

Aus dem Institut für Experimentelle Biomedizin
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Alma Zerneck-Madsen

CCR6 kontrolliert selektiv die Monozyten-vermittelte Entzündungsreaktion in der Atherosklerose



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Stefanie Barnsteiner
aus Prem

Würzburg, 14. März 2018



Referentin: Prof. Dr. Alma Zerneck-Madsen

Koreferent: Prof. Dr. Manfred Lutz

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Dezember 2018

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Atherosklerose und deren klinische Bedeutung	1
1.2	Pathogenese der Atherosklerose	2
1.3	Experimentelle Mausmodelle	5
1.4	Chemokine und deren Funktionen	5
1.5	Monozytensubtypen und deren Homöostase	6
1.6	Rolle des adaptiven Immunsystems	10
1.7	CCR6 und CCL20 in der Atherosklerose	11
2	Materialien	13
2.1	Tiermodell	13
2.2	Zellkultur	13
2.3	Kits	13
2.4	Antikörper	14
2.5	(Oligo-)Nukleotide	15
2.6	Lösungen und Puffer	15
2.7	Chemikalien und Reagenzien	16
2.8	Geräte	16
2.9	Software	17
2.10	Verbrauchsmaterialien	17
3	Methoden	18
3.1	CCR6-defizientes Tiermodell	18
3.2	Immunhistochemische Analyse muriner Plaques	18
3.3	Immunhistochemische Analyse von CCL20 in humanen Plaques	20
3.4	Enzymatische Gewebeerddauung und Durchflusszytometrie	20
3.5	<i>Air pouch</i> -Modell für Zellrekrutierung	21
3.6	HUVEC-Kultur und Immunfluoreszenzfärbung kultivierter Zellen	22
3.7	<i>In vitro</i> Adhäsions-Assay	23
3.8	Intravitalmikroskopie	24
3.9	Quantitative <i>real-time</i> Polymerasekettenreaktion	24
3.10	Serumcholesterin- und Triglyceridmessung	25
3.11	Statistik	26
4	Ergebnisse	27
4.1	Charakterisierung der Plaques	27
4.2	T-Zellphänotyp der Plaques	30

4.3	Systemischer T-Zellphänotyp	32
4.4	Mobilisierung peripherer Monozyten	36
4.5	Expression von CCL20	39
4.6	Monozytenarrest via CCL20/CCR6	40
4.7	Monozytenrekrutierung unter inflammatorischen Bedingungen	42
5	Diskussion	47
5.1	Mobilisierung peripherer Monozyten via CCR6	47
5.2	Monozytenrekrutierung via CCR6	48
5.3	Monozytenarrest und die Bedeutung von CCL20	49
5.4	Monozytensubtypen bei Mensch und Maus	51
5.5	T-Zellhomöostase und die CCL20-CCR6-Achse	52
5.6	Conclusio	53
6	Zusammenfassung	55
7	Literaturverzeichnis	56
8	Abbildungsverzeichnis	63
9	Tabellenverzeichnis	69
10	Abkürzungsverzeichnis	70

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose und deren klinische Bedeutung

Die koronare Herzkrankheit (KHK), die neben dem ischämischen Hirninfarkt und der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) zu den bedeutendsten kardiovaskulären Erkrankungen zählt, stellt weltweit eine der häufigsten Ursachen für Mortalität und Morbidität dar - im Jahr 2012 starben laut der Weltgesundheitsorganisation 7,4 Millionen Menschen an den Folgen einer KHK [1]. Auch wenn in Entwicklungsländern weiterhin Infektionskrankheiten die Haupttodesursachen ausmachen, so nimmt auch dort die Inzidenz und die gesellschaftliche Bedeutung der KHK und anderer kardiovaskuläre Erkrankungen stetig zu [1].

Pathologische Grundlage der KHK, sowie des ischämischen Infarkts und der pAVK, ist die Atherosklerose - im Volksmund als Gefäßverkalkung bekannt [2] [3]. Als Atherosklerose wird eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Gefäßwand bezeichnet [2], von welcher vor allem große elastische Arterien (beispielsweise Aorta, Karotiden und Iliacalgefäße) und große bis mittel-große muskuläre Arterien (beispielsweise Koronar- und Poplietalarterien) insbesondere in Bereichen turbulenten Blutflusses wie Gefäßabgängen betroffen sind [3]. Charakterisiert ist die Atherosklerose durch Lipidablagerungen und eine massenhafte Akkumulation von Leukozyten in der Gefäßwand [2] [3] [4]. In Folge der chronischen Entzündungsreaktion kann es einerseits zu einer langsam fortschreitenden Verengung des Gefäßlumens kommen, die typischerweise jahrelang klinisch inapparent verläuft: Beträgt die Stenose mehr als 70%, wird von einer kritischen Stenose gesprochen, welche sich durch eine Hypoxie des versorgten Gewebes und den daraus jeweils resultierenden Symptomen manifestiert. Andererseits kann die chronische Entzündung zu einer Schwächung der Gefäßwand führen, die die Entstehung von Aneurysmen begünstigt. Die am meisten gefürchtete Komplikation der Atherosklerose ist jedoch die akute Ruptur vulnerabler Plaques: Durch frei werdendes thrombogenes Material kommt es zur Aktivierung der Blutgerinnung mit konsekutiver Thrombenbildung. Solch ein Thrombus kann entweder durch den Blutstrom fortgerissen werden und andernorts embolische Ereignisse verursachen oder *in situ* einen Gefäßverschluss bewirken, welcher zu einer akuten Gewebsischämie führt, wie dies beispielsweise bei einem akuten Myokardinfarkt der Fall ist. Beide Szenarien stellen eine für den Menschen akut lebensbedrohliche Situation dar (Rezensiert in [2] [3] [4]).

Aufgrund der enormen klinischen Tragweite der Atherosklerose und ihren Folgeerkrankungen besteht daher ein großes Interesse, die zu Grunde liegenden Mechanismen ihrer Genese und Progression zu ergründen, mit dem Ziel, bereits in die Entstehung atherosklerotischer Läsionen pharmakologisch eingreifen zu können.

