

Aus dem
Department für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und
Pharmakogenomik der Universität Tübingen
Abteilung für Pharmakologie, Experimentelle Therapie und
Toxikologie

**Evaluation von Mausmodellen mit einer zelltyp-spezifischen
 $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -Defizienz in Neutrophilen Granulozyten**

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

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

vorgelegt von

Beichert, Lukas David

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

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

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. F. Konrad

Tag der Disputation: 30.11.2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Neutrophile Granulozyten	1
1.2 Heterotrimere G-Proteine	5
1.3 Die Bedeutung von G _i -Proteinen in Neutrophilen.....	8
1.4 Das Cre-loxP-System	9
1.5 Ziel dieser Arbeit	11
2 Materialien und Methoden.....	13
2.1 Materialien.....	13
2.1.1. Chemikalien.....	13
2.1.2. Reagenzien, Kits und Verbrauchsmaterialien	14
2.1.3. Puffer	15
2.1.4. Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper	16
2.1.5. PCR-Primer	16
2.1.6. Geräte.....	17
2.2 Methoden.....	18
2.2.1. Versuchstiere	18
2.2.2. Gewinnung von Neutrophilen durch Thioglycolat-induzierte Peritonitis	19
2.2.3. Immunomagnetische Aufreinigung von Neutrophilen	19
2.2.4. Gewinnung von Einzelzellsuspensionen aus Knochenmark und Milz.....	20
2.2.5. Gewinnung von Blutleukozyten	20
2.2.6. Assay zur Quantifizierung der phagozytischen Aktivität von Neutrophilen	20
2.2.7. Lyse von Zellen in Suspension und Gewebe für PCR	21
2.2.8. PCR.....	21
2.2.9. Zell-Lyse für Proteinnachweis mittels Immunoblot.....	21
2.2.10. Nachweis von Proteinen mittels Immunoblot	23
2.2.11. Durchflusszytometrie	25
2.2.12. Statistik	27

3 Ergebnisse	28
3.1 Nachweis des Knockouts von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ in Neutrophilen der <i>LysM</i> -Cre- und der <i>Ly6G</i> -Cre-Mauslinien.....	28
3.1.1. Reinheit der aufgereinigten Neutrophilen	28
3.1.2. Nachweis der Gene <i>Gnai2</i> und <i>Gnai3</i> durch PCR	29
3.1.3. Nachweis der Proteine $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ mittels Immunoblot	36
3.1.4. Nachweis der Expression von tdTomato in Catchup-Mäusen mittels Durchflusszytometrie.....	42
3.2 Zelluläre Zusammensetzung von Milz und Knochenmark in Mäusen der <i>LysM</i> -Cre Mauslinien	44
3.3 Quantifizierung der phagozytischen Aktivität von $G\alpha_i$ -defizienten Neutrophilen	50
4 Diskussion	53
4.1 Nachweis des Knockouts von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ in Neutrophilen der <i>LysM</i> -Cre- und der <i>Ly6G</i> -Cre-Mauslinien.....	53
4.2 Zelluläre Zusammensetzung von Milz und Knochenmark in Mäusen der <i>LysM</i> -Cre Mauslinien	56
4.3 Quantifizierung der phagozytischen Aktivität von $G\alpha_i$ -defizienten Neutrophilen	59
5 Zusammenfassung und Ausblick.....	63
Veröffentlichungen.....	66
Literaturverzeichnis.....	67
Erklärung zum Eigenanteil	72
Danksagung.....	73
Lebenslauf.....	74

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anti-mikrobielle Mechanismen des Neutrophilen Granulozyten	2
Abbildung 2: Funktionsweise eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors.....	6
Abbildung 3: Einsatz des Cre-loxP-Systems zur Erzeugung einer Zelltyp-spezifischen Gendeletion	10
Abbildung 4: Reinheit der isolierten Neutrophilen	29
Abbildung 5: PCR-Analyse von Neutrophilen aus <i>Gnai2^{fl/fl} LysM-Cre</i> und <i>Gnai3^{fl/fl} LysM-Cre</i> Mäusen.....	31
Abbildung 6: PCR-Analyse von Neutrophilen aus <i>Gnai2/i3^{fl/fl} LysM-Cre</i> Mäusen.....	33
Abbildung 7: PCR-Analyse von Neutrophilen aus <i>Gnai2^{fl/fl} LysM-Cre</i> und <i>Gnai3^{fl/fl} Ly6G-Cre</i> Mäusen.....	35
Abbildung 8: Western Blot-Analyse von Neutrophilen aus <i>Gnai2^{fl/fl} LysM-Cre</i> und <i>Gnai3^{fl/fl} LysM-Cre</i> Mäusen.....	37
Abbildung 9: Western Blot-Analyse von Neutrophilen aus <i>Gnai2/i3^{fl/fl} LysM-Cre</i> Mäusen.....	39
Abbildung 10: Western Blot-Analyse von Neutrophilen aus <i>Gnai2^{fl/fl} LysM-Cre</i> und <i>Gnai3^{fl/fl} Ly6G-Cre</i> Mäusen.....	41
Abbildung 11: Expression von Ly6G und tdTomato in <i>Ly6G-Cre</i> -Mäusen.....	43
Abbildung 12: Gatingstrategie zur Quantifizierung von Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen in Milz und Knochenmark.....	46
Abbildung 13: Relative Häufigkeiten von Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen in Milz und Knochenmark.....	47
Abbildung 14: Assay zur Quantifizierung der phagozytischen Aktivität von Neutrophilen	51
Abbildung 15: Quantifizierung der Phagozytose von FluoSpheres durch Neutrophile der <i>LysM-Cre</i> Mauslinien	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PCR-Ansätze	22
Tabelle 2: PCR-Protokolle.....	22
Tabelle 3: PCR-Produkte.....	23
Tabelle 4: FACS-Färbung für Knochenmark- und Milzzellen.....	26
Tabelle 5: Relative Häufigkeiten von Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen in der Milz von k.o.- bzw. transgenen Mäusen und Kontrolltieren.	48
Tabelle 6: Relative Häufigkeiten von Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen im Knochenmark von k.o.- bzw. transgenen Mäusen und Kontrolltieren.....	49
Tabelle 7: Die zelluläre Zusammensetzung von Milz und Knochenmark in dieser Arbeit und in der Literatur.....	57

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CMP	<i>common myeloid progenitors</i>
CXCL1	<i>chemokine C-X-C motif ligand 1</i>
CXCR2/4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2/4
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Elektrochemilumineszenz
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
fMLP	N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin
FPR1/2	<i>formyl peptide receptor 1/2</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
FSH	<i>forward scatter height</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	<i>granulocyte-monocyte progenitors</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i> , G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
ICAM1/2	<i>intercellular adhesion molecule-1/-2</i>
IgG	Immunglobulin G
JAM-A/B/C	<i>junctional adhesion molecule-A/B/C</i>
ki	<i>knock-in</i>
ko	<i>knock-out</i>
LFA1	<i>lymphocyte function associated antigen-1</i>
Ly6G	<i>lymphocyte antigen 6G</i>
LysM	Lysozym M

MAC1	<i>macrophage-1 antigen</i>
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i>
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NET	<i>neutrophil extracellular trap</i>
NOX2	NAPH-Oxidase 2
ns	nicht signifikant
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i> , Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
PTX	Pertussis-Toxin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sig.	Signifikanzniveau
SSC	<i>side scatter</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i> , trisgepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethylenediamine
tg	transgen
VCAM1	<i>vascular adhesion molecule-1</i>
wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten, kurz Neutrophile, sind die häufigsten Immunzellen im Körper und verantwortlich für die Bekämpfung von Mikroben wie Bakterien oder Pilze. Nach ihrer Bildung und Ausreifung im Knochenmark treten Neutrophile in den Blutkreislauf ein, von wo sie im Falle einer Infektion in den Entzündungsherd einwandern können. Im entzündeten Gewebe tragen sie durch die Freisetzung von anti-mikrobiellen Proteinen und reaktiven Sauerstoffspezies, durch Phagozytose, sowie die Bildung sogenannter *neutrophil extracellular traps* zur Beseitigung des Erregers bei.

Im Menschen werden Schätzungen zufolge 1×10^9 Neutrophile pro Tag und Kilogramm Körpergewicht im Knochenmark produziert und in den Blutkreislauf freigesetzt, eine Zahl die sich im Falle einer Infektion auf bis zu 10×10^9 steigern kann (Ley et al., 2018). Die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark zu reifen Neutrophilen verläuft über mehrere Zwischenstadien von gemeinsamen myeloischen Vorläuferzellen (engl. *common myeloid progenitors, CMP*) über Granulozyten-Monozyten Vorläuferzellen (engl. *granulocyte-monocyte progenitors, GMP*) zu dezidierten Neutrophilen-Vorläuferzellen (Ley et al., 2018; Yáñez et al., 2017). Die Freisetzung reifer Neutrophiler aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf wird über Chemokine reguliert, welche von Stromazellen des Knochenmarks gebildet werden, wobei der Verbleib im Knochenmark über den Chemokinrezeptor CXCR4 und die Freisetzung über den Chemokinrezeptor CXCR2 vermittelt wird (Martin et al., 2003). Über die Lebensdauer von Neutrophilen herrscht noch kein endgültiger Konsens; Schätzungen reichen von 1,5 bis 12,5 Stunden in der Maus und von 8 Stunden bis 5,4 Tage im Menschen (Kolaczkowska & Kubes, 2013).

Die Rekrutierung von zirkulierenden Neutrophilen zum Ort einer Entzündung verläuft in mehreren wohldefinierten Schritten. Sie beginnt damit, dass Endothelzellen unter Einfluss von Entzündungsmediatoren die Glykoproteine P- und E-Selektin an ihrer Oberfläche präsentieren, welche durch die Bindung ihrer Liganden wie etwa PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) frei zirkulierende Neutrophile anziehen. Die angelockten Neutrophilen rollen zunächst auf der Endotheloberfläche, vermittelt durch die stetige Auflösung und Neubildung von P-Selektin–PSGL1-Bindungen.

Der enge Kontakt zum Endothel und damit zu Chemokinen, die auf dessen Oberfläche haften, führt über Chemokinrezeptor-vermittelte Signalkaskaden dazu, dass die Integrine LFA1 (*lymphocyte function associated antigen-1*, auch $\alpha_1\beta_2$ bzw. CD11a/CD18) und MAC1 (*macrophage-1 antigen*, auch $\alpha_M\beta_2$ bzw. CD11b/CD18) auf den Neutrophilen in eine bindungsaffine Konformation übergehen. Die Bindung dieser Integrine an die Oberflächenmoleküle ICAM1/2 (*intercellular adhesion molecule-1/-2*) auf dem Endothel führen schließlich zum festen Anhaften der Neutrophilen. Dies ermöglicht die Transmigration genannte Auswanderung der Neutrophilen durch das Endothel und die Basalmembran des Gefäßes in das umliegende Gewebe. Die Transmigration, welche entweder para- oder transzellulär erfolgen kann, hängt maßgeblich von der Bindung von Integrinen auf der Oberfläche der Neutrophilen an die Oberflächenprotein ICAM1/2, VCAM1 (*vascular adhesion molecule-1*) und JAM-A/B/C (*junctional adhesion molecule-A/B/C*) auf dem Endothel ab. Im umliegenden Gewebe angekommen, orientieren sich die Neutrophilen an Gradienten chemoattraktiver Stoffe wie fMLP (N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin) oder die Komplementkomponente C5a, um letztendlich zum Ort der Entzündung zu gelangen (Kolaczowska & Kubes, 2013).

Zur Bekämpfung von Erregern steht Neutrophilen ein Armamentarium an antimikrobiellen Mechanismen zur Verfügung (siehe Abb. 1).

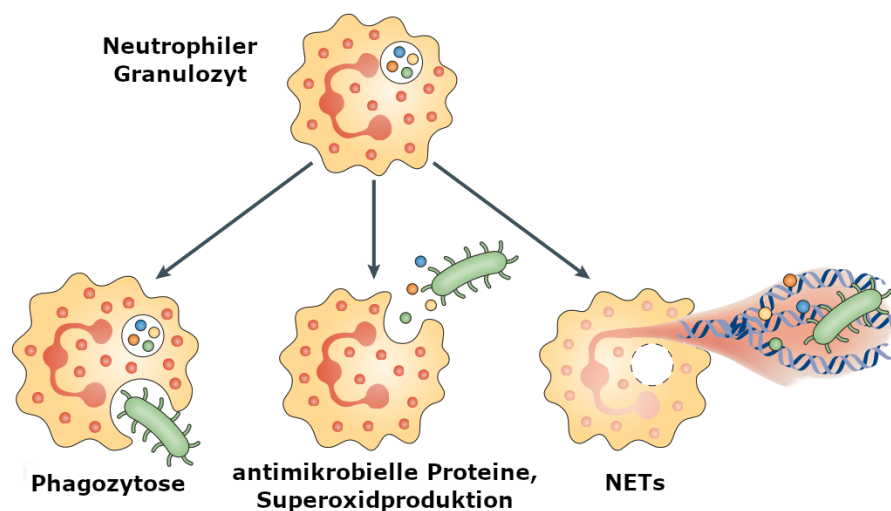


Abbildung 1: Anti-mikrobielle Mechanismen des Neutrophilen Granulozyten. Zur Bekämpfung von Erregern stehen dem Neutrophilen folgende Mechanismen zur Verfügung: Phagozytose des Erregers, Freisetzung von anti-mikrobiellen Proteinen, Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch Superoxidproduktion sowie Freisetzung von neutrophil extracellular traps (NETs). Modifiziert nach (Kolaczowska & Kubes, 2013).

Neutrophile produzieren eine Vielzahl an Proteinen mit toxischen Effekten für Mikroben. Diese, zum Teil auch für den Wirt schädlichen, anti-mikrobiellen Proteine werden im Neutrophilen in spezialisierten Organellen aufbewahrt, welche als Granula bezeichnet werden. Wird der Neutrophile durch äußere Stimuli aktiviert, fusionieren diese Granula mit der Plasmamembran und ihr Inhalt wird in den Extrazellulärraum freigesetzt. Ebenso fusionieren Granula nach der Phagozytose mit dem Phagosom (siehe unten). Die anti-mikrobiellen Proteine des Neutrophilen lassen sich in drei Kategorien einteilen: a) Kationische Peptide und Proteine, die an mikrobielle Membranen binden, b) Enzyme und c) Proteine, welche Mikroorganismen Nährstoffe entziehen (Amulic, Cazalet, Hayes, Metzler, & Zychlinsky, 2012). In der ersten Gruppe sind vor allem die α -Defensine zu nennen, welche die Lipidmembranen von Mikroben durchlässig machen und die bakterielle Zellwandsynthese inhibieren. In der Kategorie der Enzyme ist vor allem Lysozym nennenswert, welches die bakterielle Zellwand angreift, sowie die Serinproteasen Cathepsin G und Neutrophile Elastase, welche zur proteolytischen Spaltung von bakteriellen Virulenzfaktoren fähig sind. Zur dritten Gruppe gehören schließlich Chelatoren wie Lactoferrin und Calprotectin, welche für das bakterielle Wachstum essenzielle Metalle, wie Eisen bzw. Zink und Magnesium binden.

Die Phagozytose, ein Prozess bei dem Partikel von der Plasmamembran einer Immunzelle umschlossen und in einem Phagosom genannten Vesikel in das Zellinnere aufgenommen werden, ist der wichtigste Mechanismus zur Beseitigung von Erregern und Zelltrümmern durch Neutrophile. Die Bindung von opsonierten Erregern an Oberflächenrezeptoren wie Fc-Rezeptoren oder Komplementrezeptoren initiiert über intrazelluläre Signalkaskaden die komplexe Reorganisation des Zytoskeletts, welche zum Umschlingen und der Aufnahme des Erregers durch den Neutrophilen führt. Auch nicht-opsonierte Erreger können über Rezeptoren für Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) erkannt und phagozytiert werden (Underhill & Ozinsky, 2002). In der Folge gelangen durch die Fusion des Phagosoms mit Granula anti-mikrobielle Proteine in die Nähe des phagozytierten Erregers. Gleichzeitig verlagert sich das Enzym NADPH-Oxidase in die Membran des Phagosoms und komplementiert durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies die oben genannten anti-mikrobiellen Proteine in der Erzeugung eines für viele Erreger toxischen Milieus (Amulic et al., 2012).

Die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies durch den NADPH-Oxidase-Enzymkomplex stellt einen weiteren wichtigen anti-mikrobiellen Mechanismus von Neutrophilen dar. In ruhenden Neutrophilen liegen NOX2 und p22phox, die katalytischen Untereinheiten des

NADPH-Oxidase-Komplexes, membrangebunden in intrazellulären Granula vor. Erst durch die Aktivierung des Neutrophilen, und die damit einhergehende Phosphorylierung der koordinierenden Untereinheit p47phox im Zytosol, finden die übrigen Untereinheiten zueinander und der NADPH-Oxidase-Komplex beginnt mit der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (Bedard & Krause, 2007). Durch den Transfer eines Elektrons von NADPH auf O₂ erzeugt die NAPH-Oxidase zunächst Superoxid, welches durch Dismutation zu Wasserstoffperoxid bzw. durch die Reaktion mit Stickstoffmonoxid zu Peroxinitrit umgewandelt wird. Das in Granula des Neutrophilen vorliegende Enzym Myeloperoxidase wiederum produziert unter Verwendung von Wasserstoffperoxid weitere Oxidantien wie Hypochloritionen (Amulic et al., 2012). Indem NAPH-Oxidase enthaltende Granula mit den Phagosomen oder der Plasmamembran des Neutrophilen verschmelzen, gelangen phagozytierte Bakterien bzw. solche, die sich in unmittelbarer Umgebung des Neutrophilen befinden, in Kontakt mit starken Oxidantien. Dies hat die Abtötung der Bakterien oder die Inaktivierung ihrer Virulenzfaktoren zur Folge (Bedard & Krause, 2007).

Ein weiterer Mechanismus zur Bekämpfung von Erregern, die Bildung von *neutrophil extracellular traps* (NETs), wurde erstmals im Jahr 2004 beschrieben (Brinkmann et al., 2004). Hierbei setzen Neutrophile „Fallen“ aus dekondensiertem Chromatin frei, welche dekoriert sind mit Histonen und Proteinen aus Granula und dem Zytoplasma. Diese sind in der Lage, Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten zu binden und so ihre Ausbreitung im Organismus zu verhindern (Ley et al., 2018). Die Bildung von NETs geht häufig mit dem Zelltod des Neutrophilen einher und kann durch verschiedene Mechanismen ausgelöst werden, welche bisher nur unvollständig aufgeklärt sind. Welche Bedeutung NETs, verglichen mit den anderen Abwehrmechanismen von Neutrophilen, für die Bekämpfung von Erregern haben, ist noch nicht abschließend geklärt (Kruger et al., 2015). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass NETs nicht nur für die Bekämpfung von Erregern, sondern auch bei der Entstehung von Krankheiten wie dem Systemischen Lupus erythematodes oder der tiefen Venenthrombose, eine Rolle spielen (Ley et al., 2018).

Neutrophile sind integral für eine effektive Immunabwehr des Körpers. So führt ein starker Mangel an Neutrophilen zu einer deutlich erhöhten Anfälligkeit gegenüber Bakterien und Pilzen (Donadieu, Fenneteau, Beaupain, Mahlaoui, & Chantelot, 2011). Gleiches gilt bei Funktionseinschränkungen der Neutrophilen, wie etwa im Rahmen der Krankheit Septische Granulomatose, bei der eine Genmutation eine Funktionsstörung der NADPH-Oxidase verursacht (Segal, Leto, Gallin, Malech, & Holland, 2000).

Andererseits sind Neutrophile auch an der Entstehung sowohl akuter als auch chronischer entzündlicher Krankheiten beteiligt. Beispielsweise liegt der Gewebsschädigung im Rahmen des Akuten Lungenversagens (*acute respiratory distress syndrome*, ARDS) eine überschießende neutrophile Entzündung zugrunde (Grommes & Soehnlein, 2011). Gleichsam tragen Neutrophile wesentlich zum Ischämie-Reperfusionsschaden bei, einer Gewebsschädigung, welche nach der Wiederherstellung des Blutflusses in eine zeitweise ischämische Region auftritt (Schofield, Woodruff, Halai, Wu, & Cooper, 2013). Versagen die Mechanismen zur Beendigung einer physiologischen Entzündungsreaktion, kann es zur Ausbildung einer chronischen, neutrophilen Entzündung kommen. Zu den Krankheiten, bei denen solch ein chronischer Einstrom von Neutrophilen eine wichtige Rolle spielt, zählen unter anderem Mukoviszidose, Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung, Rheumatoide Arthritis, Nephritis und Systemischer Lupus erythematodes (Amulic et al., 2012; Kruger et al., 2015).

1.2 Heterotrimere G-Proteine

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (*G protein-coupled receptors*, GPCR) bilden eine große und vielfältige Rezeptorfamilie, welche die Zellantworten auf so unterschiedliche Liganden wie Neurotransmitter, Geruchsstoffe, Hormone und Wachstumsfaktoren vermittelt (Weis & Kobilka, 2018). Nach Bindung von Liganden an die GPCR wird das Signal der so aktivierten Rezeptoren über heterotrimere GTP-bindende Proteine (G-Proteine) ins Zellinnere weitergeleitet (siehe Abb. 2). Diese G-Proteine bestehen aus je einer α , β , und γ Untereinheit, wobei die β und γ Untereinheiten fest miteinander verbunden sind und als eine funktionelle $G\beta\gamma$ Einheit betrachtet werden (Syrovatkina, Alegre, Dey, & Huang, 2016). In der nicht aktivierten Form des G-Proteins hat die $G\alpha$ Untereinheit, welche eine GDP/GTP-Bindungsdomäne besitzt, GDP gebunden und ist mit der $G\beta\gamma$ Untereinheit assoziiert. Die Bindung eines Liganden an den GPCR führt zum Austausch von GDP durch GTP an der $G\alpha$ Untereinheit, wodurch es zu einer Dissoziation der $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ Untereinheiten des G-Proteins kommt. Sowohl die GTP-gebundene $G\alpha$ Untereinheit als auch die freie $G\beta\gamma$ Untereinheit vermitteln nun über verschiedene Signalwege die Reaktion der Zelle auf den Stimulus. Die Aktivierung des G-Proteins terminiert sich selbst, indem die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ Untereinheit das

gebundene GTP zu GDP hydrolysiert und damit das erneute Zusammenfinden der $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ Untereinheiten begünstigt.

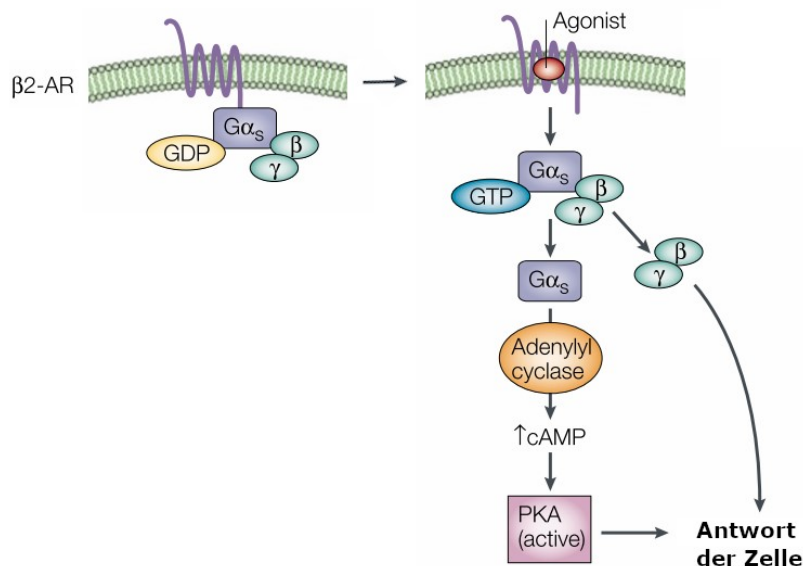


Abbildung 2: Funktionsweise eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (GPCR). Beispielhaft dargestellt ist ein $G\alpha_s$ -gekoppelter β_2 -Adrenozeptor. Durch Bindung des Agonisten an den GPCR kommt es an der $G\alpha$ -Untereinheit zum Austausch von GDP durch GTP. Dies führt zur Dissoziation der $G\alpha$ -Untereinheit und des $G\beta\gamma$ -Dimers; beide vermitteln über verschiedene Signalwege die Antwort der Zelle. Die $G\alpha_s$ -Untereinheit beispielsweise bewirkt über eine Aktivitätssteigerung der Adenylylcyclase einen Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels und damit die Aktivierung der Proteinkinase A. β_2 -AR: β_2 -Adrenozeptor. GDP: Guanosindiphosphat. GTP: Guanosintriphosphat. cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat. PKA: Proteinkinase A. Modifiziert nach (Pierce, Premont, & Lefkowitz, 2002)

Von den $G\alpha$, $G\beta$ und $G\gamma$ Untereinheiten sind jeweils mehrere Subtypen bekannt, die sich darin unterscheiden, über welche Signalwege sie ihre Wirkung auf die Zelle vermitteln (Wettschureck & Offermanns, 2005). Die $G\alpha$ Untereinheiten können anhand ihrer Aminosäure-Sequenz und Funktion in vier Familien eingeteilt werden – $G\alpha_s$, $G\alpha_i/G\alpha_o$, $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ und $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ – deren Effekte auf die Zelle zum Teil gut erforscht sind. So wurden beispielsweise die $G\alpha_s$ und $G\alpha_i$ Subtypen ursprünglich über ihren wohletablierten stimulatorischen bzw. inhibitorischen Effekt auf die Adenylylcyclase definiert. Über diese bekannten Signalwege hinaus wurden eine Vielzahl an Proteinen beschrieben, welche in der Lage sind, mit $G\alpha$ Untereinheiten zu interagieren, deren Bedeutung jedoch bisher noch größtenteils unklar ist (Syrovatkina et al., 2016). Die Benennung der G-Proteine erfolgt anhand des Isotyps ihrer $G\alpha$ -Untereinheit. In der Folge werden G-Proteine mit $G\alpha$ -Untereinheiten des Subtyps $G\alpha_i$ als G_i -Proteine bezeichnet. Soll

zusätzlich die Isoform der $G\alpha$ -Untereinheit des G_i -Proteins spezifiziert werden, wird die Bezeichnung zusätzlich mit dem Index der Isoform versehen (beispielsweise besitzt ein G_{i2} -Protein eine $G\alpha$ -Untereinheit der Isoform $G\alpha_{i2}$).

Die $G\alpha_{i/o}$ -Familie, die größte und vielfältigste Familie von $G\alpha$ -Untereinheiten, besteht aus den Proteinen $G\alpha_{i1}$ - $G\alpha_{i3}$, $G\alpha_o$, $G\alpha_z$, $G\alpha_{gust}$, $G\alpha_{t-r}$ und $G\alpha_{t-c}$. Die drei $G\alpha_i$ -Isoformen, welche 85 – 95 % ihrer Aminosäuresequenz teilen, zeichnen sich durch ihre inhibitorische Wirkung auf die Adenylylcyclase aus (Kaziro, Itoh, Kozasa, Nakafuku, & Satoh, 1991). Durch ihre große strukturelle Ähnlichkeit üben sie zum Teil überlappende Funktionen aus.

