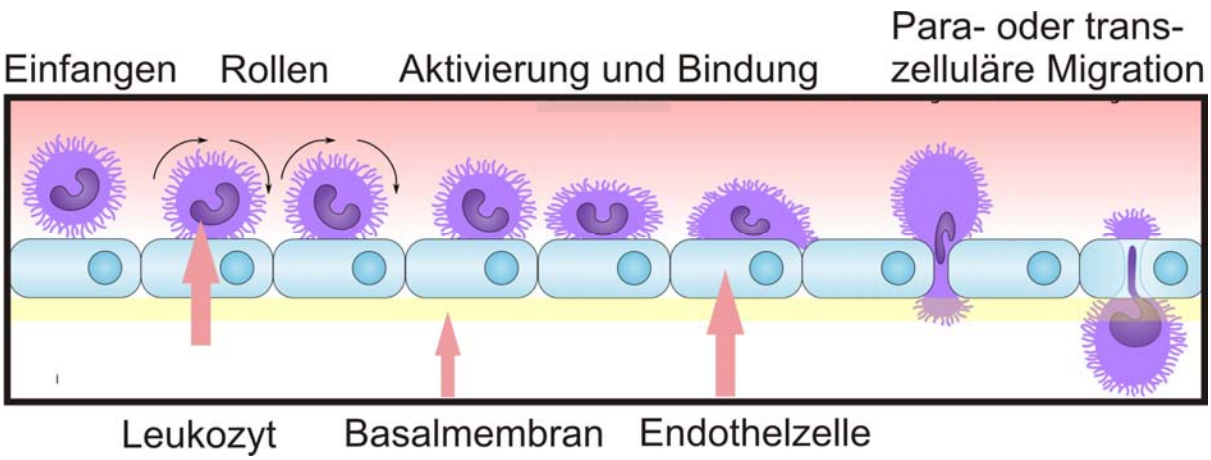


Abb. 1.2: Leukozytenmigration durch das Endothel. Schema modifiziert und abgeleitet nach Ley *et al.*, 2007.

Die entscheidenden Prozesse während der Extravasation sind (siehe Abb. 1.2):

- die Leukozyten-Endothel-Interaktion, die das Leukozytenrollen an die aktivierten Endothelzellen ermöglicht. Die feste Adhäsion wird insbesondere durch leukozytäre Adhäsionsmoleküle der Integrinfamilie und ihre endothelialen Bindungspartner „*intercellular adhesion molecule*“ (ICAM)-1, ICAM-2 und „*vascular cell adhesion molecule*“ (VCAM) vermittelt.
- die transendotheliale Diapedese, bei welcher der Leukozyt mit einem endothelialen Adhäsionsmolekül (PECAM-1 oder CD31) interagiert, das dort exprimiert wird, wo Endothelzellen aufeinandertreffen.
- die interstitielle Migration, bei welcher neutrophile Granulozyten und auch Monozyten durch chemotaktisch wirksame Substanzen angelockt werden und durch amöboide Fortbewegung unter Ausbildung von Pseudopodien zum Entzündungsort migrieren. Dort beseitigen sie durch Phagozytose Fremdkörper und setzen verschiedene chemotaktische Substanzen und Entzündungsmediatoren frei.

Die Signale für die gezielte Bewegung in das entzündete Gewebe können von residualen Makrophagen, geschädigten Zellen oder Bakterien generiert werden. Die Fähigkeit der Zelle, sich auf einen chemotaktischen Gradienten hin zu bewegen, nennt man Chemotaxis. Beispiel für ein starkes bakterielles Chemotaxin ist das formylierte Tripeptid fMLP (Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin), ein Abbauprodukt aus den bakteriellen Zellwänden, und für ein starkes körpereigenes Chemotaxin Leukotrien B_4 (LTB_4). Werden neutrophile Granulozyten z.B. durch fMLP aktiviert, setzen sie aus Phospholipiden ihrer Membran vermehrt

Arachidonsäure frei, die u.a. zu LTB_4 metabolisiert wird. Die neutrophilen Granulozyten erkennen den Gradienten durch $G\alpha_i$-gekoppelte GPCRs, die an der Zellmembran uniform verteilt sind und damit eine schnelle Reaktion ermöglichen (Servant *et al.*, 1999). Dabei sind die $G\beta\gamma$-Komplexe ein essentieller Regulator der Downstream-Effektormoleküle, wie z.B. der PLCβ, der PI3Kγ oder kleiner G-Proteine der Rho Familie (Suire *et al.*, 2006). Die PI3Kγ-Aktivität ist wichtig für die Entwicklung der Zellpolarität durch die Akkumulation von PIP3 an der führenden Seite der Zelle und seine Kolokalisation mit F-Aktin (Germena *et al.*, 2012; Manes *et al.*, 2005), und die damit verbundene Möglichkeit für die amöboiden Bewegungen der neutrophilen Granulozyten im Gewebe.

1.4 Entzündung

Durch das Eindringen von Mikroorganismen oder durch die Schädigung körpereigenen Gewebes (z.B. traumatische Verletzungen, physikalische und chemische Schädigungen, ischämiebedingte Schäden infolge von Sauerstoffmangel) kann eine akute Entzündung hervorgerufen werden. Allen Entzündungen ist gemeinsam, dass Entzündungsmediatoren freigesetzt werden. Sie steigern die Myelopoese im Knochenmark und erhöhen die Syntheserate von Akute-Phase-Proteinen in der Leber. Darüber hinaus führen sie überwiegend zur Gefäßdilatation, erhöhen die Permeabilität der Blutgefäßwände und führen zu einer Aktivierung des Blutgefäßendothels. Hinzu kommt die Stimulation von zahlreichen Abwehrzellen, die proinflammatorische Zytokine, wie z.B. Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8 und Tumornekrosefaktor α (TNFα) freisetzen (Beutler *et al.*, 1985).

Bei einer akuten Entzündung werden ortsständige Gewebemakrophagen innerhalb von Minuten mobilisiert, sie beginnen mit der Phagozytose und produzieren Entzündungsmediatoren. Die zweite Abwehrlinie bilden die einwandernden neutrophilen Granulozyten (**neutrophile Phase**). Dann werden Blutmonozyten rekrutiert, die sich nachfolgend zu Makrophagen umwandeln (**monozytäre Phase**). Die Beseitigung des Agens durch die einwandernden Phagozyten terminiert normalerweise die Entzündung. Unter Einwirkung weiterer Mediatoren (IL-1, IL-6, IL-12 u.a.) kann sie in eine spezifische Abwehrreaktion mit Anstieg der Lymphozytenkonzentration in Blut und Gewebe einmünden (**lymphozytäre Phase**). Die Gewebeintegrität kann je nach Ausmaß der Schädigung vollständig

wiederhergestellt werden, wenn die Abwehrreaktionen beendet sind und die Wundheilungsprozesse eingesetzt haben (*Restitutio ad integrum*) (Midwood *et al.*, 2004).

1.5 Rolle von $G\alpha_i$-Proteinen im Immunsystem

Eine Vielzahl von Rezeptoren für Chemokine, Eicosanoide, Leukotriene, Katecholamine oder Histamin sind G_i-gekoppelt (Lombardi *et al.*, 2002). Damit spielen $G\alpha_i$-Proteine eine wichtige Rolle in der Übertragung der Signale von Rezeptoren für chemotaktische Faktoren. Diese Funktion wurde zuerst mit der Hilfe von PTX analysiert, das die $G\alpha_i$-Proteine funktionell von ihrem Rezeptor entkoppelt. Nach der PTX-Applikation kommt es zu einer stark verminderten Migration von Lymphozyten *in vitro* (Bacon *et al.*, 1990; Spangrude *et al.*, 1985). Es verursacht Homing-Defekte in der Milz, in den Lymphknoten und Peyerschen Plaques *in vivo* (Warnock *et al.*, 1998) und betrifft vorwiegend die T-Lymphozyten. Murine Thymozyten exprimieren sowohl $G\alpha_{i2}$ als auch $G\alpha_{i3}$. $G\alpha_{i2}$-defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten sowie eine Monozytose im Blut (Pero *et al.*, 2007) und entwickeln eine diffuse, T_H1-vermittelte entzündliche Colitis, die der humanen Colitis ähnlich ist (Hornquist *et al.*, 1997; Rudolph *et al.*, 1995). Die klinische Manifestation der Krankheit geht mit einer Zunahme an T_H1-Typ Zytokinen und einer erhöhten basalen Produktion von IL-12 durch antigenpräsentierende Zellen, wie $CD8\alpha^+$ dendritische Zellen einher (He *et al.*, 2000).

B-Lymphozyten der $G\alpha_{i2}$-defizienten Mäuse zeigen Defekte bei der Entwicklung, Motilität und Migration mit einer erniedrigten Produktion von IL-10 (Dalwadi *et al.*, 2003). Das trägt ebenfalls zur Ausbildung der Colitis bei. Als sekundäre Konsequenz der Darmentzündung entwickeln $G\alpha_{i2}$-defiziente Mäuse häufig Adenokarzinome (Rudolph *et al.*, 1995). Durch bessere hygienische Bedingungen und eine sehr saubere Haltung unter strikten SPF- (*specific pathogen free*) Bedingungen in IVC- (*individually ventilated cages*) Käfigen wird das Überleben dieser Tiere verbessert (Wiege *et al.*, 2013).

$G\alpha_{i2}$-defiziente neutrophile Granulozyten zeigen eine reduzierte chemotaktische Antwort auf fMLP (Spicher *et al.*, 2002). Die Produktion von Superoxidanionen (O_2^-), sowie die Migration und Chemotaxis PI3Kγ-defizienter neutrophiler Granulozyten ist stark reduziert (Hirsch *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2000), während die chemotaktische

Antwort PLCβ_2- und PLCβ_3-defizienter neutrophiler Granulozyten verstärkt ist. PI3Kγ und PLCβ werden als die wichtigsten Effektoren der G$\beta\gamma$-Untereinheiten in neutrophilen Granulozyten angesehen und damit sind Gα_i-Proteine wahrscheinlich auch an deren Funktionen beteiligt.

1.6 Die Lunge als immunologisches Organ

Neben der Haut und der gastrointestinalen Mucosa ist die Lunge ständig gegenüber Mikroorganismen und verschiedenen organischen und anorganischen Partikeln exponiert. Evolutionär haben sich Mechanismen entwickelt, um das externe Material zu erkennen und aus der Lunge zu eliminieren. Das angeborene Immunsystem der Lunge spielt dabei eine wichtige Rolle und enthält die pulmonalen Leukozyten und die Epithelzellen der alveolaren Membran und der leitenden Atemwege.

Die löslichen Bestandteile der Atemwege und der alveolaren Flüssigkeit sind wichtige Komponenten der angeborenen Immunabwehr der Lunge. Hierzu gehört z.B. das Lysozym, das lytisch gegen viele bakteriellen Membranen wirkt, sowie das Lactoferrin, das als ein Eisen-bindendes Protein den Metabolismus verschiedener Bakterien beeinflusst, aber auch IgA, IgG und Defensine als antimikrobielle Proteine, die aus Leukozyten und pulmonalen epithelialen Zellen freigesetzt werden (Becker *et al.*, 2000; Lehrer, 2004).

Pulmonale Leukozyten bestehen zu ca. 95% aus alveolaren Makrophagen und stellen damit den wichtigsten Zelltyp des angeborenen Immunsystems der Lunge dar. Die restlichen 1-4% der Zellen sind Lymphozyten und ca. 1% neutrophile Granulozyten (Martin *et al.*, 2005). Die primäre Rolle der alveolaren Makrophagen ist die Phagozytose inerter Partikel, die den alveolaren Raum erreichen, und damit eine Aufrechterhaltung der Homöostase der Atemwege. Sie tragen auch die mikrobiellen Antigene zu den regionalen Lymphknoten, in welchen die Antigen-Präsentation durch die dendritischen Zellen stattfindet. Letzteres ist wichtig für die Aktivierung der adaptiven Immunantwort.

Neuere Studien belegen auch die Rolle der Epithelzellen der Atemwege für die normale Funktion der angeborenen Immunität in der Lunge. Neben den mechanischen Funktionen des Wimperepithels für die Entfernung von eingeklemmten und unerwünschten Partikeln, erkennen diese Zellen nicht-

methylierte bakterielle DNA (Platz *et al.*, 2004) und produzieren eine Reihe von pro-inflammatorischen Zytokinen, die den von Makrophagen stammenden Zytokinen bei der Aktivierung der angeborenen Immunsignalwege gleichwertig sind (Diamond *et al.*, 2000).

1.7 Autophagie

Es existieren zahlreiche Hinweise über die Rolle und die Bedeutung der Autophagie in der Regulation des angeborenen und erworbenen Immunsystems (Kuballa *et al.*, 2012). Zunehmend fokussiert sich das Gebiet der Autophagie-Forschung auf ihre Rollen bei einer Entzündung und bei der Immunantwort (Rodgers *et al.*, 2013). Der Begriff Autophagie bedeutet aus dem Griechischen übersetzt ein „Selbstessen“ oder „Selbstverdau“ der Zelle (*auto* = selbst, *phagos* = essen). Dieser Prozess, der unter basalen Bedingungen in fast jeder Zelle stattfindet, übernimmt durch den Abbau langlebiger Proteine eine wichtige Funktion in der Entwicklung und Differenzierung. Die Untersuchung autophagischer Prozesse beginnt in den 1950er Jahren mit der Entdeckung der Lysosomen (De Duve *et al.*, 1955), expandiert jedoch erst in der letzten Dekade, mit der Entschlüsselung der molekularen Mechanismen ihrer Regulation. Hierbei ist die Autophagie von einer nicht-lysosomalen Proteolyse, die durch das Ubiquitin-Proteasom System funktioniert, klar zu trennen.

Während der Autophagie wird das zytoplasmatische Zellmaterial (Proteine, alte und defekte Zellorganellen) in ein expandierendes Membran-Phagophor sequestiert, welches zu einem doppelmembranären Vesikel, dem Autophagosom, heranreift. Die Frage des Ursprungs dieser Membran ist immer noch ungeklärt. Lange Zeit wurde postuliert, dass die Membran den Ursprung in einer bereits existierenden Membran, wie z.B. dem endoplasmatischen Retikulum oder dem Golgi, hat. Aktuelle Auffassungen sprechen über eine *de novo* Formation des Phagophors aus einer Core-Membran, die durch Anlagerung verschiedener Vesikel expandiert (Kirisako *et al.*, 1999; Mizushima *et al.*, 2003; Mizushima *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2007). Das sequestierte Material kann erst degradiert werden, wenn die Autophagosomen mit den frühen oder späten Endosomen zu einem sogenannten Amphisom fusionieren, und anschließend das Amphisom, nach dem letzten Fusionsschritt, den Lysosomen das Material abgibt (De Duve *et al.*, 1966). Durch die lysosomalen Membranpermeasen werden die entstandenen Makromoleküle für verschiedene

Prozesse, wie z.B. Proteinsynthese, Glukoneogenese, Enzymsynthese usw. zur Verfügung gestellt (Abb. 1.3).

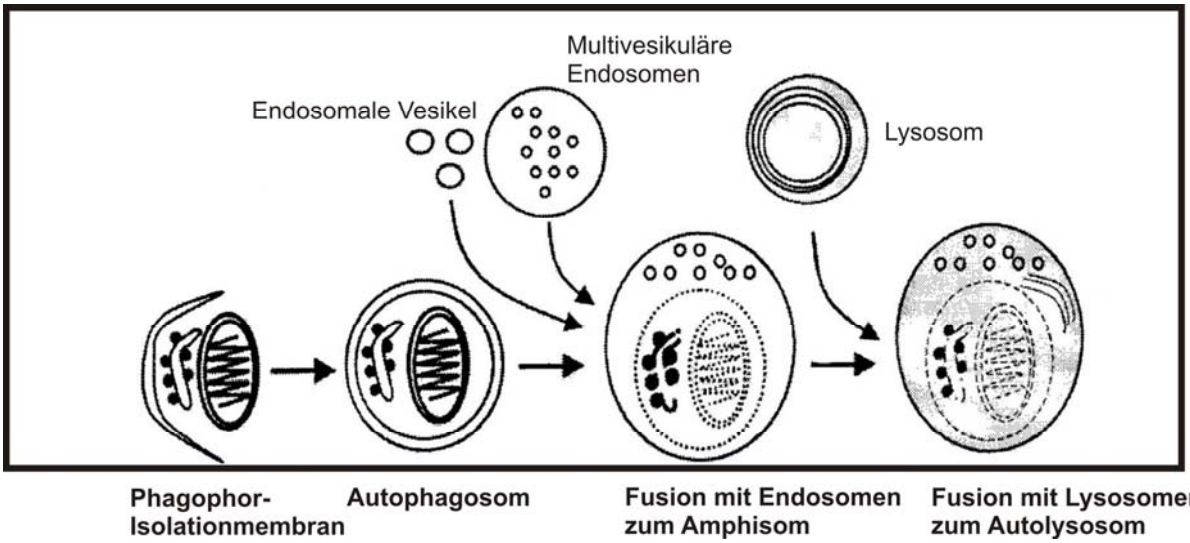


Abb. 1.3: Bildung und Reifung von Autophagosomen. Eine doppelmembranäre „Isolationsmembran" schließt das zytoplasmatische Material oder auch geschädigte Organellen wie Mitochondrien oder endoplasmatisches Retikulum um. Das Autophagosom bildet sich durch Elongation und Schließen der Membran. Das eingeschlossene Material kann nach der Fusion der Autophagosomen mit Endosomen und Lysosomen degradiert werden. Schema modifiziert und abgeleitet nach Eskelinen, 2005.

Auf zellulärer Ebene ist der Prozess der Autophagie noch zum großen Teil unerforscht. Ein Gewebe mit sehr intensiver autophagischer Aktivität ist die Leber, in deren Hepatozyten die Autophagosomen 0,5% des Zellvolumens darstellen. In der Leber wird die Autophagie u.a. durch Aminosäuren, Hormone wie Insulin und die intrazelluläre ATP-Konzentration reguliert (Chen *et al.*, 2011; Gohla *et al.*, 2007b). Die erste Untersuchung über die Beteiligung und Bedeutung der $G\alpha_i$-Proteine für diesen Prozess kommt aus Kolonkarzinom Zelllinien (Ogier-Denis *et al.*, 1995).

1.7.1 Molekulare Regulation der Autophagie

Man unterscheidet vier verschiedene Formen von Autophagie: **Makroautophagie** (Autophagie im engeren Sinne), **Mikroautophagie**, **Chaperone-vermittelte Autophagie** und **Cytoplasm-to-vacuole targeting**. Die letztgenannte Form findet nur in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* statt und stellt einen biosynthetischen Prozess dar, im Gegensatz zu den anderen katabolen autophagischen Formen (Hutchins *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2001).
Mit Autophagie ist in der Literatur generell **Makroautophagie** gemeint und der Prozess wurde in Abschnitt 1.5 beschrieben. Die **Mikroautophagie** beschreibt die

Degradation des Zytoplasmas direkt durch eine Einstülpung der Lysosomenmembran, ohne ein Zwischen-Transportvehikel (Li *et al.*, 2012). Bei der **Chaperon-vermittelten Autophagie** werden Proteine mit einem KFERQ-Motiv von dem 73 kDa großen *Heat Shock Cognate Protein* (Hsp 73) erkannt und gebunden (Benbrook *et al.*, 2012). Unter dem KFERQ-Motiv versteht man vier aufeinanderfolgende Aminosäuren, die entweder vor oder nach einem Glutamin liegen. Dabei ist die erste der vier Aminosäuren basisch, die zweite azid, die dritte hydrophob und die vierte entweder basisch oder hydrophob. Solche von Hsp 73 erkannten Proteine werden zum Lysosom geführt (Dice, 1990), wo sie anschließend durch das *Lysosomale-Membran-assoziierte-Protein 2a* (LAMP-2a) abgebaut werden.

Die Autophagie-Forschung wurde durch Untersuchung des einfach strukturierten Modell-Systems „Hefe“ stark befördert. Es wurden genetische Screens mit dem Ziel durchgeführt, die wichtigsten Gene, die an ihrer Regulation beteiligt sind, zu identifizieren (Noda *et al.*, 1995; Tsukada *et al.*, 1993). Viele dieser sogenannten Atg-Gene (*Autophagy-related genes*) sind evolutionär konserviert (Levine *et al.*, 2004). Mittlerweile sind 31 Atg-Proteine in der Hefe identifiziert worden (Kabeya *et al.*, 2007). Davon sind mindestens 16 Atg-Gene für die Bildung von Autophagosomen notwendig (Tsukada *et al.*, 1993). Sie sind in zwei Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssystemen organisiert. Für die Elongation der Präautophagosomen ist das Atg12-Atg5-Atg16L-Konjugationssystem wichtig, das allerdings bereits vor der terminalen Fusion mit den Lysosomen dissoziiert. Für die Bildung und Reifung der Autophagosomen ist das LC3-Konjugationssystem verantwortlich (Abb. 1.4). *Microtubule-associated-protein light chain 3* (MAP-LC3, kurz: LC3) ist das autophagosomale Ortholog zum Hefe-Protein Atg8 und verbleibt in seiner lipid-modifizierten LC3-II Form auf den reifen Autophagosomen bis zur Fusion mit Lysosomen. Die Lipid-Modifikation mit Phosphatidylethanolamin (PE) ermöglicht dem hydrophilen Protein eine Membranbindung und Membranassoziation mit den Autophagosomen. LC3 wird methodologisch als einziger spezifischer Marker für die Autophagie betrachtet, da es von der Bildung bis zur autophagolysosomalen Degradation des Autophagosoms anwesend ist (Mizushima, 2004).

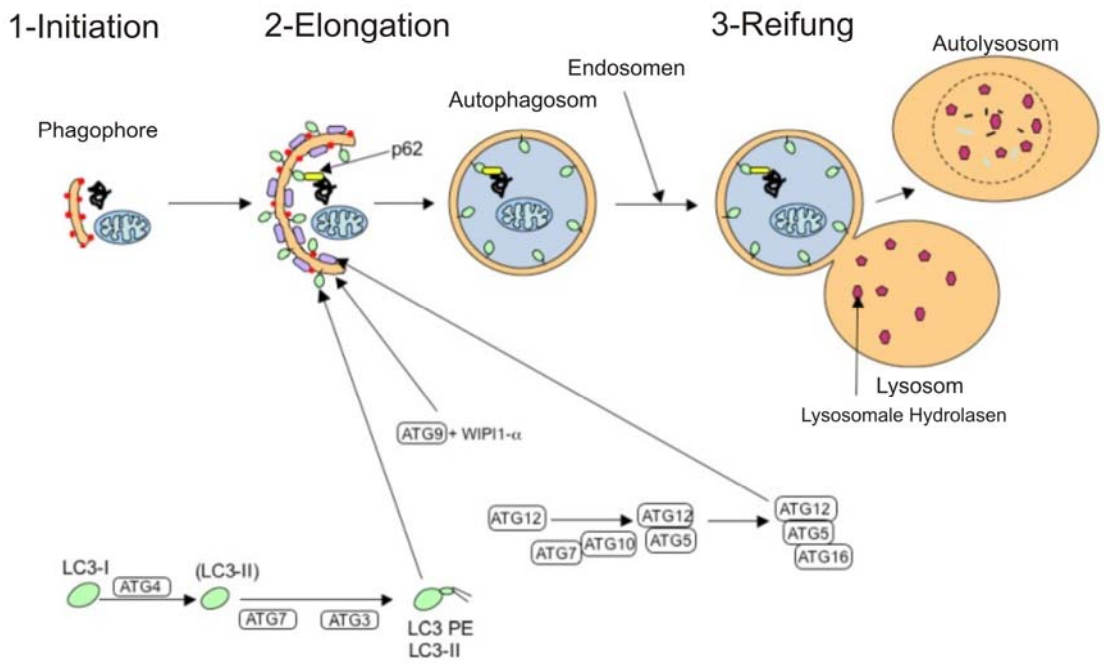


Abb. 1.4: Wichtige Konjugationssysteme für die Reifung von Autophagosomen. Die beiden Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssysteme Atg12-Atg5-Atg16L und LC3 sind verantwortlich für die Bildung und Elongation sowie die Reifung des Autophagosoms. Der Atg12-Atg5-Atg16L-Komplex dissoziiert vor der Reifung der autophagosomalen Membran wieder ins Zytoplasma ab. Das lipid-modifizierte LC3-II verbleibt auf dem Autophagosom und wird im Lysosom degradiert. Schema modifiziert und abgeleitet nach Lilienbaum, 2013.

1.7.2 Patho-/Physiologische Bedeutung der Autophagie

Die Autophagie stellt aber auch eine adaptive Antwort auf den Hungerzustand der Zelle dar und ermöglicht dem Organismus ein temporäres Überleben, weil sie unter solchen Bedingungen eine alternative Energie- und Substratquelle ist (Reggiori *et al.*, 2005). Bereits hingewiesen wurde, dass Autophagie auch essentiell für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase ist, und während der Differenzierung und Entwicklung verschiedener Gewebe hochreguliert wird. Durch die Elimination ROS (*reactive oxygen species*)-geschädigter Mitochondrien spielt die Autophagie in Alterungsprozessen eine Rolle (Dutta *et al.*, 2013).

Defekte und Dysregulation der Autophagie werden zur Erklärung des Pathomechanismus für die Entstehung bzw. Progression von Kanzerogenese, neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Chorea Huntington oder Alzheimer-Demenz, Kardiomyopathien und muskulären Erkrankungen herangezogen (Shintani *et al.*, 2004).

Autophagie spielt jedoch auch bei der Immunabwehr gegen verschiedene Mikroorganismen eine wichtige Rolle. Es ist interessant, dass manche von ihnen wiederum Mechanismen entwickelt haben um die autophagische Proteolyse zu vermeiden oder ihr zu entkommen, oder aber die autophagische Maschinerie für eigene Zwecke zu nutzen (Nakagawa *et al.*, 2004; Schmid *et al.*, 2006; Schmid *et al.*, 2007).

1.7.3 Rolle von Autophagie in der Immunabwehr

Die Aktivierung von Autophagie stellt einen wichtigen Prozess in der Abwehr gegen verschiedene Pathogene dar, entweder durch die direkte Elimination des invadierten Pathogens oder durch die Produktion und Lieferung von fremden Antigenen an die MHC-II antigenpräsentierenden Moleküle.

Nach der Erkennung von PAMPs aktiviert die **TLR**- (*Toll-like receptor*) Signalkaskade die Autophagie, die wichtig ist für die Elimination des Pathogens sowie für die Abgabe von zytosolischen PAMPs an endomembranäre Organellen (Fujita *et al.*, 2011). Autophagie ist auch ein Effektormechanismus der makrophagischen Phagozytose und Maturation der Phagosomen (Liu *et al.*, 2006). Zusätzlich kann Autophagie die TLR-Signalkaskade aktivieren und damit zu einem positiven Feedback-Mechanismus für die Amplifikation der TLR-induzierten Signale beitragen (Lee *et al.*, 2007). Die Rekrutierung von Atg-Proteinen zu den Phagosomen ist für die antigenpräsentierende Funktion der dendritischen Zellen sehr wichtig (De Luca *et al.*, 2012). Die Zytokine als wichtige Effektor-Komponenten des Immunsystems können die Autophagie stimulieren (T_H1 Zytokine, wie IFNγ und TNFα) oder inhibieren (T_H2 Zytokine, wie IL-4 und IL-13) (Kleinnijenhuis *et al.*, 2011). Andererseits reguliert die Autophagie die Transkription und Sekretion einer Reihe von Zytokinen, mit dem generellen Prinzip, dass die Transkription proinflammatorischer Zytokine (IL-1α, IL-1β und IL-18) unterdrückt wird (Wittkopf *et al.*, 2012). Zusammengefast ist die Autophagie in der Phagozytose, Antigen-Präsentation und Zytokin-Modulation des angeborenen Immunsystems involviert.

Bezüglich des adaptiven Immunsystems spielt Autophagie eine wichtige Rolle für die Entwicklung, das Überleben und die Funktion von Lymphozyten. Die Studien über die Bedeutung der Autophagie für die negative Selektion von T-Zellen und die Entwicklung der Selbst-Toleranz sind kontrovers. Einerseits gibt es solche Studien,

die das bestätigen (Nedjic *et al.*, 2009), andererseits aber auch welche, die das in Frage stellen (Sukseree *et al.*, 2012). Auf jeden Fall ist Autophagie für das Überleben der T-Zellen in der Peripherie essentiell, weil durch ihre Abwesenheit ein erhöhter Zelltod entsteht (Pua *et al.*, 2009).

Genomweite Assoziationsstudien zeigen eine starke Verbindung zwischen Polymorphismen in zwei humanen autophagischen Genen, IRGM1 und Atg16L1, und der Prädisposition für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (Brest *et al.*, 2011). Neuere klinisch-relevante Studien konnten auch die Rolle der Autophagie für die Entstehung von Lupus erythematodes (Gros *et al.*, 2012) und EAE (*Experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis*) (Bruzzone *et al.*, 2009) entschlüsseln. Man kann nicht generell sagen, ob die Aktivierung oder die Inhibition der Autophagie von Vorteil ist, da sie in unterschiedliche Prozesse der Immunregulation eingreift. Das betrifft besonders die Immunabwehr gegen verschiedene Mikroorganismen, wie z.B. Mycobacterien, Streptokokken, Shigellen, Salmonellen, Yersinien, Plasmodien, Listerien. Das bessere Verstehen der autophagischen Regulation des Immunsystems kann helfen, Strategien für die Modulation, Prävention und Behandlung autoimmuner Krankheiten zu entwickeln.

1.8 *Listeria monocytogenes*

Ein Modellorganismus für Untersuchungen der generellen Prinzipien der intrazellulären Infektion ist *Listeria* monocytogenes. Dank seinen Eigenschaften eignet sich das gram-positive Bakterium für die Analyse der autophagischen Proteolyse auf zellulärer Ebene (Rich, 2006).

L. monocytogenes wurde 1926 zuerst in England von E. G. D. Murray isoliert und für lange Zeit nur als Verursacher der Zoonose Listeriose betrachtet. Nach der ersten Epidemie in 1970 wurde es auch als humanes Pathogen anerkannt (Carbonnelle *et al.*, 1979), das eine Lebensmittelvergiftung mit klinischen Symptomen wie Gastroenteritis, Sepsis oder Meningoencephalitis verursacht. Dank einer wirksamen Lebensmittelüberwachung ist die Inzidenz der Listeriose in Deutschland eher niedrig. Die Erkrankung hat eine hohe Mortalitätsrate bei immunsupprimierten Patienten, Neugeborenen und Föten, mit einer Sterblichkeit von 30% (Watson, 2009). Nach der Nahrungsaufnahme kann das Bakterium das intestinale Epithel durchdringen und wird über die Lymph- und Blutgefäße im Organismus verteilt. Die primär befallenen

Organe sind die Milz und die Leber, wo die weitere Replikation des Bakteriums unter Bildung von Abszessen stattfindet. Die Listerien sind durch ihre Fähigkeit, zwei wichtige epitheliale Barrieren (die Blut-Hirn-Schranke und die Plazenta-Barriere) durchdringen zu können, gekennzeichnet. Dies könnte Meningoencephalitiden oder Infektionen des Fötus mit der Gefahr eines Aborts, einer Totgeburt oder einer neonatalen Meningitis zur Folge haben.

