



Technische Universität München

Fakultät für Medizin

**Einfluss des thrombozytenspezifischen Knockouts
der löslichen Guanylatzyklase auf die Ausbildung
atherosklerotischer Plaques**

Marlène Elisabeth Stroth

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Florian Eyer

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Heribert Schunkert
2. apl. Prof. Dr. Ilka V. Ott

Die Dissertation wurde am 27.12.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin 12.04.2022 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Zusammenfassung.....	IX
Abstract.....	X
1. Einleitung.....	1
1.1. Koronare Herzerkrankungen.....	1
1.1.1. Epidemiologie.....	1
1.1.2. Entstehung und traditionelle Risikofaktoren.....	1
1.1.3. Genetische Risikofaktoren.....	4
1.2. Thrombozyten und Atherosklerose.....	5
1.3. Lösliche Guanylatzyklase.....	7
1.4. Lösliche Guanylatzyklase und KHK-Risiko.....	7
1.5. Zielsetzung der Arbeit.....	9
2. Material.....	10
2.1. Puffer und Lösungen.....	10
2.2. Chemikalien.....	13
2.3. Oligonukleotide und Primer.....	14
2.4. Kits.....	14
2.5. Enzyme.....	14
2.6. Antikörper.....	15
2.7. Futtermittel.....	15
2.8. Mäuse.....	15
2.9. Verbrauchsgegenstände.....	16
2.10. Bezugsquellen.....	17
2.11. Geräte.....	17
2.12. Software.....	19
3.0. Methoden.....	20

3.1. Versuchstiere	20
3.2. Cholesterinreiche Ernährung (Western Diet)	21
3.3. Probenentnahme	21
3.4. Polymerase-Kettenreaktion	22
3.4.1. Probenvorbereitung	22
3.4.2. Durchführung.....	22
3.4.3. Agarose-Gelelektrophorese	23
3.5. Laborchemische Untersuchungen.....	24
3.6. Western Blot	24
3.6.1. Probenvorbereitung	24
3.6.2. Proteinquantifizierung mittels Bicinchoninsäure- (BCA-) Test	25
3.6.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	25
3.6.4. Blotting und Immunfärbung.....	26
3.7. Durchflusszytometrie.....	27
3.7.1. Vorbereitung der Proben	28
3.7.2. Färbungen	29
3.7.3. Erstellung der Kontrollproben	31
3.7.4. Durchführung der Durchflusszytometrie.....	31
3.7.5. Auswertung	31
3.8. Histologie	32
3.8.1. Gefrierschnitte	32
3.8.2. Masson-Trichrom-Färbung	32
3.8.3. Auswertung der Färbungen	33
3.9. Statischer Adhäsionsversuch	33
3.9.1. Isolation der Monozyten aus dem Knochenmark der Wildtypmäuse	33
3.9.2. Probenvorbereitung	34
3.9.3. Separation der Monozyten mittels MACS	35
3.9.4. Isolation von Thrombozyten aus den Versuchsmäusen	35
3.9.5. Aktivierung der Thrombozyten	36
3.9.6. Markierung der Monozyten	36

3.9.7. Versuchsdurchführung des statischen Adhäsionsversuchs	36
3.10. Statistische Auswertung	37
4. Ergebnisse	38
4.1. Generierung von <i>PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}</i> Mäusen	38
4.2. Expression der β_1 -Untereinheit in <i>PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}</i> Thrombozyten	39
4.3. Gewichtsverhältnisse und Blutanalysen in <i>PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}</i> und <i>Ldlr^{-/-}</i> Mäusen.....	41
4.4. Bildung atherosklerotischer Plaques in <i>PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}</i> und <i>Ldlr^{-/-}</i> Mäusen	42
4.5. Inflammation der Gefäßwand in <i>PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}</i> und <i>Ldlr^{-/-}</i> Mäusen.....	43
4.6. Adhäsion von Monozyten in Anwesenheit von Überstand aktivierter Wildtyp oder <i>PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}</i> Thrombozyten	45
5. Diskussion.....	47
5.1. <i>PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}</i> Mäuse.....	47
5.2. Gewichtsverhältnisse und Blutanalysen in <i>PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}</i> Mäusen.....	48
5.3. Bildung atherosklerotischer Plaques in <i>PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}</i> Mäusen.....	49
5.4. Inflammation der Gefäßwand in <i>PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}</i> Mäusen	50
5.5. Adhäsion von Monozyten in Anwesenheit von Überstand aktivierter Wildtyp oder <i>PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}</i> Thrombozyten	50
5.6. Schlussfolgerungen und Ausblick.....	51
Publikationen.....	53
Literaturverzeichnis	54
Danksagung	62

Abkürzungsverzeichnis

APC-Cy7	<i>Allophycocyanin: Cy-7 Tandem Conjugate</i>
Abb.	Abbildung
ACD	<i>Acid-Citrate-Dextrose</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid assay</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BV	Brilliant Violett
Bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CCR2	C-C Chemokinrezeptor Typ 2
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CRE	<i>Cyclization recombinase</i>
dl	Deziliter
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
ECL	Chemolumineszenzreaktion
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
et al.	und andere
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate Conjugate</i>
G	Gauge
<i>xg</i>	Erdbeschleunigung 9,81 m/s ²
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Ggf.	Gegebenenfalls
GSNO	S-Nitrosoglutathion
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPA	<i>High efficiency particulate air filter</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
H ₂ O	Wasser
HotSHOT	<i>Hot Sodium Hydroxide and Tris</i>

IVC	Individuell ventilierte Käfige
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter
Ldlr	Low density lipoprotein Rezeptor
loxP	<i>Locus of X-over P1</i>
Lux	Beleuchtungsstärke Lumen/m ²
Ly6	Lymphozyten Antigen 6
m	Meter
µg	Mikrogramm
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i> (magnetisch aktivierte Zell-sortierung)
min	Minute
Mio	Millionen
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar, mmol/l
mmol	Millimol
mg	Milligramm
nm	Nanometer
Na ⁺	Natrium
NaOH	Natronlauge
NK	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
PBS-Puffer	<i>Phosphat-buffered-saline</i> , Phosphat-Puffer
PBS-T-Puffer	<i>Phosphate-buffered-saline with tween</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	<i>Purified anti-phycoerythrin</i>
PerCP-Cy5.5	<i>Peridinin-chlorophyll-protein Complex: CY5.5 Conjugate</i>
PF4	Plättchenfaktor 4
pH	<i>Potentia Hydrogenii</i>
PVD	Polyvinylidenfluorid
PS	Plättchen-spezifisch
RIPA-Puffer	Radioimmunpräzipitations-Assay-Puffer
RPE-Cy7	Radioimmunoassay Phycoerythrin: Cy-7 Tandem Conjugate
rpm	<i>Revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute

SA	Streptavidin
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
s	Sekunden
sGC	<i>Soluble guanylyl cyclase</i> , lösliche Guanylatzyklase
SMC	<i>Smooth muscle cell</i> , glatte Muskelzelle
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
T	Temperatur
Tris	Trometamol
TBE-Puffer	TRIS Borate EDTA-Puffer
V	Volt
vs.	versus
WT	Wildtyp
x	Mal
%	Prozent

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Schematische Darstellung der Entstehung von Atherosklerose. Abbildung 1 aus (Weber et al. 2008) mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature Verlag. Copyright © 2008	2
Abbildung 2: Abbildung 2 aus (Erdmann et al. 2018). Mit freundlicher Genehmigung von Oxford University Press. Copyright © 2018	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung einer Aktivierung der NO/cGMP-Signalkaskade.	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des statischen Adhäsionsversuchs.	36
Abbildung 5: Qualitätskontrolle der Cre-LoxP-vermittelten Deletion mittels PCR	38
Abbildung 6: Knockout der sGC in Thrombozyten und ADP-induzierte Thrombozytenaggregation in WT- und <i>PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}</i> Mäusen. Siehe (Stroth et al. 2018) und (Mauersberger/Sager et al., eingereicht).	39
Abbildung 7: Serumcholesterinwerte, Thrombozytenzahlen und Leukozytenzahlen nach cholesterinreicher Ernährung. Aus (Mauersberger/Sager et al., eingereicht).	40
Abbildung 8: Plaques im Bereich der Aortenwurzel (Stroth et al. 2018) und (Mauersberger/Sager et al., eingereicht).	41
Abbildung 9: Schritte der durchflusszytometrischen Auswertung am Beispiel einer Aorten-Probe einer Knockoutmaus dargestellt.	43
Abbildung 10: Anzahl von neutrophilen Granulozyten und Ly6c ^{high} Monozyten in der Aorta (Stroth et al. 2018).	44
Abbildung 11: Adhäsion von Wildtyp Monozyten und Wildtyp Endothelzellen (Stroth et al. 2018)	45

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Zusammensetzung der Primer für die verschiedenen PCRs.	23
Tabelle 2: PCR Programme, die in dieser Arbeit angewandt worden sind.	23
Tabelle 3: Auflistung von Probenmengen und Pufferlösungen.	26
Tabelle 4: Konzentrationsangaben der Primär- und Sekundärantikörper.	27
Tabelle 5: Verwendete Fluorochrome mit jeweiligem Exzitations-, Emissionsmaximum und der jeweiligen Fluoreszenz Emissionsfarbe.	29
Tabelle 6: Zusammensetzung des ersten Antikörper Mastermix mit Auflistung der jeweiligen Antikörper, ihren Konjugaten und der endgültigen Verdünnung.	29
Tabelle 7: Zusammensetzung des zweiten Antikörper Mastermix mit Auflistung der jeweiligen Antikörper, ihren Konjugaten und der endgültigen Verdünnung.	30

Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen gelten als die häufigste Todesursache weltweit (Nowbar et al. 2019). Sie werden in den meisten Fällen durch atherosklerotische Veränderungen der Herzkranzgefäße verursacht, die bereits Jahrzehnte vor einer klinischen Manifestation in den Gefäßwänden auftreten und dann unbemerkt voranschreiten (zur Übersicht siehe (Lusis 2000)). Erst kürzlich konnten durch genomweite Assoziationsstudien 163 Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) identifiziert werden, die mit einer erhöhten Inzidenz von Myokardinfarkten in Verbindung gebracht werden können (zur Übersicht siehe (Erdmann et al. 2018)). Einer dieser SNPs ist rs7692387 (Deloukas et al. 2013). Er befindet sich auf Chromosom 4 und beeinflusst eine Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle am *GUCY1A1*-Genlocus, woraufhin *GUCY1A1* beim Vorliegen des Risikoallels vermindert exprimiert wird (Kessler et al. 2017). Das *GUCY1A1*-Gen kodiert für die $\alpha 1$ -Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase (sGC), ein Enzym mit einer zentralen Rolle in der Stickstoffmonoxid/zyklisches Guanosinmonophosphat-Signalkaskade, die eine wichtige Funktion in glatten Muskelzellen, aber insbesondere auch in Thrombozyten hat (zur Übersicht siehe (Wobst et al. 2018)). In dieser Arbeit wurde isoliert der Einfluss der thrombozytären sGC auf die Entstehung und Progredienz atherosklerotischer Plaques untersucht. Um eine sGC-spezifische Knockout Mauslinie zu generieren, wurden *PF4-Cre⁺* mit *Gucy1b1^{flox/flox}* Mäusen gekreuzt. Diese Mäuse wurden dann mit *Ldlr^{-/-}* Mäusen auf einen proatherogenen Hintergrund gekreuzt. Die entstandenen *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* sowie *Ldlr^{-/-}* Mäuse erhielten über zehn Wochen eine cholesterinreiche Ernährung. Anschließende Gewichts- und Blutanalysen zeigten keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Die Analyse der atherosklerotischen Plaques erfolgte anhand serieller Schnitte der Aortenwurzel, welche mittels Masson-Trichrom-Färbung analysiert wurden. So konnte in den *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* Mäusen eine größere Plaquesfläche als in *Ldlr^{-/-}* Mäusen nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte mittels Durchflusszytometrie der Aorta eine gesteigerte Inflammation der Gefäßwände von *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* Mäusen beobachtet werden. Darüber hinaus zeigte ein *in vitro* Adhäsionsversuch, dass Wildtyp Monozyten nach Inkubation mit dem Überstand von aktivierten *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}* Thrombozyten stärker an Wildtyp Endothelzellen adhäreren als nach Inkubation mit dem Überstand von aktivierten *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}* Thrombozyten. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass der Funktionsausfall der thrombozytären sGC eine verstärkte Rekrutierung inflammatorischer Zellen zur Folge hat und so die Entstehung atherosklerotischer Plaques fördert. Zudem deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass aktivierte *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}* Thrombozyten Chemokine und Zytokine sezernieren, welche, übertragen auf den Menschen, womöglich das Risiko für die Entstehung koronarer Herzerkrankungen bei Risikoallelträgern erhöhen. Die Modulation der thrombozytären Aktivität scheint somit für *GUCY1A1*-Risikoallelträger eine vielversprechende therapeutische Strategie darzustellen.

Abstract

Coronary artery disease (CAD), which is caused by atherosclerosis, is the leading cause of death in the world (Nowbar et al. 2019). The formation of atherosclerosis often remains unnoticed and can appear decades before clinical manifestation (for overview see (Lusis 2000)). Genome-wide association studies (GWAS) identified single nucleotide polymorphisms (SNPs) which are associated with an increased risk of CAD and myocardial infarction. So far, 163 SNPs, which are associated with CAD and distributed all over the genome, have been found (for overview see (Erdmann et al. 2018)). One of them tags the *GUCY1A1* gene (previously known as *GUCY1A3*), which is located on chromosome 4 (Deloukas et al. 2013). The SNP rs7692387 interrupts an enhancer element and causes reduced *GUCY1A1* expression (Kessler et al. 2017). The *GUCY1A1* gene encodes for the α_1 -subunit of the soluble guanylyl cyclase (sGC), a central enzyme in the nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate signaling pathway (NO/cGMP) (for overview see (Wobst et al. 2018)). In this work we sought to investigate the effect of sGC in platelets on the formation and progression of atherosclerotic plaques. By crossbreeding *PF4-Cre⁺* with *Gucy1b1^{flox/flox}* mice we generated a knockout of the sGC predominantly in platelets. In order to provoke atherosclerosis, the mice were crossbred with *Ldlr^{-/-}* mice and then fed a Western diet (WD) for 10 weeks. Weight and cholesterol levels did not differ between the genotypes. To investigate atherosclerotic plaque formation, serial sections of the aortic root were analysed. *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* mice showed larger plaques than *Ldlr^{-/-}* mice. Furthermore, the accumulation of inflammatory cells in the aorta was analysed by flow cytometry. More numerous neutrophils and *Ly6c^{high}* monocytes were detected in the aortic wall of *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* mice. Adhesion assays revealed enhanced adhesion of wildtype monocytes to wildtype endothelial cells after incubation with supernatant from activated *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* compared to *PF4-Cre⁻Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* platelets. Taken together, these data suggest that the loss of platelet sGC leads to an increased recruitment of inflammatory cells and atherosclerotic plaque formation. We assume that, induced by the loss of function of sGC, the activation of platelets lacking sGC leads to secretion of cytokines, which may in turn increase CAD risk. Thus, the modulation of platelet activity appears to be a promising therapeutic target for carriers of the *GUCY1A1* risk allele.

1. Einleitung

1.1. Koronare Herzerkrankungen

1.1.1. Epidemiologie

Die koronare Herzerkrankung (KHK) ist durch atherosklerotische Veränderungen der Herzkranzgefäße, die zu einer Minderperfusion und nachfolgend zu einem Sauerstoffmangel der distal der Läsion befindlichen Myokardanteile führen, bedingt (zur Übersicht siehe (Lusis 2000)). Auch wenn in den letzten Jahren die Inzidenz der KHK und des Myokardinfarkts aufgrund verbesserter Möglichkeiten zur Früherkennung und Prävention gesenkt werden konnte, gelten kardiovaskuläre Erkrankungen weltweit als die führende Todesursache (Nowbar et al. 2019).

1.1.2. Entstehung und traditionelle Risikofaktoren

Die Atherosklerose ist ein multifaktorieller, chronisch entzündlicher Prozess, der über Jahrzehnte unbemerkt voranschreitet. Dabei kommt es durch die Akkumulation von inflammatorischen Zellen, Lipiden und extrazellulärer Matrix zu Veränderungen der Gefäßwand (zur Übersicht siehe (Libby et al. 2011)). Schon kleine Läsionen von Endothelzellen können atherosklerotische Veränderungen initiieren. Sie erhöhen die Permeabilität für oxidierte *Low Density Lipoproteine* (LDL), die sich dann in der dem Gefäßlumen anliegenden Tunica Intima anreichern. Die Läsionen führen aber auch zu einer Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten (zur Übersicht siehe (Weber et al. 2008)). Die adhärierenden Leukozyten sind zum großen Teil Monozyten, die sich nach der Migration in die Intima zu Makrophagen differenzieren (zur Übersicht siehe (Soehnlein et al. 2009a)). Die Makrophagen phagozytieren dann das oxidierte LDL und bilden so Schaumzellen, die bei Akkumulation makroskopisch als *Fatty Streaks* imponieren können. Sie stellen eine Vorstufe der Atherosklerose dar, die bereits Jahrzehnte vor klinischer Manifestation auftritt (zur Übersicht siehe (Lusis 2000)). Mit der Zeit kommt es zur Apoptose dieser Schaumzellen. Sie werden dann wiederum durch Makrophagen phagozytiert. Mit dem Fortschreiten der Atherosklerose erschöpft sich so die phagozytotische Kapazität. Es fallen dann immer mehr apoptotische Zellen und Lipide an, die im Zentrum der Plaque zu einem nekrotischen Kern akkumulieren (zur Übersicht siehe (Tabas 2010)). Gleichzeitig transmigrieren Myofibroblasten aus der Tunica media in die Tunica intima, wo sie extrazelluläre Matrix sezernieren, mit der sie eine fibrotische Kappe bilden, die den nekrotischen Kern und die Schaumzellen umschließt (zur Übersicht siehe (Tabas 2010)). Diese Vorgänge führen zum exzentrischen Wachstum der Plaque. Im fortgeschrittenen Stadium kann es so zu einer Minderdurchblutung des distalen Myokards kommen und als Folge dessen zur stabilen Angina pectoris (zur Übersicht siehe (Lusis 2000)).

Mit dem Fortschreiten der Plaquebildung kommt es, induziert durch die Akkumulation der apoptotischen Zellen, zu einer chronischen Inflammation der Läsion (zur Übersicht siehe (Tabas 2005)). Folglich sammeln sich in der Plaque matrixabbauende Proteasen und Zytokine an, die wiederum eine Ausdünnung der fibrotischen Kappe induzieren (zur Übersicht siehe (Soehnlein et al. 2009a)). Eine Erosion kann schlussendlich der Auslöser für eine Ruptur sein, durch die thrombogenes Material exponiert wird, woraufhin dann ein Thrombus entsteht. Dieser kann zum Gefäßverschluss führen, wodurch distal ein ischämisches Myokardareal entsteht. Dies manifestiert sich im klinischen Erscheinungsbild als Myokardinfarkt (zur Übersicht siehe (Lusis 2000)). Die Pathogenese der Atherosklerose ist in **Abbildung 1** schematisch dargestellt.

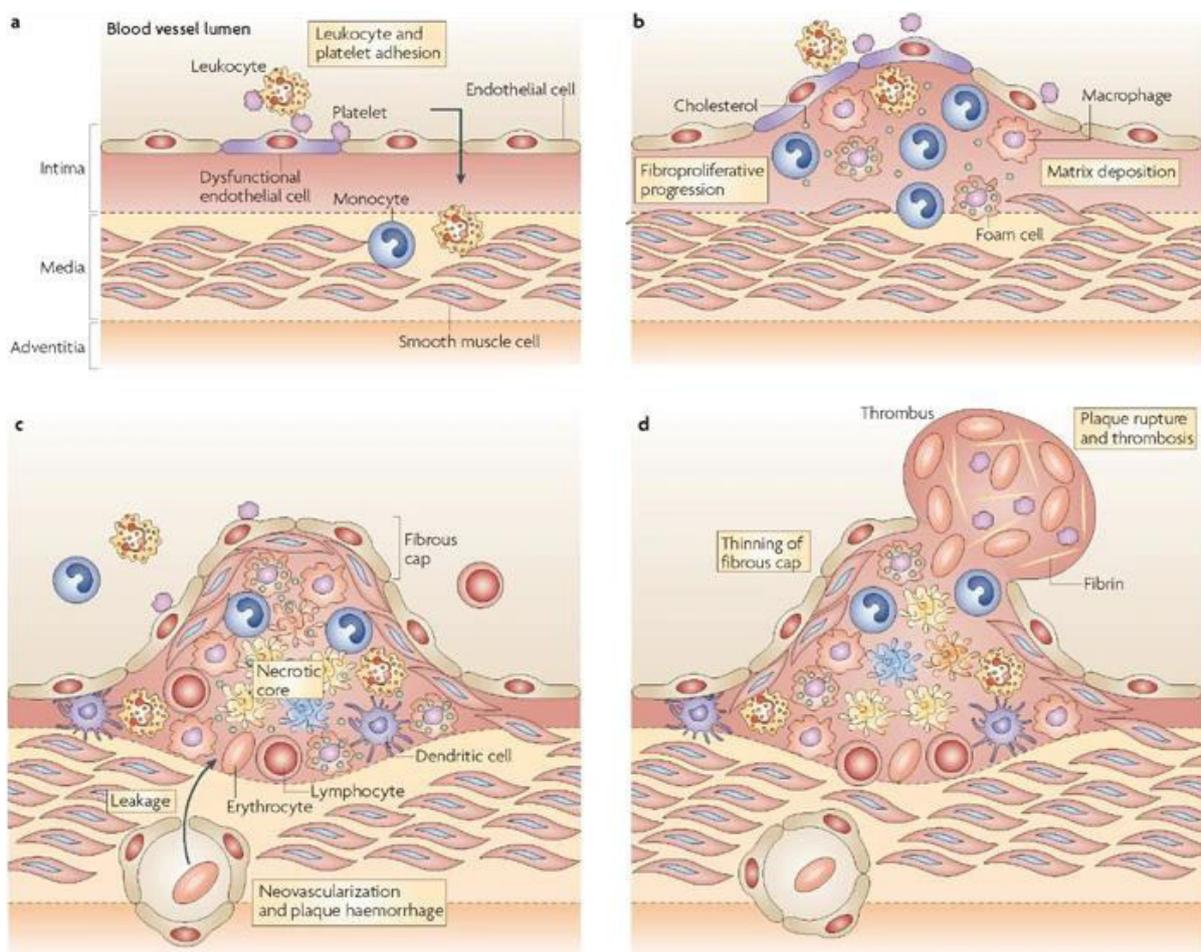


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Entstehung von Atherosklerose. Plaquebildung (a), -progression (b) bis hin zur Plaqueeruptur (c) und Thrombusbildung (d). Abbildung 1 aus (Weber et al. 2008) mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature Verlag. Copyright © 2008

Während das fortgeschrittene Stadium der Atherosklerose und die Mechanismen der Plaque-ruptur gut verstanden sind, werfen die molekularen Vorgänge während der initialen Entstehung und der Progredienz noch Fragen auf. Transgene Mausmodelle ermöglichen es, bisher noch unbekannte molekulare Abläufe zu untersuchen.