Die Erforschung der Funktion der $G\alpha_i$ Proteine beruhte lange auf dem Einsatz des aus dem Bakterium *Bordetella pertussis* stammenden Pertussis-Toxin (PTX), welches durch ADP-Ribosylierung der C-Termini der Untereinheiten $G\alpha_{i1}$ - $G\alpha_{i3}$ sowie $G\alpha_o$ zur Entkopplung der G_i - und G_o -Proteine von ihren Rezeptoren führt. Eine Differenzierung der Funktionen der einzelnen $G\alpha_i$ -Isoformen war so nicht möglich (Wettschreck & Offermanns, 2005). Eine Methode zur Untersuchung der spezifischen Funktion der verschiedenen G_i -Proteine stellt die Erzeugung genveränderter Mäuse mit Knockouts für $G\alpha_i$ -Untereinheiten einer oder mehrerer Isoformen dar. Da so die Bildung der entsprechenden G_i -Proteine ganz verhindert wird, werden sowohl $G\alpha$ - als auch $G\beta\gamma$ -abhängige Effekte des G_i -Proteins unterdrückt. Mittels dieser Methode konnte einerseits gezeigt werden, dass die verschiedenen Isoformen in ihrer Funktion teilweise überlappen. So versterben $G\alpha_{i2}/G\alpha_{i3}$ -doppeldefiziente Tiere bereits im Embryonalstadium während $G\alpha_{i2}$ - oder $G\alpha_{i3}$ -(einfach-)defiziente Tiere lebensfähig sind (Gohla et al., 2007). Andererseits gibt es, wie in (Beer-Hammer et al., 2018) dargestellt, zahlreiche Hinweise darauf, dass die verschiedenen G_i -Proteine auch spezifische Funktionen besitzen. Beispielsweise wiesen ausschließlich $G\alpha_{i3}$ -defiziente Tiere Störungen der autophagischen Leberproteolyse (Gohla et al., 2007), der Entwicklung des Achsenskeletts (Plummer et al., 2012) und der Zellpolarität in cochleären Haarzellen auf (Ezan et al., 2013). Störungen des Muskelwachstums (Minetti et al., 2014), der Thrombusbildung (Jantzen, Milstone, Gousset, Conley, & Mortensen, 2001) und der Zellmigration von Makrophagen (K. Wiege et al., 2012) konnten hingegen ausschließlich in $G\alpha_{i2}$ -defizienten Tieren nachgewiesen werden.

G_i -Proteine werden in weiten Teilen des Körpers exprimiert und ihre Beteiligung unter anderem an Funktionen des kardiovaskulären Systems, des Hormonsystems, des

Nervensystem und des Immunsystems sind bekannt (Wettschureck & Offermanns, 2005). Im Immunsystem sind vornehmlich die Isoformen $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ nachweisbar, wobei in murinen Leukozyten $G\alpha_{i2}$ etwa 3–10-fach stärker exprimiert wird als $G\alpha_{i3}$. In der Maus weisen Neutrophile das höchste Expressionsniveau von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ aller Leukozyten auf (Kehrl, 2016).

1.3 Die Bedeutung von G_i -Proteinen in Neutrophilen

Einige wichtige Funktionen von Neutrophilen wie die Chemotaxis, Zellmigration, Superoxidproduktion und Phagozytose sind abhängig von G_i -Proteinen. Hierbei spielen sowohl die Effekte der $G\alpha_i$ - als auch der $G\beta\gamma$ -Untereinheiten eine Rolle.

So koppeln die Rezeptoren für formylierte Peptide FPR1/2 (*formyl peptide receptor 1/2*), deren Aktivierung in Neutrophilen Chemotaxis, Superoxidproduktion und Phagozytose stimuliert, an G_i -Proteine (Iizawa, Akamatsu, & Niwa, 1995; Ogle, Noel, Sramkoski, Ogle, & Alexander, 1990; Ye, Boulay, Wang, & Dahlgren, 2009). Gleichermäßen ist die Stimulation von Chemotaxis, Superoxidproduktion und Phagozytose über den Rezeptor für den Komplementfaktor C5a (C5aR) abhängig von G_i -Proteinen (Guo & Ward, 2005; Monk, Scola, Madala, & Fairlie, 2007). Auch Chemokine wie CXCL1 (*chemokine C-X-C motif ligand 1*) vermitteln ihre chemotaktische Wirkung auf Neutrophile über G_i -gekoppelte Rezeptoren (Baggiolini, Dewald, & Moser, 1997).

Wie oben erwähnt, übernehmen die im Neutrophilen am häufigsten vorkommenden G_i -Protein-Isoformen, G_{i2} und G_{i3} , zum Teil spezifische Funktionen. In Versuchen mit Neutrophilen aus $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -Knockoutmäusen war etwa die C5a-stimulierte Transmigration der Neutrophilen von $G\alpha_{i2}$, jedoch nicht von $G\alpha_{i3}$, abhängig, die CXCL1-stimulierte Transmigration hingegen war von $G\alpha_{i3}$ abhängig und benötigte kein $G\alpha_{i2}$ (Kuwano, Adler, Zhang, Groisman, & Ley, 2016; Kristina Wiege et al., 2013). In Versuchen mit murinen Knochenmarks-Chimären waren $G\alpha_{i2}$ -defiziente Neutrophile in ihrer Auswanderung in Entzündungsherde gestört. Dies konnte auf einen Defekt im Schritt des Arretierens an das Endothel (engl. *arrest*) im Rahmen der Auswanderung aus dem Gefäß zurückgeführt werden (Zarbock, Deem, Burcin, & Ley, 2007). Schließlich zeigten in einem murinen Wundheilungsmodell $G\alpha_{i2}$ -defiziente Neutrophile, aber nicht $G\alpha_{i3}$ -defiziente Neutrophile, eine gestörte interstitielle Chemotaxis (Lämmermann et al., 2013).

Welchen Anteil jeweils die $G\alpha$ - und $G\beta\gamma$ -Untereinheiten an den genannten Funktionen der verschiedenen G_i -Proteine haben, ist weitgehend unbekannt. Jedoch scheint die über G_i -Proteine stimulierte Chemotaxis in erster Linie durch $G\beta\gamma$ -abhängige Signalwege vermittelt zu werden (Surve, Lehmann, & Smrcka, 2014). Zunehmend werden allerdings auch direkte Interaktionspartner der $G\alpha_i$ -Untereinheiten entdeckt, wie etwa Homer3 und ELMO1/Dock180, welche eine Rolle in der Organisation der Aktin-Polymerisierung im Rahmen der Zellmigration spielen (Kamp, Liu, & Kortholt, 2016).

1.4 Das Cre-loxP-System

Durch den Einsatz des Cre-loxP-Systems ist es möglich, Versuchstiere mit einer Zelltyp-spezifischen Gendeletion zu generieren (siehe Abb. 3). Das ursprünglich aus dem Bakteriophagen P1 stammende Enzym Cre-Rekombinase katalysiert eine sequenzspezifische Rekombination von DNA zwischen zwei sogenannten loxP-Stellen (Sternberg & Hamilton, 1981). Um ein bestimmtes Gen X mithilfe des Cre-loxP-Systems zu deletieren, wird vor und hinter den zu deletierenden Abschnitt des Genoms eine loxP-Stelle eingebracht, um eine sogenannte „geflochte“ Mauslinie zu erzeugen. In der Folge bezeichnet $GenX^{fl/fl}$ die homozygot geflochte und $GenX^{fl/+}$ die heterozygot geflochte Mauslinie. Das Einfügen der loxP-Stellen in das Genom kann z.B. durch *Gene Targeting* geschehen, also durch das Einbringen von Fremd-DNA in das Genom *via* homologe Rekombination. Zusätzlich muss das Cre-Rekombinase-Gen, entweder in Verbindung mit einem Promotor, oder als Knock-in unmittelbar *downstream* eines bestehenden Promotors, in das Genom einer zweiten Mauslinie eingebracht werden (in der Folge bezeichnet als Cre^+ Mauslinie). Dieses Transgen führt dazu, dass die Cre-Rekombinase nur in solchen Zellen transkribiert wird, in denen der Promotor aktiv ist. Durch die Kreuzung der $GenX^{fl/fl}$ Mauslinie mit der Cre^+ Mauslinie wird zunächst eine $GenX^{fl/+} Cre^+$ Maus und durch erneute Kreuzung mit der $GenX^{fl/fl}$ Mauslinie schließlich eine $GenX^{fl/fl} Cre^+$ Maus generiert, in welcher beide Allele des Zielgens in den durch den Promotor spezifizierten Zellen deletiert werden.

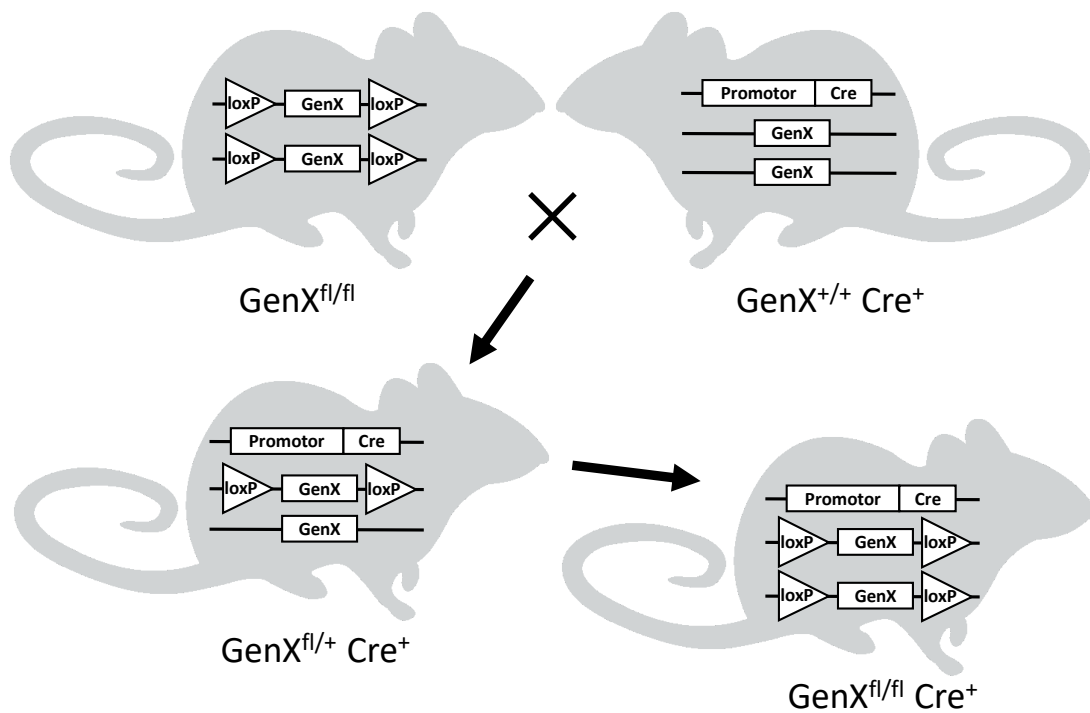


Abbildung 3: Einsatz des Cre-loxP-Systems zur Erzeugung einer Zelltyp-spezifischen Gendelektion. Durch Kreuzung einer homozygot „geflochten“ $GenX^{fl/fl}$ Mauslinie (oben links), d.h. einer Mauslinie in welcher $loxP$ -Stellen vor und nach dem zu deletierenden Gen X eingefügt wurden, mit einer Cre-transgenen Cre^+ Mauslinie, in deren Genom ein Transgen bestehend aus Promotor und Cre-cDNA eingefügt wurde (oben rechts), entsteht in erster Generation eine Cre-transgene, heterozygot „geflochte“ $GenX^{fl/+} Cre^+$ Maus (links unten). Durch erneute Kreuzung mit der $GenX^{fl/fl}$ Mauslinie entstehen schließlich $GenX^{fl/fl} Cre^+$ Mäuse (rechts unten). In letzteren Tieren führt die durch den Promotor kontrollierte Transkription der Cre-Rekombinase zu einer vollständigen, Zelltyp-spezifischen Deletion des geflochtenen Gen X . Modifiziert nach <https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2011/september/cre-lox-breeding>

Zur möglichst spezifischen Deletion von Genen in neutrophilen Granulozyten wurden in dieser Arbeit zwei Mauslinien, die *LysM*-Cre Mauslinie und die *Ly6G*-Cre-Mauslinie, verwendet. Das *LysM*-Gen der Maus kodiert für das anti-mikrobielle Enzym Lysozym und wird spezifisch in myeloischen Zellen exprimiert (Cross & Renkawitz, 1990). In der *LysM*-Cre Mauslinie wird die Cre-Rekombinase daher vor allem in Neutrophilen und Makrophagen und in geringerem Maße auch in dendritischen Zellen exprimiert (Clausen, Burkhardt, Reith, Renkawitz, & Förster, 1999). Das *Ly6G*-Gen hingegen kodiert für das Oberflächenprotein Ly6G, dessen Funktion noch nicht hinreichend geklärt ist, und wird ausschließlich in Neutrophilen exprimiert (Becher et al., 2014). Die *Ly6G*-Cre („Catchup“) Mauslinie ermöglicht also die Neutrophilen-spezifische Deletion gefloxter

Gene (Hasenberg et al., 2015). Zusätzlich zur Cre-Rekombinase kodiert das Transgen dieser Mauslinie für das fluoreszierende Protein tdTomato, anhand dessen die Neutrophilen mit dem Fluoreszenzmikroskop oder Durchflusszytometer identifiziert werden können.

1.5 Ziel dieser Arbeit

Neutrophile Granulozyten sind ein integraler Teil des angeborenen Immunsystems und tragen über verschiedene anti-mikrobielle Mechanismen zur effektiven Abwehr von Mikroben wie Bakterien und Pilze bei. Ihrer unverzichtbaren Rolle in der Immunabwehr zum Trotz sind Neutrophile jedoch auch an der Entstehung akuter und chronischer Krankheiten beteiligt.

Die Signalweiterleitung von aktivierten G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in die Zelle erfolgt über G-Proteine, welche durch ihre $G\alpha$ -Untereinheiten charakterisiert werden. In Neutrophilen Granulozyten sind die Isoformen G_{i2} und G_{i3} am stärksten vertreten und spielen unter anderem für Chemotaxis, Transmigration, Superoxidproduktion und Phagozytose eine zentrale Rolle. Welche spezifische Funktion den Isoformen G_{i2} und G_{i3} dabei jeweils zukommt, ist bisher jedoch weitgehend unbekannt.

Um den Beitrag der einzelnen Isoformen G_{i2} und G_{i3} zu den Funktionen der Neutrophilen Granulozyten sowie der Entstehung von Neutrophilen-assoziierten Erkrankungen sowohl *ex vivo* als auch *in vivo* untersuchen zu können, wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sandra Beer-Hammer mithilfe des Cre-loxP-Systems Mauslinien mit einem Neutrophilen-spezifischen Knockout von $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$ oder beiden Isoformen erzeugt. Hierbei wurden die gut etablierte *LysM-Cre* Mauslinie und die neu generierte, als spezifischer beschriebene, *Ly6G-Cre* Mauslinie parallel erprobt.

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, die Effektivität der Deletion der Zielgene *Gnai2* und/oder *Gnai3* bzw. des Knockouts der entsprechenden Proteine $G\alpha_{i2}$ und/oder $G\alpha_{i3}$ in den neuen Mauslinien *Gnai2^{fl/fl} LysM-Cre*, *Gnai3^{fl/fl} LysM-Cre*, *Gnai2^{fl/fl} Gnai3^{fl/fl} LysM-Cre* sowie *Gnai2^{fl/fl} Ly6G-Cre* und *Gnai3^{fl/fl} Ly6G-Cre* zu ermitteln. Hierfür sollten Neutrophile aus diesen Mäusen isoliert und 1.) *via* PCR auf das Vorhandensein der Gene *Gnai2* bzw. *Gnai3* sowie 2.) *via* Western Blot auf das Vorhandensein der Proteine $G\alpha_{i2}$ bzw. $G\alpha_{i3}$ überprüft werden.

Weiterhin sollte für die genannten Mauslinien überprüft werden, ob der Neutrophilenspezifische Knockout von $G\alpha_{i2}$ und/oder $G\alpha_{i3}$ Einfluss auf die Ausreifung der Zellen im Knochenmark oder deren Verteilung im Körper hat. Hierfür sollte in den untersuchten Mauslinien die Zusammensetzung von Knochenmark und Milz mithilfe von Durchflusszytometrie analysiert werden.

Schließlich sollte der jeweilige Beitrag der Isoformen $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ zur Phagozytose von Neutrophilen ermittelt werden. Hierfür sollte in einem funktionellen *ex vivo* Assay die Phagozytose von Latexpartikeln durch $G\alpha_{i2}$ und/oder $G\alpha_{i3}$ -defiziente Neutrophile quantifiziert werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1. Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Acrylamid 30%	Carl Roth (Karlsruhe)
Acrylamid 40%	Carl Roth (Karlsruhe)
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
fMLP (N-Formyl-Met-Leu-Phe)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe)
Lämmli-Puffer <i>RotiLoad 1</i>	Carl Roth (Karlsruhe)
Methanol	VWR (Leuven, Belgien)
Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	VWR (Leuven, Belgien)
Natriumazid	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumcitrat dihydrat	Merck (Darmstadt)
PBS ⁺ (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
PBS ⁻ (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline. Modified, without CaCl ₂ and MgCl ₂)	Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
Pentobarbital	Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
PMSF (Phenylmethylsulfonylflurid)	Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth (Karlsruhe)

TEMED (Tetramethylethylenediamine)	Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
Thioglycolat-Medium	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
Tris (Tris-hydroxymethyl-aminomethan)	Carl Roth (Karlsruhe)
Tween 20	Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
Urea	Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)

2.1.2. Reagenzien, Kits und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
BD <i>CellFix</i>	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
Direct PCR	Viagen (Los Angeles, CA, USA)
ECL-Lösung <i>Weststar Supernova</i>	Cyanagen (Bologna, Italien)
<i>FluoSpheres</i> carboxylate (1.0 µm, yellow-green)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
<i>LIVE/DEAD Violet Fixable Dead Cell Stain Kit</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
MACS MS Säulen	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
MACS Neutrophil Isolation Kit	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
Multiplex PCR Master Mix	Qiagen (Hilden)
<i>Precision Plus</i> Proteinstandard	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
PVDF-Membran	Merck Millipore (Burlington, MA, USA)
Strippinglösung <i>Re-blot Plus mild</i>	Merck Millipore (Burlington, MA, USA)
TopTaq PCR Master Mix	Qiagen (Hilden)

2.1.3. Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Anodenpuffer I	37,4 g Tris, 400 ml Methanol, 600 ml Aqua bidest
Anodenpuffer II	3,02 g Tris, 400 ml Methanol, 600 ml Aqua bidest
Antikörperpuffer	5 % BSA, 0,05 % Natriumazid, Aqua bidest
DNA-Lysepuffer	50 µg/ml Proteinase K in <i>DirectPCR</i>
Kathodenpuffer	3,02 g Tris, 3,00 g Glycin, 100 ml Methanol, 900 ml Aqua bidest
Laufpuffer	25 mM Tris, 200 mM Glycin, 1 % SDS, Aqua bidest
MACS-Puffer	0,5 % BSA, 2,5 mM EDTA, PBS ⁻
Proteinlysepuffer	21 mM Tris, 0,67 % SDS, 19 mg/ml 2-Mercaptoethanol, 0,4 mM PMSF, Aqua bidest
Sammelgel	1 ml Acrylamid (30 %), 9 ml Sammelgelpuffer (s.u.), 10 µl TEMED, 70 µl APS (125 mg/ml)
Sammelgelpuffer	125 mM Tris, 0,1 % SDS, Aqua bidest. Mit HCl auf pH 6,8 einstellen.
TBS-T	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20
Trenngel	9 ml Acrylamid (40 %), 5 ml Trenngelpuffer (s.u.), 14,4 g Urea, 14 ml Aqua bidest, 10 µl TEMED, 80 µl APS (125 mg/ml)
Trenngelpuffer	3 M Tris, 0,8 % SDS, Aqua bidest. Mit HCl auf pH 8,8 einstellen.

2.1.4. Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper

Antigen	Fluorochrom	Herkunft (Spezies)	Klon	Hersteller
CD11b	PE-Cy7	Ratte	M1/70	BD Pharmingen (San Diego, CA, USA)
CD11b	PerCP-Cy5.5	Ratte	M1/70	eBioscience (San Diego, CA, USA)
CD16/32	–	Ratte	93	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD19	BB700	Ratte	1D3	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
CD41	FITC	Ratte	MWReg30	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD45	APC	Ratte	30-F11	BD Pharmingen (San Diego, CA, USA)
CD90.2	APC	Ratte	53-2.1	BD Pharmingen (San Diego, CA, USA)
F4/80	FITC	Ratte	BM8	Biolegend (San Diego, CA, USA)
Ly6G	APC	Ratte	1A8	BD Pharmingen (San Diego, CA, USA)
Ly6G	BV510	Ratte	1A8	Biolegend (San Diego, CA, USA)
Ly6G	PE	Ratte	1A8	BD Pharmingen (San Diego, CA, USA)

2.1.5. PCR-Primer

Gen	Bezeichnung	Sequenz
<i>Gnai2</i>	Primer 22	5' GGC TAT GAT CCC AAA ACT CCC CG 3'
<i>Gnai2</i>	Primer 23	5' GGA GCC TGG ACT TTG CTT CTG ACC 3'
<i>Gnai2</i>	Primer 24	5' GTG GTA AGC CTG TGT TTG TGA GAG 3'
<i>Gnai3</i>	Int-F	5' TAG CAG TTG TCA TGG CTA CC 3'

<i>Gnai3</i>	EX7-R	5' ATG CTG TCA AAC AAT TTC ATG 3'
<i>Ly6G-Cre</i>	Ly6G_WT_for	5' GGT TTT ATC TGT GCA GCC C 3'
<i>Ly6G-Cre</i>	Ly6G_rev	5' GAG GTC CAA GAG ACT TTC TGG 3'
<i>Ly6G-Cre</i>	Ly6G_ki_for	5' ACG TCC AGA CAC AGC ATA GG 3'
<i>LysM-Cre</i>	wt+ko	5' CTT GGG CTG CCA GAA TTT CTC 3'
<i>LysM-Cre</i>	wt	5' TTA CAG TCG GCC AGG CTG AC 3'
<i>LysM-Cre</i>	ko	5' CCC AGA AAT GCC AGA TTA CG 3'

2.1.6. Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Blottingkammer <i>Semi-Dry Blotter MAXI</i>	Carl Roth (Karlsruhe)
Durchflusszytometer <i>FACS Canto II</i>	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
Elektrophoresekammer <i>Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell</i>	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Kamerasystem <i>Versadoc 4000 MP Imager</i>	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Gießvorrichtung <i>Mini-Protean Handcast System</i>	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Netzteil <i>PowerPac Basic</i>	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Kapillarelektrophorese-System <i>QIAxcel</i>	Qiagen (Hilden)
Thermocycler <i>C1000 Touch</i>	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)

2.2 Methoden

2.2.1. Versuchstiere

Die *Gnai2*^{-/-} Mäuse (Rudolph et al., 1995) und die *Gnai3*^{-/-} Mäuse (Jiang et al., 2002) sowie die *Gnai2*^{fl/fl} Mäuse (Plummer et al., 2012) wurden von Lutz Birnbaumer bezogen (Comparative Medicine Branch des National Institute of Environmental Health Sciences, Durham, NC, USA). Die *Gnai3*^{fl/fl} Mäuse wurden bereits in (Beer-Hammer et al., 2018) beschrieben. Die *LysM*-Cre Mäuse (Clausen et al., 1999) wurden bei *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, USA) auf einem C57BL/6N Hintergrund erworben. Die *Ly6G*-Cre (*Catchup*) Mäuse (Hasenberg et al., 2015) wurden freundlicherweise von Mathias Gunzer zur Verfügung gestellt (Institut für Experimentelle Immunologie und Bildgebung, Universitätsklinikum Essen).

Zur Erzeugung der *Gnai2*^{fl/fl} *Gnai3*^{fl/fl} Mäuse wurden *Gnai2*^{fl/fl} Tiere mit *Gnai3*^{fl/fl} Tieren gekreuzt. Zur spezifischen Deletion von *Gnai2*, *Gnai3*, oder *Gnai2* und *Gnai3* in Granulozyten/Makrophagen wurden *Gnai2*^{fl/fl} bzw. *Gnai3*^{fl/fl} bzw. *Gnai2*^{fl/fl} *Gnai3*^{fl/fl} Mäuse mit *LysM*-Cre Mäusen gekreuzt. Zur spezifischen Deletion von *Gnai2* oder *Gnai3* in Neutrophilen wurden *Gnai2*^{fl/fl} oder *Gnai3*^{fl/fl} Mäuse mit *Ly6G*-Cre (*Catchup*) Mäusen gekreuzt. Der Übersichtlichkeit halber wurden in dieser Arbeit *Gnai2*^{fl/fl} *Gnai3*^{fl/fl} Mäuse als *Gnai2/i3*^{fl/fl} Mäuse bezeichnet. Kontrolltiere wurden als *LysM*-Cre^{+/+} bzw. *Ly6G*-Cre^{+/+} oder Cre⁻-Mäuse bezeichnet. Die transgenen Mäuse der *LysM*-Cre Mauslinien wurden als *LysM*-Cre^{tg/+} oder Cre⁺-Mäuse bezeichnet. Die Knock-in-Mäuse der *Ly6G*-Cre Mauslinien wurden als *Ly6G*-Cre^{ki/+} oder Cre⁺-Mäuse bezeichnet. Mäuse, die homozygot für das *Ly6G*-Cre Knock-in-Allel waren, wurden als *Ly6G*-Cre^{ki/ki} Mäuse bezeichnet. Die Mäuse wurden mit Ohrlochung markiert. Das so gewonnene Material diente der Genotypisierung der Versuchstiere. Nach Organentnahme erfolgte die Nachgenotypisierung anhand einer Schwanzprobe.

Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Aktenzeichen: AZ vom 08.04.2014; Genehmigungen: PH6/18G, PH 3/19M) und erfolgten unter Einhaltung der EU-Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere.

2.2.2. Gewinnung von Neutrophilen durch Thioglycolat-induzierte Peritonitis

Zur Erzeugung einer sterilen Peritonitis bei den Versuchstieren erfolgte zunächst die intraperitoneale Injektion von 0,8 ml einer 3,85 %-igen Thioglycolat-Lösung. Nach 4 h wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation unter tiefer Isofluran-Narkose getötet. Das Peritoneum wurde mit 10 ml eiskaltem PBS gespült. Die Lavage wurde anschließend zentrifugiert und der Überstand aspiriert. Zur Lyse der Erythrozyten wurde das Zellpellet in 3 ml zimmerwarmem Erythrozyten-Lysepuffer (siehe Abschnitt 2.1.3) resuspendiert. Nach 3 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml eiskaltem PBS abgestoppt, die Probe erneut zentrifugiert, der Überstand aspiriert und das Zellpellet in kaltem PBS resuspendiert. Mit einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt. Die Reinheit der Proben wurde im Durchflusszytometer überprüft.