1.8.1 Zellbiologie der *L. monocytogenes* Infektion

Listeria monocytogenes ist ein invasives Bakterium, das eine Reihe verschiedener Zelltypen infizieren kann. Mit einem Arsenal virulenter Faktoren, die funktionell oder strukturell den Wirtsproteinen ähnlich sind, benutzt das Bakterium die Zell-Maschinerie für eigene Zwecke. Zwei Proteine der Familie der Internaline sind für das Eindringen des Bakteriums in die Zelle wichtig: das **Internalin A** (InlA), das an das Adherent-Junction-Protein E-Cadherin kovalent bindet, und das **Internalin B** (InlB), das an die Rezeptor-Tyrosin-Kinase Met bindet (Bierne *et al.*, 2002). Nach der Bindung an den Rezeptor kommt es zu einer Ubiquitinierung, Clathrin-Rekrutierung und Umordnung des Zellzytoskelets und das Bakterium wird in die Zelle in Phagosomen aufgenommen. Mit Hilfe der Produktion von **Listeriolysin O** (LLO) und **Phospholipasen** entkommen die Bakterien der Phagozytose und gelangen ins Zytoplasma, wo sie mit Hilfe des **ActA Proteins** das Zytoskelet der Zelle rekrutieren. ActA ist kritisch für die intrazellulären und interzellulären Bewegungen der Listerien und ermöglicht eine bakterielle Dissemination im Wirtsorganismus. Aktin polymerisiert unipolar nur an der posteriellen Seite des Bakteriums und daher sind dessen Bewegungen in eine Richtung gerichtet. Freibewegliche Listerien bilden Ausstülpungen an der Zellmembran und infizieren benachbarte Zellen ohne eine Zelllyse (Abb. 1.5). Damit umgehen die Bakterien der humoralen Immunantwort des Wirtsorganismus.

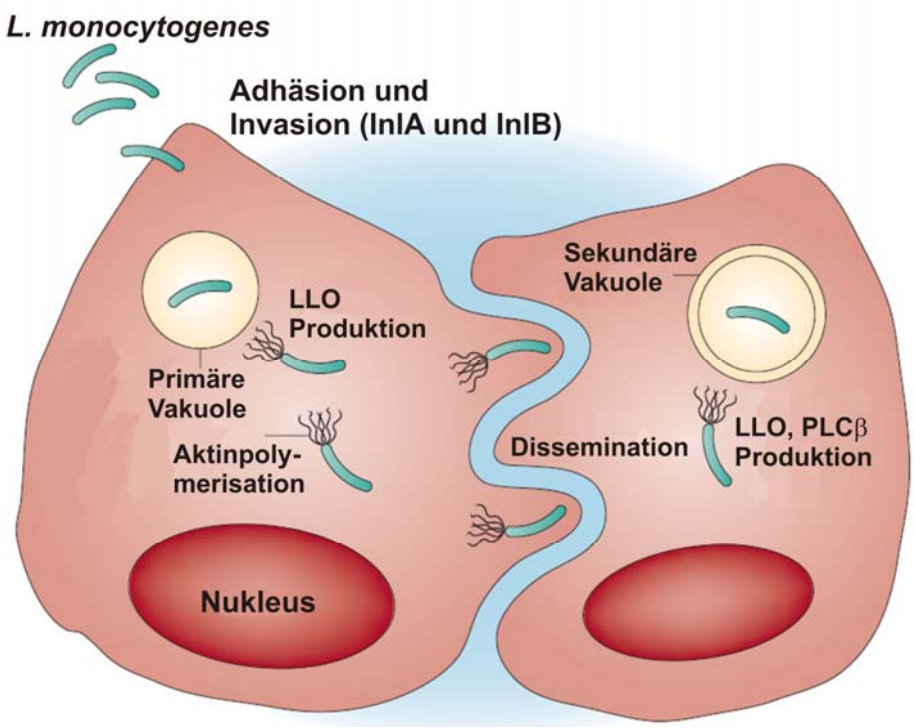


Abb. 1.5: Zelluläre *L. monocytogenes* Infektion. Nach der Invasion mit Hilfe von Internalinen wird das Bakterium in den Phagosomen aufgenommen. Durch die Produktion von Listeriolysin O (LLO) verlässt das Bakterium die Phagosomen. Mit Hilfe Aktin-reicher Flagellen bewegt sich das Bakterium innerhalb der Zelle und bildet Ausstülpungen an der Zellmembran. Auf diese Art und Weise erfolgt die sekundäre Infektion benachbarter Zellen ohne eine Zelllyse. Damit sind die Bakterien vor der humoralen Immunantwort geschützt. Schema modifiziert und abgeleitet nach Pamer, 2004.

1.8.2 Listerien und Autophagie

Die Autophagie ist nur dann ein protektiver Effektormechanismus gegen intrazelluläre Mikroorganismen, wenn die Fusion der Autophagosomen mit den Lysosomen als Voraussetzung für die Tötung der Pathogene erfolgt. Wenn die Reifung eines Autophagosoms verhindert wird, dienen die Autophagosomen als eine Replikationsnische und sind für das Pathogen von Vorteil. Nach der Aufnahme von Listerien in die Zelle dient LLO als ein Signal für die Rekrutierung der autophagischen Maschinerie (Meyer-Morse *et al.*, 2010). Die Hauptvirulenzfaktoren der Listerien für das Vermeiden einer autophagischen Proteolyse sind PLC und ActA (Birmingham *et al.*, 2007; Yoshikawa *et al.*, 2009). ActA-defiziente Listerien werden effizient in den Autophagosomen abgebaut und getötet (Py *et al.*, 2007). Die Komponenten der Aktin-Maschinerie sind als Schutz vor Autophagie notwendig, weil sie mit der Erkennung des Bakteriums durch das Adaptor-Protein für selektive

Autophagie **p62** interferieren (Zheng *et al.*, 2009). Das Schicksal des Bakteriums nach der Infektion eines Makrophages ist schematisch in der Abb. 1.6 dargestellt.

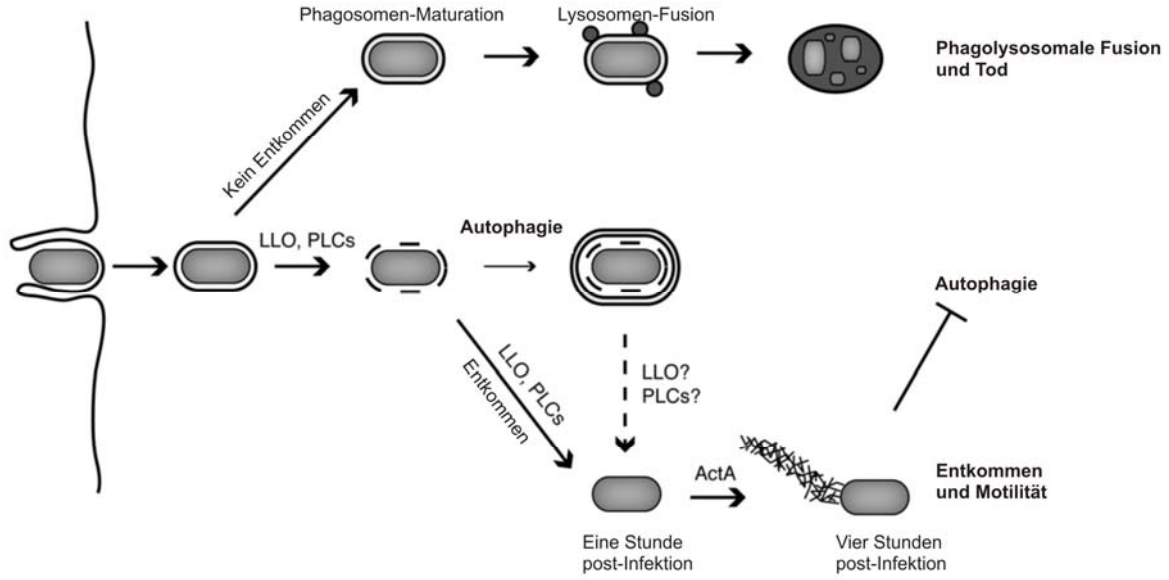


Abb. 1.6: Modell der Interaktion von Listerien mit der autophagischen Maschinerie während der Infektion von Makrophagen. Ein Teil der in den Phagosomen gefangenen Bakterien wird in den Lysosomen degradiert. Die Bakterien, die den Phagosomen entkommen, werden entweder durch die Autophagie degradiert, oder sie können benachbarte Zellen durch ihre Beweglichkeit mit Hilfe Aktin-reicher Flagellen infizieren. Schema modifiziert und abgeleitet nach Birmingham *et al.*, 2007.

1.8.3 Immunologische Aspekte der Listeriose

Die angeborene und die adaptive Immunantwort spielen eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr gegen Listerien. In der akuten Phase der Infektion (in den ersten 3-5 Tagen) ist das angeborene Immunsystem mit seinen Effektorzellen neutrophilen Granulozyten und Makrophagen der Leber und Milz für die Elimination der Bakterien durch Produktion von RNS (*reactive nitrogen species*) und ROS wichtig (Shaughnessy *et al.*, 2007). Sie produzieren auch IL-12, das die NK-Zellen aktiviert, die anschließend Interferon-gamma (INFγ) produzieren. INFγ aktiviert wiederum die Makrophagen und verstärkt ihre abtötende Wirkung. INFγ und IL-12 stimulieren auch die zellulären Komponenten des adaptiven Immunsystems, die T_H1 $CD4^+$ T-Zellen, während konventionelle dendritische Zellen (DCs) die Proliferation $CD8^+$ T-Zellen stimulieren (Jung *et al.*, 2002). Letztere wirken mit Hilfe zytoplasmatischer Granula sowie Perforin und Granzymen zytotoxisch und sind für das Abklingen der Krankheit und eine sterile Immunität in der zweiten Phase der Infektion (10-14 Tage) wichtig.

Es wurde lange Zeit angenommen, dass die humorale Komponente des adaptiven Immunsystems keine Rolle in der Immunabwehr gegen Listerien spielt. Neuere Studien belegen eine Rolle für B-Zellen durch die Unterstützung der T-Zell-spezifischen Immunantwort, ohne Produktion von Antikörpern oder eine antigenpräsentierende Funktion (Shen *et al.*, 2003). Interessanterweise führt eine orale Infektion bei Wildtyp Mäusen mit ActA Listerien-Mutanten zu einer spezifischen IgA-Antwort in GALT (*gut-associated lymphoid tissues*) (Manohar *et al.*, 2001).

1.9 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Höhere Wirbeltiere haben zwei interaktive und schützende Systeme entwickelt: das angeborene und das adaptive Immunsystem. Das ältere, kontinuierlich aktive und sofort reagierende angeborene Immunsystem enthält lösliche Proteine, die mikrobielle Produkte binden, sowie phagozytierende Leukozyten, die entweder im Blut zirkulieren und auf einen Stimulus hin in das entzündete Gewebe einwandern, oder als residuale Zellen in verschiedenen Geweben auf das externe Material warten. Für die Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen sind die chemotaktischen Signale von GPCRs und ihre Übertragung durch $G\alpha_i$-Proteine von großer Bedeutung. Es sind drei Isoformen von $G\alpha_i$-Proteinen bekannt. Allerdings ist weitestgehend ungeklärt, inwieweit die Abwesenheit einer Isoform durch die verbliebenen Isoformen kompensiert werden kann. Ein wichtiger Indikator ist die kompensatorische Hochregulation der Proteinkonzentration.

Ziel dieser Arbeit ist es, einen möglichen kompensatorischen Mechanismus semiquantitativ zu untersuchen, der die Isoformspezifität oder die Redundanz zwischen $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ erklären könnte. Dazu soll in verschiedenen Zelllinien und in der Lunge als einem Organ, das ein Reservoir für Leukozyten darstellt, die Menge dieser zwei Isoformen mittels Immunoblot-Analyse untersucht werden. Des Weiteren soll geklärt werden, ob es in $G\alpha_i$-defizienten Zellen zu einer Regulation der Expression der verbliebenen Isoform und der $G\beta$-Untereinheit kommt. Darüber hinaus soll die Rolle der $G\alpha_i$-Proteine für die Migration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in einem Entzündungsmodell untersucht werden. Da eine Beteiligung von $G\alpha_{i3}$ bei der Bildung der Autophagosomen beschrieben ist, soll die bakterielle Infektion mit *L. monocytogenes*, bei der die Autophagie bedeutend ist, etabliert werden. Anschließend soll die Rolle und Beteiligung von $G\alpha_{i3}$ während der Immunabwehr gegen die bakterielle Infektion *in vitro* und *in vivo* analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Aceton	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethylendiamin-N,N,N,N'-tetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Giemsa Färbelösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogensulfat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
May-Grünwald Färbelösung (0,25% w/v)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	BDH Prolabo, Frankreich
β-Mercaptoethanol	Applichem, Darmstadt
N, N'-Methylenbisacrylamid (Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumsulfat	Merck, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Nonidet P40 (NP-40)	Roche Diagnostics, Mannheim
Okadasäure	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sorvall, Asheville, USA
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA, Fraktion V)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure rauchend 37%	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Thioglykollat	BD Biosciences, Heidelberg
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tween-20	Roth, Karlsruhe
Harnstoff > 98%	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.2 Antikörper und Antiseren

Antikörper, die für Immunoblot-Analysen, Immunofluoreszenzfärbungen und FACS-Färbungen verwendet wurden, sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Verwendete Antikörper

Antikörper	Spezies	Verwendung	Quelle
Anti-$G\alpha_{i2}$	Kaninchen	IB; IF	Gohla *et al.*, 2007b
Anti-$G\alpha_{i3}$	Kaninchen	IB; IF	Gohla *et al.*, 2007b
Anti-$G\alpha_{common}$	Kaninchen	IB	Exner *et al.,* 1999
Anti-$G\beta_{common}$	Kaninchen	IB	Leopoldt *et al.*, 1997
Anti-LC3 B	Kaninchen	IB; IF	Novus Biologicals Inc
Anti-LC3	Maus	IF	NanoTools
Anti-α-Tubulin	Maus	IB	Sigma-Aldrich
Anti-β-Aktin	Maus	IB	Sigma-Aldrich
Anti-CD16/CD32	Ratte	FACS	BD Biosciences
Anti-Maus F4/80-FITC	Ratte	FACS	BioLegend
Anti-Maus CD11b-PE-Cy7	Ratte	FACS	BD Biosciences
Anti-Maus Ly6G-PE	Ratte	FACS	BD Biosciences
Anti-*L.monocytogenes*	Kaninchen	IF	Biotrend
Anti-Maus IgG HRP-Konjugat	Kaninchen	IB	DAKO
Anti-Kaninchen IgG HRP-Konjugat	Ziege	IB	Cell Signaling
Anti-Maus IgG AlexaFluor® 546	Ziege	IF	Invitrogen
Anti-Kaninchen IgG AlexaFluor® 488	Ziege	IF	Invitrogen

Anti-Phalloidin AlexaFluor® 633		IF	Invitrogen
DAPI		IF	Sigma-Aldrich

2.1.3 Inhibitoren und Antibiotika

Name	Bezugsquelle
Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim
Aprotinin	Applichem, Darmstadt
Leupeptin-Hemisulfat	Applichem, Darmstadt
Pepstatin A	Merck, Darmstadt
Puromycin	Sigma, Deisenhofen

2.1.4 Reagenzien, Kits und Verbrauchsmaterial

Name	Bezugsquelle
Vorgefärbte Protein-Molekulargewichtsstandards	Bio-Rad, München
ECL Western Blotting Detection System	GE Healthcare, München
ProLong Gold Antifade Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Micro BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, USA
Zellkulturmaterial	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Hybond C Nitrozellulosemembran	Amersham Biosciences, Freiburg
Whatman GF/B Papier	Whatman, Maidstone, UK
Röntgenfilme	Fuji Photo Film, Düsseldorf
Wägepapier	Neolab, Heidelberg
Maschensieb, 70 und 100 µm	BD/Falcon, Bedford, USA
Kanülen	B. Braun AG, Melsungen
96-well-Mikrotiterplatten	TPP, Trasadingen, Schweiz
Objektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Zytoträger	Tharmac, Waldsolms

2.1.5 Geräte

Name	Bezugsquelle
Brutschrank	Sanyo, Bad Nenndorf
Elektrophorese von Proteinen	BioRad, München
ELISA Reader	Tecan, Crailsheim
FACS Gerät und Auswertungssoftware	FACSCanto, BD, Heidelberg

Fotoentwicklermaschine	Protec, Oberstenfeld
Geldokumentationssystem	Versadoc BioRad, München
Kühlzentrifugen	Eppendorf, Hamburg Beckman Coulter, Krefeld
Cellspin Zytozentrifuge	Tharmac, Waldsolms
Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510	Carl Zeiss, Jena
Inverses Lichtmikroskop	Nikon, Düsseldorf
PCR Maschinen	Eppendorf, Hamburg
Spektrophotometer	Dynatech, Denkendorf
Sterilbank	Thermo Scientific, Karlsruhe
Tischzentrifugen	Thermo Scientific, Karlsruhe
Ultra-Turrax	ART Prozess & Labortechnik, Müllheim

2.1.6 Medien und Puffer

2.1.6.1 Stammlösungen und Puffer

Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Pro 50 ml Puffer wurde eine Proteasen-Inhibitorentablette (Roche) frisch zugegeben.

Tabelle 2.2: Stammlösungen und Puffer

Stammlösung oder Puffer	Zusammensetzung	
Blockierungspuffer	Tris pH 8	1 M
	$CaCl_2$	1 M
	NaCl	5 M
	Magermilchpulver	5%
	NP-40	0,2%
Laufmittelpuffer (10x konzentriert)	Tris-base	250 mM
	Glyzin	2 M
	SDS	10%
Antikörper-Verdünnungspuffer	HEPES pH 7,4	10 mM
	NaCl	0,5 M
	BSA	1%
	Tween-20	0,2%
	NaN_3	0,02%
TBS (10x konzentriert)	Tris-base pH 7,5	500 mM
	NaCl	1,5 M
Transfer-Puffer für Semi-dry Blot		
Anodenpuffer I	Tris	0,3 M
	Methanol	40%
Anodenpuffer II	Tris	25 mM

	Methanol	40%
Kathodenpuffer	Tris	25 mM
	Glyzin	40 mM
	Methanol	10%
Laemmli Puffer	Tris-HCl pH 6,8	250 mM
	Glycerol	40%
	β-Mercaptoethanol	20%
	SDS	4%
	Bromphenolblau	0,08%
Lysepuffer für MEFs	HEPES	50 mM
	NaCl	150 mM
	NP-40	1%
	SDS	1%
	Triton X-100	1%
Lysepuffer für RAW 264.7 und fEnd.5 Zellen	Tris pH 7,4	20 mM
	NaCl	300 mM
	EDTA	3,5 mM
	EGTA	1 mM
	Triton X-100	1%

2.1.6.2 Zellkulturmedien und Zusätze

Name	**Bezugsquelle**
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA, Pasching
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching
Penicillin (1000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	PAA, Pasching
L-Glutamin (200 mM)	PAA, Pasching
DMEM Medium	PAA, Pasching
RPMI 1640 Medium	PAA, Pasching
Trypsin/EDTA (0,5%/0,2%)	PAA, Pasching

2.1.6.3 Medien für die Bakterienkultur

Medium	**Bezugsquelle**
BHI (Brain Heart Infusion) Medium	BD Biosciences, Heidelberg
Columbia Agar Platten	BD Biosciences, Heidelberg
Roti-Store Cryoröhrchen	Roth, Karlsruhe

Das BHI Medium für die Kultivierung von *L. monocytogenes* wurde durch Autoklavieren (121°C, 2 Bar, 20 min) sterilisiert. Die Anzucht der Bakterien erfolgte aerob bei 37°C. Die *L. monocytogenes* Klone wurden auf Glaskügelchen in Cryoröhrchen eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.1.7 Bakterienstämme und Zelllinien

In Tabelle 2.3 sind die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien unter Angabe der Eigenschaften und der Referenz aufgelistet.

Tabelle 2.3: Bakterienstämme und Zelllinien

Bakterienstamm/Zelllinie	Eigenschaften	Referenz
L. monocytogenes	fakultativ intrazellulär replizierendes Bakterium	ATCC Stamm 43251
Murine Embryonalfibroblasten	Wildtyp, Klon 3D9	Dr. K. Spicher
	$G\alpha_{i2}^{-/-}$, Klon 2G2	
	$G\alpha_{i3}^{-/-}$, Klon 2F10	
	$G\alpha_{i2}^{-/-}$, $G\alpha_{i3}^{-/-}$, Klon 2D7	
fEnd.5	endotheliale Zellen	Wiege *et al*., 2012
RAW 264.7	murine Monozyten/Makrophagen Zelllinie aus BALB/c Mäusen, ursprünglich aus Peritoneum	Raschke *et al*., 1978

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Zellkultur

Murine Embryonalfibroblasten (MEFs) wurden in Dulbecco´s modifiziertem Eagle´s Medium (DMEM) mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 1% Glutamin bei 5% CO_2 und 37°C kultiviert. Nach drei bis vier Tagen wurden die Zellen nach Ablösen mit Trypsin/EDTA Lösung in neue Zellkulturschalen überführt.

Die RAW 264.7 Makrophagen und die fEnd.5 Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Gessner, Hannover, zur Verfügung gestellt. Diese Zelllinien wurden mit einem shRNA-Plasmid spezifisch für $G\alpha_{i2}$ transfiziert ($G\alpha_{i2}$ KD Zellen) (Wiege *et al.*, 2013; Wiege *et al.*, 2012). Als Kontrolle dienten Zellen, die mit einem leeren pLKO1 Plasmid transfiziert wurden (Mock Zellen). Die Kultivierung von RAW 264.7

Makrophagen erfolgte in RPMI Medium mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1% Glutamin und 50 mM β-Mercaptoethanol bei 5% CO_2 und 37°C. Zur Selektion wurde dem Wachstumsmedium Puromycin (3 µg/µl) zugegeben. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen durch Zugabe von frischem Medium in neue Zellkulturflaschen überführt. Die fEnd.5 Zellen wurden in DMEM Medium mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 1% Glutamin bei 5% CO_2 und 37°C kultiviert. Hier diente ebenfalls Puromycin (3 µg/µl) im Wachstumsmedium zur Selektion der sh-Plasmide. Die Zellpassage erfolgte alle fünf bis sechs Tage durch Ablösen der Zellen mittels Trypsin/EDTA-Lösung im Verhältnis 1:10.

2.2.1.2 Immunofluoreszenz

Für Immunofluoreszenzversuche wurden 22 mm Ø Glasplättchen in 6-well-Mikrotiterplatten gelegt. Für *in vitro* Infektionsversuche mit *L. monocytogenes* wurden 5 x 10^4 MEFs mit 5 x 10^5 Listerien infiziert (MOI = *multiplicity of infection* 10:1). Nach unterschiedlichen Inkubationszeitpunkten (30 min, 1 oder 4 Stunden) wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, für 20 min in 4% Paraformaldehyd (PFA) bei Raumtemperatur (RT) fixiert und anschließend 10 min lang bei 4°C mit 0,5% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Die fixierten Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Um freie, unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Zellen für eine Stunde bei RT (oder über Nacht bei 4°C) mit 3% BSA in PBS inhibiert. Anschließend wurden die Zellen mit verdünnten Primärantikörpern eine Stunde bei RT inkubiert (anti-*L. monocytogenes* Antikörper 1:1000 und anti-LC3 Antikörper 1:100). Die Zellen wurden dreimal mit kaltem PBS gewaschen und für eine Stunde mit Alexa Fluor 488 IgG und Alexa Fluor 533 IgG inkubiert (1:100 Verdünnung in 1% BSA in PBS). Nach einem erneuten Waschvorgang wurden die Zellen 10 min lang mit DAPI inkubiert (1:3000 Verdünnung in 1% BSA in PBS einer 5 mg/ml Stammlösung). Abschließend wurden die Glasplättchen in ProLong Gold Antifade Reagenz eingebettet und konfokalmikroskopisch ausgewertet.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Gewinnung von Organ- und Zelllysaten

Zur Herstellung von Organlysaten wurden Mausorgane in Lysepuffer aufgenommen und mithilfe eines Ultraturrax homogenisiert, anschließend für 30 min bei 4°C inkubiert und zentrifugiert (20000 rpm, 4°C, 15 min). Die Aufbewahrung des Überstands bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -20°C.
Zur Gewinnung von Gesamtzelllysat wurden adhärente Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in eiskaltem Lysepuffer aufgenommen und für die Homogenisierung durch eine 26-gauge Kanüle zehnmal aufgezogen. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4°C und anschließender Zentrifugation (15000 rpm, 4°C, 15 min) wurden die Zelllysate sowohl für die Proteinbestimmung als auch für Immunoblot-Analysen genutzt.

2.2.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mithilfe des MicroBCA Kits (Pierce) nach den Herstellerangaben.

2.2.2.3 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer relativen molekularen Masse wurde ein denaturierendes, diskontinuierliches SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)-System verwendet (Laemmli, 1970). 20-30 µg der lysierten Zell- oder Gewebeproben wurden so mit vierfach-konzentriertem SDS-Laemmli-Puffer versetzt, dass dieser am Ende in einfacher Konzentration vorlag. Danach erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung (100 V, 3-4 h) der Proteine in SDS-Polyacrylamid-Gelen. Zur besseren Auftrennung der verschiedenen G-Proteine wurden Harnstoffgele verwendet. Harnstoff denaturiert Proteine durch Spaltung von Wasserstoffbrücken und verhindert so die Aggregation und standardisiert die Konformation von Proteinen.

Die Harnstofflösung für das Trenngel wurde jeweils frisch angesetzt und bei RT gelöst. Die zur Gelbeladung vorbereitete Probe wurde nicht erhitzt um eine Aggregation der G-Proteine zu vermeiden.

Tabelle 2.4: Harnstoffgele		
	Trenngel 9%	**Sammelgel**
Harnstoff	14,4 g	**-**
H_2O	26 ml	**-**
Acrylamid/Bisacrylamid 30%/0,8%	-	1 ml
Acrylamid/Bisacrylamid 40%/1,6%	9 ml	-
Trenngelpuffer 3 M Tris pH 8,8; 0,8% SDS	5 ml	-
Sammelgelpuffer 125 mM Tris pH 6,8; 0,1% SDS	-	9 ml
TEMED	10 µl	10 µl
10% (w/v) APS	100 µl	100 µl

2.2.2.4 Immunoblot-Analyse

Für einen spezifischen Proteinnachweis müssen die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert werden, und anschließend mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Der Proteintransfer aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran erfolgte mittels des Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell Systems (Bio-Rad Laboratories GmbH) (Towbin *et al.*, 1992) mithilfe von drei Transfer-Puffern (Anodenpuffer I, Anodenpuffer II und Kathodenpuffer). Die Transferdauer beträgt 60 min bei 60 mA. Um die Beladung und den Transfer der Proteine zu überprüfen, wurde die Nitrozellulosemembran mit Ponceau S-Lösung reversibel angefärbt und so die Proteinbanden sichtbar gemacht. Anschließend wurden die Membranen bei RT für eine Stunde in einem Blockierungspuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der Membran abzusättigen.

Eine Inkubation mit primären Antikörpern und Seren (Verdünnung 1:1000–1:8000), die das an die Membran gebundene Antigen spezifisch erkennen und binden, erfolgte über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Danach wurde die Nitrozellulosemembran dreimal für 15 min in TBS-T (TBS + 0,1% Tween-20) und einmal für 15 min in TBS gewaschen, und für eine Stunde bei RT mit einem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper (anti-Maus- bzw. anti-Kaninchen-IgG, 1:2000 verdünnt in Blockierungspuffer) inkubiert. Alle Inkubations- und Waschschritte wurden auf einem Schüttler durchgeführt. Die Nitrozellulosemembran wurde dann erneut dreimal für 10 min in TBS-T und einmal für 10 min in TBS gewaschen. Zur Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe

wurde die Peroxidase-Aktivität durch verstärkte Chemilumineszenz (*enhanced chemiluminescence*, ECL) nachgewiesen. Dazu wurde die Membran für 1 min mit dem ECL-Reagenz benetzt, zwischen eine Folie gelegt und zur Belichtung auf Fotofilme aufgelegt.

2.2.3 Versuchstiere

$G\alpha_{i2}$- (Rudolph *et al.*, 1995) und $G\alpha_{i3}$-defiziente Tiere (Jiang *et al.*, 2002) wurden im Labor von Prof. Lutz Birnbaumer, USA, auf einem gemischten C57BL/6J/SV129 Hintergrund erzeugt. Die Mäuse wurden in unserer Tierhaltung auf einen C57BL/6N Hintergrund für mehr als acht Generationen rückgekreuzt und heterozygot verpaart. In die Untersuchungen wurden männliche und weibliche Tiere in einem Alter von 8-12 Wochen, bzw. für die Infektionsversuche mit *L. monocytogenes* vier Monate alte Mäuse einbezogen. Wildtyp Geschwister-Paare dienten als Kontrollen. Alle Mäuse wurden im SPF-Bereich bzw. in IVC-Käfigen in der Tierversuchsanlage der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen unter Einhaltung eines jeweils zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus gezüchtet. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Trinkwasser. Für die Zucht wurden in der Regel acht bis zehn Wochen alte Mäuse verpaart. Der Nachwuchs wurde nach 21 Tagen von den Eltern separiert. Die Markierung erfolgte mithilfe einer Ohrlochkodierung.
Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden von dem Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Aktenzeichen: AZ vom 02.11.2009; AZ vom 21.01.2010; AZ vom 19.12.2011; Genehmigungen: TO 7/10; PH 3/11).

2.2.3.1 Organentnahme

Die Mäuse wurden mit CO_2 betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Das Operationsgebiet wurde mit 70% Ethanol desinfiziert. Abdomen und Thorax wurden entlang der ventralen Mittellinie eröffnet und die entsprechenden Organe entnommen. Nach der Punktion des rechten Atriums zur Eröffnung des Blutkreislaufs wurden die Gefäße bei Bedarf zur Entfernung des Blutes mit PBS gespült. Die entnommenen Organe wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und entweder bei -80°C gelagert oder sofort für weitere Anwendungen genutzt.