Monozyten spielen eine große Rolle bei der Entstehung atherosklerotischer Plaques (zur Übersicht siehe (Lusis 2000)). Hierbei unterscheidet man zwei Gruppen muriner Monozyten anhand ihrer Expression des Lymphozyten Antigens 6c (*Ly6c*). Zum einen gibt es *Ly6c^{high}* Monozyten, welche auch als inflammatorische Monozyten bezeichnet werden (zur Übersicht siehe (Weber et al. 2008) und (Combadiere et al. 2008)). Sie sezernieren Zytokine, wie TNF- α und Interleukine und sammeln sich in Geweben nach Aufnahme im Rahmen von inflammatorischen Prozessen an (zur Übersicht siehe (Serbina et al. 2008)). Zum anderen gibt es die nicht-inflammatorischen *Ly6c^{low}* Monozyten, deren Funktion noch nicht endgültig geklärt ist. Sie befinden sich nicht nur in entzündeten sondern primär auch in gesunden Geweben, wo sie zu Makrophagen ausdifferenzieren können (zur Übersicht siehe (Weber et al. 2008)).

Weniger bekannt ist hingegen über die Rolle von neutrophilen Granulozyten. Aus diesem Grund hat man den Einfluss dieser Zellen lange Zeit unterschätzt (zur Übersicht siehe (Soehnlein et al. 2009b)). In den letzten Jahren konnte jedoch gezeigt werden, dass sich eine induzierte Neutrophilie verstärkend auf die Entstehung und Progredienz atherosklerotischer Plaques auswirkt. Es wird vermutet, dass neutrophile Granulozyten als Reaktion auf inflammatorische Reize sogenannte *neutrophil extracellular traps* (NETs) bilden. Diese wirken thrombogen und induzieren Läsionen an Endothelzellen (zur Übersicht siehe (Döring et al. 2017)). Darüber hinaus sezernieren Granulozyten inflammatorische Mediatoren, die Apoptose, Wachstum und Instabilität atherosklerotischer Plaques begünstigen (zur Übersicht siehe (Weber et al. 2008)).

Kardiovaskuläre Risikofaktoren begünstigen die Entwicklung der Atherosklerose. Sie sind in beeinflussbare und nicht beeinflussbare Risikofaktoren unterteilbar. Die bekannten Hauptrisikofaktoren sind Hypertonie, Dyslipidämie, Diabetes mellitus und Nikotinabusus (zur Übersicht siehe (Piepoli et al. 2016)). Diese Risikofaktoren können medikamentös sowie durch Lebensstilanpassungen positiv beeinflusst werden. Nicht medikamentös beeinflussbar sind hingegen erblich bedingte Risikofaktoren, Geschlecht und fortgeschrittenes Alter.

1.1.3. Genetische Risikofaktoren

Die Framingham- und Marenberg-Zwillings-Studie beschrieben bereits in den 90er Jahren eine positive Familienanamnese als unabhängigen Risikofaktor für Myokardinfarkte (Myers et al. 1990; Marenberg et al. 1994). Allerdings verlief die Suche nach genetischen Veränderungen für lange Zeit erfolglos. Der Durchbruch gelang durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS). Diese wurden dank der vollständigen Dekodierung der menschlichen Desoxyribonukleinsäure (DNS) sowie der Beschreibung von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) und der Entwicklung von Genotypisierungs-Arrays ermöglicht (Lander et al. 2001; Sachidanandam et al. 2001). GWAS untersuchen mithilfe von Hochdurchsatztechnologien statistische Assoziationen zwischen dem Genotyp und einem bekannten Phänotyp, in diesem Fall der KHK bzw. dem Myokardinfarkt (zur Übersicht siehe (Kessler et al. 2013)). Über eine Million bekannter SNPs wurden mit dem Ziel Genabschnitte zu finden, die mit dem Phänotyp assoziiert sind, untersucht. Um möglichst präzise Ergebnisse und eine hohe statistische Aussagekraft zu erhalten, wurden Konsortien wie Coronary ARtery Disease Genome-wide Replication and Meta-analysis (CARDIoGRAM) (Schunkert et al. 2011), Coronary Artery Disease (C4D) (The Coronary Artery Disease (C4D) Genetics Consortium 2011), Myocardial Infarction Genetics (MIGen) (Kathiresan et al. 2009) und die United Kingdom Biobank (UKBB) (Collins 2012) gegründet. Des Weiteren wurde 2012 die UK-Biodatenbank für Wissenschaftler zugänglich gemacht. Diese umfasst genetische und phänotypische Informationen von 500.000 freiwilligen europäischen Probanden und ist damit zurzeit eine der größten Biodatenbanken (zur Übersicht siehe (Collins 2012)). Bis heute wurden durch GWAS mehr als 160 genomische Loci beschrieben, die mit einem erhöhten KHK- bzw. Myokardinfarkt-Risiko einhergehen (zur Übersicht siehe (Erdmann et al. 2018)). Wie in **Abbildung 2** gezeigt, kann nur ein Teil der genetischen Befunde mit der Pathophysiologie bekannter kardiovaskulären Risikofaktoren in Verbindung gebracht werden (Erdmann et al. 2018). Bisher handelt es sich dabei jedoch nur um genetische Assoziationen, deren Art des Einflusses molekularbiologisch und biochemisch noch weiter untersucht werden muss.

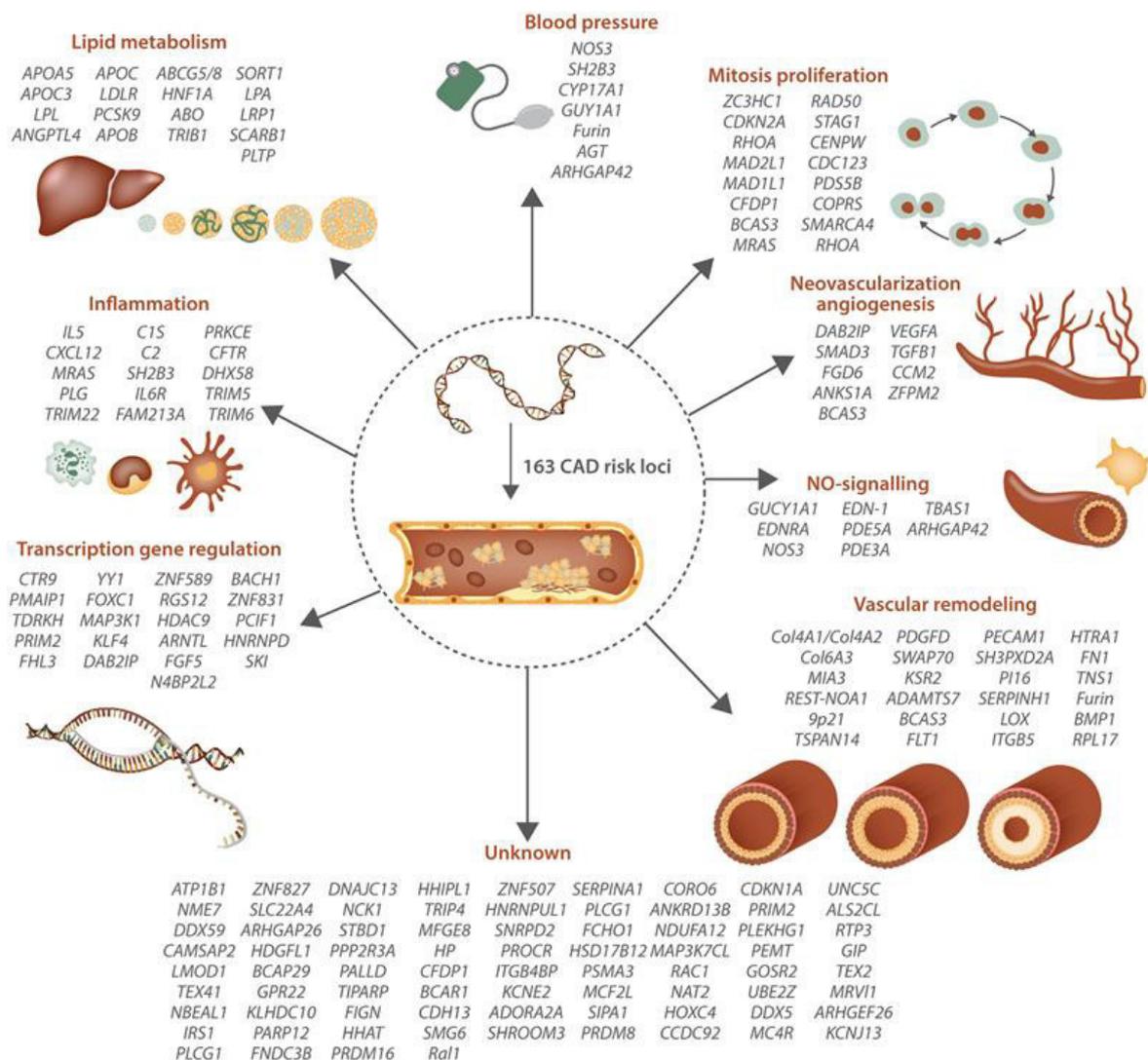


Abbildung 2: Abbildung 2 aus (Erdmann et al. 2018) mit Darstellung der 163 bekannten genomischen Loci, die mit einem erhöhten KHK-Risiko einhergehen und der dazu gehörigen Pathophysiologie. Mit freundlicher Genehmigung von Oxford University Press. Copyright © 2018

1.2. Thrombozyten und Atherosklerose

Im Jahr 2013 haben Erdmann et al. das Exom, das heißt den kodierenden Anteil des Genoms, einer Familie mit familiärer Häufung von Myokardinfarkten und KHK-Manifestation in jungem Alter analysiert. Mittels Sequenzierung des Exoms dreier Familienmitglieder wurde eine digenische Mutation identifiziert, die mit dem Phänotyp cosegregiert (Erdmann et al. 2013). Bei einer Mutation handelte es sich um einen *Frameshift* (p.Leu163Phefs*24) im *GUCY1A1*-Gen (nach früherer Nomenklatur: *GUCY1A3* (HUGO Gene Nomenclature Committee 2019a)), die zu einem vorzeitigen Stopp-Codon führt. Das *GUCY1A1*-Gen kodiert für die $\alpha 1$ -Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase (sGC) (zur Übersicht siehe (Wobst et al. 2015b)). Bei der anderen Mutation handelte es sich um einen Aminosäureaustausch (*Missense*; p.Ser525Leu) im *CCT7*-Gen, welches für das Protein *CCT η* kodiert, das als die Guanylatzyklase stabilisierend

beschrieben wurde (Hanafy et al. 2004). Die Analyse des vorhandenen Genmaterials weiterer Familienmitglieder hat gezeigt, dass alle Träger beider Mutationen an einer KHK in jungem Alter litten (Erdmann et al. 2013). Um die Relevanz der *GUCY1A1*-Mutation weiter beurteilen zu können, wurden *in vitro*- sowie *in vivo*-Versuche durchgeführt. So führte die Überexpression von *Gucy1a1*^{p.Leu163Phefs*24} zu einer um 80-96 % reduzierten Expression der *sGC-α1*-Untereinheit im Vergleich zum Wildtyp-Gen und zu einer signifikant reduzierten Synthese des *second messengers* cGMP (Erdmann et al. 2013). In Mäusen, in denen *Gucy1a1* ausgeschaltet war, trat schneller eine Thrombusbildung nach experimenteller Gefäßschädigung auf (Erdmann et al. 2013). Zusätzlich zu dieser Mutation wurde das Gen in GWAS ebenfalls mit erhöhtem KHK assoziiert (Deloukas et al. 2013). Der *GUCY1A1*-Locus gehört somit zu einem kleinen Kreis von Genen, für die sowohl seltene Varianten bzw. Mutationen beschrieben wurden, die mit dem KHK-Risiko assoziiert sind, als auch häufige Varianten aus GWAS. Kessler et al. konnten 2017 zeigen, dass die häufige Variante rs76923787, die mit dem KHK-Risiko assoziiert ist, in einer *Enhancer*-Region lokalisiert ist, welche die Expression des *GUCY1A1*-Gens steigert (Kessler et al. 2017). Das Vorliegen der Risikovariante G führte zu differenzierter Bindung des Transkriptionsfaktor ZEB1, was zu einer verminderten Expression von *GUCY1A1* führt. Als Folge werden glatte Muskelzellen, die den GG-Genotyp tragen, in ihrer Migration nach Stimulation der *sGC* weniger inhibiert. Außerdem ist die inhibitorische Wirkung von Stickstoffmonoxid auf die Thrombozytenaggregation bei homozygoten Risikoallelträgern im Vergleich zu homozygoten Nichtrisikoallelträgern reduziert (Kessler et al. 2017).

Auch wenn diese beiden Studien eine wesentliche Rolle der *sGC* in Thrombozyten im Rahmen der Atherosklerose nahelegen, steht der Nachweis eines Einflusses auf die Atherosklerose bisher aus. Die Rolle von Thrombozyten in der Atherosklerose wird insgesamt kontrovers diskutiert (zur Übersicht siehe (Kessler et al. 2020)) unter anderem, da antithrombozytäre Therapien in der Primärprävention der KHK bisher keine Erfolge verzeichnen konnten (Zur Übersicht siehe (Patrono 2015)). In einer *post-hoc* Analyse zweier großer Studien, die den Einfluss einer primärprophylaktischen Gabe von Aspirin auf das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse untersuchten, fanden Hall und Kollegen jedoch heraus, dass homozygote Träger der rs7692387-Risikovariante von Aspirin profitieren könnten (Hall et al. 2019).

1.3. Lösliche Guanylatzyklase

Die sGC ist ein zentrales Enzym der Stickstoffmonoxid/zyklisches Guanosinmonophosphat-(NO/cGMP-) Signalkaskade. 1998 wurde der Nobelpreis für Physiologie und Medizin an Robert Francis Furchgott, Louis Ignarro und Ferid Murad für ihre Arbeiten über die NO/cGMP-Signalkaskade verliehen (Furchgott und Zawadzki 1980; Ignarro et al. 1987). Die sGC hat eine zentrale Aufgabe in dieser Signalkaskade (zur Übersicht siehe (Wobst et al. 2015a)). GWAS konnten bisher fünf Mutationen identifizieren, die einen Einfluss auf diese Signalkaskade haben. Es wird vermutet, dass so Einfluss auf die Progredienz und das Risiko einer Ruptur atherosklerotischer Plaques genommen und somit auch das Myokardinfarkt-Risiko erhöht werden könnte (zur Übersicht siehe (Wobst et al. 2018)).

Die sGC ist ein obligatorisch-heterodimeres Protein bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit (Harteneck et al. 1990). Insgesamt sind vier Untereinheiten bekannt: Die α_1 -, α_2 -, β_1 - und β_2 -Untereinheit (zur Übersicht siehe (Wobst et al. 2015b)). Eine Aktivierung der sGC scheint nur bei Expression der β_1 -Untereinheit möglich zu sein (Koglin et al. 2001). Hierbei spielt es keine Rolle, mit welcher der beiden α -Untereinheiten das Heterodimer gebildet wird, sodass letztlich nur zwei funktionale Isoformen der löslichen Guanylatzyklase (sGC) existieren (Russwurm et al. 1998): α_1/β_1 und α_2/β_1 -sGC (Nimmegeers et al. 2007). In **Abbildung 3** ist die Guanylatzyklase schematisch dargestellt. Die α_1/β_1 -sGC wird als einzige Isoform in Thrombozyten und als dominante Isoform (>90 %) in der Lunge sowie Aorta beschrieben (Mergia et al. 2006).

1.4. Lösliche Guanylatzyklase und KHK-Risiko

Die NO/cGMP-Signalkaskade dient der Regulation verschiedener physiologischer Prozesse, wie zum Beispiel der Relaxation von glatten Muskelzellen, der Inhibition von Thrombozytenaggregation und der Neurotransmission (zur Übersicht siehe (Wobst et al. 2015a)). Aktiviert wird die Guanylatzyklase durch Stickstoffmonoxid (NO) (zur Übersicht siehe (Ignarro 1991)). Das aktivierende Stickstoffmonoxid wird, auf endotheliale oder chemische Stimuli hin, durch NO-Synthasen (NOS) aus der Aminosäure L-Arginin gebildet (Palmer et al. 1988). Im Menschen sind drei Formen der Stickstoffmonoxid-Synthase bekannt. Die neuronale NO-Synthase (nNOS), welche vorwiegend in Neuronen exprimiert wird, die induzierbare NO-Synthase (iNOS), deren Vorkommen vor allem in Makrophagen beobachtet wird, und die endotheliale NO-Synthase (eNOS), welche die wichtigste Isoform im kardiovaskulären System darstellt (zur Übersicht siehe (Wobst et al. 2015a)). NO induziert die Aktivierung der sGC über die Bindung an das Aktivierungszentrum, welche aus einer prosthetischen Häm-Gruppe besteht (Zhao und Marletta 1997). Diese Bindung führt zu einer Konformationsänderung und einer Aktivierung der katalytischen Einheit (zur Übersicht siehe (Russwurm et al. 2002)). Durch die Aktivierung

kommt es unter Abspaltung von Pyrophosphat (PPi) zu einer Synthese des sekundären Botenstoff zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (5'-GTP) (zur Übersicht siehe (Wobst et al. 2015a)). Dieses Phänomen konnte bereits 1977 durch Arnold et al. beobachtet werden (Arnold et al. 1977). Dieser sekundäre Botenstoff entfaltet schlussendlich seine zelluläre Funktion durch die Aktivierung von cGMP-abhängiger Proteinkinasen G (PKG). Die PKG phosphoryliert und aktiviert intrazelluläre Proteine, wie Phosphodiesterasen (PDE), Inositol-Triphosphat-Rezeptor1-assoziiertes Protein (IRAG) und vasodilatator-assoziiertes Protein (VASP) (zur Übersicht siehe (Tsai et al. 2009)). Der sekundäre Botenstoff cGMP wird vor allem durch die aktivierten Phosphodiesterasen reguliert (zur Übersicht siehe (Wobst et al. 2015a)). In Säugetieren konnten bisher elf verschiedene Phosphodiesterasen beobachtet werden. Im kardiovaskulären System kommt vor allem die Phosphodiesterase 5 (PDE5) vor und nimmt somit eine wichtige Funktion der Regulierung der NO/cGMP-Signalkaskade ein (zur Übersicht siehe (Francis et al. 2011)). In **Abbildung 3** ist die NO/cGMP-Signalkaskade exemplarisch dargestellt.

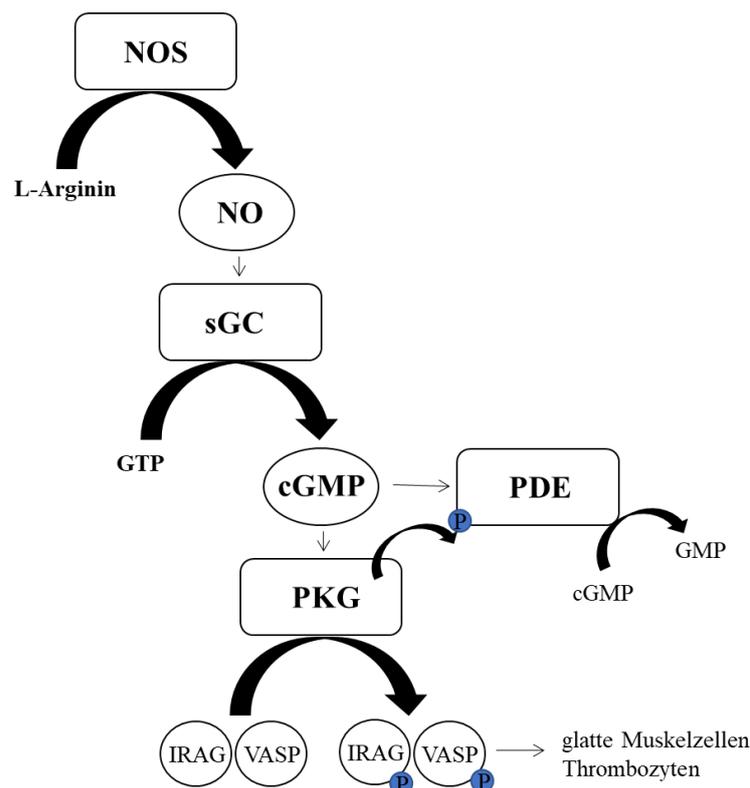


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer Aktivierung der Stickstoffmonoxid/zyklisches Guanosinmonophosphat-(NO/cGMP-) Signalkaskade. Das NO wird mit Hilfe von NO-Synthasen (NOS) aus L-Arginin gebildet. NO induziert die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC), die wiederum eine Synthese des sekundären Botenstoff zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (5'-GTP) aktiviert. Der sekundäre Botenstoff cGMP führt mit Hilfe von Proteinkinasen G (PKG) schlussendlich zur Phosphorylierung und somit Aktivierung von intrazellulären Proteinen, wie Phosphodiesterasen (PDE), Inositol-Triphosphat-Rezeptor1-assoziiertes Protein (IRAG) und vasodilatator-assoziiertes Protein (VASP).

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses der thrombozytären sGC auf:

- 1) die Entstehung und Progredienz von Atherosklerose, wofür eine morphometrische Analyse der atherosklerotischen Plaques in *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* sowie *PF4-Cre⁻Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* Mäusen durchgeführt wurde, und
- 2) die vaskuläre Inflammation, welche anhand von durchflusszytometrischen Analysen sowie in *in vitro* Versuchen erfolgte.