2.2.3. Immunomagnetische Aufreinigung von Neutrophilen

Die durch Peritoneallavage gewonnenen Neutrophilen wurden durch immunomagnetische Zellsortierung weiter aufgereinigt. Hierfür wurde das MACS-System der Firma Miltenyi (Bergisch Gladbach) mit dem *MACS Neutrophil Isolation Kit* entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die Proben wurden in 200 µl MACS-Puffer (siehe Abschnitt 2.1.3) resuspendiert und 50 µl des *Neutrophil Biotin-Antibody Cocktail* hinzugefügt. Nach 10 Minuten Inkubation bei 4 °C wurden die Proben mit MACS-Puffer gewaschen, in 400 µl MACS-Puffer resuspendiert und es wurden 100 µl *Anti-Biotin MicroBeads* hinzugegeben. Nach 15 min Inkubation bei 4 °C wurden die Proben in MACS-Puffer gewaschen und in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. MACS MS-Säulen wurden in den MACS Magneten platziert, mit MACS-Puffer gespült und die Zellsuspensionen wurden auf die Säulen gegeben. Die aufgereinigten Neutrophilen im Durchlauf wurden in einem Reagiergefäß auf Eis aufgefangen. Die so isolierten Neutrophilen wurden schließlich mit PBS⁻ gewaschen, in PBS⁻ resuspendiert und mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Reinheit der Proben wurde im Durchflusszytometer überprüft.

2.2.4. Gewinnung von Einzelzellsuspensionen aus Knochenmark und Milz

Die Versuchstiere wurden mittels zervikaler Dislokation unter tiefer Isofluran-Narkose getötet und Femur und Milz wurden entnommen. Zur Gewinnung einer Einzelzellsuspension aus Knochenmarkzellen wurde je ein Femur mithilfe einer Kanüle mit PBS⁻ ausgespült. Zur Gewinnung einer Einzelzellsuspension aus Splenozyten wurde die Milz durch ein 70 µm Zellsieb gedrückt und in PBS⁻ suspendiert. Beide Zellsuspensionen wurden abzentrifugiert und eine Lyse der Erythrozyten wurde mittels Erythrozyten-Lysepuffer (siehe Abschnitt 2.1.3) durchgeführt. Die Zellen wurden abermals in PBS⁻ resuspendiert und die Zellkonzentration wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.2.5. Gewinnung von Blutleukozyten

Zur Blutentnahme wurden die Mäuse mit Pentobarbital in eine tiefe Narkose versetzt. In eine 1 ml Spritze mit 200 µl einer 3,2 %-igen Citratlösung wurden mit einer 25G-Kanüle 600 – 800 µL Blut aus der *Vena cava inferior* abgenommen und direkt in ein 50 ml Reagiergefäß mit 1 ml einer 3,2 %-igen Citratlösung gegeben. Zur Lyse der Erythrozyten wurden 10 ml 37 °C-warmer Erythrozyten-Lysepuffer (siehe Abschnitt 2.1.3) zugegeben. Sobald die Proben optisch klar erschienen, wurden sie mit eiskaltem PBS aufgefüllt und abzentrifugiert. Diese Zellpellets wurden in 3 ml warmem Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und nach 3 min mit 10 ml kaltem PBS⁻ vermischt und abzentrifugiert. Schließlich wurden die Zellpellets in kaltem PBS⁻ resuspendiert. Die Zellkonzentration der Zellsuspensionen wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.2.6. Assay zur Quantifizierung der phagozytischen Aktivität von Neutrophilen

Je $1,5 \times 10^5$ Blutleukozyten wurden in FACS-Tubes gegeben, abzentrifugiert, in PBS⁺ oder 1 µM fMLP in PBS⁺ resuspendiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden mit kaltem PBS⁺ gewaschen, in 150 µL 1,0 µm *FluoSpheres* (1×10^7 Beads/ml in PBS⁺) resuspendiert, für 1 min bei $100 \times g$ zentrifugiert und anschließend für 15, 30, 45 oder 60 min bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle verblieb je Maus eine Probe für 60 min auf Eis. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Proben mit 5 % BSA in PBS⁻ aufgefüllt und bis zum Ende der Inkubationszeiten auf Eis platziert. Nach zweimaligem Waschen der Proben mit 5 % BSA in PBS⁻ wurden die Zellen in einem

Antikörpermix gefärbt (siehe Abschnitt 2.2.11). Die Proben wurden ein drittes Mal mit 5 % BSA in PBS⁻ gewaschen, in *BD CellFix* resuspendiert und im Durchflusszytometer gemessen.

2.2.7. Lyse von Zellen in Suspension und Gewebe für PCR

Für den späteren PCR-Nachweis spezifischer Gensequenzen in Zellen in Suspension wurden mindestens 3×10^5 Zellen in einer Konzentration von 5×10^6 /ml in DNA-Lysepuffer (siehe Abschnitt 2.1.3) resuspendiert, für 30 min auf 55 °C und anschließend für 45 min auf 85 °C erhitzt. Für die Gewinnung genomischer DNA aus Ohrstanzen und Schwanzproben für die Genotypisierung bzw. Nachgenotypisierung von Mäusen wurden die Gewebeproben in 150 µl DNA-Lysepuffer für 6 h auf 55 °C und für weitere 45 min auf 85°C erhitzt. Bis zur Verwendung wurden die Lysate bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.8. PCR

Der Nachweis spezifischer Gensequenzen in den DNA-Lysaten erfolgte mittels PCR unter Verwendung spezifischer Primer (siehe Abschnitt 2.1.5). Hierfür wurden die DNA-Lysate zu einem PCR-Ansatz aus Mastermix und Primern hinzugegeben (siehe Tab. 1). Die PCR wurde in einem Thermocycler nach dem entsprechenden Protokoll (Tab. 2) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden anschließend mithilfe des *QiAxcel* Kapillarelektrophorese-Systems analysiert. Für die Gene *Gnai2* und *Gnai3* ermöglichte die PCR den gleichzeitigen Nachweis von Wildtyp-Allel (wt), gefloxtem Allel (flox), und Knock-out-Allel (ko). Für *Ly6G-Cre* und *LysM-Cre* konnten Wildtyp-Allel (wt) und knock-in (ki) bzw. das transgene Allel (tg) nachgewiesen werden (siehe Tab. 3).

2.2.9. Zell-Lyse für Proteinnachweis mittels Immunoblot

Zum späteren Nachweis von Proteinen mittels Immunoblot wurden 20×10^6 Zellen/ml in kaltem Proteinlysepuffer (siehe Abschnitt 2.1.3) resuspendiert, für 10 min auf 95 °C erhitzt und sofort bei -20 °C eingefroren.

Tabelle 1: PCR-Ansätze

Ansatz	Zusammensetzung
<i>Gnai2-a</i>	12,5 µl <i>TopTaq</i> Mastermix, 0,5 µl Primer 22 (10 µM), 0,5 µl Primer 23 (10 µM), 11,0 µl H ₂ O, 0,5 µl DNA-Lysat
<i>Gnai2-b</i>	12,5 µl <i>TopTaq</i> Mastermix, 0,5 µl Primer 22 (10 pM), 0,5 µl Primer 24 (10 pM), 10,5 µl H ₂ O, 1,0 µl DNA-Lysat
<i>Gnai3</i>	12,5 µl <i>TopTaq</i> Mastermix, 0,5 µl Primer EX7-R (10 pM), 0,5 µl Primer Int-F (10 pM), 10,5 µl H ₂ O, 1,0 µl DNA-Lysat
<i>LysM-Cre</i> ^{+tg}	12,5 µl Multiplex PCR Mastermix, 0,5 µl Primer wt+ko (10 pM), 0,5 µl Primer wt (10 pM), 0,5 µl Primer (ko) 10 pM, 10,0 µl H ₂ O, 1,0 µl DNA-Lysat
<i>Ly6G-Cre</i> ^{+ki}	12,5 µl Multiplex PCR Mastermix, 0,25 µl Ly6G_WT for (10 µM), 0,25 µl Ly6G_rev (10 µM), 0,25 µl Ly6G_ki for (10 µM), 10,75 µl H ₂ O, 1,0 µl DNA-Lysat

Tabelle 2: PCR-Protokolle

Ansatz	Protokoll
<i>Gnai2-a</i> / <i>Gnai3</i>	3 min bei 94 °C 34 × (30 s bei 94 °C, 30 s bei 60 °C, 60 s bei 72 °C) 10 min bei 72 °C
<i>Gnai2-b</i>	15 min bei 94 °C 34 × (3 min bei 94 °C, 90 s bei 60 °C, 2 min bei 72 °C) 10 min bei 72 °C
<i>LysM-Cre</i>	15 min bei 95 °C 34 × (30 s bei 94 °C, 90 s bei 64 °C, 1 min bei 72 °C) 10 min bei 72 °C

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 2 (Fortsetzung):

Ansatz	Protokoll
<i>Ly6G-Cre</i>	3 min bei 94 °C 34 × (30 s bei 94 °C, 30 s bei 60 °C, 1 min bei 72 °C) 10 min bei 72 °C

Tabelle 3: PCR-Produkte

Ansatz	PCR-Produkte (Länge)
<i>Gnai2-a</i>	wt (400 bp), flox (500 bp)
<i>Gnai2-b</i>	ko (420 bp), wt (2200 bp), flox (2300 bp)
<i>Gnai3</i>	ko (450 bp), wt (800 bp), flox (836 bp)
<i>LysM-Cre</i>	wt (350 bp), tg (700 bp)
<i>Ly6G-Cre</i>	wt (324 bp), ki (373 bp)

2.2.10. Nachweis von Proteinen mittels Immunoblot

Zum Nachweis inhibitorischer G-Proteine in Proteinlysaten wurden die Lysate in harnstoffhaltigen Acrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membranen übertragen. Die Bindung spezifischer Antikörper an Proteine auf den Membranen wurde mittels einer Enzym-gekoppelten Chemolumineszenzreaktion sichtbar gemacht.

Gießen von harnstoffhaltigen Acrylamidgelen

Die harnstoffhaltigen Acrylamidgele wurden unter Verwendung des *Mini-Protean Handcast System* handgegossen. Hierfür wurde das Trenngel (siehe Abschnitt 2.1.3), bestehend aus Acrylamid, Trenngelpuffer (siehe Abschnitt 2.1.3) und Harnstoff, mit TEMED und APS zur Polymerisation gebracht und in eine Form mit 1,5 mm Dicke gegossen. Das Sammelgel (siehe Abschnitt 2.1.3), bestehend aus Acrylamid und Sammelgelpuffer (siehe Abschnitt 2.1.3), wurde ebenfalls mit TEMED und APS zur Polymerisation gebracht, über das durchpolymerisierte Trenngel geschichtet und mit

einem Kamm für 15 Taschen à 40 µl versehen. Die Gele wurden über Nacht bei 4 °C gelagert.

Gelelektrophorese

Das Acrylamidgel wurde in der Elektrophoresekammer platziert und die Kammer mit Laufpuffer (siehe Abschnitt 2.1.3) befüllt. Die Proteinlysate wurden mit dem 0,66–1,12-fachen Volumen Lämmli-puffer vermischt, gegebenenfalls mit H₂O auf 25 µl aufgefüllt, für 5 min auf 95 °C erhitzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die verwendeten Volumina der Proteinlysate sind den Legenden der entsprechenden Abbildungen zu entnehmen. Als Komigrationsstandard wurden 15 µl des *Precision Plus* Proteinstandards in eine Tasche pipettiert. Für die Gelelektrophorese wurde mit einem Netzteil eine Spannung von 100 V angelegt. Die Elektrophorese wurde nach Austreten der Lauffront aus dem Gel beendet.

Proteintransfer

Für den Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran wurde eine Schicht aus Filterpapier in Anodenpuffer I (siehe Abschnitt 2.1.3) getränkt und in die Blottingkammer gelegt. Eine zweite Schicht aus Filterpapier wurde in Anodenpuffer II (siehe Abschnitt 2.1.3) getränkt und auf die erste Schicht gelegt. Die PVDF-Membran wurde in Methanol getränkt und auf den Filterpapieren platziert. Das Gel aus der Gelelektrophorese wurde blasenfrei auf die PVDF-Membran gelegt. Schließlich folgte eine Schicht aus Filterpapier, die in Kathodenpuffer (siehe Abschnitt 2.1.3) getränkt wurde. Die Blottingkammer wurde verschlossen und mit einem Netzteil für 1 h ein Strom von 60 mA angelegt. Schließlich wurde die Membran in 5% Milchpulver in TBS-T (siehe Abschnitt 2.1.3) für 1 h geblockt und 3× in TBS-T gewaschen.

Immunodetektion von Proteinen

Zum Nachweis eines spezifischen Proteins auf der Membran wurde die Membran über Nacht mit Primärantikörper in Antikörperpuffer (siehe Abschnitt 2.1.3) bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran 3× in TBS-T gewaschen, 1 h bei Raumtemperatur mit *HRP-linked anti-IgG* Sekundärantikörper (1:2.000 in Antikörperpuffer) inkubiert und erneut 3× in TBS-T gewaschen. Die Membran wurde mit ECL-Lösung benetzt und die Chemilumineszenz in einem *Versadoc* Kamerasystem mithilfe der Software *Quantity One* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) aufgenommen.

Der Nachweis der G-Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper gegen G $\alpha_{i1/i2}$ (Leopoldt, Harteneck, & Nürnberg, 1997) und G α_{i3} (Gohla et al., 2007) (7BioScience,

Hartheim am Rhein). Als Ladekontrolle wurde ein β -Aktin Antikörper (abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) verwendet. Falls sowohl $G\alpha_{i2}$ als auch $G\alpha_{i3}$ nachgewiesen werden sollten, wurde die Membran mit *Re-blot Plus* Strippinglösung entsprechend der Herstellerangaben nach der $G\alpha_{i3}$ -Inkubation gestrippt.

Die densitometrische Auswertung der Blots erfolgte mit der Software *ImageJ* (NIH, Bethesda, MD, USA). Die Intensitäten der $G\alpha_{i2/3}$ -Banden wurden zunächst auf den Wert der β -Aktin-Bande derselben Spur, und anschließend auf den Mittelwert der wt-Proben des Blots normiert.

2.2.11. Durchflusszytometrie

Einzelzellsuspensionen wurden in FACS-Röhrchen abzentrifugiert, in 100 μ l Antikörpermix resuspendiert und für 15 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Falls die Fc-Rezeptoren blockiert werden sollten, wurden die Zellen zuerst in 50 μ l Fc-Block resuspendiert; nach 10 min Inkubation bei 4 °C wurden 50 μ l Antikörpermix hinzugegeben und die Proben weitere 15 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden schließlich 2 \times mit PBS⁻ gewaschen und in BD *CellFix* resuspendiert. Die Messung erfolgte an einem *FACS Canto II* Durchflusszytometer. Die durchflusszytometrischen Daten wurden mithilfe der Software *FlowJo* (FlowJo, Ashland, OR, USA) ausgewertet.

Reinheitsbestimmung von isolierten Neutrophilen

Mindestens 3×10^5 Zellen wurden in Fc-Block (1:100 in PBS⁻) inkubiert und anschließend mit einem Antikörpermix (CD11b-PE/Cy7 1:400 und Ly6G-APC 1:200 oder CD11b-PerCP-Cy5.5 1:400 und Ly6G-PE 1:200 in PBS⁻) gefärbt. Neutrophile wurden als CD11b⁺ Ly6G⁺ Zellen identifiziert und als Anteil aller gemessenen Zellen angegeben.

Zusammensetzung von Milz und Knochenmark

Je 5×10^6 Splenozyten bzw. 2×10^6 Knochenmarkzellen wurden für 30 min bei 4 °C in *LIVE/DEAD Violet Dead Cell Stain* (1:1500 in PBS) inkubiert und anschließen mit PBS⁻ gewaschen. Die Zellen wurden in Fc-Block (1:100 in MACS-Puffer, siehe Abschnitt 2.1.3) inkubiert und anschließend mit einem Antikörpermix (siehe Tab. 4) gefärbt. Für das *gating* der Zelltypen wurden zunächst die *LIVE/DEAD violet^{hi}* Zellen als tote Zellen ausgeschlossen, es folgten eine *doublet exclusion* in der FSC-FSH-Darstellung und ein

Ausschluss von Zelldebris in der FSC-SSC-Darstellung. Ausgehend von dieser Auswahl wurden Neutrophile als CD90⁻ CD19⁻ CD11b⁺ SSC^{int} Ly6G⁺ Zellen, Eosinophile als CD90⁻ CD19⁻ CD11b⁺ SSC^{hi} Ly6G⁻ Zellen und Makrophagen als CD90⁻ CD19⁻ Ly6G⁻ SSC^{lo} CD11b^{int} F4/80⁺ Zellen identifiziert. Die Gatingstrategie ist in Abb. 12 anhand je einer repräsentativen Probe aus Milz und Knochenmark dargestellt.

Tabelle 4: FACS-Färbung für Knochenmark- und Milzzellen

Antikörper	Verdünnung (final)	
	Knochenmark	Milz
CD19-BB700	1:200	1:200
CD90-APC	1:1000	1:1000
CD11b-PE/Cy7	1:400	1:100
Ly6G-PE	1:200	1:200
F4/80-FITC	1:100	1:100

Quantifizierung der phagozytischen Aktivität von Neutrophilen

Als phagozytische Aktivität wird hier die durchschnittliche Anzahl der von Neutrophilen phagozytierten Partikel pro Zeiteinheit bezeichnet. Die Zellen wurden in einem Antikörpermix bestehend aus Ly6G-APC (1:200) und CD11b-PE/Cy7 (1:400) in MACS-Puffer (siehe Abschnitt 2.1.3) gefärbt. Neutrophile wurden als CD11b⁺ Ly6G⁺ Zellen identifiziert. Phagozytierte *FluoSpheres* konnten anhand der Fluoreszenz im FITC-Kanal nachgewiesen werden. Als Maß für die phagozytische Aktivität wurden die Neutrophilen mit phagozytierten Partikeln (CD11b⁺ Ly6G⁺ *FluoSpheres*(=FITC)⁺) als Anteil aller Neutrophiler und die mittlere Fluoreszenz (MFI) der Neutrophilen im *FluoSpheres*(=FITC)-Channel betrachtet.

2.2.12. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism (Graphpad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Alle Werte wurden als *arithmetischer Mittelwert* \pm *Standardabweichung* aufgeführt. Zum Vergleich zweier normalverteilter Gruppen wurde ein Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Zum Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde eine Oneway-ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test durchgeführt. P-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis des Knockouts von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ in Neutrophilen der *LysM-Cre*- und der *Ly6G-Cre*-Mauslinien

Ziel dieses Versuchs war der Nachweis des Knockouts der Proteine $G\alpha_{i2}$ und/oder $G\alpha_{i3}$ in den Neutrophilen der Mauslinien *Gnai2*^{fl/fl} *LysM-Cre*, *Gnai3*^{fl/fl} *LysM-Cre*, *Gnai2/i3*^{fl/fl} *LysM-Cre*, sowie *Gnai2*^{fl/fl} *Ly6G-Cre* und *Gnai3*^{fl/fl} *Ly6G-Cre*.

Hierfür wurden Neutrophile aus einer Thioglycolat-induzierten Peritonitis durch Peritoneallavage gewonnen. Aus den so gewonnenen Zellen wurden die Neutrophilen mittels immunomagnetischer Zellsortierung weiter aufgereinigt und die Reinheit wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Schließlich wurden die isolierten Neutrophilen mittels PCR auf das Vorhandensein der Gene *Gnai2* bzw. *Gnai3*, und mittels Immunoblot auf das Vorhandensein der Proteine $G\alpha_{i2}$ bzw. $G\alpha_{i3}$ überprüft.

3.1.1. Reinheit der aufgereinigten Neutrophilen

Zur Bestimmung der Reinheit der isolierten Neutrophilen wurden vor und nach der immunomagnetischen Aufreinigung Aliquots entnommen, mit Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD11b und Ly6G gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. In der Auswertung wurden die Neutrophilen als CD11b⁺ Ly6G⁺ Zellen identifiziert und als Anteil aller Zellen angegeben. Die Gatingstrategie ist in Abb. 4a dargestellt.

Vor der immunomagnetischen Aufreinigung variierte der Prozentsatz von Neutrophilen in den Proben stark, von 7 % bis 76 % mit einem Mittelwert von $52,5 \pm 4,1$ % Neutrophile. Nach der immunomagnetischen Aufreinigung lag die Reinheit mit $91,6 \pm 1,3$ % deutlich höher. Lediglich zwei der 24 Proben wiesen eine Reinheit von < 85 % auf.

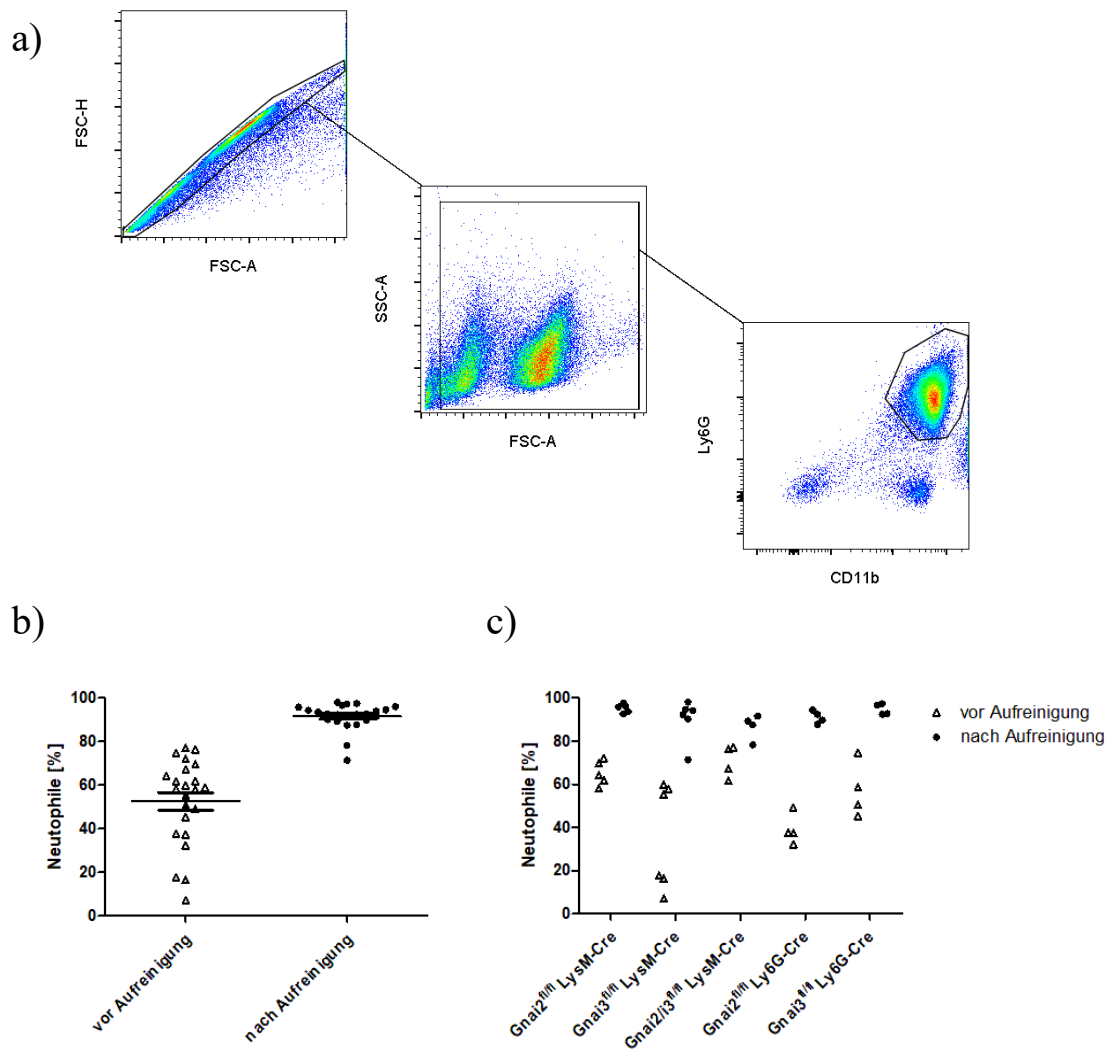


Abbildung 4: Reinheit der isolierten Neutrophilen. **(a)** Gatingstrategie: Nach Doublet-Exclusion (links) und Ausschluss von Zelldebris (Mitte) wurde auf CD11b⁺ Ly6G⁺ Zellen (rechts) als Neutrophile gegatet. **(b)** Prozentualer Anteil der Neutrophilen an allen Zellen vor und nach der immunomagnetischen Aufreinigung, alle Genotypen gepoolt. **(c)** Prozentualer Anteil der Neutrophilen an allen Zellen vor und nach der immunomagnetischen Aufreinigung, aufgeschlüsselt nach Genotypen.

3.1.2. Nachweis der Gene *Gnai2* und *Gnai3* durch PCR

Zum Nachweis der Gendeletion von *Gnai2* bzw. *Gnai3* in den Neutrophilen der untersuchten Mauslinien wurde mit der genomischen DNA der isolierten Neutrophilen eine PCR mit für die Gene spezifischen Primern durchgeführt und die PCR-Produkte aufgetrennt und gemessen. Zur Bestätigung des Genotyps wurden zusätzlich die Gene *LysM-Cre* bzw. *Ly6G-Cre* nachgewiesen.

Gnai2^{fl/fl} LysM-Cre

Die PCR-Ergebnisse für die *Gnai2^{fl/fl} LysM-Cre* Mäuse sind in Abb. 5a dargestellt. Es wurden *LysM-Cre^{tg/+}* und *LysM-Cre^{+/+}* Proben im Wechsel aufgetragen. Die Ergebnisse für die *LysM-Cre*-PCR sind in Abb. 5a (oben) zu sehen. Als Kontrollen dienten zwei *LysM-Cre^{tg/+}* Proben (Spur 6 und 7) und eine Leerprobe (Spur 8). In allen dargestellten Proben, mit Ausnahme der Leerproben, ist bei 350 bp eine Bande zu sehen, die das Vorhandensein des *LysM*-wt-Allels nachweist. In den Proben 1, 3, und 5 sind zusätzlich Banden bei 700 bp zu sehen, die das Vorhandensein des *LysM-Cre* transgenen Allels anzeigen. In Abb. 5a (unten) sind die Ergebnisse der *Gnai2*-PCR dargestellt. Als Kontrollen dienten hier eine *Gnai2*-wt- (Spur 6), und eine *Gnai2*-k.o.-Probe (Spur 7) sowie eine Leerprobe (Spur 8). In den *LysM-Cre^{tg/+}* Proben (Spuren 1, 3, 5) sowie in der *Gnai2*-k.o.-Kontrolle (Spur 7) sind Banden bei 420 bp zu sehen, die das *Gnai2*-k.o.-Allel nachweisen. Zusätzlich fehlen in den *LysM-Cre^{tg/+}* Proben Banden bei 2300 bp, die das Vorhandensein des geflochtenen *Gnai2*-Allels nachweisen, und die in den *LysM-Cre^{+/+}* Proben (Spuren 2 und 4) zu sehen sind. Zum Vergleich ist im *Gnai2*-wt (Spur 6) eine Bande bei 2200 bp zu sehen, die das wt-Allel nachweist. Zusammenfassend konnte in den *Gnai2^{fl/fl} LysM-Cre* Proben eine Deletion des *Gnai2*-Gens nachgewiesen werden.