2.2.3.2 Induktion einer Peritonitis, FACS Färbung und Analyse der peritonealen Flüssigkeit

Den Tieren wurde 4% Thioglykollat (700 µl) intraperitoneal appliziert und nach vier Stunden bzw. vier Tagen eine peritoneale Lavage durchgeführt. Die Bauchhöhle wurde dazu jeweils mit 10 ml eiskaltem PBS mehrmals gespült. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (1200 rpm, 4°C, 5 min). Die Zellpellets wurden in PBS resuspendiert und die Anzahl der Zellen in der peritonealen Lavageflüssigkeit (PLF) wurde bestimmt. 300 µl der PLF wurden mittels Zytozentrifugation zu einem Dünnschichtpräparat verarbeitet, nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt und mikroskopisch analysiert. Eine Million Zellen wurden für die FACS Analysen vorbereitet. Die übrigen Zellen wurden für eine Immunoblot-Analyse genutzt.
Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte mit Antikörpern die spezifisch sind für die Oberflächenmoleküle auf einzelnen Zellsubpopulationen. Die Antikörper sind mit einem Farbstoff gekoppelt welcher durch Anregung mit Licht bestimmter Wellenlänge Licht einer anderen speziellen Wellenlänge emittiert. Durch Laser werden die Farbstoffe angeregt und die Intensität des emittierten Lichts in einem Detektor gemessen. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern wurden 50 µl FC-Block Lösung (anti-CD16/CD32, Verdünnung 1:50) zugegeben und die Zellen 5 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die spezifischen Antikörper (anti-Ly6G-PE, Verdünnung 1:400, anti-CD11b-PE-Cy7, Verdünnung 1:400, anti-F4/80-FITC, Verdünnung 1:100) in einem Volumen von 50 µl zupipettiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis im Dunkeln erfolgte ein Waschschritt mit 300 µl PBS. Ungebundene Antikörper wurden in einem fünfminütigen Zentrifugationsschritt bei 350 g bei 4°C entfernt. Für die FACS-Messung wurden die Zellen in 300 µl PBS aufgenommen. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit der Software FlowJo 7.6.1.

2.2.3.3 Infektion mit *L. monocytogenes*

Die Anzucht von *L. monocytogenes* erfolgte über Nacht in BHI Medium bei 37°C. Für die Bestimmung der LD_{50} Dosis wurde am darauffolgenden Tag die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) bestimmt und auf 0,7 bis 0,75 OD_{600} eingestellt. Danach wurde die entsprechende Dilutionsreihe nach folgendem Schema vorbereitet (Abb. 2.1):

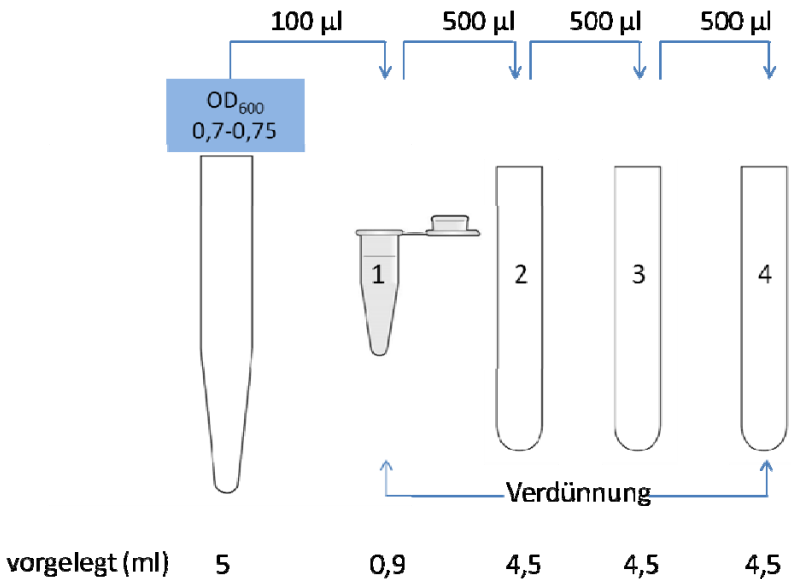


Abb. 2.1: Verdünnungsschema für die Bestimmung der LD_{50} Dosis. Für Details siehe Text.

LD_{50} ist die Abkürzung für „letale Dosis, 50%“, d.h. 50% der infizierten Tiere versterben. Diese Dosis muss für eine neue Listerien-Präparation getestet werden. Für den C57BL/6N Stamm entspricht die LD_{50} Dosis dem Dilutionsröhrchen 3 mit ca. 5 x 10^5 Listerien in 350 µl Volumen (Protokoll von Prof. K. Pfeffer, Düsseldorf, etabliert). Die LD_{50} sowie die anderen Listerien-Dosen (0,1 LD_{50}, 0,5 LD_{50}, 5 LD_{50} und 10 LD_{50}) wurden den Mäusen intraperitoneal verabreicht. Als Kontrolle der verabreichten Dosis wurden 10 µl der Verdünnungsstufen auf Columbia Agar Platten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Anzahl der bakteriellen Kolonien bestimmt. Die Tiere wurden täglich kontrolliert und die klinische Präsentation der Krankheit durch Monitoring des Körpergewichts und der rektalen Temperatur dokumentiert. Verschiedene Organe wurden für histologische Analysen und zur Bestimmung der Kolonienzahl entnommen.

2.2.3.4 Bestimmung der Kolonienzahl in den Organen

Drei und sechs Tage nach der Infektion wurden den infizierten Mäusen Leber und Milz entnommen, in 10 ml PBS homogenisiert und serielle 1:10 Verdünnungen der Organhomogenate in PBS vorbereitet. 10 µl der entsprechenden Dilution wurden auf Columbia Agar Platten ausplattiert und im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert. Danach erfolgte die Bestimmung der Anzahl der bakteriellen Kolonien.

2.2.4 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Programme SigmaPlot (Version 11.0, Systat Software Inc., Chicago, Illinois, USA) und GraphPad Prism (Version 5.01, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Alle Werte wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) aufgeführt. Die Signifikanzlevel wurden mithilfe des Student t-Tests ermittelt. Mehr als zwei unabhängige Gruppen wurden mit ANOVA (Tukey's Multiple Comparison Test) analysiert. Die Überlebensrate der infizierten Versuchsgruppen wurde in einer Kaplan-Meier Kurve dargestellt. Unterschiede zwischen den Experimentalgruppen erreichten ein Signifikanzniveau, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Aussage unter 5% lag ($p < 0,05$).

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsanalyse von $G\alpha_i$- und $G\beta$-Isoformen in verschiedenen Geweben

Die $G\alpha_i$-Proteine stellen den größten Anteil der G-Proteine in einer Zelle dar. Um das genaue Expressionsmuster der verschiedenen $G\alpha_i$-Isoformen sowie ihrer assoziierten $G\beta$-Untereinheiten in unterschiedlichen Organen und Zelllinien von Wildtyp und $G\alpha_i$-defizienten Mäusen zu untersuchen, wurden Protein-Lysate mittels Isoform-spezifischer Antikörper auf ihre Expression der $G\alpha_i$- und $G\beta$-Isoformen in Immunoblots analysiert und semiquantifiziert.

3.1.1 Expressionsanalyse von $G\alpha_i$- und $G\beta$-Isoformen in der Lunge $G\alpha_{i2}$- und $G\alpha_{i3}$-defizienter Mäuse

Für die Funktion der angeborenen Immunität in der Lunge sind verschiedene epitheliale Zelltypen und ein großer Pool zirkulierender Leukozyten wichtig. Die Lunge setzt sich aus ca. 40 verschiedenen Zelltypen, die in unterschiedlichen Anteilen vorhanden sind, zusammen (Sorokin, 1970). Daher repräsentieren Immunoblot-Analysen von Lungen-Homogenaten nicht nur die enthaltenen Entzündungszellen sondern stellen die Ergebnisse der Summe aller Zelltypen der Lunge dar.

Es ist bekannt, dass aus Verpaarungen $G\alpha_{i2}$-heterozygoter Zuchtpaare entgegen der Mendel‘schen Regel die Anzahl $G\alpha_{i2}$-defizienter Mäuse vier Wochen nach der Geburt signifikant reduziert ist (Rudolph *et al.*, 1995). Befunde aus der eigenen Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass je nach Verpaarungstyp zwischen 20 und 40% der $G\alpha_{i2}$-defizienten Mäuse innerhalb der ersten Stunden nach der Geburt versterben (Pexa, 2012; A. Nowacki, persönliche Mitteilung). Bei der genaueren Untersuchung der Todesursache der Mäuse ergaben sich Hinweise darauf, dass die Mäuse Anzeichen eines Atemnotsyndroms aufweisen und möglicherweise daran versterben. Interessanterweise zeigten Untersuchungen mit Hilfe der Apparatur der „*Isoliert Perfundierten Lunge*“ (IPL) der Maus (Mays *et al.*, 2013; Stamme *et al.*, 2002), dass jedoch die symptomatischen $G\alpha_{i2}$-defizienten Tiere, die das

Erwachsenalter erreichen, keine veränderte Lungenfunktion und Lungenstruktur aufweisen. Daher stellten wir uns die Frage, ob bei überlebenden $G\alpha_{i2}$-defizienten Mäusen möglicherweise die $G\alpha_{i3}$-Isoform kompensatorisch hochreguliert wird und die Funktion des fehlenden $G\alpha_{i2}$ übernehmen kann.

Immunoblot-Analysen mit einem $G\alpha_{common}$-spezifischen Antikörper (Gohla *et al.*, 2007b) zeigen die Expression der $G\alpha_{i2}$- und $G\alpha_{i3}$-Isoformen in der Lunge von Wildtyp Mäusen (Abb. 3.1 A). Der $G\alpha_{common}$-Antikörper ist gegen ein Epitop aus 15 Aminosäuren gerichtet, die an der Bildung der hochkonservierten GTP-Bindungstasche beteiligt sind. Dementsprechend ist diese Aminosäuresequenz in folgenden Gα-Isoformen zu finden: $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, $G\alpha_{o}$, $G\alpha_{s}$, $G\alpha_{t1}$ sowie $G\alpha_{t2}$ (Schmidt *et al.*, 1991, Spicher *et al.,* 1994). Die Identifizierung der $G\alpha_{i2}$- und $G\alpha_{i3}$-spezifischen Banden erfolgte nach (1) der Mobilität der Bande in der Gelelektrophorese und (2) ihrer Abwesenheit in Proben der entsprechenden defizienten Mauslinien.

Zur Analyse wurden jeweils 20 µg Protein des Lungenhomogenates gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Immunoblot-Analyse untersucht. Die dominante Isoform in Wildtyp Lungen ist $G\alpha_{i2}$ (Abb. 3.1 A). Von der gesamten $G\alpha_{i}$-Menge entfallen 83% auf $G\alpha_{i2.}$ In der Lunge $G\alpha_{i2}$-defizienter Mäuse kommt es zu einer Hochregulation der $G\alpha_{i3}$ Isoform um durchschnittlich 75% und somit zu einer Änderung des $G\alpha_{i2}/G\alpha_{i3}$ Quotienten zu Gunsten von $G\alpha_{i3}$.

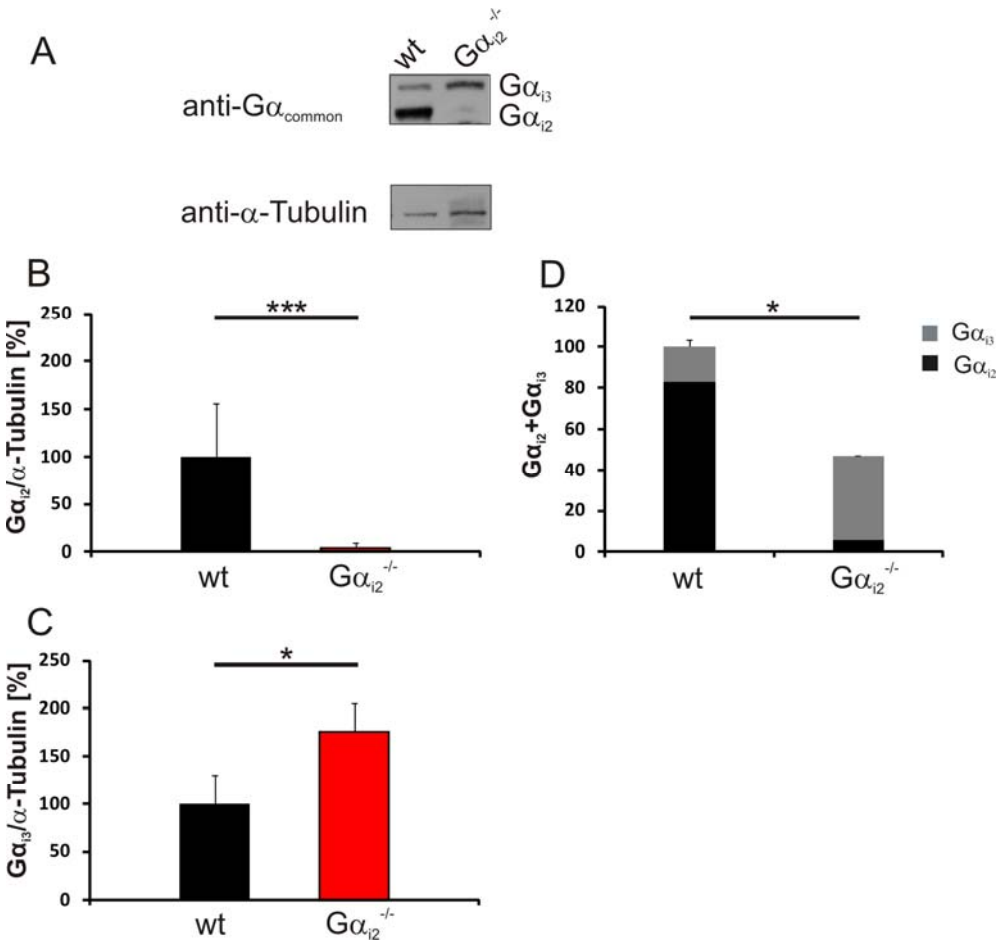


Abb. 3.1: Proteinexpression von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ in Lungen $G\alpha_{i2}$-defizienter Mäuse und ihrer Wildtyp Kontrollen. (A) Repräsentativer Immunoblot mit einem $G\alpha_{common}$–spezifischen Antikörper. Im Wildtyp Lungen-Gewebe sind $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ nachweisbar. In $G\alpha_{i2}$-defizientem Lungen-Gewebe ist die $G\alpha_{i3}$-Isoform um durchschnittlich 75% hochreguliert. Der α-Tubulin Nachweis diente zur Ladungskontrolle. **(B, C)** Statistische Auswertung der $G\alpha_{i2}$ **(B)** und der $G\alpha_{i3}$ **(C)** Expression in Lungenlysaten von Wildtyp und $G\alpha_{i2}$-defizienten Tieren. Die $G\alpha_{i2}$-Defizienz führt zu einer Hochregulation von $G\alpha_{i3}$. Die daraus resultierende Änderung des $G\alpha_{i2}/G\alpha_{i3}$ Quotienten zu Gunsten von $G\alpha_{i3}$ ist in **(D)** gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von 9 unabhängigen Experimenten (* $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$).

Durch Einsatz Isoform-spezifischer $G\alpha_{i2}$- bzw. $G\alpha_{i3}$-Antikörper (Gohla *et al.*, 2007b) wurde die Defizienz von $G\alpha_{i2}$ (Abb. 3.2 A) sowie die Hochregulation von $G\alpha_{i3}$ um den Faktor 2 (Abb. 3.2 B) in den Lungen $G\alpha_{i2}$-defizienter Mäuse bestätigt.

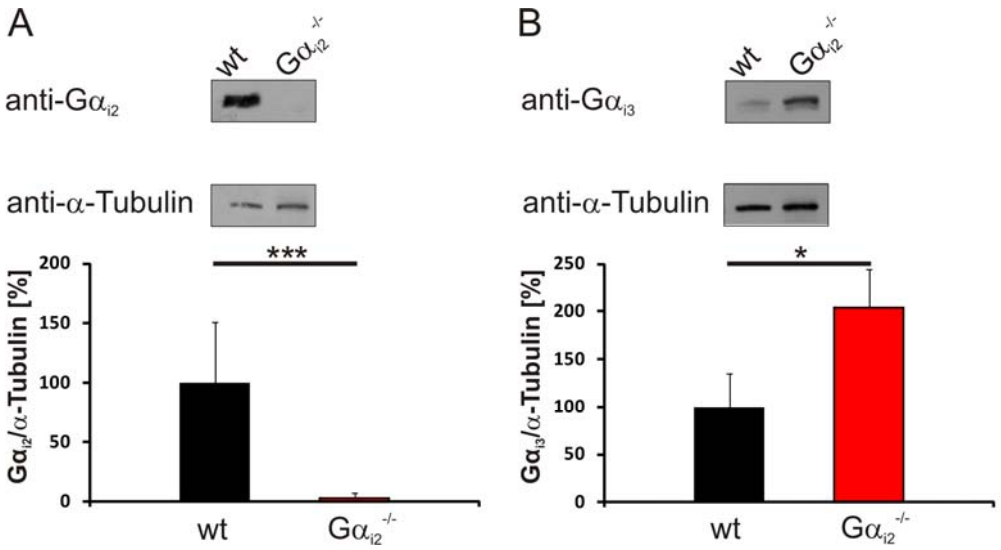


Abb. 3.2: Proteinexpression von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ in Lungen $G\alpha_{i2}$-defizienter Mäuse und ihrer Wildtyp Kontrollen. Analyse mit Isoform-spezifischen $G\alpha_{i2}$- und $G\alpha_{i3}$-Antikörpern. (A) Das $G\alpha_{i2}$-Protein war nur in den Wildtyp Lungen nachweisbar, nicht jedoch in $G\alpha_{i2}$-defizienten Mäusen. Das Fehlen von $G\alpha_{i2}$ führt zu einer Hochregulation von $G\alpha_{i3}$ **(B)**. Der α-Tubulin Nachweis diente zur Ladungskontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von 6 bis 7 unabhängigen Experimenten (* $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$).

Dennoch geht der Verlust von $G\alpha_{i2}$ in der Lunge mit einer Abnahme der gesamten $G\alpha_i$-Menge einher und dies kann nicht durch die kompensatorische Hochregulation von $G\alpha_{i3}$ ausgeglichen werden (siehe Abb. 3.1 D). Um diese Schlussfolgerung zu untermauern haben wir die Menge der exprimierten Gβ-Untereinheiten bestimmt, da G-Proteine obligat Heterotrimere bilden. Mit Hilfe eines $G\beta_{common}$-spezifischen Antikörpers (Leopoldt *et al.*, 1997), der die Isoformen $G\beta_1$-$G\beta_4$ erkennt, konnte die Expression der dominanten $G\beta_1$- und $G\beta_2$-Isoformen in der Lunge von Wildtyp und $G\alpha_{i2}$-defizienten Tieren gezeigt werden (Abb. 3.3 A). Dabei sind $G\beta_1$ und $G\beta_2$ zu jeweils gleichen Anteilen in der Wildtyp Lunge exprimiert ($G\beta_1$ 47,5%; $G\beta_2$ 52,5%) (Abb. 3.3 D). Das Fehlen des $G\alpha_{i2}$ Proteins führt zu einer um 16% ($G\beta_1$) bzw. 18% ($G\beta_2$) verringerten Expression der Gβ-Isoformen im Lungen-Gewebe $G\alpha_{i2}$-defizienter Mäuse, wenn auch eine Signifikanz nicht nachweisbar ist. Da beide Isoformen um den gleichen Anteil reduziert sind, bleibt der $G\beta_2/G\beta_1$ Quotient damit unverändert.

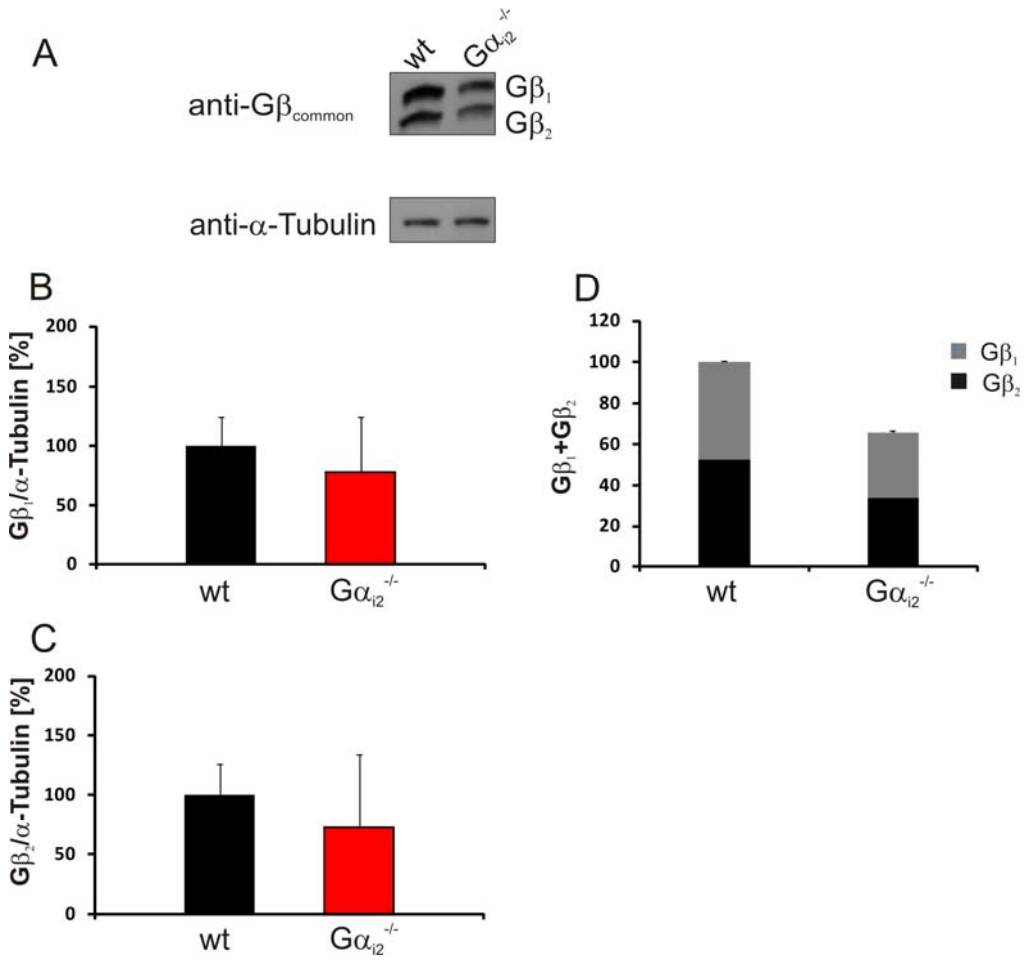


Abb. 3.3: Proteinexpression von $G\beta_1$ und $G\beta_2$ in Lungen $G\alpha_{i2}$-defizienter Mäuse und ihrer Wildtyp Kontrollen. (A) Repräsentativer Immunoblot mit einem $G\beta_{common}$-spezifischen Antikörper. Sowohl $G\beta_1$ als auch $G\beta_2$ sind in Lungen-Homogenaten von Wildtyp und $G\alpha_{i2}$-defizienten Tieren nachweisbar. **(B-D)** Statistische Auswertung der Immunoblots. Der Anteil der $G\beta_1$- bzw. $G\beta_2$-Expression liegt in Wildtyp Lungen bei 47,5% sowie 52,5%. Beide Untereinheiten wurden in $G\alpha_{i2}$-defizienten Tieren herunter reguliert ($G\beta_1$ um 16%, $G\beta_2$ um 18%). Die gesamte Menge an $G\beta$ ist um 34% erniedrigt, wobei sich der $G\beta_2/G\beta_1$ Quotient nicht ändert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von 6 unabhängigen Experimenten.

Auch in den Lungen von $G\alpha_{i3}$-defizienten Kontrolltieren (Wildtyp) ist $G\alpha_{i2}$ die dominante Isoform, mit einem $G\alpha_{i2}/G\alpha_{i3}$ Verhältnis von 85% zu 15%. Erwartungsgemäß konnte auch kein $G\alpha_{i3}$ Protein in den $G\alpha_{i3}$-defizienten Lungen detektiert werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen in $G\alpha_{i2}$-defizienten Lungen war eine Hochregulation des $G\alpha_{i2}$ Proteins in den Lungen $G\alpha_{i3}$-defizienter Mäuse nicht nachweisbar. Hierbei waren die Ergebnisse sowohl mit Hilfe des $G\alpha_{common}$-spezifischen Antikörpers (Abb. 3.4 A) als auch der Isoform-spezifischen $G\alpha_{i2}$- (Abb. 3.5 A) und $G\alpha_{i3}$-Antikörper (Abb. 3.5 B) übereinstimmend. Insgesamt kann man feststellen, dass der $G\alpha_i$-Gehalt in den Lungen um etwa 15% abnimmt.

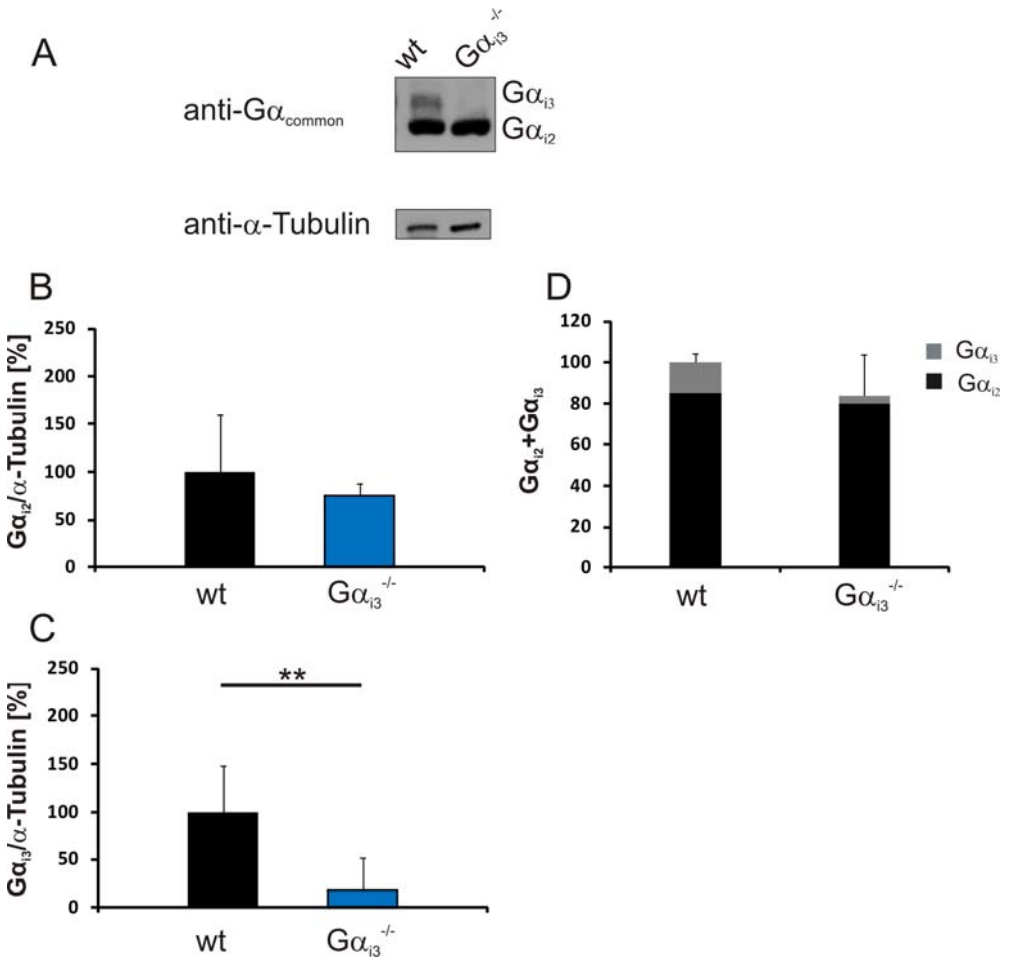


Abb. 3.4: Proteinexpression von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ in Lungen $G\alpha_{i3}$-defizienter Mäuse und ihrer Wildtyp Kontrollen. (A) Repräsentativer Immunoblot mit einem $G\alpha_{common}$–spezifischen Antikörper. Sowohl $G\alpha_{i2}$ als auch $G\alpha_{i3}$ können in Wildtyp Lungenlysaten detektiert werden. **(B-D)** In den $G\alpha_{i3}$-defizienten Lungen war nur das $G\alpha_{i2}$ Protein nachweisbar. Eine Hochregulation dieser Isoform in $G\alpha_{i3}$-defizienten Tieren war nicht erkennbar. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von 7 bis 8 unabhängigen Experimenten (** $p < 0,01$).

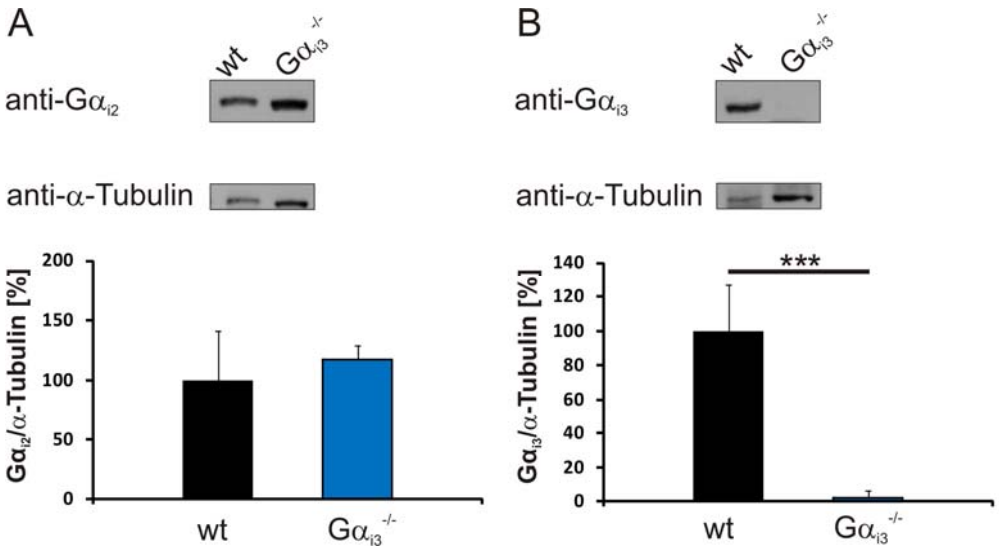


Abb. 3.5: Nachweis der Proteinexpression von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ mit Hilfe $G\alpha_{i2}$- bzw. $G\alpha_{i3}$-spezifischer Antikörper in Lungen $G\alpha_{i3}$-defizienter Mäuse und ihrer Wildtyp Kontrollen. (A) In $G\alpha_{i3}$-defizienten Mäusen kommt es nicht zu einer Hochregulation von $G\alpha_{i2}$. **(B)** Das $G\alpha_{i3}$ Protein ist nur in Wildtyp Lungenlysaten nachweisbar. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von 6 bis 7 unabhängigen Experimenten (*** $p < 0{,}0001$).

Durch Überprüfen der Gβ-Expression konnte auch hier wieder die Schlussfolgerung bezüglich der Reduktion der gesamten $G\alpha_i$-Menge bestätigt werden. So nimmt der Gβ-Gehalt, wenn auch nicht statistisch signifikant ab (Abb. 3.6 D). Dies geht auf Konten von $G\beta_1$, nicht jedoch $G\beta_2$ (Abb. 3.6 B, C).

