

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der
Kreislaufkrankheiten

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Christian Weber

Rolle von Autotaxin in Makrophagen in der Entstehung der Atherosklerose



Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Brigita Avsec

aus Ljubljana, Slowenien

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Schober

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Volker Klauss
Prof. Dr. med. Christian Schulz
PD Dr. med. Lisa Gross

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Ela Karshovska

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.02.2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
1 Einleitung.....	1
1.1 Autotaxin und Lysophosphatidsäure	1
1.2 Atherosklerose.....	4
1.3 Nekrotischer Kern.....	6
1.4 Zielsetzung	8
2 Material und Methoden	10
2.1 Geräte	10
2.2 Software	11
2.3 Chemikalien.....	11
2.4 Antikörper	12
2.5 Lösungen.....	12
2.6 Verwendete Kits	13
2.7 Mäuselinien	14
2.8 Tierhaltung und Mäusezucht.....	14
2.9 Wiegen der Mäuse und Gewebeentnahme	14
2.10 Paraffineinbettung und Schnittpräparation mit dem Mikrotom	15
2.11 Histologie und Immunfluoreszenz	15
2.11.1 Elastika-van-Gieson-Färbung (EvG).....	15
2.11.2 Oil-Red-O (ORO) Färbung.....	19
2.11.3 Kombinierte Mac2 Immunfluoreszenzfärbung und TUNEL Assay.....	21
2.12 Statistische Analyse.....	23
3 Ergebnisse.....	24
3.1 Einfluss der ATX Expression in Makrophagen auf das Körpergewicht	24
3.2 ATX Expression in Makrophagen und die Morphometrie der Aortenwurzel... 25	
3.2.1 ATX Expression in Makrophagen und der Aortenwurzelperimeter	25
3.2.2 Einfluss der ATX Expression in Makrophagen auf die Beziehung zwischen Aortenwurzelfläche und Aortenwurzelperimeter	28
3.3 Einfluss der Expression von ATX in Makrophagen auf die Atherosklerose ... 29	
3.3.1 ATX Expression in Makrophagen beeinflusst die Bildung fortgeschrittener Plaques in der Aortenwurzel	29
3.3.2 Einfluss der ATX Expression in Makrophagen auf den Zusammenhang zwischen Plaquefläche und Körpergewicht	32
3.3.3 Korrelation zwischen dem Körpergewicht und der Aortenwurzelfläche. . 33	
3.3.4 Einfluss der ATX Expression in Makrophagen auf die Plaquefläche in der Aorta.....	34
3.4 Einfluss der Expression von ATX in Makrophagen auf die Plaquezusammensetzung	37
3.4.1 Rolle der ATX Expression in Makrophagen auf den nekrotischen Kern . 37	

3.4.2	Auswirkung der ATX Expression in Makrophagen auf die Zellzahl in der Plaque.....	39
3.4.3	Einfluss der ATX Expression in Makrophagen auf die Makrophagenakkumulation in den Plaques	41
3.5	Einfluss der ATX Expression in Makrophagen auf Apoptose und Efferozytose in atherosklerotischen Plaques.....	42
3.5.1	Effekt von ATX auf die Apoptose von Plaquemakrophagen	42
3.5.2	Effekt der ATX Expression in Makrophagen auf die Efferozytose in Plaques.....	44
4	Diskussion	46
4.1	Einfluss der ATX Expression in Makrophagen auf das Körpergewicht	46
4.2	Die ATX Expression in Makrophagen fördert die Progression der Atherosklerose	47
4.3	Die ATX Expression in Makrophagen steigert die Bildung des nekrotischen Kerns.....	49
4.4	Rolle von ATX in der Apoptose von Makrophagen und der Efferozytose	52
5	Zusammenfassung	53
6	Literaturverzeichnis.....	56
7	Abkürzungsverzeichnis	63
8	Danksagung	64

1 Einleitung

1.1 Autotaxin und Lysophosphatidsäure

Autotaxin (ATX) ist ein sezerniertes Glykoprotein, das der Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (ENPP2) Proteinfamilie angehört und durch das ENPP2-Gen kodiert wird^{1,2}. Proteine aus der ENPP-Familie hydrolysieren die Pyrophosphat- oder die Phosphodiesterbindungen in Nukleotiden und Lysophospholipiden³.

ATX besteht aus zwei Somatomedin B (SMB)-ähnlichen Domänen (SMB-1 und SMB-2), einer N-terminalen Signalsequenz, einer katalytisch aktiven zentralen Phosphodiesterase (PDE)-Domäne mit einer tiefen hydrophoben Tasche und einer katalytisch inaktiven nukleaseähnlichen Domäne am C-Terminus (Abbildung 1)^{3,42}. Die SMB-2-Domäne und die zentrale Domäne sind durch die L1-Linkerregion verbunden³. Auf der anderen Seite ist die nukleaseähnliche Domäne mit der zentralen Domäne über die L2-Linkerregion verbunden (Abbildung 1)³. Die SMB-ähnlichen Domänen vermitteln Protein-Protein-Interaktionen⁵. Sie ähneln der SMB-Domäne des Vitronectins, eines Proteins der extrazellulären Matrix, das die Adhäsion und die Migration von Tumorzellen über die Interaktion der SMB-Domäne mit dem Plasminogen-Activator-Inhibitor-1 (PAI-1) und dem Urokinase Rezeptor reguliert^{3,6}. Die katalytische Domäne ähnelt strukturell der Domäne des bakteriellen NPP Enzyms der *Xanthomonas axonopodis*^{1,3} und besitzt ein katalytisch aktives Zentrum aus einem nukleophilen Threonin und zwei Zink-Ionen für die Hydrolyse der Pyrophosphat- und Phosphodiesterbindungen der Nukleotide und Phospholipide⁵. Neben diesem katalytisch aktiven Zentrum liegt eine flache hydrophile Rinne, die das Glyceringerüst der Lysophospholipide bindet und so die Phosphodiesterbindung dem katalytischen Zentrum zuführt. Darüber hinaus unterscheidet sich die katalytische Domäne des ATX von anderen Phospholipasen durch eine tiefe hydrophobe Tasche, in der die Fettsäurereste, vor allem kurze, gesättigte und längere, ungesättigte, von Lysophosphatidsäuren (lysophosphatidic acids, LPAs) positioniert sind^{1,5}. Eine weitere strukturelle Eigenart von ATX ist ein offener Tunnel der an der hydrophilen Rinne beginnt und dessen Wände durch die SMB-1 und der katalytischen Domäne gebildet werden⁵. Es wird vermutet, dass darüber LPA in direkter Nähe zu dessen Rezeptoren freigesetzt wird. Eine experimentelle Bestätigung dieser Hypothese steht allerdings noch aus^{2,5}. Die nukleaseähnliche Domäne ist katalytisch inaktiv². Sie besitzt eine ähnliche Struktur, wie bakterielle unspezifische Endonukleasen aus Bakterien, wie zum Beispiel die *Anabaena nuclease A*^{1,3}. Die genaue Rolle der nukleaseähnlichen Domäne ist allerdings noch unbekannt².

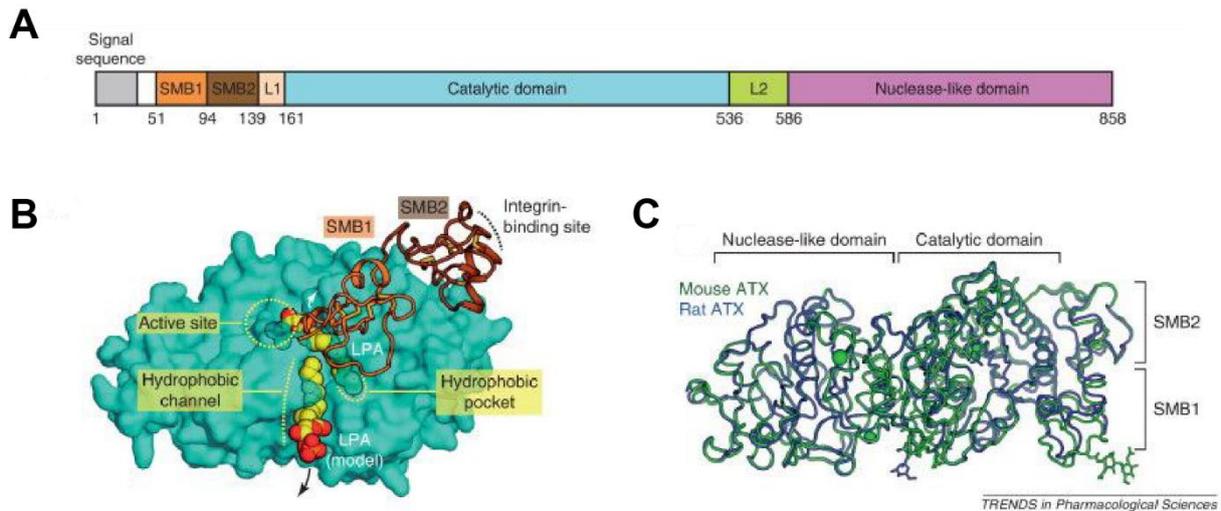


Abbildung 1: Autotaxinstruktur. (A) Organisation der ATX-Domänen. (B) Struktur des ATX der Maus. Zu sehen sind die beiden SMB-Domänen und die Integrin-Bindungsstelle, die katalytische Domäne mit dem aktiven Zentrum, die hydrophobe Tasche mit einer LPA14:0 und dem hydrophoben Tunnel. (C) Überlagerung von Maus- (grün) und Ratten-ATX (blau). Links von der katalytischen Domäne liegt die nukleaseähnliche Domäne. Die Abbildung wurde modifiziert nach Nishimasu et al.¹.

ATX weist als einziges Mitglied der ENPP-Familie eine Lysophospholipase D Aktivität auf^{1,2}, wodurch es von Lysophospholipiden, wie Lysophosphatidylcholin (LPC), unter Entstehung von LPA und Cholin, die polare Kopfgruppe abspalten kann⁷⁻⁹ (Abbildung 2)^{2,8}. Die durch die Lysophospholipase D Aktivität des ATX gebildeten LPAs besitzen unterschiedliche lange, gesättigte oder ungesättigte Fettsäurereste². Meistens sind die Fettsäuren durch die Esterbindung an der sn-1 Position mit der Glyzerin-Gruppe der LPAs gebunden (Acyl-LPAs), seltener können auch Alkyl-LPAs mit der Etherbindung entstehen (Abbildung 2B)². Die biologischen Effekte der LPAs werden durch die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten LPA-Rezeptoren vermittelt. Die insgesamt sechs LPA-Rezeptoren können in zwei Subgruppen eingeteilt werden². Die LPA-Rezeptoren 1 bis 3 werden zur Familie der endothelial differentiation gene (Edg) Rezeptoren gezählt, während die LPA-Rezeptoren 4 bis 6 zur Gruppe der purinergen P2Y Rezeptoren gehören^{2,10}. Die verschiedenen LPAs haben unterschiedliche biologische Wirkungen¹¹.

Die LPA18:0 hat zum Beispiel keine proatherogene Wirkung, während LPA20:4 die Atherosklerosebildung durch LPA-Rezeptor 1- und 3-vermittelte Monozytenrekrutierung in die arterielle Gefäßwand fördert^{10,11}. Neben den LPAs kann ATX auch zyklische Phosphatidsäure (cPA) bilden (Abbildung 2A)¹². cPA ist ein LPA-Analog, das eine Ringstruktur durch die Bindung der sn-2 Hydroxylgruppe mit dem sn-3 Phosphat besitzt^{13,14}. Funktion der extrazellulären cPA auf die Blut und Gefäßzellen ist weithin unbekannt¹². Intrazellulär inhibiert die cPA den nukleären Rezeptor peroxisom proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ), der die

inflammatorische Aktivierung von Makrophagen unterdrückt^{12,15}. cPA könnte deswegen auch einen Einfluss auf die Atherosklerose haben^{12,16}.

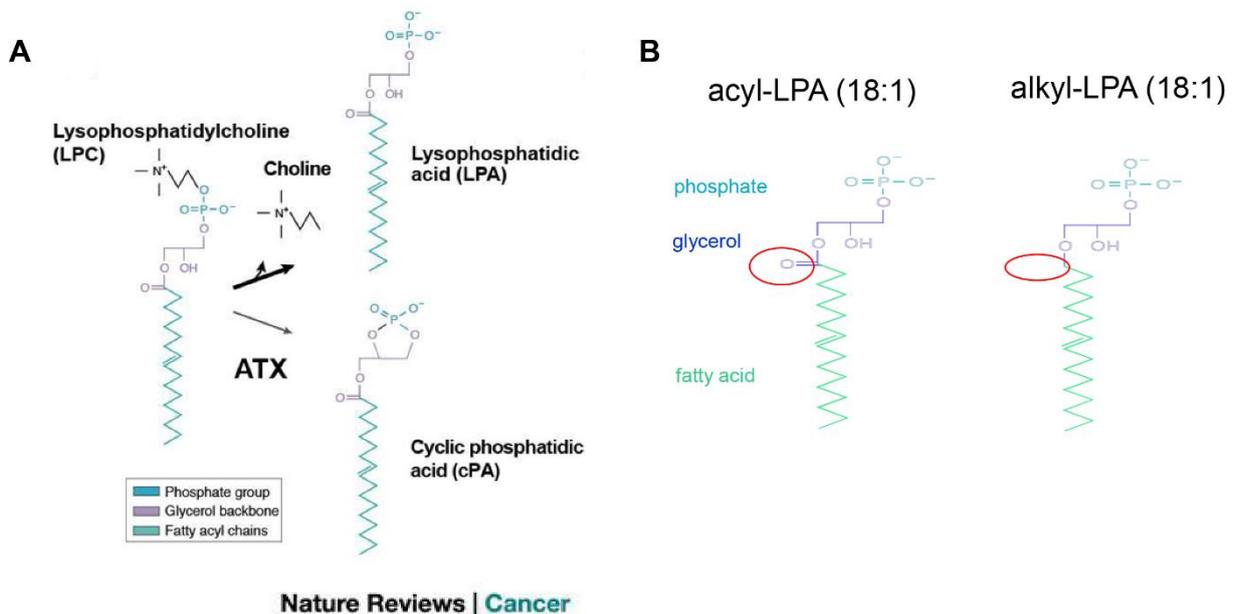


Abbildung 2: Autotaxin spaltet Cholin von LPC. (A) ATX spaltet durch seine PDE-Aktivität das Cholin von LPC. Es kann dadurch entweder LPA oder cPA entstehen. (B) Aus LPC können verschiedene LPAs entstehen. Gezeigt ist der Unterschied zwischen Acyl-LPA mit der Esterbindung und Alkyl-LPA mit der Etherbindung. Die Abbildung wurde modifiziert nach Mills et al.⁸⁷.

ATX hat durch die Bildung von LPAs einen Einfluss auf verschiedene Blut- und Gefäßwandzellen, wie zum Beispiel auf Thrombozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Monozyten bzw. Makrophagen^{10,17}. ATX bindet durch die SMB-2-Domäne an die β 1- und β 3-Integrine von Thrombozyten und fördert dadurch die lokale LPA-Produktion¹⁸. Die Aktivierung von Thrombozyten durch LPAs führt zu deren Formveränderung und Aggregation^{10,12,19}. Ferner induziert LPA die Sekretion von Chemokinen, die Expression von Adhäsionsmolekülen¹¹ und die Migration von Endothelzellen²⁰. In glatten Muskelzellen der Gefäßwand verstärkt LPA die Kontraktion, wodurch es zu einer Vasokonstriktion kommt^{10,21}. Ferner fördert LPA die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen^{10,12,17}. LPAs steigern die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen²² und die Bildung von Schaumzellen durch eine vermehrte Aufnahme von oxidiertem LDL^{23,24}.

ATX hat sowohl lokale als auch systemische Wirkungen, wobei die systemischen vor allem zur Aufrechterhaltung des Plasma-LPA-Spiegels dienen². ATX wird in verschiedenen Geweben exprimiert, wie zum Beispiel im Gehirn, in der Niere, im Fettgewebe, in der Leber und in Tumorzellen^{5,18}, aber auch in der Lunge und im Rückenmark². ATX spielt eine wichtige

Rolle in verschiedenen physiologischen Prozessen, wie der Vaskulogenese²⁵ und Neurogenese^{26, 2}. Ferner ist ATX auch der Entstehung verschiedener Erkrankungen beteiligt, wie der Lungenfibrose, Herzkreislauferkrankungen, Tumoren oder einer Arthritis^{2,5,7,11,27-32}. Eine komplette Deletion des ATX Gens in Mäusen ist durch die Effekte von ATX auf die Vaskulogenese und Neurogenese letal^{26,33,34}.

1.2 Atherosklerose

Atherosklerose ist eine durch Hyperlipidämie vermittelte chronische entzündliche Erkrankung der großen und mittelgroßen Arterien^{35,36}. Prädilektionsstellen für die Bildung der atherosklerotischen Plaques sind Bereiche in denen der laminare Blutfluss gestört ist, wie zum Beispiel an Gefäßaufzweigungen^{35,37-39}. Besonders häufig sind Koronararterien und Karotiden von der Atherosklerose betroffen³⁶. Durch einen fortschreitenden Verlust des arteriellen Lumens kann der Blutfluss eingeschränkt werden und es dadurch zu einer Ischämie kommen¹². Die Plaques können aber rupturieren, wodurch es zu einem akuten atherothrombotischen Verschluss der betroffenen Arterie kommen kann und dadurch zu einem Herzinfarkt oder Schlaganfall^{12,36,40}. Es gibt mehrere verschiedene Risikofaktoren für die Entstehung und Progression der Atherosklerose. Dazu zählen neben der Dyslipidämie (erhöhtem LDL-Spiegel und erniedrigtem HDL-Spiegel in Blut) auch die arterielle Hypertonie, der Diabetes mellitus und das Tabakrauchen⁴¹.

Das arterielle Endothel wird durch eine niedrige Wandschubspannung aufgrund eines nicht laminaren Blutflusses aktiviert, wodurch sich die endotheliale Permeabilität erhöht und vermehrt Leukozyten, insbesondere Monozyten, rekrutiert werden^{42,43}. In der Folge kommt es in einem jahrzehntelangen Verlauf zur Ablagerung von Lipoproteinen, wie LDL, in der Arterienwand, das dort durch Oxidation modifiziert wird⁴³. Je nach Stärke der Oxidation unterscheidet man zwischen „mildly oxidized“ (mox) LDL/„minimally-modified“ LDL (MM-LDL) und oxidiertem (ox)-LDL, wobei mox-LDL weniger stark oxidiert ist als ox-LDL⁴⁴. Mox-LDL wird im Gegensatz zu ox-LDL durch den LDL-Rezeptor, aber nicht durch Scavenger-Rezeptoren erkannt⁴⁴. Oxidiertes LDL aktiviert die inflammatorische Reaktion der Endothelzellen, wodurch verstärkt Adhäsionsmoleküle exprimiert und Chemokine freigesetzt und dadurch Monozyten angelockt werden⁴³. Bei der Oxidierung von LDL kann durch eine Phospholipaseaktivität des Apolipoproteins Bs LPC entstehen, dass durch endotheliale ATX Aktivität in LPA umgewandelt wird. Vor allem die dabei entstehenden ungesättigten LPAs binden an die LPA-Rezeptoren LPA₁ und LPA₃ (G-Protein gekoppelte Rezeptoren) auf den Endothelzellen und vermitteln dadurch die Freisetzung des Chemokins CXCL1, das für die LPA-abhängige Monozytenrekrutierung über CXCR2 verantwortlich ist (Abbildung 3)^{11,12,38,45}. Die Monozyten rollen zunächst vermehrt, adhären schließlich und wandern dann mittels Diapedese durch

das arterielle Endothel in die Gefäßwand^{46,47}. Subendothelial differenzieren die Monozyten zu Makrophagen^{38,47}. Die Makrophagen nehmen über verschiedene membranständige Scavenger Rezeptoren, wie zum Beispiel den SR-A1 und 2, CD36 oder LOX1 Rezeptor⁴⁵, das oxidierte LDL auf^{48,49}. Im Gegensatz zum LDL-Rezeptor haben die Scavenger-Rezeptoren keinen negativen Rückkopplungsmechanismus, der die Lipidaufnahme begrenzt, sondern es kommt zu einer fortlaufenden Verstärkung der Aufnahme von oxidiertem LDL. Das überschüssige Lipid wird intrazellulär eingelagert, so dass die Makrophagen sich in sogenannte Schaumzellen verwandeln^{38,50}. Die Aufnahme von oxidiertem LDL und die Einlagerung von Lipiden kann zur Apoptose der Schaumzellen im Verlauf der Atherosklerose führen⁴³. Wenn die apoptotischen Zellen nicht durch Phagozytose von Makrophagen, dieser Prozess wird als Efferozytose bezeichnet, entfernt werden können, was in fortgeschritten Plaques immer häufiger der Fall ist (defektive Efferozytose), kann es zur sekundären Nekrose der apoptotischen Schaumzellen kommen. Diese abgestorbenen Schaumzellen tragen zur Bildung des nekrotischen Kernes bei^{38,51}. Gleichzeitig wandern weiter Monozyten in die durch die Lipoproteine geschädigte Gefäßwand ein und fördern dadurch das weitere Wachstum der atherosklerotischen Plaques⁵². Dieser Prozess wird wesentlich durch anhaltende Bildung von LPA in der Gefäßwand verstärkt^{11,12}. In frühen Stadien der Atherosklerose trägt auch die Makrophagenproliferation zum Plaquewachstum bei⁵³⁻⁵⁵.

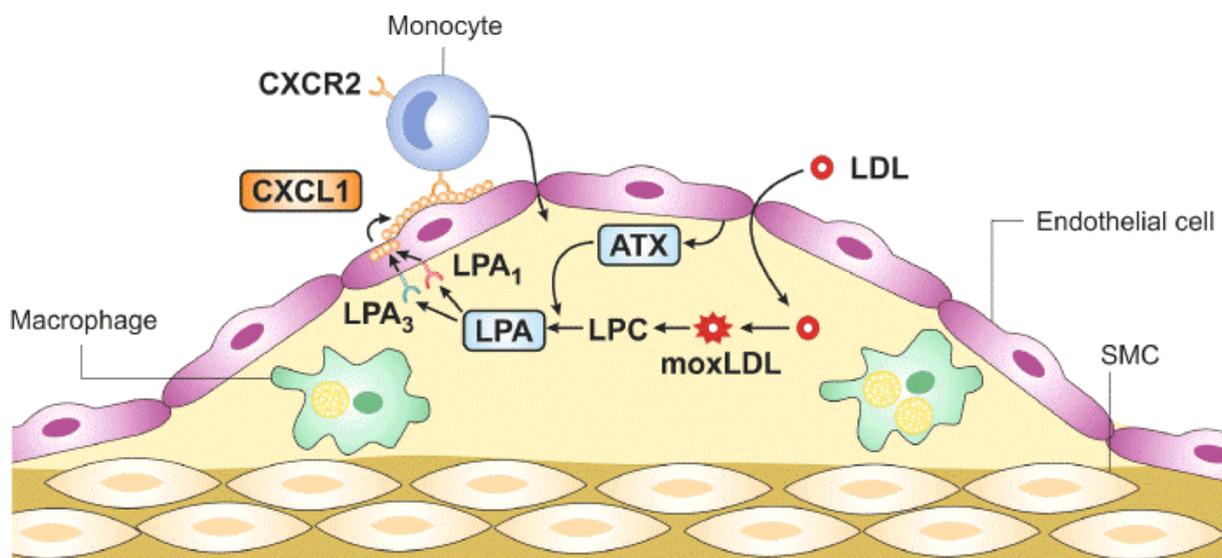


Abbildung 3: Modell der LPA-abhängige Monozytenrekrutierung in der Atherosklerose. Endotheliales ATX bildet LPAs aus LPC das bei der Oxidierung von LDL entsteht. Die LPAs binden an die LPA₁- und LPA₃-Rezeptoren auf Endothelzellen, wodurch das Chemokin CXCL1 aus den Endothelzellen freigesetzt und die Monozytenadhäsion vermehrt wird. Die Abbildung wurde entnommen aus Zhou et al.¹².