Gnai3^{fl/fl} LysM-Cre

Die PCR-Ergebnisse für die *Gnai3^{fl/fl} LysM-Cre* Mäuse sind in Abb. 5b dargestellt. Es wurden *LysM-Cre^{tg/+}* und *LysM-Cre^{+/+}* Proben im Wechsel aufgetragen. Die Ergebnisse für die *LysM-Cre*-PCR sind in Abb. 5b (oben) zu sehen. Als Kontrollen dienten eine *LysM-Cre^{+/+}* Probe (Spur 6), eine *LysM-Cre^{tg/+}* Probe (Spur 7) und eine Leerprobe (Spur 8). In allen dargestellten Proben, mit Ausnahme der Leerproben, ist bei 350 bp eine Bande zu sehen, die das Vorhandensein des *LysM*-wt-Allels nachweist. In den Proben 1, 3, 5 und 7 sind zusätzlich Banden bei 700 bp zu sehen, die das Vorhandensein des *LysM-Cre* transgenen Allels anzeigen. In Abb. 5b (unten) sind die Ergebnisse der *Gnai3*-PCR dargestellt. Als Kontrollen diente hier die Schwanzprobe einer *Gnai3^{fl/fl} LysM-Cre^{tg/+}* Maus (Spur 7) und eine Leerprobe (Spur 8). In den *LysM-Cre^{tg/+}* Proben (Spuren 1, 3 und 5) sowie in der Kontrolle (Spur 7) sind Banden bei 450 bp zu sehen, die ein *Gnai3*-k.o.-Allel nachweisen. In den *LysM-Cre^{+/+}* Proben (Spuren 2 und 4) hingegen sind Banden bei 836 bp zu sehen, die das geflochte *Gnai3*-Allel nachweisen. Zusammenfassend konnte in den *Gnai3^{fl/fl} LysM-Cre* Proben eine Deletion des *Gnai3*-Gens nachgewiesen werden.

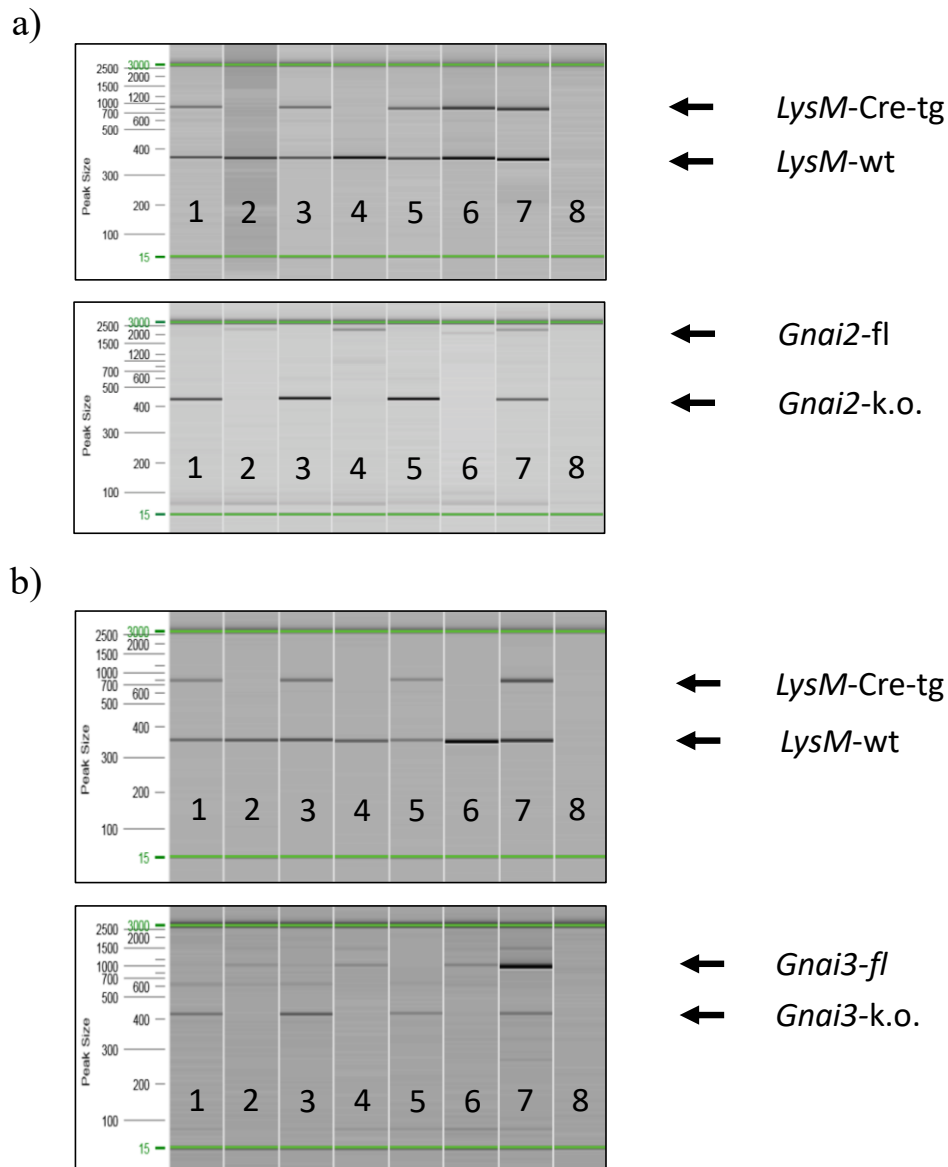


Abbildung 5: PCR-Analyse von Neutrophilen aus *Gnai2^{fl/fl} LysM-Cre* (a) und *Gnai3^{fl/fl} LysM-Cre* (b) Mäusen. Nachweis des *Gnai2-k.o.*- bzw. *Gnai3-k.o.*-Allels sowie des *LysM-Cre-tg*-Allels.

(a) Nachweis des *LysM-Cre-tg*- (oben) und *Gnai2-k.o.*-Allels (unten) in *Gnai2^{fl/fl} LysM-Cre^{tg/+}* (Spuren 1, 3, 5) und *Gnai2^{fl/fl} LysM-Cre^{+/+}* Proben (2, 4, 6). Als Kontrollen dienten (oben) zwei *LysM-Cre^{tg/+}* Proben (6, 7) und eine Leerprobe (8), (unten) eine *Gnai2-wt*- (6), eine *Gnai2-k.o.*-Probe (7) sowie eine Leerprobe (8).

(b) Nachweis des *LysM-Cre-tg*- (oben) und *Gnai3-k.o.*-Allels (unten) in *Gnai3^{fl/fl} LysM-Cre^{tg/+}* (Spuren 1, 3, 5) und *Gnai3^{fl/fl} LysM-Cre^{+/+}* Proben (2, 4, 6). Als Kontrollen dienten (oben) eine *LysM-Cre^{+/+}* (6), eine *LysM-Cre^{tg/+}* Probe (7) und eine Leerprobe (8), (unten) die Schwanzprobe einer *Gnai3^{fl/fl} LysM-Cre^{tg/+}* Maus (7) sowie eine Leerprobe (8).

Gnai2/i3^{fl/fl} LysM-Cre

Die PCR-Ergebnisse für die *Gnai2/i3^{fl/fl} LysM-Cre* Mäuse sind in Abb. 6 dargestellt. Es wurden *LysM-Cre^{tg/+}* und *LysM-Cre^{+/+}* Proben im Wechsel aufgetragen. Die Ergebnisse für die *LysM-Cre*-PCR sind in Abb. 6 (oben) zu sehen. Als Kontrollen dienten eine *LysM-Cre^{tg/+}* Probe (Spur 7), und eine Leerprobe (Spur 8). In allen dargestellten Proben, mit Ausnahme der Leerproben, ist bei 350 bp eine Bande zu sehen, die das Vorhandensein des *LysM*-Wildtyp-Allels nachweist. In den Spuren 1, 3, 5 und 7 sind zusätzlich Banden bei 700 bp zu sehen, die das Vorhandensein des *LysM-Cre* transgenen Allels anzeigen.

In Abb. 6 (Mitte) sind die Ergebnisse der *Gnai2*-PCR dargestellt. Als Kontrollen dienten hier eine *Gnai2*-k.o.-Probe (Spur 7) und eine Leerprobe (Spur 8). In den *LysM-Cre^{tg/+}* Proben (Spuren 1, 3 und 5) sowie in der *Gnai2*-k.o.-Kontrolle (Spur 7) sind Banden bei 420 bp zu sehen, die das *Gnai2*-k.o.-Allel nachweisen. Zusätzlich fehlen in den *LysM-Cre^{tg/+}* Proben Banden bei 2300 bp, die das Vorhandensein des geflochtenen *Gnai2*-Allels nachweisen, und die in den *LysM-Cre^{+/+}* Proben (Spuren 2, 4 und 6) zu sehen sind.

In Abb. 6 (unten) sind die Ergebnisse der *Gnai3*-PCR dargestellt. Als Kontrollen dienten hier die Schwanzprobe einer *Gnai3^{fl/fl} LysM-Cre^{tg/+}* Maus (Spur 7) und eine Leerprobe (Spur 8). In den *LysM-Cre^{tg/+}* Proben (Spuren 1, 3 und 5) sowie in der Kontrolle (Spur 7) sind Banden bei 450 bp zu sehen, die das *Gnai3*-k.o.-Allel nachweisen. Nur in den *LysM-Cre^{+/+}* Proben (Spuren 2, 4 und 6) sind hingegen Banden bei 836 bp zu sehen, die das geflochte *Gnai3*-Allel nachweisen.

Zusammenfassend konnte in den *Gnai2/i3^{fl/fl} LysM-Cre* Proben eine Deletion sowohl des *Gnai2*- als auch des *Gnai3*-Gens nachgewiesen werden.

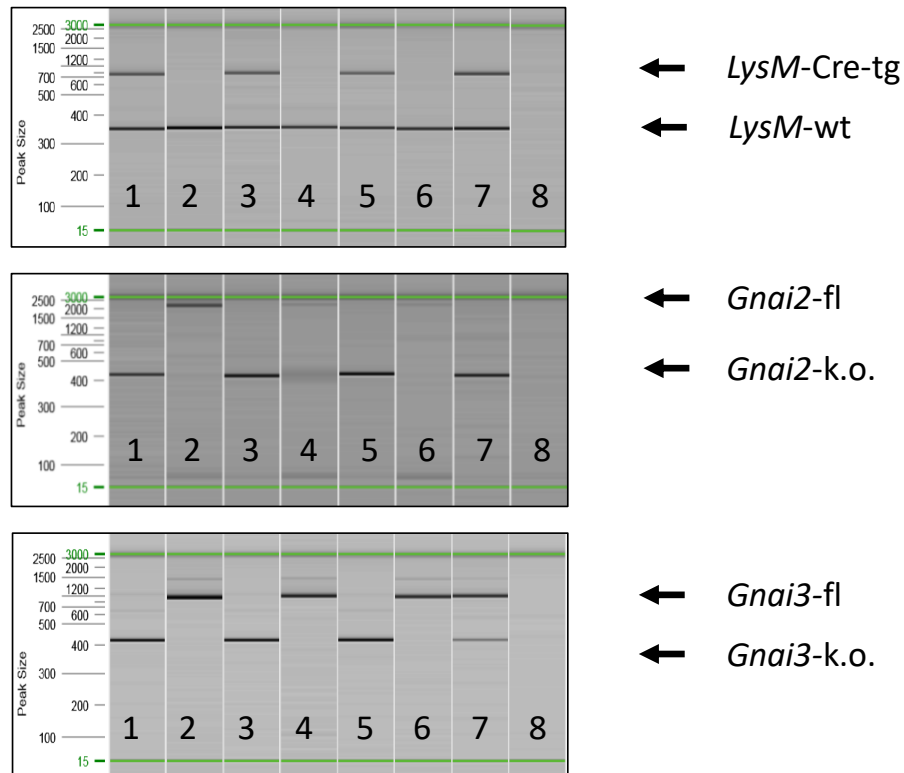


Abbildung 6: PCR-Analyse von Neutrophilen aus *Gnai2/i3^{fl/fl} LysM-Cre* Mäusen. Nachweis des *LysM-Cre-tg-* (oben), des *Gnai2-k.o.-* (Mitte) sowie des *Gnai3-k.o.-* Allels (unten). Dargestellt sind *Gnai2/i3^{fl/fl} LysM-Cre^{tg/+}* (Spuren 1, 3, 5) und *Gnai2/i3^{fl/fl} LysM-Cre^{+/+}* Proben (2, 4, 6). Als Kontrollen dienten (oben) eine *LysM-Cre^{tg/+}* Probe (7) und eine Leerprobe (8), (Mitte) eine *Gnai2-k.o.-* (7) und eine Leerprobe (8), (unten) die Schwanzprobe einer *Gnai3^{fl/fl} LysM-Cre^{tg/+}* Maus (7) sowie eine Leerprobe (8).

Gnai2^{fl/fl} Ly6G-Cre

Die PCR-Ergebnisse für die *Gnai2^{fl/fl} Ly6G-Cre* Mäuse sind in Abb. 7a dargestellt. Es wurden *Ly6G-Cre^{ki/+}* (Spuren 1 und 3) und *Ly6G-Cre^{+/+}* Proben (Spuren 2 und 4) im Wechsel aufgetragen. Die Ergebnisse für die *Ly6G-Cre-PCR* sind in Abb. 7a (oben) zu sehen. Als Kontrollen dienten zwei *Ly6G-Cre^{ki/+}* Proben (Spuren 5 und 6) und eine Leerprobe (Spur 7). In allen dargestellten Proben, mit Ausnahme der Leerprobe, ist bei 324 bp eine Bande zu sehen, die das Vorhandensein des *Ly6G-wt*-Allels nachweist. In den Spuren 1, 3, 5 und 6 sind zusätzlich Banden bei 373 bp zu sehen, die das Vorhandensein des *Ly6G-Cre-k.i.*-Allels anzeigen. In Abb 7a (unten) sind die Ergebnisse der *Gnai2-PCR* dargestellt. Als Kontrollen dienten hier eine *Gnai2-k.o.-* (Spur 5), und eine *Gnai2-wt*-Probe (Spure 6) sowie eine Leerprobe (Spur 7). In den *Ly6G-Cre^{ki/+}*

Proben (Spuren 1 und 3) sowie in der *Gnai2*-k.o.-Kontrolle (Spur 5) sind Banden bei 420 bp zu sehen, welche das *Gnai2*-k.o.-Allel nachweisen. Zusammenfassend konnte in den *Gnai2*^{fl/fl} *Ly6G*-Cre Proben eine Deletion des *Gnai2*-Gens nachgewiesen werden.

***Gnai3*^{fl/fl} *Ly6G*-Cre**

Die PCR-Ergebnisse für die *Gnai3*^{fl/fl} *Ly6G*-Cre Mäuse sind in Abb. 7b dargestellt. Es wurden eine *Ly6G*-Cre^{ki/ki} Probe (Spur 1) und je zwei *Ly6G*-Cre^{ki/+} Proben (Spuren 3 und 5) und zwei *Ly6G*-Cre^{+/+} Proben (Spuren 2 und 4) aufgetragen. Die Ergebnisse für die *Ly6G*-Cre-PCR sind in Abb. 7b (oben) zu sehen. Als Kontrollen dienten eine *Ly6G*-Cre^{ki/+} Probe (Spur 6) und eine Leerprobe (Spur 7). In den Proben 2 – 6 ist bei 324 bp eine Bande zu sehen, die das Vorhandensein des *Ly6G*-Wildtyp-Allels nachweist. In der *Ly6G*-Cre^{ki/ki} Probe (Spur 1) und der Leerprobe (Spur 7) ist dieses nicht nachweisbar. In den Proben 1, 3, 5 und 6 sind zusätzlich Banden bei 373 bp zu sehen, die das Vorhandensein des *Ly6G*-Cre-k.i.-Allels anzeigen. In Abb 7b (unten) sind die Ergebnisse der *Gnai3*-PCR dargestellt. Als Kontrollen dienten hier die Schwanzprobe einer *Gnai3*^{fl/fl} *Ly6G*-Cre^{tg/+} Maus (Spur 6) und eine Leerprobe (Spur 7). In der *Ly6G*-Cre^{ki/ki} Probe (Spur 1), den *Ly6G*-Cre^{ki/+} Proben (Spuren 3 und 5) sowie in der Kontrolle (Spur 6) sind Banden bei 450 bp zu sehen, die das *Gnai3*-k.o.-Allel nachweisen. In den *Ly6G*-Cre^{+/+} Proben (Spuren 2 und 4) hingegen sind Banden bei 836 bp zu sehen, welche das Vorhandensein des geflochtenen *Gnai3*-Allels nachweisen. Diese sind auch schwach in den *Ly6G*-Cre^{ki/+} Proben (Spuren 3 und 5) erkennbar, in der *Ly6G*-Cre^{ki/ki} Probe jedoch nicht. Zusammenfassend konnte in den *Gnai3*^{fl/fl} *Ly6G*-Cre Proben eine Deletion des *Gnai3*-Gens nachgewiesen werden.

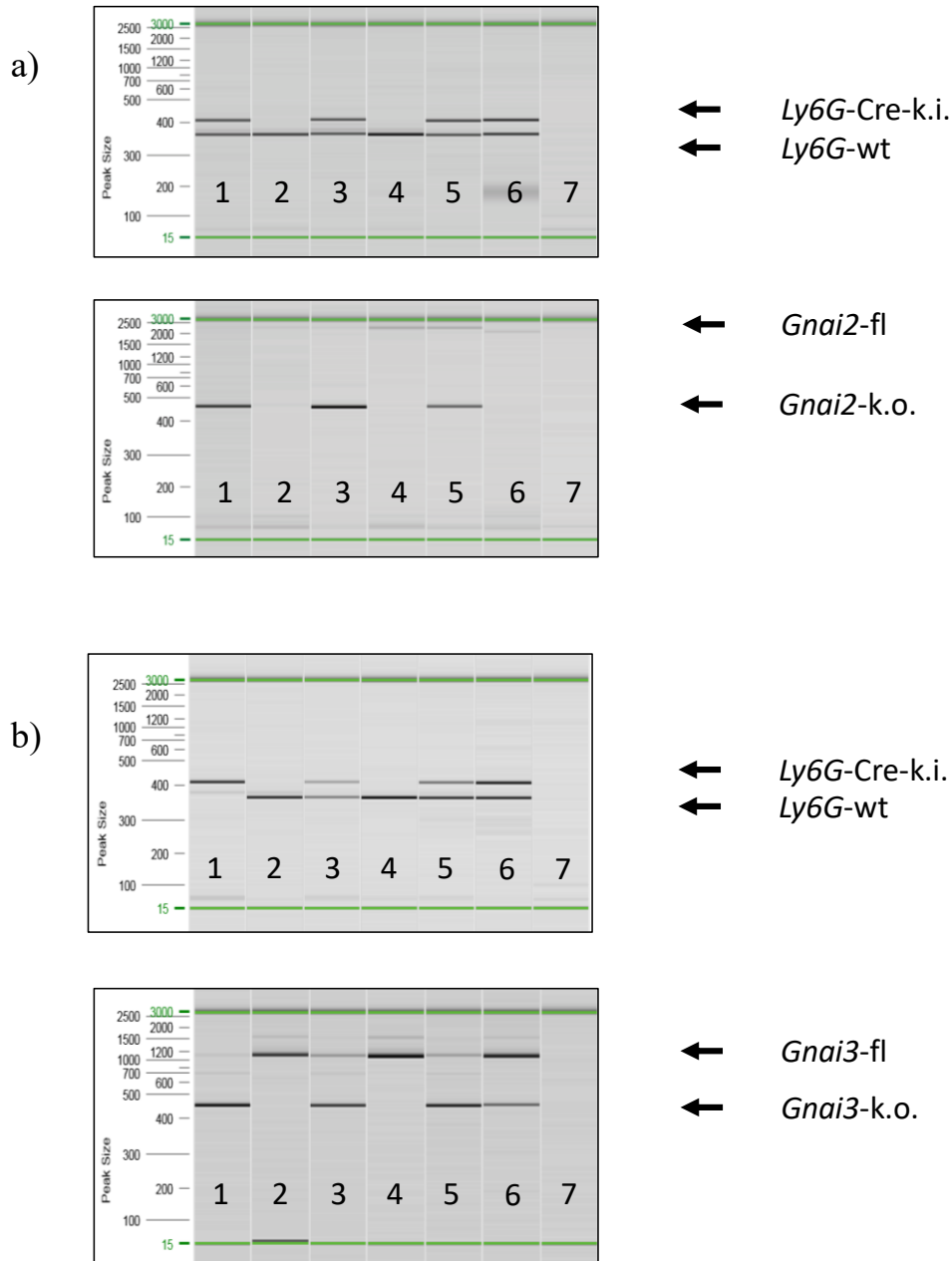


Abbildung 7: PCR-Analyse von Neutrophilen aus $Gnai2^{fl/fl}$ Ly6G-Cre (a) und $Gnai3^{fl/fl}$ Ly6G-Cre (b) Mäusen. Nachweis des $Gnai2$ -k.o.- bzw. $Gnai3$ -k.o.-Allels sowie des Ly6G-Cre-k.i.-Allels.

(a) Nachweis des Ly6G-Cre-k.i.- (oben) und des $Gnai2$ -k.o.-Allels (unten) in $Gnai2^{fl/fl}$ Ly6G-Cre^{ki/+} (Spuren 1, 3) und $Gnai2^{fl/fl}$ Ly6G-Cre^{+/+} Proben (2, 4). Als Kontrollen dienten (oben) zwei Ly6G-Cre^{ki/+} Proben (5, 6) und eine Leerprobe (7), (unten) eine $Gnai2$ -k.o.- (5), eine $Gnai2$ -wt Probe (6) und eine Leerprobe (7).

(b) Nachweis des Ly6G-Cre-k.i.- (oben) und des $Gnai3$ -k.o.-Allels (unten) in $Gnai3^{fl/fl}$ Ly6G-Cre^{ki/ki} (Spur 1), $Gnai3^{fl/fl}$ Ly6G-Cre^{ki/+} (3, 5) und $Gnai3^{fl/fl}$ Ly6G-Cre^{+/+} Proben (2, 4). Als Kontrollen dienten (oben) eine Ly6G-Cre^{ki/+} Probe (6) und eine Leerprobe (7), (unten) die Schwanzprobe einer $Gnai3^{fl/fl}$ Ly6G-Cre^{tg/+} Maus (6) sowie eine Leerprobe (7).

3.1.3. Nachweis der Proteine $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ mittels Immunoblot

Zum Nachweis der Proteine $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ in den Lysaten der isolierten Neutrophilen wurden Immunoblots mit spezifischen Antikörpern gegen $G\alpha_{i2}$ bzw. $G\alpha_{i3}$ und β -Aktin als Ladungskontrolle durchgeführt.

Gnai2^{fl/fl} LysM-Cre

Die Immunoblots der *Gnai2^{fl/fl} LysM-Cre* Mäuse sind in Abb. 8a dargestellt. Es wurden *LysM-Cre^{tg/+}* und *LysM-Cre^{+/+}* Proben im Wechsel aufgetragen. Als Kontrollen dienten lysierte Splenozyten von *Gnai2^{-/-}* und *Gnai2^{+/+}* Mäusen (Spur 6 und 7). In der Ladungskontrolle mit β -Aktin-Antikörper (unten) zeigt sich eine gleichmäßige Beladung der Gele mit Protein. Im Immunoblot mit $G\alpha_{i2}$ -Antikörper ist eine deutliche Abschwächung der $G\alpha_{i2}$ -Banden in den *LysM-Cre^{tg/+}* Proben (Spuren 1, 3, 5) im Vergleich zu den *LysM-Cre^{+/+}* Proben (Spuren 2, 4) zu erkennen. In der quantitativen Auswertung des Immunoblots (rechts) zeigt sich, dass die mittlere Bandenstärke der *LysM-Cre^{tg/+}* Proben 34% der mittleren Bandenstärke der *LysM-Cre^{+/+}* Proben beträgt und damit eine Reduktion des Proteins $G\alpha_{i2}$ um 66% erreicht werden konnte.

Gnai3^{fl/fl} LysM-Cre

Die Immunoblots der *Gnai3^{fl/fl} LysM-Cre* Mäuse sind in Abb. 8b dargestellt. Es wurden *LysM-Cre^{tg/+}* und *LysM-Cre^{+/+}* Proben im Wechsel aufgetragen. Als Kontrollen dienten lysierte Splenozyten von *Gnai3^{-/-}* und *Gnai3^{+/+}* Mäusen (Spuren 7 und 8). In der Ladungskontrolle mit β -Aktin-Antikörper (unten) zeigt sich eine gleichmäßige Beladung der Gele mit Protein. Im Immunoblot mit $G\alpha_{i3}$ -Antikörper ist eine deutliche Abschwächung der $G\alpha_{i3}$ -Banden in den *LysM-Cre^{tg/+}* Proben (Spuren 1, 3, 5) im Vergleich zu den *LysM-Cre^{+/+}* Proben (Spuren 2, 4, 6) zu erkennen. In der quantitativen Auswertung des Immunoblots (rechts) zeigt sich, dass die mittlere Bandenstärke der *LysM-Cre^{tg/+}* Proben 22% der mittleren Bandenstärke der *LysM-Cre^{+/+}* Proben beträgt und damit eine Reduktion des Proteins $G\alpha_{i3}$ um 78 % erreicht werden konnte.