2. Material

2.1. Puffer und Lösungen

1X TRIS-borate-EDTA (TBE):

Endkonzentration von 0,1 M TRIS, 90 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8,3 bei 20 °C

100 ml 10x Invitrogen™ UltraPure™ TRIS-borate-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

ad 1000 ml Millipore® Wasser

Lagerung bei Raumtemperatur

FACS-Puffer:

500 ml PBS-Puffer + 2,5 g BSA 0,5 %

Lagerung bei 4 °C

MACS-Puffer:

500 ml PBS-Puffer + 2,5 g BSA 0,5 % + 2 ml EDTA

Lagerung bei 4 °C

ACD-Lösung:

12 mM Zitronensäure, 15 mM Natriumcitrat, 25 mM Glukose

Lagerung bei 4 °C

Enzymatischer Verdaumix (für FACS Proben):

45 µl Collagenase I aus Clostridium histolyticum Typ I (Sigma-Aldrich)

10 µl Collagenase XI aus Clostridium histolyticum Typ XI (Sigma-Aldrich)

5 µl Hyaluronidase aus Rinderhoden (Sigma-Aldrich)

20 µl HEPES-Puffer (1 M in H₂O) (Sigma-Aldrich)

3,7 µl Deoxyribonuclease I (bovin, Sigma-Aldrich)

916 µl PBS (Thermo Fisher Scientific)

Lagerung bei Raumtemperatur

Alkalische Lyse für die PCR:

Lösung 1:

62,5 µl 10 Mol NaOH (final 25 mM)

10 µl 0,5 Mol EDTA-Na⁺ (final 0,2 mM)

ad 25 ml mit H₂O

pH-Wert 12

Lösung 2:

1 ml 1 Mol Tris-HCl (final 40 mM)

ad 25 ml mit H₂O

pH-Wert 5

1x radioimmunoprecipitation assay (RIPA) Puffer:

10 ml 10x RIPA (New England Biolabs)

ad 100 ml Millipore® Wasser

Lagerung bei -20 °C

RIPA-Proteinase-Inhibitor:

1 % Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100x) (Thermo Fischer)

100 % RIPA-Puffer (Zusammensetzung siehe oben)

Lagerung bei -20 °C für 1-2 Tage

1X PBS-T:

Mit einer Endkonzentration von 1 mM KH_2PO_4 , 0,16 M NaCl, 2,97 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0,2 % v/v Tween® 20, pH 7,4 bei Raumtemperatur

100 ml 10x Gibco™ PBS (Thermo Fisher Scientific)

2 ml Tween® 20 (AppliChem)

ad 1000 ml Millipore® Wasser

Lagerung bei Raumtemperatur

1x Elektrophorese Puffer:

100 ml 10x Tri/Glycine/SDS (Bio-Rad)

2 ml Tween® 20 (AppliChem)

ad 1000 ml Millipore® Wasser

Lagerung bei Raumtemperatur

2x Laemmli Puffer:

Konzentration 355 mM β -Mercaptoethanol

50 μl β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)

950 μl 2x Laemmli (Bio-Rad)

Lagerung bei -20 °C

4x Laemmli Puffer:

Konzentration 355 mM β -mercaptoethanol

100 μl β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)

900 μl 4x Laemmli (Bio-Rad)

Lagerung bei -20 °C

1x Transfer Puffer:

3,03 g TRIS PUFFERAN® (Carl Roth)

14,4 g Glycin PUFFERAN® (Carl Roth)

200 ml Methanol (AppliChem)

ad 1000 ml Millipore® Wasser

Lagerung bei Raumtemperatur

5 % w/v Milch in PBS-T:

5 g Magermilchpulver (AppliChem)

ad 100 ml 1x PBS-T (Zusammensetzung siehe oben)

Lagerung bei 4 °C für maximal 2 Tage

2,5 % w/v Milch in PBS-T:

2,5 g Magermilchpulver (AppliChem)

ad 100 ml 1x PBS-T (Zusammensetzung siehe oben)

Lagerung bei 4 °C für maximal 2 Tage

Weigert's Eisenhämatoxylin Lösung:

50 % Weigert's Eisenhämatoxylin Lösung, Teil A (1 % Hämatoxylin in Ethanol) (Sigma-Aldrich)

50 % Weigert's Eisenhämatoxylin Lösung, Teil B (Eisenchlorid 1,2 %, Chlorwasserstoffsäure 1 %) (Sigma-Aldrich)

Lagerung bei Raumtemperatur

70 % v/v Ethanol:

35 ml EMPURA® Ethanol absolut (Merck Millipore)

ad 50 ml DNase/RNase-freies Wasser

Lagerung bei Raumtemperatur

2.2. Chemikalien

Chemikalie	Firma	Ort
Calcein-AM	Carl Roth	Karlsruhe, DE
DMEM 4.5 g/l Glucose w/ Ultra Glutamin	Lonza	Basel, SUI
Dulbecco's PBS Lösung ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Merck	Darmstadt, DE
EDTA (0,5 M)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
EMPURA® Ethanol absolut	Merck	Darmstadt, DE
Ethanol denaturiert ≥96 %	Carl Roth	Karlsruhe, DE
Formaldehydlösung 4 %, gepuffert, pH 6,9	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Gibco™ PBS (10X), pH 7,4	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Gibco™ Trypanblau Lösung, 0,4 %	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Hämatoxylinlösung A nach Weigert	Carl Roth	Karlsruhe, DE
Hämatoxylinlösung B nach Weigert	Carl Roth	Karlsruhe, DE
HEPES gepufferte Kochsalzlösung	PromoCell	Heidelberg, DE
Invitrogen™ UltraPure™ DNase/RNase-frei destilliertes Wasser	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Isofluran CP®	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH	Burgdorf, DE
4x Laemmli	Bio-Rad	Hercules, USA
Methanol (MeOH)	AppliChem	Darmstadt, DE
Natriumcitrat	Carl Roth	Karlsruhe, DE
Nonfat trockenes Milchpulver	BioChemica AppliChem	Darmstadt, DE
Pertex	Histolabs Products AB	Göteborg, SE
10x RIPA	New England Biolabs	Ipswich, USA
RotiR-GelStain	Carl Roth	Karlsruhe
S-Nitrosoglutathion (GSNO)	Enzo Life Science	Farmingdale, USA
Tissue- Tek®, O.C.T™ Verbindung	Sakura Finetek Europe B.V	Alphen aan den Rijn, NL

TNF- α	ThermoFischer Scientific	Waltham, USA
Tween® 20	BioChemica AppliChem	Darmstadt, DE
Xylol	Carl Roth	Karlsruhe, DE
Zitronensäure	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich	St. Louis, USA

2.3. Oligonukleotide und Primer

β_1 - Multiplex	μ l	Ldlr	μ l	PF4-Cre	μ l
PCR Mastermix	10	PCR Mastermix	10	PCR Mastermix	10
Lox-P- β_1 -U ₁	1	WT-Ldlr	0,5	PF4-Cre-3'	0,3
Lox-P- β_1 -L ₁	1	Mutant-Ldlr	0,5	PF4-Cre-5'	0,3
Del-P- β_1 -L ₁	3	Common-Ldlr	0,5	H ₂ O	9
H ₂ O	3	H ₂ O	8	Probe	0,5
Probe	2	Probe	0,5		
Gesamtmenge/Well	20	Gesamtmenge/Well	20	Gesamtmenge/Well	20

2.4. Kits

Kit	Hersteller	Ort
Quick-Load® Lila 1 kb Plus DNA Leiter	New England Biolabs	Ipswich, USA
BCA-Kit	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Pierce™ ECL Western blot- ting Lösung	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Trichrome Stain (Masson) Kit™	Sigma-Aldrich®	St. Louis, USA

2.5. Enzyme

Enzym	Firma	Ort
Collagenase I aus Clostridium histolyticum Typ I	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Collagenase XI aus Clostridium histolyticum Typ XI	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Deoxyribonuclease I (bovin)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100X)	Thermo Fischer Scientific	Waltham, USA
Hyaluronidase aus Rinderhoden	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA

2.6. Antikörper

Antikörper	Reaktivität	Konjugate	Klon	Hersteller	Ort
B220/CD45R	Anti-Maus/Mensch	PE	RA3-6B2	Biolegend®	San Diego, USA
CD115	Anti-Maus	Biotin	AFS98	Biolegend®	San Diego, USA
CD11b	Anti-Maus/Mensch	APC-Cy7	M1/70	Biolegend®	San Diego, USA
CD45.2	Anti-Maus	PerCP/Cy5.5	104	Biolegend®	San Diego, USA
CD49b	Anti-Maus	PE	DX5	Biolegend®	San Diego, USA
CD90.2	Anti-Maus	PE	53-2.1	Biolegend®	San Diego, USA
F4/80	Anti-Maus	PE-Cy7	BM8	Biolegend®	San Diego, USA
Flow Cytometry Compensation Beads				Biolegend®	San Diego, USA
Ly6c	Anti-Maus	FITC	HK1.4	Biolegend®	San Diego, USA
Ly6g	Anti-Maus	PE	1A8	Biolegend®	San Diego, USA
NK1.1	Anti-Maus	PE	PK136	Biolegend®	San Diego, USA
Streptavidin	Biotin	Brilliant Violet 510™		Biolegend®	San Diego, USA
Ter119	Anti-Maus	PE	TER-119	Biolegend®	San Diego, USA

2.7. Futtermittel

Hochkalorisches Futter TD88137 Envigo, Indianapolis, USA

2.8. Mäuse

PF4-Cre⁻Gucy1b1^{flox/flox} (nachfolgend als Wildtyp (WT) bezeichnet)

PF4-Cre⁺Gucy1b1^{+flox}Ldlr^{-/-} und *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{+/+}Ldlr^{-/-}* (nachfolgend als *Ldlr^{-/-}* bezeichnet)

PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}

PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}

2.9. Verbrauchsgegenstände

Gegenstand	Firma	Ort
BD Microlance Kanüle 24 G 1 0,55 x 25 mm	BD Bioscience	Franklin Lakes, USA
Corning™ Falcon™ Röhrchen mit Zellfil- terkappe	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Deckgläser	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Eppendorf Safe-Lock Tubes, Reaktions- gefäß, 1,5 ml, Eppendorf Quality™, farb- los	Eppendorf	Hamburg, DE
Eppendorf Safe-Lock Tubes, Reaktions- gefäß, 2,0 ml, Eppendorf Quality™, farb- los	Eppendorf	Hamburg, DE
Falcon® 40 µm Cell Strainer, Blue, Ster- ile	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Falcon™ konische Zentrifugenröhrchen, 50 ml, mit Schraubdeckel	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Falcon™ Zellfilter	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
MACS® Cell Separation LS Column	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Glad- bach, DE
Neubauer-Zählkammer	Hausser Scientific Com- pany	Horsham, USA
Nunc® MicroWell™ 96 well Polystyrol- platten, farblos, flacher Boden	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Nunc™ Zellkultur-Multischalen, 48 wells, flacher Boden	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Nunc™ Zellkultur-Multischalen, 6 wells, flacher Boden	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Polyacrylamidgradientengel (4-20 %)	Bio Rad	Hercules, USA
Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran	Merck	Darmstadt, DE
Pre-Separations Filter	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Glad- bach, DE
Thermo Scientific™ Polysine Adhäsion- objektträger	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Zweiteilige Einmalspritze 10 ml	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, DE
Zweiteilige Einmalspritze 5 ml	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, DE

2.10. Bezugsquellen

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Merck, Darmstadt, DE	Leica Mikroskopie& Systeme GmbH, Wetzlar, DE
GE Healthcare, Buckinghamshire, GB	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Tecan Group, Männersdorf, SUI	Scientific Industries, Bohemia, USA
Eppendorf, Hamburg, DE	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, DE
Bio Rad, Hercules USA	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, DE
Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, DE	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
PromoCell, Heidelberg, DE	Sakura Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, NL
AppliChem, Darmstadt, DE	Biolegend, San Diego, USA
New England Biolabs, Ipswich, USA	
B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE	
Miltenyi Biotex GmbH, Bergisch Gladbach, DE	

2.11. Geräte

Gerät	Modell	Firma	Ort
BD LSRFortessa™	BD LSRFortessa™	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA
Hämatologie-Analysesystem	Sysmex XP 3000	Sysmex Europe GmbH	Norderstedt, DE
Hämatologisches Analysegerät	Blutlabor		
Homogenisator	Homogenisator	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
ImageQuant™ LAS 4000	ImageQuant™ LAS 4000	GE Healthcare	Buckinghamshire, GB
Kryostat CM 1850	Kryostat CM 1850	Leica Mikroskopie& Systeme GmbH	Wetzlar, DE
Leica DFC450C	Leica DFC450C	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH	Wetzlar, DE
Leica DMRB	Leica DMRB	Leica Mikroskopie& Systeme GmbH	Wetzlar, DE

Licht	Schott-Kaltlichtquelle KL200	Carl Zeiss AG	Oberkochen, DE
Lichtleiter	Schwanenhals-Lichtleiter	Zeiss	Jena, DE
Magnet mit Halterung für MACS	QuadroMACS™ Separator	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, DE
Mikroskop	Stemi 200C	Zeiss	Jena, DE
Mikroskop für Zellzählung und Zellkultur	Zeiss Axiovert 100	Carl Zeiss AG	Oberkochen, DE
Mini Trans-Blot® Cell	Mini Trans-Blot® Cell	Bio Rad	Hercules, USA
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio Rad	Hercules, USA
Mörser	Rotilabo®-Mörser mit Pistill, Reibfläche rau	Carl Roth GmbH + Co KG	Karlsruhe, DE
Plattenleser	Infinite® M200 PRO	Tecan Group	Männerdorf, SUI
PowerPac™ Basic Power Supply	PowerPac™ Basic Power Supply	Bio Rad	Hercules, USA
Taumel-Rollenmischer	Taumel-Rollenmischer	Marienfeld Superior	Lauda-Königsh- ofen
Thermomixer	Thermomixer	Eppendorf	Hamburg, DE
Veriti® 96-Well Thermal Cycler	Veriti® 96-Well Thermal Cycler	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Vortexer	Vortex-Genie® 2	Scientific Indust- ries	Bohemia, USA
Wasseraufbereitungssys- tem	Milli-Q® Reference Wasser- aufbereitungssystem	Merck	Darmstadt, DE
Zellsortierer	BD FACSAria III	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA
Zentrifuge	Heraeus™ Megafuge™ 40 R Universalzentrifuge	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Zentrifuge	Heraeus™ Fresco™ 21 Mikrozentrifuge	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 2.0R	Heraeus Instru- ments GmbH	Hanau, DE

2.12. Software

Software	Firma	Ort
Flow-Jo	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA
GraphPad Prism® software version 6.0 version 6.0 für Mac OS X	GraphPad	La Jolla, USA
ImageJ 1.50i	Wayne Rasband, National Institutes of Health	Bethesda, USA
ImageQuant™ LAS 4000 v1.2	GE Healthcare	Bukinghamshire, GB
Magellan™ data analysis software v7.2	Tecan Group	Männedorf, SUI
iControl v1.10	Tecan Group	Männedorf, SUI

3.0. Methoden

3.1. Versuchstiere

In dieser Arbeit wurden folgende Mauslinien verwendet:

PF4-Cre⁻Gucy1b1^{flox/flox} (nachfolgend als Wildtyp (WT) bezeichnet)

PF4-Cre⁺Gucy1b1^{+/-flox}Ldlr^{-/-} und *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{+/+}Ldlr^{-/-}* (nachfolgend als *Ldlr^{-/-}* bezeichnet)

PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}

PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}

C57Bl6/N Mäuse zur Kreuzung sowie *Ldlr^{-/-}* Mäuse wurden von *The Jackson Laboratories* bezogen. In *Ldlr^{-/-}* Mäusen sind beide Kopien des Gens, das für den LDL-Rezeptor kodiert, ausgeschaltet. Dies ermöglicht in Verbindung mit einer cholesterinreichen Diät die Analyse der Ausbildung atherosklerotischer Plaques in der Aortenwurzel sowie der vaskulären Inflammation.

PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox} Mäuse wurden im Rahmen eines durch das Deutsche Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung (DZHK) e.V. geförderten Kooperationsprojekts durch Prof. Dr. Andreas Friebe (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Durch Kreuzen der *Ldlr^{-/-}* und *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}* Mäuse entstanden im Verlauf *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* Mäuse, die zusammen mit den korrespondierenden Kontrollen (*PF4-Cre⁺Gucy1b1^{+/-flox}Ldlr^{-/-}* und *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{+/+}Ldlr^{-/-}*, nachfolgend als *Ldlr^{-/-}* bezeichnet) für die weiteren Versuche verwendet wurden.

Bei Vorliegen des *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}* Genotyps exprimieren die Mäuse mit Hilfe des Promotors für den Plättchenfaktor 4 (PF4) das Enzym Cre-Rekombinase. PF4 wird insbesondere in Megakaryozyten exprimiert, welche die Vorläuferzellen von Thrombozyten darstellen (Tiedt et al. 2007). Das Cre-LoxP-System wurde bereits ausführlich beschrieben und es darf an dieser Stelle auf die relevante Literatur (Sauer 1987) verwiesen werden. Im vorliegenden Fall exzidiert die Cre-Rekombinase eine von LoxP-Sites flankierte Sequenz aus dem *Gucy1b1*-Gen (nach früherer Nomenklatur *Gucy1b3* (HUGO Gene Nomenclature Committee 2019b)), was zu einer Inaktivierung des Gens führt. Da in Thrombozyten die Untereinheiten der sGC durch *Gucy1b1* und *Gucy1a1* kodiert werden, ist dies funktionell mit Knockout des *Gucy1a1*-Gens und einem Verlust der sGC-Aktivität in Thrombozyten vergleichbar. Ein weiterer Grund für die Verwendung von *Gucy1b1* als genetisches Target ist die Tatsache, dass ein Verlust der durch dieses Gen kodierten Untereinheit durch die andere β -Variante nicht kompensiert werden kann (zur Übersicht siehe (Mergia et al. 2006)).

Alle Versuchstiere wurden in der Tierhaltung des Deutschen Herzzentrums gezüchtet. Die Mäuse wurden zur mikrobiologischen Abschirmung in IVC-Käfigen vom Typ III H mit einer

Nutzungsfläche von 800 cm² (Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpreißenberg) gehalten. Die Tiere verfügten *ad libitum* über Futter und Wasser. Die Sauerstoffversorgung der luftundurchlässigen Käfige erfolgte über eine Gebläseeinheit mit HEPA-gefilterter Raumluft. Die Beleuchtung des Tierstalls erfolgte mit einem automatischen Lichtregime von 12 Stunden im Tag-Nacht-Rhythmus. Die Lichtintensitäten betragen in den Hellphasen 50-100 Lux. Alle durchgeführten Tierversuche wurden durch die Regierung Oberbayern gemäß §8 Absatz 1 des deutschen Tierschutzgesetzes genehmigt (Aktenzeichen: ROB-55.2-2532.Vet_02-15-176).

3.2. Cholesterinreiche Ernährung (Western Diet)

Um eine Hypercholesterinämie zu induzieren, erhielten alle Versuchstiere, neben dem Knock-out des LDL-Rezeptors, ab einem Alter von acht Wochen über einen Zeitraum von zehn Wochen eine cholesterinreiche Ernährung (21 % Fett und 0,2 % Cholesterol nach Gewicht; TD88137, Envigo). Die Tiere hatten zu jeder Zeit Zugang zu den Futterpellets. Am Ende der zehn Wochen wurden die Tiere euthanasiert.

3.3. Probenentnahme

Proben von 13 *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{fllox/fllox}Ldlr^{-/-}* und 15 *Ldlr^{-/-}* Mäusen dienten durchflusszytometrischen, laborchemischen und histologischen Untersuchungen. Die Probenentnahme der Versuchstiere erfolgte nach der zehnwöchigen cholesterinreichen Diät in einem Alter von 18 Wochen. Euthanasiert wurden die Tiere mittels einer Überdosis an Isofluran (CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, DE). Für die durchflusszytometrischen und laborchemischen Untersuchungen wurde mithilfe heparinierter Kapillarröhrchen 50 µl Blut aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen. Zur Verifizierung der zuvor bestimmten Genotypen diente eine *post mortem* entnommene Schwanz-Biopsie. Nach einer 4-Punkt-Fixierung der Mäuse wurden Brust- und Bauchhöhle eröffnet. Um Koagulationen in den Organen und der Aorta zu vermeiden, wurde das Gefäßsystem über den linken Ventrikel mit einer 24 G Nadel (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA) und 1x PBS-Puffer gespült. Inzisionen der Leber dienten zum Ablauf der Spüllösung, um eine Ruptur der Gefäße oder Läsion von Gewebe durch den erzeugten intravasalen Überdruck zu vermeiden. Anschließend erfolgte die Entnahme von Lunge, Leber, Milz und Nieren, welche in 1x PBS-Puffer gespült und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Organe wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Für die Durchflusszytometrie wurden die Aorten vom umliegenden Fett- und Bindegewebe frei präpariert. Dann wurden sie in der Aorta ascendens 2 mm hinter dem Herzen und 1 mm proximal der Iliakalbifurkation abgetrennt und entnommen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Aorten bei 4 °C in FACS-Puffer (Zusammensetzung siehe unter 2.1.) gelagert.

Die Herzen wurden zur histologischen Auswertung der atherosklerotischen Plaques entnommen, in 4 % Formaldehydlösung fixiert und anschließend in ein Einbettmedium (Tissue Tek, O.C.T. TM Compound, Sakura Finetek, Staufen) eingebettet.

3.4. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine, im Jahre 1983 durch Kary Mullis beschriebene *in-vitro*-Methode, die eine Amplifikation von genetischem Material ermöglicht (Mullis et al. 1986). Benötigt werden eine Original-DNS mit dem zu vervielfältigen Abschnitt (Template), zwei spezifische Oligonukleotidprimer, eine thermostabile DNS-Polymerase und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPS) (zur Übersicht siehe (Mülhardt et al. 2009)). Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten. Während des ersten Schrittes werden die Templates denaturiert. Hierbei kommt es zu einer Trennung der DNS-Stränge, so dass diese als zwei Einzelstränge vorliegen. Im zweiten Schritt (*primer annealing*) wird die Temperatur gesenkt und es hybridisiert jeweils ein Primer mit dem komplementären DNS-Strang. Im letzten und dritten Schritt erfolgt die Elongation. Ein zum Einzelstrang komplementärer DNS-Strang wird mithilfe der DNS-Polymerase synthetisiert. Dies erfolgt bei 72 °C, dem Temperaturoptimum der verwendeten DNS-Polymerase. Diese Methode wurde in dieser Arbeit angewendet, um den Genotyp der Versuchstiere zu bestimmen.

3.4.1. Probenvorbereitung

Die Präparation der DNS aus den Mausproben erfolgte mithilfe der alkalischen Lyse. Hierfür wurde die HotSHOT Methode (zur Übersicht siehe (Truett et al. 2000)) angewandt. Als Proben dienten die bei der Markierung der Mäuse anfallenden Ohrstanzen (siehe Absatz 3.1) sowie die bei der Euthanasie entnommenen Schwanz-Biopsien (siehe Absatz 3.3). Den Schwanz-Biopsien wurden jeweils 50 µl und den Ohrstanzen 30 µl der alkalischen Lösung 1 (Zusammensetzung siehe Absatz 2.1.) hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 20 min bei 95 °C wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt und mit der sauren Lösung 2 (Zusammensetzung siehe Absatz 2.1.) neutralisiert.

3.4.2. Durchführung

Es wurden zwei unterschiedliche PCR durchgeführt. Mit der β_1 -Multiplex PCR wurde überprüft, ob die β_1 -Untereinheit der sGC in den Versuchstieren gefloxt ist. Bei der *PF4-Cre* PCR hybridisiert der erste Primer mit der *PF4* Promotorsequenz und der zweite Primer mit dem Cre-Rekombinase Gen. Mit diesem Versuchsschritt wurde überprüft, ob die Cre-Rekombinase hinter den *PF4*-Promotor geschaltet ist. Da beide Versuchsstämme einen *Ldlr*-Knockout hatten, diente die *Ldlr*-PCR der Positivkontrolle.