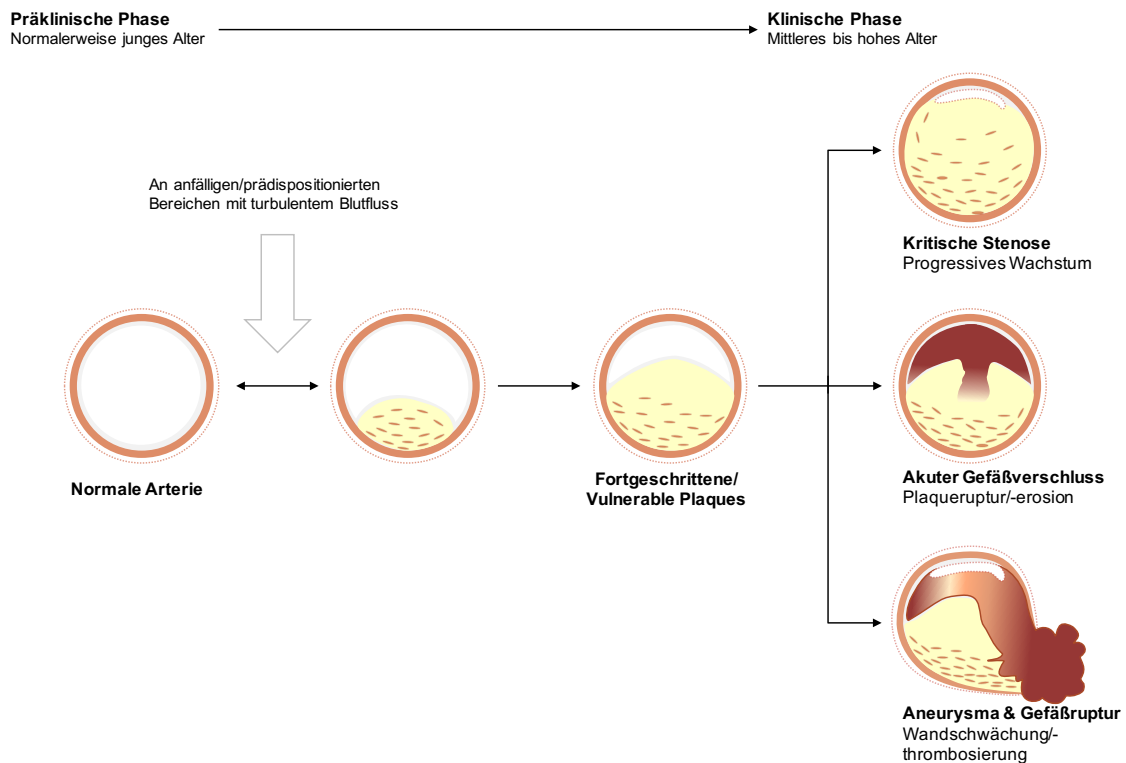


Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf, morphologische Merkmale und klinische Komplikationen der Atherosklerose. Modifiziert nach [3].

1.2 Pathogenese der Atherosklerose

Das geläufigste Konzept zur Entstehung der Atherosklerose, die eng mit diversen Risiko- beziehungsweise Lifestyle-Faktoren (siehe Tabelle 1) assoziiert ist, ist die *response to injury*-Hypothese: Die chronische Entzündungsreaktion stellt demnach eine fehlgeleitete Immunantwort auf eine Schädigung des Gefäßendothels dar, an welcher sowohl proinflammatorische als auch immunregulierende Mechanismen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems beteiligt sind [2].

Nicht-modifizierbar	Modifizierbar
Genetische Störungen	Hyperlipidämie
Familienanamnese	Hypertension
Hohes Alter	Nikotinabusus
Männliches Geschlecht	Diabetes mellitus

Tabelle 1: **Hauptrisikofaktoren für die Entstehung einer Atherosklerose.** Durch präventive Maßnahmen bezüglich der modifizierbaren Risikofaktoren kann das Auftreten sowie die Progression einer Gefäßerkrankung deutlich verringert werden. Modifiziert nach [3].

Vor allem eine chronische Hyperlipidämie und hämodynamische Störungen wie beispielsweise die arterielle Hypertension – zwei Hauptansatzpunkte bisheriger medikamentöser Therapien – führen zu einer funktionellen Veränderung und Aktivierung des Gefäßendothels [3]. Diese endotheliale Dysfunktion ist gekennzeichnet durch eine gesteigerte Permeabilität, eine Veränderung der Genexpression und eine vermehrte Adhäsion von Leukozyten [5]. Infolge einer erhöhten Durchlässigkeit des Endothels lagern sich Lipoproteinpartikel, vor allem *low density lipoprotein* (LDL), subendothelial ab und erfahren hier verschiedenste Modifikationen durch reaktive Sauerstoffspezies und Enzyme sezerniert durch inflammatorische Zellen wie neutrophile Granulozyten und Makrophagen [6]. Insbesondere oxidiertes LDL (oxLDL) induziert über verschiedene *Pattern-Recognition*-Rezeptoren eine lokale Entzündungsreaktion sowie die Aktivierung des angeborenen Immunsystems: Über *Toll-like* Rezeptoren werden Endothelzellen so weiter zur Expression inflammatorischer Chemokine und verschiedener Adhäsionsmoleküle, wie VCAM-1 und E-Selektin, angeregt, was die massenhafte Rekrutierung von Leukozyten nach sich zieht [5] [6]. Im Anfangsstadium werden insbesondere Monozyten, angelockt durch pro-inflammatorische Signale, in die entstehenden Läsionen rekrutiert und differenzieren unter dem Einfluss lokaler Wachstumsfaktoren überwiegend zu Gewebsmakrophagen und dendritischen Zellen [4] [6]. Über *Scavenger*-Rezeptoren, die wie die *Toll-like*-Rezeptoren zu den *Pattern-Recognition*-Rezeptoren gezählt werden, phagozytieren Makrophagen die in der Gefäßwand abgelagerten Lipidpartikel [5] [6]. Da diese jedoch von den Makrophagen nicht vollständig umgesetzt werden können und intrazellulär akkumulieren, kommt es zur Entstehung der für die Atherosklerose charakteristischen lipidbeladenen Schaumzellen [5] [6]. Zeitgleich zur Reaktion des angeborenen Immunsystems kommt es über Antigen-präsentierende Zellen (APC) wie den dendritischen Zellen zur Initiierung der adaptiven Immunantwort [5] [6] [7]. CD4⁺ T-Zellen sind vor allem in der sogenannten Schulterregion atherosklerotischer Plaques nachweisbar

und tragen, wie auch andere T-Zellsubtypen und B-Zellen, durch pro- sowie anti-inflammatorische Mechanismen zur Modulation der Immunantwort bei [5] [6] [7]. Das als *fatty streak* bezeichnete Frühstadium der Atherosklerose besteht hauptsächlich aus Makrophagen sowie T-Zellen [3] [5]. *Fatty streaks* können bereits im Kindesalter nachgewiesen werden und stellen ein noch reversibles Stadium dar [3] [5]. Schreitet die Entzündungsreaktion weiter voran, kommt es über die Jahre durch die fortwährende Sekretion von inflammatorischen Chemo- und Zytokinen zur Entstehung eines voll ausgeprägten Atheroms mit einem nekrotischen Kern, bestehend aus Zelldebris und Cholesterinkristallen [3] [4] [5] [6]. Auch die lokalen glatten Muskelzellen der Gefäßwand werden durch die freigesetzten Mediatoren aktiviert und zur Proliferation sowie zur Synthese extrazellulärer Matrix (EZM), vor allem Kollagen, angeregt [3] [4] [5] [6]. Dadurch bildet sich eine stabilisierende, fibröse Kappe aus glatten Muskelzellen und Kollagen über der atherosklerotischen Läsion [3] [4] [6]. Allerdings kann es beim Überwiegen proinflammatorischer Faktoren zu einer Degradation des Kollagens und so zu einer Ausdünnung dieser stabilisierenden Schicht kommen, was die Plaques vulnerabel für Rupturen macht [3] [4] [6].