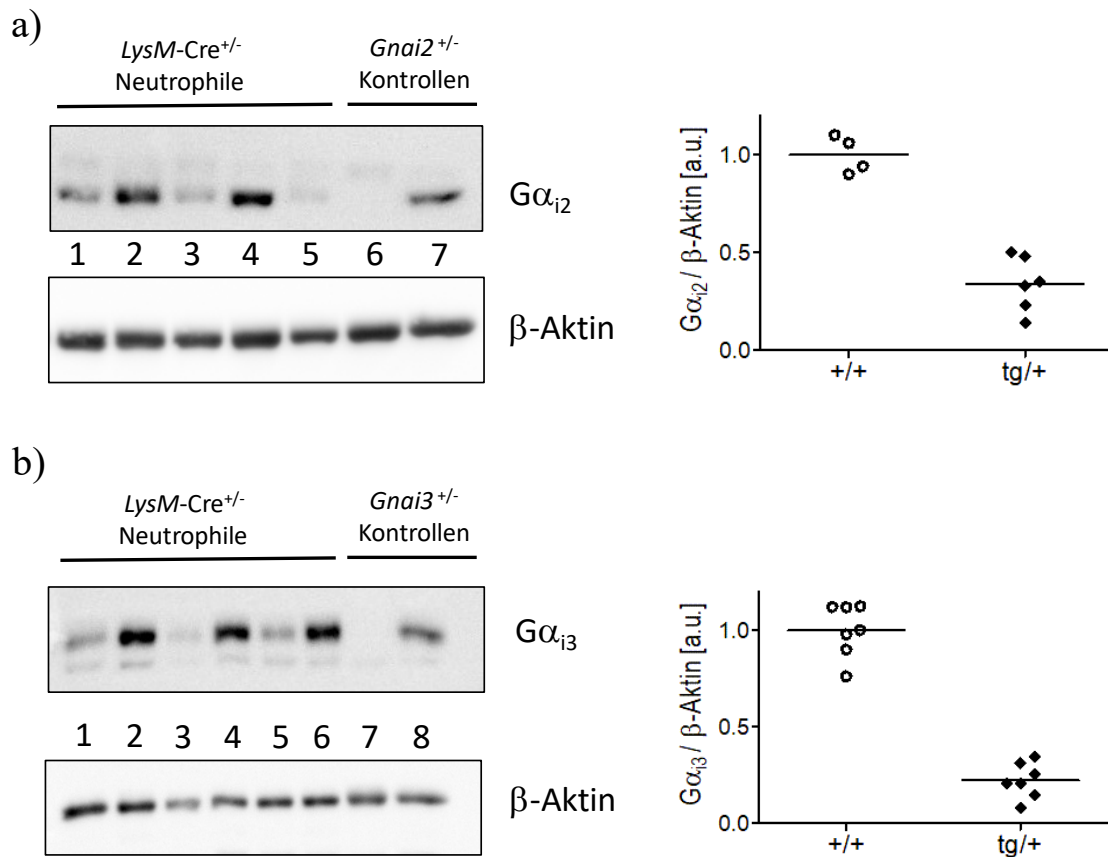


Abbildung 8: Western Blot-Analyse von Neutrophilen aus $Gnai2^{fl/fl}$ $LysM-Cre$ (a) und $Gnai3^{fl/fl}$ (b) $LysM-Cre$ Mäusen. Dargestellt sind repräsentative Immunoblots (links) und die quantitative Auswertung aller Immunoblots (rechts). Je $10 \mu\text{l}$ Proteinlysate mit $11,25 \mu\text{l}$ Lämmli-Puffer wurden in Urea-haltigen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Die Proteine wurden mit $G\alpha_{i2}$ -Antikörpern (1:2000), $G\alpha_{i3}$ -Antikörpern (1:6.000) und β -Aktin-Antikörpern (1:10.000) nachgewiesen. In der quantitativen Analyse sind die Intensitäten der $G\alpha_{i2/3}$ -Banden im Verhältnis zu den jeweiligen β -Aktin-Banden, normiert auf den Mittelwert der $LysM-Cre^{+/+}$ -Proben, dargestellt.

(a) Links: Nachweis von $G\alpha_{i2}$ und β -Aktin in $Gnai2^{fl/fl}$ $LysM-Cre^{tg/+}$ (Spuren 1, 3, 5) und $Gnai2^{fl/fl}$ $LysM-Cre^{+/+}$ Proben (2,4). Als Kontrollen dienten Splenozytenlysate von $Gnai2^{-/-}$ (6) und $Gnai2^{+/+}$ (7) Mäusen. Rechts: Intensitäten der $G\alpha_{i2}$ -Banden in 4 $Gnai2^{fl/fl}$ $LysM-Cre^{+/+}$ Proben (+/+) vs. 6 $Gnai2^{fl/fl}$ $LysM-Cre^{tg/+}$ Proben (tg/+). Daten aus 2 unabhängigen Experimenten. Adaptiert aus: Köhler, Beichert et al. (eingereicht).

(b) Links: Nachweis von $G\alpha_{i3}$ und β -Aktin in $Gnai3^{fl/fl}$ $LysM-Cre^{tg/+}$ (Spuren 1, 3, 5) und $Gnai3^{fl/fl}$ $LysM-Cre^{+/+}$ Proben (2,4,6). Als Kontrollen dienten Splenozytenlysate von $Gnai3^{-/-}$ (7) und $Gnai3^{+/+}$ (8) Mäusen. Rechts: Intensitäten der $G\alpha_{i3}$ -Banden in 7 $Gnai3^{fl/fl}$ $LysM-Cre^{+/+}$ Proben (+/+) vs. 7 $Gnai3^{fl/fl}$ $LysM-Cre^{tg/+}$ Proben (tg/+). Daten aus 2 unabhängigen Experimenten.

Gnai2/i3^{fl/fl} LysM-Cre

Die Immunoblots der *Gnai2/i3^{fl/fl} LysM-Cre* Mäuse sind in Abb. 9 dargestellt. Es wurden je zwei *LysM-Cre^{tg/+}* und *LysM-Cre^{+/+}* Proben im Wechsel aufgetragen. Als Kontrollen dienten Splenozyten von *Gnai2^{-/-}* und *Gnai2^{+/+}* Mäusen (Spuren 5 und 6) sowie *Gnai3^{-/-}* und *Gnai3^{+/+}* Mäusen (Spuren 7, 8). In der Ladungskontrolle mit β -Aktin-Antikörper (unten) zeigt sich eine gleichmäßige Beladung der Gele mit Protein. Im Immunoblot mit $G\alpha_{i2}$ -Antikörper (Mitte) ist eine deutliche Abschwächung der $G\alpha_{i2}$ -Banden in den *LysM-Cre^{tg/+}* Proben (Spuren 2, 4) im Vergleich zu den *LysM-Cre^{+/+}* Proben (Spuren 1, 3) zu erkennen. Gleiches gilt für den Immunoblot mit $G\alpha_{i3}$ -Antikörpern (oben). In der quantitativen Auswertung der Immunoblots (Abb. 9b, c) zeigt sich, dass die mittlere Bandenstärke der *LysM-Cre^{tg/+}* Proben 29% (im $G\alpha_{i2}$ -Blot) bzw. 34 % (im $G\alpha_{i3}$ -Blot) der mittleren Bandenstärke der *LysM-Cre^{+/+}* Proben beträgt. Es konnte also eine Reduktion des Proteins $G\alpha_{i2}$ um 71 % und des Proteins $G\alpha_{i3}$ um 66 % erreicht werden.

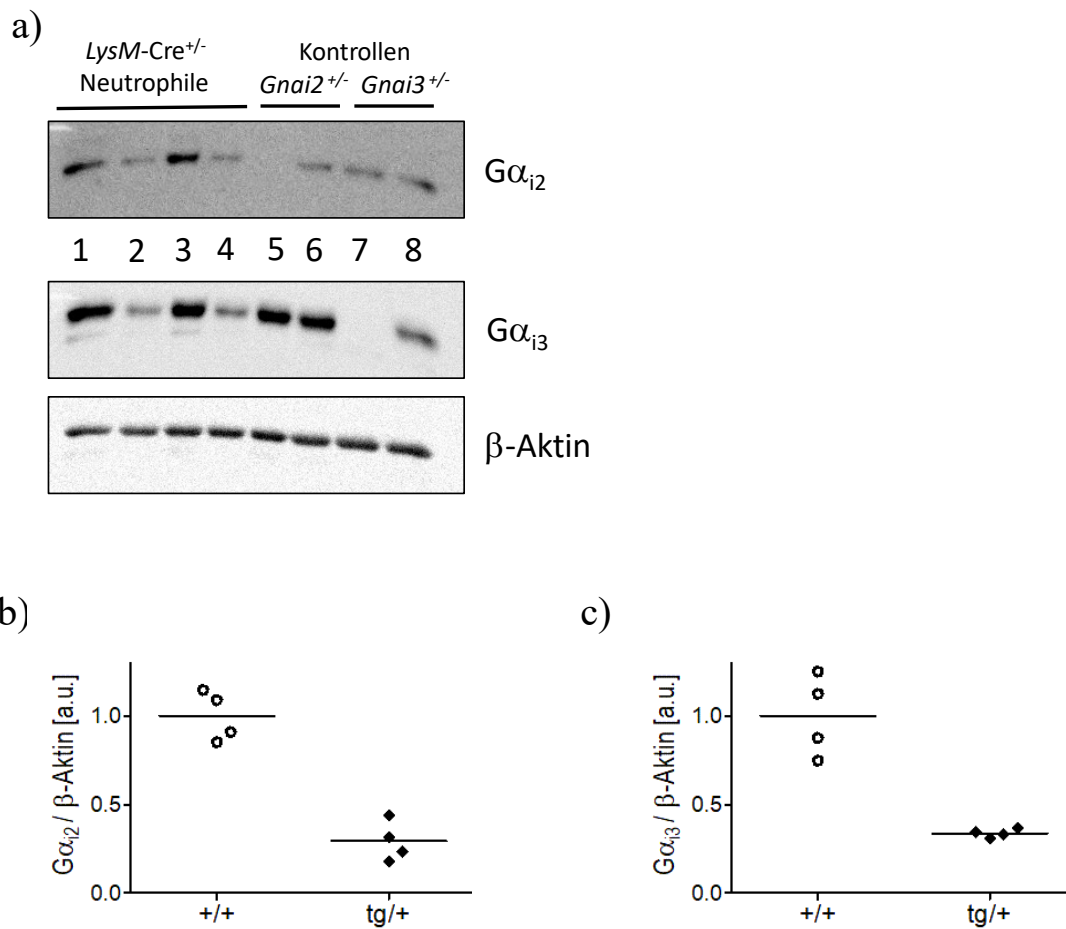


Abbildung 9: Western Blot-Analyse von Neutrophilen aus *Gnai2/i3^{fl/fl} LysM-Cre* Mäusen. Dargestellt sind repräsentative Immunoblots (a) und die quantitative Auswertung aller Immunoblots (b und c). Je 15 μ l Proteinlysate mit 10 μ l Lämmli-Puffer wurden in Urea-haltigen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf PVDF-Membranen gebロットet. Die Proteine wurden mit $G\alpha_{i2}$ -Antikörpern (1:2000), $G\alpha_{i3}$ -Antikörpern (1:6.000) und β -Aktin-Antikörpern (1:40.000) nachgewiesen. In der quantitativen Analyse sind die Intensitäten der $G\alpha_{i2/3}$ -Banden im Verhältnis zu den jeweiligen β -Aktin-Banden, normiert auf den Mittelwert der *LysM-Cre^{+/+}* Proben, dargestellt.

(a) Es wurden *Gnai2/i3^{fl/fl} LysM-Cre^{+/+}* (Spuren 1, 3) und *Gnai2/i3^{fl/fl} LysM-Cre^{tg/+}* Proben (2,4) im Wechsel aufgetragen. Als Kontrollen dienten Splenozytenlysate von *Gnai2^{-/-}* (5) und *Gnai2^{+/+}* (6) sowie *Gnai3^{-/-}* (7) und *Gnai3^{+/+}* (8) Mäusen.

(b) Intensitäten der $G\alpha_{i2}$ -Banden in 4 *Gnai2/i3^{fl/fl} LysM-Cre^{+/+}* Proben (+/+) vs. 4 *Gnai2/i3^{fl/fl} LysM-Cre^{tg/+}* Proben (tg/+). Daten aus 2 unabhängigen Experimenten.

(c) Intensitäten der $G\alpha_{i3}$ -Banden in 4 *Gnai2/i3^{fl/fl} LysM-Cre^{+/+}* Proben (+/+) vs. 4 *Gnai2/i3^{fl/fl} LysM-Cre^{tg/+}* Proben (tg/+). Daten aus 2 unabhängigen Experimenten.

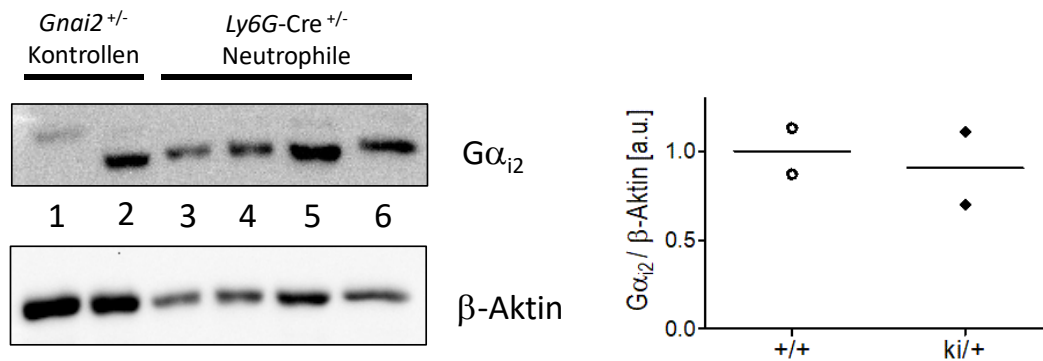
Gnai2^{fl/fl} Ly6G-Cre

Die Immunoblots der *Gnai2^{fl/fl} Ly6G-Cre* Mäuse sind in Abb. 10a dargestellt. Es wurden *Ly6G-Cre^{ki/+}* und *Ly6G-Cre^{+/+}* Proben im Wechsel aufgetragen. Als Kontrollen dienten Splenozyten von *Gnai2^{-/-}* und *Gnai2^{+/+}* Mäusen (Spuren 1 und 2). In der Ladungskontrolle mit β -Aktin-Antikörper (unten) zeigt sich eine stärkere Beladung der Spuren 1 und 2 als der restlichen Spuren. Unter den restlichen Spuren scheint Spur 5 etwas stärker beladen als die übrigen Spuren. Im Immunoblot mit $G\alpha_{i2}$ -Antikörper ist keine Abschwächung der $G\alpha_{i2}$ -Banden in den *Ly6G-Cre^{ki/+}* Proben (Spuren 3, 5) im Vergleich zu den *Ly6G-Cre^{+/+}* Proben (Spuren 4, 6) zu erkennen. Die $G\alpha_{i2}$ -Bande in Spur 5 ist entsprechend der Beladung stärker als die der übrigen Proben. In der quantitativen Auswertung des Immunoblots (rechts) ist keine signifikante Abschwächung der $G\alpha_{i2}$ -Banden erkennbar.

Gnai3^{fl/fl} Ly6G-Cre

Die Immunoblots der *Gnai3^{fl/fl} Ly6G-Cre* Mäuse sind in Abb. 10b dargestellt. Es wurden eine *Ly6G-Cre^{ki/ki}* (Spur 1) und je zwei *Ly6G-Cre^{ki/+}* (Spuren 3, 5) und *Ly6G-Cre^{+/+}* Proben (Spuren 2, 4) aufgetragen. Als Kontrollen dienten Splenozyten von *Gnai3^{-/-}* und *Gnai3^{+/+}* Mäusen (Spuren 6, 7). In der Ladungskontrolle mit β -Aktin-Antikörper (unten) zeigt sich eine stärkere Beladung der Spuren 6 und 7 als der restlichen Spuren. Die übrigen Spuren erscheinen gleichmäßig beladen. Im Immunoblot mit $G\alpha_{i3}$ -Antikörper (oben) erscheinen die Banden in Proben 2 und 5 schwächer als in Proben 1, 3 und 4. Es ist jedoch keine Abschwächung der $G\alpha_{i3}$ -Banden der *Ly6G-Cre^{ki/ki}* und *Ly6G-Cre^{ki/+}* Proben im Vergleich zu den *Ly6G-Cre^{+/+}* Proben erkennbar. Dies bestätigt sich in der quantitativen Auswertung des Immunoblots (rechts).

a)



b)

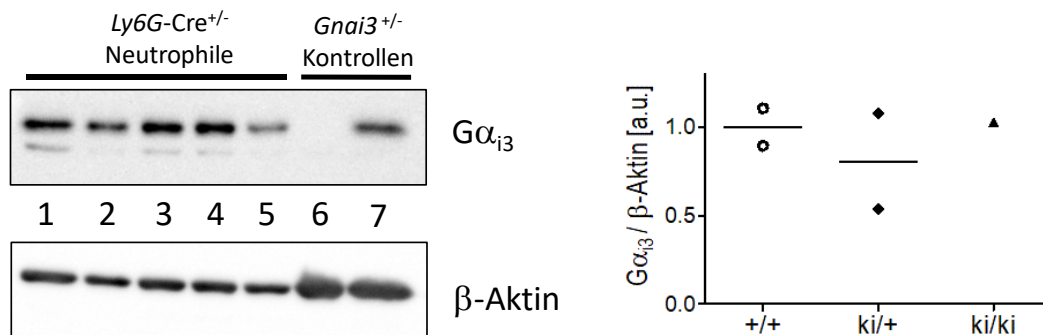


Abbildung 10: Western Blot-Analyse von Neutrophilen aus $Gnai2^{fl/fl}$ $Ly6G-Cre$ (a) und $Gnai3^{fl/fl}$ $Ly6G-Cre$ (b) Mäusen. Dargestellt sind repräsentative Immunoblots (links) und die quantitative Auswertung aller Immunoblots (rechts). Je 15 μ l Proteinlysate mit 10 μ l Lämmli-puffer wurden in Urea-haltigen Polyacrylamidgelen aufgespalten und auf PVDF-Membranen geblottet. Die Proteine wurden mit $G\alpha_{i2}$ -Antikörpern (1:2000), $G\alpha_{i3}$ -Antikörpern (1:10.000) und β -Aktin-Antikörpern (1:20.000) nachgewiesen. In der quantitativen Analyse sind die Intensitäten der $G\alpha_{i2/3}$ -Banden im Verhältnis zu den jeweiligen β -Aktin-Banden, normiert auf den Mittelwert der $Ly6G-Cre^{+/+}$ Proben, dargestellt.

(a) Links: Nachweis von $G\alpha_{i2}$ und β -Aktin in $Gnai2^{fl/fl}$ $Ly6G-Cre^{ki/+}$ (Spuren 3, 5) und $Gnai2^{fl/fl}$ $Ly6G-Cre^{+/+}$ Proben (4, 6). Als Kontrollen dienten Splenozytenlysate von $Gnai2^{-/-}$ (1) und $Gnai2^{+/+}$ (2) Mäusen. Rechts: Intensitäten der $G\alpha_{i2}$ -Banden in 2 $Gnai2^{fl/fl}$ $Ly6G-Cre^{+/+}$ Proben ($+/+$) vs. 2 $Gnai2^{fl/fl}$ $Ly6G-Cre^{ki/+}$ Proben ($ki/+$). Daten aus einem Experiment.

(b) Links: Nachweis von $G\alpha_{i3}$ und β -Aktin in $Gnai3^{fl/fl}$ $Ly6G-Cre^{ki/ki}$ (Spuren 1), $Gnai3^{fl/fl}$ $Ly6G-Cre^{+/+}$ Proben (2, 4) und $Gnai3^{fl/fl}$ $Ly6G-Cre^{ki/+}$ (3, 5) Proben. Als Kontrollen dienten Splenozytenlysate von $Gnai3^{-/-}$ (6) und $Gnai3^{+/+}$ (7) Mäusen. Rechts: Intensitäten der $G\alpha_{i3}$ -Banden in 2 $Gnai3^{fl/fl}$ $Ly6G-Cre^{+/+}$ ($+/+$) vs. 2 $Gnai3^{fl/fl}$ $Ly6G-Cre^{ki/+}$ ($ki/+$) vs. 1 $Gnai3^{fl/fl}$ $Ly6G-Cre^{ki/ki}$ (ki/ki) Proben. Daten aus einem Experiment.

3.1.4. Nachweis der Expression von tdTomato in Catchup-Mäusen mittels Durchflusszytometrie

In der verwendeten *Ly6G-Cre*-(„*Catchup*“-)Mauslinie codiert das Knock-in-Allel sowohl für die Cre-Rekombinase als auch für das fluoreszierende Protein tdTomato, welches bei einer Wellenlänge von 554 nm maximal angeregt wird und bei einer Wellenlänge von 581 nm maximal emittiert. Um die Expression des Knock-in-Allels nachzuweisen, wurden im Rahmen der Reinheitsbestimmung (siehe Abschnitt 3.1.1) Neutrophile von *Ly6G-Cre*^{ki/+} und *Ly6G-Cre*^{ki/ki} Mäusen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen die Oberflächenproteine Ly6G und CD11b gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. In Abb. 11 sind die Ergebnisse einer *Ly6G-Cre*^{+/+}-, einer *Ly6G-Cre*^{ki/+}- und einer *Ly6G-Cre*^{ki/ki}-Maus exemplarisch dargestellt. Die Neutrophilen der *Ly6G-Cre*^{ki/ki}-Maus sind negativ für Ly6G, die der *Ly6G-Cre*^{ki/+}-Maus zeigen eine geringere Fluoreszenz (MFI) im Ly6G-Kanal als die der *Ly6G-Cre*^{+/+}-Maus (MFIs: 474 vs. 9368 vs. 36.616). Im PE-Kanal des Durchflusszytometers, also dem Kanal, dessen Filter am ehesten das Emissionsspektrum von *tdTomato* erfasst, scheint bei der *Ly6G-Cre*^{ki/ki}-Probe eine gering positive Population abgrenzbar. Dies schlägt sich jedoch nicht in der MFI nieder (MFIs: 901 (+/+), 887 (ki/+), 731 (ki/ki)).

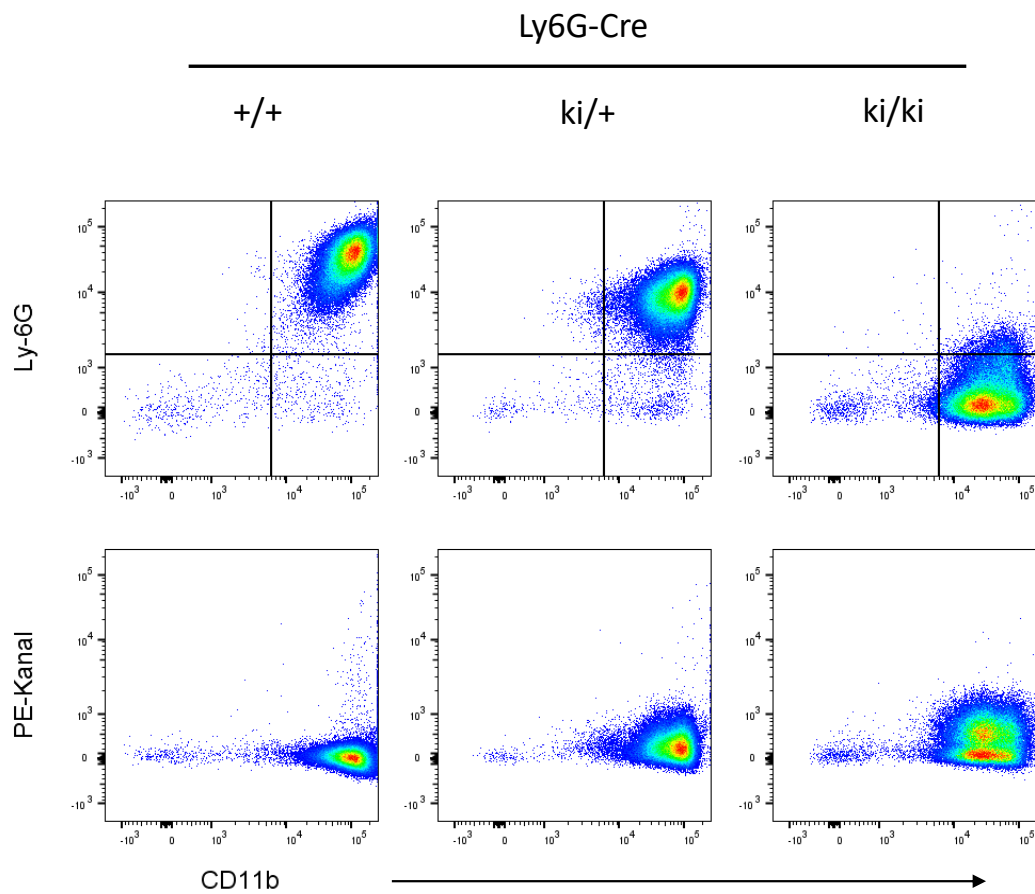


Abbildung 11: Expression von Ly6G und tdTomato in Ly6G-Cre-Mäusen. Aufgereinigte Neutrophile aus Ly6G-Cre^{+/+}- (links), Ly6G-Cre^{ki/+}- (Mitte) und Ly6G-Cre^{ki/ki}- (rechts) Mäusen wurden mit fluoreszierenden Antikörpern gegen CD11b und Ly6G gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist die Fluoreszenz der Ly6G-Antikörper gegen die der CD11b-Antikörper (oben), und die Fluoreszenz im PE-Kanal (=tdTomato) des Durchflusszytometers gegen die Fluoreszenz der CD11b-Antikörper (unten).

3.2 Zelluläre Zusammensetzung von Milz und Knochenmark in Mäusen der *LysM*-Cre Mauslinien

In den Mauslinien *Gnai2^{fl/fl} LysM-Cre*, *Gnai3^{fl/fl} LysM-Cre* und *Gnai2/i3^{fl/fl} LysM-Cre* führt die Kopplung der Cre-Rekombinase an den *LysM*-Promotor zu einer Zelltyp-spezifischen Deletion des *Gnai2*- bzw. *Gnai3*-Gens vorrangig in Granulozyten und Makrophagen. Es sollte untersucht werden, ob der Zelltyp-spezifische Knockout in den genannten Mauslinien die relativen Häufigkeiten von Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen in der Milz und im Knochenmark beeinflusst. Zum Vergleich des Effektes eines Zelltyp-spezifischen Knockouts mit dem Effekt eines globalen Knockouts von $G\alpha_{i2}$ / $G\alpha_{i3}$ wurden zusätzlich *Gnai2^{-/-}* und *Gnai3^{-/-}* Mäuse untersucht.

Hierfür wurden Einzelzellsuspensionen aus Knochenmark und Milz gewonnen, mit fluoreszierenden Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD90, CD19, CD11b, Ly6G und F4/80 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Gatingstrategie hierfür ist in Abb. 12 anhand je einer repräsentativen Probe aus Knochenmark und Milz dargestellt. Kurz gefasst wurden zunächst tote Zellen, Doubletten, Zelldebris und CD90⁺ T-Zellen ausgeschlossen. Zur Identifizierung von Neutrophilen und Eosinophilen wurde weiters die CD19⁻ CD11b⁺ Fraktion betrachtet. Neutrophile waren hierin als Ly6G⁺ SSC^{int} Zellen und Eosinophile als Ly6G⁻ SSC^{hi} Zellen zu erkennen. Zur Identifizierung von Makrophagen wurden in der CD90⁻ Fraktion Ly6G⁻ CD19⁻ Zellen ausgewählt, wobei der Schweif auto-fluoreszenter Zellen (Ly6G^{int} CD19^{int}) eingeschlossen wurde (vgl. Abb. 12a, CD19-Ly6G-Darstellung). Makrophagen waren dann als SSC^{lo} CD11b^{int} F4/80^{hi} Zellen zu erkennen.