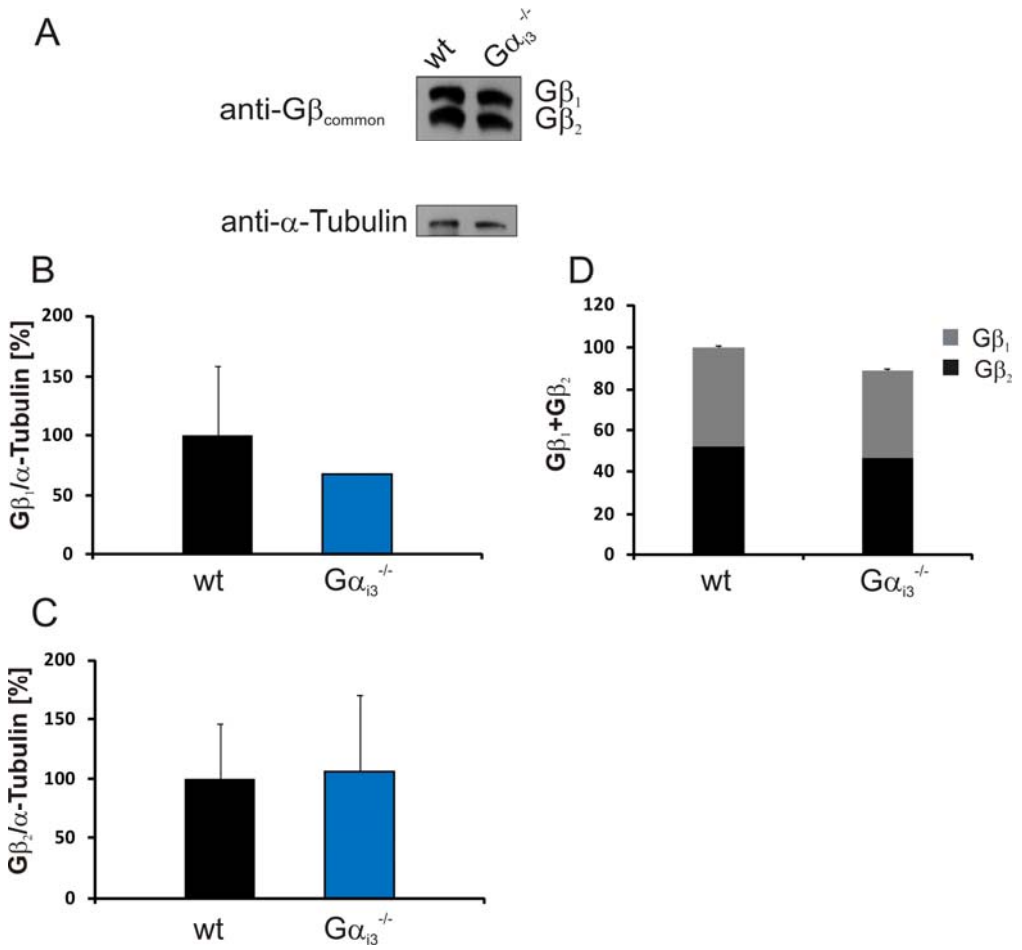


Abb. 3.6: Proteinexpression von $G\beta_1$ und $G\beta_2$ in Lungen $G\alpha_{i3}$-defizienter Mäuse und ihrer Wildtyp Kontrollen. (A) Repräsentativer Immunoblot mit einem $G\beta_{common}$-spezifischen Antikörper. Sowohl $G\beta_1$ als auch $G\beta_2$ sind in Lungen-Homogenaten von Wildtyp und $G\alpha_{i3}$-defizienten Tieren nachweisbar. Nur die $G\beta_1$-Menge ist reduziert in den Lungen $G\alpha_{i3}$-defizienter Tiere **(B)**. Die gesamte Gβ Menge ist um 10% reduziert in der Abwesenheit von $G\alpha_{i3}$ **(D)**. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von 6 unabhängigen Experimenten.

Zusammengefasst hat die differenzierte Immunoblot-Analyse von Mäuselungen ergeben, dass die dominante $G\alpha_i$-Isoform $G\alpha_{i2}$ ist. In ihrer Abwesenheit findet eine fast 2-fache Hochregulation von $G\alpha_{i3}$ statt. Entsprechend der Reduktion der gesamten $G\alpha_i$-Menge kommt es auch zu Erniedrigung der gesamten Gβ-Menge. In der Abwesenheit der minoren Isoform $G\alpha_{i3}$ sind ebenfalls die gesamte $G\alpha_i$- und Gβ-Menge um 15% und 10% reduziert, jedoch fehlt eine kompensatorische Hochregulation von $G\alpha_{i2}$.

3.2 Expressionsanalyse von $G\alpha_i$- und $G\beta$-Isoformen in Zellen der Peritonealflüssigkeit nach einer induzierten Peritonitis

Die Lunge enthält einen großen Pool zirkulierender Leukozyten, die bei einer Entzündung die erste Verteidigungslinie des angeborenen Immunsystems darstellen. Diese beeinflussen nämlich die Ergebnisse aus den Lungen-Homogenaten. Um selektiv Leukozyten für die quantitative Analyse der Expression von G_i-Proteinen gewinnen zu können, wurde das Modell der Thioglykollat-induzierten Peritonitis etabliert und angewendet. Durch zeitabhängige Unterschiede der Einwanderung in die Bauchhöhle können unterschiedlich zusammengesetzte Leukozytenpopulationen gewonnen werden.

3.2.1 Expressionsanalyse von $G\alpha_i$- und $G\beta$-Isoformen in peritonealen Zellen in der Frühphase der Peritonitis

Neutrophile Granulozyten sind die ersten Zellen, die nach Induktion einer Peritonitis in die Bauchhöhle einwandern, so dass eine Peritoneallavage schon vier Stunden nach Induktion zur Isolation signifikanter Mengen neutrophiler Granulozyten führt. Diese Zellpopulation wird in einer FACS Analyse durch die Anwesenheit der Oberflächenmoleküle Ly6G und CD11b definiert. Eine geringe Anzahl an peritonealen Makrophagen kann in der PLF auch schon nach vier Stunden beobachtet werden. Diese Zellen tragen an ihrer Oberfläche die Moleküle F4/80 und CD11b, die für die Identifikation genutzt werden können.

Die Zahl der Zellen in der PLF unterscheidet sich nicht zwischen den untersuchten Versuchsgruppen (Wildtyp vs. $G\alpha_{i2}^{-/-}$: 12,5 ± 0,7 vs. 10,8 ± 0,2 x 10^6; p=0,43; Wildtyp vs. $G\alpha_{i3}^{-/-}$: 13,2 ± 0,7 vs. 13,7 ± 1,2 x 10^6, p=0,88). Vier Stunden nach der Induktion von Peritonitis enthält die PLF von Wildtyp Tieren ca. 57% von Zellen, die positiv für die Oberflächenmoleküle Ly6G und CD11b sind und damit als peritoneale neutrophile Granulozyten identifiziert werden können (Abb. 3.7 A-zweite Reihe und B-linkes Panel). Weitere 11% der PLF-Zellen sind doppelt positiv für die Oberflächenmoleküle F4/80 und CD11b und können damit als peritoneale Makrophagen angesprochen werden (Abb. 3.7 A-erste Reihe und B-rechtes Panel).

Die FACS Analyse von Peritonealzellen $G\alpha_{i2}$-defizienter Mäuse ergibt eine statistisch signifikante Reduktion der Zahl peritonealer neutrophiler Granulozyten im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen vier Stunden nach der Induktion einer Peritonitis (Abb. 3.7 B-linkes Panel, rote Balken). Es besteht auch die Tendenz zu einer reduzierten Anzahl von peritonealen Makrophagen, die allerdings nicht signifikant ist (Abb. 3.7 B-rechtes Panel, rote Balken). Die Ergebnisse aus heterozygoten $G\alpha_{i2}$ Mäusen unterscheiden sich nicht von den Wildtyp Kontrollen (Abb. 3.7 B, graue Balken).

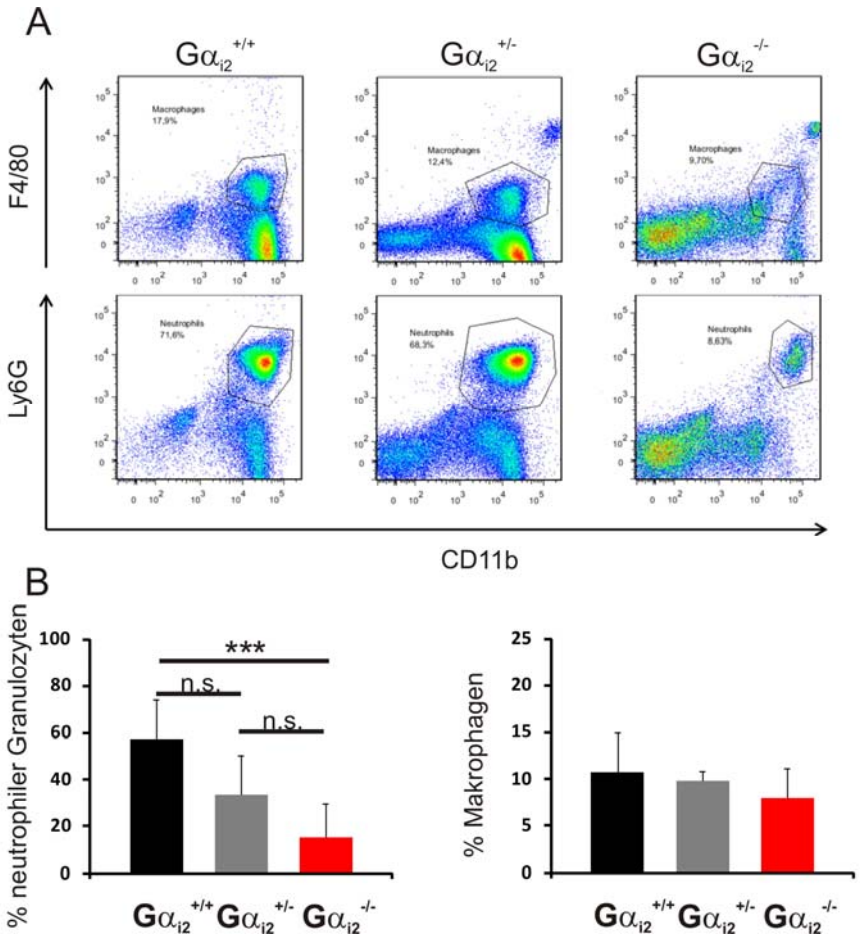


Abb. 3.7: Prozentsatz peritonealer neutrophiler Granulozyten und Makrophagen vier Stunden nach der Thioglykollat-induzierten Peritonitis in Wildtyp, $G\alpha_{i2}^{+/-}$ und $G\alpha_{i2}^{-/-}$ Mäusen. (A) FACS Analyse der PLF. Erste Reihe: F4/80$^+$ CD11b$^+$ Zellen werden als Makrophagen identifiziert. Zweite Reihe: Ly6G$^+$ CD11b$^+$ Zellen werden als neutrophile Granulozyten identifiziert. **(B)** Statistische Auswertung des prozentualen Anteils von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in der PLF. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von 6-8 Tieren. (**Neutrophile Granulozyten**: wt: 57,3 ± 16,6; $G\alpha_{i2}^{+/-}$: 33,5 ± 16,9; $G\alpha_{i2}^{-/-}$: 15,3 ± 14,4; *** $p < 0{,}0001$; **Makrophagen**: wt: 10,7 ± 4,2; $G\alpha_{i2}^{+/-}$: 9,8 ± 1,1; $G\alpha_{i2}^{-/-}$: 7,9 ± 3,2).

Im Gegensatz zu den $G\alpha_{i2}$-defizienten Mäusen unterscheiden sich die $G\alpha_{i3}$-defizienten Mäuse nicht von ihren Wildtyp und heterozygoten Kontrollen bezüglich der Anzahl peritonealer neutrophiler Granulozyten und Makrophagen vier Stunden

nach der Induktion von Peritonitis mit 4% Thioglykollat. Die PLF Wildtyp Tiere enthält ca. 55% neutrophile Granulozyten (Abb. 3.8 A-zweite Reihe und B-linkes Panel, schwarze Balken) und 13,3% Makrophagen (Abb. 3.8 A-erste Reihe und B-rechtes Panel, schwarze Balken). Die PLF $G\alpha_{i3}$-defizienter Tiere enthält ca. 45% neutrophile Granulozyten (Abb. 3.8 A-zweite Reihe und B-linkes Panel, blaue Balken) und 12% Makrophagen (Abb. 3.8 A-erste Reihe und B-rechtes Panel, blaue Balken).

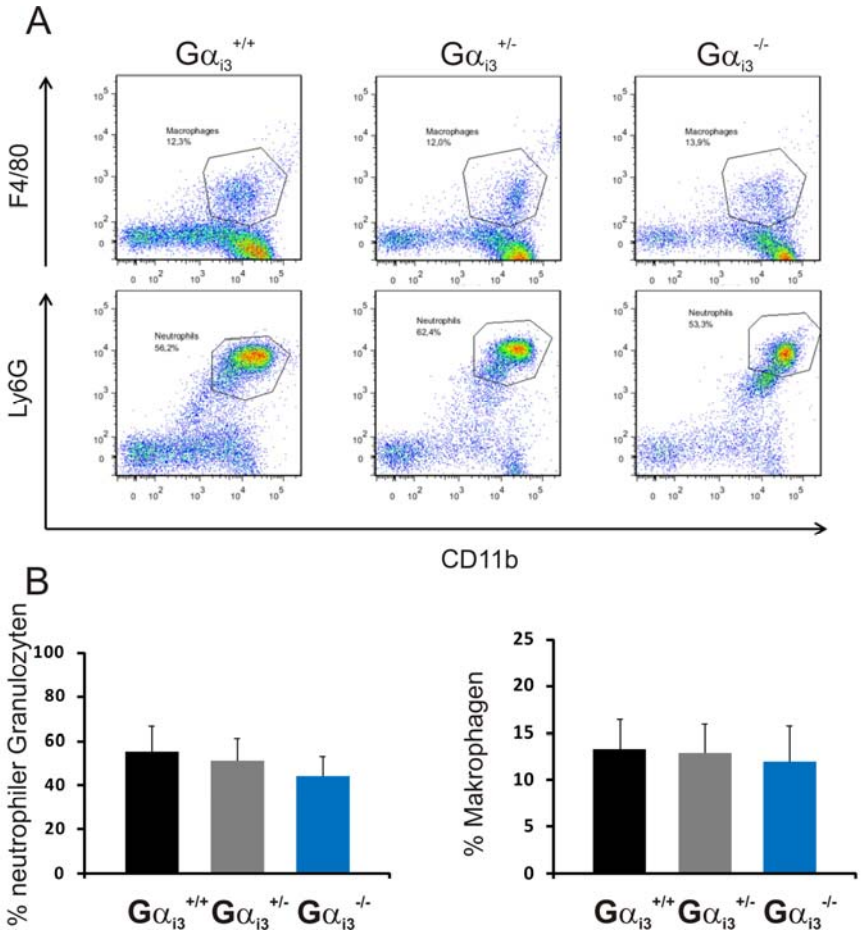


Abb. 3.8: Prozentsatz peritonealer neutrophiler Granulozyten und Makrophagen vier Stunden nach der Thioglykollat-induzierten Peritonitis in Wildtyp, $G\alpha_{i3}^{+/-}$ und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäusen. (A) FACS Analyse der PLF. Erste Reihe: $F4/80^+$ $CD11b^+$ Zellen werden als Makrophagen identifiziert. Zweite Reihe: $Ly6G^+$ $CD11b^+$ Zellen werden als neutrophile Granulozyten identifiziert. **(B)** Statistische Auswertung des prozentualen Anteils von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in der PLF. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von 5-6 Tieren. (**Neutrophile Granulozyten**: wt: 55,3 ± 11,4; $G\alpha_{i3}^{+/-}$: 51,3 ± 25,7; $G\alpha_{i3}^{-/-}$: 44,3 ± 20,7; **Makrophagen**: wt: 13,3 ± 5,5; $G\alpha_{i3}^{+/-}$: 12,9 ± 5,2; $G\alpha_{i3}^{-/-}$: 12 ± 4,4).

Die Unterschiede der gewonnenen Zellpopulationen in der PLF von $G\alpha_i$-defizienten Mäusen sind auch mikroskopisch gut sichtbar in den Dünnschichtpräparaten der PLF, die nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt wurden. In den Präparaten $G\alpha_{i2}$-defizienter Tiere sind deutlich weniger neutrophile Granulozyten, dagegen aber

Lymphozyten und Monozyten zu beobachten (Abb. 3.9 A). Die PLF $G\alpha_{i3}$-defizienter Tiere ist reich an neutrophilen Granulozyten und das mikroskopische Bild unterscheidet sich nicht von den PLF Präparaten der Wildtyp Tiere (Abb. 3.9 B).

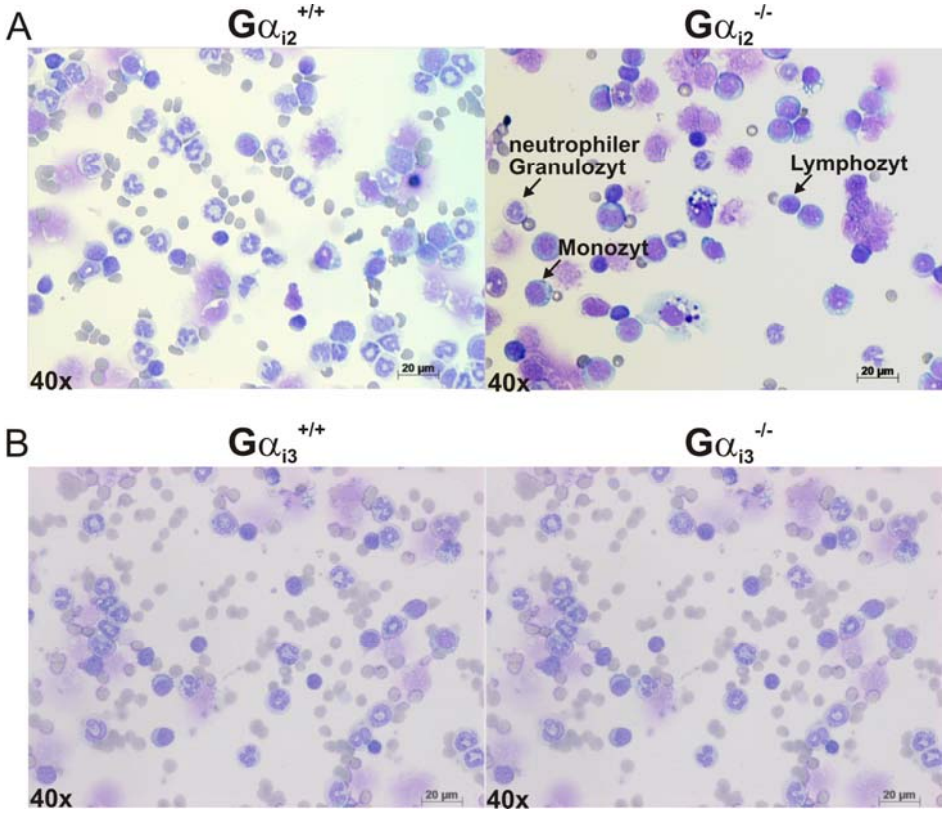


Abb. 3.9: May-Grünwald-Giemsa Färbung der PLF-Dünnschichtpräparate Wildtyp und $G\alpha_i$-defizienter Mäuse. Die PLF $G\alpha_{i2}$-defizienter Mäuse ist reich an Zellen der monozytären und lymphozytären Linie **(A)**. $G\alpha_{i3}$-defiziente Mäuse zeigen eine änliche Anreicherung an neutrophilen Granulozyten in der PLF wie ihre Wildtyp Kontrollen **(B)**.

Die nachfolgende Immunoblot-Analyse der nach vier Stunden gewonnenen peritonealen Zellpopulation erfolgte mit den beschriebenen $G\alpha_{common}$ und $G\beta_{common}$ Antikörpern. Das Verhältnis von $G\alpha_{i2}$ zu $G\alpha_{i3}$ beträgt in den Wildtyp Zellen der PLF 9 zu 1 (Abb. 3.10 D), und damit ist auch hier $G\alpha_{i2}$ die dominante Isoform. In ihrer Abwesenheit wird $G\alpha_{i3}$ um den Faktor 8 hochreguliert (Abb. 3.10 C), während interessanterweise in Abwesenheit von $G\alpha_{i3}$ das $G\alpha_{i2}$ um den Faktor 2,5 hochreguliert wird (Abb. 3.10 B). Durch die starke kompensatorische Hochregulation der noch anwesenden Isoform steigt auch die gesamte Menge an $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ (Abb. 3.10 D).

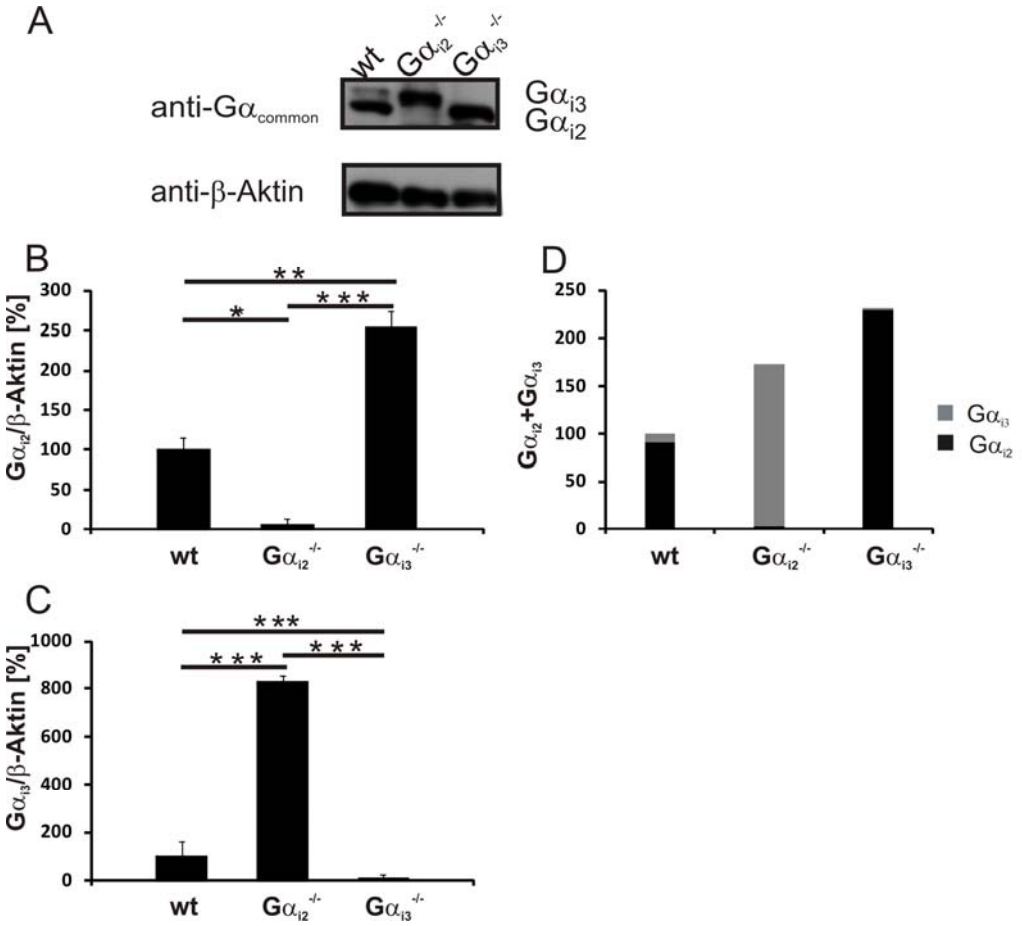


Abb. 3.10: Proteinexpression von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ in peritonealen Zellen vier Stunden nach der Induktion einer Peritonitis mit 4% Thioglykollat. (A) Repräsentativer Immunoblot mit einem $G\alpha_{common}$–spezifischen Antikörper. **(B)** In Zellen aus der PLF $G\alpha_{i3}$-defizienter Mäuse kommt es zu einer 2,5-fachen Hochregulation von $G\alpha_{i2}$. **(C)** In Zellen aus der PLF $G\alpha_{i2}$-defizienter Mäuse kommt es zu einer 8-fachen Hochregulation von $G\alpha_{i3}$. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von 6 unabhängigen Experimenten (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$).

Ein 10%-er Anteil von $G\alpha_{i3}$ und in seiner Abwesenheit die 2,5-fache Hochregulation von $G\alpha_{i2}$ müsste sich in einer entsprechenden Hochregulation der Gβ-Menge zeigen. Tatsächlich konnte eine Erhöhung der gesamten Gβ-Menge nachgewiesen werden (Abb. 3.11 D).

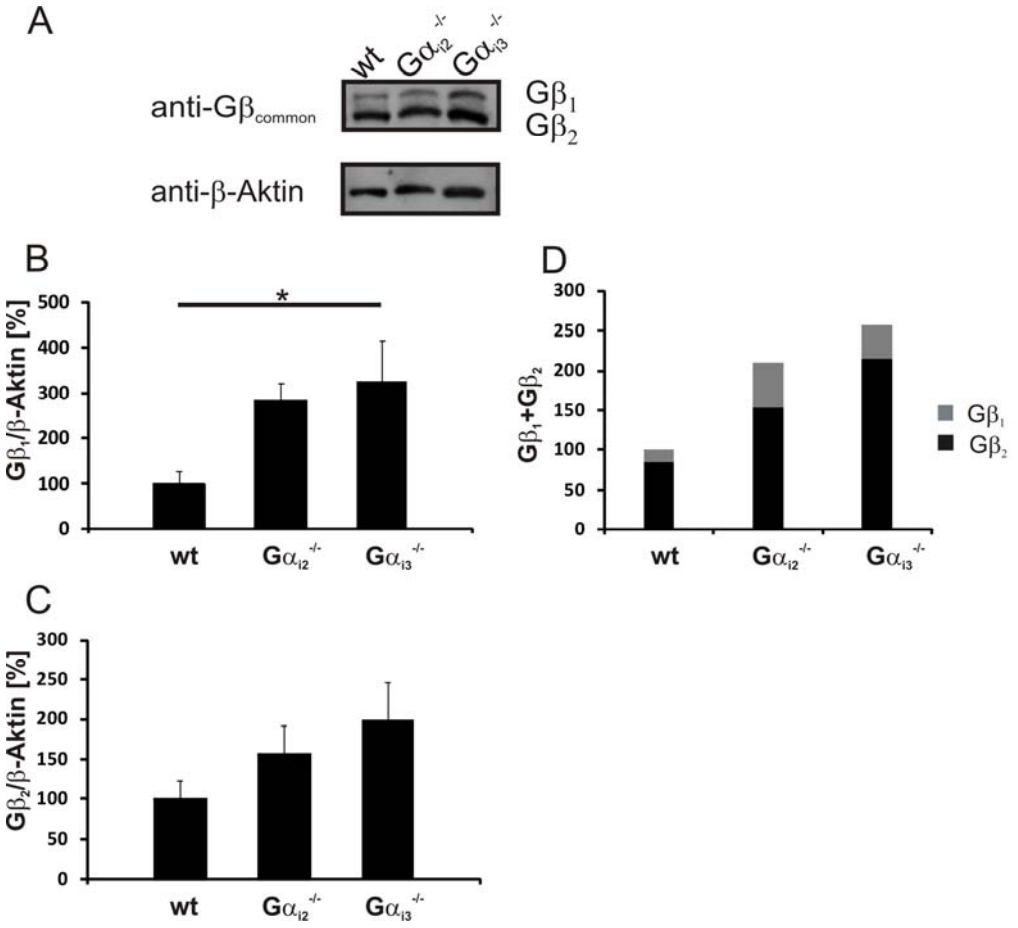


Abb. 3.11: Proteinexpression von $G\beta_1$ und $G\beta_2$ in peritonealen Zellen vier Stunden nach der Induktion einer Peritonitis mit 4% Thioglykollat. (A) Repräsentativer Immunoblot mit einem $G\beta_{common}$-spezifischen Antikörper. **(B)** In Zellen aus der PLF $G\alpha_{i3}$-defizienter Mäuse kommt es zu einer Hochregulation von $G\beta_1$. **(C)** Die Menge an $G\beta_2$ unterscheidet sich statistisch signifikant nicht zwischen den untersuchten Gruppen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von 8 unabhängigen Experimenten (* $p < 0,05$).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen in den Lungen-Homogenaten kann für die Entzündungszellen in der Peritonealflüssigkeit zusammengefasst werden, dass es hier zu keiner Reduktion der $G\alpha_i$- und $G\beta$-Menge kommt. Durch die starke Hochregulation der noch vorhandenen Isoform bei Abwesenheit der jeweils anderen wird hingegen die Gesamtmenge erhöht was auch durch einen Anstieg der Menge an $G\beta$ reflektiert wird. Allerdings konnten insgesamt nur 68,3% der Wildtyp, 23,2% der $G\alpha_{i2}$-defizienten und 56,3% der $G\alpha_{i3}$-defizienten peritonealen Zellen als neutrophile Granulozyten und Makrophagen detektiert werden. Die geänderte Zusammensetzung der Zellpopulationen in den $G\alpha_i$-defizienten Tieren könnte einen Einfluss auf das $G\alpha_i$-Expressionsmuster haben, so dass die Ergebnisse der Immunoblot-Analyse mit Vorsicht interpretiert werden müssen.

3.2.2 Expressionsanalyse von $G\alpha_i$- und $G\beta$-Isoformen in der Spätphase der Peritonitis

Um eine angereicherte Population von peritonealen Makrophagen für die Immunoblot-Analyse gewinnen zu können, wurde die Peritoneallavage vier Tage nach der Induktion einer Peritonitis mit 4% Thioglykollat durchgeführt. Die PLF $G\alpha_{i2}$-defizienter Mäuse enthält eine signifikant reduzierte Zahl von Zellen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (Abb. 3.12 A). Die FACS Analyse mit CD11b und F4/80 spezifischen Antikörpern, wodurch die Makrophagen-Population definiert wird, zeigte einen Anteil an Makrophagen von ca. 43% in der PLF von Wildtyp Mäusen (Abb. 3.12 B). Peritoneale neutrophile Granulozyten konnten in der PLF zu diesem Zeitpunkt nicht mehr detektiert werden.