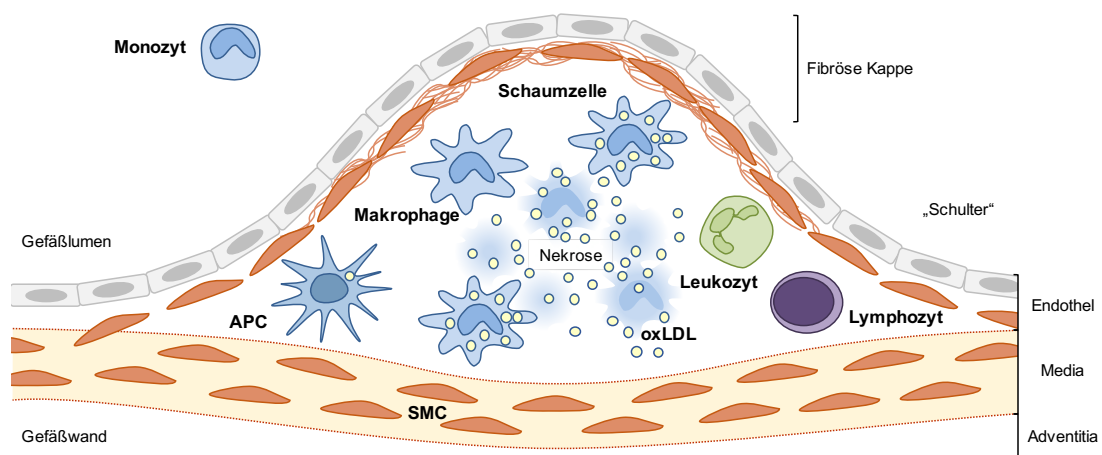


Abbildung 2: **Morphologie einer fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques.** Eine gesteigerte Endothelpermeabilität sowie eine subendotheliale Akkumulation von Lipidpartikeln führen über einen Influx mononukleärer Zellen, eine Rekrutierung glatter Muskelzellen (*smooth muscle cell*, SMC) und eine Produktion extrazellulärer Matrix zu der Entstehung atherosklerotischer Plaques mit fibröser Kappe. Durch die Apoptose lipidbeladener Schaumzellen sowie anderer Zellen entsteht ein nekrotischer Kern aus Zell- und Lipiddebris bzw. Cholesterinkristallen. T-Zellen finden sich überwiegend in der Schulterregion der Plaques. Modifiziert nach [4].

1.3 Experimentelle Mausmodelle

Apolipoprotein E (ApoE)- und LDL-Rezeptor (LDLR)-defiziente Mäuse sind häufig verwendete Tiermodelle, anhand derer die spezifische Rolle einzelner Komponenten des Immunsystems in der Atherosklerose untersucht werden können. Durch die Deletion dieser für den Cholesterinstoffwechsel relevanten Gene besteht in diesen Modellorganismen eine ererbte Neigung zur Entwicklung atherosklerotischer Plaques – pathogenetisch vergleichbar mit den familiären Hyperlipoproteinämien des Menschen [5] [6] [8]. Lipoproteine dienen dem Transport von Cholesterin und Triglyceriden im Blut und bestehen neben einem hydrophoben Lipidkern aus einer amphiphilen Hülle [3]. Apolipoproteine, welche zur strukturellen Integrität sowie der Rezeptorerkennung der Lipoproteinpartikel beitragen, sind Teil dieser Hülle [3]. Die genetische Deletion von ApoE führt durch die gestörte Clearance der aus der Nahrung aufgenommenen Fette zu einer spontanen Hypercholesterinämie und prä-maturen Entstehung von Atherosklerose [9]. Ein Knockout des ubiquitär exprimierten LDL-Rezeptors führt hingegen nur unter einer fettreichen Ernährungsweise, der sogenannten *western-type diet*, zur Ausbildung atherosklerotischer Läsionen [10].

Das in den Tiermodellen beobachtete Spektrum atherosklerotischer Läsionen reicht von schaumzellreichen *fatty streaks* bis zu Atheromen mit nekrotischem Kern [8]. Zur Untersuchung von Plaquerupturen und deren Komplikationen sind die Tiermodelle weniger geeignet, da instabile, vulnerable Plaques kaum zu beobachten sind [6] [8]. Auch wenn es inzwischen gelungen ist, in ApoE^{-/-} Mäusen Plaquerupturen zu simulieren, so bleibt die Übertragbarkeit dieses Modells auf den Menschen doch fraglich [11]. Für Untersuchungen atherosklerotischer Komplikationen und vor allem für valide Aussagen bezüglich der Atherogenese und Plaqueprogression im menschlichen Organismus sind daher histopathologische und klinische Studien unabdingbar [5] [6]. Trotz ihrer Begrenzungen und gewissen pathophysiologischen Unterschieden zum Menschen erleichtern die atherosklerotischen Tiermodelle es, grundlegende Pathomechanismen und die Rolle verschiedener Komponenten des Immunsystems erkennen zu können [5] [6] [8].

1.4 Chemokine und deren Funktionen

Als Chemokine wird eine Familie strukturverwandter Proteine bezeichnet, welche – ebenso wie ihre Rezeptoren – anhand des Motivs konservierter Cystein-Residuen am

N-Terminus der Aminosäuresequenz in vier Subgruppen unterteilt werden: C-C, C-X-C, C-X₃-C und X-C [12] [13]. Chemokinrezeptoren (bezeichnet mit der jeweiligen Aminosäuresequenz und der Endung -R) zählen zu der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und können oft mehrere Chemokine derselben Untergruppe binden [12]. Dies gilt umgekehrt auch für die Chemokinliganden (bezeichnet mit der jeweiligen Aminosäuresequenz und der Endung -L) [12].

Die Migration von im Blut zirkulierenden Leukozyten an den Ort der Entzündung ist essentiell für die Funktion des angeborenen und adaptiven Immunsystems – so auch in der Atherosklerose [5] [6] [12] [13]. Chemokine und Chemokinrezeptoren, die sowohl von Leukozyten als auch von Endothel- und glatten Muskelzellen exprimiert werden, tragen wesentlich zu diesem Migrationsvorgang bei [13] [14]. Das Chemokin-Rezeptor-Netzwerk ist dabei vor allem für seine chemotaktischen Fähigkeiten bekannt: anhand eines Gradienten erfolgt eine Mobilisierung von Leukozyten aus dem Knochenmark und der Milz sowie deren Rekrutierung an den Ort der Entzündung, beziehungsweise in die atherosklerotische Plaques [6] [12] [13] [15]. Die Promiskuität und vermeintliche Redundanz der Chemokin-Rezeptor-Familie spielen dabei eine essentielle Rolle in der räumlichen und zeitlichen Koordination der Leukozytenrekrutierung und verleihen dem System eine gewisse Robustheit [12] [13]. Neben der Anlockung von Leukozyten mittels Chemotaxis können Chemokine auch den Zellarrest an entzündlich verändertem Endothel vermitteln: zum einen mittels direkter Chemokin-Rezeptor-Interaktionen, zum anderen durch eine *inside-out* Aktivierung von Integrinen über die Signalkaskade G-Protein-gekoppelter Rezeptoren [16]. Beides, die Chemotaxis und der Arrest von Leukozyten, sind wichtige Schritte für die Entstehung und den Unterhalt atherosklerotischer Läsionen [17]. Darüber hinaus nehmen Chemokine weitere, weniger prominente Funktionen ein: Chemokine können immunmodulatorische Effekte vermitteln und sind zudem für die Homöostase der Immunzellen und deren Überlebensdauer wichtig [13]. Auch eine mögliche Rolle in der Regression atherosklerotischer Läsionen wird diskutiert [13].