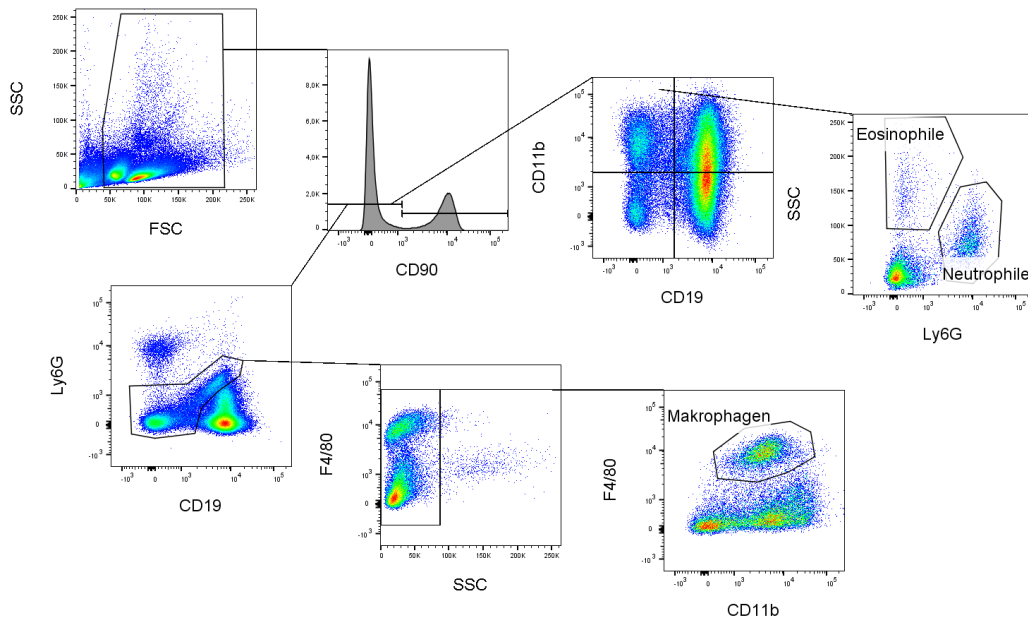
Es wurden im Mittel pro Maus $5,38 \pm 2,07 \times 10^5$ lebende Splenozyten (mindestens $1,92 \times 10^5$) und $3,45 \pm 1,16 \times 10^5$ Knochenmarkzellen (mindestens $1,35 \times 10^5$) im Durchflusszytometer gemessen. Die relativen Häufigkeiten von Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen in den *LysM*-Cre Mauslinien sind in Abb. 13 dargestellt. Für relative Häufigkeit von Neutrophilen in Milz (Abb. 13a) und Knochenmark (Abb. 13b) lässt sich für keine der dargestellten Mauslinien ein signifikanter Unterschied zwischen *LysM*-Cre^{+/+} und *LysM*-Cre^{tg/+} Tieren feststellen. Auch die relative Häufigkeit von Eosinophilen in Milz (Abb. 13c) und Knochenmark (Abb. 13d) unterschied sich nicht in den untersuchten *LysM*-Cre^{+/+} und *LysM*-Cre^{tg/+} Tieren. Schließlich ergab sich für die relative Häufigkeit von Makrophagen in

Milz (Abb. 13e) und Knochenmark (Abb. 13f) ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen *LysM-Cre*^{+/+} und *LysM-Cre*^{tg/+} Tieren.

Die relativen Häufigkeiten von Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen in den *LysM-Cre* Mauslinien sowie in den *Gnai2*^{-/-}- und *Gnai3*^{-/-}-Mauslinien sind in Tab. 5 (Milz) und Tab. 6 (Knochenmark) aufgeführt. In den Milzen der *Gnai2*^{-/-}-Tiere fanden sich signifikant mehr Neutrophile und Eosinophile als in denen der *Gnai2*^{+/+}-Tiere (P<0,001) bei unveränderter Häufigkeit von Makrophagen. In den Milzen der *Gnai3*^{-/-}-Tiere entsprachen die Häufigkeiten von Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen im Rahmen der Messgenauigkeit denen in den Milzen der *Gnai3*^{+/+}-Tiere. Im Knochenmark der *Gnai2*^{-/-}-Tiere fanden sich signifikant mehr Eosinophile und Makrophagen als im Knochenmark der *Gnai2*^{+/+}-Tiere (P<0,001) bei unveränderter Häufigkeit von Neutrophilen. Im Knochenmark der *Gnai3*^{-/-}-Tiere ließ sich keine signifikant veränderte Häufigkeit von Neutrophilen, Eosinophilen oder Makrophagen im Vergleich zu der im Knochenmark der *Gnai3*^{+/+}-Tiere feststellen.

Zusammenfassend konnte in den *LysM*-Mauslinien kein Einfluss des Zelltypspezifischen Knockouts von $G\alpha_{i2}$ und/oder $G\alpha_{i3}$ auf die relative Häufigkeit von Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen in Milz und Knochenmark festgestellt werden.

a) Milz



b) Knochenmark

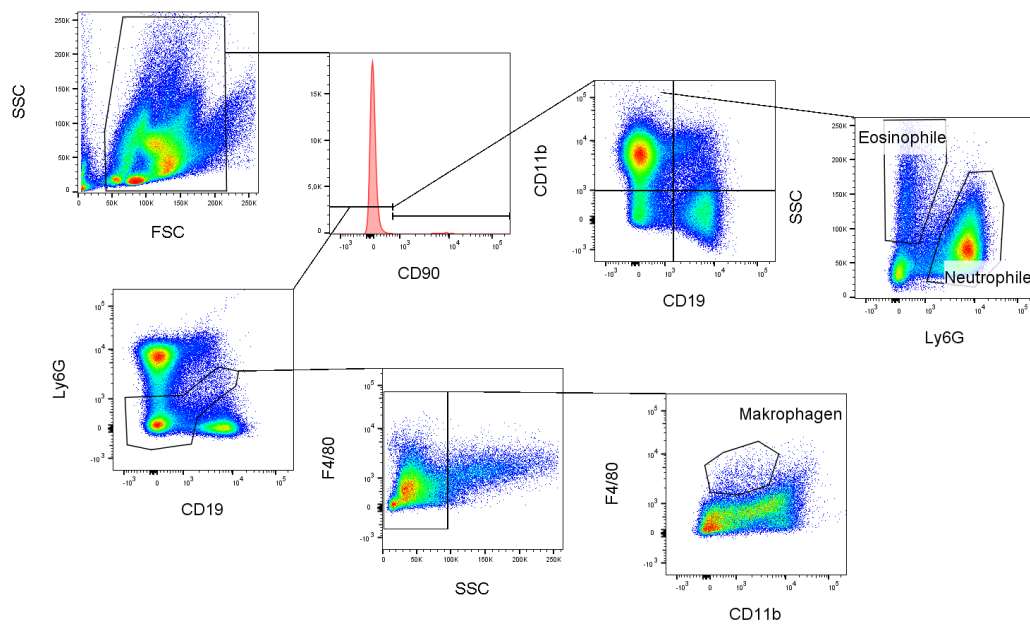


Abbildung 12: Gatingstrategie zur Quantifizierung von Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen in Milz (a) und Knochenmark (b). Dargestellt ist je eine repräsentative Probe. Nach Ausschluss von toten Zellen und Doubletten (nicht dargestellt) wurden zunächst Zelldebris (FSC-SSC-Plot) und T-Zellen (CD90-Histogramm) ausgeschlossen. In der $CD19^- CD11b^+$ Fraktion (CD19-CD11b-Plot) konnten $Ly6G^+ SSC^{int}$ Neutrophile und $Ly6G^- SSC^{hi}$ Eosinophile identifiziert werden (Ly6G-SSC-Plot). Nach Auswahl der $CD19^- Ly6G^-$ Zellen in der $CD90^-$ Fraktion (CD19-Ly6G-Plot) konnten im SSC^- Subset (SSC-F4/80-Plot) Makrophagen als $CD11b^{int} F4/80^{hi}$ Zellen identifiziert werden (CD11b-F4/80-Plot).

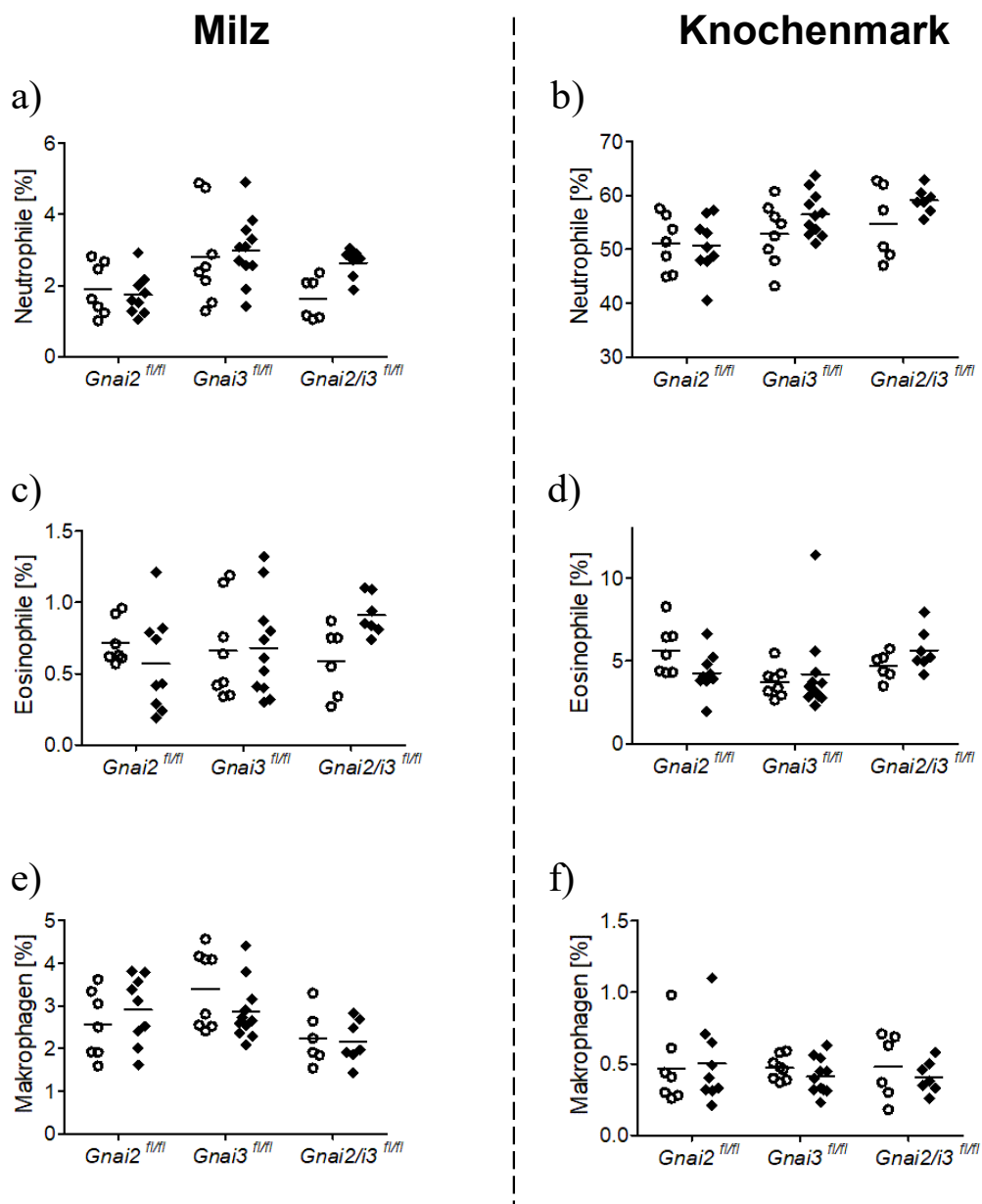


Abbildung 13: Relative Häufigkeiten von Neutrophilen (oben), Eosinophilen (Mitte) und Makrophagen (unten) in Milz (links) und Knochenmark (rechts) von *Gnai2*^{fl/fl} LysM-Cre (n=7-9), *Gnai3*^{fl/fl} LysM-Cre (n=8-11) und *Gnai2/i3*^{fl/fl} LysM-Cre Mäusen (n=6-7). Angegeben als Anteil an Gesamtzellen. ○: LysM-Cre^{+/+}. ◆: LysM-Cre^{tg/+}. Adaptiert aus: Köhler, Beichert et al. (eingereicht)

5: Relative Häufigkeiten von Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen in der Milz von k.o.- bzw. transgenen Mäusen (-/- bzw. tg/+ Mäusen (+/+). Werte angegeben als Anteil an Gesamtzellen (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Genotyp	n		Neutrophile [%]			Eosinophile [%]			Makrophagen [%]	
	+/+	-/-	+/+	-/-	Sig.	+/+	-/-	Sig.	+/+	-/-
	5	5	1,57 \pm 0,47	5,90 \pm 2,84	***	0,41 \pm 0,13	3,28 \pm 1,80	***	3,34 \pm 1,00	2,96 \pm 0,47
	3	2	1,96 \pm 0,33	2,25 \pm 0,28	ns	0,80 \pm 0,59	0,37 \pm 0,10	ns	3,93 \pm 1,11	4,08 \pm 0,40
	+/+	tg/+	+/+	tg/+		+/+	tg/+		+/+	tg/+
^{n/n} LysM-Cre	7	9	1,89 \pm 0,74	1,73 \pm 0,58	ns	0,72 \pm 0,16	0,57 \pm 0,34	ns	2,56 \pm 0,79	2,91 \pm 0,81
^{n/n} LysM-Cre	8	11	2,80 \pm 1,35	2,99 \pm 0,95	ns	0,66 \pm 0,34	0,68 \pm 0,35	ns	3,40 \pm 0,90	2,87 \pm 0,69
ⁱ³ / ^{n/n} LysM-Cre	6	7	1,64 \pm 0,60	2,63 \pm 0,41	ns	0,59 \pm 0,24	0,91 \pm 0,14	ns	2,25 \pm 0,64	2,16 \pm 0,51

anzahl der untersuchten Tiere. Sig.: Signifikanzniveau; ns:nicht signifikant ($P > 0,05$); ***: $P < 0,001$.

relative Häufigkeiten von Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen im **Knochenmark** von k.o.- bzw. transgenen Mäusen und Kontrolltieren (+/+). Werte angegeben als Anteil an Gesamtzellen (Mittelwert \pm Standardabweichung).

	n		Neutrophile [%]			Eosinophile [%]			Makrophagen [%]		
	+/+	-/-	+/+	-/-	Sig.	+/+	-/-	Sig.	+/+	-/-	Sig.
	5	5	47,66 \pm 4,07	49,38 \pm 3,16	ns	2,70 \pm 0,28	10,19 \pm 2,23	***	0,82 \pm 0,33	0,27 \pm 0,08	*
	3	2	53,77 \pm 5,81	54,45 \pm 1,63	ns	4,38 \pm 2,49	2,83 \pm 1,48	ns	0,54 \pm 0,08	0,87 \pm 0,28	r
	+/+	tg/+	+/+	tg/+		+/+	tg/+		+/+	tg/+	
M-Cre	7	9	51,14 \pm 5,09	50,72 \pm 5,21	ns	5,65 \pm 1,50	4,27 \pm 1,27	ns	0,47 \pm 0,26	0,50 \pm 0,28	r
M-Cre	8	11	52,89 \pm 5,69	56,52 \pm 4,09	ns	3,74 \pm 0,91	4,19 \pm 2,55	ns	0,47 \pm 0,08	0,41 \pm 0,13	r
lysM-Cre	6	7	54,78 \pm 6,88	59,07 \pm 2,34	ns	4,68 \pm 0,81	5,64 \pm 1,25	ns	0,48 \pm 0,23	0,41 \pm 0,11	r

untersuchten Tiere. Sig.: Signifikanzniveau. ns: nicht signifikant ($P > 0,05$). ***: $P < 0,001$

3.3 Quantifizierung der phagozytischen Aktivität von $G\alpha_i$ -defizienten Neutrophilen

Es sollte der Effekt einer Defizienz von $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$ oder $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ auf die phagozytische Aktivität¹ von Neutrophilen untersucht werden. Hierzu wurden Leukozyten aus Vollblut von $Gnai2^{fl/fl}$ / $Gnai3^{fl/fl}$ / $Gnai2/i3^{fl/fl}$ *LysM-Cre* Mäusen bei 37 °C in einer Suspension mit fluoreszierenden Latexpartikeln (*FluoSpheres*) inkubiert. Nach zusätzlicher Antikörper-Färbung der Oberflächenmarker CD11b und Ly6G konnten im Durchflusszytometer die Neutrophilen identifiziert werden (Abb. 14a, Mitte). Anhand der Fluoreszenz der Neutrophilen im FITC-Kanal des Durchflusszytometers, der die *FluoSpheres* detektierte, konnten die von Neutrophilen phagozytierten *FluoSpheres* quantifiziert werden (Abb. 14a, rechts).

Um zu verifizieren, dass die gemessene Fluoreszenz im *FluoSpheres*-Kanal tatsächlich von phagozytierten Latexpartikeln und nicht etwa ausschließlich von an der Oberfläche haftenden Latexpartikeln stammte, wurden zunächst Leukozyten für 10, 15, 20 oder 30 min mit *FluoSpheres* inkubiert. Als Negativkontrolle verblieb je Maus eine Leukozytenprobe mit Latexpartikeln für 30 min auf Eis. Hierbei konnte mit zunehmender Inkubationszeit eine kontinuierliche Zunahme der Fluoreszenz im *FluoSpheres*-Kanal beobachtet werden (Abb. 14b).

Für den Vergleich der phagozytischen Aktivitäten von Cre^- - und Cre^+ -Neutrophilen wurden die Proben zunächst für 30 min in PBS^+ oder in fMLP (1 μ M in PBS^+) prä-inkubiert und anschließend für 60 min mit *FluoSpheres* inkubiert. Als Negativkontrolle verblieben je Maus und Prä-Inkubation eine Probe mit *FluoSpheres* für 60 min auf Eis. Zur Kontrolle der Stimulation der Neutrophilen mit fMLP wurden die Daten der Kontrolltiere aller drei untersuchten Genotypen gepoolt und in Abb. 14c dargestellt. Die mittlere Fluoreszenz (MFI) der Negativkontrollen im *FluoSpheres*-Kanal betrug 752 ± 302 (PBS) bzw. 755 ± 271 (fMLP). Durch die Stimulation mit fMLP steigerte sich die MFI der bei 37 °C inkubierten Proben von 3104 ± 1953 auf 4807 ± 1882 ($P < 0,01$).

¹ Als phagozytische Aktivität wird hier die durchschnittliche Anzahl der von Neutrophilen phagozytierten Partikel pro Zeiteinheit bezeichnet.

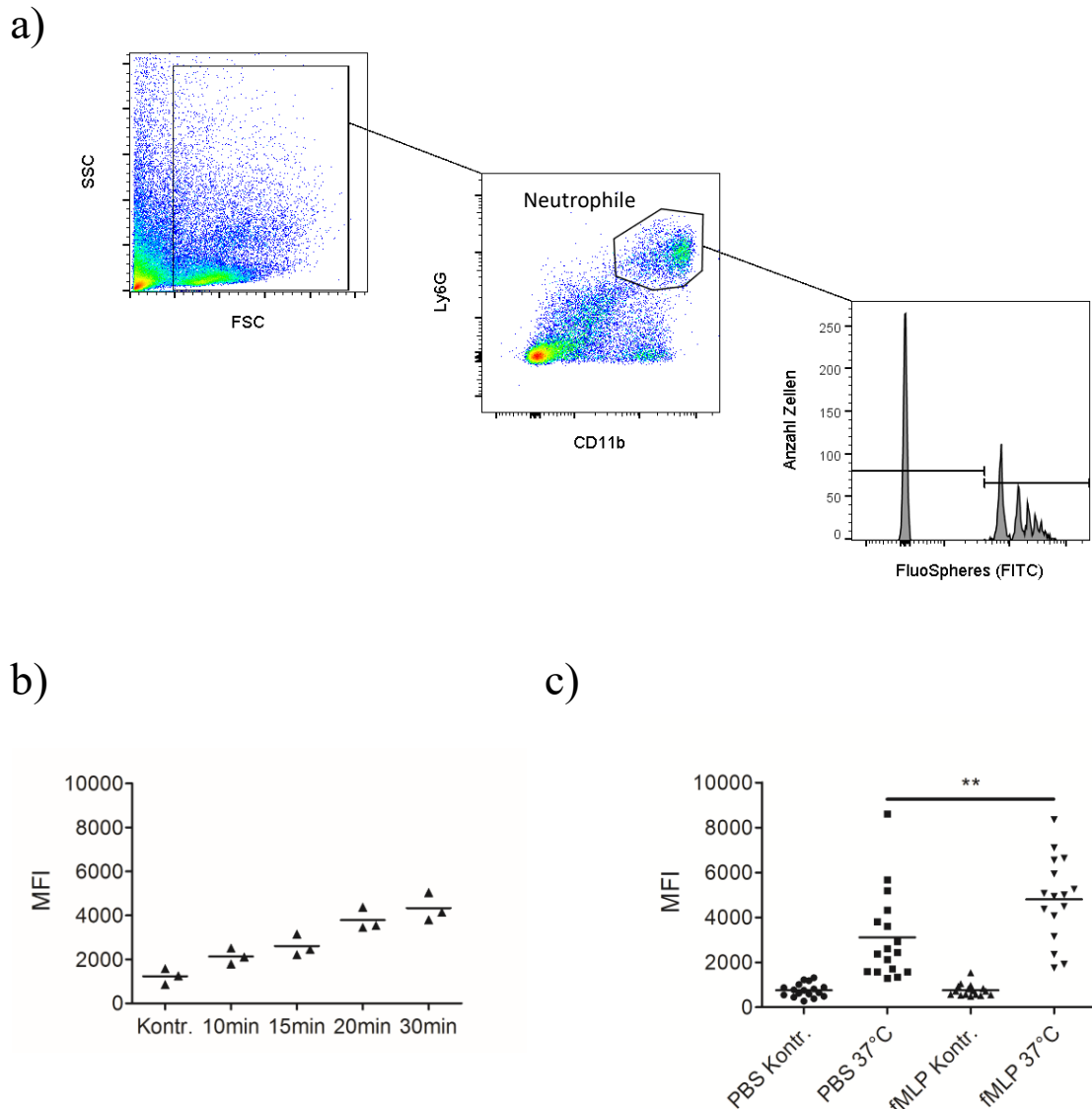


Abbildung 14: Assay zur Quantifizierung der phagozytischen Aktivität von Neutrophilen.

a) Gatingstrategie. Nach doublet-exclusion (nicht abgebildet) und Ausschluss von Zelldebris (links) konnten Neutrophile als $CD11b^+$ $Ly6G^+$ Zellen identifiziert werden (Mitte). Phagozytierte fluoreszente Latexpartikel (FluoSpheres) ließen sich anhand der Fluoreszenz der Neutrophilen im FITC-Kanal (rechts) quantifizieren.

b) Blutleukozyten von Cre-Tieren wurden für die angegebenen Zeiten mit FluoSpheres inkubiert. Als Negativkontrolle (Kontr.) verblieb je Maus eine Probe für 30 min mit FluoSpheres auf Eis. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenz (MFI) der Neutrophilen im FluoSpheres-Kanal. Daten aus einem Experiment ($n=3$).

c) Blutleukozyten von Cre⁻-Tieren der Mauslinien $Gnai2^{fl/fl}$, $Gnai3^{fl/fl}$, und $Gnai2/i3^{fl/fl}$ LysM-Cre wurden für 30 min in PBS oder fMLP ($1\mu M$ in PBS) prä-inkubiert und anschließend für 60 min mit FluoSpheres inkubiert. Als Negativkontrolle (Kontr.) verblieb je Maus und Prä-Inkubation eine Probe für 60 min mit FluoSpheres auf Eis. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenz (MFI) der Neutrophilen im FluoSpheres-Kanal. Horizontale Linien markieren den Mittelwert der jeweiligen Gruppe. Daten aus 10 unabhängigen Experimenten ($n=16$). **: $P < 0,01$

Der Vergleich der phagozytischen Aktivitäten der Cre^- - und Cre^+ -Neutrophilen der drei untersuchten Mauslinien – $Gnai2^{fl/fl}$, $Gnai3^{fl/fl}$ und $Gnai2/i3^{fl/fl}$ $LysM-Cre$ – ist in Abb. 15 dargestellt. Für die $Gnai2^{fl/fl}$ $LysM-Cre$ Mauslinie schienen die Cre^+ -Neutrophilen tendenziell mehr *FluoSpheres* zu phagozytieren als die Cre^- -Neutrophilen, sowohl nach fMLP-Stimulation als auch unstimuliert. Dieser Effekt erwies sich jedoch als nicht statistisch signifikant. Auch für die $Gnai3^{fl/fl}$ $LysM-Cre$ Mauslinie schienen die Cre^+ -Neutrophilen unstimuliert mehr zu phagozytieren als die Cre^- -Neutrophilen ($P > 0,05$, nicht signifikant). Nach fMLP-Stimulation war hingegen kein Unterschied mehr erkennbar. Schließlich schienen auch bei der $Gnai2/i3^{fl/fl}$ $LysM-Cre$ Mauslinie die Cre^+ -Neutrophilen unstimuliert mehr zu phagozytieren als die Neutrophilen aus den Kontrolltieren ($P > 0,05$, nicht signifikant). Zusammenfassend ließ sich kein signifikanter Effekt der Defizienz von $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$ oder $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ auf die phagozytische Aktivität von Neutrophilen feststellen.

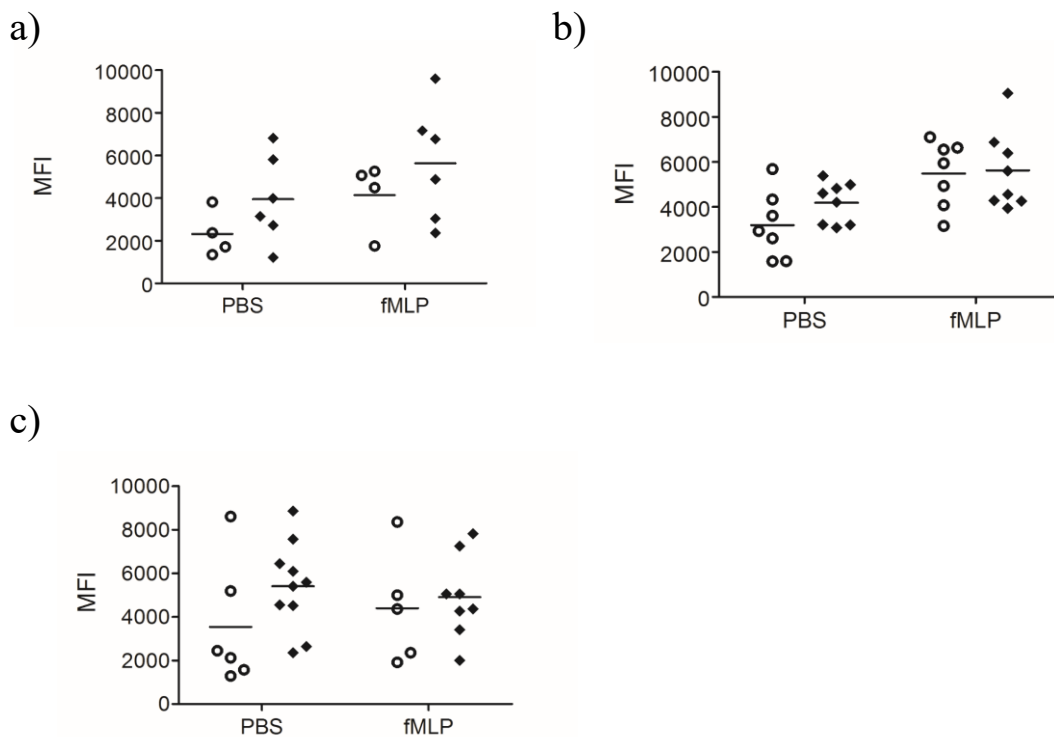


Abbildung 15: Quantifizierung der Phagozytose von *FluoSpheres* durch Neutrophile der *LysM-Cre* Mauslinien. Blutleukozyten von Cre^- - (o) und Cre^+ -Tieren (♦) wurden für 30 min in PBS oder fMLP ($1\mu M$ in PBS) prä-inkubiert und anschließend für 60 min mit *FluoSpheres* inkubiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenz (MFI) der Neutrophilen im *FluoSpheres*-Kanal.