Die Probenmengen der Primer für die PCR sind in der **Tabelle 1** aufgelistet. Die für die PCR angewandten Programme sind in der **Tabelle 2** dargestellt.

β₁- Multiplex	μl	Ldlr	μl	PF4-Cre	μl
PCR Mastermix	10	PCR Mastermix	10	PCR Mastermix	10
Lox-P-β ₁ -U ₁	1	WT-Ldlr	0,5	PF4-Cre-3'	0,3
Lox-P-β ₁ -L ₁	1	Mutant-Ldlr	0,5	PF4-Cre-5'	0,3
Del-P-β ₁ -L ₁	3	Common-Ldlr	0,5		
H ₂ O	3	H ₂ O	8	H ₂ O	9
Probe	2	Probe	0,5	Probe	0,5
Gesamtmenge/ Well	20	Gesamtmenge/ Well	20	Gesamtmenge/ Well	20

Tabelle 1: Zusammensetzung der Primer für die verschiedenen PCRs.

β₁- Multiplex			Ldlr			PF4-Cre		
T	Dauer	Zyklen	T	Dauer	Zyklen	T	Dauer	Zyklen
95 °C	5 min	1	95 °C	5 min	1	95 °C	5 min	1
95 °C	1 min		95 °C	20 s		95 °C	15 s	
60 °C	45 s	40	63 °C	30 s	40	55 °C	20 s	35
72 °C	75 s		72 °C	25 s		72 °C	25 s	
72 °C	7 min		72 °C	7 min		72 °C	7 min	
4 °C	dauerhaft		4 °C	dauerhaft		4 °C	dauerhaft	

Tabelle 2: PCR Programme, die in dieser Arbeit angewandt worden sind.

3.4.3. Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese handelt es sich um eine Methode, die die Auftrennung von Nukleinsäure-Strängen nach ihrer Größe ermöglicht. Die elektrophoretische Auftrennung der DNS-Fragmente erfolgt durch ein in ionischer Pufferlösung befindliches Agarosegel. Da DNS-Stränge negativ geladen sind, wandern sie während der Elektrophorese im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Die Größe der Proben ist hierbei maßgebend für die Geschwindigkeit. Größere DNS-Fragmente brauchen länger als kleinere um das Gel zu durchlaufen, weshalb es zu einer Auftrennung der DNS-Fragmente kommt. Um die Größe der Proben beurteilen zu können wird neben den Proben ein Marker mit DNS-Molekülen, deren Größen bekannt sind, aufgetragen. Diese Methode ermöglichte die bei der PCR vervielfältigten Genabschnitte für die Auswertung sichtbar zu machen. Für die Gelelektrophorese wurde ein 1 % Gel bestehend aus Agarose und TBE-Puffer gefertigt.

Zur Visualisierung der DNS wurden pro 100 ml Agarosegel 5 µl des fluoreszierenden Farbstoffs RotiR-GelStain (Carl Roth, Karlsruhe) hinzugefügt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit einem DNS-Gel -*Loading Dye* (Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA) in einem Verhältnis von 1:6 vermischt.

Dieses Reagenz bindet die DNS und stellt sicher, dass die Proben auf den Boden der Gel-taschen sinken. Des Weiteren hemmt das in der Lösung enthaltene EDTA metallabhängige Nukleasen und verhindert so einen Verdau der Proben. Bei 120 V liefen die Gele in 1x TBE-Puffer für zwei Stunden. Die Visualisierung der Banden erfolgte unter Verwendung des ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare, Buckinghamshire, GB) und dem ImageQuant™ LAS 4000 v1.2 (GE Healthcare, Buckinghamshire, GB) Programm. Die Auswertung der Banden erfolgte manuell.

3.5. Laborchemische Untersuchungen

Um nicht nur den Einfluss der sGC auf die atherosklerotische Veränderung der Gefäße beurteilen zu können, sondern auch den Effekt auf die Körperfettentstehung, wurden die Versuchstiere nach der Euthanasie gewogen. Damit die Voraussetzungen bei jedem Tier identisch sind, erfolgte die Gewichtserfassung vor der Blut- und Probenentnahme.

Die Bestimmung der Cholesterinwerte und der Leukozyten- sowie Thrombozytenzahlen erfolgte im Institut für Laboratoriumsmedizin des Deutschen Herzzentrums München aus in EDTA-Microvetten (Sarstedt, Nümbrecht) antikoaguliertem Blut mit einem automatischen Analysegerät (Hitachi Chiyoda, Japan).

3.6. Western Blot

Western Blotting ist eine Methode, mit der man zuvor aufgetrennte Proteine auf eine Trägermembran übertragen und visualisieren kann. Diese Methode wurde angewandt, um mithilfe spezifischer Antikörper den thrombozytenspezifischen Knockout der sGC-β₁-Untereinheit in den Versuchstieren darzustellen. Verwendet wurden verschiedene Gewebe der Versuchstiere, wie Lunge, Leber, Milz und Thrombozyten.

3.6.1. Probenvorbereitung

Zur Vorbereitung müssen die Proteine aus den verschiedenen Organen isoliert werden. Die Organe der Versuchstiere wurden zuerst in einem RIPA-Protease-Inhibitor Gemisch (Zusammensetzung siehe Absatz 2.1.) mit einem Homogenisator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) zerkleinert. Sobald makroskopisch keine Organstücke mehr zu sehen waren, wurden diese mit 4000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung mit 4x Laemmli-Puffer bei -20 °C asserviert.

Die Isolation der Thrombozyten erfolgte aus 1 ml Blut, welches retrobulbär entnommen und zur Gerinnungshemmung in 200 µl ACD-Lösung gegeben wurde. Das Blut wurde mit 400 µl PBS-Puffer verdünnt und anschließend für 10 min mit 100 *xg* bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach dem ersten Durchlauf wurde das thrombozytenreiche Plasma (PRP) entnommen. Nach der Zentrifugation (700 *xg*, 10 min bei Raumtemperatur) des thrombozytenreichen Plasmas wurde der Überstand verworfen.

Anschließend wurden 10 µl der Thrombozyten-Suspension mit PBS 1:100 verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Thrombozyten wurden weiterführend mit PBS-Puffer und 30 µl 2x Laemmli (Zusammensetzung siehe Absatz 2.1.) auf eine Konzentration von 200 Mio Thrombozyten pro ml gebracht. Die Thrombozyten wurden per Ultraschallba aufgeschlossen.

3.6.2. Proteinquantifizierung mittels Bicinchoninsäure- (BCA-) Test

Um eine definierte Proteinmenge für den Western Blot verwenden zu können, wurde mittels BCA-Messung die Proteinkonzentration der gewonnenen Proben bestimmt. Da von jeder Maus nur wenig Probenmaterial der Thrombozyten vorlag, wurde auf die Bestimmung der Proteinkonzentration in diesen Proben verzichtet. Die restlichen Proben wurden mit RIPA-Puffer 1:10 verdünnt. In jedes Well wurden 2 µl der verdünnten Probe und 198 µl Lösung des BCA-Puffers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) pipettiert. Die Vorbereitung der Lösungen erfolgte nach Herstellerangaben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min im Dunkeln wurden die Proteinkonzentrationen photometrisch mit dem Infinite® M200 PRO (Tecan Group, Männedorf, SUI) und der Magellan™ data analysis Software v7.2 (Tecan Group, Männedorf, SUI) bestimmt. Als Kontrolle diente eine Standardreihe mit bekannten Proteinkonzentrationen.

3.6.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von den Proteinen erfolgte mittels SDS-PAGE. Dabei handelt es sich um eine von Ulrich K. Laemmli im Jahre 1970 beschriebene Methode (Laemmli 1970), mit der es möglich ist Proteine in einem SDS-Gel nach ihrer molekularen Masse aufzutrennen. Vor der Auftragung auf das Gel wurden die Proben mit 4x Laemmli und RIPA-Puffer auf ein Volumen von 50 µl auf pipettiert. Das β-Mercaptoethanol, welches sich im Laemmli-Puffer befindet, zerstört die Disulfidbrücken der Proteine, wodurch sie ihre Tertiärstruktur verlieren (zur Übersicht siehe (Löffler et al. 2014)). Des Weiteren wurden die Zellen im Ultraschallbad dreimal für 30 s aufgeschlossen. Um die Proteine in ihre Primärstruktur zu denaturieren, wurden die Proben 5 min bei 95 °C in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) erhitzt. Dies bewirkt eine Unterbrechung der Wasserstoffbrücken und zusätzlich eine Inaktivierung von Proteasen (zur Übersicht siehe (Löffler et al. 2014; Rehm 2010)).

Anschließend wurden die Proben auf ein in 1x Elektrophorese-Puffer (Zusammensetzung siehe Absatz 2.1.) befindlichen Polyacrylamidgradientengel (4-20 %) (Biorad, Hercules, USA) aufgetragen und aufgetrennt (100 V, 1 h). Das im Gel befindliche anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an die zuvor denaturierten Proteine, wodurch diese keine Protein-Protein Wechselwirkungen mehr eingehen können und linearisiert werden (zur Übersicht siehe (Rehm 2010)). Durch die SDS-Moleküle wird die Eigenladung der Proteine überdeckt und einheitlich mit negativer Ladung versehen. Mithilfe des Molekularsiebeffekts des Gels können die Proteine in einem elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt werden (zur Übersicht siehe (Rehm 2010)). Um die daraus resultierenden Banden besser beurteilen zu können wurde neben die Proben ein Standard mit bekannten atomaren Masseneinheiten aufgetragen. Die Banden wurden anschließend mittels Immunfärbung sichtbar gemacht. In der **Tabelle 3** sind die Probenmengen aufgelistet.

Gewebe	Probenmenge (μl)	4x Laemmli (μl)	RIPA-Puffer (μl)	Proteinmenge (μg)
Milz WT	8,67	5,00	6,33	30
Milz KO	7,41	5,00	7,59	30
Lunge WT	1,77	5,00	13,23	3
Lunge KO	2,00	5,00	13,00	3
Thrombozyten WT	20,00	0	0	
Thrombozyten KO	20,00	0	0	

Tabelle 3: Auflistung von Probenmengen und Pufferlösungen. KO (*PF4-Cre⁺Gucy1b1^{fllox/fllox}Ldlr^{-/-}* Mäuse), WT (*Ldlr^{-/-}* Mäuse)

3.6.4. Blotting und Immunfärbung

Die auf dem Gel aufgetrennten Proteine wurden anschließend per *Wet Blotting*-Verfahren auf eine in Methanol aktivierte Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran (Merck Millipore, Billerica, USA) übertragen (100 V, 1,5 h). Anschließend wurde die Membran kurz in 1x PBS-T-Puffer gespült. Um eine Bindung von weiteren Proteinen und damit einhergehende unspezifische Antikörperreaktionen zu vermeiden, wurde die Membran mit 5 % Milch (Zusammensetzung siehe Absatz 2.1.) geblockt. Anschließend wurde die überschüssige Milch auf der Membran dreimal für fünf Minuten in 1x PBS-T-Puffer bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) abgespült. Die Proteinbanden wurden mittels Immunfärbung und ECL-Reaktion visualisiert. Hierbei binden zuerst Antikörper die zu visualisierenden Antigene. Dazu werden in einer zweiten Reaktion die Primärantikörper durch mit Peroxidase markierten Sekundärantikörper gebunden. Die Membran wird anschließend mit einem ECL-Puffer inkubiert.

Der ECL-Puffer enthält Luminol, welches durch die Peroxidase oxidiert wird. Es kommt zu einer Chemilumineszenz, welche mit einem Chemilumineszenz Imager erfasst werden kann (zur Übersicht siehe (Rehm 2010)). In dieser Arbeit wurde die β_1 -Untereinheit der sGC und als Positiv-Kontrolle das GAPDH visualisiert. Die Konzentrationsangaben der verwendeten Antikörper sind in der **Tabelle 4** aufgelistet. Die m β_1 -Antikörper wurden uns von Prof. Dr. Andreas Friebe (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Die Membran wurde bei 4 °C über Nacht mit den primären Antikörpern in 2,5 % w/v Milch (Zusammensetzung siehe Absatz 2.1.) auf einem Taumel-Rollenmischer (Marienfeld Superior™, Lauda-Königshofen) inkubiert. Nach der nächtlichen Inkubation wurden die nicht gebundenen Primärantikörper von der Membran mit PBS-T-Puffer abgespült. Anschließend wurde die Membran auf einem Wippschüttler für mindestens eine Stunde mit den Sekundärantikörpern in 2,5 % w/v Milch (Zusammensetzung siehe Absatz 2.1.) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Überreste mit PBS-T-Puffer von der Membran gewaschen. Die Visualisierung der Banden erfolgte mithilfe eines ECL-Puffers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Die Anwendung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Entwickelt wurden die Bilder mithilfe des ImageQuant™ LAS 4000 und der ImageQuant™ LAS 4000 v1.2 Software.

Primärantikörper:	Sekundärantikörper:
m β_1 1:1000	anti-Rabbit 1:100000
GAPDH 1:10000	

Tabelle 4: Konzentrationsangaben der Primär- und Sekundärantikörper

3.7. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, die angewandt wird, um einzelne Zellen zu quantifizieren, zu erfassen und zu sortieren. Mithilfe dieser Methode können nicht nur Gesamtpopulationen dargestellt werden. Moderne Durchflusszytometer sind in der Lage bis zu 100.000 Zellen mit 10-20 verschiedenen Eigenschaften pro Sekunde auszuwerten (zur Übersicht siehe (Patel 2007)). Aufgrund dieser Vielzahl können auch einzelne Subpopulationen bewertet werden. Es können zum einen Größe und Kompartimentierung von Zellen und zum anderen Fluoreszenzen beurteilt werden. Fluoreszenzen können nicht nur natürlich in den Zellen vorkommen. Auch können sie mittels Antigen-Antikörper Reaktion mit Fluorochrom gebundenen Antikörpern induziert werden. Eine Fluoreszenz ist eine kurzzeitig, spontan entstehende Emission von Licht. Die Elektronen des fluoreszierenden Farbstoffs werden angeregt und durch einen Laser auf ein höheres Energieniveau gehoben. Wenn diese wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurückfallen, emittieren sie ein Photon.

Diese Energieabstrahlung erfolgt in einem sichtbaren Spektralbereich, welcher auch als Emissionsspektrum bezeichnet wird (zur Übersicht siehe (Pötzsch 2010; Patel 2007)). Die Maxima der Emissionsspektren unterscheiden sich bei den verwendeten Fluorchromen. Somit können unterschiedliche charakteristische Farben visualisiert werden, was dazu führt, dass pro Zelle mehr als nur ein Oberflächenmerkmal beurteilt werden kann. Neben der beschriebenen spezifischen Zelldifferenzierung ist auch eine Differenzierung der Zellen anhand ihrer Größe und Kompartimentierung möglich. Hierfür werden die durch den Laser erzeugten Lichtstreuungssignale beurteilt. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*) gibt Hinweise über die Größe der Zelle und durch das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*) ist die Beurteilung der Kompartimente und Granulierung der Zellen möglich (zur Übersicht siehe (Pötzsch 2010)). Die Durchflusszytometrie wurde in dieser Arbeit angewandt, um die Zellen aus den atherosklerotischen Plaques der Aorten und aus dem Blut der Versuchstiere zu typisieren.

3.7.1. Vorbereitung der Proben

Die Aorten wurden nach ihrer Entnahme aus den Mäusen in FACS-Puffer (Zusammensetzung siehe Absatz 2.1) gegeben und von anheftenden Geweberesten befreit. Da eine der Knockout Mäuse ein abdominelles Aneurysma aufwies, wurde dieses Tier aus den durchflusszytometrischen Versuchen ausgeschlossen. Durch vorheriges Spülen konnten intraluminale Blutreste bereits aus den Aorten entfernt werden. Anschließend wurden die Aorten mit 1 ml enzymatischem Verdaumix (Zusammensetzung siehe Absatz 2.1.) in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) geben und manuell mithilfe einer Schere zerkleinert, bis makroskopisch keine große Aortenstücke mehr sichtbar waren. Um den Verdauprozess zu beschleunigen wurden die Aorten anschließend eine Stunde bei 37 °C und 750 rpm in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Nachfolgend wurde der Verdau-Aorten-Mix durch einen Nylon-Zellenfilter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in ein 50 ml Falcon (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) überführt. Um möglichst wenig Zellmaterial zu verwerfen, wurden die Reaktionsgefäße zweimal mit 1 ml FACS-Puffer gespült. Dann wurde der Filter mithilfe von FACS-Puffer ausgewaschen und das Falcon auf 40 ml aufgefüllt. Die Falcons wurden bei 400 *xg* und 4 °C für 8 min zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurden diese dekantiert und der Flüssigkeitsrest abgesaugt. Das Pellet wurde anschließend in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert und über eine Zellenfilterkappe in ein FACS-Röhrchen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gegeben. Um die Gesamtzahl der Zellen in den Proben zu bestimmen, wurden 10 µl Aliquot entnommen und bei 4 °C gelagert. Neben den Aorten wurde auch das Blut der Mäuse durchflusszytometrisch untersucht. Die Entnahme des Bluts ist unter Absatz 3.3 genauer beschrieben. Für die Durchflusszytometrie-Versuche wurde 50 µl Blut der Versuchstiere verwendet. Auch hier wurden 10 µl Aliquot entnommen, um vor der Durchflusszytometrie die genaue Anzahl der Leukozyten in den Proben zu bestimmen.

Die Aliquots beider Versuchsreihen wurden in einer Neubauer-Zählkammer (Hausser Scientific Company, Horsham, USA) gezählt. Um lebende Zellen von toten unterscheiden zu können wurden die Proben im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gemischt. Zu den restlichen 40 µl Blut wurde 1 ml Lysepuffer (Zusammensetzung siehe Absatz 2.1.) hinzugegeben, mit der Pipette vorsichtig vermischt, 5 Minuten inkubiert und dann bei 400 *xg* und 4 °C für 8 min zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand dekantiert und der Flüssigkeitsrest abgesaugt. Das Pellet wurde in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen gegeben. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Aorten- und Blutproben der Versuchstiere bei 4 °C gelagert.

3.7.2. Färbungen

Zur Unterscheidung der verschiedenen Zellpopulationen wurden monoklonale Fluorochrom-markierte Antikörper verwendet. Die Fluorochrome der Antikörper haben unterschiedliche Emissions-Maxima, was eine Differenzierung diverser Oberflächenantigene ermöglicht. Die verwendeten Fluorochrome, Emissions-Maxima, Exzitations-Maxima sind in der **Tabelle 5** aufgelistet.

Fluorochrom	Exzitations-Maximum [nm]	Emissions-Maximum [nm]	Fluoreszenz- Emissionsfarbe
APC-Cy7	650	785	nahes Infrarot
BV510	405	510	Grün
FITC	494	519	Grün
PE	496, 564	578	Gelb
PE-Cy7	496,564	785	nahes Infrarot
PerCP-Cy5.5	482	678	Rot

Tabelle 5: Verwendete Fluorochrome mit jeweiligem Exzitations-, Emissionsmaximum und der jeweiligen Fluoreszenz Emissionsfarbe

Die Proben der Versuchstiere wurden durchgehend bei einer Temperatur von 4 °C gehalten. Den vorbereiteten Proben (Protokoll siehe Absatz 3.8.1.) wurde jeweils 50 µl des ersten Antikörper Mastermix (Zusammensetzung siehe **Tabelle 6**) hinzu pipettiert. Dieser wurde mittels Vortexer (Scientific Industries, Bohemia, USA) mit den Proben vermengt und 15 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 1 ml FACS-Puffer aufgefüllt und bei 400 *xg* und 4 °C für 8 min zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurden diese dekantiert und der Flüssigkeitsrest abgesaugt. Die Pellets wurden in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert.

Antikörper	Konjugat	Verdünnung	Volumen in μl
B220	PE	1 in 600	0,5
CD49b	PE	1 in 1200	0,25
CD90.2	PE	1 in 3000	0,1
NK1.1	PE	1 in 600	0,5
Ter119	PE	1 in 600	0,5
Ly6g	PE	1 in 600	0,5
CD115	Biotin	1 in 600	0,5
FACS-Puffer			47,2
Volumen gesamt			50

Tabelle 6: Zusammensetzung des ersten Antikörper Mastermix mit Auflistung der jeweiligen Antikörper, ihren Konjugaten und der endgültigen Verdünnung

Dann wurde jeweils 50 μ l des zweiten Antikörper Mastermix (Zusammensetzung **Tabelle 7**) auf die Aortenproben gegeben. Der Sekundärantikörper Streptavidin (SA), welcher das an CD115 gekoppelte Biotin bindet, wurde nur zu den Blutproben der Versuchstiere hinzugegeben. Dem Rest des zweiten Mastermix wurde dann der SA-Antikörper hinzugegeben und anschließend wurde jeweils 50 μ l zu den Blutproben pipettiert. Der zweite Mastermix wurde mit den Proben mittels Vortexer vermischt und anschließend 15 min im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Proben mit 1 ml FACS-Puffer aufgefüllt und bei 400 xg und 4 °C für 8 min zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurden diese dekantiert und der Flüssigkeitsrest abgesaugt. Die Pellets wurden vorsichtig in 300 μ l FACS-Puffer resuspendiert und anschließend bei 4 °C bis zur durchflusszytometrischen Untersuchung gelagert.

Antikörper	Konjugat	Verdünnung	Volumen in μl
(SA	BV510)	1 in 600	0,5
Ly6c	FITC	1 in 600	0,5
CD45.2	PerCP-Cy5.5	1 in 630	1,0
F4/80	PE-Cy7	1 in 600	0,5
CD11b	APC-Cy7	1 in 600	0,5
FACS-Puffer			46,5
Volumen gesamt			\approx 50

Tabelle 7: Zusammensetzung des zweiten Antikörper Mastermix mit Auflistung der jeweiligen Antikörper, ihren Konjugaten und der endgültigen Verdünnung

3.7.3. Erstellung der Kontrollproben

Da bei der durchflusszytometrischen Untersuchung verschiedene Fluorochrome verwendet werden, muss das Gerät vorher mit Kontrollen kompensiert werden, um Überlappungen unterschiedlicher Fluorochrom-Signale zu minimieren. Hierfür wurden in zwei FACS-Röhrchen je 300 µl FACS-Puffer auf 20 µl Kontroll-Beads (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gegeben und anschließend mit je 1 µl der Antikörper Mastermixe für 15 min im Dunkeln inkubiert. Dann wurde den Kontrollen je 1 ml FACS-Puffer hinzugegeben und bei 400 $\times g$ und 4 °C für 8 min zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurden diese dekantiert und der Flüssigkeitsrest abgesaugt. Anschließend wurden die Zell-Pellets in je 600 µl FACS-Puffer vorsichtig resuspendiert.