1.5 Monozytensubtypen und deren Homöostase

Monozyten und deren gewebsständigen Abkömmlingen, den Makrophagen und dendritischen Zellen, kommt eine Schlüsselrolle in der Initiierung der angeborenen sowie der adaptiven Immunantwort zu [5]. Anhand der Expression verschiedener Ober-

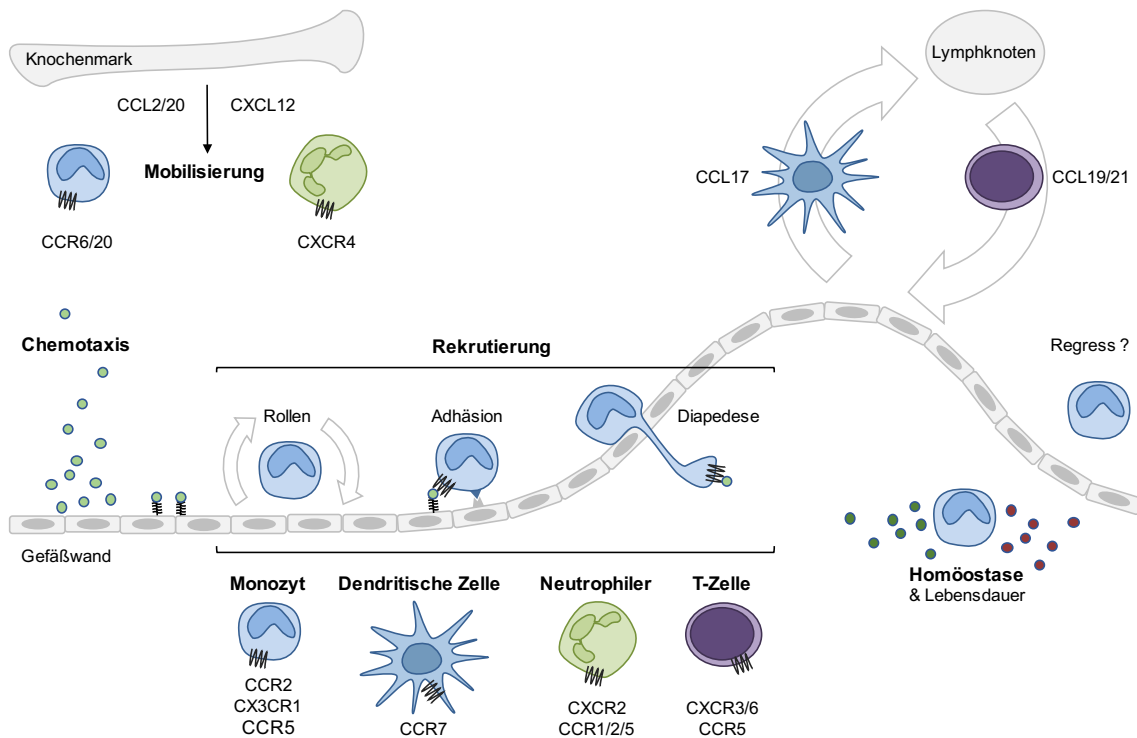


Abbildung 3: **Chemokine und deren Rezeptoren in der Atherosklerose.** Monozyten und Neutrophile werden via CCL2/-20 respektive CXCL12 aus dem Knochenmark mobilisiert. Von dendritischer Zellen sezerniertes CCL17 sowie CCL19/-21 scheinen eine Rolle im *Priming*, der Expansion und Rezirkulation von T-Zellen zu spielen. Per Chemotaxis angelockte Immunzellen werden über Chemokine und deren Rezeptoren in atherosklerotische Plaques rekrutiert. Dieser Vorgang besteht aus dem Rollen der Leukozyten entlang des aktivierten Endothels, deren fester Adhäsion und anschließende transendothelialen Migration. Endothelial immobilisierte Chemokine triggern den Leukozytenarrest über eine G-Protein-Rezeptor-vermittelte Integrinaktivierung. Welche Rolle Chemokine im Zellegress spielen, konnte bisher nicht sicher geklärt werden. Einige Chemokine respektive -rezeptoren sind jedoch an der Homöostase der Plaquezellen und deren Überlebensdauer beteiligt. Modifiziert nach [6], [18].

flächenmarker und Chemokinrezeptoren lassen sich Monozyten in Subgruppen – klassisch, intermediär und nicht-klassisch – unterteilen, die unterschiedliche Funktionen in der Homöostase und im Rahmen von Entzündungsreaktionen ausüben [13] [15] [19] [20]. Bei Mäusen werden mindestens zwei große Gruppen von Monozyten unterschieden: die klassischen Gr-1^{high} (oder Ly-6C^{high}) CCR2⁺ Monozyten, welche spezifisch bei Entzündungsreaktionen rekrutiert werden, sowie die nicht-klassischen, residenten Gr-1^{low} (oder Ly-6C^{low}) CX3CR1⁺ Monozyten, die vor allem gesundes Gewebe unter homöostatischen Bedingungen patrouillieren [19] [21]. Es ist bekannt, dass Hypercholesterinämie, ein Hauptrisikofaktor für die Entstehung von Atherosklerose, eine systemische Monozytose nach sich zieht, welche vor allem durch eine selektive Expansion der Gr-1^{high} Subgruppe bedingt wird [21] [22] [23]. Die Anzahl der bei Hypercholesterinämie zirkulierenden Monozyten wird dabei durch verschiedene Chemokine und deren Rezeptoren reguliert und korreliert direkt mit dem Ausprägungsgrad der Atherosklerose [4] [23] [24] [25]. Durch die gleichzeitige Inhibition mehrerer Chemokinrezeptoren, insbesondere von CCR2, CCR5 und CX3CR1, kann die Zahl der zirkulierenden Monozyten gesenkt und deren Rekrutierung in die Gefäßwand blockiert werden, so dass in an Hypercholesterinämie leidenden Knockout-Mäusen die Bildung von atherosklerotischen Läsionen beinahe vollständig unterbunden wird [24]. Die Rekrutierung und Differenzierung von Monozyten, insbesondere der Gr-1^{high} Monozyten, ist vor allem für die Entstehung atherosklerotischer Läsionen ein essentieller Schritt [17] [26]. In späteren Atherosklerosestadien spielt zudem die lokale Proliferation der Plaquemakrophagen selbst für die Expansion und Aufrechterhaltung der subendothelialen Makrophagenpopulation eine tragende Rolle [26]. Zudem wird ein kleiner Anteil der Plaquemakrophagen aus einer Transdifferenzierung von glatten Muskelzellen sowie der Proliferation aus Intima-ständigen multipotenten vaskulären Stamm- und Vorläuferzellen generiert [17].

Die murinen Subtypen der klassischen und der nicht-klassischen Monozyten entsprechen in etwa den CD14^{high}CD16⁻ und den CD14^{low}CD16⁺ Monozyten des menschlichen Organismus [13] [15] [19] [27]. Es existieren jedoch auch einige Unterschiede zwischen den Monozytensubtypen dieser Spezies, weshalb eine direkte Übertragung von Erkenntnissen aus dem Mausmodell auf die Vorgänge im Menschen erschwert ist [4] [13] [15] [20] [28].