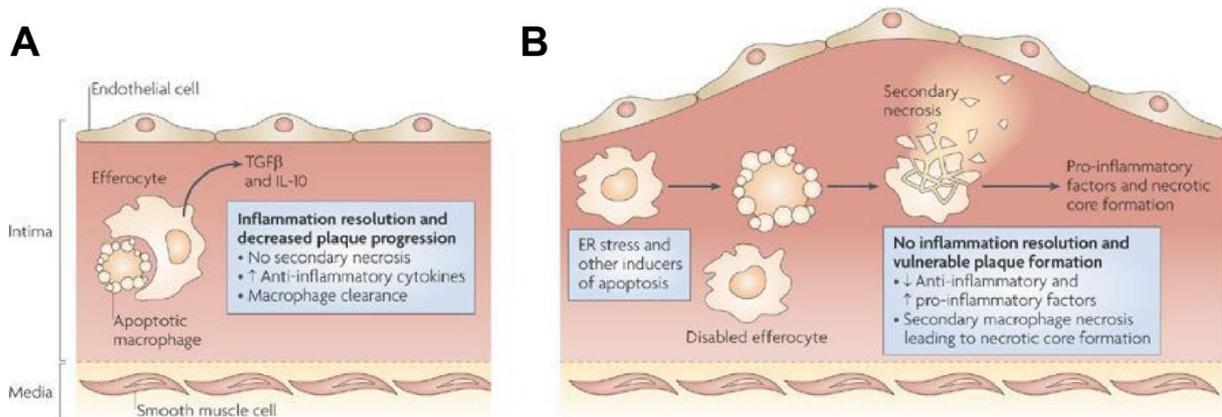
1.3 Nekrotischer Kern

Mit der fortschreitenden Atheroskleroseprogression kommt es in der Plaque durch Bildung eines nekrotischen Kerns zu Veränderungen in der Zusammensetzung¹⁵. Der nekrotische Kern ist lipidreich und besteht aus abgestorbenen Schaumzellen und Cholesterinkristallen^{56,43,56}. Durch zunehmende Größe des nekrotischen Kerns wird die atherosklerotische Plaque instabiler^{43,56}. Die wichtigsten Prozesse bei der Entstehung des nekrotischen Kerns sind einerseits eine vermehrte Apoptose und Nekrose und andererseits eine unzureichende Efferozytose⁵³. Die Apoptose ist ein physiologischer, „programmierter“ Zelltod^{57,58}. Die Zellen und deren Inhalt werden kontrolliert abgebaut und somit eine Entzündungsreaktion vermieden^{57,59}. Die apoptotische Zelle schrumpft, das Chromatin wird kompaktiert und der Nukleus fragmentiert, die Mitochondrien verlieren das Membranpotential und werden abgebaut, die Zellmembran bildet blasenförmige Ausbuchtungen („Blebs“)⁵⁷⁻⁵⁹. Die Zelle wird schließlich in kleinere Apoptosekörper fragmentiert und durch das Phosphatidylserin, das von der inneren zur äußeren Schicht der Zellmembran wechselt, von Makrophagen oder anderen phagozytierenden Zellen erkannt⁵⁷. Es gibt verschiedene Ursachen, die zum Zelltod einer Zelle führen¹⁵. Die Schaumzellen, die den Großteil der frühen atherosklerotischen Läsion ausmachen, sterben unter anderem an der Überladung mit oxidiertem LDL, das zu Stress im endoplasmatischen Retikulum (ER) führt, oder wegen anderer Stimuli, wie zum Beispiel oxidativer Stress oder hoher Zytokinkonzentrationen – beispielsweise TNF α , ab^{15,38,45,58,60}. Durch die Störung der ER Funktion wegen anhaltendem ER-Stress kommt es zur falschen Proteinfaltung¹⁵. Folglich wird der unfolded protein response (UPR)-Weg aktiviert, wodurch proapoptotische Proteine, wie CHOP, verstärkt exprimiert werden¹⁵. Im Gegensatz zur Apoptose erfolgt die Nekrose unkontrolliert⁵⁷. Bei der Nekrose schwellen die Zellen an und die Zellmembran wird geschädigt, wodurch der Zellinhalt in die Umgebung freigesetzt wird und es dadurch zu einer Entzündungsreaktion kommt⁵⁷.

Die Efferozytose ist ein Prozess bei dem die abgestorbenen apoptotischen Zellen durch die Efferozyten phagozytiert werden¹⁵. Die Efferozytose verhindert die Entzündungsreaktion infolge einer sekundären Nekrose, da die apoptotischen Zellen vorher entfernt werden^{15,61-63}. Die anti-inflammatorische Wirkung der Efferozytose in frühen Stadien der Atherosklerose vermindert die Zunahme der Plaquegröße (Abbildung 4A)^{61,15,61}. In späten Stadien reicht die Efferozytose nicht aus um die abgestorbenen Zellen zu entfernen¹⁵. Es kommt zur Bildung eines nekrotischen Kerns und einer verstärkten Entzündungsreaktion (Abbildung 4B)^{15,61}. Ein großer nekrotischer Kern ist klinisch problematisch, weil die atherosklerotische Läsion dadurch instabil wird⁴³ und es zur Plaqueruptur kommen kann. Auch die vermehrte Entzündungsreaktion und die damit einhergehende Ausdünnung der fibrösen Kappe, die den hoch thrombogenen nekrotischen Kern von den Gerinnungsfaktoren im Blut trennt, erhöhen

das Rupturrisiko³⁸. Zu den Ursachen, die zur Bildung des nekrotischen Kerns führen, zählt neben der bereits erwähnten defektiven Efferozytose, ein anhaltender Entzündungszustand¹⁵.

Bei der Progression der Atherosklerose spielen auch die glatten Muskelzellen eine wichtige Rolle. Sie migrieren aus der Tunica media in die Plaque, proliferieren dort und bilden die fibröse Kappe³⁷. Die fibröse Kappe ist die Bindegewebsschicht über dem nekrotischen Kern, die aus glatten Muskelzellen und von denen produzierten extrazellulären Matrix besteht⁴⁰. Fibröse Kappe wird mit der Zeit durch das Absterben der glatten Muskelzellen immer dünner und kann mit der Zeit beim Menschen so stark ausdünnen, dass es zu einer Ruptur der Plaque kommt, die folglich eine Atherothrombose bewirken kann^{40,43}.



Nature Reviews | Immunology

Abbildung 4: Efferozytose und Bildung des nekrotischen Kerns. (A) Gezeigt ist die Efferozytose in den frühen atherosklerotischen Läsionen. Efferozyten sind noch in der Lage die apoptotischen Zellen aufzunehmen. Ihre Wirkung ist antiinflammatorisch, da es nicht zu einer sekundären Nekrose kommt. (B) In den fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose werden die apoptotischen Makrophagen nicht mehr ausreichend efferozytiert. Es kommt zur sekundären Nekrose mit Freisetzung inflammatorischen Faktoren und folglich zur Bildung eines nekrotischen Kerns. Die Abbildung wurde entnommen aus Tabas et al.¹⁵.

1.4 Zielsetzung

ATX spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen². Die Freisetzung von ATX aus Endothelzellen fördert die Monozytenrekrutierung in den subendothelialen Raum der Gefäßwand durch die Bildung von LPA aus LPC^{10,11}. Dadurch hat ATX einen direkten Einfluss auf die Atherosklerose. Die Rolle von ATX in Makrophagen in der Atherogenese ist allerdings nicht bekannt.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle von ATX in Makrophagen in der Entstehung der Atherosklerose zu untersuchen. Anhand von Mäusen, die einen zell-spezifischen Knock-out des ATX Gens in myeloiden Zellen aufweisen, wird die Hypothese geprüft, dass ATX in Makrophagen, ähnlich wie in den Endothelzellen, eine proatherogene Wirkung hat. Dazu wird die Plaqueausdehnung in den Aorten und den Aortenwurzeln von Mäusen mit und ohne den ATX Knock-out in myeloiden Zellen, nachdem diese für drei und sechs Monate mit einer cholesterinreichen Diät gefüttert wurden, verglichen. Ein Nebenziel dieses Abschnittes der Arbeit ist die Bestimmung des geeignetsten Normalisierungsfaktors für die Bestimmung der Plaquegröße in der Aortenwurzel.

Zweites Hauptziel dieser Arbeit ist zu untersuchen, ob ATX in Makrophagen an der Bildung des nekrotischen Kerns beteiligt ist, da durch die zunehmende Größe die atherosklerotische Plaque geschwächt und instabil wird und es dadurch zu einer Plaqueablösung oder zu einer Plaqueruptur kommen kann³⁸ und somit die Größe klinisch relevant ist. Dafür wird die Größe des nekrotischen Kerns in verschiedenen Zeitpunkten der Atherosklerose (nach drei und sechs Monaten fettreicher Diät) analysiert. Es sollte die Hypothese überprüft werden, dass ATX in Makrophagen zu einer vermehrten Bildung des nekrotischen Kerns beiträgt.

Drittens ist das Ziel dieser Arbeit mittels Immunfluoreszenz festzustellen, ob ATX in Makrophagen eine Rolle in der Makrophagenrekrutierung spielt. Die Makrophagen spielen nämlich eine wichtige Rolle in der Bildung des nekrotischen Kerns, da sie meist wegen der Überladung mit Lipiden absterben⁴³ und danach nicht abgeräumt werden¹⁵. Die Makrophagen spielen aber auch allgemein eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose^{38,43}.

Viertens werden die Ursachen für die Entstehung des nekrotischen Kerns untersucht. Als Hypothese wird, als Hauptursache der vermehrten Bildung des nekrotischen Kerns, eine erhöhte Rate der Apoptose- und defektiven Efferozytoserate durch M-ATX gestellt. Ziel ist also den Einfluss von ATX in Makrophagen auf die Apoptose- und Efferozytoserate in den

atherosklerotischen Läsionen zu untersuchen. Das wird mittels kombinierter Mac2 Immunfluoreszenzfärbung mit TUNEL Assay geprüft.

Fünftes Ziel dieser Arbeit ist, die geschlechtsspezifische Wirkung von ATX in Makrophagen auf das Körpergewicht, die Plaquebildung und die Bildung des nekrotischen Kerns zu untersuchen, da in der Literatur geschlechtsspezifische Wirkungen von ATX beschrieben wurden. Es wurde nämlich gezeigt, dass sich die Plasma-ATX-Spiegel zwischen Frauen und Männern unterscheiden können⁶⁴.

Durch die Erkenntnisse dieser Arbeit, sowie auch der weiteren wissenschaftlichen Untersuchungen zum Thema der Rolle von ATX in der Atheroskleroseprogression, könnte überlegt werden, ob die Therapie der Atherosklerose durch die ATX-Inhibitoren sinnvoll wäre und ob somit ein weiterer Ansatz zur Atherosklerosebehandlung bestehen würde.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Autoklav	Systec VX-95 (Systec GmbH, Wettenberg, Deutschland)
Gewebeeinbettautomat	Leica ASP200 S Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland)
Mikroskope	Leica DM6000B, Leica DM750 (beide von Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland), Zeiss 47 30 11-9901 (Carl Zeiss, Oberkochen Deutschland)
Mikroskopkameras	Leica DFC295 und Leica DFC365FX (beide von Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland)
Paraffinausgießstation	Leica EG 1160 Paraffinausgießstation (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland)
pH-Meter	WTW Labor-pH-Meters pH 526 (Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim, Deutschland)
Rotationsmikrotom	Leica RM2235 (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland)
Vortex Mixer	Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA)
Waagen	Sartorius CPA64 analytische Waage (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland; Wiegegenauigkeit: 0.1 mg), Präzisionswaage EMB 6000-1, (KERN & SOHN GmbH, Balingen, Deutschland; Wiegegenauigkeit: 0.1 g)
Wärmeschrank	Memmert U40 (Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland)
Wasseraufbereitungssystem	Milli-Q-Integral 3/5/10/15 (Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland)
Paraffin-Streckbad	Paraffinstreckbad Typ 1052 (GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland)
Zentrifuge	Eppendorf 5415C (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

2.2 Software

Mikroskop Software	Leica Application Suite (LAS) AF, Version V4.13.0, LAS X, Version 3.6.0.20104 (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland)
Bildanalysesoftware	ImageJ, https://imagej.nih.gov/ij/
Bildbearbeitungsprogramm	Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems Software Dublin, Irland)
Statistiksoftware	Prism 7 (GraphPad, San Diego, CA, USA)

2.3 Chemikalien

- Vectashield® Eindeckmittel mit DAPI (Vector Laboratories, INC., Burlingame, CA, USA)
- Paraformaldehyd (PFA) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Phosphate buffered saline (PBS) Pulver (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- Tween® 20 (Merck Millipore, Schwalbach, Deutschland)
- Vitro Clud® Eindeckmedium (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland)
- Ethanol Absolut (Sigma-Aldrich-Merck, Steinheim, Deutschland)
- Xylol (Fisher Chemical, Schwerte, Deutschland)
- Natriumcitrat (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland)
- Zitronensäure (Merck Millipore, Schwalbach, Deutschland)
- Oil-Red-O Pulver (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland)
- Isopropanol 100% (aus der Apotheke)
- Salzsäure, HCl (aus der Apotheke)
- Natrium Hydroxid, NaOH (Merck Millipore, Schwalbach, Deutschland)
- Natrium Chlorid, NaCl (Merck Millipore, Schwalbach, Deutschland)
- Glycerin-Gelatine (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland)
- Vitro-Clud® (R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland)
- Vectashield® (Vector Laboratories, Peterborough, UK)

2.4 Antikörper

Tabelle 1: Primäre Antikörper

Antikörper	Wirt	Klonalität	Katalognummer	Firma	Sonstiges
Mac2	Ratte	Monoklonal (M3/38)	/	/	Überstand der Hybridomazelllinie
IgG	Ratte	n. A.	Sc-2026	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA	/

Tabelle 2: Sekundärer Antikörper

Antigen	Wirt	Konjugation	Katalognummer	Firma
Ratten-IgG	Esel	FITC	712-095-153	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK

2.5 Lösungen

Zur Vorbereitung aller Lösungen und Puffer wurde Reinwasser (Typ I) verwendet, dass durch das Wasseraufbereitungssystem Milli-Q-Integral 3/5/10/15 generiert wurde.

Citrat-Puffer:

Die Herstellung des Citrat-Puffers erfolgte durch das Zusammenmischen von Aqua dest. (630 ml), Lösung A (12,6 ml), Lösung B (57,4 ml) und Tween 20 (350 µl, pH 6,0). Zur Herstellung der Lösung A wurde Zitronensäure (2,101 g) in Aqua dest. (100 ml) aufgelöst. Zur Herstellung der Lösung B wurde Natriumcitrat (14,70 g) in Aqua dest. (500 ml) aufgelöst.

4% Paraformaldehyd (PFA):

Zur Herstellung der 4%-igen PFA-Lösung wurde zunächst 16 g PFA in 184 ml Reinwasser gegeben. Die Auflösung von PFA erfolgte unter Zugabe von NaOH (10 M, 5 ml) während des Erhitzens der Lösung auf 100°C. Der pH-Wert wurde auf 7,4-8,0 durch die Gabe von 25% HCl eingestellt. Anschließend wurde dasselbe Volumen von 2×PBS hinzugefügt und die Lösung wurde durch ein Filterpapier (Dicke 0.20 mm, Ø 270mm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) filtriert. Der pH-Wert wurde schließlich auf 7,4-8,0 eingestellt.

20×Kochsalz-Natriumcitrat (SSC) – Puffer:

Der 20×Kochsalz-Natriumcitrat (SSC) – Puffer wurde durch die Auflösung von Natriumcitrat (0,3 M, pH 7,0) in NaCl (3 M) hergestellt.

Oil-Red-O-Stammlösung (0,5%-ig):

Zur Herstellung von Oil-Red-O-Stammlösung wurde Oil-Red-O Pulver (1 g; Sigma-Aldrich) in 99%-igem Isopropanol (200 ml) (2-Propanol) aufgelöst.

Oil-Red-O-Arbeitslösung:

Die Herstellung der Oil-Red-O-Arbeitslösung erfolgte durch Zugabe von 120 ml Reinwasser zu 160 ml der Stammlösung. Nach 1 h auf Raumtemperatur wurde die Arbeitslösung durch ein Filterpapier filtriert.

Glycerin-Gelatine-Sol

Zum Eindecken von Oil-Red-O gefärbten Gewebe wurde Glycerin/Gelatine-Sol vorbereitet, wobei 2 ml Sol in 7 ml Aqua dest. vermischt wurde.

2.6 Verwendete Kits

Elastika-van-Gieson-Färbekit (baacklab, Schwerin, Deutschland)

- Weigert Stammlösung A (#10225A.01000)
- Weigert Stammlösung B (#10225B.01000)
- Resorcin-Fuchsin und Van-Gieson Pikrofuchsin-Lösung (#12739)
- 1%ige Salzsäure-Alkohol (#10372.01000)

In situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)

2.7 Mäuselinien

Für die Untersuchungen des Einflusses des Makrophagen-ATX auf die Atheroskleroseprogression wurden $ApoE^{-/-}LysMCre^{+}ATX^{flox/flox}$ (M-ATX^{-/-} Mäuse) und $ApoE^{-/-}LysMCre^{+}ATX^{+/+}$ (M-ATX^{+/+} Mäuse) Mäuse verwendet. Um M-ATX^{-/-}-Mäuse mit einem Zellspezifischen Knockout des ATX Gens in myeloiden Zellen zu bekommen, wurden die $ApoE^{-/-}$ Mäuse mit ATX geflochten Mäusen ($ATX^{flox/flox}$) via LysMCre-Rekombinase gekreuzt. Die Wildtyp-Mäuse (M-ATX^{+/+}) wurden durch die Kreuzung der $ApoE^{-/-}$ Mäuse mit den $LysMCre^{+}ATX^{+/+}$ Mäusen erhalten. Die $ATX^{flox/flox}$ Mäuse wurden von Dr. Vasilis Aidinis (Alexander Fleming Biomedical Sciences Research Center, Griechenland) zur Verfügung gestellt^{26,65}. Die $LysMCre^{+}$ und $ApoE^{-/-}$ wurden bei Jackson Laboratory (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) gekauft. Die fettreiche Spezialdiät enthielt 21% Fett, 19,5% Casein und 0,15% Cholesteroll (ssniff, Soest, Deutschland) und wurde für drei bzw. sechs Monate verabreicht. Das Alter der Mäuse bei Beginn der Fütterung mit der Spezialdiät war zwischen acht und zehn Wochen. Die Versuche mit den lebenden Mäusen wurden von Frau Dr. Karshovska durchgeführt.

2.8 Tierhaltung und Mäusezucht

Die Mäuse wurden in isoliert ventilierten Käfigen, jeweils vier Mäuse pro Käfig, in der Zentralen Versuchstierhaltung (ZVH) des Klinikums der Universität München (KUM) bei einem 12-stündigem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Nahrung. Das Tierversuchsvorhaben wurde von der Regierung von Oberbayern gemäß § 8 des deutschen Tierschutzgesetzes genehmigt (55.2-1-54-2532-122-2015).

2.9 Wiegen der Mäuse und Gewebeentnahme

Die Mäuse wurden am Ende der Diätperiode durch Frau Dr. Karshovska und Frau Rokia Mohibullah gewogen. Anschließend wurde das Gewebe ebenfalls durch Dr. Karshovska entnommen. Vor Gewebeentnahme wurden die Mäuse nach drei bzw. sechs Monaten Fütterung mit fettreicher Diät mit Ketamin (80 mg/kg) und Xylazin (5 mg/kg) anästhesiert. Die Herzen samt Aorten (von Aortenbogen bis zur iliakalen Aortenbifurkation) wurden entnommen und anschließend über Nacht in 4%igem PFA fixiert.

2.10 Paraffineinbettung und Schnittpräparation mit dem Mikrotom

Am nächsten Tag wurden die Präparate durch Dr. Karshovska ins 70%ige Ethanol überführt und danach in einem Einbettautomaten (Leica ASP200 S) entsprechend dem folgenden Protokoll in Paraffin eingebettet:

- | | |
|---------------------|---------------------|
| 1. 70%iges Ethanol | 60 min bei 20°C |
| 2. 80%iges Ethanol | 60 min bei 20°C |
| 3. 96%iges Ethanol | 30 min bei 20°C |
| 4. 96%iges Ethanol | 30 min bei 20°C |
| 5. 100%iges Ethanol | 30 min bei 20°C |
| 6. 100%iges Ethanol | 30 min bei 20°C |
| 7. Xylol | 30 min bei 45°C |
| 8. Xylol | 30 min bei 45°C |
| 9. Paraffin | 30 min bei 62°C |
| 10. Paraffin | 30 min bei 62°C |
| 11. Paraffin | Über Nacht bei 62°C |

Jede Gewebeprobe wurde anschließend in je eine Metallform mit flüssigem Paraffin eingegossen und das Paraffin bei -5°C gehärtet (Leica EG 1160 Paraffinausgießstation, Leica Biosystems). Mittels einem Rotationsmikrotom wurden von den Paraffinblöcken 5 μm dicke Serienschnitte (etwa 80-100 Schnitte pro Block) ab Beginn der Aortenklappen gesammelt. Es wurden jeweils zwei Schnitte der Aortenwurzel auf einen Objektträger (Superfrost plus glass slides, Thermo Fisher Scientific) aufgetragen.

2.11 Histologie und Immunfluoreszenz

2.11.1 Elastika-van-Gieson-Färbung (EvG)

Für die Analyse der Aortenwurzelmorphologie, der Plaquegröße und der Größe des nekrotischen Kernes wurden pro Maus drei bis fünf Schnitte der Aortenwurzel in ca. 100 μm Abständen mit EvG-Färbung gefärbt. Dazu wurde das Gewebe erst entparaffiniert und gewässert (Tabelle 3).

Tabelle 3: Entparaffinieren und rehydrieren.

Schritt	Lösung	Zeit
1.	Xylol	10 min
2.	Xylol	10 min
3.	100%iges Ethanol	5 min
4.	100%iges Ethanol	5 min
5.	96%iges Ethanol	5 min
6.	70%iges Ethanol	5 min

Danach wurden die Gewebeschnitte für 20 min in die Resorcin-Fuchsin-Lösung eingetaucht, um die elastischen Fasern zu färben, und anschließend unter fließendem Leitungswasser für eine Minute gespült. Um die Zellkerne anzufärben, wurden die Objektträger dann 15 min in Weigerts Eisenhämatoxylin-Lösung (bestehend aus der Weigert Stammlösung A und der Weigert Stammlösung B im Verhältnis 1:1) inkubiert. Die Gewebeschnitte wurden anschließend für 10 min unter fließendem Wasser gewaschen. Zur besseren Differenzierung der Färbung wurden die Objektträger für 5-10 s in 1%ige Salzsäure-Alkohol (1%iges HCl in 70%iges Ethanol) eingetaucht und anschließend für 5 s im Leitungswasser gewaschen. Danach wurden die Gewebeschnitte für 1 min in die van-Gieson-Pikrofuksin-Lösung eingetaucht, um das Kollagen anzufärben, und wieder mit dem Leitungswasser gewaschen. Zur Dehydration wurden die Gewebeschnitte zweimal für jeweils 2 min in Isopropanol und jeweils zweimal für 5 min in Xylol eingetaucht. Als letztes wurden die Gewebeschnitte mit einem wasserunlöslichem Einschlussmedium (Vitro Clud[®], R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland) und einem Deckglas eingedeckt. Die EvG-Färbung wurde zum Teil von Frau Lourdes Ruiz-Heinrich (MTA) durchgeführt.

Die EvG-Färbung färbt die Zellkerne braun bis schwarz, die elastischen Fasern schwarzviolett, das Kollagen bzw. das Bindegewebe rot und das Zytoplasma gelb bis hellbraun.

Nach der Färbung wurden Bilder mit einem Durchlichtmikroskop (Leica DM6000B, Leica Microsystems) und einer digitalen Kamera (Leica DFC295) in 5- und 10-facher Vergrößerung aufgenommen.

Die Auswertung der mikroskopischen Bilder erfolgte mithilfe einer Bildanalyse-Software (ImageJ, <https://imagej.nih.gov/ij/>). Dabei wurden zur Bestimmung der Atheroskleroseausdehnung die Plaquefläche sowie die Fläche und der Perimeter der Aortenwurzel (Abbildung 5) gemessen. Die Skalierung für die Messung der Flächen und

Perimeter erfolgte durch ImageJ Software. Die Distanz, die in ImageJ Software in Pixel gemessen wurde, wurde mit der bekannten Länge in μm , die automatisch durch das LAS AF Software skaliert wurde, geteilt, um so die Skalierung in μm zu bekommen. Als Plaque wurde die Ablagerung zwischen dem Gefäßlumen und der Membrana elastica interna jeweils in einem Sinus aortae definiert (Abbildung 5B). Die Aortenwurzelbegrenzung wurde durch die Membrana elastica interna definiert (Abbildung 5A). Aus der Analyse der drei bis fünf Gewebeschnitte pro Maus wurde ein Mittelwert berechnet und als gemeinsamer Wert in den Graphen als Plaquefläche pro Klappe, Plaquefläche als Prozent der Aortenwurzelfläche und als Verhältnis zwischen Plaquefläche und Perimeter der Aortenwurzel dargestellt. In die Auswertung wurden nur Schnitte aufgenommen, in denen alle drei Klappen in ungefähr gleicher Ausdehnung zu sehen waren.