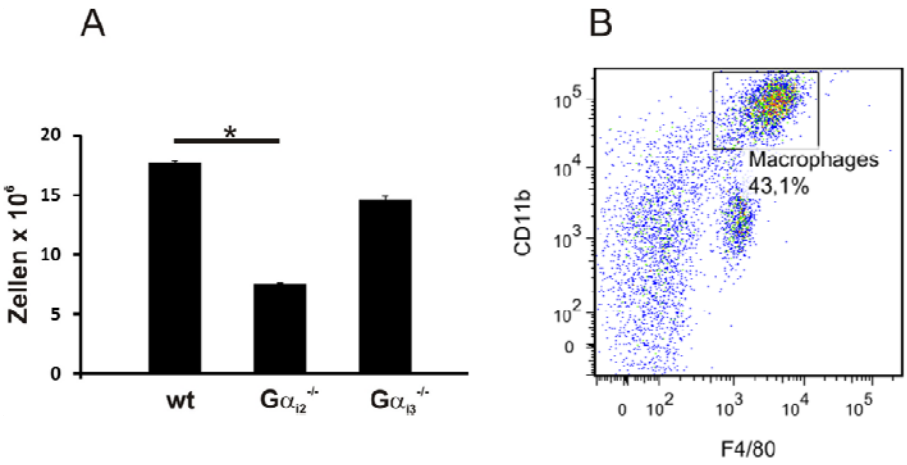


Abb. 3.12: Die Zellularität in der Peritonealflüssigkeit und die Anzahl gewonnener Makrophagen nach der Induktion einer Peritonitis mit 4% Thioglykollat. (A) In $G\alpha_{i2}$-defizienten Mäusen ist die Zellularität in der gewonnenen PLF im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen reduziert (wt: 17,7 ± 0,17; $G\alpha_{i2}^{-/-}$: 7,6 ± 0,08; $G\alpha_{i3}^{-/-}$: 14,5 ± 0,36). Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von 6-7 Tieren (* $p < 0,05$). **(B)** Vier Tage nach Peritonitisinduktion beträgt der Makrophagen-Anteil im Wildtyp Peritoneum 43%.

Die Immunoblot-Analyse der gewonnenen PLF nach vier Tagen zeigt, dass im Vergleich zum Wildtyp in den jeweiligen Knockout Tieren das Fehlen einer $G\alpha_i$-Isoform durch eine Hochregulation der noch exprimierten $G\alpha_i$-Isoform kompensiert wird (Abb. 3.13). In den PLF-Zellen $G\alpha_{i3}$-defizienter Mäuse kommt es zur 1,7-fachen Hochregulation von $G\alpha_{i2}$ (Abb. 3.13 A) und in den PLF-Zellen $G\alpha_{i2}$-defizienter Mäuse zur 6-fachen Hochregulation von $G\alpha_{i3}$ (Abb. 3.13 B).

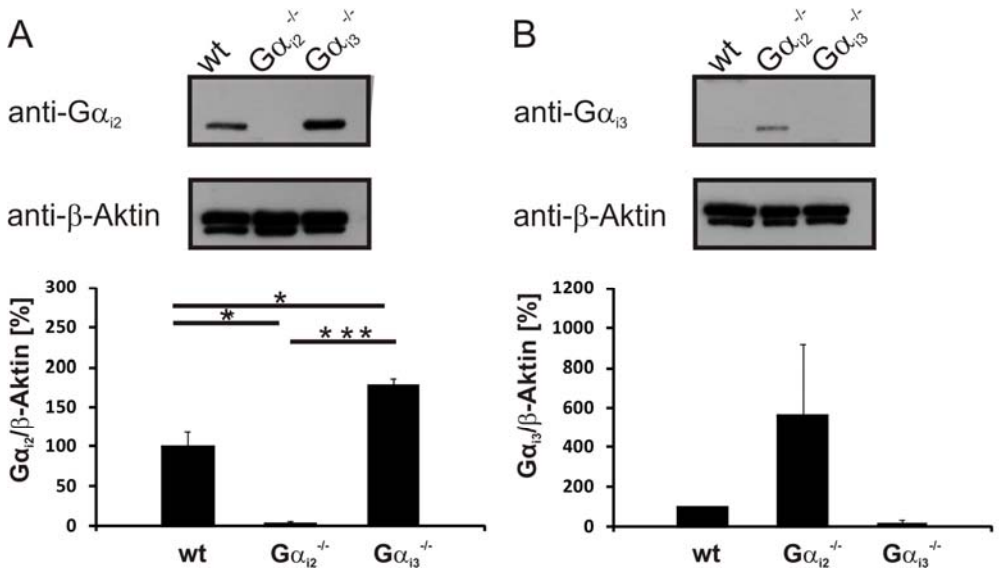


Abb. 3.13: Proteinexpression von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ in peritonealen Zellen vier Tage nach der Induktion einer Peritonitis mit 4% Thioglykollat. (A) In Zellen aus der PLF $G\alpha_{i3}$-defizienter Mäuse kommt es zu einer 1,7-fachen Hochregulation von $G\alpha_{i2}$. **(B)** In Zellen aus der PLF $G\alpha_{i2}$-defizienter Mäuse kommt es zu einer 6-fachen Hochregulation von $G\alpha_{i3}$. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von 4-6 unabhängigen Experimenten (* $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$).

Die Analyse der Gβ-Menge ergab, dass es in der Abwesenheit von $G\alpha_{i2}$ zur Erniedrigung der gesamten Gβ-Menge um durchschnittlich 65% kommt (Abb. 3.14 D). Durch die Herunterregulation beider Gβ-Isoformen um den gleichen prozentualen Anteil ändert sich der $G\beta_2/G\beta_1$ Quotient nicht. In $G\alpha_{i3}$-defizienten Tieren nimmt der Gβ-Gehalt um etwa 20% ab. Im Gegensatz zu $G\alpha_{i2}$-defizienten Zellen wird nur die $G\beta_1$-Isoform in den PLF Zellen $G\alpha_{i3}$-defizienter Mäuse erniedrigt (Abb. 3.14 B), was eine Änderung des $G\beta_2/G\beta_1$ Quotienten zu Gunsten von $G\beta_2$ verursacht.

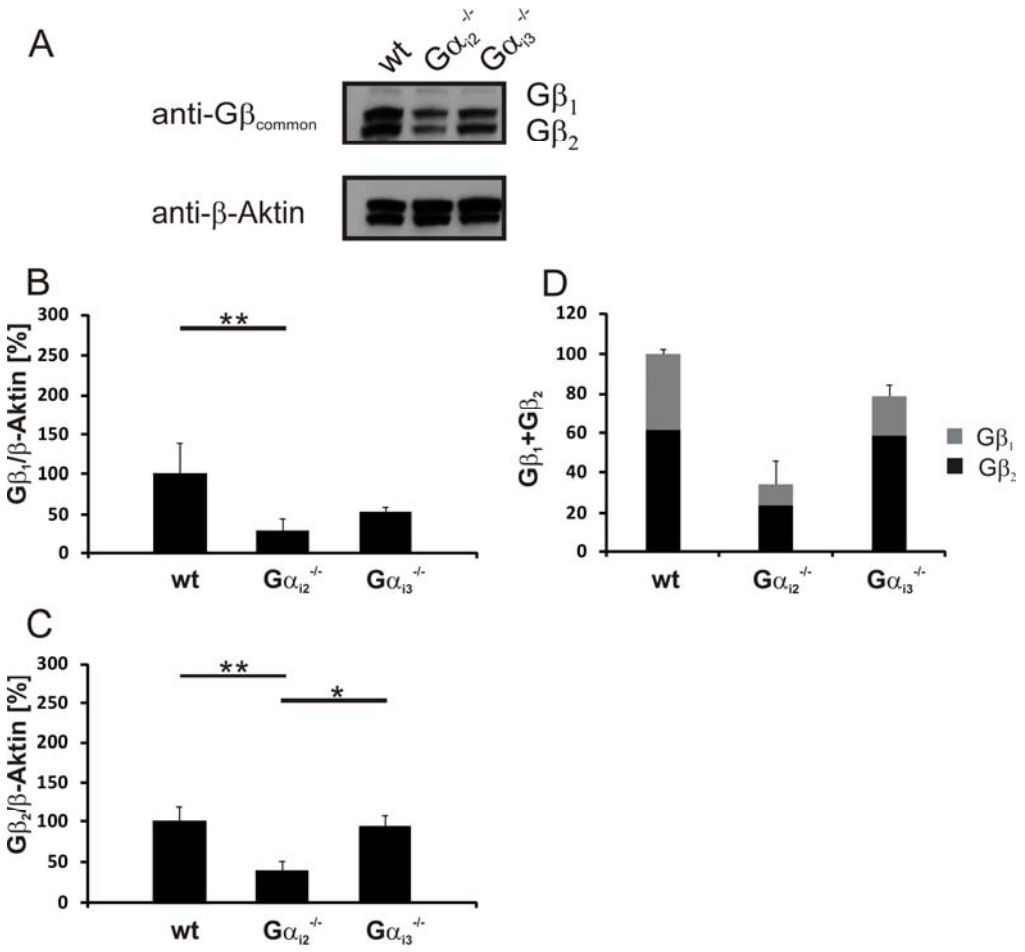


Abb. 3.14: Proteinexpression von $G\beta_1$ und $G\beta_2$ in peritonealen Zellen vier Tage nach der Induktion einer Peritonitis mit 4% Thioglykollat. (A) Repräsentativer Immunoblot mit einem $G\beta_{common}$-spezifischen Antikörper. **(B-C)** In Zellen aus der PLF $G\alpha_{i2}$-defizienter Mäuse werden beide Gβ-Untereinheiten herunter reguliert. Daraus ergibt sich eine Reduktion der gesamten Gβ Menge um 65% **(D)**. Im Gegensatz dazu ist in der PLF $G\alpha_{i3}$-defizienter Mäuse nur die $G\beta_1$ Untereinheit herunter reguliert **(B)**, wodurch eine Veränderung des $G\beta_2/G\beta_1$ Quotienten zu Gunsten von $G\beta_2$ verursacht wird **(D)**. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von 5 unabhängigen Experimenten (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Zusammengefasst hat die Immunoblot-Analyse der beiden untersuchten peritonealen Entzündungszellpopulationen gezeigt, dass es zur kompensatorischen Hochregulation der noch vorhandenen $G\alpha_i$-Isoform kommt. Die Unterschiede zwischen peritonealen neutrophilen Granulozyten und Makrophagen betreffen die Gβ-Menge, die interessanterweise nur in den letzteren in der Abwesenheit der dominanten Isoform $G\alpha_{i2}$ herunter reguliert wird.

3.3 Expressionsanalyse von $G\alpha_i$- und $G\beta$-Isoformen in RAW 264.7 Makrophagen

Beachtenswert ist, dass in dem Entzündungsmodell der Thioglykollat-induzierten Peritonitis nach der FACS Analyse die Zellen nicht sortiert wurden, so dass die Ergebnisse wieder für eine gemischte Zellpopulation repräsentativ sind (z.B. vier Stunden nach der Induktion der Peritonitis rechnet man mit ca. 10% Makrophagen in der PLF von Wildtyp Mäusen). Um die Proteinexpression der $G\alpha_i$-Isoformen in einer reinen Zellpopulation testen zu können, wurde die Makrophagen Zelllinie RAW 264.7 verwendet. Diese Zellen wurden mit einem spezifischen Antisense-Plasmid gegen $G\alpha_{i2}$ **($G\alpha_{i2}$ KD)** und als Kontrolle mit leerem pLKO1 Plasmid transfiziert **(Mock KD)**. Sie wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Gessner generiert und im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt (Wiege *et al.*, 2012). Die Zelllinien wurden mittels Immunoblot-Analysen auf die Expression von $G\alpha_i$- und $G\beta$-Isoformen getestet. Hierfür wurden jeweils 30 µg Protein der Zelllysate auf das Gel geladen.

Die dominante Isoform in den Mock-behandelten Zellen ist $G\alpha_{i2}$. Ihr Verhältnis zum $G\alpha_{i3}$ beträgt 80% zu 20% (Abb. 3.15 D). Die shRNA-induzierte Hemmung der $G\alpha_{i2}$ Translation konnte mittels Immunoblot-Analysen auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die Proteinmenge von $G\alpha_{i2}$ war um 67,5% reduziert. Dagegen blieb die Proteinmenge von $G\alpha_{i3}$ in diesen Zellen unverändert. Die Immunoblotanalyse erfolgte sowohl mit dem $G\alpha_{common}$ (Abb. 3.15) als auch mit den Isoform-spezifischen $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ Antikörpern (Abb. 3.16).

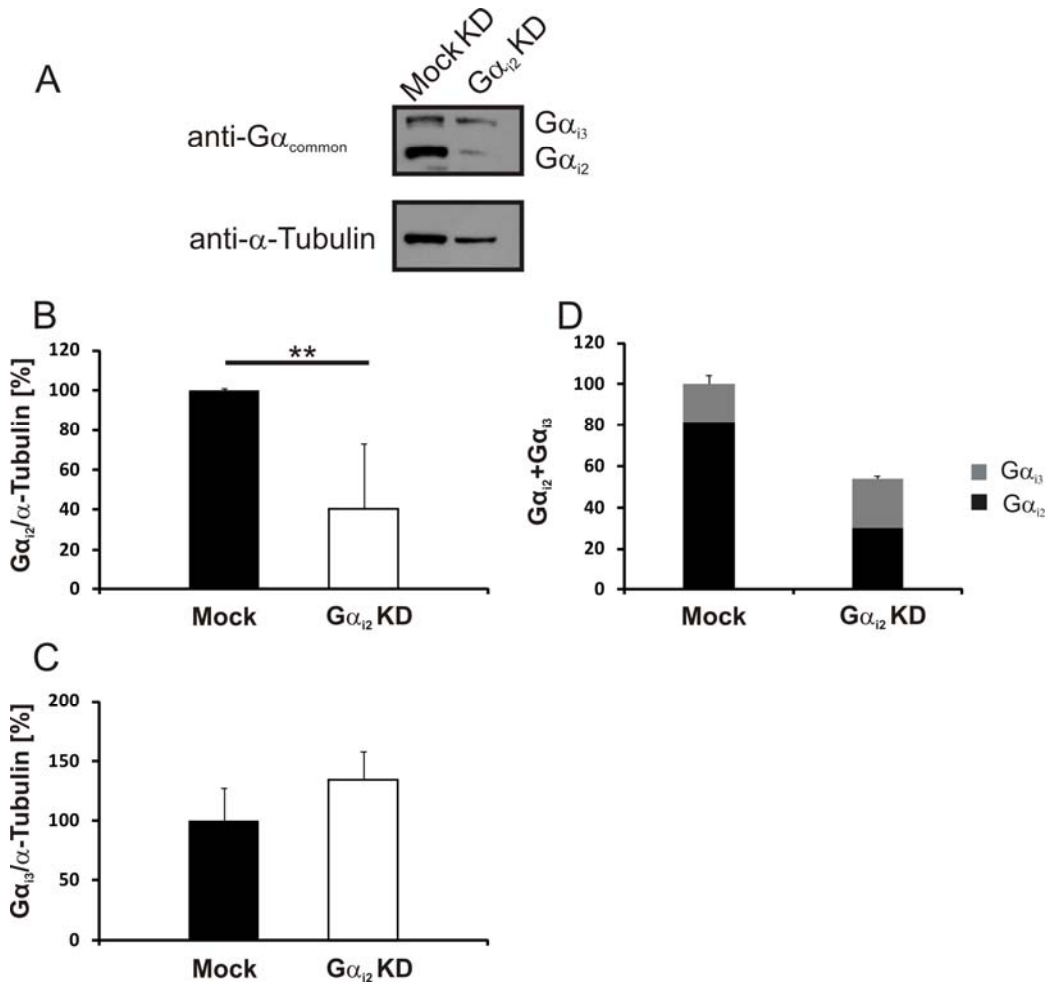


Abb. 3.15: Proteinexpressionsanalyse von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ in RAW 264.7 Makrophagen nach shRNA-induzierter Herunterregulation von $G\alpha_{i2}$. (A) Repräsentativer Immunoblot mit einem $G\alpha_{common}$–spezifischen Antikörper. **(B)** Nach shRNA-Behandlung kommt es zu einer Reduktion der $G\alpha_{i2}$ Expression um 60%. Die Menge an $G\alpha_{i3}$ Protein blieb unverändert. **(B)** Die gesamte Menge an $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ ist in den $G\alpha_{i2}$ KD Zellen um 46% reduziert **(D)**. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von 5 unabhängigen Experimenten (** $p < 0,01$).

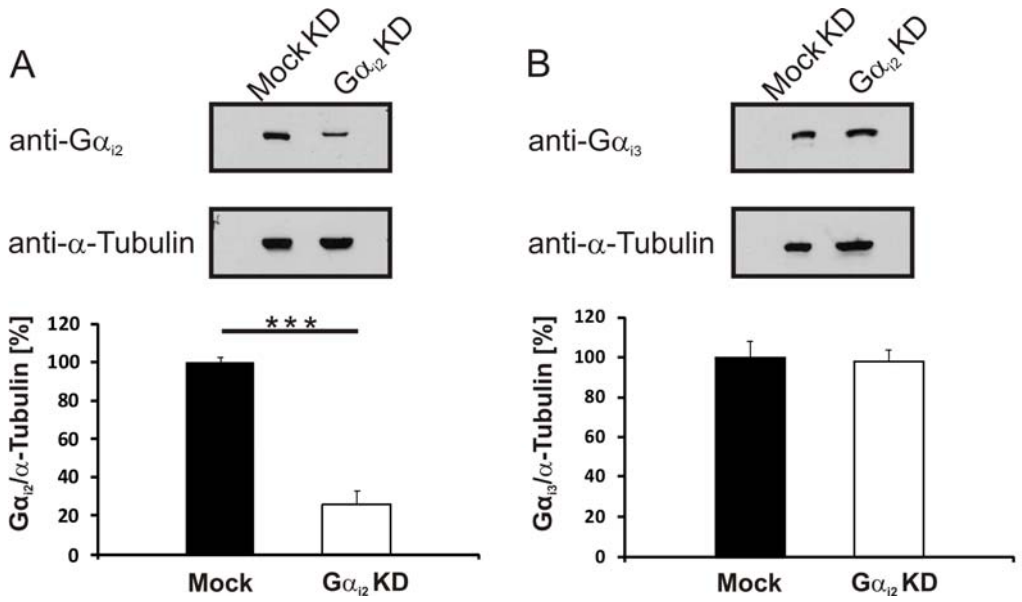


Abb. 3.16: Proteinexpressionsanalyse von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ in RAW 264.7 Makrophagen nach shRNA-induzierter Herunterregulation von $G\alpha_{i2}$. (A) Die Protein-Menge von $G\alpha_{i2}$ wurde um 75% reduziert. **(B)** Dabei kam es zu keiner Hochregulation von $G\alpha_{i3}$. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von 6 unabhängigen Experimenten (*** $p < 0{,}0001$).

Im Einklang mit der verminderten Gesamtmenge an $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ zeigt die Analyse der Gβ-Isoformen, wiederum mithilfe des $G\beta_{common}$ Antikörpers, dass es nach dem Knockdown von $G\alpha_{i2}$ auch zu einer Herunterregulation von $G\beta_1$ (25%) (Abb. 3.17 B) und $G\beta_2$ (23%) (Abb. 3.17 C) kommt. Die gesamte Menge an Gβ ist damit um 24% erniedrigt (Abb. 3.17 D). Aufgrund der Tatsache, dass die Expression beider Isoformen zu einem gleichgroßen Anteil abnimmt, ändert sich das Verhältnis von $G\beta_2$ zu $G\beta_1$ nicht (Abb. 3.17 D).

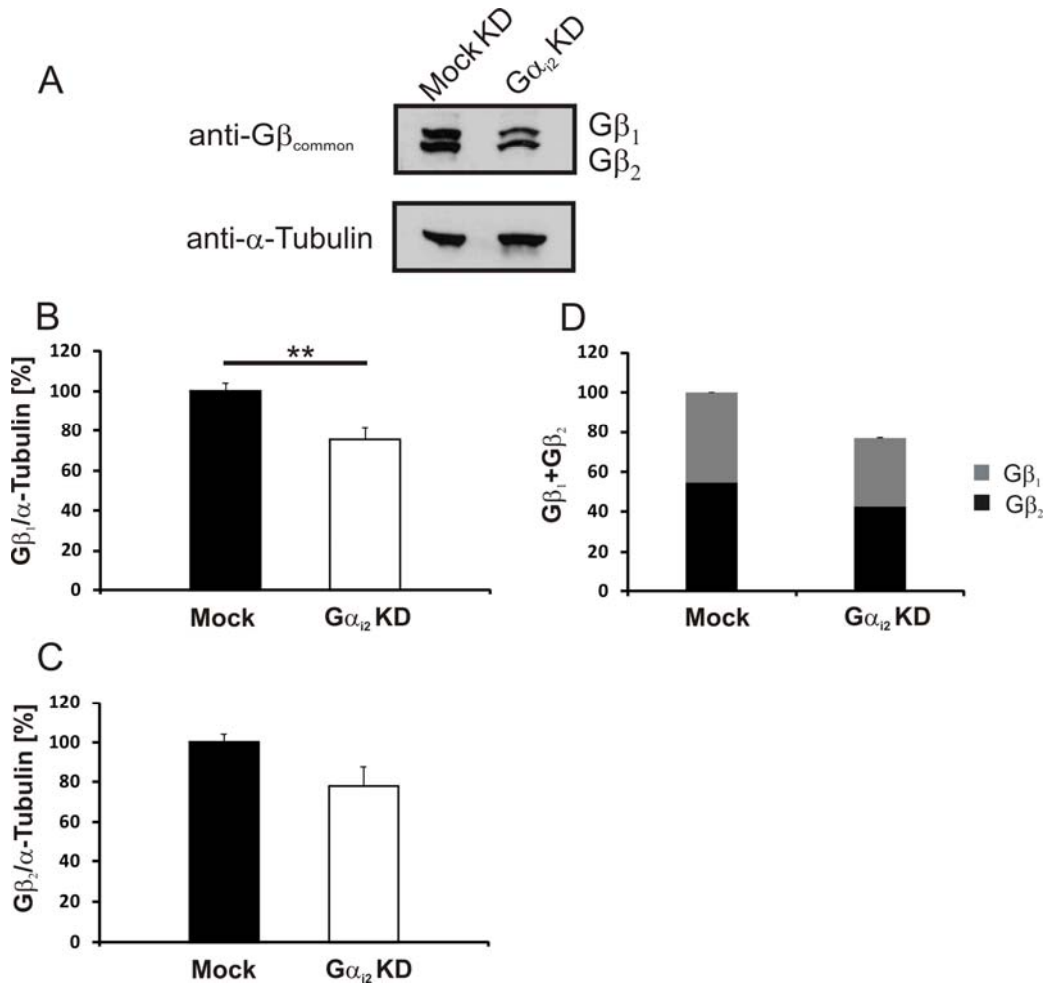


Abb. 3.17: Proteinexpressionsanalyse von $G\beta_1$ und $G\beta_2$ in RAW 264.7 Makrophagen nach shRNA-induzierter Hemmung der $G\alpha_{i2}$ Expression. (A) Repräsentativer Immunoblot mit einem $G\beta_{common}$-spezifischen Antikörper. $G\beta_1$ **(B)** und $G\beta_2$ **(C)** wurden um 25% bzw. 23% herunter reguliert. Damit ist die Gesamtproteinmenge an Gβ um 24% reduziert, wobei der $G\beta_2/G\beta_1$ Quotient unverändert bleibt **(D)**. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von 7 unabhängigen Experimenten (** $p < 0,01$

3.4 Expressionsanalyse von $G\alpha_i$- und Gβ-Isoformen in der fEnd.5 Zelllinie

Die Bedeutung der epithelialen Pulmonalmembran für die Aktivierung der angeborenen Immunsignalwege wurde in der letzten Zeit entschlüsselt (Diamond *et al.*, 2000). Neben dieser spielen weitere endotheliale und epitheliale Barrieren des Organismus eine wichtige Rolle bei der Migration neutrophiler Granulozyten und Makrophagen. Die Generierung einer endothelialen $G\alpha_{i2}$-depletierten Zelllinie ebenso in der Arbeitsgruppe von Prof. Gessner ermöglichte die Analyse der Expression von G-Proteinen (Wiege *et al.*, 2013). Die beiden stabilen fEnd.5 Zelllinien (mit spezifischem Antisense-Plasmid gegen $G\alpha_{i2}$ (**$G\alpha_{i2}$ KD**) und mit leerem pLKO1 Plasmid-transfizierte Zellen **(Mock KD)** wurden mittels Immunoblot-Analysen auf die Expression sowohl der $G\alpha_i$- als auch der Gβ-Isoformen getestet. Es wurden jeweils 30 µg Protein der Zelllysate geladen.

Wiederum ist $G\alpha_{i2}$ die dominante Isoform in den Mock-behandelten Zellen (Abb. 3.18 A). Nach der Behandlung mit dem $G\alpha_{i2}$ Antisense-Plasmid konnte eine 94,5%-ige Reduktion von $G\alpha_{i2}$ nachgewiesen werden (Abb. 3.18 A und 3.19 A). Die starke Herunterregulation von $G\alpha_{i2}$ geht mit einer fast 2-fachen Hochregulation von $G\alpha_{i3}$ (Abb. 3.18 B und 3.19 B) und eine Änderung des $G\alpha_{i2}/G\alpha_{i3}$ Quotienten zu Gunsten von $G\alpha_{i3}$ einher (Abb. 3.18 D). Die Immunoblot-Analyse erfolgte sowohl mit dem $G\alpha_{common}$ (Abb. 3.18) als auch mit den Isoform-spezifischen $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ Antikörpern (Abb. 3.19).

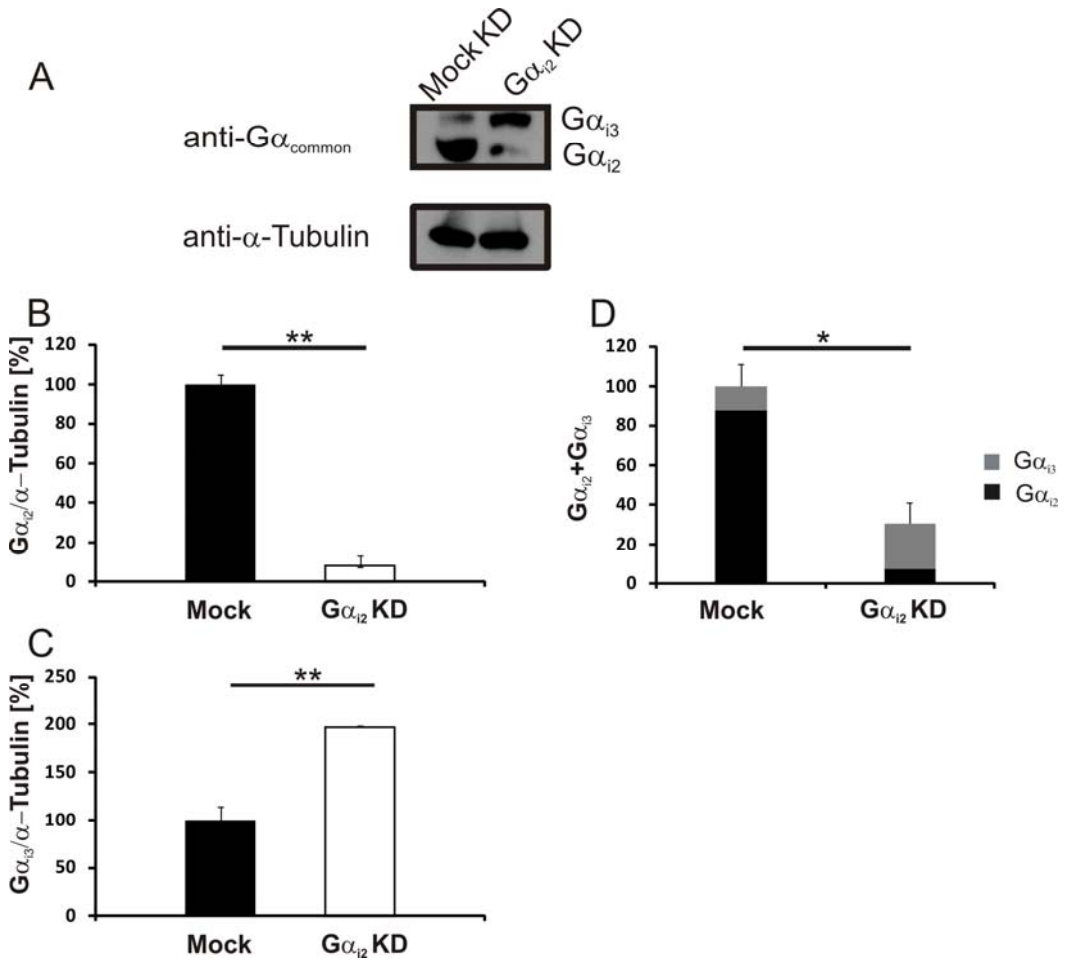


Abb. 3.18: Proteinexpressionsanalyse von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ in fEnd.5 Zellen nach shRNA-induzierter Herunterregulation von $G\alpha_{i2}$. (A) Repräsentativer Immunoblot mit einem $G\alpha_{common}$–spezifischen Antikörper. **(B)** Das $G\alpha_{i2}$ Protein wurde um 92% herunter reguliert und das $G\alpha_{i3}$ um 97% hochreguliert **(C)**. Damit hat sich der $G\alpha_{i2}/G\alpha_{i3}$ Quotient in den $G\alpha_{i2}$ KD Zellen zu Gunsten von $G\alpha_{i3}$ geändert **(D)**. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von 5 unabhängigen Experimenten (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

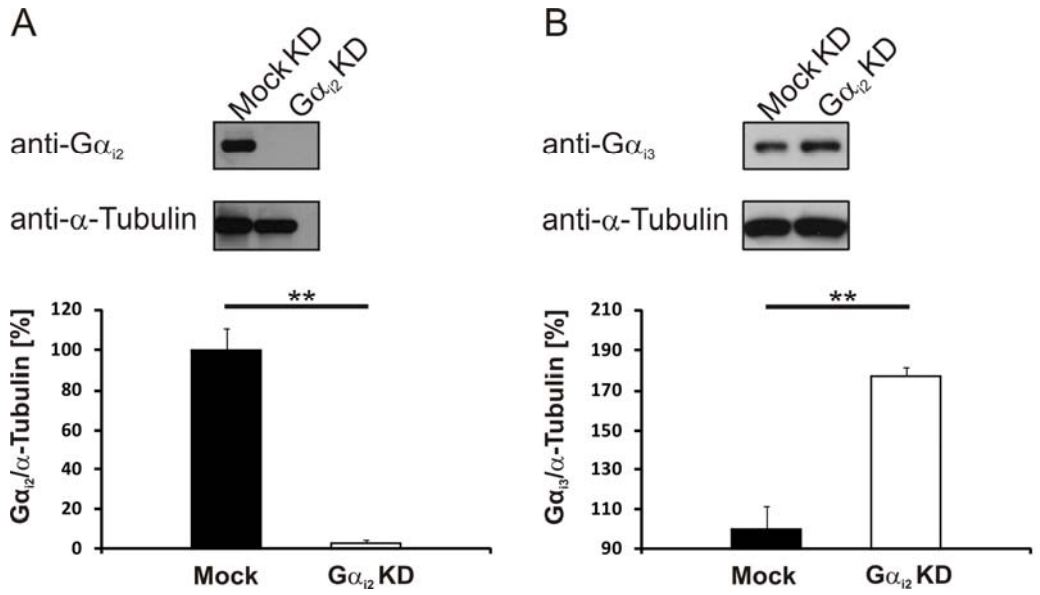


Abb. 3.19: Proteinexpressionsanalyse von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ in fEnd.5 Zellen nach shRNA-induzierter Herunterregulation von $G\alpha_{i2}$. (A) Die $G\alpha_{i2}$ Proteinmenge war nach der shRNA Behandlung um 97% reduziert. Dabei kam es zu einer Hochregulation von $G\alpha_{i3}$ um 77% **(B)**. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von 6 unabhängigen Experimenten (** $p < 0,01$).