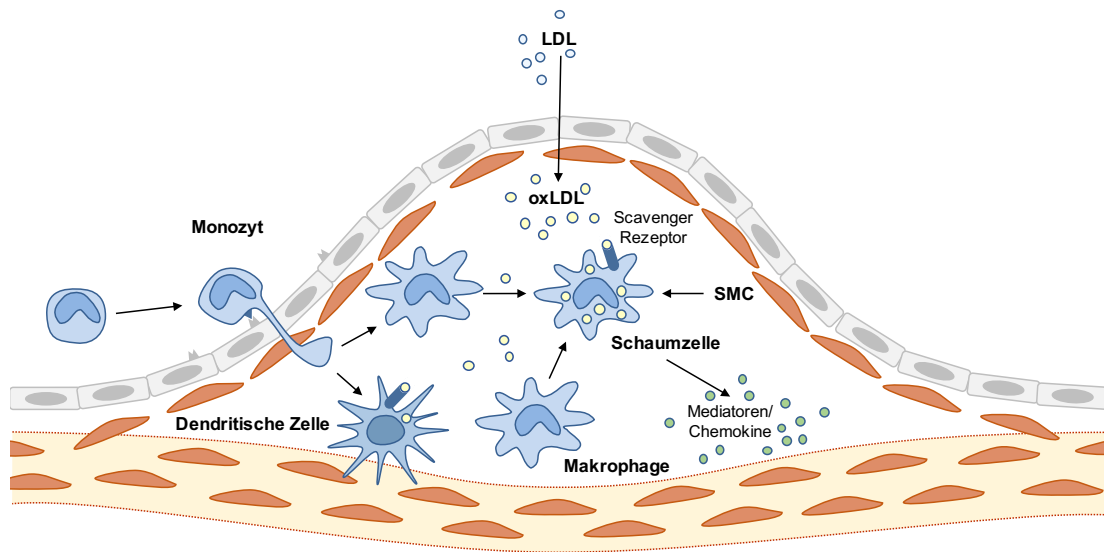


Abbildung 4: **Angeborene Immunabwehr in der Atherosklerose.** Intimale Lipidablagerungen führen zur vermehrten Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle und der Rekrutierung von Monozyten. Diese differenzieren unter dem Einfluss lokaler Wachstumsfaktoren zu Makrophagen oder dendritischen Zellen. Zudem wird der Pool der Plaquemakrophagen aus gewebständigen Makrophagenpopulationen gespeist und auch glatte Muskelzellen (*smooth muscle cells*, SMC) können in Makrophagen-ähnliche Zelltypen transdifferenzieren. Eine *Scavenger*-Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Lipidpartikeln führt zur Bildung von sogenannten Schaumzellen sowie zur Freisetzung inflammatorischer Mediatoren. Auch Antigen-präsentierende Zellen (APC) wie die dendritischen Zellen nehmen via *Scavenger*-Rezeptoren Lipidpartikel auf und initiieren die Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Modifiziert nach [6], [29].

1.6 Rolle des adaptiven Immunsystems

Neben dem angeborenen Immunsystem wird die Entstehung atherosklerotischer Läsionen und deren Progression auch durch Zellen des adaptiven Immunsystems, den T- und den B-Lymphozyten, moduliert [5] [6] [4]. Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem sind Antigen-präsentierende Zellen (APCs), wie die dendritischen Zellen (DCs), über welche es zur Aktivierung naiver T-Zellen kommt [4] [5] [6].

Sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen wurde im Rahmen der Atherosklerose eine systemische T-Zellaktivierung beschrieben [7] [30] [31]. Vor allem die verschiedenen $CD4^+$ T-Helferzelllinien, welche anhand ihres Zytokinprofils charakterisiert werden, nehmen in der Atherosklerose eine zentrale Rolle ein: Hauptsächlich Interferon (INF)- γ produzierende Th1- und Interleukin (IL)-17 sezernierende Th17-Zellen werden in atherosklerotisch veränderten Gefäßen nachgewiesen [5] [7]. Während die pro-atherosklerotischen Eigenschaften von Th1-Zellen gut erforscht sind [14], ist die Rolle von Th17-Zellen in der Atherosklerose immer noch schwer zu erfassen, da bisher veröffentlichte Ergebnisse zu widersprüchlichen Schlüssen gelangt sind [30] [32] [33]. Auch die Bedeutung von Th2-Zellen, welche in einer sehr geringen Frequenz in atherosklerotischen Plaques zu finden sind, ist noch nicht klar definiert, wobei eine protektive Wirkung dieses Subtyps vermutet wird [17] [30] [34]. Einem anderen $CD4^+$ T-Zellsubtyp, den IL-10- und TGF- β -sezernierenden regulatorischen Foxp3⁺T-Zellen (Tregs), konnte hingegen eindeutig eine vor Atherosklerose schützende Wirkung nachgewiesen werden [30]: Auch wenn die genauen Mechanismen der Immunmodulation durch Tregs noch unbekannt sind, so konnte gezeigt werden, dass ein sinkendes Verhältnis von regulatorischen zu anderen T-Effektorzellen mit der Progression sowie der Ruptur atherosklerotischer Plaques assoziiert ist [35]. Darüber hinaus wurde ein indirekter protektiver Effekt der regulatorischen T-Zellen durch Einflussnahme auf die Lipidhomöostase in Mäusen beschrieben [36]. Neben den $CD4^+$ T-Zellen, finden sich auch $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen (*cytotoxic T-lymphocyte*, CTL) und diverse andere T-Zellsubtypen in atherosklerotischen Läsionen, deren Bedeutung in der Genese und der Progression der Atherosklerose zum Teil noch nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte [17] [31].

In Analogie zu den T-Zellen werden auch durch die verschiedenen B-Zellsubtypen und die von ihnen produzierten Antikörper heterogene, subtyp- beziehungsweise klassenspezifische Effekte vermittelt: Follikuläre B2-Zellen scheinen durch eine verstärkte Aktivierung proatherogener T-Effektorzellen die Progression atherosklerotischer Läsionen zu begünstigen [6] [31]. Den von den B2-Zellen sezernierten spezi-

fischen IgG-Antikörpern wird hingegen eher eine protektive Rolle zugesprochen [6] [31]. B1-Zellen und natürliche Antikörper vom IgM-Typ, welche dem angeborenen Immunsystem zugerechnet werden, wirken ebenfalls atheroprotektiv [6] [31].