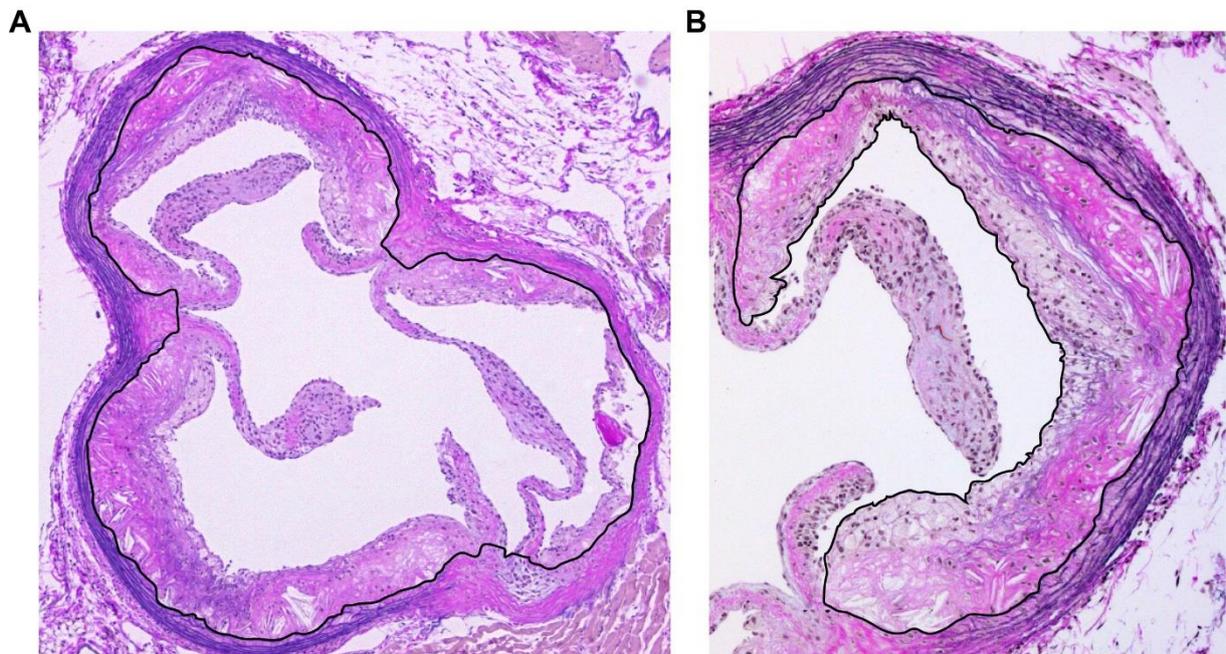


Abbildung 5: Auswertung der Plaqueausdehnung. (A) Beispiel für die Messung der Aortenwurzelfläche bzw. des Aortenwurzelperimeters (schwarze Linie). (B) Beispiel für die Messung der Plaquefläche (schwarze Linie).

In den mit der EvG-Färbung gefärbten Gewebeschnitten wurde auch die Analyse des nekrotischen Kerns durchgeführt. Zum nekrotischen Kern wurden azelluläre Areale und Cholesterinkristalllücken gezählt (Abbildung 6). Die Quantifizierung des nekrotischen Kerns erfolgte in denselben Schnitten in denen auch die Plaquegröße bestimmt wurde. Die Fläche des nekrotischen Kerns wurde mittels ImageJ Software gemessen und als absolute Fläche dargestellt oder als prozentualer Anteil an der gesamten Plaquefläche berechnet.

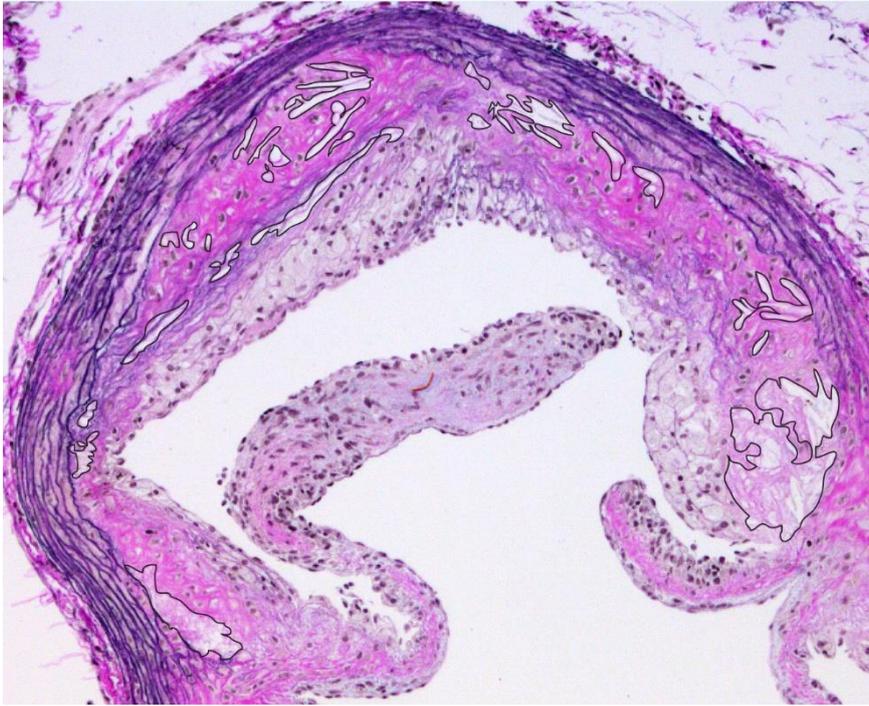


Abbildung 6: Auswertung des nekrotischen Kerns. Beispiel für die Messung des nekrotischen Kerns in einer atherosklerotischen Plaque (schwarz umrandete Areale).

2.11.2 Oil-Red-O (ORO) Färbung

Nach Aortenentnahme wurde das Aortenlumen eröffnet und die gesamte Aorta mit der Innenseite nach oben en face mit Nadeln auf einem gummierten Objektträger aufgespannt. Die Aorten wurden in Petrischalen mit 4%igem PFA über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Adventitia entfernt und die ORO-Färbung durchgeführt. Dazu wurden als erstes die Stammlösung und die Arbeitslösung vorbereitet (Abschnitt 2.5). Die Aorten wurden zuerst für 5 min in PBS gewaschen und danach zehnmal in 60%igem Isopropanol eingetaucht. Anschließend wurden sie für 15 min in der ORO-Arbeitslösung inkubiert und erneut zehnmal in 60%igem Isopropanol eingetaucht. Nach der Färbung wurde das Gewebe für 5 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen und mittels eines Glycerin-Gelatine-Sols eingedeckt. Die ORO Färbung wurde zum Teil auch von Frau Rokia Mohibullah durchgeführt. Es wurde einen bis drei Tage gewartet damit sich die rote Farbe der ORO-Färbung in den Arealen mit Lipideinlagerung entwickeln konnte bevor mikroskopische Bilder von den Aortenpräparaten mit einem Durchlichtmikroskop (DM6000B) und einer digitalen Kamera (DFC295) aufgenommen wurden. Die Bilder wurden mit der 2,5-fachen Vergrößerung aufgenommen und danach mit Hilfe eines Bilderbearbeitungsprogramms (Adobe Photoshop CS6) zusammengefügt.

Die Auswertung der ORO-Färbung erfolgte mit der ImageJ Software. Dabei wurden die Flächen der entnommenen Aorten und die mit ORO gefärbten Flächen gemessen (Abbildung 7B). Die Aorten wurden in drei Bereiche geteilt – in den Aortenbogen, den thorakalen und den abdominalen Teil der Aorta (Abbildung 7A), um beurteilen zu können, wo die Läsionen prädisponiert sind und ob genotypspezifische Unterschiede in der Lokalisation bestehen. Der Aortenbogen reichte vom Aortenausgang aus dem Herzen bis zum Ende des Bogens. Bei den aufgenommenen Bildern wurde das Ende des Aortenbogens leicht unterhalb von der durch das Schneiden vom Aortenbogen verursachte „Bifurkation“ definiert (Abbildung 7A – der oberste Abschnitt). Der thorakale Teil wurde als Fläche zwischen dem Ende des Aortenbogens und dem Nierenarterienabgang markiert (Abbildung 7A – der mittlere Abschnitt). Falls die Nierenarterien durch die Präparation nicht erhalten waren, wurde als Übergang zwischen dem thorakalen und dem abdominalen Abschnitt der Bereich der Aorta genommen, bei dem die Aorta schmaler wurde (Abbildung 7A). Der Abschnitt der Aorta zwischen dem thorakalen Teil und der iliakalen Bifurkation wurde als abdominaler Teil definiert (Abbildung 7A – der untere Abschnitt).

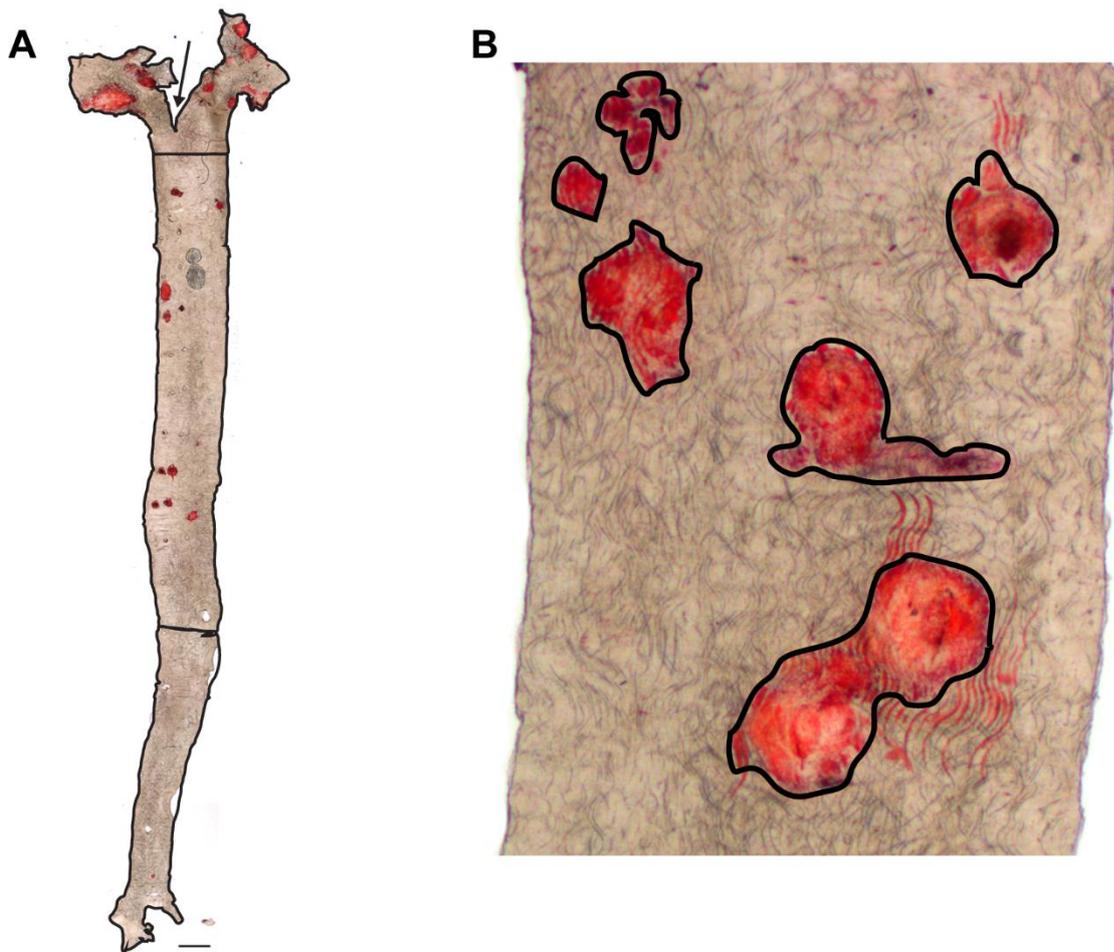


Abbildung 7: Auswertung der Plaque- und Aortenfläche. (A) Beispiel für die Messung der Aortenfläche und Beispiel der Teilung der Aorta auf den Aortenbogen (oben), den thorakalen (Mitte) und den abdominalen Teil (unten). Pfeil: „Bifurkation“ (B) Beispiel für die Messung der Plaqueablagerungen in der Aorta.

2.11.3 Kombinierte Mac2 Immunfluoreszenzfärbung und TUNEL Assay

Um den Makrophagenanteil in den Plaques sowie die Apoptose und die Efferozytose der Makrophagen zu beurteilen, wurde eine kombinierte Mac2 Immunfluoreszenzfärbung mit dem TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick-End Labeling) Assay durchgeführt. Pro Maus wurden drei bis vier histologische Schnitte ausgesucht (Distanz zwischen den Schnitten: 50-100 µm) und gefärbt. Die Schnitte wurden dazu entparaffiniert und rehydriert (Tabelle 3). Nach einer absteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte für 5 min in PBS gewaschen. Zur Antigendemaskierung wurden sie zweimal für 10 min im Citratpuffer mit den Detergenzien (630 ml Aqua dest. + 57,4 ml Lösung B + 12,6 ml Lösung A + 350 µl Tween20) in einer Mikrowelle gekocht. Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte in PBS gegeben. Zuerst wurde der TUNEL Assay (In Situ Cell Death Detction Kit, TMR Red, Roche) durchgeführt. Dazu wurde die „Enzyme Solution“ in die „Label Solution“ im Verhältnis 1:10 pipettiert und den positiven Kontrollen dazugegeben. Da auf dem Objektträger jeweils zwei histologische Schnitte vorhanden waren, wurde eins davon immer als positive Kontrolle (mit dem TUNEL Assay und Mac2 Antikörper) und das andere als negative Kontrolle genommen. Als negative Kontrolle wurde PBS verwendet. Die Gewebeschnitte wurden anschließend für 15 min in dem Wärmeschrank (Mettler U40, Mettler GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland) bei 37°C inkubiert und danach dreimal mit PBS gewaschen. Die unspezifischen Antikörperbindungsstellen wurden mit einem 10%igem Eselserum 30 min blockiert. Nach der Entfernung des Serums wurde der Mac2 Antikörper – unverdünnte Überstände der Hybridomazelllinie TIB-166 (ATCC) – auf die positiven Kontrollen gegeben. Die Isotyp- bzw. die negative Kontrolle erfolgte mittels Ratten-IgG (sc-2026, 400 µg/ml), das im Verhältnis 1:160 mit PBS verdünnt wurde und 0,1%iges Eselserum enthielt. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal in PBS gewaschen und mit einem sekundären, FITC-konjugierten Antikörper gegen Ratten IgG (712-095-153, 1,5 mg/ml, 1:300 mit PBS) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Präparate mit dem Eindeckmedium, das 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) enthält (VECTASHIELD®, Vector Laboratories, Peterborough, UK), eingedeckt. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Leica DM6000B, Leica Microsystems) und einer digitalen Farbkamera (Leica DFC365FX) wurden digitale Bilder aufgenommen und anschließend mit der ImageJ Software ausgewertet.

Es wurden alle Zellen in der Plaque sowie die Anzahl der Makrophagen gezählt, um den Makrophagengehalt beurteilen zu können. Für die Analyse der Apoptose und der Efferozytose wurden zusätzlich die TUNEL-positiven Signale gezählt. Dabei wurden drei verschiedene Zellarten gezählt: Erstens die apoptotischen Makrophagen mit TUNEL-positivem Nukleus (DAPI⁺Mac2⁺TUNEL⁺) (Abbildung 8A), zweitens die phagozytierten apoptotischen Zellen mit

einer TUNEL Färbung im Makrophagenzytoplasma (DAPI-Mac2⁺TUNEL⁺) (Abbildung 8B) und drittens die nicht-phagozytierten apoptotischen Zellen mit einer TUNEL Färbung in einem Zellkern außerhalb von Makrophagen (DAPI⁺Mac2⁻TUNEL⁺) (Abbildung 8C). Die Apoptose wurde ausgedrückt als prozentualer Anteil der apoptotischen Makrophagen mit TUNEL-positivem Nukleus (DAPI⁺Mac2⁺TUNEL⁺) an der Gesamtzahl an Makrophagen in der Plaque. Für die Efferozytose wurde einerseits der Anteil der phagozytierten apoptotischen Zellen (DAPI-Mac2⁺TUNEL⁺) an der Gesamtzahl an Makrophagen analysiert und andererseits das Verhältnis zwischen den nicht-phagozytierten apoptotischen Zellen (DAPI⁺Mac2⁻TUNEL⁺) und den apoptotischen Makrophagen (DAPI⁺Mac2⁺TUNEL⁺) bestimmt⁶⁶.

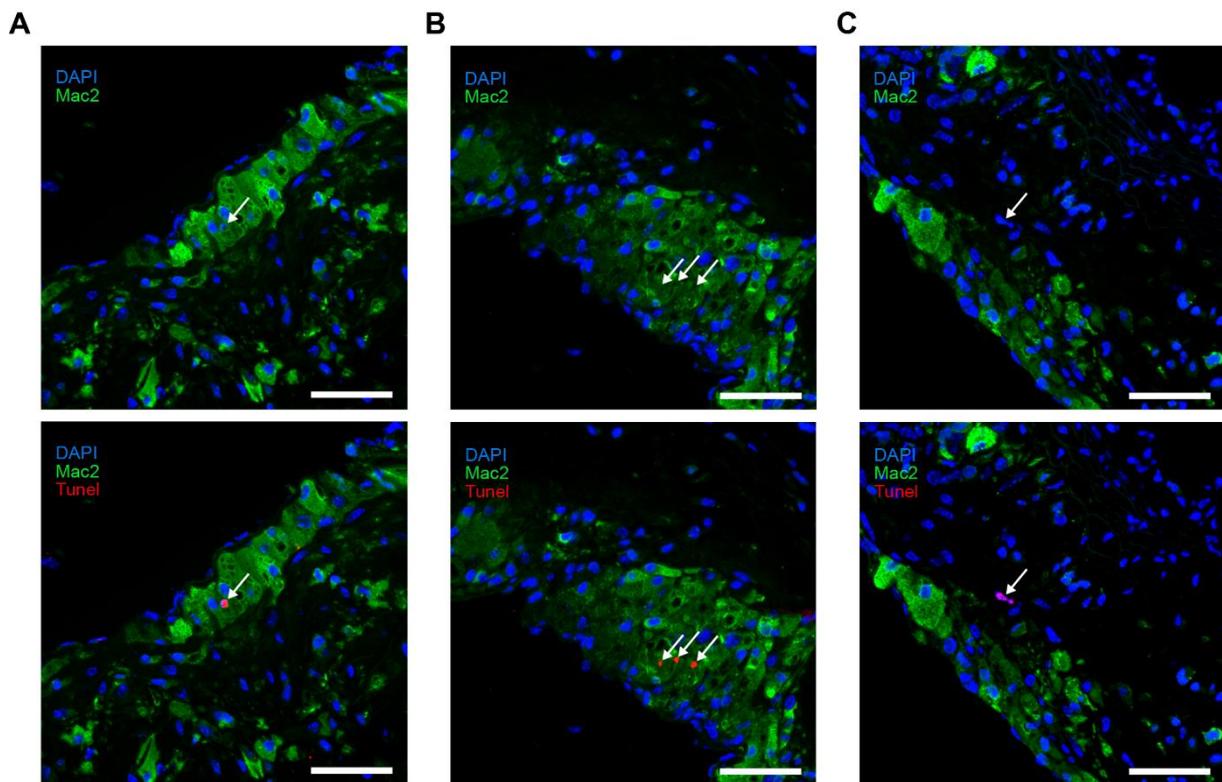


Abbildung 8: (A) Beispiel für den apoptotischen Makrophagen mit TUNEL Färbung im Zellkern (DAPI⁺Mac2⁺Tunel⁺). (B) Beispiel für phagozytierte apoptotischen Zellen mit TUNEL Färbung im Makrophagenzytoplasma (DAPI-Mac2⁺TUNEL⁺). (C) Beispiel für nicht-phagozytierte apoptotische Zelle mit einer TUNEL Färbung in einem Zellkern außerhalb von Makrophagen (DAPI⁺Mac2⁻TUNEL⁺). Maßstäbe: 70 µm.

2.12 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mittels einer Statistiksoftware (Prism 7, GraphPad) durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM ausgedrückt. Bei den Experimenten mit zwei voneinander unabhängigen Gruppen wurden die Unterschiede mittels dem t -Test nach Student analysiert. Die Korrelationen wurden mittels Pearson-Korrelation bestimmt. Als signifikant wurden die Werte mit $p < 0,05$ angesehen. Manche Mäuse bzw. Schnitte wurden aus technischen Gründen aus der Auswertung ausgeschlossen – beispielsweise wegen gefalteten oder zerrissenen Präparaten, oder weil das Gewebe schräg im Mikrotom geschnitten wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss der ATX Expression in Makrophagen auf das Körpergewicht

Um herauszufinden, ob die ATX Expression in Makrophagen das Körpergewicht der Mäuse beeinflusst, wurde das Mäusegewicht am Ende der Diätperiode bestimmt und zwischen den M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen verglichen. Nach einer dreimonatigen fettreichen Diät konnten unabhängig vom Geschlecht keine Unterschiede im Körpergewicht zwischen den M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen beobachtet werden (Abbildung 9A und B). Während bei den weiblichen Mäusen der Knockout von ATX in Makrophagen zu einem höheren Körpergewicht nach sechs Monaten im Vergleich zu den Kontrollmäusen führte (Abbildung 9A), konnte bei den männlichen Mäusen zu diesem Zeitpunkt kein Effekt der ATX Expression in Makrophagen auf das Körpergewicht festgestellt werden (Abbildung 9B). Erwartungsgemäß war sowohl bei den weiblichen M-ATX^{+/+} als auch bei den weiblichen M-ATX^{-/-} Mäusen das Körpergewicht nach der sechsmonatigen Diät höher als nach der dreimonatigen Diät (Abbildung 9A). Auch bei den männlichen M-ATX^{-/-} Mäusen war das Körpergewicht nach der sechsmonatigen Diät angestiegen im Vergleich zur dreimonatigen Diät (Abbildung 9B). Dagegen war das Körpergewicht bei den männlichen M-ATX^{+/+} Mäusen zwischen der drei- und sechsmonatigen Diät nicht signifikant verschieden (Abbildung 9B). Dies könnte mit der geringen Gruppengröße bei den männlichen M-ATX^{+/+} Mäusen zusammenhängen.

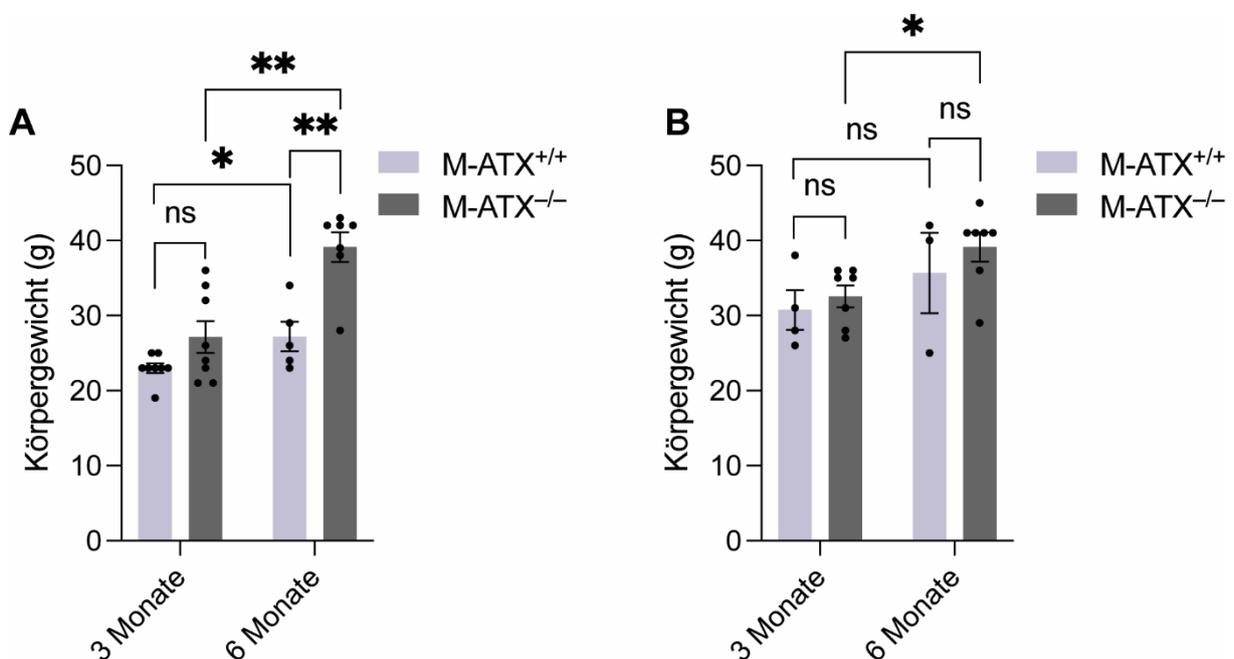


Abbildung 9: Einfluss von ATX in Makrophagen auf das Körpergewicht. Körpergewicht der weiblichen (A, n=5-8 Mäuse pro Gruppe) und männlichen (B, n=3-8 Mäuse pro Gruppe) M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäuse nach drei und sechs Monaten fettreicher Diät. *p<0,05 und **p<0,01 mit t-Test.