3.7.4. Durchführung der Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie wurde bereits in Absatz 3.8. beschrieben. Es handelt sich hierbei um ein druckbetriebenes strömungstechnisches System. Die Zellen der Proben werden durch eine Durchflusszelle, welche fest mit dem Laser ausgerichtet ist, geführt. Der koaxiale Strom, bestehend aus den Zellen und der Ummantelung durch einen zellfreien Puffer, ermöglicht eine Zentrierung der Zelle gegenüber dem Laser. Die bei der Passage entstandene Lichtstreuung und die emittierte Fluoreszenz gelangen per Reflexion zu den mit Bandpassfiltern versehenen Photomultiplier-Detektoren, die selbst schwache Lichtsignale erkennen können. Die spektrale Auswahl der gesammelten Wellenlängen erfolgt durch die Bandpassfilter. Alle gesammelten Informationen werden anschließend durch ein Computerprogramm graphisch dargestellt (zur Übersicht siehe (Patel 2007)). Die Versuche wurden mit den Durchflusszytometern BD LSR Fortessa™ (BD Biosciences Franklin Lakes, USA), so wie BD FACSARIA III (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) und der BD FACS Diva Software durchgeführt. Nach den Kontroll-Beads (Zusammensetzung siehe Absatz 3.8.2.) wurden die Proben der Versuchstiere einzeln ausgewertet. Die Kompensation der Proben erfolgte manuell.

3.7.5. Auswertung

Zur Auswertung der durchflusszytometrischen Ergebnisse wurde die *Dot-Plot*-Darstellung gewählt. Mit dieser können zwei verschiedenen Parameter in einer zweidimensionalen Darstellung berücksichtigt werden. Mit einer Darstellung als Histogramm kann lediglich ein gemessener Parameter im Verhältnis zur Zellzahl angezeigt werden (zur Übersicht siehe (Patel 2007)). Das *Dot-Plot*-Diagramm stellt einzelne Zellen in Form eines Punktes dar. Auf der x-Achse sind die gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten des ersten ausgewählten Parameters aufgetragen und auf der y-Achse die Intensitäten des zweiten ausgewählten Parameters. Ein Zusammenspiel beider Parameter bestimmt die Position des Punktes auf dem Diagramm.

So ist eine Unterteilung in Quadranten, welche die Anzahl der Zellen in vorher definierte Bereiche anzeigt möglich. Die Auswertung der graphisch dargestellten Messwerte erfolgte mit der FlowJo-Software (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA).

3.8. Histologie

3.8.1. Gefrierschnitte

Zur quantitativen Beurteilung der atherosklerotischen Plaques wurden mit einem Mikrotom histologische Präparate der Herzen auf Höhe der Aortenklappen angefertigt. Die Herzen der Versuchstiere (Probeentnahme in Absatz 3.3 beschrieben) wurden in Kryoeinbettformen (Sakura Finetek™ Tissue-Tek™ Cryomold™) senkrecht, mit der Herzapex nach unten zeigend, positioniert. Das Einbettmedium (Tissue Tek, O.C.T.™ Compound, Sakura Finetek, Staufen) wurde anschließend in flüssigem Stickstoff ausgehärtet.

Die Proben wurden bis zu weiterer Verwendung bei -80 °C gelagert. Mit dem Kryo-Mikrotom (Modell CM 1850, Leica, Wetzlar) wurden 4 µm dicke Gefrierschnitte bei einer Umgebungstemperatur von -23 °C angefertigt und direkt auf einen Objektträger übertragen. Die Schnitte wurden seriell von der Aortenwurzel bis in die Herzkammer in einer parallel zu den Herzklappen verlaufenden Schnittführung angefertigt. Um durch eine durch Auftauen bedingte Aktivierung von Proteasen und auch Zerstörung von Proteinen zu vermeiden, wurden die Objektträger bis zur Färbung auf Trockeneis und bei -80 °C gelagert.

3.8.2. Masson-Trichrom-Färbung

Die Schnitte der Aortenklappen wurden mit einer Masson Trichrom Färbung angefärbt. Diese erzeugt eine Rotfärbung der Muskelfaser, eine Blaufärbung der Kollagenfasern und eine Schwarzfärbung der Zellkerne. Für die Färbung wurde das Trichrome Stain (Masson) Kit (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) und die Hämatoxylinlösung nach Weigert (Carl Roth, Karlsruhe, DE) verwendet. Die Vorbereitung der verwendeten Lösungen erfolgte nach Herstellerangaben. Die Zusammensetzung der Weigerts-Eisen-Hämatoxylin-Arbeitslösung ist in Absatz 2.1 beschrieben. Die Schnitte wurden in Anlehnung an das Protokoll des Kits gefärbt (Sigma-Aldrich). Die Anfertigung der histologischen Präparate ist in Absatz 3.11. beschrieben. Nach dem Auftauen der Präparate wurde durch mehrfaches Eintauchen in 1x PBS das Einbettmedium abgespült.

Die Masson-Trichrom-Färbung wurde nach folgendem Protokoll angefertigt:

- | | |
|---|---------|
| 1. Färben in Weigerts-Eisen-Hämatoxylin-Arbeitslösung | 5 min |
| 2. Spülen unter Leitungswasser | 5 min |
| 3. Spülen in Millipore Wasser | 2 s |
| 4. Färben in Biebrich-Scharlachrot-Säurefuchsin-Lösung | 5 min |
| 5. Kurz in Millipore Wasser baden | 2 s |
| 6. Färben in Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure-Lösung | 5 min |
| 7. Färben in Anilinblau-Lösung | 1,5 min |
| 8. Spülen in 1 % Essigsäure | 2 min |
| 9. Destilliertes Wasser | |

Nach der Färbung erfolgte die Dehydratisierung der Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe (einmal in Ethanol 70 %, einmal in Ethanol, 96 %, zweimal in Ethanol 100 %, zweimal in Xylol). Das Eindecken der Schnitte erfolgte mit Pertex (Histolabs Products AB, Götheburg, SE) und Deckgläschen. Die Präparate wurden bis zur Auswertung bei -20 °C gelagert.

3.8.3. Auswertung der Färbungen

Die Digitalisierung der histologischen Präparate erfolgte mit dem Mikroskop Leica DMRB (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, DE) und der Kamera Leica DFC450C (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, DE). Zum Verarbeiten und Speichern der Bilder wurde die Software LAS4.5. (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, DE) verwendet. Die morphometrische Auswertung der atherosklerotischen Plaques erfolgte manuell mit dem Programm ImageJ 1.50i (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, USA).

3.9. Statischer Adhäsionsversuch

Mittels in-vitro-Versuchen wurde die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen von genetisch nicht veränderter Wildtypmäuse (C57Bl6/N) untersucht. Hierfür wurden die Monozyten mit dem Überstand der aktivierten Thrombozyten der $Ldlr^{-/-}$ oder der $PF4-Cre^{+}Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}$ Mäuse inkubiert.

3.9.1. Isolation der Monozyten aus dem Knochenmark der Wildtypmäuse

Zur isolierten Gewinnung von Monozyten aus den Wildtypmäusen wurde die Methode der magnetisch aktivierten Zellsortierung (MACS) angewandt. Hierbei ist es anhand der Kenntnis über Oberflächenmoleküle möglich bestimmte Zellpopulationen spezifisch aus einem Zellgemisch abzutrennen. Das Zellgemisch wird mit sogenannten MicroBeads inkubiert. Hierbei handelt es sich um Antikörper an denen kleine Magnetpartikel gebunden sind.

Die MicroBeads erkennen so spezifische Antigene und binden diese. Beim Durchlaufen eines starken Magnetfelds werden die markierten Zellen zurückgehalten, wohingegen die unmarkierten Zellen das Magnetfeld ungehindert passieren können (Miltenyi et al. 1990). In diesem Verfahren unterscheidet man zwischen der positiven Selektion und der Depletion. Handelt es sich bei den Zielzellen um die markierten Zellen, spricht man von einer positiven Selektion. Sind jedoch die unmarkierten Zellen die Zielzellen wird das Verfahren Depletion genannt. In unserem Versuch haben wir das Verfahren der positiven Selektion angewandt (Miltenyi et al. 1990).

3.9.2. Probenvorbereitung

Die Isolation der Monozyten erfolgte aus drei Wildtypmäusen. Die Versuchstiere wurden mittels einer Überdosis Isofluran (Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, DE) euthanasiert. Es wurden die Wirbelsäule, das Becken, die Knochen der oberen und unteren Extremitäten sowie das Schulterblatt beidseits entnommen. Die entnommenen Knochen wurden vom umliegenden Muskel-, Fett- und Bindegewebe befreit und anschließend mithilfe eines Mörsers (Carl Roth GmbH Karlsruhe, DE) unter Zugabe von MACS-Puffer (Zusammensetzung siehe Absatz 2.1.) zerkleinert. Der Flüssigkeitsüberstand wurde über einen Zellenfilter in ein 50 ml Falcon überführt. Diese Prozedur wurde so lange wiederholt, bis die Knochen homogenisiert waren. Anschließend wurden die Falcons mit MACS-Puffer auf 40 ml aufgefüllt und dann bei 4 °C mit 300 *xg* für 10 min zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das zurückgebliebene Pellet in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert. Die Monozyten wurden mithilfe eines biotinylierten CD115-Antikörpers gebunden. 5 µl des Antikörpers wurden 30 min mit der Suspension im Dunkeln inkubiert. Um überschüssige Antikörper zu entfernen, wurde das Zell-Antikörper Gemisch mit 40 ml MACS-Puffer gewaschen und anschließend über ein Zellfilter in ein neues 50 ml Falcon überführt. Nach der Zentrifugation bei 4 °C mit 300 *xg* für 10 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen. Der Lösung wurden 70 µl SA-Beads hinzugefügt und für 15 min inkubiert. Bei dieser Methode handelt es sich um indirekte MACS über zwei Schritte, wobei die SA-Beads spezifisch das Biotin der zuvor markierten CD115-Antikörper binden. Um eine Zellverklebung zu vermeiden und unspezifische Bindungen der MicroBeads zu reduzieren wurde das Gemisch mit 40 ml MACS-Puffer gewaschen und über ein Zellfilter in ein frisches 50 ml Falcon überführt. Nach der Zentrifugation bei 4 °C mit 300 *xg* für 10 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 2,5 ml MACS-Puffer resuspendiert.

3.9.3. Separation der Monozyten mittels MACS

Für den nächsten Schritt wurden MACS LS Column Säulen (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE) mitsamt Zellseparationsfilter in die dafür vorgesehene magnetische Halterung (QuadroMACS™, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE) gespannt. Die Filter halten Zellaggregate und große Partikel zurück, um einen optimalen Fluss innerhalb der Trennsäulen zu erhalten. Die Zelltrennsäulen wurden vorab mit 3 ml MACS-Puffer gespült. Anschließend wurde das Zellgemisch auf die Säulen gegeben und dabei gefiltert. Um so wenig Zellmaterial wie möglich zu verlieren, wurden die Probengefäße anschließend mit einem weiteren ml MACS-Puffer gespült. Die Spüllösung wurde anschließend auch in die Zellseparationssäulen gegeben. Nachdem die Proben die Säule komplett durchlaufen hatten, wurden diese dreimal mit 3 ml MACS-Puffer gespült. Da eine positive Selektion erfolgte, konnte das aufgefangene Material verworfen werden. Nach der Entnahme aus dem Magnetfeld wurden die Säulen unter Druck mit 5 ml MACS-Puffer in ein neues 50 ml Falcon überführt. Somit wurden die zurückgehaltene Zellen ausgespült und im Falcon aufgefangen. Die Lösung wurde bei 4 °C mit 300 *xg* für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und anschließend wurde das Pellet bestehend aus den isolierten Monozyten in einem ml PBS resuspendiert.

Ein 10 µl Aliquot wurde aus der Monozyten Lösung (Isolierung siehe Absatz 3.14.) für die Zellzählung entnommen. Um lebende von toten Zellen unterscheiden zu können wurde das Aliquot im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gefärbt. Mittels Zellzählung konnte sichergestellt werden, dass über 95 % der Zellen lebendig sind. Gleichzeitig ermöglichte diese Zählung die Berechnung einer optimalen Verdünnung der isolierten Monozyten, um gleiche Zellkonzentrationen in den Proben der drei Mäuse zu erhalten. Für den Adhäsionsversuch wurde eine Zellkonzentration von 2 Mio Zellen pro ml benötigt. Die Lagerung der isolierten Monozyten erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C.

3.9.4. Isolation von Thrombozyten aus den Versuchsmäusen

Für den Adhäsionsversuch wurden Thrombozyten aus sechs *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* Mäusen und sechs *Ldlr^{-/-}* Mäusen isoliert. Die Euthanasie der Mäuse erfolgte mittels einer Überdosis Isofluran. Anschließend wurde ihnen retrobulbär 800 µl Blut entnommen und die Koagulation mit 200 µl ACD-Lösung (Zusammensetzung siehe Absatz 2.1.) gehemmt. Um die Thrombozyten aus dem Vollblut zu isolieren, wurde dieses für 15 Minuten bei 100 *xg* und Raumtemperatur zentrifugiert und das thrombozytenreiche Plasma (PRP) entnommen. Dieses wurde wiederum für 10 Minuten zentrifugiert (100 *xg* bei Raumtemperatur), der Überstand verworfen und das entstandene Pellet, bestehend aus den Thrombozyten, in 300 µl DMEM aufgelöst. Um sicherzustellen, dass in den Proben genug Thrombozyten isoliert worden sind,

wurde jeweils ein 10 µl Aliquot entnommen und mit dem hämatologischen Analysegerät Sysmex XP 3000 (Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Deutschland) quantifiziert. Bis zur weiteren Verwendung der Thrombozyten erfolgte eine Lagerung bei 4 °C.

3.9.5. Aktivierung der Thrombozyten

Die aus den Versuchstieren gewonnenen Thrombozyten (Vorgang im Absatz 3.14. beschrieben) wurden durch Schütteln aktiviert. Hierfür wurde die akquirierten Thrombozyten gleichmäßig auf zwei 1,5 ml Reagenzgefäße verteilt. In die eine Probe wurden 15 µl PBS-Puffer gegeben und in die andere Probe 15 µl eines Stickstoffmonoxid-Donors, S-Nitrosoglutathion (GSNO). In einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) wurden die Thrombozyten bei 25 °C und 1000 rpm 30 Minuten lang geschüttelt und anschließend 10 min bei 12.000 *xg* herunterzentrifugiert. Im Überstand befanden sich die durch die Aktivierung der Thrombozyten freigegebenen Substanzen.

3.9.6. Markierung der Monozyten

Die isolierten Monozyten (Vorgang siehe Absatz 3.14) wurden jeweils mit 2,5 µl Calcein-Acetoxy-methylester (AM) Lösung (Endkonzentration: 2 µg/ml) bei 37 °C im Dunkeln für 30 min inkubiert. Calcein ist ein Fluoreszenzfarbstoff, dessen Exzitations-Maximum bei 495 nm liegt. Calcein diffundiert in die Zellen und wird in lebenden Zellen in fluoreszierendes Calcein umgewandelt. So können die viablen Zellen markiert werden. Nach der Inkubation wurden die Lösungen bei 300 *xg* für 5 min runterzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in einem ml DMEM-Medium resuspendiert. Um auf die gewünschte Zellkonzentration zu kommen, wurden die Proben mit der bei der Zellzählung berechneten Mediummenge aufgefüllt.

3.9.7. Versuchsdurchführung des statischen Adhäsionsversuchs

Der Versuchsaufbau ist in **Abbildung 4** schematisch dargestellt. Auf einer 96 Well Platte wurden 20.000 Wildtyp Endothelzellen/Well ausgesät und vor Versuchsbeginn für 4 Stunden mit TNF- α (Verdünnung: 50 ng/mL) in DMEM inkubiert und so aktiviert. Anschließend wurde in Spalte eins der Überstand von den mit GSNO-inkubierten Thrombozyten aus den *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* Mäusen und in Spalte zwei der Platte der Überstand von den mit GSNO-inkubierten Thrombozyten aus den *LDLr^{-/-}* Mäusen aufgetragen. In Spalte drei wurde der Überstand von den mit PBS-inkubierten Thrombozyten aus den *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* Mäusen und in Spalte vier der Platte der Überstand von den mit PBS-inkubierten Thrombozyten aus den *LDLr^{-/-}* Mäusen aufgetragen. In jedes Well wurden anschließend 500.000 Monozyten aus Wildtyp Mäusen gegeben. Die Endothelzellen der Zeilen fünf und sechs wurden weder mit Überstand aktivierter Thrombozyten noch mit Monozyten behandelt und dienten der Negativ-Kontrolle.

Hier wurde jeweils 300 µl DMEM-Medium hinzu pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden nicht haftende Zellen dreimal mit 150 µl PBS-Puffer abgewaschen. Anschließend wurde jeweils 100 µl PBS-Puffer auf die Wells gegeben. Die Auswertung des Adhäsionsversuchs erfolgte mithilfe eines Mikroplattenlesers (Tecan Group, Männerdorf, SUI) und der Software Tecan iControl v1.10 (Tecan Group, Männerdorf, SUI). Gemessen wurde die Fluoreszenzintensität, die im Wesentlichen von der Menge der adhärierenden Monozyten abhängt. Desto mehr Zellen adhäreren umso höher ist die gemessene Fluoreszenzintensität.

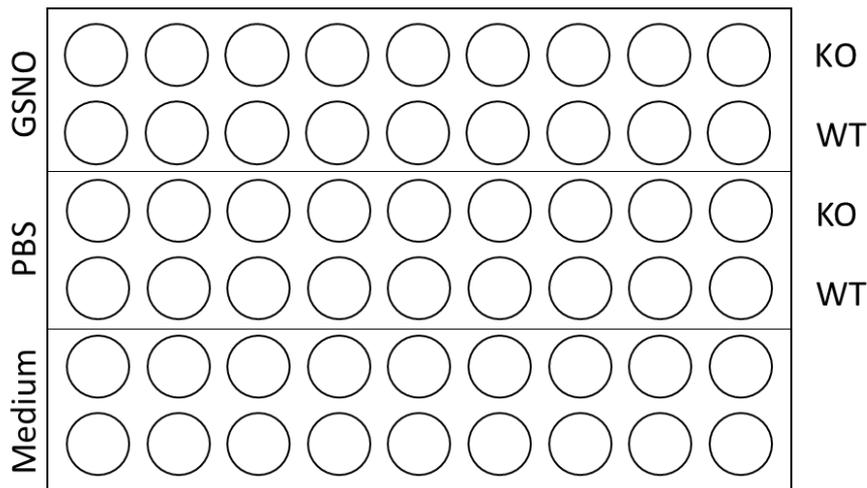


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des statischen Adhäsionsversuchs. KO: Spalte, in die der Überstand von aktivierten Thrombozyten aus *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldl^{r/-}* Mäusen aufgetragen wurde. WT: Spalte, in die der Überstand von aktivierten Thrombozyten aus *LDLr^{-/-}* Mäusen aufgetragen wurde. In den ersten zwei Spalten ist der Überstand von Thrombozyten, welche mit S-Nitrosoglutathion (GSNO) inkubiert wurden aufgetragen worden. In Spalte drei und vier wurde der Überstand von Thrombozyten, welche mit PBS inkubiert wurden aufgetragen. In Spalte fünf und sechs wurde als Kontrolle ausschließlich Medium auf die Wildtyp Endothelzellen aufgetragen.

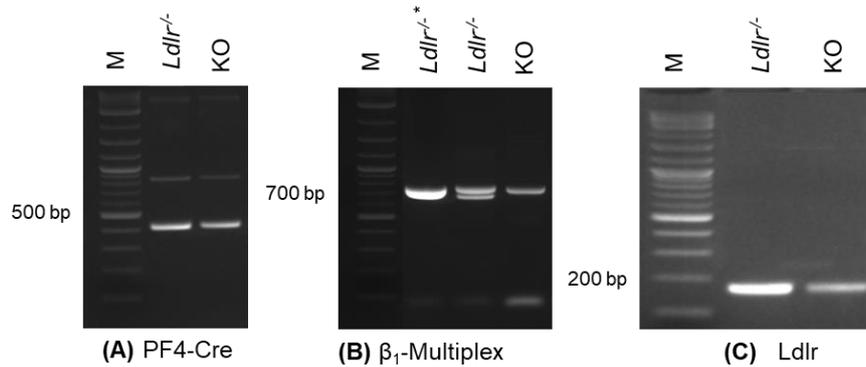
3.10. Statistische Auswertung

Für die graphische Darstellung und statistische Auswertung der Daten wurde die Software GraphPad PRISM 7 benutzt. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov Test überprüft. Für den Vergleich zweier Versuchsgruppen wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Die statistische Auswertung des Adhäsionsversuchs erfolgte mittels Einstichproben t-Test und der Mann-Whitney-U-Test diente zur Auswertung der Gewichtsanalysen der Mäuse. Für alle statistische Auswertungen wurde $p < 0,05$ als statistisch signifikant gesetzt.

4. Ergebnisse

4.1. Generierung von *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* Mäusen

Für die Versuche dieser Arbeit wurden *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* Mäuse verwendet. Zur Bestätigung der *Cre-LoxP*-vermittelten Deletion wurde aus Ohrstanzen der Mäuse isolierte DNS genotypisiert und der Genotyp anschließend mittels drei verschiedener PCRs überprüft. Bei den *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* Mäusen handelt es sich um homozygote *Cre*-Rekombinase Träger, in denen die Gensequenz der β_1 -Untereinheit der sGC homozygot durch *LoxP*-Sequenzen flankiert ist. Es wird angenommen, dass die *Cre*-Rekombinase in heterozygoten Mausmodellen ausreichend exprimiert wird, um die geflochtenen DNS-Sequenzen zuverlässig und zirkulär herauszuschneiden. Wie bereits im Absatz 1.2.1 beschrieben kann die Guanylatzyklase aus einer α_1 - oder α_2 -Untereinheit und einer β_1 -Untereinheit gebildet werden (Russwurm et al. 1998). Mit dieser Vorkenntnis kann davon ausgegangen werden, dass aufgrund der zellspezifischen Deletion des Genabschnitts in *Gucy1b1* in den Thrombozyten keine funktionsfähige Guanylatzyklase exprimiert werden kann. Da für die Genotypisierung keine Thrombozyten mit der aktiven *Cre*-Rekombinase verwendet wurden, sondern Ohrstanzen und Schwanzbiopsien, mussten in dieser Arbeit zwei verschiedene PCR-Methoden angewandt werden, um den thrombozytenspezifischen Knockout visualisieren zu können. In der β_1 -Multiplex PCR wurde überprüft, ob beide *Gucy1b1*-Allele der Knockout Mäuse geflocht sind (**siehe Abbildung 5 (B)**). Da die *LoxP*-Sequenzen 34 Basenpaare (bp) umfassen, sind die multiplizierten Genabschnitte der geflochtenen Mäuse größer als die der nicht geflochtenen Mäuse. Aus diesem Grund können zwei Banden unterschiedlicher Größe entstehen: nicht-geflochte Sequenzen mit 680 bp und geflochte Sequenzen mit 714 bp. Als homozygoter Knockout galten die Mäuse, die bei der PCR nur eine Bande auf der Höhe von 714 bp zeigten. Die Mäuse der *Ldlr^{-/-}* Linie stellten sich in der β_1 -Multiplex PCR entweder mit zwei Banden – davon eine mit 714 Basenpaaren und eine mit 680 bp – oder mit nur einer Bande auf der Höhe von 680 bp dar (**siehe Abbildung 5 (C)**). Neben der β_1 -Multiplex-PCR wurde bei der *PF4-Cre*-PCR überprüft, ob das die *Cre*-Rekombinase codierende Gen distal des *PF4*-Promotors lokalisiert ist (**siehe Abbildung 5 (A)**). Die *Cre*-Rekombinase umfasst 450 bp und stellt sich in Mäusen, die diese exprimieren, nach Durchführung der PCR und Auftragung aufs Gel als eine Bande dar (Tiedt et al. 2007). Sie ist in beiden Versuchsstämmen nachweisbar. Der thrombozytenspezifische Knockout konnte nur dann erreicht werden, wenn die Versuchstiere sowohl homozygot geflocht waren als auch das Gen für die *Cre*-Rekombinase in der PCR nachgewiesen werden konnte. In beiden Gruppen der Versuchstiere lag auch ein homozygoter *Ldlr*-Knockout vor. Die Banden der *Ldlr*-PCR wurden bei den Knockout Mäusen bei 189 bp und bei den Wildtypmäusen bei 350 bp erwartet. Vor Einschluss in die Versuche wurde die Genotypisierung mittels PCR wiederholt.