(a) $Gnai2^{fl/fl}$ $LysM-Cre$ Mäuse. Daten aus 2 Experimenten ($n=4-6$).

(b) $Gnai3^{fl/fl}$ $LysM-Cre$ Mäuse. Daten aus 3 Experimenten ($n=7-8$).

(c) $Gnai2/i3^{fl/fl}$ $LysM-Cre$ Mäuse. Daten aus 5 Experimenten ($n=6-10$).

4 Diskussion

4.1 Nachweis des Knockouts von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ in Neutrophilen der *LysM-Cre*- und der *Ly6G-Cre*-Mauslinien

Zur Erzeugung zweier Mausmodelle mit einer Zelltyp-spezifischen Deletion von *Gnai2* / *Gnai3* und damit einem Knockout von $G\alpha_{i2}$ / $G\alpha_{i3}$ in Neutrophilen wurden *Gnai2*^{fl/fl} / *Gnai3*^{fl/fl} / *Gnai2/i3*^{fl/fl} Mäuse mit *LysM-Cre* Mäusen und *Ly6G-Cre*-Mäusen gekreuzt.

Der *LysM*-Lokus der Maus wird spezifisch in myeloischen Zellen exprimiert (Cross & Renkawitz, 1990). In der *LysM-Cre* Mauslinie wird die Cre-Rekombinase daher vor allem in Neutrophilen und Makrophagen und in geringerem Maße auch in dendritischen Zellen exprimiert (Clausen et al., 1999). Der *Ly6G*-Lokus hingegen wird ausschließlich in Neutrophilen exprimiert (Becher et al., 2014). Die *Ly6G-Cre* („Catchup“) Mauslinie ermöglicht also die neutrophilen-spezifische Deletion gefloxter Gene (Hasenberg et al., 2015). Zusätzlich zur Cre-Rekombinase wird in dieser Mauslinie das fluoreszierende Protein tdTomato exprimiert, anhand dessen die Neutrophilen mit dem Fluoreszenzmikroskop oder Durchflusszytometer identifiziert werden können.

Für alle untersuchten Mauslinien – *Gnai2*^{fl/fl}, *Gnai3*^{fl/fl} und *Gnai2/i3*^{fl/fl} *LysM-Cre* sowie *Gnai2*^{fl/fl} und *Gnai3*^{fl/fl} *Ly6G-Cre* – wurden isolierte Neutrophile auf die Deletion der Zielgene und auf den Knockout der Zielproteine hin überprüft.

Die Überprüfung der Deletion der Zielgene erfolgte über den Nachweis des k.o.-Allels bzw. des geflochten Allels *via* PCR. In allen untersuchten Mauslinien konnte in den Cre⁺-Neutrophilen das k.o.-Allel nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass eine Deletion des geflochten Gens, zumindest in einem Teil der Zellen, stattgefunden hatte. Auch konnte eine Abschwächung der Bande des geflochten Allels in den Cre⁺-Neutrophilen beobachtet werden. Allerdings ist die klassische PCR nicht dazu geeignet, die Menge der nachgewiesenen Gensequenz zu ermitteln. Eine Aussage über die Effizienz der Deletion lässt sich mit der hier angewendeten Methode also nicht treffen.

Bei der *Ly6G-Cre* („Catchup“-) Mauslinie codiert das Knock-in-Allel zusätzlich zur Cre-Rekombinase auch für das fluoreszierende Protein tdTomato, welches bei einer Wellenlänge von 554 nm maximal angeregt wird und bei einer Wellenlänge von 581 nm maximal emittiert. Um die Expression der knock-in-Allele zu überprüfen, sollten aus *Ly6G-Cre* Mäusen isolierte Neutrophile im Durchflusszytometer auf Fluoreszenz im

Emissionsspektrum von tdTomato überprüft werden. In dem Kanal des Durchflusszytometers, der am ehesten das Emissionsspektrum von *tdTomato* abdeckte (PE, 564-606 nm), konnte bei den *Ly6G-Cre^{ki/+}* Neutrophilen, und stärker noch bei den *Ly6G-Cre^{ki/ki}* Neutrophilen, Ausläufer mit einer höheren Fluoreszenz gemessen werden, sodass die Expression der knock-in-Allele zumindest in einem Teil der Neutrophilen bestätigt werden konnte. Allerdings konnte die tdTomato⁺ Population nicht eindeutig von der tdTomato⁻ Population abgegrenzt werden, sodass eine Aussage über den Anteil der Neutrophilen, welche das Knock-in-Allel exprimieren, nicht möglich war. Ein möglicher Grund für die nur schwache Fluoreszenz der tdTomato⁺ Population stellt die Tatsache dar, dass die Wellenlängen der Laser des Durchflusszytometers mit 405 nm, 488 nm, und 633 nm zu stark von der idealen Anregungsfrequenz von 554 nm abwichen, sodass das Fluorophor tdTomato nicht effektiv angeregt wurde.

Die Überprüfung des Knockouts der Proteine $G\alpha_{i2}$ bzw. $G\alpha_{i3}$ in Neutrophilen erfolgte mittels Immunoblot. In den drei *LysM-Cre*-Mauslinien konnte mittels densitometrischer Analyse der Immunoblots in den Cre⁺-Neutrophilen eine Verringerung der geflochtenen Proteine um 66 – 78 % ermittelt werden (siehe Abschnitt 3.1.3). In den *Ly6G-Cre*-Mauslinien hingegen konnte keine Verringerung von $G\alpha_{i2}$ bzw. $G\alpha_{i3}$ in den Cre⁺-Neutrophilen festgestellt werden. In der Erstbeschreibung der *LysM-Cre* Mauslinie führte die Kreuzung mit einer Reporter-Mauslinie zur Deletion des geflochtenen Gens in 99 % der Granulozyten (Clausen et al., 1999). Im Rahmen der Erstbeschreibung der *Ly6G-Cre* Mauslinie konnte in der Kreuzung mit einer Reportermauslinie das Reporterprotein, und damit die Expression der Cre-Rekombinase, in 90 % aller CD11b⁺ Ly6G⁺ Neutrophilen nachgewiesen werden (Hasenberg et al., 2015).

Dass in der vorliegenden Arbeit auf Proteinebene eine deutlich geringere Effizienz des Knockouts ermitteltet bzw. im Fall der *Ly6G-Cre* Mäuse gar keine Reduktion des Proteins festgestellt werden konnte, kann an der Reinheit der gewonnenen Neutrophilen gelegen haben. Die immunomagnetisch aufgereinigten Proben bestanden laut durchflusszytometrischer Analyse zu mindestens 85 % ($91,6 \pm 1,3$ %) aus CD11b⁺ Ly6G⁺ Neutrophilen (siehe 3.1.1). Im Umkehrschluss enthielten die Proben also bis zu 15 % Zellen, in denen die Cre-Rekombinase nicht exprimiert wurde und in denen folglich keine Deletion des Zielgens stattgefunden hatte. Jedoch kann die beschriebene Verunreinigung allein die hohe Restmenge an $G\alpha_{i2}$ / $G\alpha_{i3}$ in den Cre⁺-Neutrophilen der *Ly6G-Cre*-Mäuse nicht erklären.

Denkbar ist auch, dass die Detektion einer Restbande in den transgenen bzw. knock-in-Neutrophilen ein Artefakt des Immunoblots darstellt, beispielsweise durch unspezifische Antikörperbindung. Dies erscheint jedoch angesichts des kompletten Fehlens einer Bande in den *Gnai2*^{-/-}- bzw. *Gnai3*^{-/-}-Kontrollen unwahrscheinlich.

In zwei Studien, welche die Effizienz des *LysM*-Cre-vermittelten Knockouts auf Proteinebene ermittelten, indem sie *LysM*-Cre Mäuse mit einer Reportermauslinie kreuzten, konnte das Reporterprotein in 70% der aus der Milz gewonnenen und in 80 % bzw. 93 % der aus dem Blut gewonnen Neutrophilen detektiert werden (Abram, Roberge, Hu, & Lowell, 2014; Jakubzick et al., 2008). Somit konnten diese Studien auf Proteinebene die Aktivität der Cre-Rekombinase ebenfalls nicht in allen Neutrophilen nachweisen, wenn die ermittelten Effizienzen auch über den von uns beobachteten Werten lagen.

In der Erstbeschreibung der *Ly6G*-Cre Mauslinie wird auch eine Kreuzung mit der *Fcgr4*^{fl/fl}-Mauslinie beschrieben, in der eine Verringerung des Zielproteins in Neutrophilen um lediglich 55 % nachgewiesen wurde (Hasenberg et al., 2015). Da die Autoren über Messung der mRNA *via* qPCR eine effektive Deletion des *Fcgr4*-Gens nachweisen konnten, vermuteten sie, dass das *Fcgr4*-Gen schon vor dem *Ly6G*-Lokus exprimiert wird und das so gebildete FcγRIV-Protein so stabil ist, dass es nach der Cre-vermittelten Deletion im Laufe der kurzen Lebensdauer der Neutrophilen nicht vollständig abgebaut wird. Übertragen auf die vorliegende Arbeit könnte diese Hypothese die Restmenge an Gα_{i2} / Gα_{i3} in den Cre⁺-Neutrophilen sowohl der *LysM*-Cre- als auch der *Ly6G*-Cre-Mauslinien erklären. Die Menge an Gα_{i2} / Gα_{i3}, die bereits vor der Expression des *LysM*- bzw. des *Ly6G*-Lokus und damit vor der Cre-vermittelten Deletion der entsprechenden Gene produziert wurde, müsste demnach erst abgebaut werden, bevor eine Verringerung der Proteine messbar wird. Aufgrund der kurzen Lebensdauer der Neutrophilen von wenigen Tagen (Pillay et al., 2010) und möglicherweise auch wegen der Stabilität der Gα_i-Proteine bliebe somit eine Restmenge an Gα_{i2} / Gα_{i3} in isolierten Neutrophilen vorhanden. Dass der Protein-Knockout in den *LysM*-Cre Mäusen effizienter war als in den *Ly6G*-Cre-Mäusen, lässt sich dadurch erklären, dass das *LysM*-Gen schon früher in der Entwicklung des Neutrophilen exprimiert wird als das *Ly6G*-Gen.

4.2 Zelluläre Zusammensetzung von Milz und Knochenmark in Mäusen der *LysM-Cre* Mauslinien

Das *LysM*-Gen wird ausschließlich in Zellen der myeloischen Reihe exprimiert. Die Kopplung der Cre-Rekombinase an den *LysM*-Lokus führt zu einer Deletion gefloxter Gene vornehmlich in Granulozyten und Makrophagen (99% bzw. 95% Vollständigkeit) und in geringerem Maße auch in dendritischen Zellen des Knochenmarks (31 % Vollständigkeit) und der Milz (16 % Vollständigkeit) (Clausen et al., 1999). Granulozyten entwickeln sich im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen. Nach dem Durchlaufen verschiedener Reifestadien verlassen die ausdifferenzierten Zellen das Knochenmark in die Zirkulation (Kruger et al., 2015). Makrophagen lassen sich nach ihrem Ursprung in zwei Gruppen untergliedern. Eine Gruppe entwickelt sich aus Vorläuferzellen im Dottersack und wandert schon im Rahmen der Embryonalentwicklung in ihre Zielorgane ein. Die andere Gruppe entsteht aus Monozyten, die aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark gebildet werden, über die Zirkulation in periphere Organe auswandern und sich erst dort zu Makrophagen ausdifferenzieren (De Kleer, Willems, Lambrecht, & Goriely, 2014).

Um zu überprüfen, ob die Cre-vermittelte Deletion der Gene *Gnai2* bzw. *Gnai3* in Granulozyten und Makrophagen einen Einfluss auf deren Ausreifung im Knochenmark oder Verteilung im Körper hat, wurde die Zusammensetzung des Knochenmarks und der Milz *via* Durchflusszytometrie untersucht. Neutrophile wurden anhand des spezifischen Markers Ly6G in Kombination mit CD11b identifiziert (Becher et al., 2014; Daley, Thomay, Connolly, Reichner, & Albina, 2008; Lagasse & Weissman, 1996). Eosinophile wurden als CD11b⁺ SSC^{hi} Zellen bestimmt (Rose, Misharin, & Perlman, 2012). Makrophagen wurden anhand des Markers F4/80 identifiziert, der von Makrophagen sowohl in der Milz als auch im Knochenmark exprimiert wird (Chow et al., 2011; Leenen, de Bruijn, Voerman, Campbell, & van Ewijk, 1994). Die F4/80⁺ Zellen wiesen eine mittlere bis hohe Dichte an *CD11b* auf, was die Identifikation dieser Zellen als Makrophagen weiter stützt (Leenen et al., 1994). Da F4/80 zum Teil auch von Eosinophilen exprimiert wird (McGarry & Stewart, 1991), wurden diese zuvor über ihre SSC-Eigenschaften ausgeschlossen. In geringerem Maße wurde F4/80 auch auf Monozyten und dendritischen Zellen gefunden (Gordon, Hamann, Lin, & Stacey, 2011).

Zur Einordnung der Ergebnisse der Methode wurden die relativen Häufigkeiten von Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen in Milz und Knochenmark der Kontrolltiere dieser Arbeit mit Werten aus der Literatur verglichen (siehe Tabelle 7). Dabei wurden Studien hinzugezogen, welche die Zusammensetzung der Milz oder des Knochenmarks von wt-Mäusen durch histologische Beurteilung der Morphologie oder *via* Durchflusszytometrie ermittelten.

Tabelle 7: Die zelluläre Zusammensetzung von Milz und Knochenmark in dieser Arbeit und in der Literatur. Vergleich der in dieser Arbeit an Kontrolltieren bestimmten relativen Häufigkeiten von Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen mit Werten aus der Literatur.

	Milz		Knochenmark	
	Kontrolltiere dieser Arbeit	Literatur	Kontrolltiere dieser Arbeit	Literatur
Neutrophile				30,5 % *
		2,0 % *		33,0 % **
	1,57 – 2,80 %	< 5 % †	47,7 – 54,8 %	36,9 % §
				~35 % †
Eosinophile		0,4 % *		2,5 % *
	0,41 – 0,80 %	< 5% ‡	2,70 – 5,65 %	4,0 % **
				5-7 % ‡
Makrophagen	2,25 – 3,93 %	0,1 % *	0,47 – 0,82 %	0,3 % *

* C57BL/ 6J Mäuse (Yang, Büsche, Ganser, & Li, 2013);

** C57BL/6 Mäuse (Antipov, Karpova, Golosov, Novitskii, & Lapina, 1978);

§ C57BL/6 Mäuse (Mitsui et al., 2003);

† C57BL/6 Mäuse (Hasenberg et al., 2015);

‡ BALB/c Mäuse (Dyer, Garcia-Crespo, Killoran, & Rosenberg, 2011)

Die Werte für die relativen Häufigkeiten von Neutrophilen und Eosinophilen in der Milz lagen jeweils im Bereich der Vergleichswerte aus der Literatur. Die Werte für die relative Häufigkeit von Makrophagen in der Milz lagen jedoch deutlich höher als der in der Literatur gefundene Wert. Dies könnte an der Spezifität des Markers F4/80 liegen, anhand dessen wir Zellen als Makrophagen einordneten. Zwar wird dieser Marker am stärksten auf Makrophagen exprimiert, er kann aber auch schwächer auf anderen Zelltypen wie etwa Eosinophilen, Monozyten und dendritischen Zellen nachgewiesen werden (Gordon et al., 2011). Während Eosinophile über ihre SSC-Eigenschaften eindeutig von Makrophagen unterschieden werden konnten, ist es möglich, dass andere in der Milz vorkommende Zelltypen wie Monozyten oder dendritische Zellen fälschlicherweise zu den Makrophagen hinzugezählt wurden.

Die in dieser Arbeit ermittelten Werte für die relative Häufigkeit von Neutrophilen im Knochenmark lagen deutlich über den Vergleichswerten aus der Literatur. Es ist also davon auszugehen, dass bei der Analyse des Knochenmarks systematisch zu viele Zellen als Neutrophile eingeordnet wurden. Mögliche Ursache hierfür ist die Tatsache, dass der Marker Ly6G, der unter reifen Leukozyten als spezifisch für Neutrophile gilt (Becher et al., 2014), im Knochenmark vorübergehend auch auf Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzellen exprimiert wird (Rogers, Driessnack, & Hiltbold Schwartz, 2017). Es besteht also die Möglichkeit, dass die Zellen im Knochenmark, die wir als Neutrophile bezeichneten, tatsächlich aus einer Mischung von Neutrophilen und Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzellen bestanden. Um dies zu verhindern, hätten die Vorläuferzellen über einen Stammzellmarker wie beispielsweise c-Kit identifiziert und ausgeschlossen werden können.

Die Werte für die relativen Häufigkeiten von Eosinophilen im Knochenmark stimmten gut mit den Literaturwerten überein. Wie in der Milz lagen die relativen Häufigkeiten von Makrophagen im Knochenmark jedoch deutlich über dem Literaturwert. Wieder ist eine Verunreinigung des Makrophagen-Gates mit dendritischen Zellen oder Monozyten aufgrund der begrenzten Spezifität des Markers F4/80 denkbar (siehe oben).

Zusammenfassend wurden durch unsere Methode vermutlich die relativen Häufigkeiten von Neutrophilen im Knochenmark sowie von Makrophagen in Milz und Knochenmark überschätzt. Da diese systematische Überschätzung jedoch gleichermaßen in transgenen Tieren und Kontrolltieren stattfand, sind die Daten dennoch für den Vergleich zwischen transgenen Tieren und Kontrolltieren geeignet. Die Sensitivität für die Detektion von

Unterschieden in den relativen Häufigkeiten der betroffenen Zelltypen ist jedoch durch die Verunreinigung mit anderen Zelltypen als geringer einzuschätzen.

Im Vergleich zwischen transgenen Tieren und Kontrolltieren konnten für keine der untersuchten *LysM*-Cre Mauslinien – *Gnai2*^{fl/fl}, *Gnai3*^{fl/fl} und *Gnai2/i3*^{fl/fl} – und Gewebe (Milz und Knochenmark) Unterschiede in den relativen Häufigkeiten der untersuchten Zelltypen (Neutrophile, Eosinophile, Makrophagen) festgestellt werden. In der *Gnai2*^{-/-} Mauslinie hingegen fanden sich signifikant mehr Neutrophile und Eosinophile in den Milzen der k.o.-Tiere als in denen der Kontrolltiere. Im Knochenmark dieser Mäuse waren zudem mehr Eosinophile und weniger Makrophagen in den k.o.-Tieren als in den Kontrolltieren nachweisbar. In der *Gnai3*^{-/-} Mauslinie waren keine Unterschiede zwischen den k.o.-Tieren und den Kontrolltieren festzustellen.

Für die *Gnai2*^{-/-} Mauslinie war für die k.o.-Tiere eine Leukozytose vorherbeschrieben, mit erhöhten Zahlen von Lymphozyten, Monozyten, Neutrophilen und Eosinophilen im Blut (Pero et al., 2007). Die Autoren der zitierten Studie führten diesen Befund auf eine gestörte Diapedese zurück, die durch die Unterbrechung $G\alpha_{i2}$ -abhängiger Signalwege im Endothel verursacht wird. Es ist denkbar, dass die von uns beobachteten erhöhten Zahlen von Neutrophilen und Eosinophilen in der Milz die direkte Folge der erhöhten Zahlen dieser Zellen im Blut sind, da die Milz ein stark perfundiertes Organ ist und möglicherweise als Reservoir für Neutrophilen fungiert (Suratt et al., 2001). Unsere Befunde zur Zusammensetzung des Knochenmarks in den *Gnai2*^{-/-} Tieren jedoch lassen sich so nicht erklären.

4.3 Quantifizierung der phagozytischen Aktivität von $G\alpha_i$ -defizienten Neutrophilen

Eine der Hauptfunktionen von Neutrophilen stellt die Phagozytose von Erregern, toten Zellen und Zellfragmenten dar (Kruger et al., 2015). Hierbei führt ein komplexes Zusammenspiel von Membranlipiden, intrazellulären Signalkaskaden und Reorganisationen des Zytoskeletts dazu, dass ein Partikel außerhalb der phagozytierenden Zelle von deren Zellmembran umschlossen und in einem Phagosom genannten Vesikel in das Zellinnere aufgenommen wird.

Für Makrophagen, die wie Neutrophile Phagozytose betreiben, konnte gezeigt werden, dass die Proteine $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ eine Rolle bei der Koordination des

Phagozytoseprozesses spielen. So führte die Behandlung mit Pertussis-Toxin (PTX), einem Toxin, welches durch die spezifische ADP-Ribosylierung der $G\alpha_i$ -Proteine deren Aktivierung verhindert, zu einer Inhibition der Phagozytose von IgG-opsoniertem *Staphylococcus aureus* durch Makrophagen (Damiani & Colombo, 2001). Eine Studie an *Gnai2*^{-/-} und *Gnai3*^{-/-} Makrophagen stellte eine Beteiligung von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ bei der Phagozytose von Zymosan-Partikeln fest, wobei nur $G\alpha_{i2}$ eine Rolle bei der Phagozytose von Antikörper-besetzten Schaferythrozyten zu spielen schien (Huang et al., 2014). Die Autoren dieser Studie konnten außerdem zeigen, dass sich die $G\alpha_i$ -Proteine im Rahmen der Phagozytose von Zymosan an den sich bildenden Zellfortsätzen und frühen Phagosomen anreicherten und dort möglicherweise über die Rekrutierung weiterer Proteine wie Elmo1 zum Fortgang des Phagozytoseprozesses beitrugen.

Im Gegensatz zu dem beschriebenen Beitrag der $G\alpha_i$ -Proteine zur Phagozytose bei Makrophagen konnte bei Neutrophilen zunächst kein Effekt von PTX – und damit kein Beitrag von $G\alpha_i$ -Proteinen – auf die Phagozytose von IgG-opsonierten oder nicht opsonierten Schaferythrozyten, *Candida albicans* oder Latexpartikeln festgestellt werden (Gresham, Clement, Volanakis, & Brown, 1987; Lad, Olson, & Grewal, 1986). Dem teilweise widersprechend fand eine jüngere Studie an HL-60 Zellen, einem Modell für humane Neutrophile, dass zwar die Phagozytose IgG-opsonierter Partikel durch PTX unbeeinträchtigt, die fMLP-stimulierte Phagozytose nicht opsonierter Partikel hingegen nach PTX-Behandlung nicht mehr möglich war (Wen et al., 2019). Die Autoren begründen dies damit, dass die Phagozytose opsonierter Partikel in Neutrophilen primär über die Bindung der Opsonine an Oberflächenrezeptoren wie Fc- und Komplement-Rezeptoren initiiert werde, welche ihre Signale G-Protein-unabhängig über die Aktivierung von Tyrosinkinasen vermitteln (Futosi & Mócsai, 2016; Underhill & Ozinsky, 2002). Die Opsonin-unabhängige Phagozytose jedoch beruhe auf der Aktivierung der $G\alpha_i$ -gekoppelten Formylpeptidrezeptoren Fpr1 und Fpr2, wie sie an Neutrophilen aus *Fpr1/2*^{-/-} Mäusen zeigten (Wen et al., 2019). Da PTX auf unspezifische Weise alle $G\alpha_i$ -Isotypen inaktiviert, blieb in der Studie jedoch ungewiss, welcher spezifische Isotyp entscheidend für die Opsonin-unabhängige Phagozytose ist. In dieser Arbeit sollte deshalb an Neutrophilen aus *Gnai2*^{fl/fl} / *Gnai3*^{fl/fl} / *Gnai2/i3*^{fl/fl} *LysM-Cre* Tieren der Effekt eines spezifischen Knockouts von $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$ oder $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ auf die Phagozytose nicht-opsonierter Partikel untersucht werden.

Um zu verifizieren, dass der Assay tatsächlich zur Quantifizierung von phagozytierten *FluoSpheres* geeignet ist und die gemessene Fluoreszenz nicht etwa ausschließlich von an der Oberfläche haftenden Latexpartikeln stammt, wurde zunächst in einer Zeitreihe der Einfluss der Inkubationszeit der Zellen mit *FluoSpheres* auf die gemessene Fluoreszenz bestimmt (Abb 14b). Als Negativkontrollen dienten Zellproben, die für die gesamte Inkubationszeit mit *FluoSpheres* auf Eis verblieben, da bei niedrigen Temperaturen Phagozytose nicht, oder nur stark verlangsamt stattfindet (Peterson, Verhoef, & Quie, 1977). Die Neutrophilen aus den Negativkontrollen wiesen eine geringe Fluoreszenz im *FluoSpheres*-Kanal auf. Dies spricht dafür, dass entweder, trotz der niedrigen Temperatur, ein gewisses Maß an Phagozytose stattgefunden hatte, oder, dass nach dem Waschen der Zellproben ein gewisser Teil der nicht phagozytierten Latexpartikel an der Oberfläche der Neutrophilen haften blieb. Die gemessene Fluoreszenz der bei 37 °C inkubierten Proben steigerte sich mit zunehmender Inkubationszeit kontinuierlich bis nach 30-minütiger Inkubationszeit die Fluoreszenz etwa auf das 4-fache der Fluoreszenz der Negativkontrollen angestiegen war. Daraus lässt sich schließen, dass nach einer Inkubationszeit von mindesten 30 min ein Großteil der gemessenen Fluoreszenz von phagozytierten *FluoSpheres* stammte.

Für den Vergleich der phagozytischen Aktivitäten von Cre⁻- und Cre⁺-Neutrophilen wurde deshalb eine Inkubationszeit von 60 min gewählt. Um zu überprüfen, ob die prä-Inkubation mit fMLP bei Cre⁻-Neutrophilen, wie erwartet, zu einer Steigerung der phagozytischen Aktivität führte, wurden die Daten der Kontrolltiere aller drei untersuchten Genotypen gepoolt (Abb. 14c). Die mit fMLP prä-inkubierten Neutrophilen wiesen im Vergleich zu den mit PBS prä-inkubierten Neutrophilen eine signifikant gesteigerte Fluoreszenz im *FluoSpheres*-Kanal auf (P<0,01). Daraus lässt sich schließen, dass, entsprechend unseren Erwartungen, die prä-Inkubation mit fMLP zu einer Steigerung der phagozytischen Aktivität der Cre⁻-Neutrophilen führte.