3.2 ATX Expression in Makrophagen und die Morphometrie der Aortenwurzel

Um die Plauegröße in der Aortenwurzel zwischen beiden Geschlechtern und im Zeitverlauf vergleichbar zu machen, kann neben der absoluten Plauegröße auch eine Normalisierung auf den Perimeter der Aortenwurzel oder auf die Aortenwurzelfläche in den histologischen Schnitten vorgenommen werden. Es ist allerdings generell nicht klar, welche Messparameter und welche Normalisierung am besten geeignet ist. Ferner besteht auch die Möglichkeit, dass der Perimeter oder die Fläche der Aortenwurzel durch den Knockout von ATX in Makrophagen beeinflusst werden.

3.2.1 ATX Expression in Makrophagen und der Aortenwurzelperimeter

Zunächst sollte beurteilt werden, ob das Aortenwurzelperimeter zur Normalisierung der Plauefläche bei Mäusen unterschiedlichen Alters geeignet ist. Das Perimeter der Aortenwurzel war sowohl in weiblichen M-ATX^{+/+} als auch in weiblichen M-ATX^{-/-} Mäusen nach sechs Monaten größer als nach drei Monaten fettreicher Diät (Abbildung 10A). In den männlichen M-ATX^{-/-} Mäusen war das Perimeter nach sechs Monaten Diät ebenfalls größer als nach drei Monaten Diät (Abbildung 10B). Das Aortenwurzelperimeter in den männlichen M-ATX^{+/+} war tendenziell ebenfalls nach sechs Monaten Diät größer als nach drei Monaten Diät (Abbildung 10B). Dieser Unterschied war aber nicht statistisch signifikant, möglicherweise aufgrund der kleinen Gruppengröße. Der Knockout von ATX in Makrophagen hatte unabhängig vom Geschlecht und der Dauer der fettreichen Diät, keinen Einfluss auf das Aortenwurzelperimeter (Abbildung 10A und B).

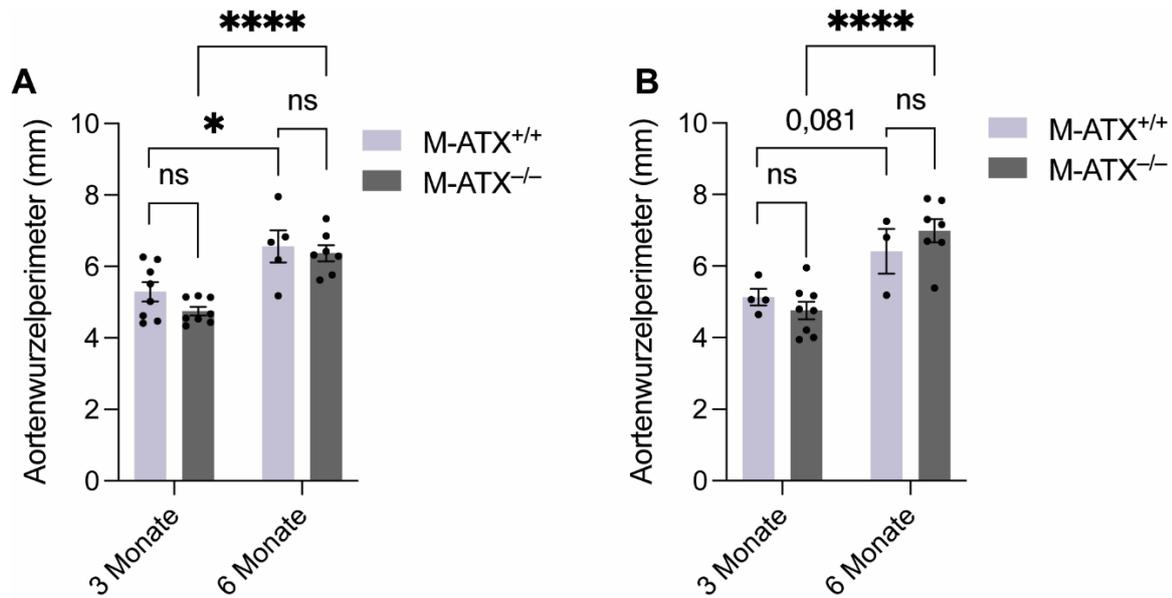


Abbildung 10: Einfluss der ATX Expression in Makrophagen auf das Perimeter der Aortenwurzel. Perimeter der Aortenwurzel in weiblichen (**A**, n=5–8) und männlichen (**B**, n=3–8) M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen nach drei und sechs Monaten fettreicher Diät. *p<0,05 und ****p<0,0001. ns = nicht signifikant.

Zusätzlich wurde untersucht, ob eine Beziehung zwischen Aortenwurzelperimeter und Körpergewicht besteht. Es zeigte sich nach drei Monaten fettreicher Diät weder bei M-ATX^{+/+} (Abb. 11A) noch bei M-ATX^{-/-} Mäusen (Abb. 11B) eine Korrelation zwischen dem Aortenwurzelperimeter und dem Körpergewicht. Nach der sechsmonatigen Diät war auch bei den M-ATX^{+/+} Mäusen keine Beziehung zwischen den beiden Parametern zu erkennen (Abb. 11C). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Perimeter der Aortenwurzel und damit die Größe der Aortenwurzel mit dem Alter der Mäuse unabhängig vom Körpergewicht zunimmt. Im Unterschied dazu war bei den M-ATX^{-/-} Mäusen eine geringe positive Korrelation zwischen Körpergewicht und Perimeter festzustellen (Abb. 11D). Dieser Befund könnte damit zusammenhängen, dass das Gewicht bei weiblichen M-ATX^{-/-} Mäusen nach der sechsmonatigen Diät deutlicher angestiegen war und dadurch besser mit dem altersabhängig vergrößerten Aortenwurzelperimeter korreliert. Ein kausaler Zusammenhang zwischen ATX in Makrophagen und der Beziehung von Aortenwurzelperimeter und Körpergewicht scheint unwahrscheinlich.

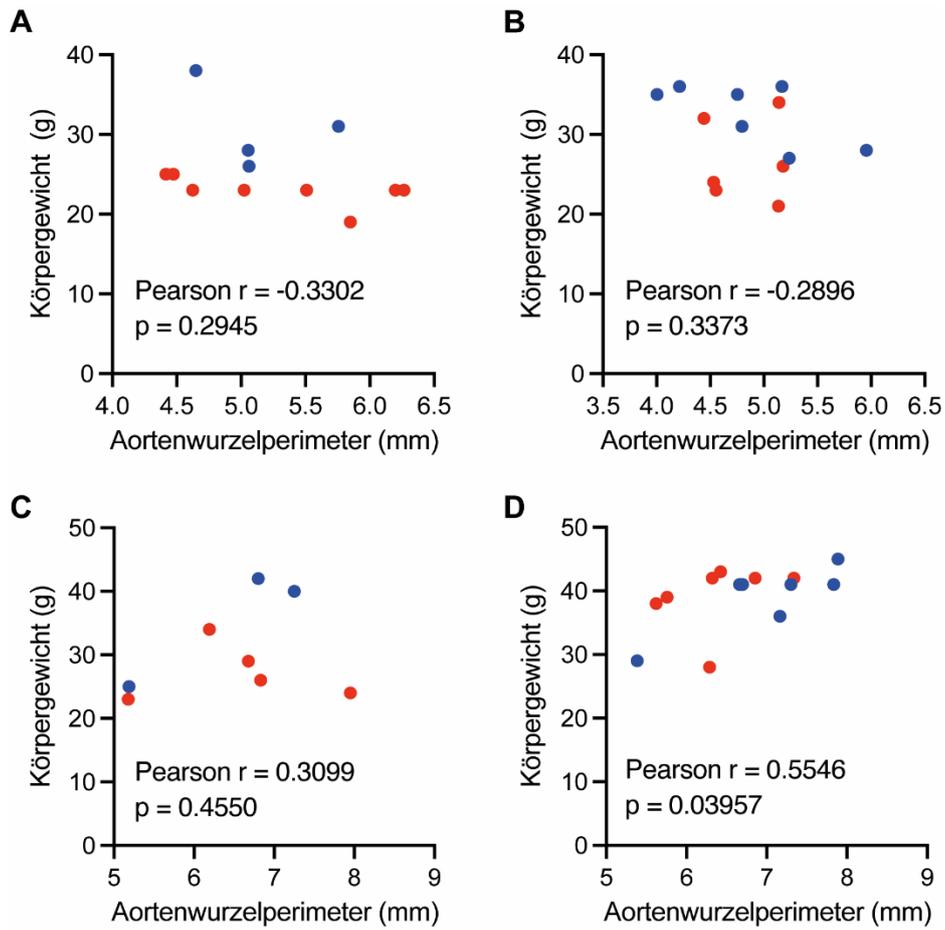


Abbildung 11: Einfluss der ATX Expression in Makrophagen auf die Beziehung zwischen Perimeter der Aortenwurzel und Körpergewicht. (A und B) Korrelation zwischen Aortenwurzelperimeter und Körpergewicht in M-ATX^{+/+} (A) und M-ATX^{-/-} Mäusen (B) nach drei Monaten fettreicher Diät. (C und D) Korrelation zwischen Aortenwurzelperimeter und Körpergewicht in M-ATX^{+/+} (C) und M-ATX^{-/-} Mäusen (D) nach sechs Monaten fettreicher Diät. Rot = weibliche Mäuse; Blau = männliche Mäuse.

3.2.2 Einfluss der ATX Expression in Makrophagen auf die Beziehung zwischen Aortenwurzelfläche und Aortenwurzelperimeter

Ferner wurden die Fläche und das Perimeter der Aortenwurzel korreliert, um einen Hinweis zu erhalten, ob einer der beiden Parameter für die Normalisierung der Plaquelfläche besser geeignet ist. Grundsätzlich gingen wir davon aus, dass beide Größen in einem direkten Zusammenhang stehen und Abweichung von diesem Zusammenhang auf ein technisch bedingtes Artefakt bei der Präparation der Aortenwurzel für die Anfertigung der histologischen Schnitte zurückzuführen sein könnte. Nach drei Monaten fettreicher Diät korrelierte das Aortenwurzelperimeter mit der Aortenwurzelfläche in M-ATX^{+/+} Mäusen (Abbildung 12A), aber nicht in M-ATX^{-/-} Mäusen (Abbildung 12B). Nach sechs Monaten fettreicher Diät stieg das Perimeter mit der Fläche der Aortenwurzel in beiden Gruppen signifikant an, wobei der Zusammenhang in M-ATX^{+/+} Mäusen (Abbildung 12C) etwas deutlicher zu sein scheint als in M-ATX^{-/-} Mäusen (Abbildung 12D).

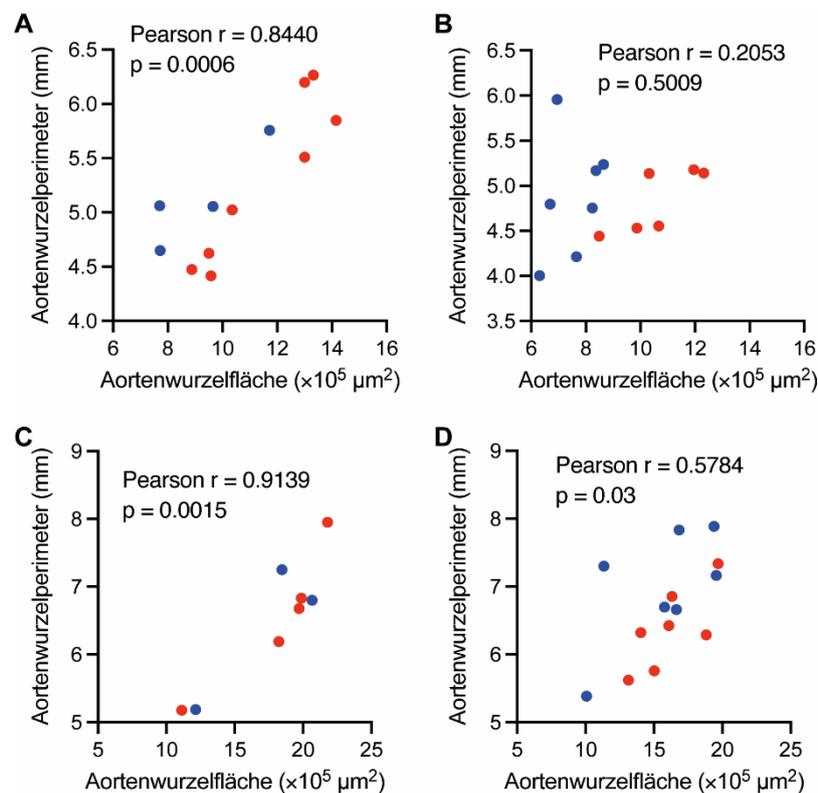


Abbildung 12: Einfluss der ATX Expression in Makrophagen auf den Zusammenhang zwischen Perimeter und Fläche der Aortenwurzelfläche. (A und B) Korrelation zwischen Perimeter und Fläche der Aortenwurzel in M-ATX^{+/+} (A) und M-ATX^{-/-} Mäusen (B) nach drei Monaten fettreicher Diät. (C und D) Korrelation zwischen Perimeter und Fläche der Aortenwurzel in M-ATX^{+/+} (C) und M-ATX^{-/-} Mäusen (D) nach sechs Monaten fettreicher Diät. Rot = weibliche Mäuse; Blau = männliche Mäuse.

3.3 Einfluss der Expression von ATX in Makrophagen auf die Atherosklerose

3.3.1 ATX Expression in Makrophagen beeinflusst die Bildung fortgeschrittener Plaques in der Aortenwurzel

Ein zentrales Ziel dieser Arbeit ist die Rolle der ATX Expression in Makrophagen in der Bildung von atherosklerotischen Plaques zu bestimmen. Deswegen wurde in weiblichen und männlichen M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen, die für drei oder sechs Monate mit einer fettreichen Diät gefüttert worden waren, die Plaqueflächen in histologischen Schnitten der Aortenwurzel ausgewertet. In weiblichen (Abbildung 13A, C) und männlichen (Abbildung 13D) Mäusen zeigte sich, dass nach drei Monaten fettreicher Diät der Knockout von ATX in Makrophagen keinen signifikanten Einfluss auf die mittlere absolute Plaquefläche hat. Nach sechs Monaten war die Plaquefläche sowohl in weiblichen (Abbildung 13B, C) als auch in männlichen Mäusen (Abbildung 13D) größer als nach einer dreimonatigen fettreichen Diät. Erst im fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose, nach einer sechsmonatigen fettreichen Diät, war die Plaquefläche in weiblichen M-ATX^{-/-} Mäusen geringer als in den Mäusen der Kontrollgruppe (Abbildung 13C). In den männlichen Mäusen war zwar durch den ATX Knockout in Makrophagen die Plaquefläche tendenziell ebenfalls geringer als in der Kontrollgruppe, allerdings war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant (Abbildung 13D).

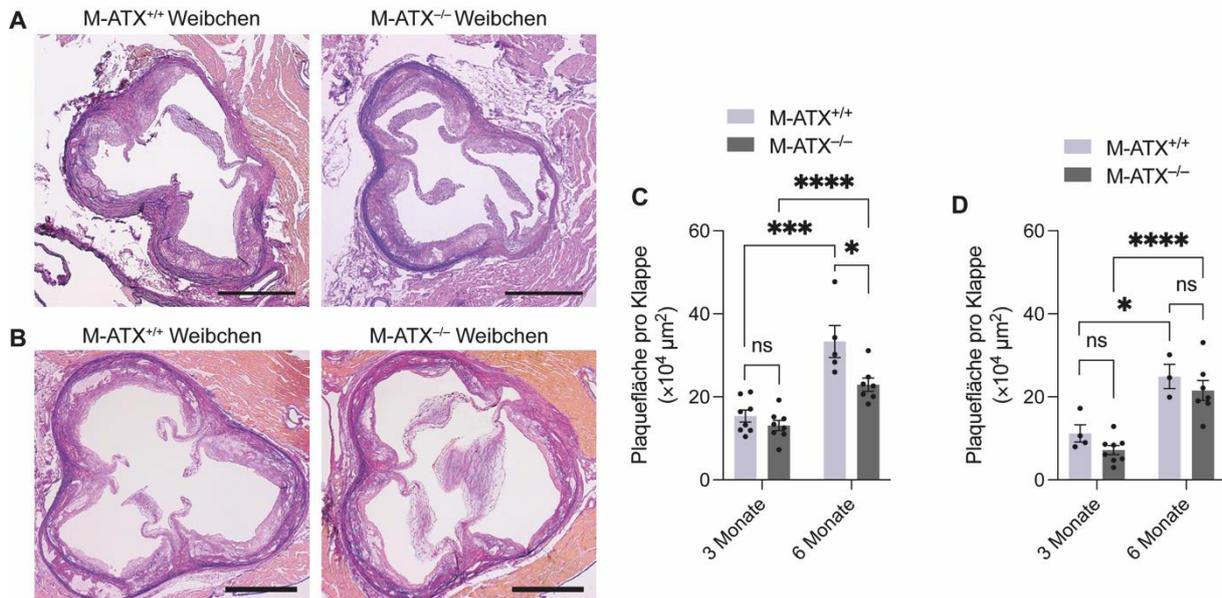


Abbildung 13. Rolle der Expression von ATX in Makrophagen auf die Plaquebildung in der Aortenwurzel. Repräsentative Aufnahmen von EvG gefärbten histologischen Schnitten der Aortenwurzel von weiblichen Mäusen nach einer dreimonatigen (**A**) und sechsmonatigen (**B**) fettreicher Diät. Maßstäbe: 500 μm . Mittlere absolute Plaquefläche in den Aortenwurzel in weiblichen (**C**) und männlichen (**D**) M-ATX^{+/+} Mäusen und M-ATX^{-/-} Mäusen nach drei Monaten und sechs Monaten fettreicher Diät. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$ mittels t -Test.

Eine eindeutige Aussage zur Rolle von ATX in Makrophagen auf die Atherosklerose in männlichen Mäusen ist aber leider nicht abschließend möglich, da die Anzahl der Mäuse in der Kontrollgruppe nicht ausreicht. Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass der Knockout von ATX in Makrophagen in weiblichen Mäusen die Progression der fortgeschrittenen Atherosklerose verringert. Während bei männlichen Mäusen auch nach der dreimonatigen fettreichen Diät eine protektive Rolle des Knockouts von ATX in Makrophagen möglich scheint, war bei weiblichen Mäusen in diesem früheren Stadium der Atherosklerose kein Einfluss von ATX auf die Plaquefläche zu erkennen.

Zusätzlich wurde die Plaquefläche in diesen Mäusen auf die Fläche und den Perimeter der Aortenwurzel normalisiert, um mögliche Artefakte durch die Präparation des Gewebes zu korrigieren. Die Normalisierung auf die Aortenwurzelfläche ergab bei den weiblichen Mäusen weder einen Unterschied in der Plaquefläche zwischen drei- und sechsmonatigen fettreicher Diät noch zwischen M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen (Abbildung 14A). Bei den männlichen Mäusen war nach der Normalisierung auf die Aortenwurzelfläche die Plaqueflächen in M-ATX^{-/-} Mäusen tendenziell vermindert gegenüber den M-ATX^{+/+} Mäusen (Abbildung 14B). Dagegen war aber nur in den männlichen M-ATX^{-/-} Mäusen die Plaquefläche nach der sechsmonatigen fettreichen Diät größer als nach der dreimonatigen fettreichen Diät (Abbildung 14B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Normalisierung auf die Aortenwurzelfläche kein geeignetes Verfahren ist, weil dadurch selbst die eindeutigen Unterscheide zwischen der Plaquegröße nach drei- und sechsmonatiger fettreicher Diät nicht mehr erkennbar waren.

Dagegen ergab die Normalisierung auf den Aortenwurzelperimeter ähnliche Ergebnisse wie die Bestimmung der absoluten Plaquefläche. Die Plaqueflächen normalisiert auf den Aortenwurzelperimeter waren sowohl in weiblichen als auch in männlichen Mäusen nach der sechsmonatigen größer als nach der dreimonatigen fettreichen Diät (Abbildung 14C, D). Ferner war die Plaquefläche bezogen auf den Perimeter in weiblichen M-ATX^{-/-} Mäusen nach der sechsmonatigen fettreichen Diät gegenüber der Kontrollgruppe verringert (Abbildung 14C). In den männlichen Mäusen zeigte sich sowohl nach drei als auch nach sechs Monaten eine tendenziell verringerte Plaquefläche bezogen auf den Perimeter, ohne ein statistisch signifikantes Niveau zu erreichen (Abbildung 14D). Möglicherweise ist dies auf eine zu geringe Zahl an männlichen Mäusen in den Kontrollgruppen zurückzuführen.

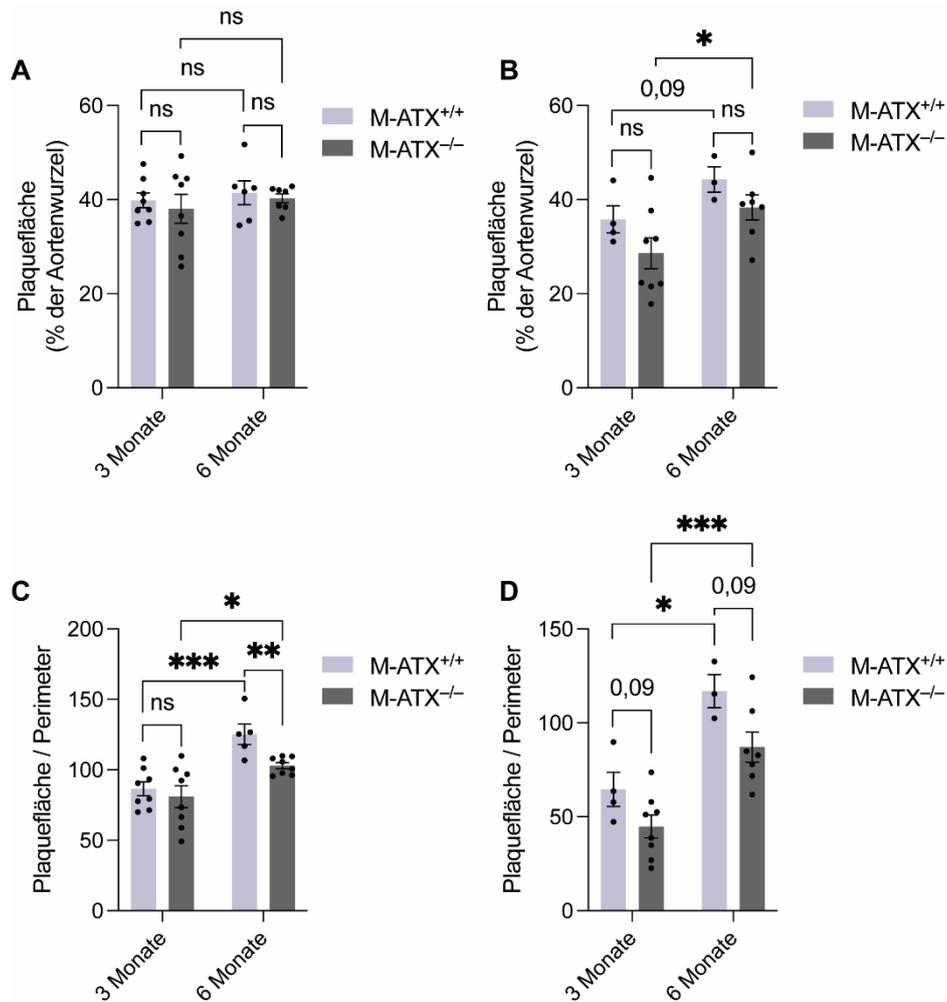


Abbildung 14: Einfluss der Normalisierung der Plaqueflächen in der Aortenwurzel auf die Effekte der ATX Expression in Makrophagen. Plaquefläche bezogen auf die Aortenwurzelfläche in weiblichen (A) und männlichen (B) M-ATX^{+/+} Mäusen und M-ATX^{-/-} Mäusen nach einer dreimonatigen und einer sechsmonatigen fettreichen Diät. Plaqueflächen bezogen auf den Perimeter der Aortenwurzel in weiblichen (C) und männlichen (D) M-ATX^{+/+} Mäusen und M-ATX^{-/-} Mäusen nach einer dreimonatigen und einer sechsmonatigen fettreichen Diät. *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001 mittels *t*-Test.