Ldlr^{-/-}: *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{+/-flox}Ldlr^{-/-}* und *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{+/-}Ldlr^{-/-}* Mäuse
Ldlr^{-/-*}: *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{+/-}Ldlr^{-/-}* Mäuse
KO: *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* Mäuse
M: Marker

Abbildung 5: Qualitätskontrolle der Cre-LoxP-vermittelten Deletion mittels PCR der Knockout (KO, *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}*) und *Ldlr^{-/-}* (*PF4-Cre⁺Gucy1b1^{+/-flox}Ldlr^{-/-}* und *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{+/-}Ldlr^{-/-}* Mäuse) Mäuse mittels β_1 -Multiplex, *PF4-Cre* und *LDLr* PCR. **(A)** Die *PF4-Cre* PCR überprüft, ob distal des *PF4*-Promotors eine Cre-Rekombinase lokalisiert ist, die einer Bandengröße von 450 bp entspricht. Sie ist in beiden Versuchsstämmen nachweisbar. **(B)** Darstellung der β_1 -Multiplex PCR. Nicht geflochte Gensequenzen entsprechen 680 Basenpaare (bp), geflochte Sequenzen haben 714 bp. Bei Mäusen der *Ldlr^{-/-}* Linie gibt es zwei Möglichkeiten der Darstellung - *Gucy1b1^{+/-flox}* mit zwei Banden, davon eine mit 714 Basenpaaren und eine mit 680 bp oder *Gucy1b1^{+/-}* (s. *Ldlr^{-/-}*) mit nur einer Bande auf der Höhe von 680 bp. **(C)** Positivkontrolle in Form einer *LDLr* PCR. Sowohl KO als auch WT Mäuse haben einen Knockout der LDL-Rezeptoren, weshalb eine Bandengröße von 189 bp erwartet wird. Bei fehlendem *LDLr*-Knockout liegt die Bandengröße bei 350 bp.

4.2. Expression der β_1 -Untereinheit in *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}* Thrombozyten

Nach der Bestätigung des Genotyps der Mäuse wurde die intrazelluläre Konzentration der β_1 -Untereinheit mittels Western Blot analysiert. Untersucht wurde, ob die heterozygote Expression der Cre-Rekombinase ausreichend ist, um eine Deletion des *Gucy1b1*-Gens sicherzustellen. Eine Deletion des Gens gilt in diesem Versuch als nachgewiesen, wenn in den Proben der *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}* Thrombozyten die Bande der β_1 -Untereinheit durch die Immunfärbung nicht dargestellt werden kann, während bei den Kontrollproben der anderen Gewebe und der von den *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}* Thrombozyten Banden zu erkennen sind. Als Ladekontrolle wurde GAPDH detektiert. Die β_1 -Untereinheit hat eine Molekülmasse von 63-73 kDa. **Abbildung 6 A** zeigt exemplarisch einen Western Blot dieser Versuchsreihe. Mit dem Hintergrundwissen, dass die sGC ohne β_1 -Untereinheit nicht funktionsfähig ist, konnte ein thrombozytenspezifischer Knockout der sGC mit diesem Versuch angenommen werden. Die sGC hat eine integrale Rolle in der NO-vermittelten Inhibition der Thrombozytenaggregation.

Um den Verlust der thrombozytären sGC auch funktionell nachzuweisen, wurde in Folgeuntersuchungen, die nicht Bestandteil dieser Arbeit waren, die ADP-vermittelte Thrombozytenaggregation unter *Baseline*-Bedingungen sowie nach Stimulation der sGC mit dem NO-Donor Natriumnitroprussid analysiert (Mauersberger/Sager et al., eingereicht). Während die Thrombozytenaggregation unter *Baseline*-Bedingungen in beiden Genotypen vergleichbar war (**Abbildung 6 B**), zeigte sich nach NO-Gabe eine signifikante Reduktion der NO-vermittelten Thrombozytenaggregation in Wildtyp – im Vergleich zu *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{fllox/fllox}* Mäusen (**Abbildung 6 C**). Diese Erkenntnisse sind die Voraussetzung für die nachfolgenden Versuche.

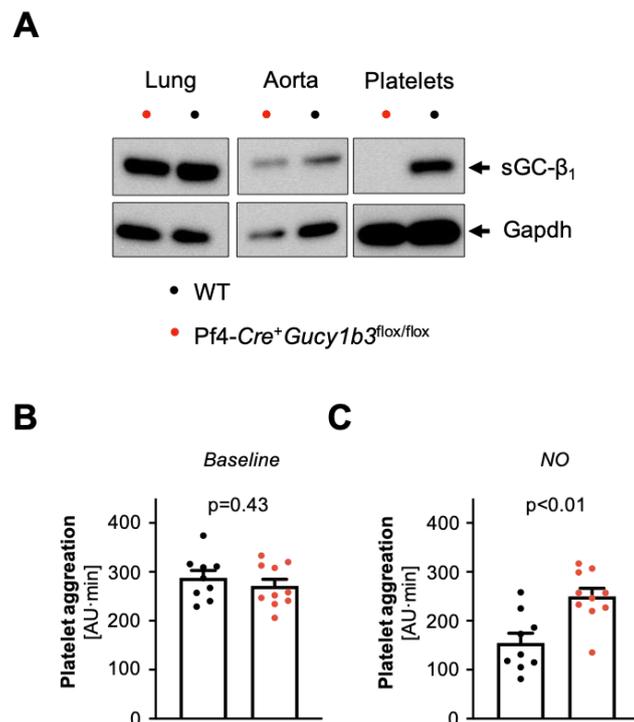


Abbildung 6: Knockout der sGC in Thrombozyten. **(A)** Western Blot von Lunge (*Lung*), Aorta und Thrombozyten (*Platelets*) im Vergleich zwischen Wildtyp (WT) und *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{fllox/fllox}* Mäusen. Es wurden die β_1 -Untereinheit der sGC (sGC- β_1) sowie GAPDH als Ladekontrolle detektiert. **(B)** ADP-induzierte Thrombozytenaggregation (*platelet aggregation*) in WT- und *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{fllox/fllox}* Mäusen unter *Baseline*-Bedingungen. **(C)** ADP-induzierte Thrombozytenaggregation (*platelet aggregation*) in WT- und *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{fllox/fllox}* Mäusen nach Stimulation der sGC mittels Natriumnitroprussid. Die Daten zeigen Mittelwert und Standardfehler. Ungepaarter t-Test. Siehe (Stroth et al. 2018) und (Mauersberger/Sager et al., eingereicht).

4.3. Gewichtsverhältnisse und Blutanalysen in *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* und *Ldlr^{-/-}* Mäusen

Es ist bekannt, dass sowohl der Cholesterinmetabolismus als auch Übergewicht einen Einfluss auf die Entstehung von Atherosklerose haben (zur Übersicht siehe (Catapano et al. 2016)). Um den Effekt der thrombozytären Guanylatzyklase auf diese Parameter beurteilen zu können, wurden in beiden Versuchsgruppen die Cholesterinwerte sowie die Leukozyten- und Thrombozytenzahl nach cholesterinreicher Kost und das Gewicht vor bzw. nach cholesterinreicher Ernährung bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 7** dargestellt. Die Versuche zeigten keinen signifikanten Unterschied der Cholesterinwerte nach cholesterinreicher Ernährung zwischen *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* und *Ldlr^{-/-}* Mäusen (**Abbildung 7 A**). Während sich bei den Thrombozytenzahlen ein Trend hin zu einer geringeren Zahl bei *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* Mäusen zeigte (**Abbildung 7 B**), waren die Leukozytenzahlen nach cholesterinreicher Ernährung gleich (**Abbildung 7 C**). Die Gewichtsanalyse ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, weder vor noch am Ende der cholesterinreichen Ernährung (**Abbildung 7 D**).

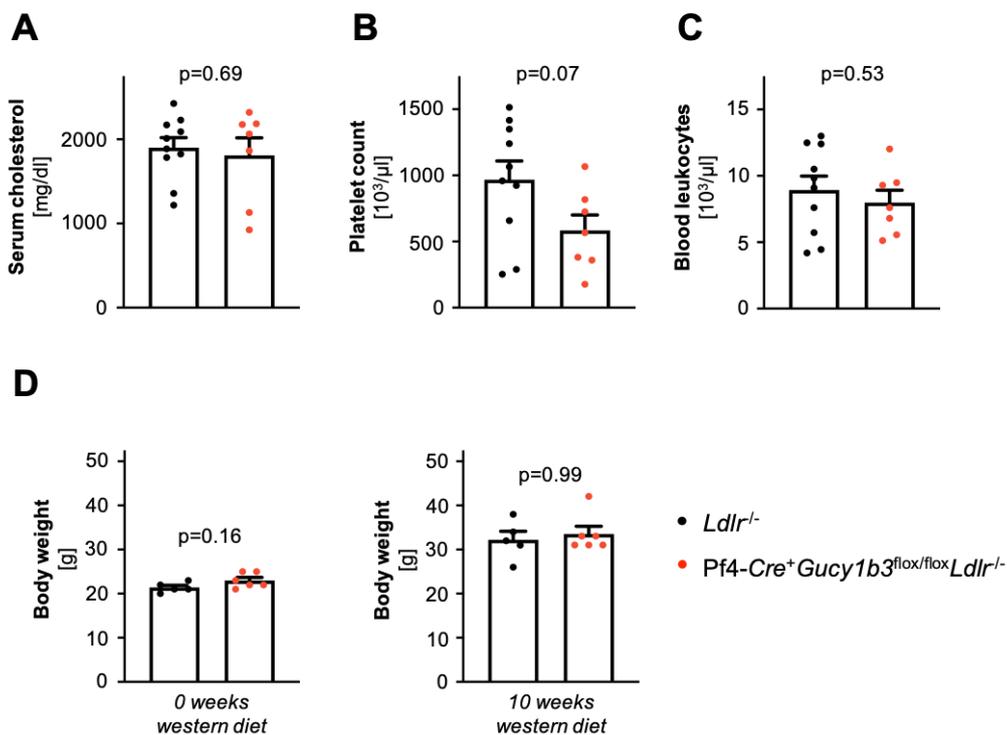


Abbildung 7: Serumcholesterinwerte (*Serum cholesterol*) (A), Thrombozytenzahlen (*Platelet count*) (B) und Leukozytenzahlen (*Blood leukocytes*) (C) nach cholesterinreicher Ernährung in *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* und *Ldlr^{-/-}* Mäusen. D. Körpergewicht (*Body weight*) vor (links) und nach (rechts) cholesterinreicher Ernährung in *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* und *Ldlr^{-/-}* Mäusen. Ungepaarter t-Test (A-C), Mann-Whitney-U-Test (D). Aus (Mauersberger/Sager et al., eingereicht).

4.4. Bildung atherosklerotischer Plaques in *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* und *Ldlr^{-/-}* Mäusen

Die morphometrische Analyse der atherosklerotischen Plaques erfolgte anhand histologischer Präparate. Beurteilt wurde hierbei die Größe der atherosklerotischen Plaques auf Höhe der Aortenklappe von *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* und *Ldlr^{-/-}* Mäusen. In **Abbildung 8** ist jeweils ein Schnitt einer Versuchsgruppe exemplarisch dargestellt.

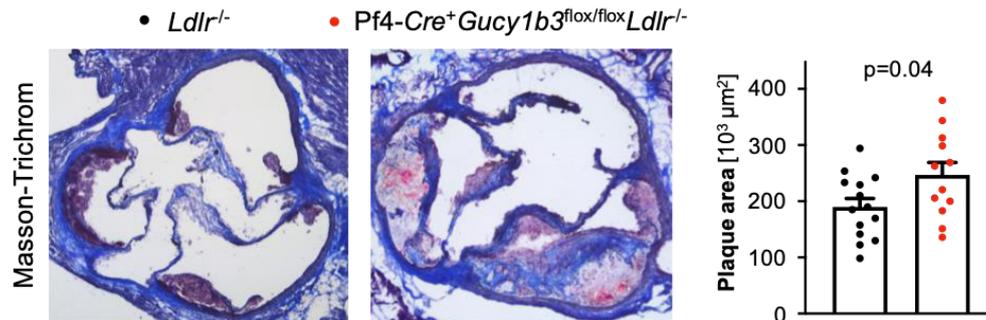


Abbildung 8: Plaques im Bereich der Aortenwurzel im Vergleich zwischen *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* und *Ldlr^{-/-}* Mäusen nach cholesterinreicher Ernährung. Ungepaarter t-Test. Siehe (Stroth et al. 2018) und (Mauersberger/Sager et al. (eingereicht)).

Das linke Bild zeigt die atherosklerotischen Veränderungen auf Höhe der Aortenklappen einer *Ldlr^{-/-}* Maus, das rechte Bild die einer *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* Maus. Die atherosklerotischen Veränderungen der sGC-Knockout Maus scheinen weiter fortgeschritten zu sein als die der sGC-Wildtyp Maus. Die histologischen Präparate in **Abbildung 8** zeigen eine Infiltration der Tunica media, sowie ein ausgeprägtes exzentrisches Wachstum der Plaques bei der *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* Maus. Dagegen ist bei der *Ldlr^{-/-}* Maus keine ausgeprägte Infiltration der Tunica media festzustellen. Die fibrotische Kappe, bestehend aus extrazellulärer Matrix und migrierten glatten Muskelzellen, erscheint auch in der Histologie der Knockout Maus wesentlich prominenter. Neben atherosklerotischen Veränderungen der Aortenklappen in beiden Versuchstieren zeigt sich lediglich in der Histologie der Knockout Maus ein ausgeprägter nekrotischer Kern. Die morphometrische Ausmessung der atherosklerotischen Läsionen ergab eine signifikant größere Läsionsfläche in *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* Mäusen. Die Ergebnisse hiervon sind ebenfalls in **Abbildung 8** dargestellt. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* Mäuse größere atherosklerotische Plaques entwickelten als *Ldlr^{-/-}* Mäuse.

4.5. Inflammation der Gefäßwand in *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* und *Ldlr^{-/-}* Mäusen

Wie bereits in Absatz 1.1.1 beschrieben, ist bekannt, dass Atherosklerose ein chronisch entzündlicher Prozess ist (zur Übersicht siehe (Lusis 2000)). Da in den vorherigen Versuchen kein Effekt der thrombozytären sGC auf das Gewicht und die Cholesterinwerte, jedoch ein Einfluss auf die Plaquebildung beobachtet werden konnte, wurde in diesem Versuch der Zusammenhang mit Zellen des Immunsystems, vor allem Monozyten und Neutrophilen, untersucht. In dieser Versuchsreihe wurden mittels Fluorochrom-gebundenen Antikörpern bekannte Oberflächenantigene von Zellen markiert und quantifiziert. Hierfür wurden Aortenproben und Blut von *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* und *Ldlr^{-/-}* Mäusen nach cholesterinreicher Ernährung untersucht. In **Abbildung 9** sind die Schritte der durchflusszytometrischen Auswertung am Beispiel der Aorten-Probe einer Knockoutmaus dargestellt. Die verwendete *Dot-Plot*-Darstellung ermöglicht eine Berücksichtigung von zwei verschiedenen Parametern in einer zweidimensionalen Darstellung. Hierbei entspricht jeder Punkt einer Zelle, was eine Quantifizierung der gesuchten Zellen ermöglicht. **Abbildung 9 A** zeigt die sogenannte *scatter gated* Fluoreszenz-Analyse. Mittels Analyse des Vorwärtsstreulichts (*forward scatter*, FSC-A) und des Seitwärtsstreulichts (*side scatter*, SSC-A) ist die Differenzierung zwischen lebendigen und toten Zellen möglich. Hierbei ist auf die Ordinatenachse das Vorwärtsstreulicht (FSC-A) und auf die Abszissenachse das Seitwärtsstreulicht (SSC-A) aufgetragen. Lebende Zellen erzeugen eine höhere Vorwärts- und eine geringere Seitwärtsstreuung als tote Zellen (zur Übersicht siehe (Patel 2007)). In den **Abbildungen 9 B-D** werden verschiedene Emissionen der Fluoreszenzen gegeneinander aufgetragen. Spezifische Fluoreszenzemissionen führen zu einem erhöhten Impuls und somit zu einer höheren Gate-Zahl im Diagramm (zur Übersicht siehe (Patel 2007)). Zur Zellanalyse können die Diagramme in vier Quadranten unterteilt werden. Anhand **Abbildung 9 B** veranschaulicht bedeutet das, dass die Zellen, die im Quadranten unten links aufgetragen sind, weder als eindeutig CD45.2- noch als eindeutig CD11b-positiv gelten. Bei Zellen im Quadranten unten rechts handelt es sich um CD11b positive Zellen. Die Zellen im Quadranten oben links sind CD45.2 positiv, die im Quadranten oben rechts sowohl CD45.2, als auch CD11b positiv. Das Oberflächenantigen CD45.2 wird auf allen hämatopoetischen Zellen, bis auf Erythrozyten und Thrombozyten exprimiert. CD11b wird überwiegend in Dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen und Granulozyten exprimiert. Im Diagramm, welches in **Abbildung 9 B** dargestellt ist, werden mithilfe der Antigene CD45.2 und CD11b myeloische Zellen aus dem Zellgemisch herausgefiltert. Zellen im rechten oberen Quadranten sind CD45.2- und CD11b-positiv. Anschließend wird in **Abbildung 9 C** nach der Expression von zelltypischen Markern von hämatopoetische Zellen (in diesem Fall Ly6g, Ter119, NK1.1, CD90.2, CD49b, B220/CD45R, CD11b) und CD45.2 unterschieden.

In **Abbildung 9 D** erfolgt die Detektion von Monozyten, die auch Ly6c exprimieren. Zellen in der oberen Hälfte des Diagramms exprimieren das Oberflächenantigen F4/80, ein Antigen, welches in murinen Makrophagen exprimiert wird.

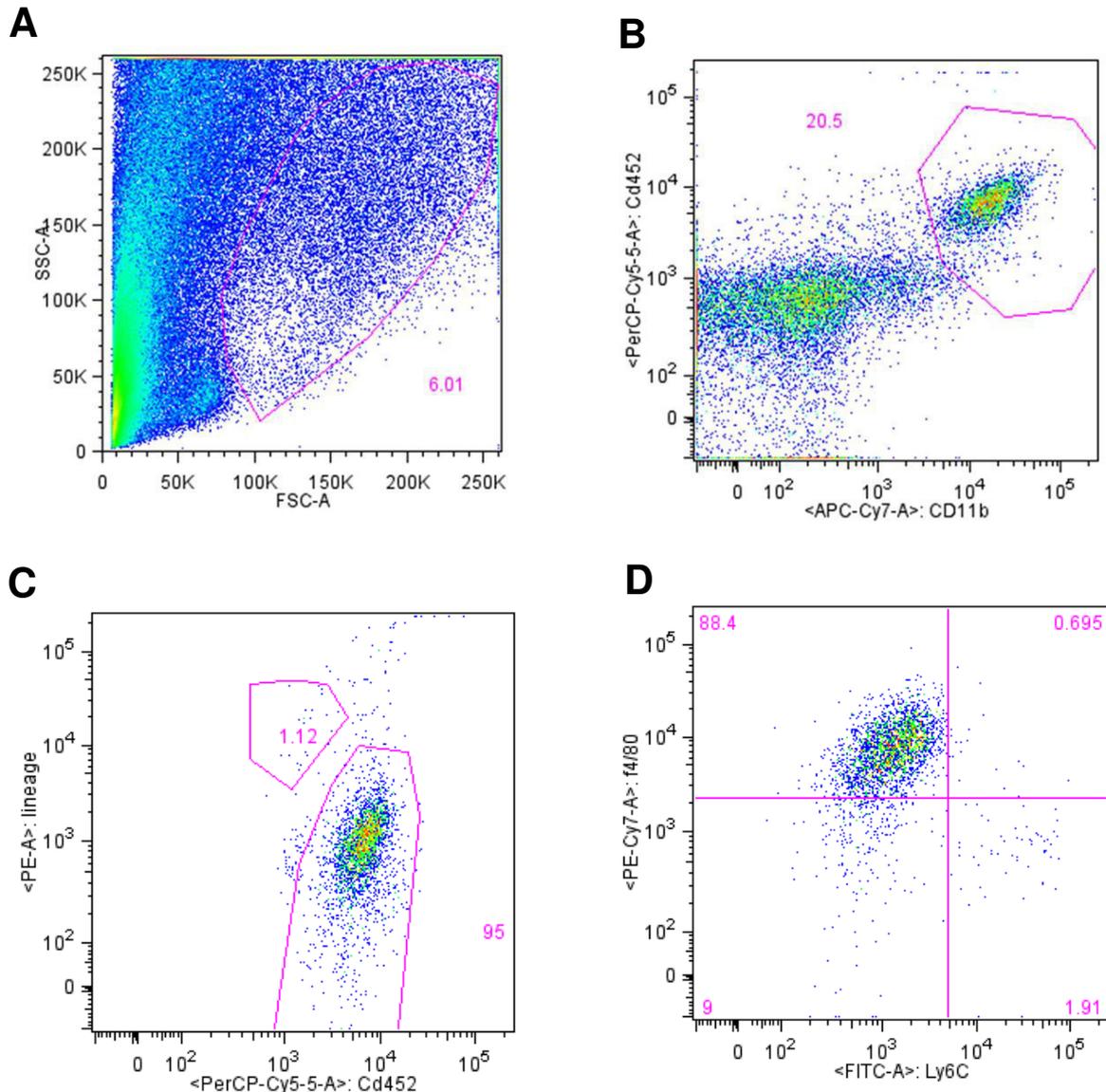


Abbildung 9: Schritte der durchflusszytometrischen Auswertung am Beispiel einer Aorten-Probe einer Knock-outmaus dargestellt. In die Dot-Plot Darstellung sind einzelne Gates eingetragen. Diese dienen der Selektion bestimmter Zellpopulationen. **(A)** FSC-A vs. SSC-A, **(B)** APC-Cy7-A: CD11b vs. PerCP-Cy5-5-A: Cd45.2, **(C)** PerCP-Cy5-5-A: Cd45.2 vs. PE-A: lineage, **(D)** FITC-A: Ly6c vs. PE-Cy7-A: F4/80.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung sind in der **Abbildung 10** dargestellt. Die Versuche zeigten, dass nach einer cholesterinreichen Diät über zehn Wochen in der Aorta von *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldl^{r/-}* Mäusen im Vergleich zu *Ldl^{r/-}* Mäusen eine signifikant höhere Anzahl an Neutrophilen und Ly6c^{high} Monozyten nachweisbar ist.