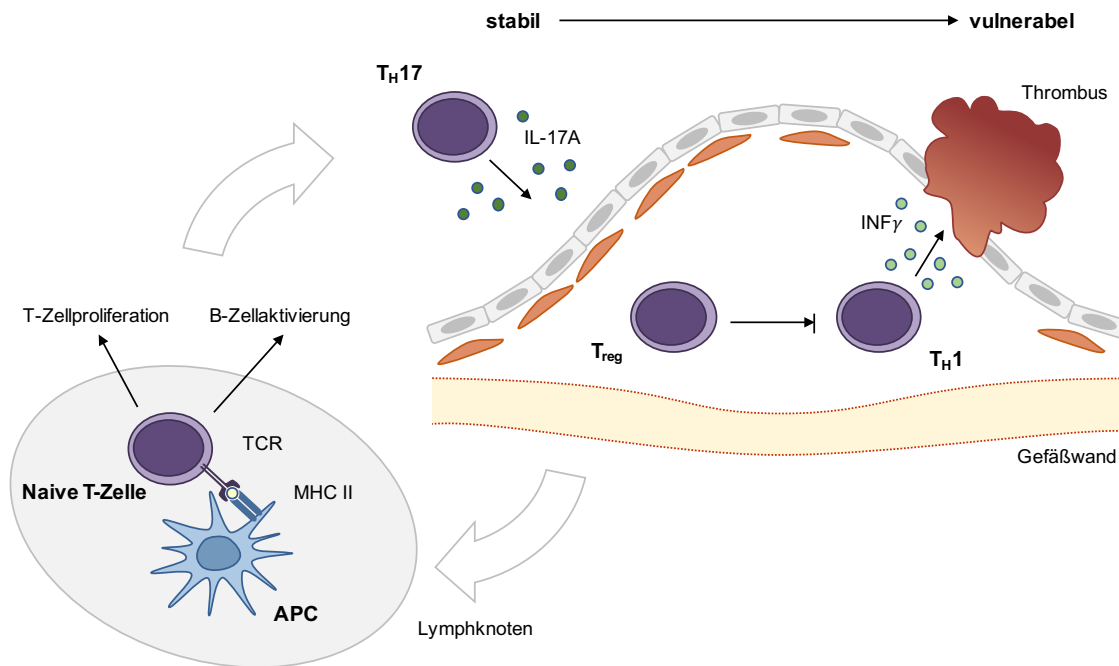


Abbildung 5: **Adaptive Immunabwehr in der Atherosklerose.** Antigen präsentiierende Zellen (APC) vermitteln über die Präsentation verschiedener Plaque-Antigene die Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Das adaptive Immunsystem spielt eine entscheidende Rolle in der Entstehung, Stabilität und Ruptur atherosklerotischer Läsionen. Von Th17 T-Zellen sezerniertes IL-17A unterstützt die Plaquestabilität via Kollagenproduktion durch die glatten Muskelzellen. Th1-Zellen sezernieren INF- γ , welches zu einer Makrophagenaktivierung und einer Degeneration der stabilisierenden fibrösen Kappe führt und somit die Vulnerabilität der Plaques begünstigt. Regulatorische T-Zellen (Tregs) modulieren die inflammatorischen Prozesse anderer T-Helferzellen. Modifiziert nach [29].

1.7 CCR6 und CCL20 in der Atherosklerose

Die Superfamilie der Chemokine ist für ihre Heterogenität und Promiskuität bekannt, jedoch sind in der Literatur auch einige exklusive Chemokin-Rezeptor-Paare beschrieben, wie der C-C Chemokinrezeptor Typ 6 (CCR6) und sein Chemokinligand, das *macrophage inflammatory protein-3 α* CCL20 [37] [38].

Beide sind in humanen atherosklerotischen Plaques im Gegensatz zu gesunden, nicht verkalkten Gefäßen vermehrt nachweisbar [39]. Auch im ApoE^{-/-} Tiermodell wurde eine Expression von CCR6 und CCL20 in den Aorten erkrankter Tiere nachgewiesen [40]. Ferner sind die CCL20-Serumspiegel bei Patienten, welche an Hypercholesterinämie leiden, erhöht [41]. Daher ist zu vermuten, dass der Chemokinrezeptor CCR6, der sowohl von Monozyten [40] als auch von Zellen des adaptiven Immunsystems, wie den Th17 T-Zellen [42] und den regulatorischen T-Zellen [43], exprimiert wird, pleiotrope Effekte in der Pathogenese der Atherosklerose durch die Modulation des angeborenen sowie des adaptiven Immunsystems bewirkt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass CCR6 die Plaquentstehung in ApoE^{-/-} Mäusen durch die Mobilisierung von Monozyten aus dem Knochenmark in die Zirkulation sowie die Chemotaxis und Akkumulation von Monozyten beziehungsweise Makrophagen in die Plaques begünstigt [40].

Eine mögliche direkte Rolle von CCR6 in der Zelladhäsion sowie der Homöostase von Th17 T-Zellen und regulatorischen T-Zellen wurden bisher jedoch noch nicht definiert und soll daher Gegenstand der vorliegenden Dissertation sein.

2 Materialien

2.1 Tiermodell

B6.129S7-Ldlr ^{tm1Her} /J	Jackson Laboratories, USA
B6.129P2-Ccr6 ^{tm1Dgen} /J	Jackson Laboratories, USA
<i>Western type</i> Diät	Altromin, Deutschland

2.2 Zellkultur

MONO-MAC 6	vergleiche PMID: 3162233 [44]
HUVEC	PromoCell, Deutschland
SVEC	LGC Standards GmbH, Deutschland
Collagen G	Biochrom, Deutschland
DMEM / Dulbecco's Modified Eagle's medium	Thermo Fisher Scientific, USA
Endothelial Cell Growth Medium	PromoCell, Deutschland
FBS / Gibco® fetal bovine serum	Sigma Aldrich, USA
HISTOPAQUE 1083	Sigma Aldrich, USA
LPS / Lipopolysaccharides	Sigma Aldrich, USA
TNF-alpha, Mouse (aa 80-235)	R&D Systems, USA
12 well Chamber, removabel	Ibidi, Deutschland

2.3 Kits

Amplex Red Cholesterol Assay Kit	Invitrogen, USA
ChemMate™Detection Kit,Peroxidase/DAB	Dako, Dänemark
Cytofix/Cytoperm™Kit	BD Biosciences, Deutschland
EnzyChrom™Triglyceride Assay Kit	BioAssay Systems, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, USA

2.4 Antikörper

Alexafluor 488-conjugated Antibody	Molecular Probes, Deutschland
CD3 (clone 500A2 oder 17A2)	BD Biosciences, USA
CD4 (clone RM4-5 or GK1.5)	eBioscience, Deutschland
CD8a (clone 53-6.7)	BD Biosciences, USA
CD11b (clone M1/70)	eBioscience, Deutschland
CD11c (clone N418)	eBioscience, Deutschland
CD19 (clone 1D3)	BD Biosciences, USA
CD44 (clone 1M7)	eBioscience, Deutschland
CD45 (clone 30-F11)	BD Biosciences, USA
CD62L (clone MEL-14)	BD Biosciences, USA
CD115 (clone AFS98)	eBioscience, Deutschland
Gr-1 (clone RB6-8C5)	BD Biosciences, USA
CD18 (cloneM18/2)	eBioscience, Deutschland
CD29 (clone HMB1-1)	eBioscience, Deutschland
CD49d (clone R1-2)	eBioscience, Deutschland
FoxP3 (clone FJK-165)	eBioscience, Deutschland
IFN γ (clone XMG1.2)	BD Biosciences, USA
IL-17a (clone eBio17B7)	eBioscience, Deutschland
α -Smooth Muscle-Cy3 (C6198, clone 1A4)	Sigma Aldrich, USA
Anti-MIP-3- α (ab9829)	Abcam, United Kingdom
CD3 (MCA1477, clone CD3-12)	AdB Serotec, Deutschland
Human CCL20/MIP-3- α (AF360)	R&D Systems, USA
Mac2 (CL8942AP, clone M3/38)	Cedarlane, Kanada
Goat IgG Isotype Control	R&D Systems, USA
Rabbit IgG Isotype Control	R&D Systems, USA