Die fast vollständige Reduktion des $G\alpha_{i2}$ Proteins ging mit einer Reduktion der Gesamtmenge an $G\beta$ einher (60%) (Abb. 3.20 D). $G\beta_1$ und $G\beta_2$ wurden um 59% (Abb. 3.20 B) bzw. 68% (Abb. 3.20 C) herunter reguliert. Dadurch hat sich der $G\beta_2/G\beta_1$ Quotient in den $G\alpha_{i2}$ KD Zellen nicht wesentlich geändert (Abb. 3.20 D).

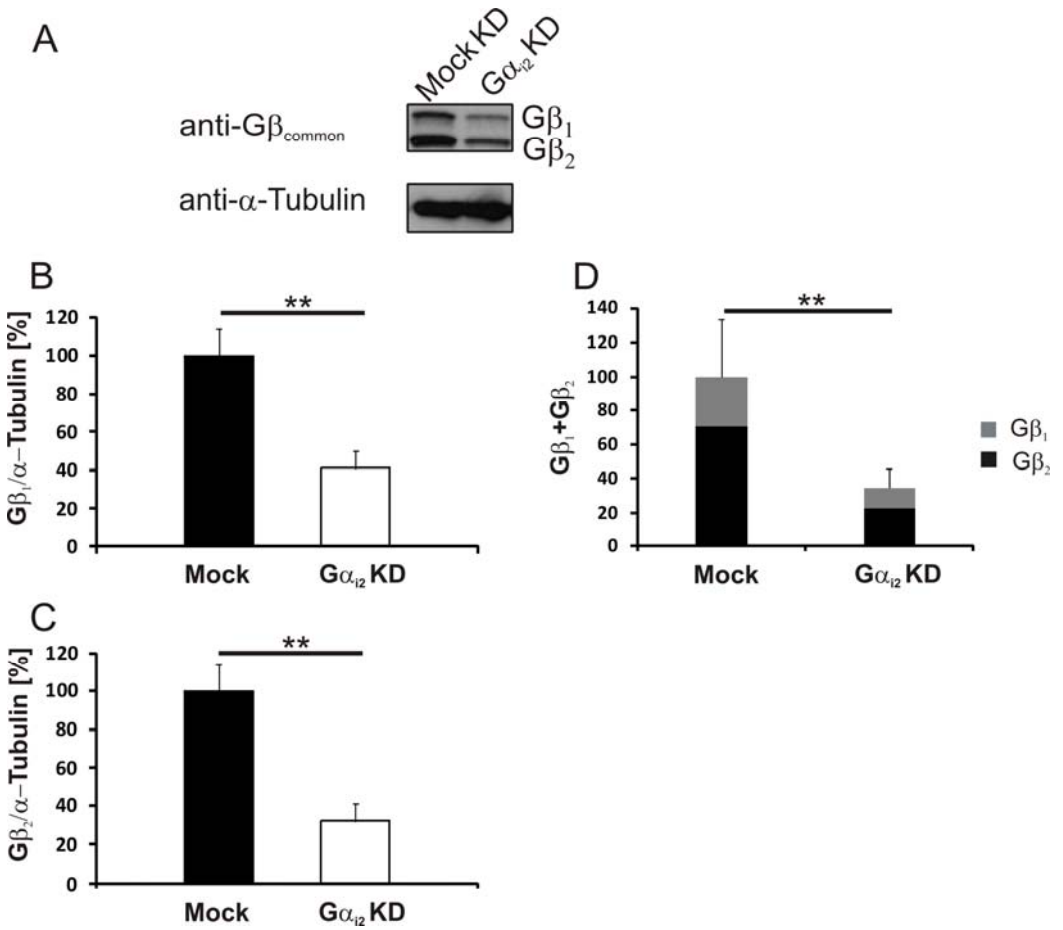


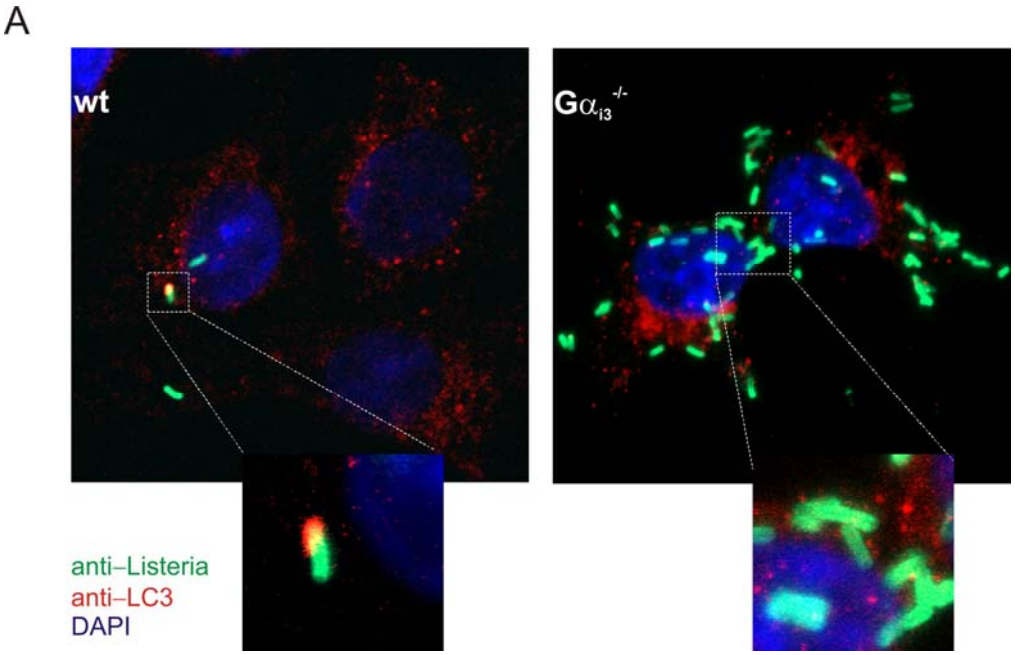
Abb. 3.20: Proteinexpressionsanalyse von $G\beta_1$ und $G\beta_2$ in fEnd.5 Zellen nach shRNA-induzierter Herunterregulation von $G\alpha_{i2}$. (A) Repräsentativer Immunoblot mit einem $G\beta_{common}$-spezifischen Antikörper. Die beiden Gβ Untereinheiten wurden um 59% ($G\beta_1$) **(B)** bzw. 68% ($G\beta_2$) **(C)** herunter reguliert. Damit ist die gesamte Menge an Gβ in den $G\alpha_{i2}$ KD-Zellen um 60% erniedrigt **(D)**. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von 6 unabhängigen Experimenten (** $p < 0,01$).

3.5 Infektionsanalyse mit *L. monocytogenes*

In allen bisherigen untersuchten Modellen stellt $G\alpha_{i3}$ quantitativ die minore $G\alpha_i$-Isoform dar. Ihr Beitrag für das Funktionieren der angeborenen Immunität ist weitgehend unbekannt. Die $G\alpha_{i3}$-defizienten Mäuse zeigen keinen deutlichen immunologischen oder autoimmunologischen Phänotyp im Vergleich zu den $G\alpha_{i2}$-defizienten Mäusen. In der Literatur sind zwei immunologische Phänomene in der Abwesenheit von $G\alpha_{i3}$ beschrieben worden. Es konnte erstens gezeigt werden, dass die CXCR3-(*chemokine C-X-C motif receptor 3*) induzierte Migration $G\alpha_{i3}$-defizienter T-Zellen verstärkt ist (Thompson *et al.*, 2007). Und zweitens, dass die Graft-versus-Host-Reaktion (*GvHR*) in Empfängern von $G\alpha_{i3}$-defizienten T-Zellen ausgeprägter ist (Jin *et al.*, 2008). Die beiden erwähnten Ergebnisse sind vorwiegend für das Forschungsgebiet des adaptiven Immunsystems wichtig. Um die Rolle und den Beitrag von $G\alpha_{i3}$ für die ersten Schritte der angeborenen Immunantwort, d.h. Migration polymorphnukleärer Leukozyten und Makrophagen *in vivo* untersuchen zu können, haben wir uns für das Infektionsmodell mit dem Bakterium *L. monocytogenes* entschieden, in welchem die Mobilisation von Entzündungszellen in der akuten Phase der Infektion von großer Bedeutung ist. Interessanterweise ist die bakterielle Infektion mit *L. monocytogenes* auch ein gutes Modell für die Untersuchung der Regulation der Autophagie (Rich, 2006), eines zellulären Prozesses, der in den letzten Jahren zum Verständnis der Immunabwehr gegen zahlreiche Mikroorganismen erheblich beigetragen hat. In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass das $G\alpha_{i3}$ Protein eine Isoform-spezifische Rolle in der Regulation der hepatischen Autophagie spielt (Gohla *et al.*, 2007b). Um die Rolle von $G\alpha_{i3}$ in einem Infektionsmodell untersuchen zu können, das gleichzeitig auch die Rolle bei der Regulation der autophagischen Proteolyse aufzeigen kann, wurden *in vitro* und *in vivo* Infektionsanalysen mit *L. monocytogenes* etabliert.

3.5.1 *In vitro* Infektionsanalyse mit *L. monocytogenes*

Murine embryonale Fibroblasten (MEFs) von Wildtyp, $G\alpha_{i2}$- und $G\alpha_{i3}$-defizienten Mäusen wurden mit *L. monocytogenes* infiziert. Nach Infektion mit 5 x 10^5 Wildtyp Listerien des Stammes ATCC 43251 wurden zu verschiedenen Zeitpunkten die Anzahl infizierter Zellen, die Anzahl der Bakterien pro Zelle sowie die Aktivierung der Autophagie mithilfe eines konfokalen *Laser-scanning*-Mikroskops bestimmt. Die $G\alpha_{i3}$-defizienten MEFs zeigten dabei eine viel höhere Permissivität für das Eindringen und für die Replikation der Bakterien als die Wildtyp Zellen. Eine Induktion der Autophagie in diesen Zellen konnte nicht festgestellt werden, da der autophagische Marker LC3 nicht nachgewiesen werden konnte. Die Wildtyp MEFs wiesen niedrigere Infektionsraten auf und die Kolokalisation des autophagischen Markers LC3 und der Listerien-Stäbchen zeigte sich deutlich (Abb. 3.21 A). Die $G\alpha_{i2}$-defizienten MEFs zeigten einen protektiven Phänotyp und schienen vor dem Eindringen und der Replikation der Listerien-Stäbchen geschützt zu sein (Abb. 3.21 B rechts).



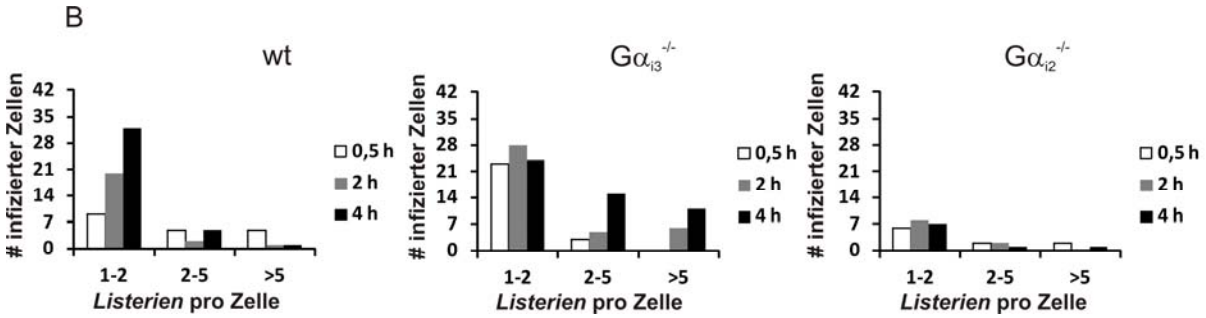


Abb. 3.21: Murine embryonale Fibroblasten nach der Infektion mit *L. monocytogenes*. (A) Konfokalmikroskopische Aufnahmen von infizierten MEFs. Nur in Wildtyp Zellen ist eine Kolokalisation von LC3 (rot) und Listerien (grün) detektierbar. In $G\alpha_{i3}$-defizienten MEFs war keine Kolokalisation zwischen LC3 und den Listerien-Stäbchen nachweisbar. **(B)** Stattdessen zeigten $G\alpha_{i3}$-defiziente MEFs nach 30 min, 1 und 2 Stunden eine höhere Permissivität für das Eindringen und für die Replikation von *L. monocytogenes* **(B, Mitte)**, während $G\alpha_{i2}$-defiziente MEFs einen protektiven Phenotyp zeigten **(B, rechts)**.

3.5.2 *In vivo* Infektionsanalyse mit *L. monocytogenes*

Die Ergebnisse der *in vitro* Infektionsanalyse mit *L. monocytogenes* haben gezeigt, dass sich sowohl $G\alpha_{i3}$-defiziente als auch $G\alpha_{i2}$-defiziente MEFs deutlich von Wildtyp Zellen unterscheiden. Dies spricht für eine Isoform-spezifische Funktion von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ bei der Immunabwehr gegen dieses Bakterium.
Um die Immunabwehrreaktion *in vivo* zu untersuchen, wurde zuerst die LD_{50} des *L. monocytogenes* Stammes in Wildtyp Mäusen bestimmt.

3.5.2.1 Bestimmung der LD_{50} *L. monocytogenes* Dosis (Stamm ATCC 43251) in C57BL/6N Wildtyp Mäusen (Charles River)

30 weibliche C57BL/6N Mäuse (Charles River) wurden in Gruppen von jeweils sechs Tieren eingeteilt und jeweils mit einer steigenden Dosis von Listerien intraperitoneal infiziert (0,1 LD_{50}, 0,5 LD_{50}, LD_{50}, 5 LD_{50} und 10 LD_{50}). Für die Versuche wurden ausschließlich 3-4 Monate alte Weibchen mit einem Körpergewicht von 21-24 g verwendet (Abb. 3.22 A). Das Überleben der Tiere wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen aufgezeichnet (Abb. 3.22 B). Wie zu erwarten überlebten 40% der Tiere mit einer LD_{50} Dosis (grün), wohingegen die Infektion mit der 10-fachen LD_{50} Dosis (hellblau) und der 5-fachen LD_{50} Dosis (lila) bereits zu einem Versterben der Mäuse am Tag 1 bzw. Tag 2 führte. Die deutlich schwächere Dosis von 0,1 LD_{50} zeigte keinerlei Auswirkung auf das Überleben der Tiere (blau).

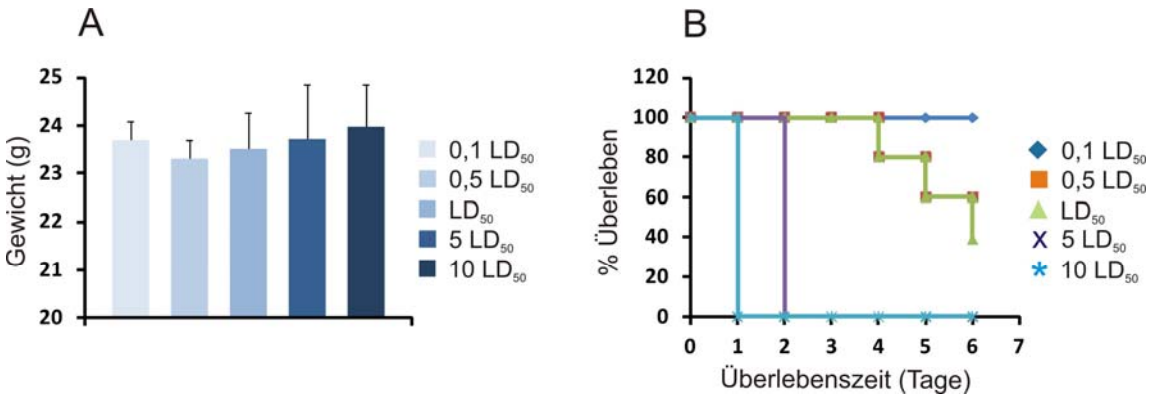


Abb. 3.22: Bestimmung der LD_{50} Dosis in Wildtyp C57BL/6N Mäusen (Charles River). **(A)** 30 gleichschwere Wildtyp Weibchen wurden in fünf Gruppen von jeweils sechs Tieren unterteilt. **(B)** Die fünf Gruppen wurden mit verschiedenen *L. monocytogenes* Dosen infiziert (0,1 LD_{50}, 0,5 LD_{50}, LD_{50}, 5 LD_{50} und 10 LD_{50}) und das Überleben der Tiere dokumentiert. Dargestellt ist die Kaplan-Meier Kurve der Überlebensanalyse.

3.5.2.2 Analyse der Immunabwehr gegen *L. monocytogenes* in Wildtyp Mäusen

Zur Etablierung des Infektionsmodells wurden zunächst Wildtyp Mäuse mit zwei verschieden Dosen infiziert (LD_{50} und 10 LD_{50}). Am Tag der Infektion (Tag 0) wurden Körpergewicht und Körpertemperatur der Tiere bestimmt. Die Tiere wurden anhand ihrer Gewichte in zwei Gruppen (n=7 und n=11) unterteilt und sichergestellt, dass sich die Ausgangsgewichte dieser beiden Gruppen nicht signifikant voneinander unterschieden (Abb. 3.23 A). Während des Versuchs wurden täglich Körpergewicht und Körpertemperatur der Tiere kontrolliert (Abb. 3.23 B). Parallel dazu wurde als ein Endpunktparameter die Bakterienlast in Milz und Leber von Tieren aus beiden Infektionsgruppen überprüft. Exemplarisch ist hierfür in Abb. 3.22 C die Anzahl der Listerienkolonien am Tag 3 in Milz und Leber für beide Dosen gezeigt. Die dargestellten Daten stammen von jeweils einem Tier pro Gruppe. Denn es wurden nur Organe entnommen und analysiert, wenn am gleichen Tag Tiere aus beiden experimentellen Gruppen gestorben sind, um die Überlebensanalyse nicht zu verfälschen.

Die 10 LD_{50} Gruppe zeigte eine deutlich niedrigere Überlebensrate (Abb. 3.23 D). Diese lag bei 14% im Vergleich zu der Überlebenswahrscheinlichkeit der LD_{50} Gruppe von 50%. Darüber hinaus wiesen Milzen und Lebern der Mäuse, die mit der 10 LD_{50} Dosis infiziert wurden, deutlich mehr Bakterien im Vergleich zu den gleichen Organen der LD_{50}-infizierten Gruppe auf (Milz: 10 LD_{50}: 44 CFU*10^7/Organ; LD_{50}: 30

CFU*10^7/Organ; Leber: 10 LD_{50}: 60 CFU*10^6/Organ; LD_{50}: 42 CFU*10^6/Organ). Sowohl die 10 LD_{50} als auch die LD_{50} Dosis führten zu einer stärkeren Bakterienlast in der Milz als in der Leber.

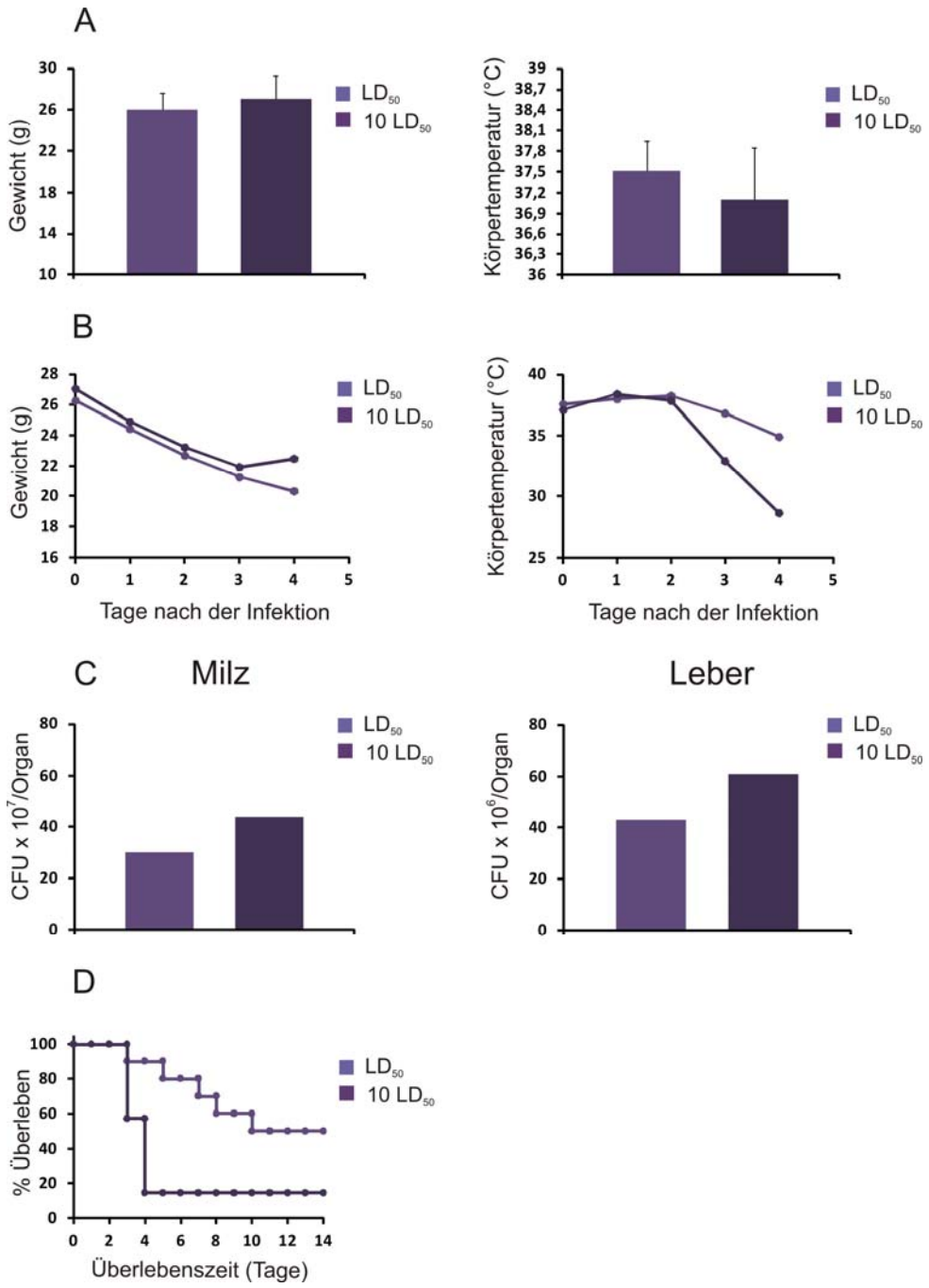


Abb. 3.23: ***L. monocytogenes*** **Infektion von Wildtyp Mäusen. (A)** 18 Wildtyp Weibchen wurden in zwei Gruppen von sieben und elf Tieren unterteilt. Das Körpergewicht und die Körpertemperatur der Tiere wurde am Tag 0 der Infektion bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD. **(B)** Veränderung des Körpergewichts und der Körpertemperatur in der akuten Phase der Infektion. **(C)** Anzahl der Listerien-Kolonien in Milz und Leber drei Tage nach der Infektion. **(D)** Kaplan-Meier Kurve der Überlebensanalyse der mit LD_{50} (helllila) und 10 LD_{50} (dunkellila) Dosis von *L. monocytogenes* infizierten Mäusen über 14 Tage.

3.5.2.3 Infektion von Wildtyp und $G\alpha_{i3}$-defizienten Mäusen

Um die Immunabwehr der $G\alpha_{i3}$-defizienten Mäuse während einer bakteriellen Infektion analysieren zu können, wurden sieben $G\alpha_{i3}^{+/+}$ und sieben $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäuse mit einer LD_{50} Dosis von *L. monocytogenes* infiziert. Am Tag der Infektion (Tag 0) wurden Körpergewicht und Körpertemperatur bestimmt (Abb. 3.24 A). Diese beiden Parameter wurden im Laufe des Versuchs täglich kontrolliert (Abb. 3.24 B).
Die Überlebensrate der Wildtyp Mäuse lag bei 48,9%, während 22,4% der $G\alpha_{i3}$-defizienten Mäuse überlebten (Abb. 3.24 D). Das niedrigere Überleben korrelierte mit einer verminderten Körpertemperatur, die eine statistische Signifikanz am Anfang der Infektion (Tag 1 und 3) erreichte. Der Verlust an Körpergewicht war in den $G\alpha_{i3}$-defizienten Mäusen im späteren Verlauf der Krankheit ausgeprägter (Tag 8 bis 11, Körpergewichtsverlust um 30% des Ausgangskörpergewichts bei den $G\alpha_{i3}$-defizienten Mäusen bzw. 17% bei den Wildtyp Mäusen). Allerdings konnten in der späteren Phase der Infektion keine statistisch signifikanten Unterschiede detektiert werden, weil sich die Gruppengröße durch das Versterben der Tiere reduzierte. Milzen und Lebern der $G\alpha_{i3}$-defizienten Mäuse wiesen deutlich mehr Bakterien im Vergleich zu den Organen der Wildtyp Mäuse auf (Milz: Wildtyp: 15 $CFU*10^{10}$/Organ; $G\alpha_{i3}^{-/-}$: 60 $CFU*10^{10}$/Organ; Leber: Wildtyp: 40 $CFU*10^{9}$/Organ; $G\alpha_{i3}^{-/-}$: 70 $CFU*10^{9}$/Organ).

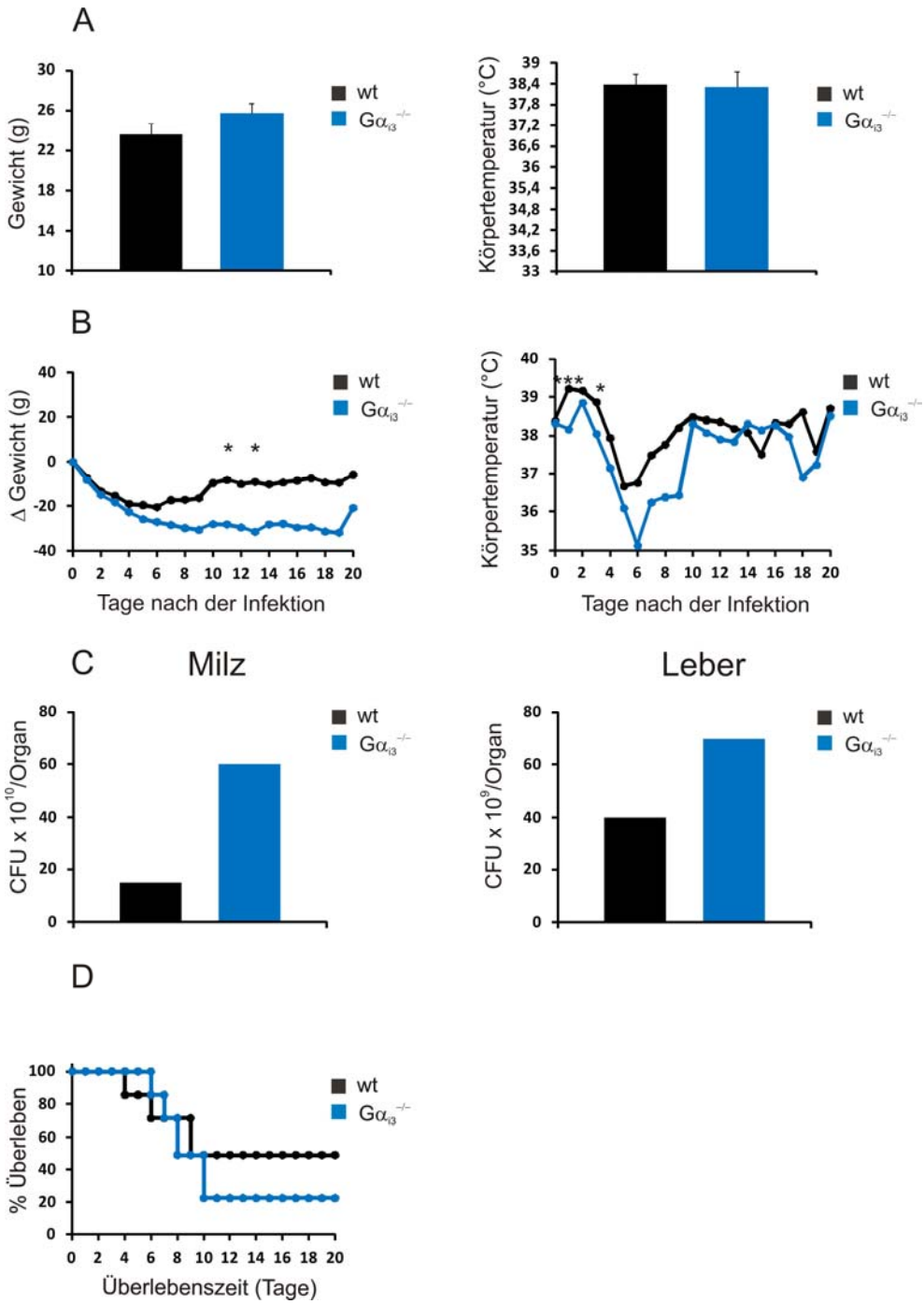


Abb. 3.24: Infektion von Wildtyp und $G\alpha_{i3}$-defizienten Mäusen mit *L. monocytogenes*. **(A)** Sieben Wildtyp und sieben $G\alpha_{i3}$-defiziente Mäuse wurden mit einer LD_{50} Dosis infiziert. Das Körpergewicht und die Körpertemperatur der Tiere wurden am Tag 0 der Infektion bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD. **(B)** Veränderung des Körpergewichts und der Körpertemperatur in der akuten Phase der Infektion. **(C)** Anzahl der Listerien-Kolonien in Milz und Leber sechs Tage nach der Infektion. **(D)** Kaplan-Meier Kurve der Überlebensanalyse der Wildtyp (schwarz) und $G\alpha_{i3}$-defizienten (blau) *L. monocytogenes* infizierten Mäuse über 20 Tage.

4 Diskussion

In Säugetieren und dem Menschen werden drei Mitglieder von $G\alpha_i$-Proteinen exprimiert, $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$, die Transkripte drei unterschiedlicher Gene sind. Diese Gene befinden sich auf den Chromosomen 3, 5 und 9. Die drei Isoformen besitzen eine Aminosäurensequenzidentität zwischen 85-90%, wobei $G\alpha_{i1}$ und $G\alpha_{i3}$ miteinander näher verwandt sind, als mit $G\alpha_{i2}$. Als primär neuronal-exprimiertes Protein wurde $G\alpha_{i1}$ im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht näher betrachtet. Die Expression und die Isoform-spezifischen Funktionen der peripher zu findenden Isoformen $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ für die Entzündungszellen und das Immunsystem wurden mit Hilfe konstitutiver knock out Tiere untersucht (Gohla *et al.*, 2007b; Rudolph *et al.*, 1995). In einem globalen $G\alpha_{i2}$ bzw. $G\alpha_{i3}$ knock out Organismus kann es zu einer Hochregulation der verbleibenden Isoform kommen. Inwiefern diese Hochregulation auch an dem beobachteten Phänotyp beteiligt ist, ist ungeklärt, aber durchaus möglich.