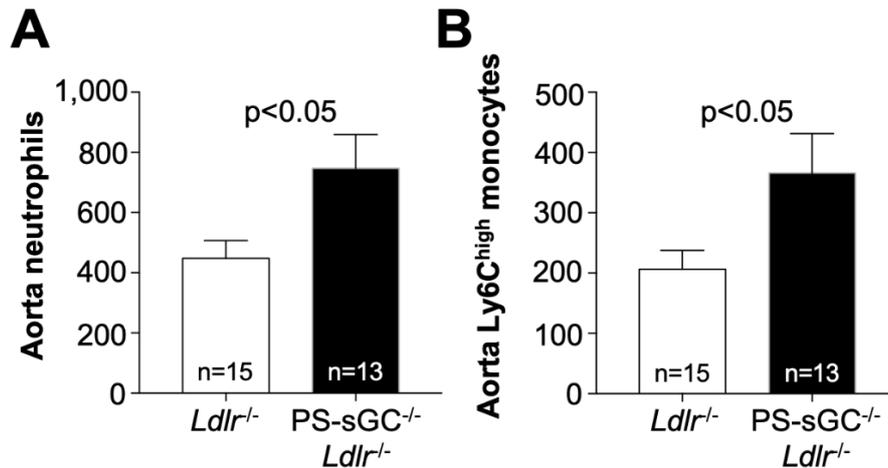


Abbildung 10: Anzahl von neutrophilen Granulozyten (A) und Ly6C^{high} Monozyten (B) in der Aorta von *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* (hier *PS-sGC^{-/-}Ldlr^{-/-}*) und *Ldlr^{-/-}* Mäusen nach cholesterinreicher Ernährung. Ungepaarter t-Test. Aus (Stroth et al. 2018).

4.6. Adhäsion von Monozyten in Anwesenheit von Überstand aktivierter Wildtyp oder *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}* Thrombozyten

Die durchflusszytometrischen Versuche haben ein erhöhtes Aufkommen von Ly6C^{high} Monozyten in atherosklerotischen Plaques der *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* Mäuse gezeigt. Um zu überprüfen, ob es einen Zusammenhang zwischen dem thrombozytenspezifischen Knockout der Guanylatzyklase und der Adhäsion von Monozyten an das Endothel gibt, wurde dies im Beisein von Überstand aktivierter Thrombozyten aus *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* und *LDLR^{-/-}* Mäusen in einem Zellkultur-Experiment analysiert. Die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen ist ein essentieller Schritt während der Einwanderung in atherosklerotischen Plaques (zur Übersicht siehe (Weber et al. 2008)). Thrombozyten von *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}* - und *LDLR^{-/-}* Mäusen wurden im Rahmen des *in vitro* Versuches jeweils mit einem NO-Donor oder PBS-Puffer inkubiert und aktiviert. Durch die Aktivierung der Thrombozyten befindet sich der Inhalt ihrer Granula in dem Überstand mit dem die fluoreszenzmarkierten Monozyten inkubiert wurden. Die am Ende des Versuches gemessene Intensität der Fluoreszenz ermöglicht eine Aussage über die Anzahl der adhärenen Monozyten. Dadurch war ein Vergleich des Einflusses auf die Adhäsion von Monozyten, entweder durch eine nicht funktionsfähigen Guanylatzyklase in den Thrombozyten der *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}* Mäuse oder eine funktionsfähigen Guanylatzyklase in den Thrombozyten der *LDLR^{-/-}* Mäuse, möglich. Um den isolierten Effekt – induziert durch die Aktivierung der Guanylatzyklase in den Thrombozyten – auf die Adhäsion der Wildtyp Monozyten an das Endothel besser beurteilen zu können wurde jeweils die Intensität der Fluoreszenz der mit PBS aktivierten Thrombozyten mit der Intensität, der mit GSNO aktivierten Thrombozyten dividiert. In der **Abbildung 11** sind diese Ergebnisse dargestellt.

Der Vergleich der Adhäsion von Monozyten hat gezeigt, dass nach Inkubation mit dem Überstand der aktivierten Thrombozyten aus den *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}* Mäusen signifikant mehr Monozyten an Endothelzellen adhärten. Es kam zu um 13% gesteigerter Adhäsion der Monozyten, welche mit dem Überstand der Thrombozyten aus *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}* Mäusen inkubiert wurden.

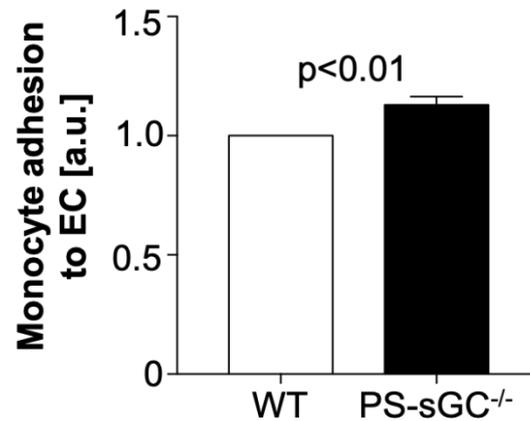


Abbildung 11: Adhäsion von Wildtyp Monozyten und Wildtyp Endothelzellen nach Inkubation mit Überstand von aktivierten *LDLr⁻* (WT) oder *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}* (hier PS-sGC^{-/-}) Thrombozyten. Einstichproben t-Test. Aus (Stroth et al. 2018)

5. Diskussion

Durch die Erkenntnis, dass genetische Aberrationen die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen positiv beeinflussen, hat die personalisierte Medizin an Bedeutung gewonnen. Ziel dieser ist neue Therapeutika auf der Basis der zugrundeliegenden Pathomechanismen zu finden. Dadurch erhofft man sich frühzeitig in die Entstehung und Progredienz von Atherosklerose eingreifen zu können. Die Tatsache, dass lediglich 4 % der westeuropäischen Bevölkerung homozygote Nicht-Risikoallel-Träger sind, jedoch 63 % der Westeuropäer eine Homozygotie des *GUCY1A1*-Risikoallels aufweisen, verdeutlicht eindeutig die Relevanz einer zielgerichteten Präzisionsmedizin (Kessler et al. 2017). In dieser Arbeit wurde der Effekt der thrombozytären löslichen Guanylatzyklase (sGC) auf die Entstehung und Progredienz atherosklerotischer Plaques untersucht.

5.1. *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* Mäuse

Der Einfluss der sGC auf atherosklerotische Veränderungen wurde bereits durch andere Arbeitsgruppen untersucht. Segura-Puimedon et al. haben durch einen ubiquitären Knockout der α_1 -Untereinheit der sGC keine Reduktion atherosklerotischer Veränderungen in Gefäßwänden zeigen können (Segura-Puimedon et al. 2016). Aufgrund vorangegangener Erkenntnisse und Assoziationen zwischen dem *GUCY1A1*-Risikoallel mit einem erhöhten Aufkommen koronarer Herzerkrankung wird vermutet, dass der proatherogene Effekt des Risikoallels nicht über vaskuläre glatte Muskelzellen, sondern vielmehr über Thrombozyten vermittelt wird (Segura-Puimedon et al. 2016). Thrombozyten können über die Expression von Adhäsionsmolekülen und Immunrezeptoren Inflammationen modulieren und verstärken (zur Übersicht siehe (Hundelshausen et al. 2007)). Sie werden in Inflammations- und Immunprozessen als Hauptakteure angesehen und können die Adhäsion von Leukozyten sowie deren Rekrutierung in inflammatorischem Gewebe fördern (zur Übersicht siehe (Hundelshausen et al. 2007)).

Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit der spezifische Effekt der sGC in Thrombozyten auf die Entstehung atherosklerotischer Plaques untersucht werden. Um dies zu ermöglichen, wurde mittels Cre-LoxP-Systems ein Knockout der β_1 -Untereinheit der sGC erreicht. Aus bisher publizierten Arbeiten geht hervor, dass die sGC ein obligatorisch-heterodimeres Protein, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit, ist (Harteneck et al. 1990). Eine Aktivierung der Guanylatzyklase ist nur bei Expression der β_1 -Untereinheit möglich, da sich an ihr das Aktivierungszentrum des Enzyms befindet (Zhao und Marletta 1997). Eine Hochregulierung der α_2 -Untereinheit bei Knockout der α_1 -Untereinheit konnte bisher nicht beobachtet werden (Mergia et al. 2006). Auch gibt es keinen Nachweis einer funktionsfähigen sGC, die aus einer α - und einer β_2 -Untereinheit besteht (Koglin et al. 2001).

Deshalb konnte in dieser Arbeit mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit eine Funktionsunfähigkeit der sGC in Thrombozyten durch den Knockout der β_1 -Untereinheit erreicht werden. Sowohl in der PCR als auch im Western Blot war die Expression der β_1 -Untereinheit in den Thrombozyten der *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}* Mäuse nicht mehr nachweisbar (Siehe Absatz 4.1. und Absatz 4.2.), ferner zeigte sich als funktioneller Nachweis in Aggregationsversuchen, welche nicht Teil dieser Arbeit waren, eine Reduktion der NO-vermittelten Inhibition der Thrombozytenaggregation (Siehe Absatz 4.2. und (Mauersberger/Sager et al., eingereicht)). Für die weiteren Versuche konnte daher von einem Verlust der thrombozytären sGC ausgegangen werden.

5.2. Gewichtsverhältnisse und Blutanalysen in *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* Mäusen

Eine Dyslipidämie ist ein wichtiger Faktor für die Entstehung atherosklerotischer Plaques (Drechsler et al. 2010). Die Mäuse-Spezies, *Mus musculus*, welche für diese Versuche verwendet wurde, weist normalerweise Cholesterinwerte um die 27 mg/dl auf (Mills und Taylaur 1971). Um eine Hypercholesterinämie in den Versuchstieren zu induzieren, wurden die Mäuse auf einen LDL-Rezeptor-Knockout-Hintergrund gekreuzt und erhielten anschließend eine cholesterinreiche Ernährung. So konnten in den Mäusen Cholesterinwerte im Bereich von ca. 1.800 mg/dl erreicht werden (siehe Absatz 4.3.). Wie bereits durch Segura-Puimedon et al. bei einem ubiquitären sGC- α_1 -Knockout in Mäusen beobachtet (Segura-Puimedon et al. 2016), waren auch in dieser Arbeit keine Unterschiede der Gewichts- und Cholesterinwerte zwischen den *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* und den *Ldlr^{-/-}* Mäusen nachweisbar (siehe Absatz 4.3.). Es ist daher plausibel, dass der Verlust der sGC in Thrombozyten keinen Einfluss auf Gewichtszunahme und den Cholesterinstoffwechsel hat. Die Erkenntnis, dass es keine Unterschiede hinsichtlich Gewichtszunahme und Cholesterinstoffwechsel zwischen den Genotypen gab, ist jedoch für die Beurteilung der folgenden Versuche von Bedeutung, da die Entstehung und Progredienz atherosklerotischer Läsionen nicht auf Alterationen des Metabolismus zurückzuführen zu sein scheinen.

5.3. Bildung atherosklerotischer Plaques in *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* Mäusen

Die morphometrische Analyse der atherosklerotischen Plaques ergab eine signifikant größere Läsionsfläche in *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* Mäusen verglichen zu *Ldlr^{-/-}* Mäusen (siehe Absatz 4.4.), was darauf hindeutet, dass die thrombozytäre sGC die Bildung atherosklerotischer Plaques moduliert. Diese Ergebnisse sind zunächst gegenläufig zu den von Segura-Puimedon et al. berichteten Befunden, die zeigen, dass ein Knockout der sGC- α_1 -Untereinheit atheroprotektiv wirkt (Segura-Puimedon et al. 2016). Es müssen jedoch grundsätzliche Unterschiede in der Methodik beachtet werden. Bei Segura-Puimedon et al. wurde kein zellspezifisches Knockout-Modell verwendet, sondern ein ubiquitärer Knockout. Der Einfluss eines bestimmten Zelltyps kann somit nicht untersucht werden. Ferner kann der Verlust der sGC- α_1 -Untereinheit, im Gegensatz zur β_1 -Untereinheit, durch andere α -Untereinheiten zu einem gewissen Grad kompensiert werden (Mergia et al. 2006), so dass ein ubiquitärer Knockout als potentielle Limitation angesehen werden muss. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind im Gegensatz hierzu im Einklang mit der genetischen Evidenz. So wurde in der Familie, in der eine Mutation in *GUCY1A1* als kausal für den Phänotyp des Auftretens einer KHK-Manifestation in jungem Alter identifiziert wurde, bei Mutationsträgern eine reduzierte cGMP-Bildung in Thrombozyten beobachtet (Erdmann et al. 2013). Weiterhin bilden Mausstämme, die eine genetisch bedingt geringere – jedoch nicht aufgehobene – Expression von *Gucy1a1* aufweisen, mehr atherosklerotische Plaques (Kessler et al. 2017). Die quantitative Modulation der Expression ist daher ggf. physiologischer als der komplette Knockout, bei dem die Möglichkeit einer (partiellen) Kompensation besteht. Weiterhin stehen die Ergebnisse dieser Arbeit im Einklang mit der Erkenntnis, dass eine nicht selektive Thrombozytenaggregationshemmung mit Aspirin bei homozygoten *GUCY1A1*-Risikoallelträgern die Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse reduzierte (Kessler et al. 2019). Dies ist insbesondere von Bedeutung, da frühere randomisierte Studien und Metaanalysen (zum Überblick siehe (Patrono 2015)), aber auch aktuelle Studien in Individuen mit hohem Risiko (Gaziano et al. 2018; Bowman et al. 2018; McNeil et al. 2018) keinen Benefit für Aspirin in der Primärprävention zeigen konnten.

Die Rolle von Thrombozyten in der Atherosklerose ist nicht vollständig geklärt (für einen aktuellen Überblick siehe (Kessler et al. 2020)). In den folgenden Experimenten sollte weitere Evidenz für die Rolle der thrombozytären sGC in der Atherosklerose generiert werden.

5.4. Inflammation der Gefäßwand in *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* Mäusen

Der Verlust der thrombozytären sGC führte unter proatherogenen Bedingungen zu einer Steigerung der Bildung atherosklerotischer Plaques. Ein wesentlicher pathophysiologischer Prozess im Rahmen der Atherogenese und -progression ist die vaskuläre Inflammation, die insbesondere durch die Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut in die Gefäßwand bzw. den Plaque entsteht (zum Überblick siehe (Swirski et al. 2013)). Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob die thrombozytäre sGC die vaskuläre Inflammation beeinflusst. Zur Quantifizierung von Leukozyten in der Gefäßwand wurden aortale Zellsuspensionen von *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* - und *Ldlr^{-/-}* Mäusen einer durchflusszytometrischen Phänotypisierung und Quantifizierung unterzogen. Diese ergab eine höhere Zahl an neutrophilen Granulozyten sowie Ly6c^{high} Monozyten in der Aorta von Mäusen mit thrombozytärer sGC-Defizienz (siehe Absatz 4.5.). Diese Befunde weisen in Zusammenschau mit der histologischen Analyse der Plaques im Bereich der Aortenwurzel auf eine gesteigerte Atherosklerose sowie Plaqueinflammation hin (siehe Absatz 4.4. und 4.5.). Die Ergebnisse dieser Arbeit geben erstmals den Einfluss der thrombozytären sGC auf die vaskuläre Inflammation wieder. Sie sind im Einklang mit früheren Berichten, in denen eine reduzierte Adhäsion sowie eine reduziertes *Rolling* von Leukozyten *in vivo* nach Stimulation der sGC gezeigt wurde (Ahluwalia et al. 2004). Während ferner eine Rolle der NO-sGC-cGMP-Achse als „endogene Bremse“ der Thrombozytenaggregation unter shear stress beschrieben wurde (Lai Wen et al. 2018) sind die in dieser Arbeit erhobenen Befunde bisher so nicht gezeigt worden und stellen die Grundlage für Folgeprojekte dar.

5.5. Adhäsion von Monozyten in Anwesenheit von Überstand aktivierter Wildtyp oder *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}* Thrombozyten

Die dargestellten *in vivo*-Versuche ergaben eine gesteigerte Bildung atherosklerotischer Plaques sowie vaskuläre Inflammation. In einem weiteren Versuch wurde überprüft, ob ein löslicher Faktor, der nach Aktivierung aus Thrombozyten freigesetzt wird, als Ursache dafür in Betracht kommt. Zu diesem Zweck wählten wir ein *in vitro*-System, in dem wir die Adhäsion von Wildtyp Leukozyten (in diesem Fall Monozyten) an Wildtyp-Endothelzellen untersuchten. Dies ist von Bedeutung, da eine Expression der Cre-Rekombinase unter dem Einfluss des PF4-Promotors auch in anderen myeloischen Zellen exprimiert werden kann. Durch die Inkubation mit dem Überstand aktivierter Wildtyp oder *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}* Thrombozyten ist jedoch die spezifische Untersuchung des Thrombozytenphänotyps möglich. Der Versuch ergab eine gesteigerte Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen, wenn sie mit dem Über-

stand aktivierter *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}* Thrombozyten inkubiert wurden. Dies – und insbesondere das Fehlen von Thrombozyten während der Inkubation – weist darauf hin, dass ein löslicher Faktor, der von den Thrombozyten sezerniert wird, ursächlich für den Phänotyp ist. Thrombozyten sezernieren eine Vielzahl von löslichen Faktoren, die die Entstehung einer (Athero-) Thrombose, aber auch die Aktivierung des Endothels zur Folge haben können (zum Überblick siehe (Kessler et al. 2020)). In Folgeuntersuchungen, die nicht Bestandteil dieser Arbeit waren, sollte untersucht werden, welche Faktoren differentiell in Abhängigkeit vom Genotyp freigesetzt werden.

5.6. Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es durch den Funktionsverlust der sGC in Thrombozyten nicht nur zu ausgeprägter Plaquerbildung, sondern auch zu einer verstärkten Rekrutierung von wichtigen inflammatorischen Mediatoren, wie *Ly6c^{high}*-Monozyten oder neutrophiler Granulozyten in die atherosklerotischen Plaques kommt. Des Weiteren deuten *in vitro*-Versuche auf eine verbesserte Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen in den *PF4-Cre⁺Gucy1b1^{flox/flox}Ldlr^{-/-}* Mäusen hin. Es kann also sein, dass Faktoren, die durch Aktivierung der Thrombozyten, welche nicht über eine funktionfähige Guanylatzyklase verfügen, freigesetzt werden, ein erhöhtes Risiko für die Entstehung koronarer Herzerkrankungen mit sich bringen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können zu einem besseren Verständnis für die Rolle der Thrombozyten in der Atherosklerose im Allgemeinen und der thrombozytären sGC im Speziellen beitragen. Unter Berücksichtigung der aktuellen genetischen Evidenz können sie zudem als Erklärungsansatz für die Beobachtung dienen, dass homozygote Träger der *GUCY1A1*-Risikovariante (rs7692387), die eine geringere *GUCY1A1*-Expression aufweisen (Kessler et al. 2017; Emdin et al. 2018), im Gegensatz zur Allgemeinbevölkerung einen Nutzen von Aspirin in der Primärprävention aufweisen (Hall et al. 2019). Des Weiteren dienen die Ergebnisse als Ausgangspunkt für Folgestudien und Experimente der Arbeitsgruppe, in denen der Einfluss der thrombozytären sGC auf molekularer Ebene und die Möglichkeit einer therapeutischen Intervention weiter untersucht wurden (Mauersberger/Sager et al, eingereicht).

Die Ergebnisse stärken die durch genetische Assoziationsstudien in den Fokus gerückte Rolle des NO-cGMP-Stoffwechsels in der Atherosklerose (zum Überblick siehe (Wobst et al. 2018)). Dieser ist sowohl in pathophysiologischer aber auch in therapeutischer Hinsicht interessant. Eine Studie hat erst kürzlich untersucht, wie sich ein genetisch bedingt gesteigerter NO-cGMP-Stoffwechsel auf kardiometabolische Phänotypen auswirkt. Hierzu wurden seltene und häufige Varianten in den Genen *NOS3* und *GUCY1A1* berücksichtigt. Eine genetische Prädisposition, die zu gesteigerter Expression und Aktivität dieser Gene führt war, in einem stärkeren Maße,

als es rein durch eine Reduktion des Blutdrucks zu erwarten wäre, mit einem signifikant seltenerem Auftreten von KHK, Schlaganfall, chronischer Niereninsuffizienz und peripherer arterieller Verschlusskrankheit assoziiert (Emdin et al. 2018). Im Gegensatz hierzu ergaben klinische Studien, die insbesondere NO-Donoren bei kardiovaskulären Erkrankungen untersuchten, eher enttäuschende Ergebnisse (zum Überblick siehe (Wobst et al. 2015a)). Spezifische Stimulatoren der sGC, wie sie beispielsweise bei pulmonaler Hypertonie (Ghofrani et al. 2013a), chronisch thromboembolischer pulmonaler Hypertonie (Ghofrani et al. 2013b) oder systolischer Herzinsuffizienz (Armstrong et al. 2020) eingesetzt werden, könnten hier neue Therapieoptionen eröffnen.

Ein weiteres interessantes Zielmolekül ist die Phosphodiesterase 5A (PDE5A). Das *PDE5A*-Gen wurde ebenfalls in GWAS (Nelson et al. 2017) und in einer Familie mit hoher Prävalenz von KHK in jungem Alter identifiziert (Dang et al. 2021). Mit Sildenafil und verwandten Substanzen sind ebenfalls spezifische *PDE5A*-Inhibitoren verfügbar, die bereits u.a. bei der erektilen Dysfunktion und der pulmonalen Hypertonie eingesetzt werden (zum Überblick siehe (Barnett et al. 2006)). Die Beobachtung, dass sowohl häufige Varianten als auch die familiäre Mutation zu einer gesteigerten Expression der Phosphodiesterase 5A führten (Nelson et al. 2017; Dang et al. 2021) lässt einen therapeutischen Benefit hinsichtlich kardiovaskulärer Ereignisse plausibel erscheinen. Bisher gibt es jedoch keine überzeugende Evidenz aus klinischen Studien. Lediglich ein Vergleich bei Patienten mit erektiler Dysfunktion und KHK ergab, dass Patienten, die Sildenafil erhielten, ein signifikant geringeres Risiko für kardiovaskuläre Endpunkte hatten, als Patienten, die das Prostaglandin E₂-Analogon Alprostadil erhielten (Andersson et al. 2021).