3.3.2 Einfluss der ATX Expression in Makrophagen auf den Zusammenhang zwischen Plaquesfläche und Körpergewicht

Als nächstes stellte sich die Frage, ob die Expression von ATX in Makrophagen den Zusammenhang zwischen Körpergewicht und Atherosklerose beeinflusst. Diese Fragestellung war relevant, weil bei weiblichen Mäusen der Knockout von ATX in Makrophagen zu einem erhöhten Körpergewicht im Vergleich zu den Mäusen der Kontrollgruppe nach einer sechsmonatigen fettreichen Diät geführt hatte (Abbildung 9A). Während bei den M-ATX^{+/+} Mäusen weder nach drei noch nach sechs Monaten eine Korrelation zwischen dem Körpergewicht und der Plaquesfläche festzustellen war (Abbildung 15A und B), zeigte sich bei den M-ATX^{-/-} Mäusen nach einer dreimonatigen fettreichen Diät eine inverse Korrelation beider Parameter (Abbildung 15A). Nach sechsmonatiger fettreicher Diät bestand bei den M-ATX^{-/-} Mäusen keine Korrelation mehr zwischen Körpergewicht und der Plaquesfläche (Abbildung 15B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch den Knockout von ATX in Makrophagen ein höheres Körpergewicht protektive Effekte auf frühere Stadien der Atherosklerose haben könnte.

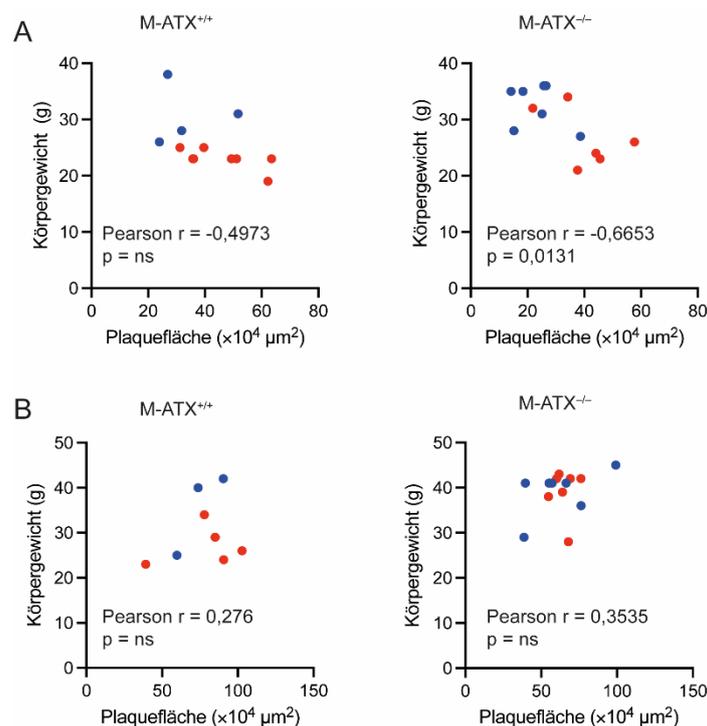


Abbildung 15: Einfluss von ATX Expression in Makrophagen auf das Verhältnis zwischen Körpergewicht und Plaquesfläche. Es wurde die Korrelation zwischen Körpergewicht und der Plaquesfläche in der gesamten Aortenwurzel in männlichen (blau) und weiblichen (rot) M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen nach drei Monaten (A, n=11-13 Mäuse pro Gruppe) und sechs Monaten (B, n=8-13 Mäuse pro Gruppe) einer fettreichen Diät nach Pearson berechnet.

3.3.3 Korrelation zwischen dem Körpergewicht und der Aortenwurzelfläche.

Zusätzlich wurde die Aortenwurzelfläche mit dem Körpergewicht der Mäuse korreliert, um zu beurteilen, ob sich diese beiden Zielgrößen gegenseitig beeinflussen. Die Ergebnisse zeigen, dass bei M-ATX^{+/+} Mäusen weder nach einer dreimonatigen noch nach einer sechsmonatigen fettreichen Diät eine Korrelation zwischen Körpergewicht und Aortenwurzelfläche besteht (Abbildung 16A und B). Im Unterschied fand sich bei den M-ATX^{-/-} Mäusen nach dreimonatiger fettreicher Diät eine negative Korrelation zwischen Körpergewicht und Aortenwurzelfläche, allerdings war der Zusammenhang nicht sehr ausgeprägt und erreichte gerade noch ein statistisch signifikantes Niveau (Abbildung 16A). Nach der dreimonatigen fettreichen Diät bestand dagegen keine Korrelation zwischen beiden Parametern in M-ATX^{-/-} Mäusen mehr (Abbildung 16B).

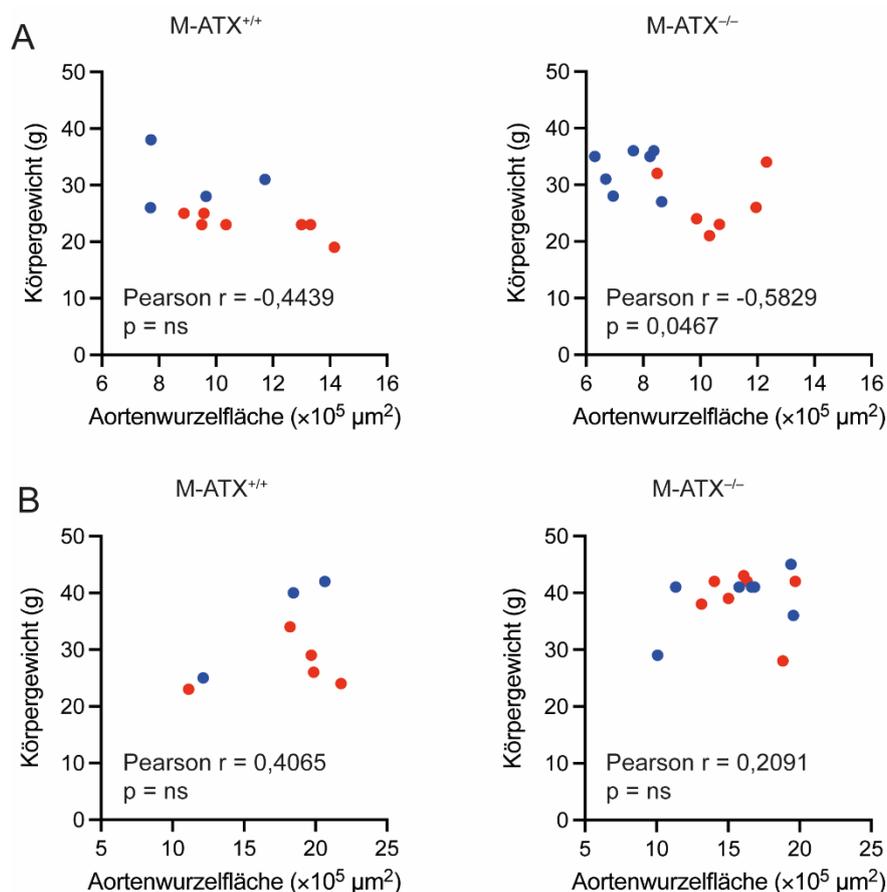


Abbildung 16: Einfluss von ATX Expression in Makrophagen auf das Verhältnis zwischen Körpergewicht und Aortenwurzelfläche. Es wurde die Korrelation zwischen Körpergewicht und der Aortenwurzelfläche in männlichen (blau) und weiblichen (rot) M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen nach drei Monaten (A, n=11-13 Mäuse pro Gruppe) und sechs Monaten (B, n=8-14 Mäuse pro Gruppe) einer fettreichen Diät berechnet.

3.3.4 Einfluss der ATX Expression in Makrophagen auf die Plauefläche in der Aorta
 Neben der Plauebildung in den Aortenwurzeln wurde auch der Einfluss der ATX Expression in Makrophagen auf die Plauefläche in der Aorta nach drei- und sechsmonatiger fettreicher Diät untersucht (Abbildung 17). Dazu wurden die Lipidablagerung in *en face* präparierten Aorten mit Oil-Red-O gefärbt. Die Oil-Red-O⁺ Plauefläche wurde ausgemessen und auf die gesamte Aortenfläche bezogen.

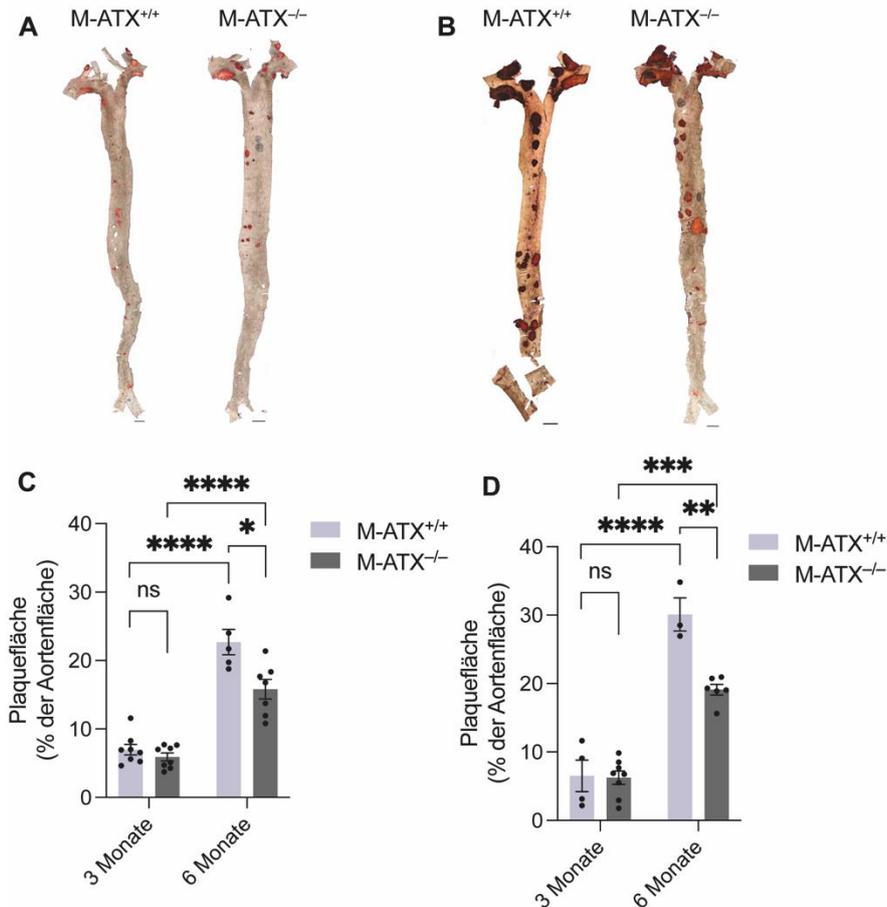


Abbildung 17: Einfluss der ATX Expression in Makrophagen auf die Atherosklerose in der Aorta. Plauefläche gefärbt mit Oil-Red O in der gesamten Aorta einer M-ATX^{+/+} und einer M-ATX^{-/-} Maus nach drei Monaten (A) und nach sechs Monaten (B) der fettreichen Diät. Repräsentative Bilder von mikroskopischen Aufnahmen sind dargestellt. Maßstab: 1 mm. (C) Vergleich der Plaueflächen (in Prozent der Aortenflächen) zwischen weiblichen M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen nach drei- (n=8 Mäuse pro Gruppe) und nach sechsmonatiger Diät (n= 5–7 Mäuse pro Gruppe). (D) Vergleich der Plaueflächen (in Prozent der Aortenflächen) zwischen männlichen M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen nach drei- (n=3–8 Mäuse pro Gruppe) und nach sechsmonatiger Diät (n= 3–7 Mäuse pro Gruppe). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 und ****p<0,0001 mittels *t*-Test. ns = nicht signifikant.

Die Ergebnisse zeigen nach dreimonatiger fettreicher Diät unabhängig vom Geschlecht keinen Unterschied in der Plauefläche zwischen M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen (Abbildung 17A–

D). Nach einer sechsmonatigen fettreichen Diät war die Plauefläche sowohl in weiblichen wie in männlichen M-ATX^{+/+} Mäusen deutlich erhöht im Vergleich zu der dreimonatigen Diät (Abbildung 17A–D). Obwohl die Plauefläche nach sechsmonatiger Diät auch in weiblichen und männlichen M-ATX^{-/-} Mäusen größer war als nach einer dreimonatigen Diät (Abbildung 17), war sie signifikant geringer als in den jeweiligen M-ATX^{+/+} Mäusen (Abbildung 17). Diese Ergebnisse bestätigen bei den weiblichen Mäusen eine protektive Rolle des ATX Knockouts auf die fortgeschrittene Atherosklerose. Ferner weisen die Daten darauf hin, dass auch bei männlichen Mäusen der Knockout von ATX in Makrophagen die Progression der Atherosklerose in der Aorta vermindert.

Ferner wurde der Einfluss der ATX Expression in Makrophagen auf die Atherosklerose in drei verschiedenen Abschnitten der Aorta getrennt untersucht (Abbildung 18). Es zeigte sich, dass unabhängig vom Geschlecht weder im Aortenbogen noch im thorakalen oder abdominalen Teil der Aorta ein Unterschied in der Plauefläche zwischen M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen nach einer dreimonatigen fettreichen Diät bestand (Abbildung 18).

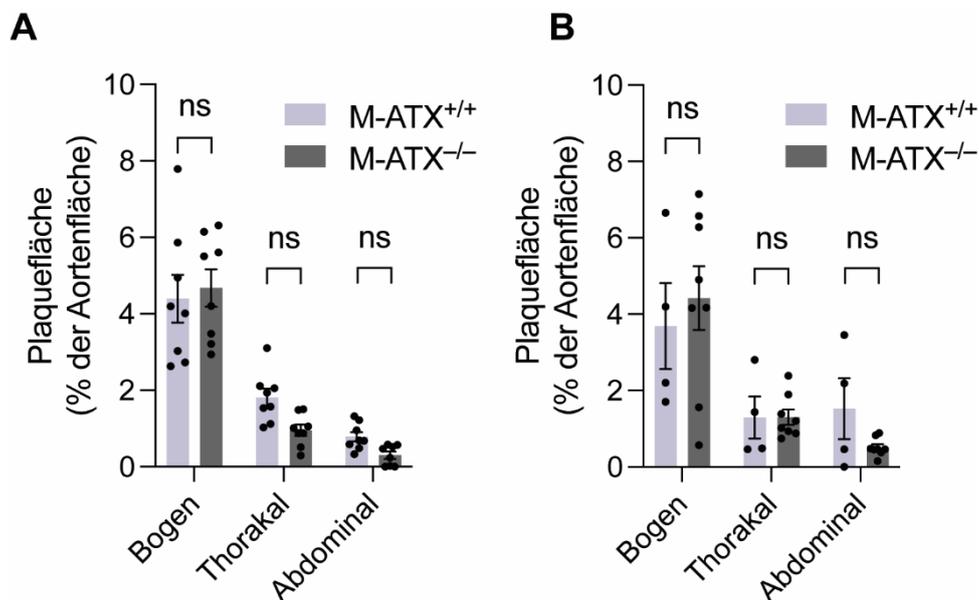


Abbildung 18: Regionale Effekte von ATX in Makrophagen auf die Atherosklerose in der Aorta nach drei Monaten einer fettreichen Diät. (A) Vergleich der Plaueflächen im Aortenbogen, in der thorakalen und in der abdominalen Aorta bezogen auf die gesamte Aortenfläche zwischen weiblichen M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen (n=8 Mäuse pro Gruppe). (B) Vergleich der Plaueflächen im Aortenbogen, in der thorakalen und in der abdominalen Aorta (bezogen auf die gesamte Aortenfläche) zwischen männlichen M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen (n=4–8 Mäuse pro Gruppe). Vergleich zwischen beiden Gruppen mittels *t*-Test. ns=nicht signifikant.

Im Unterschied zu der dreimonatigen Diät, zeigte sich nach der sechsmonatigen Diät im Vergleich zu den M-ATX^{+/+} Mäusen eine verminderte Plaquebildung im Aortenbogen sowohl in weiblichen (Abbildung 19A) als auch in männlichen M-ATX^{-/-} Mäusen (Abbildung 19B). Im Unterschied zu den weiblichen M-ATX^{-/-} Mäusen war nach der sechsmonatigen Diät die Plaquefläche in den männlichen M-ATX^{-/-} Mäusen auch in der abdominalen Aorta geringer als in den M-ATX^{+/+} Mäusen (Abbildung 19B). In der thorakalen Aorta war dagegen weder in weiblichen noch in männlichen Mäusen ein Effekt des ATX Knockouts auf die Atherosklerose festzustellen (Abbildung 19A und B).

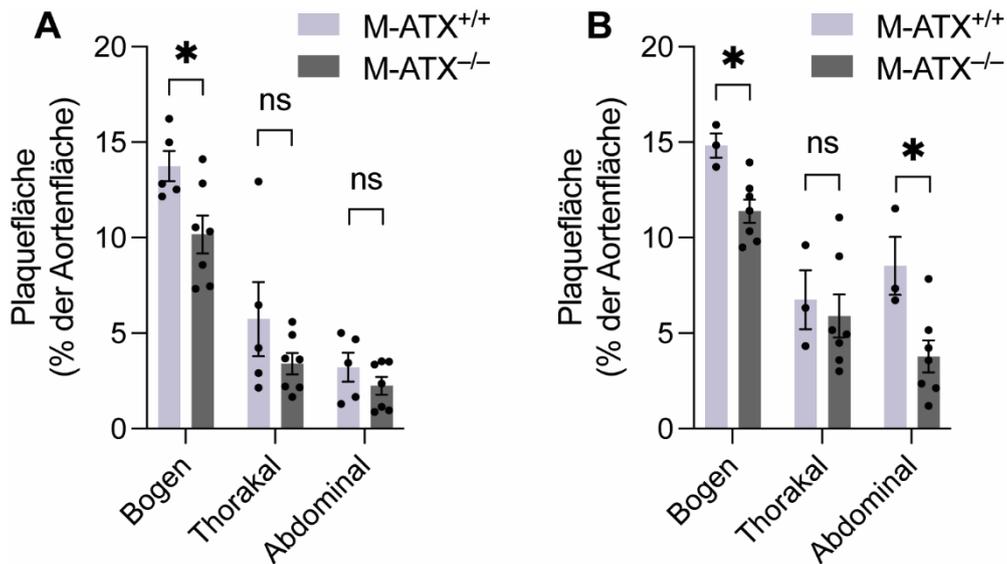


Abbildung 19: Regionale Effekte von ATX in Makrophagen auf die aortale Atherosklerose nach sechs Monaten fettreicher Diät. (A) Vergleich der Plaqueflächen im Aortenbogen, in der thorakalen und in der abdominalen Aorta (bezogen auf die gesamte Aortenfläche) zwischen weiblichen M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen (n=5–7 Mäuse pro Gruppe). **(B)** Vergleich der Plaqueflächen im Aortenbogen, in der thorakalen und in der abdominalen Aorta (bezogen auf die gesamte Aortenfläche) zwischen männlichen M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen (n=3–7 Mäuse pro Gruppe). Vergleich zwischen beiden Gruppen mittels t-test. *p<0,05 mittels t-Test. ns=nicht signifikant.

3.4 Einfluss der Expression von ATX in Makrophagen auf die Plaquezusammensetzung

Nachdem die Wirkung von M-ATX auf die Atherosklerose analysiert wurde, stellte sich die Frage, ob die beobachteten Unterschiede auf Veränderungen des nekrotischen Kerns oder der zellulären Zusammensetzung der Plaques zurückzuführen sind.

3.4.1 Rolle der ATX Expression in Makrophagen auf den nekrotischen Kern

Von besonderem Interesse war die Analyse der Bildung des nekrotischen Kerns in der atherosklerotischen Plaque, da die Größe des nekrotischen Kerns die Plaquestabilität, und damit das Risiko für Plaqueruptur, Atherothrombose, Herzinfarkt oder Schlaganfall beeinflusst^{12,36,40}. Um den Effekt der ATX Expression in Makrophagen auf die Bildung des nekrotischen Kerns zu bestimmen, wurde die Fläche der azellulären Areale und der Cholesterinkristalllücken in den Plaques der Aortenwurzel nach drei und sechs Monaten fettreicher Diät untersucht (Abbildung 20A, B).

Nach einer dreimonatigen fettreichen Diät zeigte in beiden Geschlechtern weder die prozentuale Auswertung des Flächenanteils des nekrotischen Kerns an der Plaque noch die absolute Quantifizierung des nekrotischen Kernfläche einen Unterschied zwischen den M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen (Abbildung 20A, C, D). Nach der sechsmonatigen fettreichen Diät war der relative Anteil der nekrotischen Kernfläche an der Plaquefläche sowohl in weiblichen als auch in männlichen M-ATX^{+/+} Mäusen signifikant erhöht im Vergleich zu der dreimonatigen Diät (Abbildung 20A–D). Auch die absolute Fläche des nekrotischen Kerns war nach der sechsmonatigen gegenüber der dreimonatigen fettreichen Diät deutlich vergrößert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass einerseits die Progression der Atherosklerose durch die Vergrößerung des nekrotischen Kerns bestimmt ist und andererseits die Fläche des nekrotischen Kerns einen größeren Anteil an der Plaquefläche einnimmt.

Der Knockout von ATX in Makrophagen verringerte bei den weiblichen Mäusen tendenziell den relativen Anteil des nekrotischen Kerns nach sechsmonatiger fettreicher Diät ohne allerdings ein statistisch signifikantes Niveau zu erreichen (Abbildung 20 C). Dagegen war die absolute Fläche des nekrotischen Kerns nach sechsmonatiger Diät in den weiblichen M-ATX^{-/-} Mäusen vermindert im Vergleich zu den M-ATX^{+/+} Mäusen (Abbildung 20E). In den männlichen Mäusen reduzierte der Knockout von ATX in Makrophagen nach sechsmonatiger Diät sowohl die relative als auch die absolute Fläche des nekrotischen Kerns (Abbildung 20D, F). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die ATX Expression in Makrophagen die Bildung eines nekrotischen Kerns im fortgeschrittenen Atherosklerosestadium verstärkt.