Andererseits sind Isoform-spezifische Funktionen für die $G\alpha_i$-Isoformen anzunehmen. Ursächlich für eine Isoform-Spezifität wären z.B. eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ (Gohla *et al.*, 2007b), strukturelle Unterschiede in den Sequenzbereichen der Proteine, die keine Rezeptor- oder Effektor-bindenden Domänen darstellen, sowie generell die Menge von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ in einem Gewebe oder in einer Zelle. Das Letztere wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht, um die Menge der einzelnen Isoform mit ihrer Funktion in dem untersuchten Modell korrelieren zu können.

4.1 Expression von $G\alpha_i$- und $G\beta$-Isoformen: *in vitro* versus *in vivo* Modelle

In der Lunge als peripheres Gewebe sowie den Entzündungszellen der peritonealen Flüssigkeit, den neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, wurde die *ex vivo* Expression von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ analysiert. Mit dem $G\alpha_{common}$ Antikörper konnte nachgewiesen werden, dass die dominante Isoform in diesen Geweben bzw. Zellen $G\alpha_{i2}$ ist (Verhältnis $G\alpha_{i2}/G\alpha_{i3}$ von ca. 9). In der Abwesenheit der dominanten Isoform $G\alpha_{i2}$ kommt es in allen drei erwähnten Zell-Systemen zu einer Hochregulation von $G\alpha_{i3}$. Die höchste kompensatorische Hochregulation wurde

dabei in den peritonealen Neutrophilen beobachtet (8-fache Hochregulation im Vergleich zur 6-fachen in den peritonealen Makrophagen bzw. 2-fachen in der Lunge). Bezüglich der Hochregulation von $G\alpha_{i2}$ in der Abwesenheit der minoren Isoform $G\alpha_{i3}$ war die Hochregulation nicht so stark und nur in den peritonealen Neutrophilen und Makrophagen zu beobachten.

$G\alpha_i$-Proteine repräsentieren den größten Anteil der G-Proteine in der Zelle und bilden zusammen mit den $G\beta\gamma$ Dimeren heterotrimere Komplexe (> 90% aller G-Proteine). Daher ist es gerechtfertigt, die Menge an $G\beta$ in den gleichen Geweben und Zellen als zusätzlicher unabhängiger Parameter für die Analyse der gesamten $G\alpha_i$-Menge heranzuziehen. In der Lunge ändern sich die Mengen an $G\beta_1$ und $G\beta_2$ in der Abwesenheit von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ nicht. In den peritonealen Neutrophilen kommt es interessanterweise zur Hochregulation von $G\beta_1$ und $G\beta_2$, während in den peritonealen Makrophagen die Menge von $G\beta_1$ und $G\beta_2$ nur in der Abwesenheit von $G\alpha_{i2}$ stark reduziert ist. In diesen Zellen führt eine $G\alpha_{i3}$-Defizienz nur zur Reduktion der $G\beta_1$-Menge.

Unseren Ergebnissen zufolge kommt es in einem globalen $G\alpha_{i2}$ knock out Modell immer zur kompensatorischen Hochregulation von $G\alpha_{i3}$. Allerdings handelte es sich in allen drei untersuchten Modellen um eine gemischte Population von Entzündungszellen und somit müssen die Ergebnisse und die Schlussfolgerungen vorsichtig interpretiert werden. Mit Hilfe zweier stabiler Zelllinien, RAW 264.7 Makrophagen und fEnd.5 Endothelzellen, die mit einem shRNA Antisense-Plasmid spezifisch für $G\alpha_{i2}$ transfiziert worden sind, konnte die Expression von $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$ und $G\beta$ getestet werden. Die Effizienz des $G\alpha_{i2}$-Knockdowns in den RAW 264.7 Makrophagen betrug nur 67,5%. Gleichzeitig wurde eine kompensatorische Hochregulation von $G\alpha_{i3}$ unabhängig vom eingesetzten Antikörper nicht beobachtet. Im Gegensatz dazu ging die hohe Effizienz des Knockdowns in den fEnd.5 Zellen von 94,5% mit einer 1,7-fachen kompensatorischen Hochregulation von $G\alpha_{i3}$ einher. Ob ein ursächlicher Zusammenhang zwischen dem Ausmaß des $G\alpha_{i2}$-Knockdowns und einer kompensatorischen Hochregulation der verbleibenden $G\alpha_{i3}$-Isoform besteht ist derzeit unklar. Hierzu müssten in der RAW 264.7 Zelllinie mit dem shRNA Plasmid Titrationsversuche durchgeführt werden.

Die G-Protein-Untereinheiten, die *in vivo* existieren, sind mit ein paar Ausnahmen (Kleuss *et al.*, 1993), unbekannt. In HeLa Zellen führt die sh-RNA-induzierte

Herunterregulation von $G\alpha_{i2}$ oder $G\alpha_{i3}$ zur 2-fachen Hochregulation von $G\alpha_{i1}$ auf Proteinebene. In diesen Zellen führt die Herunterregulation von $G\alpha_{i3}$ zur Hochregulation von $G\alpha_{i2}$. Bezüglich der $G\beta$-Menge kommt es zu Herunterregulation von $G\beta_1$ und $G\beta_4$ nach der sh-RNA-induzierten Hemmung der $G\alpha_{i2}$- oder $G\alpha_{i3}$-Expression. Auf der anderen Seite eliminiert nur die simultane Herunterregulation von $G\beta_1$ und $G\beta_2$ fast alle Mitglieder der $G\alpha_i$-Familie (Krumins *et al.*, 2006). HeLa Zellen enthalten gleiche Mengen an Gα- und $G\beta$-Untereinheiten was dafür spricht, dass die G-Proteine als Heterotrimere existieren. Die Stabilisation der Gα-Untereinheiten durch $G\beta$ ist ein wichtiger Mechanismus für das stöchiometrische Gleichgewicht zwischen Gα und $G\beta$ (Krumins *et al.*, 2006). Die erwähnten Effekte scheinen Zelllinien-spezifisch zu sein. In der Makrophagen Zelllinie J774A.1, die mit sh-RNA gegen $G\beta_1$ und $G\beta_2$ behandelt wurde, kam es zu keiner Änderung der $G\alpha_{i2}$- oder $G\alpha_{i3}$-Proteinmenge. Die beiden Isoformen befanden sich vorwiegend in der membranären Fraktion der Zellen. Allerdings ging die Migration dieser Zellen nach C5a-stimulierten Chemotaxis verloren (Hwang *et al.*, 2005). In der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinie, RAW 264.7 Makrophagen, kam es ebenfalls zu einer erniedrigten Chemotaxis nach C5a Stimulation in den $G\alpha_{i2}$-Antisense-Plasmid-transfizierten Zellen, in welchen auch die Proteinmengen von $G\beta_1$ und $G\beta_2$ signifikant reduziert wurden (Wiege *et al.*, 2012). Die Signalkaskade über $G\beta\gamma$-Dimere nach der Aktivierung des Rezeptors ist von größter Bedeutung für die Aktivierung weiterer Proteine, die direkt an der Initiation der Chemotaxis beteiligt sind (Hwang *et al.*, 2004).

4.2 Migration neutrophiler Granulozyten und Makrophagen nach Thioglykollat-induzierter Peritonitis

Fast alle Rezeptoren, die Chemotaxis vermitteln, sind $G\alpha_i$-gekoppelt. Über diese Rezeptoren wirken die wichtigsten Signalstoffe für das Aktivieren des angeborenen Immunsystems. Über die intrazelluläre biochemische Signalkaskade werden $G\alpha_i$-Proteine aktiviert. Sie spielen damit eine wesentliche Rolle bei der Rekrutierung neutrophiler Leukozyten und Makrophagen während verschiedener entzündlicher Prozesse und während der primären Immunantwort nach verschiedenen Infektionen.

Die dominante periphere Isoform in diesen Zellen ist $G\alpha_{i2.}$ $G\alpha_{i2}$-defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte Anzahl neutrophiler Leukozyten sowie eine Monozytose im Blut (Pero *et al.*, 2007). In verschiedenen entzündlichen Modellen wurde die Kapazität der Neutrophilen und Makrophagen bezüglich ihrer Migration nach verschiedenen inflammatorischen Stimuli untersucht (Wiege *et al.*, 2013; Wiege *et al.*, 2012). In dem *in vivo* Modell der Thioglykollat-induzierten Peritonitis ist die Migration neutrophiler Leukozyten und Makrophagen $G\alpha_{i2}$-defizienter Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp und $G\alpha_{i3}$-defizienten Mäusen erniedrigt. Obwohl in $G\alpha_{i2}$-defizienten Neutrophilen und Makrophagen eine massive Hochregulation von $G\alpha_{i3}$ vorkommt, kann sie in diesem Fall als minore Isoform für die $G\alpha_{i2}$-Defizienz funktionell nicht kompensieren. Interessanterweise zeigen *in vitro* Versuche der C5a und CXCL2- induzierten Chemotaxis, dass $G\alpha_{i2}$-defiziente Neutrophilen genauso gut wie Wildtyp oder $G\alpha_{i3}$-defiziente Neutrophile migrieren und nur die funktionelle Inaktivierung der beiden Isoformen mit PTX zu einer gestörten Migration der Neutrophilen führt (Wiege *et al.*, 2013).

Eine sehr wichtige Rolle bei der Migration von Neutrophilen und Makrophagen spielt die endotheliale Barriere. Ihr Beitrag wurde mit der Hilfe der stabilen fEnd.5 Zelllinie untersucht, in der $G\alpha_{i2}$ mit einem Antisense-Plasmid herunter reguliert wurde. Selbst die Migration von Wildtyp und $G\alpha_{i3}$-defizienten Neutrophilen ist durch ein Monolayer von $G\alpha_{i2}$-defizienten Endothelzellen eingeschränkt, was dafür spricht, dass sowohl das neutrophile als auch das endotheliale $G\alpha_{i2}$ für die Transmigration von Neutrophilen von Bedeutung ist (Wiege *et al.*, 2013). Interessanterweise konnte die fast 2-fache Hochregulation von $G\alpha_{i3}$ in den fEnd.5 Zellen das fehlende $G\alpha_{i2}$ funktionell nicht substituieren, was erneut auf eine Isoform-spezifische Funktion von $G\alpha_{i2}$ hindeutet. Diese Ergebnisse schließen die quantitative Komponente der Redundanz aus, und ermöglichen weitere Untersuchungen, die nach den Mechanismen der Isoform-Spezifität suchen werden.

4.3 Die Rolle von $G\alpha_{i3}$ in der Immunabwehr gegen *L. monocytogenes*

In den untersuchten Entzündungszellen, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, sowie in vielen anderen peripheren Geweben ist $G\alpha_{i3}$ quantitativ die minore Isoform. Nichtsdestotrotz wurden in der letzten Zeit Isoform-spezifische

Funktionen von $G\alpha_{i3}$ beschrieben. So kommt es in der Abwesenheit von $G\alpha_{i3}$ zur gestörten Migration der Kinozillie der Haarzellen im inneren Ohr, was die Morphologie des Haarbündels und seine Orientation beeinflusst (Ezan *et al.*, 2013). Vorläufige Untersuchungen des Hörvermögens $G\alpha_{i3}$-defizienter Tiere weisen auf eine Hörschädigung im Bereich höherer akustischer Frequenzen hin (Prof. M. Knipper, PD Dr. L. Rüttiger, L. Lee, Hörforschung der HNO-Klinik, Tübingen, persönliche Mitteilung). $G\alpha_{i3}$ spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der hepatischen autophagischen Proteolyse, vor allem bei ihrer Inhibition durch Insulin (Gohla *et al.*, 2007a; Gohla *et al.*, 2007b). Dabei ändert $G\alpha_{i3}$ seine subzelluläre Lokalisation nach der Stimulation der Autophagie und akkumuliert in den Autophagosomen. Nach der Inhibition des Prozesses durch Insulin wandert $G\alpha_{i3}$ zurück in die Plasmamembran. Diese dynamische Redistribution zwischen der Plasmamembran und den intrazellulären Kompartimenten wurde für $G\alpha_{i2}$ nicht beobachtet. Allerdings spielt $G\alpha_{i3}$ eine duale Rolle in der Regulation der Autophagie (Abb. 4.1). Seine Aktivierung durch den **GEF** (*guanine nucleotide exchange factor*) GIV führt zur Inhibition der Autophagie, während seine Inaktivierung durch AGS3 die autophagische Proteolyse stimuliert (Garcia-Marcos *et al.*, 2011).

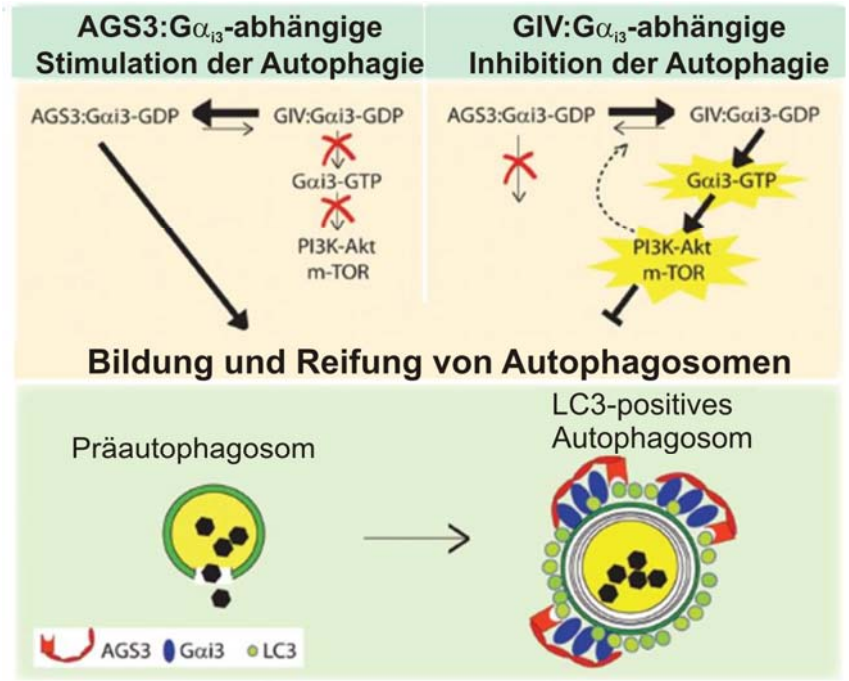


Abb. 4.1: Duale Rolle von $G\alpha_{i3}$ bei der Regulation der Autophagie. Die Interaktion von $G\alpha_{i3}$ mit AGS3 führt durch die Lokalisation der $G\alpha_{i3}$-AGS3-Komplexe an den LC3-positiven Vesikeln zur Reifung der Präautophagosomen in reife Autophagosomen. Auf der anderen Seite führt die Interaktion von $G\alpha_{i3}$ mit GIV zur Inhibition der Autophagie, durch die Stimulation des anti-autophagischen Signalwegs von Klasse I PI3-Kinase-Akt-mTOR an der Plasmamembran und andererseits durch das Herauslösen des aktiven $G\alpha_{i3}$ aus dem LC3-

AGS3-$G\alpha_{i3}$-Komplex an der Autophagosomenmembran. Schema abgeleitet von Garcia-Marcos *et al.*, 2011.

Interessanterweise stellt die Autophagie auch einen wichtigen zellulären Effektor-Mechanismus in der Abwehr von verschiedenen Mikroorganismen dar (Deretic, 2012). Ein gutes Modell für die Analyse der zellulären Autophagie ist die Infektion mit *L. monocytogenes*, einem Target-Bakterium für die autophagische Proteolyse. Die Listerien werden kurz nach ihrem Eintritt in die Zelle in die Autophagosomen aufgenommen und verdaut. Ein kritischer Punkt für die Erkennung des Bakteriums durch die autophagische Maschinerie ist die Freisetzung aus den Phagosomen durch die Produktion von Listeriolysin und die zytoplasmatische Lokalisation des Bakteriums. Allerdings ist der Erfolg der Autophagie am größten bevor sich die Bakterien mit der Hilfe der Aktin-reichen Flagella aktiv bewegen können (Birmingham *et al.*, 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von $G\alpha_{i3}$ in der Immunabwehr gegen *L. monocytogenes* mit Hilfe von *in vitro* und *in vivo* Methoden untersucht. Die $G\alpha_{i3}$-defizienten MEFs sind viel permissiver für das Eindringen und/oder die Replikation von intrazellulären Listerien. Der Phänotyp ist sehr ähnlich dem Zustand nach einer *in vitro* Listerien-Infektion in verschiedenen Zelllinien, in welchen wichtige ATG Gene deletiert sind. Die $G\alpha_{i2}$-defizienten MEFs zeigen ebenfalls einen interessanten Phänotyp, in dem Sinne, dass sie resistent gegen diese Infektion sind. Für die Internalisation der Listerien in die Zelle ist das E-Cadherin an der Plasmamembran ein wichtiger Rezeptor, an den die bakteriellen Internaline binden. Ein wichtiger Punkt wäre die Analyse der Protein-Protein Interaktion zwischen $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$ und E-Cadherin, die bei der Entschlüsselung der Isoform-spezifischen Rollen von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ beitragen könnte. In diesem Fall wäre die potentiell unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der beiden Isoformen von großer Bedeutung für die Erklärung der unterschiedlichen beobachteten Phänotypen.

Das Protein LC3 ist der wichtigste biochemische und zellbiologische Marker für den Nachweis aktivierter Autophagie, der bei der Bildung der reifen Autophagosomen eine wichtige Rolle spielt. Als einziger Marker kann LC3 an den reifen Autophagosomen detektiert werden. In den Wildtyp MEFs konnte eine Ko-lokalisation zwischen LC3 und den Listerien-Stäbchen nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass die autophagische Maschinerie in den Wildtyp Zellen funktioniert und mit der Infektion aktiviert werden kann. Im Gegensatz dazu konnte in den $G\alpha_{i3}$-

defizienten MEFs keine Kolokalisation von LC3 mit den Listerien-Stäbchen detektiert werden. Eine frühere präliminäre Beobachtung aus unserem Labor konnte eine defekte Prozessierung von LC3 in der Abwesenheit von $G\alpha_{i3}$ zeigen (K. Thiele, persönliche Mitteilung). Die Mechanismen der $G\alpha_{i3}$-LC3 Interaktion und Regulation bei der zellulären Autophagie stellen mit Sicherheit ein wichtiges Forschungsthema dar.

In der Abwesenheit von $G\alpha_{i3}$ wurden die MEFs mit viel mehr Listerien infiziert. Ob die Aufnahme der Bakterien in diesen Zellen oder ihre intrazelluläre Replikation erleichtert wird, muss in weiteren Versuchen geklärt werden. Allerdings war es interessant wie sich dieses Ergebnis in der *in vivo* Immunabwehr $G\alpha_{i3}$-defizienter Mäuse gegen dieses Bakterium widerspiegelt. Im Vergleich zu den Wildtyp Tieren zeigten die weiblichen infizierten $G\alpha_{i3}$-defizienten Mäuse mit der LD_{50} Dosis ein deutlich schlechteres Überleben und eine höhere Anzahl bakterieller Kolonien in den primären Foci der Infektion, in Milz und Leber. Die klinische Manifestation der Krankheit, die über zwei Wochen verfolgt wurde, hat zwei weitere Phänomene ergeben. In der akuten Phase der Infektion zeigen $G\alpha_{i3}$-defiziente Mäuse eine statistisch signifikant niedrigere Körpertemperatur. Während der späteren Phase der Infektion erholen sich diese Mäuse langsamer und schlechter als die Wildtyp Kontrollen. In dieser Phase sind auch zwei $G\alpha_{i3}$-defiziente Mäuse gestorben, die in Milz und Leber immer noch zahlreiche Listerien hatten. Den Ergebnissen zufolge scheint in den $G\alpha_{i3}$-defizienten Mäusen die Infektion in eine chronische Phase überzugehen.

In der akuten Phase einer Listerien-Infektion ist die primäre Immunantwort, durch die Rekrutierung von Neutrophilen und Makrophagen und ihre Tötungskapazität, der entscheidende Abwehrmechanismus für die Elimination der Bakterien. $G\alpha_{i3}$-defiziente Mäuse zeigen eine normale Rekrutierung dieser Zellen in unserem inflammatorischen Modell, der Thioglykollat-induzierten Peritonitis. Die Analyse der Tötung dieser Bakterien in $G\alpha_{i3}$-defizienten Neutrophilen und Makrophagen durch verschiedene Mechanismen, unter anderem durch die Aktivierung von Autophagie, könnte eine weitere Isoform-spezifische Rolle von $G\alpha_{i3}$ bedeuten. Für die endgültige Elimination der Bakterien ist jedoch auch eine T-Zell-spezifische Immunantwort von großer Bedeutung. SCID (*severe combined immunodeficiency*) Mäuse, denen T- und B-Zellen fehlen, können die Infektion nicht eliminieren und entwickeln eine chronische Listeriose. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass $G\alpha_{i3}$ für die

Stimulation und Aktivierung der T-Zellen wichtig ist. Ob diese Isoform-spezifische Rolle von $G\alpha_{i3}$ nur bei Infektionen mit Bakterien, gegen welche Autophagie ein wichtiger Abwehrmechanismus darstellt, relevant ist, soll in weiteren Versuchen mit Bakterien untersucht werden, für welche Autophagie als zellulärer Abwehrmechanismum nicht relevant ist.

5 Zusammenfassung

Pertussistoxin-sensitive $G\alpha_i$-Proteine sind die quantitativ am häufigsten vorkommenden G-Proteine in Säugetierzellen. $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ als peripher exprimierte Mitglieder der $G\alpha_i$-Familie sind durch eine hohe Aminosäuresequenzidentität sowie ein überlappendes Expressionsprofil gekennzeichnet. Zahlreiche Befunde lassen vermuten, dass sie sowohl Isoform-spezifische als auch redundante Funktionen besitzen.

Als ein Mechanismus der funktionellen Redundanz wird die kompensatorische Hochregulation verbleibender Isoformen nach genetischer Inaktivierung einer spezifischen $G\alpha_i$-Isoform vermutet. Die Befunde aus der Literatur sind hierzu widersprüchlich. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sowohl in der Lunge als auch in verschiedenen Entzündungszellen zu einer Hochregulation kommt. So wurde eine signifikante Hochregulation von $G\alpha_{i3}$ in $G\alpha_{i2}$-defizienten Lungen beobachtet. Im Gegensatz dazu blieb die Expression von $G\alpha_{i2}$ in $G\alpha_{i3}$-defizienten Lungen unverändert. Zusätzlich wurden neutrophile Granulozyten und Makrophagen aus der Peritonealflüssigkeit nach einer Thioglykollat-induzierten Peritonitis untersucht. Diese Zellen zeigen eine deutliche Hochregulation der noch anwesenden Isoform, also auch $G\alpha_{i2}$ in Abwesenheit von $G\alpha_{i3}$. Außerdem ergab die Analyse der $G\beta$-Isoformen, eine signifikante Reduktion beider Isoformen $G\beta_1$ und $G\beta_2$ in den $G\alpha_{i2}$-defizienten Makrophagen, während in den $G\alpha_{i3}$-defizienten Neutrophilen die $G\beta_1$-Isoform stärker exprimiert ist. Bei der Zellgewinnung nach der Peritonitis wurde festgestellt, dass sowohl die neutrophilen Granulozyten als auch die Makrophagen in den $G\alpha_{i2}$-defizienten Mäusen stark reduziert sind. Um die Ursache der reduzierten Migration in einem Zellsystem untersuchen zu können, wurden mittels shRNA-Plasmide eine $G\alpha_{i2}$-defiziente Makrophagen und eine Endothel Zelllinie in Kooperation mit Prof. Gessner hergestellt. Diese Zelllinien wurden ebenfalls auf ihre Expression der $G\alpha_i$- und $G\beta$-Isoformen analysiert. Die Effizienz der Herunterregulation beträgt in den RAW 264.7 Makrophagen 67,5% und in den fEnd.5 Endothelzellen 94,5%. Interessanterweise kommt es nur in den Endothelzellen zu einer Hochregulation von $G\alpha_{i3}$. Parallel dazu war die Reduktion beider $G\beta$-Isoformen in den Endothelzellen stärker als in den Makrophagen. Diesen Ergebnissen zufolge kommt es in einem globalen $G\alpha_i$ knock out Modell meistens zur kompensatorischen Hochregulation der noch vorhandenen Isoform.

Die Funktion von $G\alpha_{i3}$ im Gegensatz zu $G\alpha_{i2}$ ist bislang weitgehend unklar. In vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurde beobachtet, dass $G\alpha_{i3}$ in der Ausbildung der Autophagosomen beteiligt ist. Ein Infektionsmodell, in dem die Autophagie eine wesentliche Rolle spielt, ist die *L. monocytogenes* Infektion. Daher wurden murine embryonale Fibroblasten (MEFs) *in vitro* mit *L. monocytogenes* infiziert. Dabei wurde beobachtet, dass $G\alpha_{i3}$-defiziente MEFs im Vergleich zu $G\alpha_{i2}$-defizienten und Wildtyp Zellen eine wesentlich größere Permissivität für das Eindringen und die Replikation der Bakterien zeigten. Des Weiteren konnte im Gegensatz zu den Wildtyp MEFs keine Kolokalisation mit dem Autophagosomen-Marker LC3 gefunden werden. Nachfolgend wurden $G\alpha_{i3}$-defiziente und Wildtyp Tiere mit *L. monocytogenes* infiziert. Das Überleben der $G\alpha_{i3}$-defizienten Tiere ist nach der Innokulation einer LD_{50} Dosis stark vermindert. Dies geht mit einer erhöhten Kolonienzahl in Milz und Leber einher. Das Ganze spricht für eine essentielle Rolle von $G\alpha_{i3}$ in der Immunabwehr gegen ein Bakterium, dass ein Target für die zelluläre Autophagie darstellt. Um die Mechanismen der Regulation der autophagischen Proteolyse durch $G\alpha_{i3}$ während einer bakteriellen Infektion aufzuklären, sind weitere *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen notwendig. Mit Hilfe von *in vitro* Analysen könnte die Regulation des Autophagosomen-Markers LC3 durch $G\alpha_{i3}$-spezifische Mechanismen bestimmt werden. Weitere *in vivo* Infektionsversuche müssen eine protektive Rolle von $G\alpha_{i3}$ sowohl in Zellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems bei infektiösen Krankheiten näher analysieren.

6 Literaturverzeichnis

Arshavsky VY., Lamb TD., Pugh EN, Jr. (2002). G proteins and phototransduction. *Annu Rev Physiol* **64:** 153-187.

Bacon KB., Camp RD (1990). Interleukin (IL)-8-induced in vitro human lymphocyte migration is inhibited by cholera and pertussis toxins and inhibitors of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* **169:** 1099-1104.

Becker MN., Diamond G., Verghese MW., Randell SH (2000). CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. *J Biol Chem* **275:** 29731-29736.

Benbrook DM., Long A (2012). Integration of autophagy, proteasomal degradation, unfolded protein response and apoptosis. *Exp Oncol* **34:** 286-297.

Beutler B., Greenwald D., Hulmes JD., Chang M., Pan YC., Mathison J., Ulevitch R., Cerami A (1985). Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* **316:** 552-554.

Bierne H., Cossart P (2002). InlB, a surface protein of Listeria monocytogenes that behaves as an invasin and a growth factor. *J Cell Sci* **115:** 3357-3367.

Birmingham CL., Canadien V., Gouin E., Troy EB., Yoshimori T., Cossart P., Higgins DE., Brumell JH (2007). Listeria monocytogenes evades killing by autophagy during colonization of host cells. *Autophagy* **3:** 442-451.

Blitzer RD (2005). Teaching resources. Ligand-gated ion channels. *Sci STKE* **2005:** tr12.

Brest P., Lapaquette P., Souidi M., Lebrigand K., Cesaro A., Vouret-Craviari V., Mari B., Barbry P., Mosnier JF., Hebuterne X., Harel-Bellan A., Mograbi B., Darfeuille-Michaud A., Hofman P (2011). A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat Genet* **43:** 242-245.

Bruzzone S., Fruscione F., Morando S., Ferrando T., Poggi A., Garuti A., D'Urso A., Selmo M., Benvenuto F., Cea M., Zoppoli G., Moran E., Soncini D., Ballestrero A., Sordat B., Patrone F., Mostoslavsky R., Uccelli A., Nencioni A (2009). Catastrophic NAD+ depletion in activated T lymphocytes through Nampt inhibition reduces demyelination and disability in EAE. *PLoS One* **4:** e7897.

Carbonnelle B., Cottin J., Parvery F., Chambreuil G., Kouyoumdjian S., Le Lirzin M., Cordier G., Vincent F (1979). [Epidemic of listeriosis in Western France (1975--1976)]. *Rev Epidemiol Sante Publique* **26:** 451-467.

Chen Y., Klionsky DJ (2011). The regulation of autophagy - unanswered questions. *J Cell Sci* **124:** 161-170.

Cismowski MJ., Takesono A., Bernard ML., Duzic E., Lanier SM (2001). Receptor-independent activators of heterotrimeric G-proteins. *Life Sci* **68:** 2301-2308.

Clapham DE., Neer EJ (1997). G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37:** 167-203.

Cuervo AM (2004). Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol* **14:** 70-77.

Dalwadi H., Wei B., Schrage M., Spicher K., Su TT., Birnbaumer L., Rawlings DJ., Braun J (2003). B cell developmental requirement for the G alpha i2 gene. *J Immunol* **170:** 1707-1715.

De Duve C., Pressman BC., Gianetto R., Wattiaux R., Appelmans F (1955). Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J* **60:** 604-617.

De Duve C., Wattiaux R (1966). Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* **28:** 435-492.

De Luca A., Iannitti RG., Bozza S., Beau R., Casagrande A., D'Angelo C., Moretti S., Cunha C., Giovannini G., Massi-Benedetti C., Carvalho A., Boon L., Latge JP., Romani L (2012). CD4(+) T cell vaccination overcomes defective cross-presentation of fungal antigens in a mouse model of chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* **122:** 1816-1831.

De Vries L., Zheng B., Fischer T., Elenko E., Farquhar MG (2000). The regulator of G protein signaling family. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40:** 235-271.

Deretic V (2012). Autophagy: an emerging immunological paradigm. *J Immunol* **189:** 15-20.

Diamond G., Legarda D., Ryan LK (2000). The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunol Rev* **173:** 27-38.

Dice JF (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci* **15:** 305-309.

Dutta D., Xu J., Kim JS., Dunn WA, Jr.., Leeuwenburgh C (2013). Upregulated autophagy protects cardiomyocytes from oxidative stress-induced toxicity. *Autophagy* **9:** 328-344.

Eskelinen EL (2005). Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy* **1:** 1-10.