2.5 (Oligo-)Nukleotide

Random Hexamer Primers	Fermentas, Deutschland
Spezifische Primerpaare	Eurofins MWG Operon, Germany
- humanes CCL20:	5'-GCTGCTACTCCACCTCTGCG-3' 5'-ATTGGCCAGCTGCCGTGTGA-3'
- humane HPRT:	5'-GGCTCCGTTATGGCGACCCG-3' 5'-CGAGCAAGACGTTTCAGTCCTGTCC-3'
- murines CCL20:	5'-GCCTCTCGTACATACAGACGC-3' 5'-CCAGTTCTGCTTTGGATCAGC-3'
- murine HPRT:	5'-TCCTCCTCAGACCGCTTT -3' 5'-CCTGGTTCATCATCGCTAATC-3'

2.6 Lösungen und Puffer

BSA / Bovine Serum Albumin	Sigma Aldrich, USA
PBS / Phosphate-Buffered Saline	Thermo Fisher Scientific, USA
HBSS / Hanks Buffered Saline Solution	Thermo Fisher Scientific, USA
HEPES	Sigma Aldrich, USA
HANKs complete:	500 ml HBSS 1 ml 30% BSA in PBS 1,5 ml 100 mM EDTA
Red Blood Cell Lysis Buffer:	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA

2.7 Chemikalien und Reagenzien

Acetaldehyde Solution	Sigma Aldrich, USA
Basic Fuchsin	Sigma Aldrich, USA
BCECF-AM	Molecular Probes, USA
Calcein-AM	Molecular Probes, USA
Hämalaunlösung	Sigma Aldrich, USA
Liberase Blendzyme TL (#3)	Roche, Deutschland
Oil-red-O	Sigma Aldrich, USA
PFA / Paraformaldehyde	Sigma Aldrich, USA
Rhodamin 6G Chloride	Molecular Probes, USA
Sirius Red/Direct red	Sigma Aldrich, USA
VECTORSHIELD mounting medium	Vector laboratories, USA

2.8 Geräte

7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, USA
ASP200 S Gewebeinfiltrationsautomat	Leica, Deutschland
BX51 Fluorescence Microscope	Olympus, Japan
DM 4000B Fluoreszenzmikroskop	Leica, Deutschland
DVM-700 hard disk-Recorder	JVC, Japan
EM-CCD Camera C9100	Hamamatsu, Japan
FACSCanto II Flow Cytometer System	Becton Dickson, USA
Flowchamber	Haustechnik LMU, Deutschland
FY-550 Video Camera	JVC, Japan
IX50 Inverted Fluorescence Microscope	Olympus, Japan
KX-21N-Hematology-Analyzer	Sysmex, Deutschland
KY-F75U Digital Imaging Camera	JVC, Japan
RM2255 Rotationsmikrotom	Leica, Deutschland

2.9 Software

Cell-R Software	Olympus, Japan
Diskus Software	Hilgers, Deutschland
FlowJo 7.6 Software	Treestar Inc., USA
Prism 6.0 Software	GraphPad Software Inc., USA

2.10 Verbrauchsmaterialien

Sofern nicht anders angegeben wurden alle Verbrauchsmaterialien von Hartenstein, Deutschland bezogen.

3 Methoden

3.1 CCR6-defizientes Tiermodell

Um ein Atherosklerose anfälliges Tiermodell mit gleichzeitigem CCR6-Knockout zu erhalten, wurden CCR6-defiziente ($Ccr6^{-/-}$) Mäuse mit *low density lipoprotein* Rezeptor (LDLR) defizienten ($Ldlr^{-/-}$) Mäusen gekreuzt. Die $Ccr6^{-/-}$ sowie die $Ldlr^{-/-}$ Tiere wurden von den Jackson Laboratories bezogen und miteinander verpaart. Beide Linien entstammen dem genetischen Hintergrund der C57BL/6J-Mäuse. Die Genotypisierung der gezüchteten Tiere erfolgte mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR). Die unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehaltenen $Ldlr^{-/-}$ und $Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-}$ Mäuse erhielten ab dem Alter von acht Wochen eine achtwöchige, fettreiche *western-type* Diät (15% Milchfett, 1,25% Cholesterin). Vor jeglicher Entnahme von Geweben wurden die Tiere durch Genickbruch getötet. Alle Tierversuche wurden durch die zuständige behördliche Instanz, die Regierung von Unterfranken, genehmigt (Aktenzeichen der Tierversuchsgenehmigung: 55.2-2531.01-37/09) und die Einhaltung der deutschen Tierrechtsbestimmungen sichergestellt.

3.2 Immunhistochemische Analyse muriner Plaques

Mittels immunhistochemischer Färbungen wurden die Größe, der Kollagengehalt und die zelluläre Zusammensetzung der atherosklerotischen Läsionen analysiert. Die Arterien wurden hierfür *in situ* mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (*phosphate-buffered saline*, PBS) und 4%igem Paraformaldehyd (PFA) gespült, den Tieren entnommen und über Nacht in PFA perfusionsfixiert. Das Herz sowie die gesamte Aorta wurden herauspräpariert, vorsichtig von dem umgebenden Fett befreit und ebenfalls in 4%igem PFA fixiert. Die fixierten Gefäße, Herzen und Aortenwurzeln wurden in einem Gewebeeinfiltrationsautomaten entwässert, anschließend in Paraffin eingebettet und 5 μ m starke Gewebeschnitte hergestellt.

Das Gesamtausmaß der atherosklerotischen Läsionen der thorakoabdominalen Aorta wurde durch eine Färbung für Lipidablagerungen mit dem fettlöslichen, rot färbenden Azofarbstoff *Oil-red-O* (vgl. [45]) beurteilt. Die Flächenbestimmung der atherosklerotischen Plaques in Schnitten der Aortenwurzel erfolgte nach einer Färbung

mit *Picrosirius red*- und *Gabe's Aldehyde Fuchsin*-Lösung für Kollagen- und Elastinfasern. Dazu wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert und rehydriert, um anschließend mit obengenannten Lösungen gefärbt zu werden.

Die an den Bereich der Aortenwurzel angrenzenden Schnitte wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung zur Bestimmung der Zellzusammensetzung des Plaques und dessen Gehalt an Makrophagen, CD3⁺ T-Zellen und glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells*, SMC) herangezogen. Zur Durchführung solch einer Färbung erfolgt zunächst ein Antigen *retrival* - hier mittels Citratmethode - zur Wiederherstellung der Immunreaktivität der Oberflächenepitope der eingebetteten Schnitte, gefolgt von einer Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen mit 1%igem bovinem Serumalbumin (BSA). Anschließend wurden die Schnitte mit spezifischen, primären Antikörpern (*mAb-staining*) über Nacht bei 4° Celsius inkubiert werden. Hier wurden die primären Antikörper *Mac2* (# CL8942AP, Cedarlane, Kanada) gegen Makrophagen, *CD3* (# MCA1477, AdB Serotec, Deutschland) gegen CD3⁺ T-Zellen und *α-smooth muscle actin* (# C6198, Sigma Aldrich, USA) gegen glatte Muskelzellen für das *mAb-staining* verwendet. Die Detektion der *Mac2*- und *CD3*-Antikörper erfolgte mittels einem mit dem Fluoreszenzfarbstoff *Alexafluor 488*-konjugierten, sekundären Antikörper von Molecular Probes, Deutschland. Der primäre *α-smooth muscle actin* Antikörper ist bereits mit dem Cyanin-Fluoreszenzfarbstoff *Cy3* konjugiert, so dass zu dessen Detektion kein Zweitantikörper vonnöten war. Zur Darstellung der Zellnuclei wurden die Schnitte mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) gegengefärbt, welches in dem verwendeten Eindeckmittel *vectorshield mounting medium* enthalten ist.