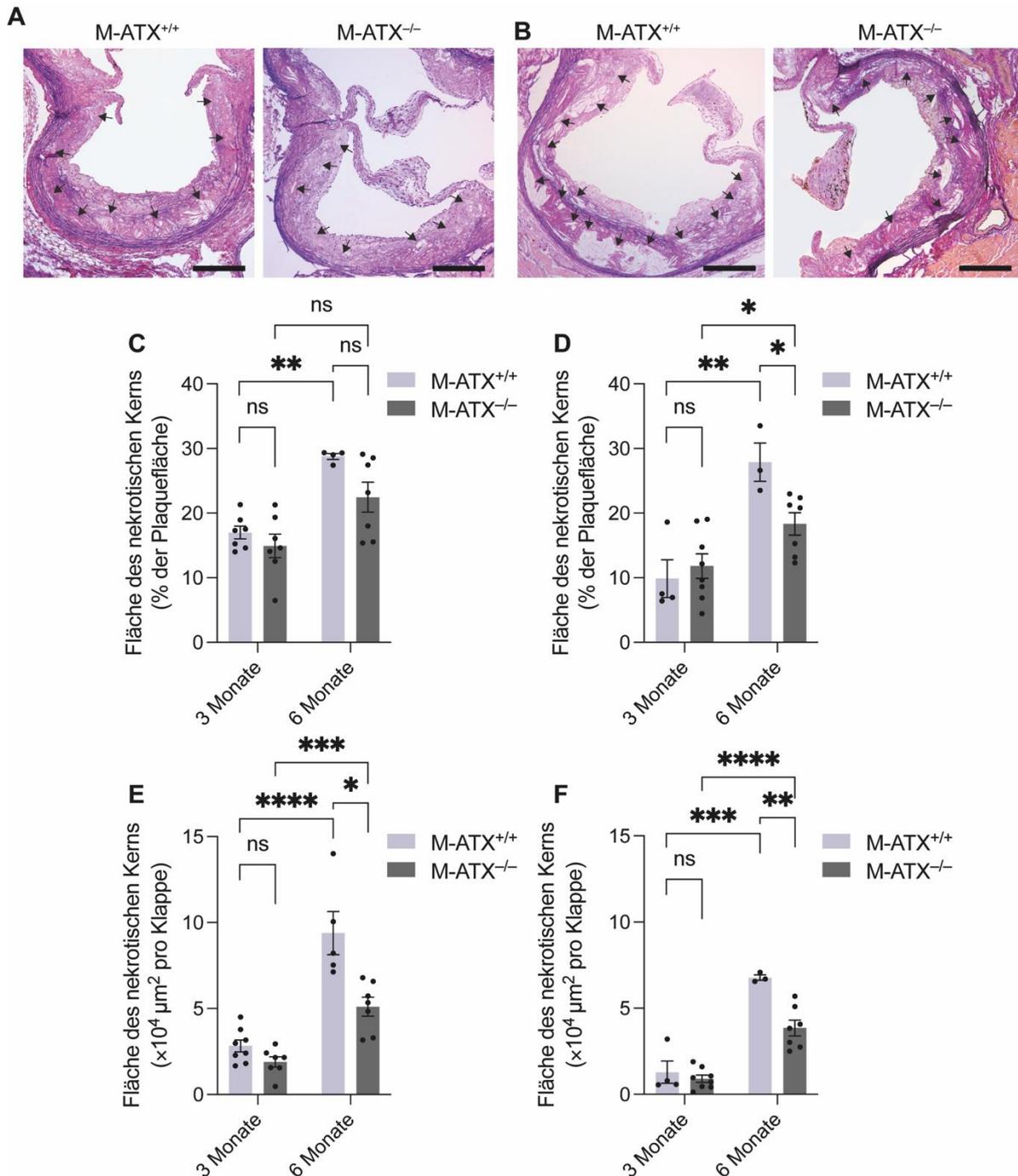


Abbildung 20: Einfluss der ATX Expression in Makrophagen auf die Bildung des nekrotischen Kerns. (A) Repräsentative Bilder von EvG-gefärbten histologischen Schnitten der Aortenwurzeln von Mäusen nach einer drei- (A) und sechsmonatigen (B) fettreichen Diät. Die Pfeile zeigen den nekrotischen Kern. Maßstab: 200 μm . (C und D) Fläche des nekrotischen Kerns in Prozent der Plaquerfläche im Sinus aortae in weiblichen (C, n=4–8 Mäuse pro Gruppe) und männlichen (D, n=3–8 Mäuse pro Gruppe) M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen nach drei und sechs Monaten fettreicher Diät. (E und F) Absolute Fläche des nekrotischen Kerns in weiblichen (E, n=5–8 Mäuse pro Gruppe) und männlichen (F, n=3–7 Mäuse pro Gruppe) M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen nach der und sechs Monaten fettreicher Diät. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 und ****p<0,0001 mittels t-Test. ns=nicht signifikant.

3.4.2 Auswirkung der ATX Expression in Makrophagen auf die Zellzahl in der Plaque
Zusätzlich wurde die Analyse der Zellzahl durchgeführt, um den Einfluss der ATX Expression in Makrophagen auf die zellulären Bestandteile der Plaque zu beurteilen. Es wurde sowohl die absolute Zellzahl in der gesamten Plaquefläche der Aortenwurzel als auch die relative Zellzahl bezogen auf die Plaquefläche mittels Färbung der Zellkerne mit DAPI nach drei und sechs Monaten fettreicher Diät ausgewertet.

Weder in den weiblichen noch in den männlichen Mäusen zeigte sich nach der dreimonatigen fettreichen Diät ein Unterschied in der absoluten oder relativen Zellzahl zwischen M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen (Abbildung 21A–D). Während die absolute Zellzahl in den weiblichen und männlichen M-ATX^{+/+} Mäusen nach sechsmonatiger Diät unverändert im Vergleich zur dreimonatigen Diät blieb, war die relative Zellzahl in beiden Geschlechtern nach sechsmonatiger Diät deutlich geringer als nach der dreimonatigen Diät (Abbildung 21). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Vergrößerung der Plaquefläche zwischen drei und sechs Monaten fettreicher Diät im Wesentlichen auf nichtzelluläre Bestandteile, wie den nekrotischen Kern, zurückzuführen ist.

Der Knockout von ATX in Makrophagen führte in den weiblichen Mäusen zu einem Anstieg der absoluten und relativen Zellzahl in den Plaques nach sechs Monaten fettreicher Diät (Abbildung 21A, B). In männlichen M-ATX^{-/-} Mäusen war die relative Zellzahl in den Plaques nach der sechsmonatigen fettreichen Diät höher als in den M-ATX^{+/+} Mäusen (Abbildung 21D). Die absolute Zellzahl in den Plaques der männlichen M-ATX^{-/-} Mäusen war nach der sechsmonatigen Diät nur tendenziell größer als in den M-ATX^{+/+} Mäusen, möglicherweise konnte aufgrund der geringen Gruppengröße kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dafür, dass der Knockout von ATX in Makrophagen die Atherosklerose nach sechsmonatiger fettreicher Diät nicht nur durch die Ausdehnung des nekrotischen Kerns, sondern auch durch eine Erhöhung der Zellzahl vermindert.

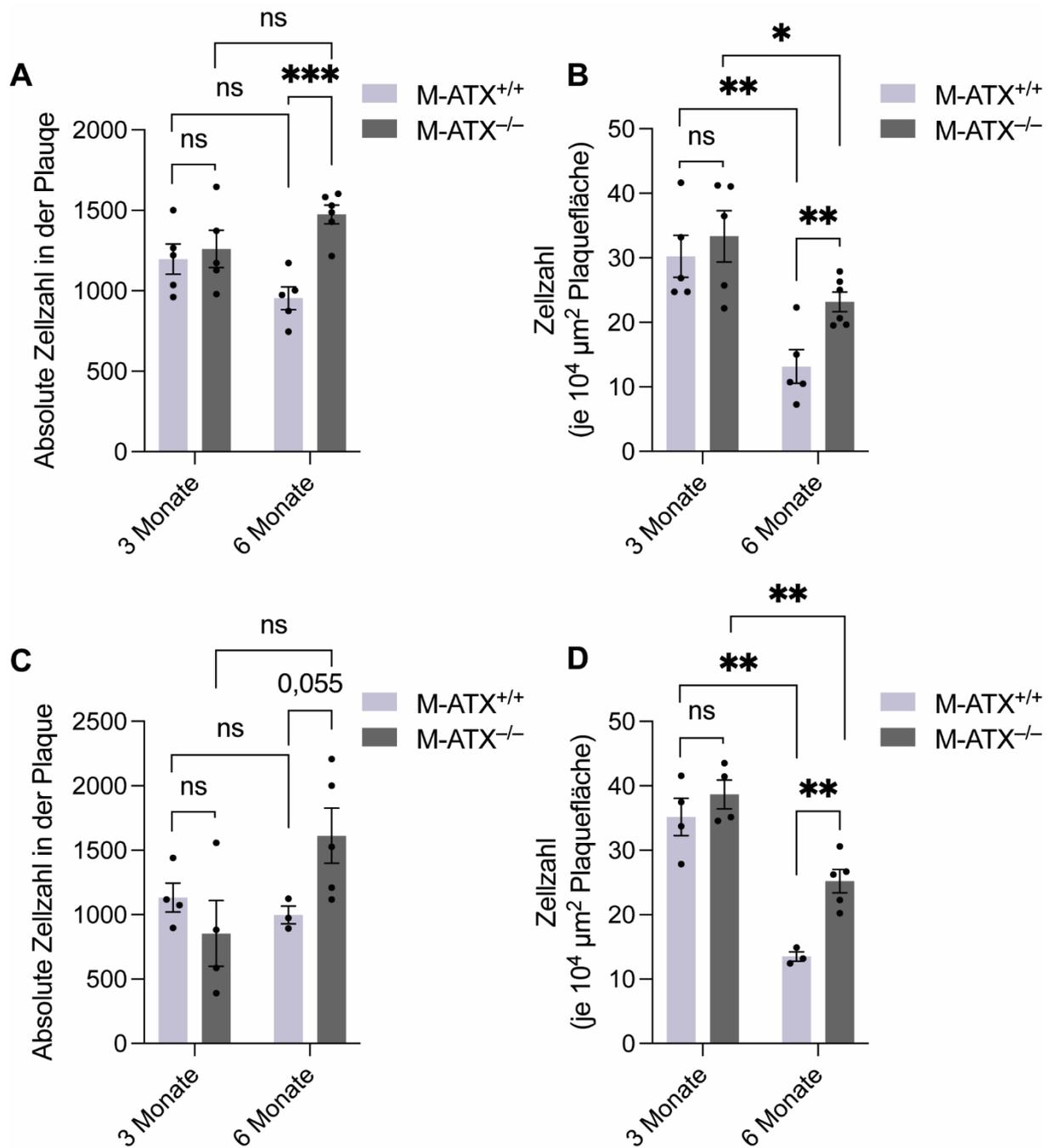


Abbildung 21: Einfluss der ATX Expression in Makrophagen auf die Zellzahl in den Plaques. Absolute (A und C) und relative Zellzahl (B und D) in den Plaques von weiblichen (A und B) und männlichen (C und D) M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen nach einer drei- oder sechsmonatigen fettreichen Diät. *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001 mittels t-Test. ns=nicht signifikant.

3.4.3 Einfluss der ATX Expression in Makrophagen auf die Makrophagenakkumulation in den Plaques

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob der Knockout von ATX in Makrophagen zu einer Änderung der Makrophagen in den Plaques führt. Es wurde sowohl die absolute Zahl der Makrophage in der gesamten Plaquesfläche der Aortenwurzel als auch die relative Zahl der Makrophagen bezogen auf eine Plaquesfläche mittels Immunfluoreszenzfärbung des Makrophagenantigens Mac2 durchgeführt.

Nach dreimonatiger fettreicher Diät waren die absolute und die relative Makrophagenzahl in den Plaques zwischen den weiblichen M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen nicht signifikant voneinander verschieden (Abbildung 22A-D). Nach der sechsmonatigen Diät war sowohl die absolute (Abbildung 22C) als auch die relative Makrophagenzahl (Abbildung 22D) in den weiblichen M-ATX^{-/-} Mäusen höher als in den weiblichen M-ATX^{+/+} Mäusen. Im Vergleich zur dreimonatigen Diät war nach sechs Monaten die relative Makrophagenzahl in den Plaques in den weiblichen M-ATX^{+/+} Mäusen vermindert (Abbildung 22D), während die absolute Makrophagenzahl unverändert war (Abbildung 22C). Dagegen war bei den weiblichen M-ATX^{-/-} Mäusen weder bei der absoluten (Abbildung 22C) noch bei der relativen Makrophagenzahl (Abbildung 22D) ein Unterschied zwischen der drei- und sechsmonatigen Diät zu beobachten.

Bei den männlichen M-ATX^{-/-} Mäusen war zwar nach der dreimonatigen Diät auch kein Unterschied in der absoluten Makrophagenzahl im Vergleich zu den M-ATX^{+/+} Mäusen festzustellen (Abbildung 22E), dafür war aber die relative Makrophagenzahl zu diesem Zeitpunkt in den männlichen M-ATX^{-/-} Mäusen höher als in den männlichen M-ATX^{+/+} Mäusen (Abbildung 22F). Nach der sechsmonatigen fettreichen Diät zeigte sich bei den männlichen M-ATX^{-/-} Mäusen nur ein nicht-signifikanter Trend zu einer höheren absoluten (Abbildung 22E) und relativen Makrophagenzahl (Abbildung 22F) im Vergleich zur den M-ATX^{+/+} Mäusen. Im Vergleich zur dreimonatigen fettreichen Diät war nach sechs Monaten die absolute Makrophagenzahl in den männlichen M-ATX^{+/+} Mäusen erhöht (Abbildung 22E), während sich bei der relativen Makrophagenzahl kein Unterschied zwischen den beiden Zeitpunkten zeigte (Abbildung 22F). Dagegen verringerte sich in den männlichen M-ATX^{+/+} Mäusen die relative Makrophagenzahl zwischen drei und sechs Monaten Diät (Abbildung 22F). Die absolute Makrophagenzahl zwischen drei und sechs Monaten Diät (Abbildung 22E). Die absolute Makrophagenzahl in den männlichen M-ATX^{+/+} Mäusen war dagegen nicht statistisch signifikant verschieden zwischen den beiden Zeitpunkten (Abbildung 22E). Aufgrund der geringeren Gruppengröße der männlichen M-ATX^{+/+} Mäusen ist jedoch die Aussagekraft dieser Ergebnisse begrenzt.

Zusammenfassend lassen diese Befunde darauf schließen, dass die ATX Expression in Makrophagen die Makrophageninfiltration und damit auch insgesamt die Zelldichte in den Plaques in der fortgeschrittenen Atherosklerose reduziert.

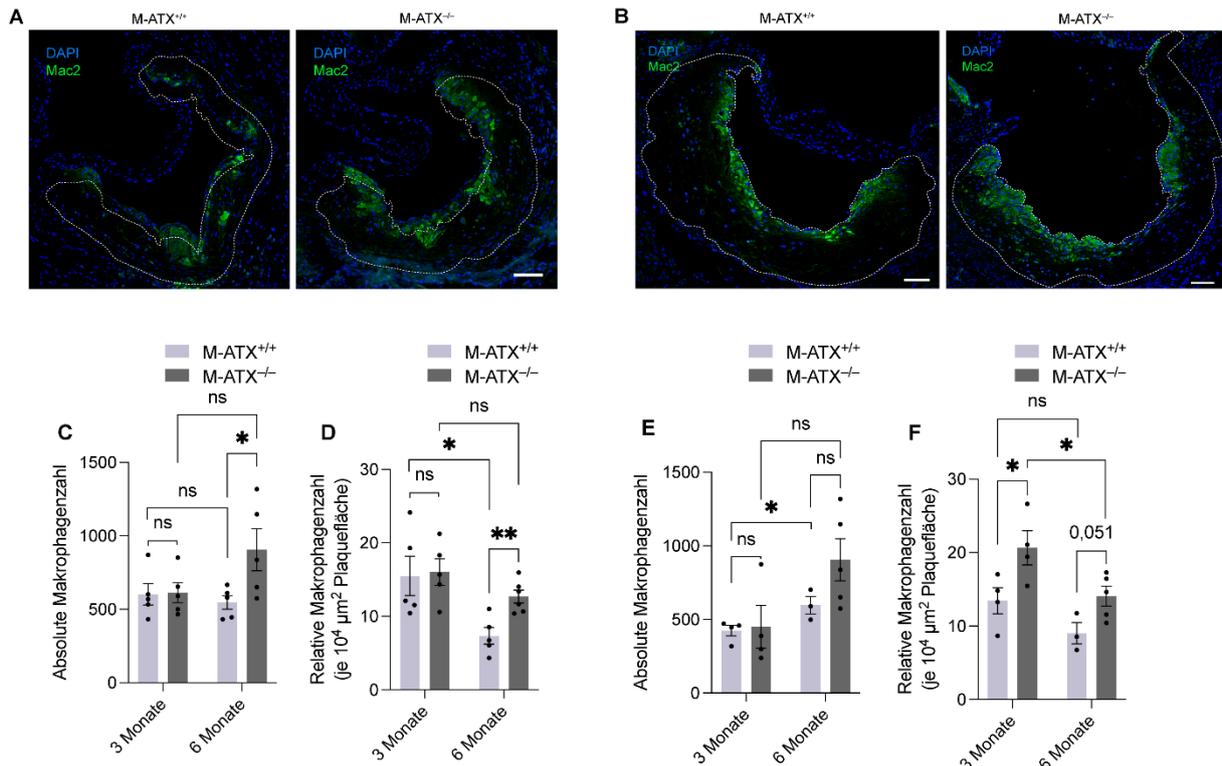


Abbildung 22: Einfluss der ATX Expression in Makrophagen auf die Makrophagenakkumulation in Plaques. (A, B) Repräsentative Aufnahmen von Mac2-Immunfluoreszenzfärbungen zur Detektion von Makrophagen in den Plaques (weiße Umrandung) von M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen nach drei (A) und sechs Monaten (B) fettreicher Diät. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Maßstab: 120 µm. (C und D) Absolute Zahl der Makrophagen in den Plaques der Aortenwurzel (C und E) und relative Makrophagenanzahl pro Plauefläche (D und F) in weiblichen (C und D) und männlichen (E und F) M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen. *p<0,05 und **p<0,01 mittels t-Test.

3.5 Einfluss der ATX Expression in Makrophagen auf Apoptose und Efferozytose in atherosklerotischen Plaques

Es wurde als nächstes die Wirkung der ATX Expression in Makrophagen auf die Apoptose in der atherosklerotischen Plaue untersucht, um zu beurteilen, ob ATX dadurch zu einem kleineren nekrotischen Kern führt. Dazu wurden histologische Schnitte der Aortenwurzeln von M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen nach drei und sechs Monaten fettreicher Diät mit einer Kombination aus Mac2-Immunfluoreszenz und TUNEL-Assay gefärbt.

3.5.1 Effekt von ATX auf die Apoptose von Plaquemakrophagen

Um den Einfluss der ATX Expression in Plaquemakrophagen auf deren Apoptose zu untersuchen, wurde in M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen die Zahl der Makrophagen mit einem

TUNEL-positivem Nukleus (DAPI+Mac2+TUNEL+) im Verhältnis zur Gesamtzahl an Makrophagen (DAPI+Mac2+) in den Plaques bestimmt.

Weder nach drei noch nach sechs Monaten fettreicher Diät konnte ein signifikanter Unterschied in der Apoptose von Plaquemakrophagen zwischen weiblichen M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen beobachtet werden (Abbildung 23A–C). Ebenso war bei den männlichen M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen weder nach drei noch nach sechs Monaten ein Unterschied in der Apoptose der Plaquemakrophagen festzustellen (Abbildung 23D). Zusammengefasst ergeben diese Daten keinen Hinweis auf eine Rolle von ATX in der Apoptose von Makrophagen in der Plaque.

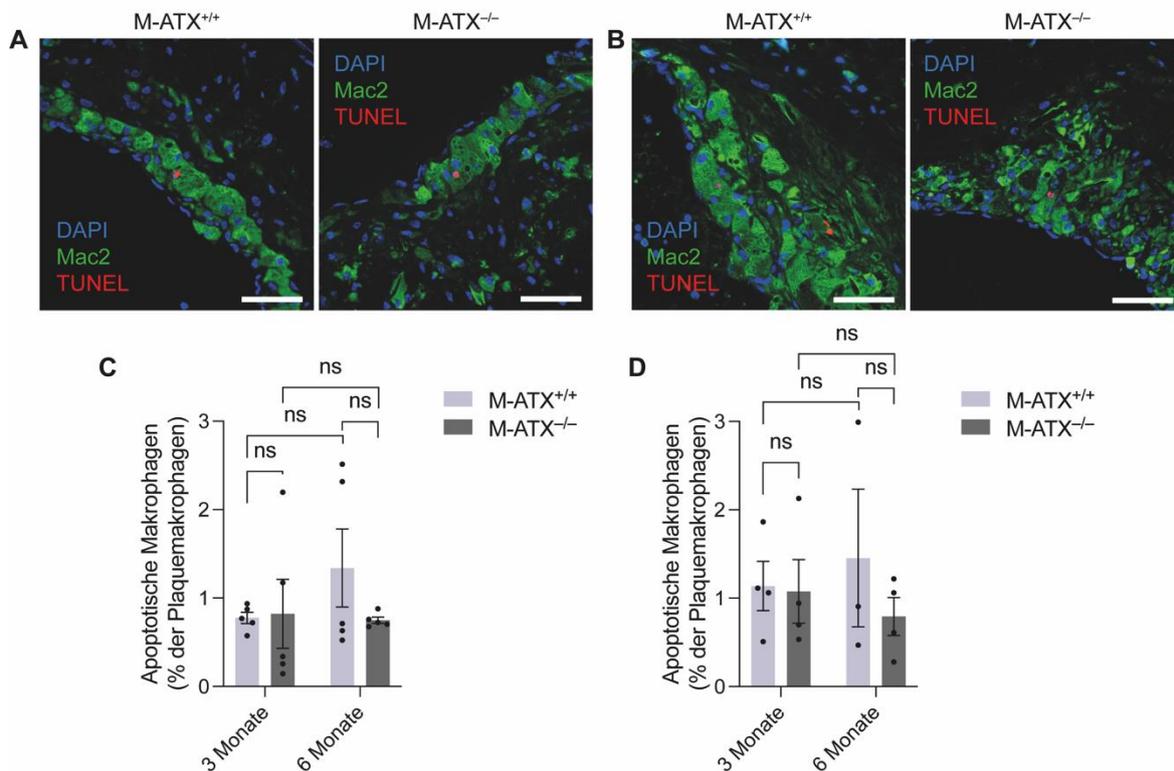


Abbildung 23: Einfluss von ATX in Makrophagen auf deren Apoptose in atherosklerotischen Plaques. (A und B) Repräsentative Aufnahmen der kombinierten Färbung der Mac2-Immunfluoreszenz und dem TUNEL Assay in Plaques von M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen nach drei (A) und nach sechs Monaten (B) fettreicher Diät. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Maßstab: 70 µm. (C und D) Vergleich der Apoptose von Makrophagen in der Plaque zwischen den weiblichen (C, n=5) und männlichen (D, n=3–4) M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen. Ausgewertet wurde die Zahl der Makrophagen mit einem TUNEL-positiven Nukleus (DAPI+Mac2+TUNEL+) als Prozent der Gesamtzahl an Makrophagen (Mac2+DAPI+). ns= nicht signifikant mittels *t*-Test.

3.5.2 Effekt der ATX Expression in Makrophagen auf die Efferozytose in Plaques

Um die Efferozytose zu beurteilen, wurden phagozytierte apoptotische Zellen, gekennzeichnet durch eine TUNEL-Färbung im Makrophagenzytoplasma (DAPI-Mac2⁺TUNEL⁺), ausgewertet und in Prozent der Plaquemakrophagen (DAPI⁺Mac2⁺) ausgedrückt (Abbildung 24A und B).