Exner T., Jensen ON., Mann M., Kleuss C., Nürnberg B (1999). Posttranslational modification of Galphao1 generates Galphao3, an abundant G protein in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96:** 1327-1332.

Ezan J., Lasvaux L., Gezer A., Novakovic A., May-Simera H., Belotti E., Lhoumeau AC., Birnbaumer L., Beer-Hammer S., Borg JP., Le Bivic A., Nürnberg B., Sans N., Montcouquiol M (2013). Primary cilium migration depends on G-protein signalling control of subapical cytoskeleton. *Nat Cell Biol*

Fantl WJ., Johnson DE., Williams LT (1993). Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* **62:** 453-481.

Fredriksson R., Lagerstrom MC., Lundin LG., Schioth HB (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* **63:** 1256-1272.

Fujita K., Maeda D., Xiao Q., Srinivasula SM (2011). Nrf2-mediated induction of p62 controls Toll-like receptor-4-driven aggresome-like induced structure formation and autophagic degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108:** 1427-1432.

Garcia-Marcos M., Ear J., Farquhar MG., Ghosh P (2011). A GDI (AGS3) and a GEF (GIV) regulate autophagy by balancing G protein activity and growth factor signals. *Mol Biol Cell* **22:** 673-686.

Germena G., Hirsch E (2012). PI3Ks and small GTPases in neutrophil migration: Two sides of the same coin. *Mol Immunol*.

Gilman AG (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* **56:** 615-649.

Gohla A., Klement K., Nürnberg B (2007a). The heterotrimeric G protein G(i3) regulates hepatic autophagy downstream of the insulin receptor. *Autophagy* **3:** 393-395.

Gohla A., Klement K., Piekorz RP., Pexa K., vom Dahl S., Spicher K., Dreval V., Haussinger D., Birnbaumer L., Nürnberg B (2007b). An obligatory requirement for the heterotrimeric G protein Gi3 in the antiautophagic action of insulin in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104:** 3003-3008.

Gohla A., Offermanns S., Wilkie TM., Schultz G (1999). Differential involvement of Galpha12 and Galpha13 in receptor-mediated stress fiber formation. *J Biol Chem* **274:** 17901-17907.

Gros F., Arnold J., Page N., Decossas M., Korganow AS., Martin T., Muller S (2012). Macroautophagy is deregulated in murine and human lupus T lymphocytes. *Autophagy* **8**.

Gudermann T., Kalkbrenner F., Dippel E., Laugwitz KL., Schultz G (1997). Specificity and complexity of receptor-G-protein interaction. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **31:** 253-262.

Harhammer R., Nürnberg B., Spicher K., Schultz G (1994). Purification of the G-protein G13 from rat brain membranes. *Biochem J* **303 (Pt 1):** 135-140.

He J., Gurunathan S., Iwasaki A., Ash-Shaheed B., Kelsall BL (2000). Primary role for Gi protein signaling in the regulation of interleukin 12 production and the induction of T helper cell type 1 responses. *J Exp Med* **191:** 1605-1610.

Hendry IA., Kelleher KL., Bartlett SE., Leck KJ., Reynolds AJ., Heydon K., Mellick A., Megirian D., Matthaei KI (2000). Hypertolerance to morphine in G(z alpha)-deficient mice. *Brain Res* **870:** 10-19.

Hirsch E., Katanaev VL., Garlanda C., Azzolino O., Pirola L., Silengo L., Sozzani S., Mantovani A., Altruda F., Wymann MP (2000). Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* **287:** 1049-1053.

Hornquist CE., Lu X., Rogers-Fani PM., Rudolph U., Shappell S., Birnbaumer L., Harriman GR (1997). G(alpha)i2-deficient mice with colitis exhibit a local increase in memory CD4+ T cells and proinflammatory Th1-type cytokines. *J Immunol* **158:** 1068-1077.

Huntington ND., Tarlinton DM (2004). CD45: direct and indirect government of immune regulation. *Immunol Lett* **94:** 167-174.

Hutchins MU., Veenhuis M., Klionsky DJ (1999). Peroxisome degradation in Saccharomyces cerevisiae is dependent on machinery of macroautophagy and the Cvt pathway. *J Cell Sci* **112 (Pt 22):** 4079-4087.

Hwang JI., Choi S., Fraser ID., Chang MS., Simon MI (2005). Silencing the expression of multiple Gbeta-subunits eliminates signaling mediated by all four families of G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102:** 9493-9498.

Hwang JI., Fraser ID., Choi S., Qin XF., Simon MI (2004). Analysis of C5a-mediated chemotaxis by lentiviral delivery of small interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101:** 488-493.

Jiang M., Spicher K., Boulay G., Martin-Requero A., Dye CA., Rudolph U., Birnbaumer L (2002). Mouse gene knockout and knockin strategies in application to alpha subunits of Gi/Go family of G proteins. *Methods Enzymol* **344:** 277-298.

Jin YZ., Thompson BD., Zhou ZY., Fu Y., Birnbaumer L., Wu MX (2008). Reciprocal function of Galphai2 and Galphai3 in graft-versus-host disease. *Eur J Immunol* **38:** 1988-1998.

Jung S., Unutmaz D., Wong P., Sano G., De los Santos K., Sparwasser T., Wu S., Vuthoori S., Ko K., Zavala F., Pamer EG., Littman DR., Lang RA (2002). In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* **17:** 211-220.

Kabeya Y., Kawamata T., Suzuki K., Ohsumi Y (2007). Cis1/Atg31 is required for autophagosome formation in Saccharomyces cerevisiae. *Biochem Biophys Res Commun* **356:** 405-410.

Kim J., Klionsky DJ (2000). Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu Rev Biochem* **69:** 303-342.

Kirisako T., Baba M., Ishihara N., Miyazawa K., Ohsumi M., Yoshimori T., Noda T., Ohsumi Y (1999). Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J Cell Biol* **147:** 435-446.

Kleinnijenhuis J., Oosting M., Plantinga TS., van der Meer JW., Joosten LA., Crevel RV., Netea MG (2011). Autophagy modulates the Mycobacterium tuberculosis-induced cytokine response. *Immunology* **134:** 341-348.

Kleuss C., Scherubl H., Hescheler J., Schultz G., Wittig B (1993). Selectivity in signal transduction determined by gamma subunits of heterotrimeric G proteins. *Science* **259:** 832-834.

Kobilka BK (2007). G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta* **1768:** 794-807.

Kroeze WK., Sheffler DJ., Roth BL (2003). G-protein-coupled receptors at a glance. *J Cell Sci* **116:** 4867-4869.

Krumins AM., Gilman AG (2006). Targeted knockdown of G protein subunits selectively prevents receptor-mediated modulation of effectors and reveals complex changes in non-targeted signaling proteins. *J Biol Chem* **281:** 10250-10262.

Kuballa P., Nolte WM., Castoreno AB., Xavier RJ (2012). Autophagy and the immune system. *Annu Rev Immunol* **30:** 611-646.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227:** 680-685.

Lee HK., Lund JM., Ramanathan B., Mizushima N., Iwasaki A (2007). Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* **315:** 1398-1401.

Lee JW., Juliano R (2004). Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. *Mol Cells* **17:** 188-202.

Lehrer RI (2004). Primate defensins. *Nat Rev Microbiol* **2:** 727-738.

Leopoldt D., Harteneck C., Nürnberg B (1997). G proteins endogenously expressed in Sf 9 cells: interactions with mammalian histamine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **356:** 216-224.

Levine B., Klionsky DJ (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* **6:** 463-477.

Ley K., Laudanna C., Cybulsky MI., Nourshargh S (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* **7:** 678-689.

Li WW., Li J., Bao JK (2012). Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci* **69:** 1125-1136.

Lilienbaum A (2013). Relationship between the proteasomal system and autophagy. *Int J Biochem Mol Biol* **4:** 1-26.

Litman GW., Cannon JP., Dishaw LJ (2005). Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. *Nat Rev Immunol* **5:** 866-879.

Liu GW., Ma HX., Wu Y., Zhao Y (2006). The nonopsonic allogeneic cell phagocytosis of macrophages detected by flow cytometry and two photon fluorescence microscope. *Transpl Immunol* **16:** 220-226.

Lombardi MS., Kavelaars A., Heijnen CJ (2002). Role and modulation of G protein-coupled receptor signaling in inflammatory processes. *Crit Rev Immunol* **22:** 141-163.

Maier U., Babich A., Macrez N., Leopoldt D., Gierschik P., Illenberger D., Nürnberg B (2000). Gbeta 5gamma 2 is a highly selective activator of phospholipid-dependent enzymes. *J Biol Chem* **275:** 13746-13754.

Manes S., Gomez-Mouton C., Lacalle RA., Jimenez-Baranda S., Mira E., Martinez AC (2005). Mastering time and space: immune cell polarization and chemotaxis. *Semin Immunol* **17:** 77-86.

Manohar M., Baumann DO., Bos NA., Cebra JJ (2001). Gut colonization of mice with actA-negative mutant of Listeria monocytogenes can stimulate a humoral mucosal immune response. *Infect Immun* **69:** 3542-3549.

Marrari Y., Crouthamel M., Irannejad R., Wedegaertner PB (2007). Assembly and trafficking of heterotrimeric G proteins. *Biochemistry* **46:** 7665-7677.

Martin TR., Frevert CW (2005). Innate immunity in the lungs. *Proc Am Thorac Soc* **2:** 403-411.

Mays LE., Ammon-Treiber S., Mothes B., Alkhaled M., Rottenberger J., Muller-Hermelink ES., Grimm M., Mezger M., Beer-Hammer S., von Stebut E., Rieber N., Nürnberg B., Schwab M., Handgretinger R., Idzko M., Hartl D., Kormann MS (2013). Modified Foxp3 mRNA protects against asthma through an IL-10-dependent mechanism. *J Clin Invest* **123:** 1216-1228.

McKenna NJ., O'Malley BW (2001). Nuclear receptors, coregulators, ligands, and selective receptor modulators: making sense of the patchwork quilt. *Ann N Y Acad Sci* **949:** 3-5.

Meyer-Morse N., Robbins JR., Rae CS., Mochegova SN., Swanson MS., Zhao Z., Virgin HW., Portnoy D (2010). Listeriolysin O is necessary and sufficient to induce autophagy during Listeria monocytogenes infection. *PLoS One* **5:** e8610.

Midwood KS., Williams LV., Schwarzbauer JE (2004). Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int J Biochem Cell Biol* **36:** 1031-1037.

Mizushima N (2004). Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* **36:** 2491-2502.

Mizushima N., Kuma A., Kobayashi Y., Yamamoto A., Matsubae M., Takao T., Natsume T., Ohsumi Y., Yoshimori T (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci* **116:** 1679-1688.

Mizushima N., Yamamoto A., Hatano M., Kobayashi Y., Kabeya Y., Suzuki K., Tokuhisa T., Ohsumi Y., Yoshimori T (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol* **152:** 657-668.

Nakagawa I., Amano A., Mizushima N., Yamamoto A., Yamaguchi H., Kamimoto T., Nara A., Funao J., Nakata M., Tsuda K., Hamada S., Yoshimori T (2004). Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science* **306:** 1037-1040.

Nedjic J., Aichinger M., Mizushima N., Klein L (2009). Macroautophagy, endogenous MHC II loading and T cell selection: the benefits of breaking the rules. *Curr Opin Immunol* **21:** 92-97.

Noda T., Matsuura A., Wada Y., Ohsumi Y (1995). Novel system for monitoring autophagy in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Biochem Biophys Res Commun* **210:** 126-132.

Nürnberg B (2004). Classification and functional properties of G proteins. The nature reviews drug discovery GPCR questionnaire participants. In: The state of GPCR research in 2004. *Nat Rev Drug Discov*, **3**: 575-626.

Nürnberg, B. (1997). Pertussis toxin as a Cell Biology Tool. *In: Aktories, K. (Ed.), Bacterial toxins.Chapman & Hall, London*, 33-45.

Nürnberg B., Ahnert-Hilger G (1996). Potential roles of heterotrimeric G proteins of the endomembrane system. *FEBS Lett* **389:** 61-65.

Offermanns S (2003). G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog Biophys Mol Biol* **83:** 101-130.

Offermanns S (2000). Mammalian G-protein function in vivo: new insights through altered gene expression. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **140:** 63-133.

Offermanns S., Hashimoto K., Watanabe M., Sun W., Kurihara H., Thompson RF., Inoue Y., Kano M., Simon MI (1997a). Impaired motor coordination and persistent multiple climbing fiber innervation of cerebellar Purkinje cells in mice lacking Galphaq. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94:** 14089-14094.

Offermanns S., Toombs CF., Hu YH., Simon MI (1997b). Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice. *Nature* **389:** 183-186.

Offermanns S., Zhao LP., Gohla A., Sarosi I., Simon MI., Wilkie TM (1998). Embryonic cardiomyocyte hypoplasia and craniofacial defects in G alpha q/G alpha 11-mutant mice. *EMBO J* **17:** 4304-4312.

Ogier-Denis E., Couvineau A., Maoret JJ., Houri JJ., Bauvy C., De Stefanis D., Isidoro C., Laburthe M., Codogno P (1995). A heterotrimeric Gi3-protein controls autophagic sequestration in the human colon cancer cell line HT-29. *J Biol Chem* **270:** 13-16.

Pamer EG (2004). Immune responses to Listeria monocytogenes. *Nat Rev Immunol* **4:** 812-823.

Pero RS., Borchers MT., Spicher K., Ochkur SI., Sikora L., Rao SP., Abdala-Valencia H., O'Neill KR., Shen H., McGarry MP., Lee NA., Cook-Mills JM., Sriramarao P., Simon MI., Birnbaumer L., Lee JJ (2007). Galphai2-mediated signaling events in the endothelium are involved in controlling leukocyte extravasation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104:** 4371-4376.

Pexa K (2012). Charakterisierung biologischer Funktionen Guaninnukleotid-bindender G alpha i-Proteine in genetisch modifizierten Mauslinien.

Pfeuffer T (1977). GTP-binding proteins in membranes and the control of adenylate cyclase activity. *J Biol Chem* **252:** 7224-7234.

Pillay J., Kamp VM., van Hoffen E., Visser T., Tak T., Lammers JW., Ulfman LH., Leenen LP., Pickkers P., Koenderman L (2012). A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest* **122:** 327-336.

Platz J., Beisswenger C., Dalpke A., Koczulla R., Pinkenburg O., Vogelmeier C., Bals R (2004). Microbial DNA induces a host defense reaction of human respiratory epithelial cells. *J Immunol* **173:** 1219-1223.

Pua HH., Guo J., Komatsu M., He YW (2009). Autophagy is essential for mitochondrial clearance in mature T lymphocytes. *J Immunol* **182:** 4046-4055.

Py BF., Lipinski MM., Yuan J (2007). Autophagy limits Listeria monocytogenes intracellular growth in the early phase of primary infection. *Autophagy* **3:** 117-125.

Pyriochou A., Papapetropoulos A (2005). Soluble guanylyl cyclase: more secrets revealed. *Cell Signal* **17:** 407-413.

Reggiori F., Monastyrska I., Shintani T., Klionsky DJ (2005). The actin cytoskeleton is required for selective types of autophagy, but not nonspecific autophagy, in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Mol Biol Cell* **16:** 5843-5856.

Rich KA., Webster P (2006). *Listeria monocytogenes*: A Model System for Studying Autophagy. *In: Deretic, V. (Ed.), Autophagy in Immunity and Infection. Wiley-VCH, New Jersey,* 161-178.

Robishaw JD., Berlot CH (2004). Translating G protein subunit diversity into functional specificity. *Curr Opin Cell Biol* **16:** 206-209.

Rodgers MA., Bowman JW., Liang Q., Jung JU (2013). Regulation where autophagy intersects the inflammasome. *Antioxid Redox Signal*.

Rohrer DK., Kobilka BK (1998). G protein-coupled receptors: functional and mechanistic insights through altered gene expression. *Physiol Rev* **78:** 35-52.

Rudolph U., Finegold MJ., Rich SS., Harriman GR., Srinivasan Y., Brabet P., Boulay G., Bradley A., Birnbaumer L (1995). Ulcerative colitis and adenocarcinoma of the colon in G alpha i2-deficient mice. *Nat Genet* **10:** 143-150.

Sadja R., Smadja K., Alagem N., Reuveny E (2001). Coupling Gbetagamma-dependent activation to channel opening via pore elements in inwardly rectifying potassium channels. *Neuron* **29:** 669-680.

Sasaki T., Irie-Sasaki J., Jones RG., Oliveira-dos-Santos AJ., Stanford WL., Bolon B., Wakeham A., Itie A., Bouchard D., Kozieradzki I., Joza N., Mak TW., Ohashi PS., Suzuki A., Penninger JM (2000). Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science* **287:** 1040-1046.

Schmid D., Dengjel J., Schoor O., Stevanovic S., Munz C (2006). Autophagy in innate and adaptive immunity against intracellular pathogens. *J Mol Med (Berl)* **84:** 194-202.

Schmid D., Munz C (2007). Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity* **27:** 11-21.

Schmidt A., Hescheler J., Offermanns S., Spicher K., Hinsch KD., Klinz FJ., Codina J., Birnbaumer L., Gausepohl H., Frank R., et al. (1991). Involvement of pertussis toxin-sensitive G-proteins in the hormonal inhibition of dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} currents in an insulin-secreting cell line (RINm5F). *J Biol Chem* **266:** 18025-18033.

Schwindinger WF., Robishaw JD (2001). Heterotrimeric G-protein betagamma-dimers in growth and differentiation. *Oncogene* **20:** 1653-1660.

Scott SV., Guan J., Hutchins MU., Kim J., Klionsky DJ (2001). Cvt19 is a receptor for the cytoplasm-to-vacuole targeting pathway. *Mol Cell* **7:** 1131-1141.

Servant G., Weiner OD., Neptune ER., Sedat JW., Bourne HR (1999). Dynamics of a chemoattractant receptor in living neutrophils during chemotaxis. *Mol Biol Cell* **10:** 1163-1178.

Shaughnessy LM., Swanson JA (2007). The role of the activated macrophage in clearing Listeria monocytogenes infection. *Front Biosci* **12:** 2683-2692.

Shen H., Whitmire JK., Fan X., Shedlock DJ., Kaech SM., Ahmed R (2003). A specific role for B cells in the generation of CD8 T cell memory by recombinant Listeria monocytogenes. *J Immunol* **170:** 1443-1451.
Shintani T., Klionsky DJ (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* **306:** 990-995.

Simon MI., Strathmann MP., Gautam N (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252:** 802-808.

Smrcka AV (2008). G protein betagamma subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling. *Cell Mol Life Sci* **65:** 2191-2214.

Sorokin P (1970). The cells of the lungs. *In: Morphology of experimental respiratory carcinogenesis. Proceedings of a biology division, Oak Ridge National Laboratory conference, Gatlinburg,* 3-43.

Spangrude GJ., Sacchi F., Hill HR., Van Epps DE., Daynes RA (1985). Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin. *J Immunol* **135:** 4135-4143.

Spicher, K., Rudolph, U., Brandt, U., Jiang, M., Boulay, G., Nüsse, O., Nürnberg, B., Schultz, G. & Birnbaumer, L. (2002). Targeted inactivation of G-protein ai-subunits affects neutrophil function. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.*, 365:R46.

Spicher K., Kalkbrenner F., Zobel A., Harhammer R., Nürnberg B., Soling A., Schultz G (1994). G12 and G13 alpha-subunits are immunochemically detectable in most membranes of various mammalian cells and tissues. *Biochem Biophys Res Commun* **198:** 906-914.

Stamme C., Brasch F., von Bethmann A., Uhlig S (2002). Effect of surfactant on ventilation-induced mediator release in isolated perfused mouse lungs. *Pulm Pharmacol Ther* **15:** 455-461.

Sternweis PC (1986). The purified alpha subunits of Go and Gi from bovine brain require beta gamma for association with phospholipid vesicles. *J Biol Chem* **261:** 631-637.

Strathmann MP., Simon MI (1991). G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88:** 5582-5586.

Suire S., Condliffe AM., Ferguson GJ., Ellson CD., Guillou H., Davidson K., Welch H., Coadwell J., Turner M., Chilvers ER., Hawkins PT., Stephens L (2006). Gbetagammas and the Ras binding domain of p110gamma are both important regulators of PI(3)Kgamma signalling in neutrophils. *Nat Cell Biol* **8:** 1303-1309.

Sukseree S., Mildner M., Rossiter H., Pammer J., Zhang CF., Watanapokasin R., Tschachler E., Eckhart L (2012). Autophagy in the thymic epithelium is dispensable for the development of self-tolerance in a novel mouse model. *PLoS One* **7:** e38933.

Suzuki N., Nakamura S., Mano H., Kozasa T (2003). Galpha 12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100:** 733-738.

ten Dijke P., Hill CS (2004). New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* **29:** 265-273.

Thompson BD., Jin Y., Wu KH., Colvin RA., Luster AD., Birnbaumer L., Wu MX (2007). Inhibition of G alpha i2 activation by G alpha i3 in CXCR3-mediated signaling. *J Biol Chem* **282:** 9547-9555.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* **24:** 145-149.

Tsukada M., Ohsumi Y (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of Saccharomyces cerevisiae. *FEBS Lett* **333:** 169-174.

Warnock RA., Askari S., Butcher EC., von Andrian UH (1998). Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *J Exp Med* **187:** 205-216.

Watson R (2009). Listeriosis remains a cause for concern in Europe. *BMJ* **338:** b319.

Wettschureck N., Offermanns S (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* **85:** 1159-1204.

Wiege K., Ali SR., Gewecke B., Novakovic A., Konrad FM., Pexa K., Beer-Hammer S., Reutershan J., Piekorz RP., Schmidt RE., Nürnberg B., Gessner JE (2013). $G\alpha_{i2}$ is the essential galphai protein in immune complex-induced lung disease. *J Immunol* **190:** 324-333.

Wiege K., Le DD., Syed SN., Ali SR., Novakovic A., Beer-Hammer S., Piekorz RP., Schmidt RE., Nürnberg B., Gessner JE (2012). Defective macrophage migration in $G\alpha_{i2}$- but not $G\alpha_{i3}$-deficient mice. *J Immunol* **189:** 980-987.

Wilkie TM., Yokoyama S (1994). Evolution of the G protein alpha subunit multigene family. *Soc Gen Physiol Ser* **49:** 249-270.

Wise A., Jupe SC., Rees S (2004). The identification of ligands at orphan G-protein coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44:** 43-66.

Witherow DS., Slepak VZ (2003). A novel kind of G protein heterodimer: the G beta5-RGS complex. *Receptors Channels* **9:** 205-212.

Wittkopf N., Gunther C., Martini E., Waldner M., Amann KU., Neurath MF., Becker C (2012). Lack of intestinal epithelial atg7 affects paneth cell granule formation but does not compromise immune homeostasis in the gut. *Clin Dev Immunol* **2012:** 278059.

Wong GT., Gannon KS., Margolskee RF (1996). Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature* **381:** 796-800.

Xie Z., Klionsky DJ (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* **9:** 1102-1109.

Yang J., Wu J., Jiang H., Mortensen R., Austin S., Manning DR., Woulfe D., Brass LF (2002). Signaling through Gi family members in platelets. Redundancy and specificity in the regulation of adenylyl cyclase and other effectors. *J Biol Chem* **277:** 46035-46042.

Yoshikawa Y., Ogawa M., Hain T., Yoshida M., Fukumatsu M., Kim M., Mimuro H., Nakagawa I., Yanagawa T., Ishii T., Kakizuka A., Sztul E., Chakraborty T., Sasakawa C (2009). Listeria monocytogenes ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nat Cell Biol* **11:** 1233-1240.

Yost EA., Mervine SM., Sabo JL., Hynes TR., Berlot CH (2007). Live cell analysis of G protein beta5 complex formation, function, and targeting. *Mol Pharmacol* **72:** 812-825.

Zhang GF., Patton WA., Moss J., Vaughan M (1997). Cholera toxin: mechanism of action and potential use in vaccine development. *In: Aktories, K. (Ed.), Bacterial toxins. Chapman & Hall, London*, 1-13.

Zheng YT., Shahnazari S., Brech A., Lamark T., Johansen T., Brumell JH (2009). The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. *J Immunol* **183:** 5909-5916.

I Eigene Publikationen

Köhler D., Devanathan V., de Oliveira Franz CB., Eldh T., **Novakovic A**., Roth JM., Granja T., Birnbaumer L., Rosenberger P., Beer-Hammer S., Nürnberg B. $G\alpha_{i2}$- and $G\alpha_{i3}$-deficient mice display converse severity of myocardial ischemia reperfusion injury. *eingereicht*

Ezan J., Lasvaux L., Gezer A., **Novakovic A**., May-Simera H., Belotti E., Lhoumeau AC., Birnbaumer L., Beer-Hammer S., Borg JP., Le Bivic A., Nürnberg B., Sans N., Montcouquiol M (2013). Primary cilium migration depends on G-protein signalling control of subapical cytoskeleton. *Nat Cell Biol*

Hippe HJ., Ludde M., Schnoes K., **Novakovic A**., Lutz S., Katus HA., Niroomand F., Nürnberg B., Frey N., Wieland T (2013). Competition for $G\beta\gamma$ dimers mediates a specific cross-talk between stimulatory and inhibitory G protein α subunits of the adenylyl cyclase in cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **386:** 459-469.

Wiege K., Ali SR., Gewecke B., **Novakovic A**., Konrad FM., Pexa K., Beer-Hammer S., Reutershan J., Piekorz RP., Schmidt RE., Nürnberg B., Gessner JE (2013). $G\alpha_{i2}$ is the essential galphai protein in immune complex-induced lung disease. *J Immunol* **190:** 324-333.

Wiege K., Le DD., Syed SN., Ali SR., **Novakovic A**., Beer-Hammer S., Piekorz RP., Schmidt RE., Nürnberg B., Gessner JE (2012). Defective macrophage migration in $G\alpha_{i2}$- but not $G\alpha_{i3}$-deficient mice. *J Immunol* **189:** 980-987.

Autenrieth SE., Warnke P., Wabnitz GH, Lucero Estrada C., Pasquevich KA., Drechsler D., Günter M., Hochweller K., **Novakovic A**., Beer-Hammer S., Samstag Y., Hämmerling GJ., Garbi N., Autenrieth IB (2012). Depletion of Dendritic Cells Enhances Innate Anti-Bacterial Host Defense through Modulation of Phagocyte Homeostasis. *PLoS Pathog* **8:** e1002552.

II Posterpräsentationen

Ana Novakovic, Sandra Beer-Hammer, and Bernd Nürnberg: Specific role of $G\alpha_{i3}$ in the immune response upon *Listeria monocytogenes* infection; 05.-07.03.2013, DGPT Jahrestagung 2013, Halle, Germany

Ana Novakovic, Kristina Wiege, Sandra Beer-Hammer, Johannes Gessner and Bernd Nürnberg: Role of $G\alpha_i$ proteins in immune function and infection; 19.-22.03.2012, DGPT Jahrestagung 2012, Dresden, Germany

Ana Novakovic, Kristina Wiege, Sandra Beer-Hammer, Johannes Gessner and Bernd Nürnberg: Role of $G\alpha_i$ proteins in immune function and infection; Treffen der Baden-Württembergischen Pharmakologen und Toxikologen, 17.-19.11.2011, Schloss Reisensburg Günzburg, Germany

Ana Novakovic, Karinna Klement, Annette Schürmann, Roland Piekorz, Lutz Birnbaumer, Hans-Georg Joost, Dieter Häussinger, Antje Gohla, Bernd Nürnberg:

An obligatory requirement for the heterotrimeric G protein $G\alpha_{i3}$ in the anti-autophagic action of insulin in the liver; 1st International Symposium for PhD Students on Protein Trafficking in Health and Disease, May 26th-28th 2010, Hamburg, Germany

Ana Novakovic, Daniel Degrandi, Antje Gohla, Sandra Beer-Hammer and Bernd Nürnberg: Potential role of G_i-Proteins in the autophagy-mediated defense against *L.monocytogenes*; Retreat der Abteilung „Allgemeine Pharmakologie und Experimentelle Therapie“ des Institutes für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 17.-18.12.2009 in Blaubeuren, Germany

III Danksagung

An dieser Stelle möchte ich herzlichst all jenen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Nürnberg für die intensive Betreuung der Arbeit, zahlreiche wissenschaftliche Anregungen und Diskussionen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Sandra Beer-Hammer für die exzellente Ko-Betreuung.

Frau Dr. Veronika Leiss und Frau Katarina Flockerzie bin ich für die Einführung in molekularbiologische Arbeitstechniken, sowie für die exzellente kollegiale und nette Zusammenarbeit verbunden. In vielen Momenten unterstützen sie mich und stellen damit eine Ergänzung meiner Familie in Deutschland dar. Dafür bin ich für alle Ewigkeit dankbar.

Herrn Dr. Milenko Kujovic bin ich für die moralische Unterstützung und die zahlreichen Beratungen am Anfang meines Lebens in einem neuen Land sehr dankbar.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppen möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft und ausgezeichnete Zusammenarbeit bedanken.

Gustav Mahler, Miles Davis, Dizzy Gillespie, Ella Fitzgerald und der Rest der klassischen und Jazz „Company“ haben mein Leben in den letzten Phasen des Schreibens erleichtert und dafür danke ich ihnen genauso wie meinen Eltern, die mein musikalisches Talent sehr früh entdeckt und es unterstützt haben.

Besonders dankbar bin ich meiner ganzen Familie und meinen Freunden für ihren Rückhalt.

IV Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Ana Novakovic
Geburtsdatum/-ort:	15.10.1981 in Skopje, Mazedonien
Staatsangehörigkeit:	serbisch
Familienstand:	ledig

Schulbildung

1988-1996:	Grundschule in Skopje, Mazedonien
1996-2000:	“Josip Broz Tito” Gymnasium, Skopje, Mazedonien
Juni 2000:	Abitur

Hochschulstudium

2000-2006:	Studium der Humanmedizin, Medizinische Fakultät, Universität Belgrad, Belgrad, Serbien
2006-2007:	Praktisches Jahr am Klinikum der Medizinischen Fakultät, Universität Belgrad, Belgrad, Serbien
26.03.2007	Staatsexamen mit dem Abschluss *Doktor der Medizin* (Prüfungskommission des Gesundheitsministeriums Serbiens, 26.03.2007)
09.12.2009:	Erteilung der Berufserlaubnis gem. § 10 der BÄO (Kenntnisprüfung am 09.12.2009, Prüfungskommission der Universität Heidelberg)
27.07.2012:	Erteilung der Approbation gem. § 3 der BÄO (Regierungspräsidium Stuttgart)

Berufliche Tätigkeit

2007-2009:	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Heinrich Heine Universität Düsseldorf
seit 2009:	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Eberhard Karls Universität Tübingen

Lehrtätigkeit

2007-2009:	Dozentin an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf: Biochemie-Praktikum, Biochemie-Integriertes und fachbezogenes Seminar
seit 2009:	Dozentin an der Eberhard Karls Universität Tübingen: Pharmakologie-Seminar/Kursus der allgemeinen und systematischen Pharmakologie und Toxikologie, POL=Problemorientiertes Lernen