Weitere experimentelle sowie klinische Studien, die unter Berücksichtigung des Genotyps durchgeführt werden, sind erforderlich, um die pathophysiologische Bedeutung der thrombozytären sGC und die therapeutischen Möglichkeiten weiter zu evaluieren.

Publikationen

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind Bestandteil folgender Publikationen:

- 1) Stroth M, Bettaga N, Wobst J, Werner J, Zimmermann AS, Friebe A, et al. (2018): Abstract 471: Influence of Platelet-specific Soluble Guanylyl Cyclase Deficiency on Atherosclerotic Plaque Formation. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology (ATVB)* 38 (Suppl_1)
Präsentiert bei Vascular Discovery:
 - *From Genes to Medicine Scientific Sessions 2018* (Mai 2018, San Francisco, USA)
 - *Best of from genes to medicine scientific sessions 2018* bei *American Heart Association Scientific Sessions 2018* (November 2018, Chicago, USA)

- 2) Mauersberger C, Sager HB, Wobst J, Dang TA, Lambrecht L, Koplev S, Stroth M, Bettaga N, Schlossmann J, Friebe A, Björkegren JLM, Dietz L, Sandner P, Soehnlein O, Schunkert H, Kessler T. Loss of soluble guanylyl cyclase in platelets contributes to atherosclerotic plaque formation and vascular inflammation. (zur Publikation eingereicht)

Literaturverzeichnis

Ahluwalia, Amrita; Foster, Paul; Scotland, Ramona S.; McLean, Peter G.; Mathur, Anthony; Perretti, Mauro et al. (2004): Antiinflammatory activity of soluble guanylate cyclase: cGMP-dependent down-regulation of P-selectin expression and leukocyte recruitment. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (5), S. 1386–1391. DOI: 10.1073/pnas.0304264101.

Andersson, Daniel P.; Landucci, Laura; Lagerros, Ylva Trolle; Grotta, Alessandra; Bellocco, Rino; Lehtihet, Mikael; Holzmann, Martin J. (2021): Association of Phosphodiesterase-5 Inhibitors Versus Alprostadil With Survival in Men With Coronary Artery Disease. In: *Journal of the American College of Cardiology* 77 (12), S. 1535–1550. DOI: 10.1016/j.jacc.2021.01.045.

Armstrong, Paul W.; Pieske, Burkert; Anstrom, Kevin J.; Ezekowitz, Justin; Hernandez, Adrian F.; Butler, Javed et al. (2020): Vericiguat in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. In: *The New England journal of medicine* 382 (20), S. 1883–1893. DOI: 10.1056/NEJMoa1915928.

Arnold, W. P.; Mittal, C. K.; Katsuki, S.; Murad, F. (1977): Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (8), S. 3203–3207. DOI: 10.1073/pnas.74.8.3203.

Barnett et al. (2006): Sildenafil in the treatment of pulmonary hypertension. In: *Vascular Health and Risk Management* 2 (4), S. 411–422.

Bowman, L.; Mafham, M.; Wallendszus, K.; Stevens, W.; Buck, G.; Barton, J. et al. (2018): Effects of Aspirin for Primary Prevention in Persons with Diabetes Mellitus. In: *The New England journal of medicine* 379 (16). DOI: 10.1056/NEJMoa1804988.

Catapano, Alberico L.; Graham, Ian; Backer, Guy de; Wiklund, Olov; Chapman, M. John; Drexel, Heinz et al. (2016): 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias. In: *Eur Heart J* 37 (39), S. 2999–3058. DOI: 10.1093/eurheartj/ehw272.

Collins, Rory (2012): What makes UK Biobank special? In: *Lancet (London, England)* 379 (9822), S. 1173–1174. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60404-8.

Combadiere, Christophe; Potteaux, Stephane; Rodero, Mathieu; Simon, Tabassome; Pezard, Adeline; Esposito, Bruno et al. (2008): Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. In: *Circulation* 117 (13), S. 1649–1657. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.745091.

Dang, Tan An; Kessler, Thorsten; Wobst, Jana; Wierer, Michael; Braenne, Ingrid; Strom, Tim M. et al. (2021): Identification of a Functional PDE5A Variant at the Chromosome 4q27 Coronary Artery Disease Locus in an Extended Myocardial Infarction Family. In: *Circulation* 144 (8), S. 662–665. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.052975.

Deloukas, Panos; Kanoni, Stavroula; Willenborg, Christina; Farrall, Martin; Assimes, Themistocles L.; Thompson, John R. et al. (2013): Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. In: *Nature genetics* 45 (1), S. 25–33. DOI: 10.1038/ng.2480.

Döring, Yvonne; Soehnlein, Oliver; Weber, Christian (2017): Neutrophil Extracellular Traps in Atherosclerosis and Atherothrombosis. In: *Circulation research* 120 (4), S. 736–743. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309692.

Drechsler, Maik; Megens, Remco T. A.; van Zandvoort, Marc; Weber, Christian; Soehnlein, Oliver (2010): Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. In: *Circulation* 122 (18), S. 1837–1845. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.961714.

Emdin, Connor A.; Khera, Amit V.; Klarin, Derek; Natarajan, Pradeep; Zekavat, Seyedeh M.; Nomura, Akihiro et al. (2018): Phenotypic Consequences of a Genetic Predisposition to Enhanced Nitric Oxide Signaling. In: *Circulation* 137 (3), S. 222–232. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028021.

Erdmann, Jeanette; Kessler, Thorsten; Munoz Venegas, Loreto; Schunkert, Heribert (2018): A decade of genome-wide association studies for coronary artery disease: the challenges ahead. In: *Cardiovascular research* 114 (9), S. 1241–1257. DOI: 10.1093/cvr/cvy084.

Erdmann, Jeanette; Stark, Klaus; Esslinger, Ulrike B.; Rumpf, Philipp Moritz; Koesling, Doris; Wit, Cor de et al. (2013): Dysfunctional nitric oxide signalling increases risk of myocardial infarction. In: *Nature* 504 (7480), S. 432–436. DOI: 10.1038/nature12722.

Francis, Sharron H.; Blount, Mitsi A.; Corbin, Jackie D. (2011): Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. In: *Physiological reviews* 91 (2), S. 651–690. DOI: 10.1152/physrev.00030.2010.

Furchgott, R. F.; Zawadzki, J. V. (1980): The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. In: *Nature* 288 (5789), S. 373–376. DOI: 10.1038/288373a0.

Gaziano, J. M.; Brotons, C.; Coppolecchia, R.; Cricelli, C.; Darius, H.; Gorelick, P. B. et al. (2018): Use of aspirin to reduce risk of initial vascular events in patients at moderate risk of cardiovascular disease (ARRIVE): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. In: *Lancet (London, England)* 392 (10152). DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31924-X.

Ghofrani, H. A.; Galiè, N.; Grimminger, F.; Grünig, E.; Humbert, M.; Jing, Z. C. et al. (2013a): Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. In: *The New England journal of medicine* 369 (4). DOI: 10.1056/NEJMoa1209655.

Ghofrani, Hossein-Ardeschir; D'Armini, Andrea M.; Grimminger, Friedrich; Hoeper, Marius M.; Jansa, Pavel; Kim, Nick H. et al. (2013b): Riociguat for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. In: *The New England journal of medicine* 369 (4), S. 319–329. DOI: 10.1056/NEJMoa1209657.

Hall, Kathryn T.; Kessler, Thorsten; Buring, Julie E.; Passow, Dani; Sesso, Howard D.; Zee, Robert Y. L. et al. (2019): Genetic variation at the coronary artery disease risk locus GUCY1A3 modifies cardiovascular disease prevention effects of aspirin. In: *European heart journal*. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz384.

Hanafy, Khalid A.; Martin, Emil; Murad, Ferid (2004): CCTeta, a novel soluble guanylyl cyclase-interacting protein. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (45), S. 46946–46953. DOI: 10.1074/jbc.M404134200.

Harteneck, C.; Koesling, D.; Soling, A.; Schultz, G.; Bohme, E. (1990): Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. In: *FEBS letters* 272 (1-2), S. 221–223. DOI: 10.1016/0014-5793(90)80489-6.

HUGO Gene Nomenclature Committee (2019a): Symbol report for GUCY1A1, zuletzt geprüft am 01.08.2019.

HUGO Gene Nomenclature Committee (2019b): Symbol report for GUCY1B1, zuletzt geprüft am 08.08.2019.

Hundelshausen et al. (2007): Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. In: *Circulation research* 100 (1), S. 27–40. DOI: 10.1161/01.RES.0000252802.25497.b7.

Ignarro, L. J. (1991): Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. In: *Biochemical pharmacology* 41 (4), S. 485–490. DOI: 10.1016/0006-2952(91)90618-f.

Ignarro, L. J.; Buga, G. M.; Wood, K. S.; Byrns, R. E.; Chaudhuri, G. (1987): Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (24), S. 9265–9269. DOI: 10.1073/pnas.84.24.9265.

Kathiresan, Sekar; Voight, Benjamin F.; Purcell, Shaun; Musunuru, Kiran; Ardissino, Diego; Mannucci, Pier M. et al. (2009): Genome-wide association of early-onset myocardial infarction

with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. In: *Nature genetics* 41 (3), S. 334–341. DOI: 10.1038/ng.327.

Kessler, T.; Schunkert, H.; von, Hundelshausen P. (2020): Novel Approaches to Fine-Tune Therapeutic Targeting of Platelets in Atherosclerosis: A Critical Appraisal. In: *Thrombosis and haemostasis* 120 (11). DOI: 10.1055/s-0040-1714352.

Kessler, Thorsten; Erdmann, Jeanette; Schunkert, Heribert (2013): Genetics of coronary artery disease and myocardial infarction--2013. In: *Current cardiology reports* 15 (6), S. 368. DOI: 10.1007/s11886-013-0368-0.

Kessler, Thorsten; Wobst, Jana; Wolf, Bernhard; Eckhold, Juliane; Vilne, Baiba; Hollstein, Ronja et al. (2017): Functional Characterization of the GUCY1A3 Coronary Artery Disease Risk Locus. In: *Circulation* 136 (5), S. 476–489. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024152.

Kessler, Thorsten; Wolf, Bernhard; Eriksson, Niclas; Kofink, Daniel; Mahmoodi, Bakhtawar K.; Rai, Himanshu et al. (2019): Association of the coronary artery disease risk gene GUCY1A3 with ischaemic events after coronary intervention. In: *Cardiovascular research*. DOI: 10.1093/cvr/cvz015.

Koglin, M.; Vehse, K.; Budaeus, L.; Scholz, H.; Behrends, S. (2001): Nitric oxide activates the beta 2 subunit of soluble guanylyl cyclase in the absence of a second subunit. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (33), S. 30737–30743. DOI: 10.1074/jbc.M102549200.

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.

Lai Wen; Susanne Feil; Markus Wolters; Martin Thunemann; Frank Regler; Kjestine Schmidt et al. (2018): A shear-dependent NO-cGMP-cGKI cascade in platelets acts as an auto-regulatory brake of thrombosis. In: *Nat Commun* 9 (1), S. 1–11. DOI: 10.1038/s41467-018-06638-8.

Lander, E. S.; Linton, L. M.; Birren, B.; Nusbaum, C.; Zody, M. C.; Baldwin, J. et al. (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. In: *Nature* 409 (6822), S. 860–921. DOI: 10.1038/35057062.

Libby, Peter; Ridker, Paul M.; Hansson, Goran K. (2011): Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. In: *Nature* 473 (7347), S. 317–325. DOI: 10.1038/nature10146.

Löffler et al. (2014): Biochemie und Pathobiochemie. Kapitel 5.4.1. S. 80-83 Denaturierung und Faltung von Proteinen; S. 62-75 Kapitel 5.3. Konformation von Proteinen. 9. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch).

Lusis, A. J. (2000): Atherosclerosis. In: *Nature* 407 (6801), S. 233–241. DOI: 10.1038/35025203.

Marenberg, M. E.; Risch, N.; Berkman, L. F.; Floderus, B.; de Faire U. (1994): Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. In: *The New England journal of medicine* 330 (15). DOI: 10.1056/NEJM199404143301503.

McNeil, J. J.; Wolfe, R.; Woods, R. L.; Am Tonkin; Donnan, G. A.; Nelson et al. (2018): Effect of Aspirin on Cardiovascular Events and Bleeding in the Healthy Elderly. In: *The New England journal of medicine* 379 (16). DOI: 10.1056/NEJMoa1805819.

Mergia, Evanthia; Friebe, Andreas; Dangel, Oliver; Russwurm, Michael; Koesling, Doris (2006): Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system. In: *The Journal of clinical investigation* 116 (6), S. 1731–1737. DOI: 10.1172/JCI27657.

Mills, G. L.; Taylaur, C. E. (1971): The distribution and composition of serum lipoproteins in eighteen animals. In: *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry* 40 (2), S. 489–501.

Miltenyi, S.; Muller, W.; Weichel, W.; Radbruch, A. (1990): High gradient magnetic cell separation with MACS. In: *Cytometry* 11 (2), S. 231–238. DOI: 10.1002/cyto.990110203.

Mülhardt et al. (2009): Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics. 6. Aufl. München: Spektrum Akad. Verl (Der Experimentator).

Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1, S. 263–273.

Myers, R. H.; Kiely, D. K.; Cupples, L. A.; Kannel, W. B. (1990): Parental history is an independent risk factor for coronary artery disease: the Framingham Study. In: *American heart journal* 120 (4), S. 963–969. DOI: 10.1016/0002-8703(90)90216-k.

Nelson, Christopher P.; Goel, Anuj; Butterworth, Adam S.; Kanoni, Stavroula; Webb, Tom R.; Marouli, Eirini et al. (2017): Association analyses based on false discovery rate implicate new loci for coronary artery disease. In: *Nature genetics* 49 (9), S. 1385–1391. DOI: 10.1038/ng.3913.

Nimmegeers, Sofie; Sips, Patrick; Buys, Emmanuel; Brouckaert, Peter; van de Voorde, Johan (2007): Functional role of the soluble guanylyl cyclase alpha(1) subunit in vascular smooth muscle relaxation. In: *Cardiovascular research* 76 (1), S. 149–159. DOI: 10.1016/j.cardiores.2007.06.002.

Nowbar, Alexandra N.; Gitto, Mauro; Howard, James P.; Francis, Darrel P.; Al-Lamee, Rasha (2019): Mortality From Ischemic Heart Disease. In: *Circulation. Cardiovascular Quality and Outcomes* 12 (6), e005375. DOI: 10.1161/CIRCOUTCOMES.118.005375.

Palmer, R. M.; Rees, D. D.; Ashton, D. S.; Moncada, S. (1988): L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. In: *Biochemical and biophysical research communications* 153 (3), S. 1251–1256. DOI: 10.1016/s0006-291x(88)81362-7.

Patel, Hitendra R. H. (2007): *Basic Science Techniques in Clinical Practice*. London: Springer-Verlag London Limited.

Patrono, Carlo (2015): The Multifaceted Clinical Readouts of Platelet Inhibition by Low-Dose Aspirin. In: *Journal of the American College of Cardiology* 66 (1), S. 74–85. DOI: 10.1016/j.jacc.2015.05.012.

Piepoli, Massimo F.; Hoes, Arno W.; Agewall, Stefan; Albus, Christian; Brotons, Carlos; Catapano, Alberico L. et al. (2016): 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). In: *Eur Heart J* 37 (29), S. 2315–2381. DOI: 10.1093/eurheartj/ehw106.

Pötzsch, Bernd (2010): *Hämostaseologie*. 2. Aufl. Heidelberg: Springer.

Rehm, Hubert (2010): *Der Experimentator: Proteinbiochemie, Proteomics*. Seite 8-10. 6. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl (Der Experimentator).

Russwurm, M.; Behrends, S.; Harteneck, C.; Koesling, D. (1998): Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. In: *The Biochemical journal* 335 (Pt 1), S. 125–130. DOI: 10.1042/bj3350125.

Russwurm et al. (2002): Isoforms of NO-sensitive guanylyl cyclase. In: *Molecular and cellular biochemistry* 230 (1-2), S. 159–164.

- Sachidanandam, R.; Weissman, D.; Schmidt, S. C.; Kakol, J. M.; Stein, L. D.; Marth, G. et al. (2001): A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. In: *Nature* 409 (6822), S. 928–933. DOI: 10.1038/35057149.
- Sauer, B. (1987): Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Molecular and cellular biology* 7 (6), S. 2087–2096. DOI: 10.1128/mcb.7.6.2087.
- Schunkert, Heribert; König, Inke R.; Kathiresan, Sekar; Reilly, Muredach P.; Assimes, Themistocles L.; Holm, Hilma et al. (2011): Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. In: *Nature genetics* 43 (4), S. 333–338. DOI: 10.1038/ng.784.
- Segura-Puimedon, Maria; Mergia, Evanthia; Al-Hasani, Jaafar; Aherrahrou, Redouane; Stoelting, Stephanie; Kremer, Felix et al. (2016): Proatherosclerotic Effect of the alpha1-Subunit of Soluble Guanylyl Cyclase by Promoting Smooth Muscle Phenotypic Switching. In: *The American journal of pathology* 186 (8), S. 2220–2231. DOI: 10.1016/j.ajpath.2016.04.010.
- Serbina, Natalya V.; Jia, Ting; Hohl, Tobias M.; Pamer, Eric G. (2008): Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. In: *Annual review of immunology* 26, S. 421–452. DOI: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326.
- Sigma-Aldrich: Sigma-Aldrich TRICHROME STAINS (MASSON) (Procedure No. HT15).
- Soehnlein, Oliver; Drechsler, Maik; Hristov, Mihail; Weber, Christian (2009a): Functional alterations of myeloid cell subsets in hyperlipidaemia: relevance for atherosclerosis. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 13 (11-12), S. 4293–4303. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00965.x.
- Soehnlein et al. (2009b): Myeloid cells in atherosclerosis: initiators and decision shapers. In: *Seminars in immunopathology* 31 (1), S. 35–47. DOI: 10.1007/s00281-009-0141-z.
- Stroth, Marlène; Bettaga, Noomen; Wobst, Jana; Werner, Julia; Zimmermann, Anna-Sophia; Friebe, Andreas et al. (2018): Abstract 471: Influence of Platelet-specific Soluble Guanylyl Cyclase Deficiency on Atherosclerotic Plaque Formation. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 38 (Suppl_1). DOI: 10.1161/atvb.38.suppl_1.471.
- Swirski et al. (2013): Leukocyte Behavior in Atherosclerosis, Myocardial Infarction, and Heart Failure. In: *Science* 339 (6116), S. 161–166. DOI: 10.1126/science.1230719.
- Tabas, Ira (2005): Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. In: *Arteriosclerosis,*

thrombosis, and vascular biology 25 (11), S. 2255–2264. DOI: 10.1161/01.ATV.0000184783.04864.9f.

Tabas, Ira (2010): Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. In: *Nature reviews. Immunology* 10 (1), S. 36–46. DOI: 10.1038/nri2675.

The Coronary Artery Disease (C4D) Genetics Consortium (2011): A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease. In: *Nature genetics* 43 (4), S. 339–344. DOI: 10.1038/ng.782.

Tiedt, Ralph; Schomber, Tibor; Hao-Shen, Hui; Skoda, Radek C. (2007): Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo. In: *Blood* 109 (4), S. 1503–1506. DOI: 10.1182/blood-2006-04-020362.

Truett, G. E.; Heeger, P.; Mynatt, R. L.; Truett, A. A.; Walker, J. A.; Warman, M. L. (2000): Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). In: *BioTechniques* 29 (1), 52, 54. DOI: 10.2144/00291bm09.

Tsai et al. (2009): Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. In: *Pharmacology & therapeutics* 122 (3), S. 216–238. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2009.02.009.

Weber, Christian; Zerneck, Alma; Libby, Peter (2008): The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. In: *Nature reviews. Immunology* 8 (10), S. 802–815. DOI: 10.1038/nri2415.

Wobst, Jana; Kessler, Thorsten; Dang, Tan An; Erdmann, Jeanette; Schunkert, Heribert (2015a): Role of sGC-dependent NO signalling and myocardial infarction risk. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 93 (4), S. 383–394. DOI: 10.1007/s00109-015-1265-3.

Wobst, Jana; Rumpf, Philipp Moritz; Dang, Tan An; Segura-Puimedon, Maria; Erdmann, Jeanette; Schunkert, Heribert (2015b): Molecular variants of soluble guanylyl cyclase affecting cardiovascular risk. In: *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 79 (3), S. 463–469. DOI: 10.1253/circj.CJ-15-0025.

Wobst, Jana; Schunkert, Heribert; Kessler, Thorsten (2018): Genetic alterations in the NO-cGMP pathway and cardiovascular risk. In: *Nitric oxide : biology and chemistry* 76, S. 105–112. DOI: 10.1016/j.niox.2018.03.019.

Zhao, Y.; Marletta, M. A. (1997): Localization of the heme binding region in soluble guanylate cyclase. In: *Biochemistry* 36 (50), S. 15959–15964. DOI: 10.1021/bi971825x.

Danksagung

Zum Schluss dieser Arbeit gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Professor Schunkert. Er hat mir ermöglicht, meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe der experimentellen Erwachsenenkardiologie des Deutschen Herzzentrums München zu absolvieren.

Insbesondere möchte ich meinem Mentor Herrn PD Dr. Thorsten Kessler dafür danken, dass er sich für mich viel Zeit genommen hat, mir bei allen Fragen immer unterstützend zur Seite stand und dieses Manuskript mit viel Geduld Korrektur gelesen hat. Er hat es geschafft, mich mit seiner Begeisterung für die Molekulargenetik der Atherosklerose anzustecken.

Herrn Professor Hendrik Sager und seinem Team danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der manchmal bis spät in die Nacht dauernden Durchführung aller durchflusszytometrischen Versuche sowie die vielen nützlichen Ratschläge. Ein herzliches Dankeschön auch an Carina Mauersberger für ihre Hilfe auf den letzten Metern.

Ich danke dem DZHK für das Stipendium zur Förderung dieser Doktorarbeit und der Reise nach San Francisco, bei der ich meine Forschungsergebnisse im Rahmen des Kongresses Vascular Discovery „*From genes to medicine; Scientific sessions*“ im Jahr 2018 persönlich präsentieren durfte.

Den größten Dank aber spreche ich meiner Familie aus, die bedingungslos immer hinter mir steht und mich in all meinen Vorhaben und Zielen unterstützt.