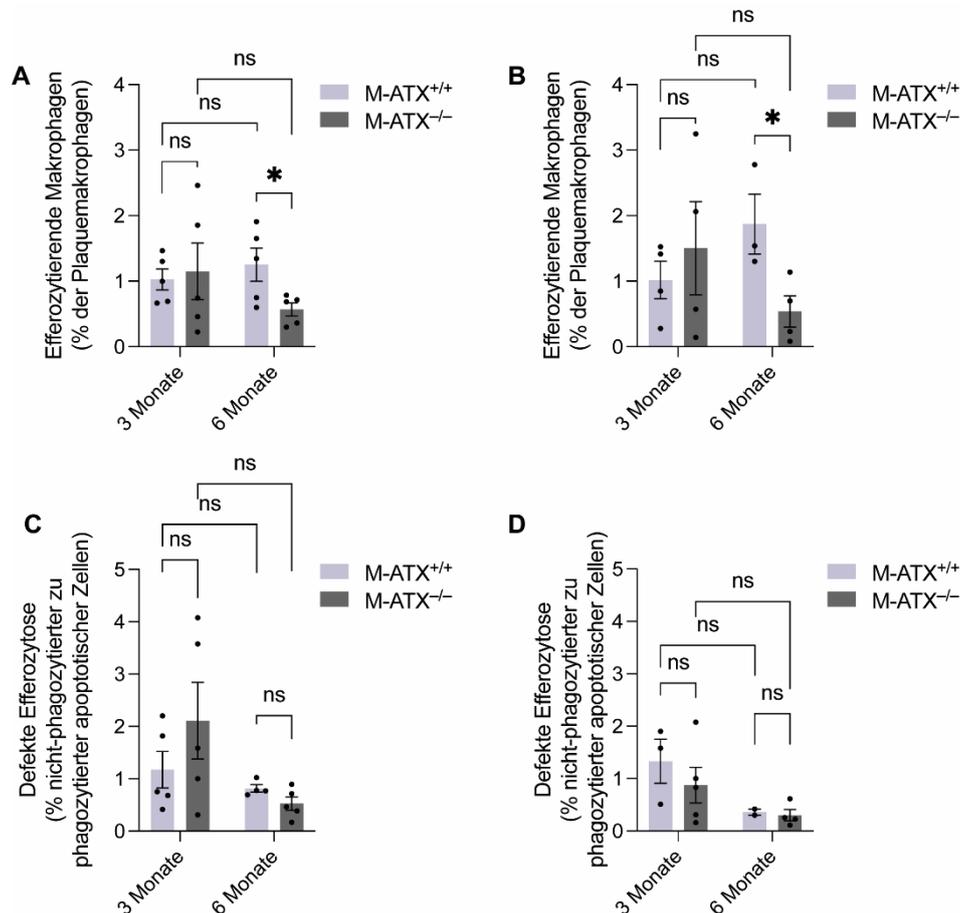


Abbildung 24: Auswirkung der ATX Expression in Makrophagen auf die Efferozytose. (A und B) Efferozytose in Plaques weiblicher (A, n=5) und männlicher (B, n=3–4) M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäuse. Ausgewertet wurden TUNEL⁺ Zellen im Makrophagenzytoplasma (DAPI-Mac2⁺TUNEL⁺) in Prozent der gesamten Makrophagenzahl in der Plaque (DAPI⁺Mac2⁺). (C und D) Defekte Efferozytose in weiblichen (C, n=4–5) und männlichen (D, n=2–5) M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen. Ausgewertet wurde das Verhältnis von nicht-phagozytierten apoptotischen Zellen, gekennzeichnet durch einen TUNEL⁺ Nukleus außerhalb von Makrophagen (DAPI⁺Mac2⁻TUNEL⁺), zu phagozytierten apoptotischen Zellen (DAPI-Mac2⁺TUNEL⁺). *p<0,05 mittels t-Test.

Weder zwischen weiblichen (Abbildung 24A) noch männlichen M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen (Abbildung 24B) konnte nach drei Monaten fettreicher Diät ein Unterschied im Anteil der efferozytierenden Makrophagen beobachtet werden. Nach sechs Monaten fettreicher Diät zeigte sich dann sowohl bei den weiblichen (Abbildung 24A) als auch den männlichen M-ATX^{-/-}

⁻ Mäusen (Abbildung 24B) ein geringerer Anteil an efferozytierenden Makrophagen in den Plaques im Vergleich zu den M-ATX^{+/+} Mäusen. Im Vergleich zwischen drei- und sechsmonatiger Diät wurde kein Unterschied im Anteil der efferozytierenden Makrophagen weder bei weiblichen (Abbildung 24A) noch bei männlichen M-ATX^{+/+} und M-ATX^{-/-} Mäusen (Abbildung 24B) festgestellt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Knockout von ATX in Makrophagen zu einer geringeren Efferozytose führt.

Zweitens wurde das Ausmaß der defekten Efferozytose untersucht, indem die nicht-phagozytierten apoptotischen Zellen, definiert als Zellen mit einer TUNEL-Färbung im Zellkern ohne von einer Mac2-Färbung umgeben zu sein (DAPI⁺Mac2⁻TUNEL⁺), im Verhältnis zu den phagozytierten apoptotischen Zellen ausgewertet wurden (Abbildung 24C und D). Eine Erhöhung dieses Verhältnisses könnte somit für eine defekte Efferozytose sprechen. Allerdings war weder nach drei- noch nach sechsmonatiger fettreicher Diät ein Unterschied des Verhältnisses von nicht-phagozytierten apoptotischen Zellen und phagozytierten apoptotischen Zellen zwischen weiblichen (Abbildung 24C) oder männlichen Mäusen (Abbildung 24D) durch den Knockout von ATX in Makrophagen festzustellen. Dies könnte möglicherweise auch damit zusammenhängen, dass der Parameter die defekte Efferozytose in Plaques nicht genau darstellt.

4 Diskussion

Die bisherigen publizierten Ergebnisse lassen vermuten, dass ATX eine Rolle in der Atherosklerose spielt^{10,11}. Durch die Wirkung von ATX als Lysophospholipase D wird LPC in LPA und Cholin gespalten^{2,8}. LPA wirkt proatherogen, da sie Endothelzellen aktiviert, die durch Freisetzung von Chemokinen die Adhäsion von Monozyten an der Gefäßwand sowie die subendotheliale Infiltration der Monozyten steigern^{10,11}. ATX wird nicht nur in Endothelzellen exprimiert, sondern auch in den Makrophagen. Hier wurde erstens die Wirkung von ATX in Makrophagen auf das Körpergewicht der Mäuse und zweitens der Einfluss von ATX in Makrophagen auf die atherosklerotische Plaquebildung diskutiert. Drittens wurde die Rolle von ATX in Makrophagen bei der Bildung des nekrotischen Kerns erörtert. Viertens wurde der Einfluss von ATX in Makrophagen auf die Makrophagenrekrutierung in die Plaque und am Ende dieser Arbeit die Rolle vom M-ATX auf die Apoptose- und die Efferozytoserate in der Plaque diskutiert. Bei allen Abschnitten dieser Diskussion wurden auch die möglichen geschlechtsspezifischen Einflüsse auf die Ergebnisse erläutert.

4.1 Einfluss der ATX Expression in Makrophagen auf das Körpergewicht

Aus der Literatur ist bekannt, dass ATX eine Rolle bei Adipositas spielt^{33,69} und Adipozyten bei einer Adipositas vermehrt ATX sezernieren³³. Die erste Publikation zur Rolle von ATX auf das Körpergewicht und Adipositas zeigte, dass ein Knockout in Adipozyten nach einer 13 Wochen fettreichen Diät nur bei weiblichen Mäusen tendenziell zu einem erhöhten Körpergewicht führt⁷⁰. Bei beiden Geschlechtern war in dieser Studie der adipozyten-spezifische ATX Knockout mit einer Vermehrung des Fettgewebes verbunden, möglicherweise aufgrund einer Hypertrophie der Adipozyten⁷⁰. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung, dass der Knockout in Makrophagen in weiblichen Mäusen nach sechsmonatiger fettreicher Diät zu einem erhöhten Körpergewicht führt, sind vereinbar mit diesen Befunden. Eine durch inflammatorische Makrophagen hervorgerufene Entzündung des Fettgewebes trägt entscheidend zu Übergewicht und Adipositas bei⁷¹. Es wäre möglich, dass die ATX Sekretion von Makrophagen im Fettgewebe von weiblichen Mäusen die Polarisierung der Makrophagen zu einem anti-inflammatorischen Phänotyp und damit das Fettgewebe und das Körpergewicht reduziert. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass eine fettreiche Diät zu geschlechtsspezifischen Unterschieden im migratorischen Verhalten von Makrophagen führt⁷².

Dagegen gibt es aber auch Daten, dass männliche ATX heterozygote Mäuse nach einer 12-wöchigen fett- und kohlenhydratreichen Diät ein geringeres Körpergewicht aufweisen⁷³. Ferner führte in einer weiteren Arbeit sowohl ein ubiquitärer postnataler als auch

ein adipozyten-spezifischer Knockout von ATX in männlichen Mäusen nach einer 20-wöchigen fettreichen Diät zu keiner Änderung des Körpergewichts oder der Fettgewebsmenge⁷⁴.

4.2 Die ATX Expression in Makrophagen fördert die Progression der Atherosklerose

Es ist bekannt, dass die pharmakologische Blockade der LPA Rezeptoren LPAR1 und LPAR3 durch Ki16425 nach einer 12-wöchigen oder 8-wöchigen fettreichen Diät die Atherosklerose in *ApoE*^{-/-} bzw. *Ldlr*^{-/-} Mäusen reduziert^{11,75}. Auch der LPAR4 Rezeptor verstärkt die Atherosklerose, da in Mäusen die heterozygot sind für den LPAR4 die Plauefläche um 25% reduziert ist⁷⁶. Diese Befunde weisen darauf hin, dass LPA eine proatherogene Wirkung hat und ATX durch eine vermehrte Bildung von LPA zur Atherosklerose beitragen könnte. Allerdings gibt es bisher keine Studien zur Rolle von ATX oder von zelltyp-spezifische Effekte von ATX in der Atherosklerose. Da bekannt ist, dass Frauen höhere LPA-Konzentrationen im Plasma als Männer aufweisen und die LPA Konzentration mit der ATX Aktivität im Plasma korreliert⁷⁷, stellte sich auch die Frage, ob im Mausmodell der Atherosklerose geschlechtsspezifische Effekte der ATX Expression in Makrophagen auftreten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die ATX Expression in Makrophagen in einem früheren Stadium der Atherosklerose nach der dreimonatigen fettreichen Diät weder in weiblichen noch in männlichen Mäusen die Plaquebildung entscheidend beeinflusst. Dies trifft sowohl auf die Aortenwurzel als auch auf die Lipidablagerung in der Aorta zu. Daraus kann man schlussfolgern, dass die protektive Wirkung der LPAR1/3 Hemmung mittels Ki16425 in der frühen Atherosklerose nicht auf die Hemmung von LPAs zurückzuführen sind, die durch ATX aus Makrophagen gebildet wurde. Dazu würde auch passen, dass eine wesentliche Rolle von ATX aus Endothelzellen für die durch LPAR1/3-vermittelte Rekrutierung von Monozyten in die arterielle Gefäßwand vermutet wurde¹¹. Allerdings kann man aufgrund der geringen Größe der männlichen Kontrollgruppe, die Wirkung des ATX Knockouts in Makrophagen auf die frühe Atherosklerose nach drei Monaten fettreicher Diät nicht abschließend beurteilen.

Im Unterschied zu den Ergebnissen nach dreimonatiger fettreicher Diät, zeigte sich in einem weiter fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose, nach sechs Monaten fettreicher Diät, dass in weiblichen Mäusen die ATX Expression in Makrophagen sowohl in der Aortenwurzel als auch in der Aorta die Plaques vergrößert. Obwohl in den männlichen Mäusen in der Aortenwurzel nur ein Trend zu einer größeren Plaquebildung durch die ATX Expression in Makrophagen zu beobachten war, zeigte sich in der Aorta dieser Mäuse, wie in den weiblichen Mäusen, dass die ATX Expression in Makrophagen zu einer deutlichen Steigerung

der fortgeschrittenen Atherosklerose führt. Man kann deshalb schlussfolgern, dass die ATX Expression in Makrophagen in beiden Geschlechtern die Atherosklerose in diesem Stadium fördert. Es ist davon auszugehen, dass die proatherogene Wirkung der ATX Expression in Makrophagen auf eine vermehrte Bildung von LPA in den Plaques zurückzuführen ist. Aus Studien in Mäusen ist bekannt, dass die LPA Konzentrationen mit der Progression der Plaques im Zeitverlauf zunimmt⁷⁸. Dies könnte erklären, warum erst nach sechsmonatiger fettreicher Diät ein Effekt der ATX Expression in Makrophagen auf die Plaquebildung zu beobachten war. Dazu passt auch die Feststellung, dass die ATX Expression in Makrophagen gerade im Aortenbogen, wo die Plaquebildung besonders ausgeprägt und fortgeschritten ist im Vergleich zu denen anderen Aortenabschnitten, die Atherosklerose am meisten verstärkt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass diese Ergebnisse dafürsprechen, dass eine pharmakologische Hemmung von ATX das Fortschreiten der Plaquebildung vermindern und damit eine potentielle therapeutische Option darstellen könnte.

4.3 Die ATX Expression in Makrophagen steigert die Bildung des nekrotischen Kerns

Die Bildung des nekrotischen Kerns trägt entscheidend bei zur Vergrößerung der Plaques in einem fortgeschrittenen Stadium. Der nekrotische Kern wird erst in den fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose gebildet, da er laut Tabas¹⁵ erst entsteht, wenn die apoptotischen Zellen nicht abgeräumt werden und es dadurch zu einer sekundären Nekrose mit folgender Entzündungsreaktion kommt oder wenn die Entzündungszellen vermehrt freigesetzt werden oder die Entzündung länger bestehen bleibt. Zusätzlich findet man regelmäßig auch eine Anhäufung von Cholesterinkristallen in nekrotischen Kernen, deren Entstehung aus der extrazellulären Ansammlung von freiem Cholesterin aus unterschiedlichen Quellen, wie der Zellmembran abgestorbener Zellen oder LDL Partikeln, erklärt wird. Aufgrund der Beobachtungen, dass die ATX Expression in Makrophagen bei Mäusen nach sechs Monaten einer fettreichen Diät eine proatherogene Wirkung zeigt, stellte sich die Frage, ob ATX in Makrophagen auch eine Rolle bei der Bildung des nekrotischen Kerns spielt und ob das die Ursache der vermehrten Plaquebildung in diesem späten Stadium der Atherosklerose ist.

In der vorliegenden Arbeit bestätigte sich, dass bei der Progression der Atherosklerose, zwischen drei- und sechs Monaten fettreicher Diät, die Ausdehnung des nekrotischen Kerns eine wesentliche Rolle spielt, unabhängig vom Geschlecht. Die Fläche des nekrotischen Kerns nahm nicht nur absolut, sondern auch relativ zur Plaquegröße zu, so dass der nekrotische Kern einen größeren Anteil der Plaque ausmacht. Parallel dazu kam es zu einer Abnahme der relativen Zellzahl bezogen auf die Plaquefläche. Der nekrotische Kern nahm also auf Kosten der zellulären Plaquebestandteile geschlechtsunabhängig zu, wobei die absolute Zellzahl im Verlauf der Plaqueprogression zwischen drei und sechs Monaten Diät unverändert blieb. Bei den weiblichen Mäusen ist die Veränderung der relativen Zellzahl größtenteils auf die Mac2+ Makrophagen zurückzuführen, die etwa 50% der Zellen im frühen Plaquestadium ausmachen. Bei den männlichen Mäusen scheint dagegen die Zahl an Mac2+ Makrophagen zwischen drei und sechs Monaten Diät zuzunehmen, während der relative Anteil unverändert bleibt. Diese Befunde, die einer weiteren Bestätigung durch zusätzliche Mäuse in der Kontrollgruppe bedürfen, deuten darauf hin, dass bei den männlichen Mäusen andere Zellen, möglicherweise Mac2- Makrophagen, der Veränderung der relativen Zellzahl im Verlauf der Plaqueprogression zu Grunde liegen.

Es konnte ferner in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die verminderte Plaqueprogression durch den Knockout von ATX in Makrophagen tatsächlich auf eine geringere Bildung des nekrotischen Kerns nach sechsmonatiger fettreicher Diät zurückzuführen war. Gleichzeitig erhöhte der ATX Knockout in Makrophagen die relative und

absolute Zellzahl in den fortgeschrittenen Plaques. Beide Effekte, der auf die Fläche des nekrotischen Kerns als auch der auf die Zellzahl, waren in weiblichen und männlichen Mäusen nachweisbar. Diese Befunde weisen darauf hin, dass die ATX Expression in Makrophagen den nekrotischen Kern in fortgeschrittenen Plaques durch eine Verminderung der Zellzahl vergrößert. In weiblichen Mäusen waren die durch ATX vermittelten Effekte auf die Zellzahl begleitet durch entsprechende Veränderungen der Mac2⁺ Makrophagen. Man kann deshalb davon ausgehen, dass in weiblichen Mäusen die verminderte Anreicherung von Zellen in den fortgeschrittenen Plaques durch die ATX Expression in Makrophagen auf eine geringere Akkumulation von Mac2⁺ Makrophagen verursacht ist. In männlichen Mäusen war zwar ebenfalls eine Tendenz zu einer verminderten Akkumulation von Mac2⁺ Makrophagen durch die ATX Expression in den Plaques vorhanden, es sollten aber noch weitere Mäuse diesbezüglich untersucht werden, um eine endgültige Aussage treffen zu können. Nicht auszuschließen ist auch, dass es in männlichen Mäusen andere Subpopulationen an Makrophagen als bei weiblichen Mäusen gibt.

Es ist bekannt, dass ungesättigte LPAs, wie LPA20:4, die Rekrutierung von Monozyten in die atherosklerotische Gefäßwand sowie die Akkumulation von Makrophagen in den Plaques fördern¹¹. Dieser Effekt ist auf die durch LPAR1- und LPAR3-vermittelte Freisetzung von CXCL1 aus Endothelzellen zurückzuführen¹¹. Entsprechend dürfte die Hemmung der Atherosklerose durch Behandlung mit einem LPAR1 und LPAR3 Antagonisten durch die reduzierte endotheliale Rekrutierung von Monozyten bedingt sein, insbesondere da auch die Makrophagenakkumulation in den Plaques vermindert wird^{11,75}. Ferner gibt es Hinweise, dass die Freisetzung von ATX aus Endothelzellen entscheidend zur Bildung von ungesättigten LPAs und damit zur CXCL1-vermittelten Monozytenrekrutierung beiträgt¹¹. Im Gegensatz dazu scheint die ATX Expression in Makrophagen keine Rolle bei der Monozytenrekrutierung in der frühen Atherosklerose zu spielen, so dass vermutlich zell-spezifische Effekte von ATX in der Atherosklerose existieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind damit vereinbar, dass die ATX Expression in Makrophagen in fortgeschrittenen Atherosklerosestadien vor allem lokalen Einfluss auf die Plaquezusammensetzung hat. Ähnlich wie bei dem vermuteten Effekt von endothelialelem ATX auf die Atherosklerose, dürfte auch die Wirkung der ATX Expression in Makrophagen auf die Plaquebildung durch die Bildung von LPAs und deren Interaktion mit LPA-Rezeptoren verursacht sein.

Aus der Literatur ist bekannt, dass autokrine Effekte von LPAs zu einer inflammatorischen Aktivierung von Makrophagen führen, unter anderem durch LPAR1 und LPAR2⁷⁹⁻⁸¹. Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass dieser Mechanismus eine Rolle spielt bei der gesteigerten Plaquebildung durch die ATX Expression in Makrophagen, weil man dann vermutlich durch die gesteigerte Zytokinsekretion eher eine vermehrte Makrophagenakkumulation erwarten würde. Denkbar wäre aber, dass eine überschießende

inflammatorische Aktivierung der Makrophagen, z.B. durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies oder einen akuten ATP Mangel, zu einem nekrotischen Zelltod führt. Dieser Mechanismus liegt der Bildung eines nekrotischen Kerns durch die Aktivierung des inflammatorischen Transkriptionsfaktors HIF-1 α in Makrophagen zu Grunde⁸².

Darüber hinaus fördert LPA in vitro die Lipidakkumulation in Makrophagen, unter anderem durch eine LPAR3-induzierte Expression von Scavenger-Rezeptoren^{23,83,84}. Obwohl auch in der vorliegenden Arbeit die Lipidakkumulation in der Gefäßwand durch die ATX Expression in Makrophagen in einem späten Atherosklerosestadium verstärkt wird, könnte dies auf die extrazelluläre Ablagerung von Lipiden im nekrotischen Kern zurückzuführen sein. Ferner ist bekannt, dass LPA die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen und das Überleben von Makrophagen fördert^{22,85}. Der Befund, dass die ATX Expression in Makrophagen die Akkumulation dieser Zellen verringert, spricht gegen eine entscheidende Beteiligung dieses Mechanismus an der ATX-vermittelten späten Atherosklerose.

4.4 Rolle von ATX in der Apoptose von Makrophagen und der Efferozytose

Im Initialstadium der Atherosklerose ist die Efferozytose noch effizient^{15,53}. Durch die regelmäßige Phagozytose der apoptotischen Zellen wirken Efferozyten antiinflammatorisch und verlangsamen die Atheroskleroseprogression¹⁵. Im fortgeschrittenen Stadium sterben Makrophagen vermehrt ab^{15,53} und die Efferozyten sind immer weniger in der Lage alle abgestorbenen Zellen zu phagozytieren¹⁵. Dieses Ungleichgewicht zwischen Zelltod und Efferozytose wird als wesentlicher Mechanismus für die zunehmende Bildung des nekrotischen Kerns in späten Stadien der Atherosklerose angenommen^{15,61}. Es wurde deswegen untersucht, ob die ATX Expression in Makrophagen einen Einfluss auf die Apoptose und die Efferozytose hat und dadurch die Bildung des nekrotischen Kerns verstärkt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergaben keinen eindeutigen Hinweis darauf, dass die ATX Expression in Makrophagen im frühen oder späten Atherosklerosestadium eine Rolle bei der Apoptose der Makrophagen spielt. Es war auch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Plaquestadium und dem Ausmaß der Apoptose festzustellen. Daraus lässt sich schließen, dass weder die vereinzeltten Berichte über pro-apoptotische noch die bekannten anti-apoptotischen Effekte von LPA eine zentrale Funktion in der ATX-vermittelten Bildung des nekrotischen Kerns haben^{22,85,86}.

Überraschenderweise zeigte sich in den fortgeschrittenen Plaques, dass der Knockout von ATX in Makrophagen zu einem geringeren Anteil an Plaquemakrophagen führt, die aktiv apoptotische Zellen phagozytieren oder phagozytiert haben. Dieser Befund würde eher dafürsprechen, dass der nekrotische Kern durch das Fehlen von ATX vergrößert statt verkleinert wird. Möglicherweise ist dieses Ergebnis eher dadurch bedingt, dass die Zahl an Makrophagen in den Plaques bei einem Knockout von ATX stark erhöht sind ohne dass sich die Zahl an efferozytierenden Makrophagen verändert. Es ist deshalb nicht unwahrscheinlich, dass die ATX Expression in Makrophagen keinen Einfluss auf die Efferozytose hat. Zu dieser Hypothese passt, dass ATX den Grad an defekter Efferozytose nicht veränderte.

Es konnte folglich in der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden, wie die ATX Expression in Makrophagen die Bildung des nekrotischen Kerns verstärkt. Eine Möglichkeit, die weiter untersucht werden sollte, ist ob ATX die Ablagerung von Cholesterinkristallen im nekrotischen Kern verstärkt und dadurch zur Plaqueprogression beiträgt.

5 Zusammenfassung

Atherosklerose ist eine stark verbreitete chronische Gefäßerkrankung, bei der es zur Bildung von atherosklerotischer Plaque durch die Lipideinlagerung in die Gefäßwand kommt. Durch die Plaquevergrößerung wird das Lumen des Gefäßes immer kleiner und es kann zu Sauerstoffunterversorgungen in distal liegenden Geweben kommen. Noch problematischer und lebensbedrohlich wird es, wenn es zu einer Plaqueablösung oder Ruptur mit folgender Atherothrombose kommt, da daraus ein Herzinfarkt oder Schlaganfall resultieren kann. Eine Rolle in der Bildung von Atherosklerose spielt auch Autotaxin (ATX). ATX ist ein sezerniertes Glykoprotein, das eine Lysophospholipase D Aktivität aufweist. Es spaltet die polare Kopfgruppe von Lysophospholipiden, wie Lysophosphatidylcholin (LPC), unter Entstehung von LPA und Cholin ab. ATX in Endothelzellen hat eine proatherogene Wirkung durch die LPA-abhängige Anlockung und vermehrte Monozytenadhäsion¹¹.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Rolle von ATX Expression in Makrophagen bei der Progression der Atherosklerose zu untersuchen. Genauer wurden die Einflüsse der ATX Expression in Makrophagen auf das Körpergewicht der Mäuse, sowie die Plaquebildung, die Bildung des nekrotischen Kerns, die zelluläre Zusammensetzung der Plaque und letztlich auf die Apoptose und Efferozytose in früherem und weiter fortgeschrittenem Atherosklerosestadium untersucht. Außerdem wurde analysiert, ob die ATX Expression in Makrophagen eine geschlechtsspezifische Wirkung bei den genannten Prozessen aufwies.

Dafür wurden die Mäuse vor der Einschläferung durch meine Betreuerin gewogen. Nach der Einschläferung der Mäuse und Vorbereitung der Präparate wurden die Gewebeschnitte gefärbt und mittels Bildanalyseprogramm ImageJ Software ausgewertet. Die Analyse der Atheroskleroseprogression erfolgte nach der Färbung der Aortenwurzeln mit EvG. Dafür wurden die Plaques in den Aortenklappen der Aortenwurzel gemessen und miteinander verglichen. Die Größe und die Lokalisation der atherosklerotischen Läsionen wurden zusätzlich in der Aorta nach ORO Färbung analysiert. Um die Wirkung des ATX in Makrophagen auf die Bildung des nekrotischen Kerns zu beurteilen, wurden die nekrotischen Kernflächen in den Plaques der mit EvG gefärbten Aortenwurzel gemessen. Der Einfluss von ATX Expression in Makrophagen auf die zellulären Plaquebestandteile sowie auf die Apoptose- und Efferozytoserate in der Plaque wurde mittels Immunfärbung (Dapi-Mac2-TUNEL) dargestellt.