Im Vergleich zwischen Cre⁻- und Cre⁺-Neutrophilen stellten wir für keine der untersuchten Mauslinien – *Gnai2*^{fl/fl}, *Gnai3*^{fl/fl} und *Gnai2/i3*^{fl/fl} *LysM-Cre* – einen signifikanten Unterschied in der phagozytischen Aktivität fest, unabhängig von der Prä-Inkubation mit PBS oder fMLP. Der Tendenz nach wiesen die Cre⁺-Neutrophilen entgegen unserer Erwartung eine höhere phagozytische Aktivität auf. Jedoch wiesen die

Daten eine große interindividuelle Streuung auf, sodass bei der in dieser Arbeit untersuchten Anzahl an Versuchstieren nur ein sehr starker Effekt der Defizienz von $G\alpha_{i2}$ / $G\alpha_{i3}$ / $G\alpha_{i2/i3}$ auf die phagozytische Aktivität der Neutrophilen hätte nachgewiesen werden können.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Neutrophile Granulozyten sind die im Körper am häufigsten vorkommenden Immunzellen. Sie sind unverzichtbar für die effektive Immunabwehr gegen Mikroben wie Bakterien und Pilze und können hierfür auf eine Reihe von anti-mikrobiellen Mechanismen zurückgreifen. Neutrophile sind jedoch auch an der Entstehung verschiedener akuter und chronischer Krankheiten beteiligt.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind im Körper ubiquitär vertreten und vermitteln Zellantworten auf verschiedenste Stimuli. In Neutrophilen sind G-Proteine des Subtyps G_i am stärksten vertreten und vermitteln zentrale Funktionen wie Chemotaxis, Transmigration, Superoxidproduktion und Phagozytose. Der jeweilige Beitrag der Isoformen G_{i2} und G_{i3} hierbei ist jedoch bisher noch unzureichend aufgeklärt.

Um die Erforschung der spezifischen Funktionen der Isoformen G_{i2} und G_{i3} in Neutrophilen *in vivo* zu ermöglichen, wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sandra Beer-Hammer mithilfe des Cre-loxP-Systems Mauslinien mit einem Neutrophilen-spezifischen Knockout für $G\alpha_{i2}$ und/oder $G\alpha_{i3}$ erzeugt. Es wurden parallel zwei Cre-exprimierende Mauslinien erprobt, zum einen die gut etablierte *LysM*-Cre Mauslinie, zum anderen die neuere, als spezifischer beschriebene, *Ly6G*-Cre Mauslinie.

Es sollte zunächst die Effektivität der Cre-vermittelten Deletion der Zielgene *Gnai2* und/oder *Gnai3* bzw. des Knockouts der Proteine $G\alpha_{i2}$ und/oder $G\alpha_{i3}$ in den Neutrophilen der neu erzeugten Mauslinien ermittelt werden. Hierfür wurden Neutrophile aus Tieren der verschiedenen Mauslinien isoliert und *via* PCR auf das Vorhandensein der Gene *Gnai2* und/oder *Gnai3* sowie *via* Western Blot auf das Vorhandensein der entsprechenden Proteine $G\alpha_{i2}$ und/oder $G\alpha_{i3}$ überprüft. Für die Mauslinien *Gnai2*^{fl/fl} *LysM*-Cre, *Gnai3*^{fl/fl} *LysM*-Cre und *Gnai2*^{fl/fl} *Gnai3*^{fl/fl} *LysM*-Cre konnte auf genomischer Ebene eine effektive Deletion der Zielgene nachgewiesen werden. Auch auf Proteinebene konnte mit einer Reduktion der Konzentrationen von $G\alpha_{i2}/G\alpha_{i3}$ um 66 – 78 % eine Effektivität des Knockouts nachgewiesen werden, welche mit den in der Literatur angegebenen Werten vergleichbar ist. Für die Mauslinien *Gnai2*^{fl/fl} *Ly6G*-Cre und *Gnai3*^{fl/fl} *Ly6G*-Cre zeigte sich zwar auch auf genomischer Ebene eine effektive Deletion der Zielgene, jedoch war auf Proteinebene keine Reduktion von $G\alpha_{i2}/G\alpha_{i3}$ nachweisbar. Der Unterschied in der Effektivität des Knockouts in den *LysM*-Cre und den *Ly6G*-Cre Mauslinien lässt sich möglicherweise durch den späteren Zeitpunkt der Expression von *Ly6G* in der

Entwicklung des Neutrophilen erklären. Zusammenfassend konnte in den *LysM-Cre* Mauslinien, jedoch nicht in den *Ly6G-Cre* Mauslinien, ein effektiver Knockout der Proteine $G\alpha_{i2}$ und/oder $G\alpha_{i3}$ nachgewiesen werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der Neutrophilen-spezifische Knockout von $G\alpha_{i2}$ und/oder $G\alpha_{i3}$ einen Einfluss auf die Ausreifung der Zellen im Knochenmark oder deren Verteilung im Körper hat. Hierfür wurde die Zusammensetzung von Knochenmark und Milz im Durchflusszytometer untersucht. Da im ersten Teil dieser Arbeit ein effektiver Knockout von $G\alpha_{i2}/G\alpha_{i3}$ nur in den *LysM-Cre* Mauslinien festgestellt werden konnte, wurden die *Ly6G-Cre* Mauslinien nicht weiter untersucht. Es wurde der relative Anteil von Neutrophilen Granulozyten, Eosinophilen Granulozyten und Makrophagen an der Gesamtheit der Knochenmarkszellen und Milzzellen ermittelt. In *Gnai2^{-/-}* Mäusen mit einem globalen Knockout von $G\alpha_{i2}$ konnten mit dieser Methode vorbekannte Auffälligkeiten in der Verteilung der Leukozyten reproduziert werden. In den Mauslinien *Gnai2^{fl/fl} LysM-Cre*, *Gnai3^{fl/fl} LysM-Cre* und *Gnai2^{fl/fl} Gnai3^{fl/fl} LysM-Cre* konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in den relativen Häufigkeiten von Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen in Knochenmark und Milz festgestellt werden. Ein Effekt des Neutrophilen-spezifischen Knockouts von $G\alpha_{i2}$ und/oder $G\alpha_{i3}$ auf die Ausreifung von Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen im Knochenmark oder auf deren Verteilung im Körper erscheint somit unwahrscheinlich.

Schließlich sollte der jeweilige Beitrag der Isoformen $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ zur Phagozytose von Neutrophilen ermittelt werden. Hierfür wurde in einem funktionellen *ex vivo* Assay die Phagozytose von fluoreszierenden Latexpartikeln durch $G\alpha_{i2}$ - und/oder $G\alpha_{i3}$ -defiziente Neutrophile mit oder ohne vorhergehende Stimulation durch fMLP im Durchflusszytometer quantifiziert. Entgegen der Erwartung konnte kein signifikanter Effekt des Knockouts von $G\alpha_{i2}$ und/oder $G\alpha_{i3}$ auf die phagozytische Aktivität der Neutrophilen festgestellt werden, unabhängig von der vorherigen Stimulation mit fMLP. Die Daten wiesen jedoch eine große interindividuelle Streuung auf, sodass bei der gegebenen Anzahl an untersuchten Versuchstieren nur ein sehr starker Effekt der Defizienz von $G\alpha_{i2}$ und/oder $G\alpha_{i3}$ auf die phagozytische Aktivität der Neutrophilen hätte nachgewiesen werden können.

Zusammenfassend konnte durch diese Arbeit gezeigt werden, dass mit der Erzeugung der Mauslinien *Gnai2^{fl/fl} LysM-Cre*, *Gnai3^{fl/fl} LysM-Cre* und *Gnai2^{fl/fl} Gnai3^{fl/fl} LysM-Cre* Mausmodelle geschaffen wurden, in welchen es zu einem zuverlässigen Knockout der

Proteine $G\alpha_{i2}$ und/oder $G\alpha_{i3}$ in Neutrophilen Granulozyten kommt, ohne dass hierdurch die Ausreifung im Knochenmark oder Verteilung im Körper gestört wird. Tiere dieser Mauslinien eignen sich also einerseits als Spender für $G\alpha_{i2}$ - und/oder $G\alpha_{i3}$ -defiziente Neutrophile, anhand derer *ex vivo* Untersuchungen zur spezifischen Bedeutung der Isoformen $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ für die Funktionen der Neutrophilen durchgeführt werden können. Andererseits sind die Tiere dieser Mauslinien geeignet für *in vivo* Studien. So kann zum einen der Effekt einer Defizienz von $G\alpha_{i2}$ und/oder $G\alpha_{i3}$ in Neutrophilen auf die Funktion des Immunsystems, etwa im Rahmen von Infektionsmodellen, ermittelt werden. Schließlich wird auch die Untersuchung der Bedeutung von $G\alpha_{i2}$ und oder $G\alpha_{i3}$ in Neutrophilen für die Entstehung von Neutrophilen-assoziierten Erkrankungen durch die Mauslinien ermöglicht.

Veröffentlichungen

Ergebnisse dieser Arbeit werden veröffentlicht unter:

Köhler, D., **Beichert, L.**, Killinger, S., Grothe, D., Weigelin, B., Eggstein, C.,
Devanathan, V., Barth, H., Rosenberger, P., Beer-Hammer, S., Nürnberg, B. Treatment
with $G\alpha_{i2}$ -specific antibodies protects from cardiac reperfusion injury.

Manuskript in Vorbereitung

Literaturverzeichnis

- Abram, C. L., Roberge, G. L., Hu, Y., & Lowell, C. A. (2014). Comparative analysis of the efficiency and specificity of myeloid-Cre deleting strains using ROSA-EYFP reporter mice. *Journal of Immunological Methods*, *408*, 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.05.009>
- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D., & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annual Review of Immunology*, *30*(1), 459–489. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074942>
- Antipov, I. G., Karpova, G. V., Golosov, O. S., Novitskii, V. V., & Lapina, G. N. (1978). Characteristics of the blood system of inbred and mongrel mice. *Biulleten 'eksperimental'noi Biologii i Meditsiny*, *85*(4), 501.
- Baggiolini, M., Dewald, B., & Moser, B. (1997). Human Chemokines: An Update. *Annual Review of Immunology*, *15*(1), 675–705. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.675>
- Becher, B., Schlitzer, A., Chen, J., Mair, F., Sumatoh, H. R., Teng, K. W. W., ... Newell, E. W. (2014). High-dimensional analysis of the murine myeloid cell system. *Nature Immunology*, *15*(12), 1181–1189. <https://doi.org/10.1038/ni.3006>
- Bedard, K., & Krause, K.-H. (2007). The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews*, *87*(1), 245–313. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>
- Beer-Hammer, S., Lee, S. C., Mauriac, S. A., Leiss, V., Groh, I. A. M., Novakovic, A., ... Rüttiger, L. (2018). Ga i Proteins are Indispensable for Hearing. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *47*(4), 1509–1532. <https://doi.org/10.1159/000490867>
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S. ., ... Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, *303*(5663), 1532–1535. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>
- Chow, A., Lucas, D., Hidalgo, A., Méndez-Ferrer, S., Hashimoto, D., Scheiermann, C., ... Frenette, P. S. (2011). Bone marrow CD169⁺ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *Journal of Experimental Medicine*, *208*(2), 761–771. <https://doi.org/10.1084/jem.20101688>
- Clausen, B. E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R., & Förster, I. (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Research*, *8*(4), 265–277. <https://doi.org/10.1023/A:1008942828960>
- Cross, M., & Renkawitz, R. (1990). Repetitive sequence involvement in the duplication and divergence of mouse lysozyme genes. *The EMBO Journal*, *9*(4), 1283–1288. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08237.x>
- Daley, J. M., Thomay, A. A., Connolly, M. D., Reichner, J. S., & Albina, J. E. (2008). Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *Journal of Leukocyte Biology*, *83*(1), 64–70. <https://doi.org/10.1189/jlb.0407247>
- Damiani, M. T., & Colombo, M. I. (2001). Involvement of heterotrimeric G proteins in phagocytosis and recycling from the phagosomal compartment. *Experimental Cell Research*, *271*(1), 189–199. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5354>
- De Kleer, I., Willems, F., Lambrecht, B., & Goriely, S. (2014). Ontogeny of myeloid cells. *Frontiers in Immunology*, *5*(AUG), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00423>
- Donadiou, J., Fenneteau, O., Beaupain, B., Mahlaoui, N., & Chantelot, C. B. (2011). Congenital neutropenia: Diagnosis, molecular bases and patient management. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *6*(1), 1–28. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-26>

- Dyer, K. D., Garcia-Crespo, K. E., Killoran, K. E., & Rosenberg, H. F. (2011). Antigen profiles for the quantitative assessment of eosinophils in mouse tissues by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 369(1–2), 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.04.009>
- Ezan, J., Lasvaux, L., Gezer, A., Novakovic, A., May-Simera, H., Belotti, E., ... Montcouquiol, M. (2013). Primary cilium migration depends on G-protein signalling control of subapical cytoskeleton. *Nature Cell Biology*, 15(9), 1107–1115. <https://doi.org/10.1038/ncb2819>
- Futosi, K., & Mócsai, A. (2016). Tyrosine kinase signaling pathways in neutrophils. *Immunological Reviews*, 273(1), 121–139. <https://doi.org/10.1111/imr.12455>
- Gohla, A., Klement, K., Piekorz, R. P., Pexa, K., Vom Dahl, S., Spicher, K., ... Nürnberg, B. (2007). An obligatory requirement for the heterotrimeric G protein Gi3 in the antiautophagic action of insulin in the liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(8), 3003–3008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611434104>
- Gordon, S., Hamann, J., Lin, H. H., & Stacey, M. (2011). F4/80 and the related adhesion-GPCRs. *European Journal of Immunology*, 41(9), 2472–2476. <https://doi.org/10.1002/eji.201141715>
- Gresham, H. D., Clement, L. T., Volanakis, J. E., & Brown, E. J. (1987). Cholera toxin and pertussis toxin regulate the Fc receptor-mediated phagocytic response of human neutrophils in a manner analogous to regulation by monoclonal antibody 1C2. *Journal of Immunology*, 139(12), 4159–4166.
- Grommes, J., & Soehnlein, O. (2011). Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Molecular Medicine*, 17(3–4), 293–307. <https://doi.org/10.2119/molmed.2010.00138>
- Guo, R.-F., & Ward, P. A. (2005). Role of C5a in Inflammatory Responses. *Annual Review of Immunology*, 23(1), 821–852. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115835>
- Hasenberg, A., Hasenberg, M., Männ, L., Neumann, F., Borkenstein, L., Stecher, M., ... Gunzer, M. (2015). Catchup: A mouse model for imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes. *Nature Methods*, 12(5), 445–452. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3322>
- Huang, N.-N., Becker, S., Boullaran, C., Kamenyeva, O., Vural, A., Hwang, I.-Y., ... Kehrl, J. H. (2014). Canonical and Noncanonical G-Protein Signaling Helps Coordinate Actin Dynamics To Promote Macrophage Phagocytosis of Zymosan. *Molecular and Cellular Biology*, 34(22), 4186–4199. <https://doi.org/10.1128/MCB.00325-14>
- Iizawa, O., Akamatsu, H., & Niwa, Y. (1995). Neutrophil chemotaxis, phagocytosis, and generation of reaction oxygen species show a hierarchy of responsiveness to increasing concentrations of N-formyl-Met-Leu-Phe. *Biological Signals*, 4(1), 14–18. <https://doi.org/10.1159/000109415>
- Jakubzick, C., Bogunovic, M., Bonito, A. J., Kuan, E. L., Merad, M., & Randolph, G. J. (2008). Lymph-migrating, tissue-derived dendritic cells are minor constituents within steady-state lymph nodes. *Journal of Experimental Medicine*, 205(12), 2839–2850. <https://doi.org/10.1084/jem.20081430>
- Jantzen, H. M., Milstone, D. S., Gousset, L., Conley, P. B., & Mortensen, R. M. (2001). Impaired activation of murine platelets lacking Gai2. *Journal of Clinical Investigation*, 108(3), 477–483. <https://doi.org/10.1172/JCI12818>
- Jiang, M., Spicher, K., Boulay, G., Martín-Requero, A., Dye, C. A., Rudolph, U., & Birnbaumer, L. (2002). Mouse Gene Knockout Knockin Strategies in Application to α Subunits of Gi/Go Family of G Proteins. In *Methods in Enzymology* (pp. 277–298). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)44721-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)44721-0)

- Kamp, M. E., Liu, Y., & Kortholt, A. (2016). Function and regulation of heterotrimeric G proteins during chemotaxis. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(1). <https://doi.org/10.3390/ijms17010090>
- Kaziro, Y., Itoh, H., Kozasa, T., Nakafuku, M., & Satoh, T. (1991). Structure and Function of Signal-Transducing GTP-Binding Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, *60*(1), 349–400. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.60.070191.002025>
- Kehrl, J. H. (2016). The impact of RGS and other G-protein regulatory proteins on Gai-mediated signaling in immunity. *Biochemical Pharmacology*, *114*, 40–52. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.04.005>
- Köhler, D., Devanathan, V., De Franz, C. B. O., Eldh, T., Novakovic, A., Roth, J. M., ... Nürnberg, B. (2014). Gai2- and Gai3-deficient mice display opposite severity of myocardial ischemia reperfusion injury. *PLoS ONE*, *9*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098325>
- Kolaczowska, E., & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, *13*(3), 159–175. <https://doi.org/10.1038/nri3399>
- Kruger, P., Saffarzadeh, M., Weber, A. N. R., Rieber, N., Radsak, M., von Bernuth, H., ... Hartl, D. (2015). Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLoS Pathogens*, *11*(3), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004651>
- Kuwano, Y., Adler, M., Zhang, H., Groisman, A., & Ley, K. (2016). Gai2 and Gai3 Differentially Regulate Arrest from Flow and Chemotaxis in Mouse Neutrophils. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *196*(9), 3828–3833. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500532>
- Lad, P. M., Olson, C. V., & Grewal, I. S. (1986). A step sensitive to pertussis toxin and phorbol ester in human neutrophils regulates chemotaxis and capping but not phagocytosis. *FEBS Letters*, *200*(1), 91–96. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)80517-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)80517-8)
- Lagasse, E., & Weissman, I. L. (1996). Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. *Journal of Immunological Methods*, *197*(1–2), 139–150. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(96\)00138-X](https://doi.org/10.1016/0022-1759(96)00138-X)
- Lämmermann, T., Afonso, P. V., Angermann, B. R., Wang, J. M., Kastenmüller, W., Parent, C. A., & Germain, R. N. (2013). Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo. *Nature*, *498*(7454), 371–375. <https://doi.org/10.1038/nature12175>
- Leenen, P. J. M., de Bruijn, M. F. T. R., Voerman, J. S. A., Campbell, P. A., & van Ewijk, W. (1994). Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies. *Journal of Immunological Methods*, *174*(1–2), 5–19. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90005-1](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90005-1)
- Leopoldt, D., Harteneck, C., & Nürnberg, B. (1997). G Proteins endogenously expressed in Sf 9 cells: Interactions with mammalian histamine receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *356*(2), 216–224. <https://doi.org/10.1007/PL00005044>
- Ley, K., Hoffman, H. M., Kubes, P., Cassatella, M. A., Zychlinsky, A., Hedrick, C. C., & Catz, S. D. (2018). Neutrophils: New insights and open questions. *Science Immunology*, *3*(30). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat4579>
- Martin, C., Burdon, P. C. E., Bridger, G., Gutierrez-Ramos, J. C., Williams, T. J., & Rankin, S. M. (2003). Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity*, *19*(4), 583–593. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00263-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00263-2)
- McGarry, M. P., & Stewart, C. C. (1991). Murine eosinophil granulocyte bind the murine macrophage-monocyte specific monoclonal antibody F4/80. *Journal of Leukocyte Biology*, *50*(5), 471–478. <https://doi.org/10.1002/jlb.50.5.471>

- Minetti, G. C., Feige, J. N., Bombard, F., Heier, A., Morvan, F., Nurnberg, B., ... Fornaro, M. (2014). G α i2 Signaling Is Required for Skeletal Muscle Growth, Regeneration, and Satellite Cell Proliferation and Differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 34(4), 619–630. <https://doi.org/10.1128/mcb.00957-13>
- Mitsui, T., Watanabe, S., Taniguchi, Y., Hanada, S., Ebihara, Y., Sato, T., ... Tsuji, K. (2003). Impaired neutrophil maturation in truncated murine G-CSF receptor-transgenic mice. *Blood*, 101(8), 2990–2995. <https://doi.org/10.1182/blood.V101.8.2990>
- Monk, P. N., Scola, A. M., Madala, P., & Fairlie, D. P. (2007). Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. *British Journal of Pharmacology*, 152(4), 429–448. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707332>
- Ogle, J. D., Noel, J. G., Sramkoski, R. M., Ogle, C. K., & Alexander, J. W. (1990). Effects of chemotactic peptide f-met-leu-phe (FMLP) on C3b receptor (CR1) expression and phagocytosis of microspheres by human neutrophils. *Inflammation*, 14(3), 337–353. <https://doi.org/10.1007/BF00915817>
- Pero, R. S., Borchers, M. T., Spicher, K., Ochkur, S. I., Sikora, L., Rao, S. P., ... Lee, J. J. (2007). G α i2-mediated signaling events in the endothelium are involved in controlling leukocyte extravasation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(11), 4371–4376. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700185104>
- Peterson, P. K., Verhoef, J. A. N., & Quie, P. G. (1977). Influence of temperature on opsonization and phagocytosis of staphylococci. *Infection and Immunity*, 15(1), 175–179.
- Pierce, K. L., Premont, R. T., & Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(9), 639–650. <https://doi.org/10.1038/nrm908>
- Pillay, J., Den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L. M., De Boer, R. J., Borghans, J. A. M., ... Koenderman, L. (2010). In vivo labeling with 2 H $_2$ O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*, 116(4), 625–627. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-259028>
- Plummer, N. W., Spicher, K., Malphurs, J., Akiyama, H., Abramowitz, J., Nurnberg, B., & Birnbaumer, L. (2012). Development of the mammalian axial skeleton requires signaling through the G α i subfamily of heterotrimeric G proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(52), 21366–21371. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219810110>
- Rogers, P. B., Driessnack, M. G., & Hiltbold Schwartz, E. (2017). Analysis of the developmental stages, kinetics, and phenotypes exhibited by myeloid cells driven by GM-CSF in vitro. *PLoS ONE*, 12(7), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181985>
- Rose, S., Misharin, A., & Perlman, H. (2012). A novel Ly6C/Ly6G-based strategy to analyze the mouse splenic myeloid compartment. *Cytometry Part A*, 81 A(4), 343–350. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22012>
- Rudolph, U., Finegold, M. J., Rich, S. S., Harriman, G. R., Srinivasan, Y., Brabet, P., ... Birnbaumer, L. (1995). Ulcerative colitis and adenocarcinoma of the colon in G α i2-deficient mice. *Nature Genetics*, 10(2), 143–150. <https://doi.org/10.1038/ng0695-143>
- Schofield, Z. V., Woodruff, T. M., Halai, R., Wu, M. C. L., & Cooper, M. A. (2013). Neutrophils - A key component of ischemia-reperfusion injury. *Shock*, 40(6), 463–470. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000044>
- Segal, B. H. M. D., Leto, T. L. P. D., Gallin, J. I. M. D., Malech, H. L. M. D., & Holland, S. M. M. D. (2000). Genetic, Biochemical, and Clinical Features of Chronic Granulomatous Disease. *Medicine*, 79(3), 170–200.
- Sternberg, N., & Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *Journal of Molecular Biology*, 150(4), 467–486. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90375-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90375-2)

- Suratt, B. T., Young, S. K., Lieber, J., Nick, J. A., Henson, P. M., & Worthen, G. S. (2001). Neutrophil maturation and activation determine anatomic site of clearance from circulation. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 281(4 25-4), 913–921. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2001.281.4.1913>
- Surve, C. R., Lehmann, D., & Smrcka, A. V. (2014). A chemical biology approach demonstrates G protein $\beta\gamma$ subunits are sufficient to mediate directional neutrophil chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry*, 289(25), 17791–17801. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.576827>
- Syrovatkina, V., Alegre, K. O., Dey, R., & Huang, X. Y. (2016). Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 428(19), 3850–3868. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.002>
- Underhill, D. M., & Ozinsky, A. (2002). Phagocytosis of Microbes: Complexity in Action. *Annual Review of Immunology*, 20(1), 825–852. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.103001.114744>
- Weis, W. I., & Kobilka, B. K. (2018). The Molecular Basis of G Protein–Coupled Receptor Activation. *Annual Review of Biochemistry*, 87(1), 897–919. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033910>
- Wen, X., Xu, X., Sun, W., Chen, K., Pan, M., & Ming, J. (2019). *G-protein – coupled formyl peptide receptors play a dual role in neutrophil chemotaxis and bacterial phagocytosis*. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-06-0358>
- Wettschureck, N., & Offermanns, S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiological Reviews*, 85(4), 1159–1204. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2005>
- Wiege, K., Le, D. D., Syed, S. N., Ali, S. R., Novakovic, A., Beer-Hammer, S., ... Gessner, J. E. (2012). Defective Macrophage Migration in G i2- but Not G i3-Deficient Mice. *The Journal of Immunology*, 189(2), 980–987. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200891>
- Wiege, Kristina, Ali, S. R., Gewecke, B., Novakovic, A., Konrad, F. M., Pexa, K., ... Gessner, J. E. (2013). Gai2 is the essential gai protein in immune complex-induced lung disease. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 190(1), 324–333. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201398>
- Yáñez, A., Coetzee, S. G., Olsson, A., Muench, D. E., Berman, B. P., Hazelett, D. J., ... Goodridge, H. S. (2017). Granulocyte-Monocyte Progenitors and Monocyte-Dendritic Cell Progenitors Independently Produce Functionally Distinct Monocytes. *Immunity*, 47(5), 890–902.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.10.021>
- Yang, M., Büsche, G., Ganser, A., & Li, Z. (2013). Morphology and quantitative composition of hematopoietic cells in murine bone marrow and spleen of healthy subjects. *Annals of Hematology*, 92(5), 587–594. <https://doi.org/10.1007/s00277-012-1653-5>
- Ye, R. D., Boulay, F., Wang, J., & Dahlgren, C. (2009). Nomenclature for the Formyl Peptide Receptor (FPR) Family. *Pharmacological Reviews*, 61(2), 119–161. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001578.119>
- Zarbock, A., Deem, T. L., Burcin, T. L., & Ley, K. (2007). Gai2 is required for chemokine-induced neutrophil arrest. *Blood*, 110(10), 3773–3779. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-094565>

Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde in der Abteilung für Pharmakologie, Experimentelle Therapie und Toxikologie des Departments für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Pharmakogenomik der Universität Tübingen unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Beer-Hammer durchgeführt. Die Konzeption der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Beer-Hammer.

Alle Versuche und Messungen, mit Ausnahme der Genotypisierung der Versuchstiere und der PCR-Analyse der Neutrophilen-Lysate, wurden eigenständig von mir durchgeführt. Die Genotypisierung der Versuchstiere erfolgte durch Sarah Plöger, Renate Riehle, Sandra Schwegmann, Elke Zabinsky und mich. Die PCR-Analyse der Neutrophilen-Lysate erfolgten durch Sarah Plöger, Elke Zabinsky und mich.

Die statistische Auswertung sowie die Erstellung aller Abbildungen erfolgten eigenständig durch mich.

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

Tübingen, den

Danksagung

Seite 73 enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

Lebenslauf

Seite 74 enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.