In frühem Stadium der Atherosklerose gibt es keine Unterschiede im Körpergewicht. Nach sechsmonatiger fettreicher Diät führt der Knockout in Makrophagen in weiblichen Mäusen zu einem erhöhten Körpergewicht.

Durch die Analyse der Plaqueausdehnung in den Aortenwurzeln zeigte ATX Expression in Makrophagen eine proatherogene Wirkung bei weiblichen Mäusen erst in fortgeschrittener Atherosklerose. Männliche Mäuse mit dem ATX Knockout zeigten nur einen Trend zu geringerer Atheroskleroseprogression, allerdings war die Gruppengröße klein. Die Ergebnisse der Plaqueanalysen in Aorta bestätigten eine protektive Rolle des ATX Knockouts auf die fortgeschrittene Atherosklerose bei weiblichen Mäusen, zeigten aber auch bei männlichen Knockoutmäusen eine verminderte Progression der Atherosklerose. Die ATX Expression in Makrophagen fördert in diesem Stadium also in beiden Geschlechtern die Atherosklerose. Die Ursache dafür könnte die vermehrte LPA Bildung sein, deswegen ist der Effekt der ATX Expression in Makrophagen eventuell erst nach sechs Monaten fettreicher Diät sichtbar.

Auch die Bildung des nekrotischen Kerns wird durch die ATX Expression in Makrophagen erst im fortgeschrittenen Atherosklerosestadium verstärkt. Daraus bestätigt sich, dass die Ausdehnung des nekrotischen Kerns eine wesentliche Rolle bei der Progression der Atherosklerose spielt, unabhängig vom Geschlecht der Mäuse. Genauere Betrachtung der zellulären Plaquezusammensetzung ergibt geschlechtsunabhängig keinen Unterschied der Zellzahl nach dreimonatiger fettreicher Diät. Nach sechs Monaten fettreicher Diät führt der Knockout von ATX in Makrophagen zu einem Anstieg der absoluten und relativen Zellzahl in den Plaques bei den weiblichen Mäusen. Die männlichen Mäuse zeigen ebenfalls eine erhöhte relative Zellzahl durch das Fehlen des ATX in Makrophagen. Die absolute Zellzahl ist nur tendenziell größer, aber die Gruppengröße ist gering. Der nekrotische Kern nimmt also durch eine Verminderung der Zellzahl geschlechtsunabhängig zu. Die Makrophagenakkumulation ist in den fortgeschrittenen Plaques weiblicher Mäuse durch die ATX Expression in Makrophagen verringert, deswegen kann angenommen werden, dass die verminderte Zellanreicherung in den Plaques durch eine geringere Makrophagenakkumulation zustande kommt. Bei den männlichen Mäusen ist die Tendenz dazu zwar auch da, allerdings kann aufgrund von geringer Gruppenzahl keine genaue Aussage getroffen werden.

Es gibt ebenfalls keinen eindeutigen Hinweis, dass die ATX Expression in Makrophagen eine Rolle bei der Apoptose der Makrophagen spielt, weder im frühen noch im späten Atherosklerosestadium. Entgegen den Erwartungen zeigt die ATX Expression in Makrophagen geschlechtsunabhängig erhöhte Anzahl der efferozytierenden Makrophagen in den fortgeschrittenen Plaques. Die ATX Expression in Makrophagen hat keinen Einfluss auf die defekte Efferozytose unabhängig vom Geschlecht oder Atherosklerosestadium.

In der vorliegenden Arbeit bleibt es ungeklärt, wie die Expression von ATX in Makrophagen die Bildung des nekrotischen Kerns in fortgeschrittenem Atherosklerosestadium verstärkt. Um noch genauer die Mechanismen der Wirkung des ATX in Makrophagen auf die Atheroskleroseprogression zu verstehen und vor allem die geschlechtsspezifische Wirkung besser beurteilen zu können, müssten mehrere vor allem männliche Mäuse mit fortgeschrittener Atherosklerose analysiert werden. Außerdem sollten unter anderem weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um herauszufinden, ob die verstärkte Ablagerung von Cholesterinkristallen im nekrotischen Kern zur Progression der Atherosklerose führt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit dafürsprechen, dass eine pharmakologische Hemmung von ATX das Fortschreiten der Plaquebildung vermindern und damit eine potenzielle therapeutische Option darstellen könnte. Da die Forschung des ATX in Makrophagen aber relativ am Anfang ist, bleibt der therapeutische Einsatz von ATX-Inhibitoren noch eine offene wissenschaftliche Frage.

6 Literaturverzeichnis

1. Nishimasu H, Ishitani R, Aoki J, Nureki O. A 3D view of autotaxin. *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33(3):138-145. doi:10.1016/j.tips.2011.12.004
2. Perrakis A, Moolenaar WH. Autotaxin: structure-function and signaling. *J Lipid Res.* 2014;55(6):1010-1018. doi:10.1194/jlr.R046391
3. Nishimasu H, Okudaira S, Hama K, et al. Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators. *Nat Struct Mol Biol.* 2011;18(2):205-212. doi:10.1038/nsmb.1998
4. Stefan C, Jansen S, Bollen M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem Sci.* 2005;30(10):542-550. doi:10.1016/j.tibs.2005.08.005
5. Moolenaar WH, Perrakis A. Insights into autotaxin: how to produce and present a lipid mediator. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(10):674-679. doi:10.1038/nrm3188
6. Deng G, Royle G, Wang S, Crain K, Loskutoff DJ. Structural and functional analysis of the plasminogen activator inhibitor-1 binding motif in the somatomedin B domain of vitronectin. *J Biol Chem.* 1996;271(22):12716-12723.
7. Umezū-Goto M, Kishi Y, Taira A, et al. Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol.* 2002;158(2):227-233. doi:10.1083/jcb.200204026
8. Tokumura A, Majima E, Kariya Y, et al. Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *J Biol Chem.* 2002;277(42):39436-39442. doi:10.1074/jbc.M205623200
9. Nakanaga K, Hama K, Aoki J. Autotaxin--an LPA producing enzyme with diverse functions. *J Biochem.* 2010;148(1):13-24. doi:10.1093/jb/mvq052
10. Zhao Y, Hasse S, Zhao C, Bourgoïn SG. Targeting the autotaxin - Lysophosphatidic acid receptor axis in cardiovascular diseases. *Biochem Pharmacol.* 2019;164:74-81. doi:10.1016/j.bcp.2019.03.035
11. Zhou Z, Subramanian P, Sevilmis G, et al. Lipoprotein-derived lysophosphatidic acid promotes atherosclerosis by releasing CXCL1 from the endothelium. *Cell Metab.* 2011;13(5):592-600. doi:10.1016/j.cmet.2011.02.016
12. Schober A, Siess W. Lysophosphatidic acid in atherosclerotic diseases. *Br J Pharmacol.* 2012;167(3):465-482. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02021.x
13. Tsuda S, Okudaira S, Moriya-Ito K, et al. Cyclic phosphatidic acid is produced by autotaxin in blood. *J Biol Chem.* 2006;281(36):26081-26088. doi:10.1074/jbc.M602925200

14. Fujiwara Y. Cyclic phosphatidic acid - a unique bioactive phospholipid. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1781(9):519-524. doi:10.1016/j.bbaliip.2008.05.002
15. Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(1):36-46. doi:10.1038/nri2675
16. Tsukahara T, Tsukahara R, Fujiwara Y, et al. Phospholipase D2-dependent inhibition of the nuclear hormone receptor PPARgamma by cyclic phosphatidic acid. *Mol Cell*. 2010;39(3):421-432. doi:10.1016/j.molcel.2010.07.022
17. Siess W. Athero- and thrombogenic actions of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1582(1-3):204-215.
18. Fulkerson Z, Wu T, Sunkara M, Kooi CV, Morris AJ, Smyth SS. Binding of autotaxin to integrins localizes lysophosphatidic acid production to platelets and mammalian cells. *J Biol Chem*. 2011;286(40):34654-34663. doi:10.1074/jbc.M111.276725
19. Siess W, Zangl KJ, Essler M, et al. Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(12):6931-6936.
20. Panetti TS, Hannah DF, Avraamides C, et al. Extracellular matrix molecules regulate endothelial cell migration stimulated by lysophosphatidic acid. *J Thromb Haemost*. 2004;2(9):1645-1656. doi:10.1111/j.1538-7836.2004.00902.x
21. Dancs PT, Ruisanchez É, Balogh A, et al. LPA1 receptor-mediated thromboxane A2 release is responsible for lysophosphatidic acid-induced vascular smooth muscle contraction. *FASEB J*. January 2017. doi:10.1096/fj.201600735R
22. Ray R, Rai V. Lysophosphatidic acid converts monocytes into macrophages in both mice and humans. *Blood*. 2017;129(9):1177-1183. doi:10.1182/blood-2016-10-743757
23. Chen L, Zhang J, Deng X, et al. Lysophosphatidic acid directly induces macrophage-derived foam cell formation by blocking the expression of SRBI. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;491(3):587-594. doi:10.1016/j.bbrc.2017.07.159
24. Chang CL, Hsu HY, Lin HY, Chiang W, Lee H. Lysophosphatidic acid-induced oxidized low-density lipoprotein uptake is class A scavenger receptor-dependent in macrophages. *Prostaglandins & other lipid* 2008.
25. Moolenaar WH, Houben AJS, Lee S-J, van Meeteren LA. Autotaxin in embryonic development. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831(1):13-19. doi:10.1016/j.bbaliip.2012.09.013
26. Fotopoulou S, Oikonomou N, Grigorieva E, et al. ATX expression and LPA signalling are vital for the development of the nervous system. *Dev Biol*. 2010;339(2):451-464. doi:10.1016/j.ydbio.2010.01.007

27. Oikonomou N, Mouratis M-A, Tzouveleakis A, et al. Pulmonary autotaxin expression contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012;47(5):566-574. doi:10.1165/rcmb.2012-0004OC
28. Houben AJS, Moolenaar WH. Autotaxin and LPA receptor signaling in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2011;30(3-4):557-565. doi:10.1007/s10555-011-9319-7
29. Nikitopoulou I, Oikonomou N, Karouzakis E, et al. Autotaxin expression from synovial fibroblasts is essential for the pathogenesis of modeled arthritis. *J Exp Med.* 2012;209(5):925-933. doi:10.1084/jem.20112012
30. Lee D, Suh D-S, Lee SC, Tigyi GJ, Kim JH. Role of autotaxin in cancer stem cells. *Cancer Metastasis Rev.* 2018;37(2-3):509-518. doi:10.1007/s10555-018-9745-x
31. Liu S, Umezu-Goto M, Murph M, et al. Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases. *Cancer Cell.* 2009;15(6):539-550. doi:10.1016/j.ccr.2009.03.027
32. Smyth SS, Mueller P, Yang F, Brandon JA, Morris AJ. Arguing the case for the autotaxin-lysophosphatidic acid-lipid phosphate phosphatase 3-signaling nexus in the development and complications of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(3):479-486. doi:10.1161/ATVBAHA.113.302737
33. Rancoule C, Dusaulcy R, Tréguer K, Grès S, Attané C, Saulnier-Blache JS. Involvement of autotaxin/lysophosphatidic acid signaling in obesity and impaired glucose homeostasis. *Biochimie.* 2014;96:140-143. doi:10.1016/j.biochi.2013.04.010
34. van Meeteren LA, Ruurs P, Stortelers C, et al. Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol.* 2006;26(13):5015-5022. doi:10.1128/MCB.02419-05
35. Cochain C, Zerneck A. Macrophages in vascular inflammation and atherosclerosis. *Pflugers Arch.* 2017;469(3-4):485-499. doi:10.1007/s00424-017-1941-y
36. Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46(6):937-954. doi:10.1016/j.jacc.2005.03.074
37. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* 2011;473(7347):317-325. doi:10.1038/nature10146
38. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell.* 2011;145(3):341-355. doi:10.1016/j.cell.2011.04.005
39. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med.* 2011;17(11):1410-1422. doi:10.1038/nm.2538
40. Thim T, Hagensen MK, Bentzon JF, Falk E. From vulnerable plaque to atherothrombosis. *J Intern Med.* 2008;263(5):506-516. doi:10.1111/j.1365-2796.2008.01947.x

41. Torres N, Guevara-Cruz M, Velázquez-Villegas LA, Tovar AR. Nutrition and Atherosclerosis. *Arch Med Res.* 2015;46(5):408-426. doi:10.1016/j.arcmed.2015.05.010
42. Cunningham KS, Gotlieb AI. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest.* 2005;85(1):9-23. doi:10.1038/labinvest.3700215
43. Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(8 Suppl):C7-12. doi:10.1016/j.jacc.2005.09.068
44. Stocker R, Keaney JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004;84(4):1381-1478. doi:10.1152/physrev.00047.2003
45. Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(10):709-721. doi:10.1038/nri3520
46. Gerhardt T, Ley K. Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovasc Res.* 2015;107(3):321-330. doi:10.1093/cvr/cvv147
47. Randolph GJ. Mechanisms that regulate macrophage burden in atherosclerosis. *Circ Res.* 2014;114(11):1757-1771. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.301174
48. Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, et al. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature.* 1997;386(6622):292-296. doi:10.1038/386292a0
49. Moore KJ, Freeman MW. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(8):1702-1711. doi:10.1161/01.ATV.0000229218.97976.43
50. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell.* 2001;104(4):503-516.
51. Tabas I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(11):2255-2264. doi:10.1161/01.ATV.0000184783.04864.9f
52. Swirski FK, Pittet MJ, Kircher MF, et al. Monocyte accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(27):10340-10345. doi:10.1073/pnas.0604260103
53. Tabas I, Bornfeldt KE. Macrophage phenotype and function in different stages of atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118(4):653-667. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306256
54. Robbins CS, Hilgendorf I, Weber GF, et al. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med.* 2013;19(9):1166-1172. doi:10.1038/nm.3258
55. Lamharzi N, Renard CB, Kramer F, et al. Hyperlipidemia in concert with hyperglycemia stimulates the proliferation of macrophages in atherosclerotic lesions: potential role of glucose-oxidized LDL. *Diabetes.* 2004;53(12):3217-3225.

56. Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, Ladich E, Kolodgie FD, Virmani R. Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. *Heart Lung Circ.* 2013;22(6):399-411. doi:10.1016/j.hlc.2013.03.001
57. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516. doi:10.1080/01926230701320337
58. Van Vré EA, Ait-Oufella H, Tedgui A, Mallat Z. Apoptotic cell death and efferocytosis in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(4):887-893. doi:10.1161/ATVBAHA.111.224873
59. Geng Y-J, Libby P. Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(9):1370-1380.
60. Seimon T, Tabas I. Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl:S382-7. doi:10.1194/jlr.R800032-JLR200
61. Thorp E, Tabas I. Mechanisms and consequences of efferocytosis in advanced atherosclerosis. *J Leukoc Biol.* 2009;86(5):1089-1095. doi:10.1189/jlb.0209115
62. Henson PM, Bratton DL, Fadok VA. Apoptotic cell removal. *Curr Biol.* 2001;11(19):R795-805. doi:10.1016/S0960-9822(01)00474-2
63. Schrijvers DM, De Meyer GRY, Herman AG, Martinet W. Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability. *Cardiovasc Res.* 2007;73(3):470-480. doi:10.1016/j.cardiores.2006.09.005
64. Naz S, Kolmert J, Yang M, et al. Metabolomics analysis identifies sex-associated metabotypes of oxidative stress and the autotaxin-lysoPA axis in COPD. *Eur Respir J.* 2017;49(6). doi:10.1183/13993003.02322-2016
65. Mouratis M-A, Magkrioti C, Oikonomou N, et al. Autotaxin and Endotoxin-Induced Acute Lung Injury. *PLoS One.* 2015;10(7):e0133619. doi:10.1371/journal.pone.0133619
66. Thorp E, Cui D, Schrijvers DM, Kuriakose G, Tabas I. MERTK receptor mutation reduces efferocytosis efficiency and promotes apoptotic cell accumulation and plaque necrosis in atherosclerotic lesions of apoE^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(8):1421-1428. doi:10.1161/ATVBAHA.108.167197
67. Nakamura K, Ohkawa R, Okubo S, et al. Measurement of lysophospholipase D/autotaxin activity in human serum samples. *Clin Biochem.* 2007;40(3-4):274-277. doi:10.1016/j.clinbiochem.2006.10.009
68. Keune W-J, Hausmann J, Bolier R, et al. Steroid binding to Autotaxin links bile salts and lysophosphatidic acid signalling. *Nat Commun.* 2016;7:11248. doi:10.1038/ncomms11248
69. Reeves VL, Trybula JS, Wills RC, et al. Serum Autotaxin/ENPP2 correlates with insulin resistance in older humans with obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2015;23(12):2371-2376. doi:10.1002/oby.21232

70. Dusaulcy R, Rancoule C, Grès S, et al. Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid. *J Lipid Res.* 2011;52(6):1247-1255. doi:10.1194/jlr.M014985
71. Lauterbach MAR, Wunderlich FT. Macrophage function in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Pflugers Arch.* 2017;469(3-4):385-396. doi:10.1007/s00424-017-1955-5
72. Chen K-HE, Lainez NM, Coss D. Sex Differences in Macrophage Responses to Obesity-Mediated Changes Determine Migratory and Inflammatory Traits. *J Immunol.* December 2020. doi:10.4049/jimmunol.2000490
73. D'Souza K, Nzirorera C, Cowie AM, et al. Autotaxin-Lysophosphatidic Acid Signaling Contributes to Obesity-Induced Insulin Resistance in Muscle and Impairs Mitochondrial Metabolism. *J Lipid Res.* August 2018. doi:10.1194/jlr.M082008
74. Brandon JA, Kraemer M, Vandra J, et al. Adipose-derived autotaxin regulates inflammation and steatosis associated with diet-induced obesity. *PLoS One.* 2019;14(2):e0208099. doi:10.1371/journal.pone.0208099
75. Kritikou E, van Puijvelde GHM, van der Heijden T, et al. Inhibition of lysophosphatidic acid receptors 1 and 3 attenuates atherosclerosis development in LDL-receptor deficient mice. *Sci Rep.* 2016;6:37585. doi:10.1038/srep37585
76. Yang L, Kraemer M, Fang XF, et al. LPA Receptor 4 deficiency attenuates experimental atherosclerosis. *J Lipid Res.* February 2019. doi:10.1194/jlr.M091066
77. Hosogaya S, Yatomi Y, Nakamura K, et al. Measurement of plasma lysophosphatidic acid concentration in healthy subjects: strong correlation with lysophospholipase D activity. *Ann Clin Biochem.* 2008;45(Pt 4):364-368. doi:10.1258/acb.2008.007242
78. Bot M, Bot I, Lopez-Vales R, et al. Atherosclerotic lesion progression changes lysophosphatidic acid homeostasis to favor its accumulation. *Am J Pathol.* 2010;176(6):3073-3084. doi:10.2353/ajpath.2010.090009
79. Fransson J, Gómez-Conde AI, Romero-Imbroda J, et al. Activation of Macrophages by Lysophosphatidic Acid through the Lysophosphatidic Acid Receptor 1 as a Novel Mechanism in Multiple Sclerosis Pathogenesis. *Mol Neurobiol.* September 2020. doi:10.1007/s12035-020-02130-x
80. Lee C-H, Sapkota A, Gaire BP, Choi JW. NLRP3 Inflammasome Activation Is Involved in LPA1-Mediated Brain Injury after Transient Focal Cerebral Ischemia. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22). doi:10.3390/ijms21228595
81. Wang Z, Shi W, Tian D, et al. Autotaxin stimulates LPA2 receptor in macrophages and exacerbates dextran sulfate sodium-induced acute colitis. *J Mol Med.* 2020;98(12):1781-1794. doi:10.1007/s00109-020-01997-6

82. Karshovska E, Wei Y, Subramanian P, et al. HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor-1 α) Promotes Macrophage Necroptosis by Regulating miR-210 and miR-383. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020;40(3):583-596. doi:10.1161/ATVBAHA.119.313290
83. Chang C-L, Hsu H-Y, Lin H-Y, Chiang W, Lee H. Lysophosphatidic acid-induced oxidized low-density lipoprotein uptake is class A scavenger receptor-dependent in macrophages. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2008;87(1-4):20-25. doi:10.1016/j.prostaglandins.2008.05.002
84. An D, Hao F, Zhang F, et al. CD14 is a key mediator of both lysophosphatidic acid and lipopolysaccharide induction of foam cell formation. *J Biol Chem.* 2017;292(35):14391-14400. doi:10.1074/jbc.M117.781807
85. Koh JS, Lieberthal W, Heydrick S, Levine JS. Lysophosphatidic acid is a major serum noncytokine survival factor for murine macrophages which acts via the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *J Clin Invest.* 1998;102(4):716-727. doi:10.1172/JCI1002
86. Zhang J, Li Y, Wang C, et al. Lysophosphatidic acid induces apoptosis of PC12 cells through LPA1 receptor/lpa2 receptor/mapk signaling pathway. *Front Mol Neurosci.* 2020;13:16. doi:10.3389/fnmol.2020.00016
87. Mills GB, Moolenaar WH. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(8):582-591. doi:10.1038/nrc1143

7 Abkürzungsverzeichnis

ApoE	Apolipoprotein E
ATX	Autotaxin
BMDM	Bone marrow-derived macrophage – Makrophagen, die aus Knochenmark abstammen
cPA	zyklische Phosphatidsäure
CXCL1	Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand 1
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ENPP	Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase
ENPP2	Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 2
EvG	Elastika van Gieson
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
HDL	High-density Lipoprotein = Lipoprotein hoher Dichte
LDL	Low-density Lipoprotein = Lipoprotein inedriger Dichte
Ldlr	LDL-Rezeptor
LOX1	Lectin-like oxidized low-density lipoprotein (LDL) receptor-1
LPA	Lysophosphatidsäure
LysmCre	Lysosom M Cre Rekombinase
M-ATX	Autotaxin in Makrophagen
MM-LDL	Minimally modified LDL = minimal modifiziertes LDL
mox LDL	mildly oxidized LDL = leicht oxidiertes LDL
NPP Enzym	Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase
ORO	Oil-red-O
ox LDL	oxidized LDL = oxidiertes LDL
PBS	Phosphate buffered saline = Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDE -	Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldehyd
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
SMB	Somatomedin B
SR-A1 und 2	Scavenger Rezeptor Typ 1 und 2
TMX	Tamoxifen
Tunel	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick-End Labeling
UP-Wasser	Ultra-purified Wasser
W/v	Gewicht pro Volumen

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Andreas Schober für die Überlassung des Themas, die fachliche Unterstützung und zahlreiche Tipps und umfassende Hilfe beim wissenschaftlichen Arbeiten und Schreiben während des gesamten Zeitraums der Betreuung bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei der Frau Dr. rer. nat. Ela Karshovska für die Mitbetreuung vor Ort, die Vorbereitung der Gewebepreparate, und stetige Hilfe und Unterstützung im Labor, die Motivierung bei nicht funktionierenden Versuchen und noch vielem mehr, bedanken.

Weiter möchte ich mich bei allen Mitgliedern der AG Schober für ihre Unterstützung im Labor bedanken, vor allem bei Claudia Geissler für die technische Hilfe und das Beibringen vom Arbeiten im Labor, Lourdes Ruiz-Heinrich für die Unterstützung mit der EvG Färbung und Rokia Mohibullah für die Vorbereitung der Gewebepreparate und die Unterstützung mit der ORO Färbung.

Besonders danke ich meiner Familie dafür, dass sie mir das Studium in München ermöglicht haben und mich sowohl während des Studiums als auch während der Promotion stets motiviert haben.

Zuletzt danke ich insbesondere meinem Ehemann Žiga für die Mitteilung eigener wissenschaftlichen Erfahrungen, für die Motivation und moralische Unterstützung für diese Doktorarbeit. Ohne dich würde ich es nicht schaffen.

Eidesstattliche Versicherung

Avsec Brigita

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Rolle von Autotaxin in Makrophagen in der Entstehung der Atherosklerose

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Augsburg, 22.02.2022

Brigita Avsec