Alle Bilder zur Analyse der immunhistologischen Färbungen wurden mit einem Leica *DM 4000B* Fluoreszenzmikroskop und einer JVC *KY-F75U* Kamera aufgenommen und die Größe der Plaques sowie deren Kollagen- und Zellgehalt mit *Diskus*, einer Software für digitale Bildanalyse, quantitativ ausgewertet. Das Gesamtausmaß der atherosklerotischen Läsionen der thorakoabdominalen Aorta wurde durch den Quotienten aus der Fläche angefärbter Lipidablagerungen und der Gesamtoberfläche der der Länge nach eröffneten, ausgebreiteten Aorta ermittelt. Der Kollagengehalt der Aortenwurzel wurde unter polarisiertem Licht bestimmt: Der Quotient aus dunkel imponierender Fläche und Plaquesgesamtfläche gibt hierbei den prozentualen Gehalt an Kollagen wieder. Die zelluläre Zusammensetzung der Plaques wurde bestimmt, indem die für den jeweiligen Zelltyp positive Fläche und die Anzahl der Zellkerne innerhalb dieser Fläche ermittelt und mit der Plaquesgesamtfläche ins Verhältnis gesetzt wurden.

3.3 Immunhistochemische Analyse von CCL20 in humanen Plaques

Die immunhistochemische Analyse von CCL20 in atherosklerotischen Plaques wurden von Herrn Dr. Clément Cochain, Mitarbeiter des Instituts für Experimentelle Biomedizin des Universitätsklinikums Würzburg, in Kooperation mit Herrn PD Dr. Jaroslav Pelisek, Mitarbeiter der Klinik für Vaskuläre und Endovaskuläre Chirurgie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, durchgeführt. Für die Analyse wurden repräsentative Schnitte von Gewebeproben menschlicher Halsschlagadern verwendet. Die Gewebeproben entstammen Patienten ($n = 5$), die aufgrund einer hochgradigen Karotisstenose ($> 70\%$) eine Karotisendarterektomie in der Klinik für Vaskuläre und Endovaskuläre Chirurgie am Klinikum rechts der Isar erhalten haben. Bei einer Endarterektomie wird durch Ausschälung der atherosklerotischen Plaques, zum Teil unter Mitnahme von einigen Schichten der Gefäßwand, versucht, die Stenose des betroffenen Gefäßes zu beseitigen.

Das den Karotiden entnommene Plaquetgewebe wurde in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet, anschließend wurden $5 \mu\text{m}$ starke Schnitte hergestellt. Um die Expression von CCL20 in den Plaques zu analysieren, wurde ein *mAB-stainings* durchgeführt (vgl. 3.2). Dazu wurden die Schnitte mit dem CCL20-Antikörper *goat anti-human CCL20/MIP-3 alpha* von R&D Systems beziehungsweise einer *goat*-Isotypkontrolle inkubiert. Die Visualisierung des primären Antikörpers erfolgte mit Hilfe des *peroxidase/DAB ChemMate Detection Kit* gemäß der Herstellerangaben. Zur Darstellung der Zellnuclei wurde eine Hämatoxylinfärbung durchgeführt.

Alle Bilder wurden mit einem Leica *DM 4000B* Fluoreszenzmikroskop und einer JVC *KY-F75U* Kamera aufgenommen. Die Analyse erfolgte mit der Software *Diskus* (vgl. 3.2).

3.4 Enzymatische Gewebeverdauung und Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie können verschiedene Zelltypen anhand von Größe, Granularität und/oder spezifischer Färbungen, zum Beispiel mit Antikörpern gegen Oberflächenantigene, detektiert und quantifiziert werden. Hier wurde diese Methode zur Analyse von aus Blut, Knochenmark, Milz und Lymphknoten stammenden

Zellen angewandt. Die Auszählung der Blutzellen wurde mit einem automatischen Blutanalysegerät von Sysmex durchgeführt. Zur Probenvorbereitung für die zytometrische Messung wurde das den Tieren entnommene Vollblut mit einem Erythrozytenlysepuffer versetzt und für 10 Minuten bei 4° Celsius lysiert, um anschließend die Leukozyten daraus isolieren zu können. Die entnommenen Milzen, Lymphknoten und das aus den Femurknochen der Tiere gewonnene Knochenmark wurden durch Filter mit einer Porengröße von 70 μm gegeben, um eine Suspension einzelner Zellen zu erhalten. Die Aorta der Tiere wurde im Gesamten heraus präpariert, mit PBS gespült und mittels Liberase-Lösung für 30 Minuten bei 37° Celsius enzymatisch verdaut. Die so hergestellten Einzelzellsuspensionen der verschiedenen Gewebe wurden in *Hanks Buffered Saline Solution* (HBSS) resuspendiert und manuell mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Anschließend erfolgte eine Fluoreszenzfärbung aller Suspensionen mit einer Kombination aus spezifischen Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD45, CD11b, CD11c, CD115, Gr-1, CD19, CD3, CD4, CD8a, CD44, CD62L, CD18, CD49d und CD29 sowie gegen die intrazellulären Zytokine IFN γ und IL-17a und den Transkriptionsfaktor FoxP3 - die Inkubation erfolgte für 30 Minuten auf Eis. Das intrazelluläre Labeling von IL-17A, INF γ und FoxP3 benötigte einen vorhergehenden Permeabilisierungsschritt, welcher mit Hilfe des *Cytofix/CytopermTMKit* gemäß Herstellerangaben durchgeführt wurde. Alle Proben wurden mittels eines *FACSCanto II* gemessen und mit dem Programm *FlowJo 7.6* analysiert.

Die durchflusszytometrische Analyse mittels CD18-, CD49d- und CD29-Antikörpern bezüglich der Integrinexpression der Ldlr^{-/-} und Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-} Tiere wurde von Herrn Dr. Clément Cochain, Mitarbeiter des Instituts für Experimentelle Biomedizin des Universitätsklinikums Würzburg, durchgeführt.

3.5 *Air pouch*-Modell für Zellrekrutierung

Ein subkutaner Luftpolster (*air pouch*) kann als Modell herangezogen werden, um den Zellinflux und die Produktion inflammatorischer Mediatoren während einer akuten Entzündungsreaktionen *in vivo* zu untersuchen [46]. Durch die subkutane Injektion steriler Luft in den Rücken von Versuchstieren wird ein *air pouch* geschaffen, in welchen ein entzündungsvermittelnder Reizstoff injiziert wird, um eine akute Immunantwort zu provozieren [46].

Hier wurde bei zehn bis elf Wochen alten Ldlr^{-/-} und Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-} Mäusen an Tag

0 und 4 ein solches subkutanes Luftreservoir angelegt. Die Injektion der sterilen Luft erfolgte unter Sedierung der Tiere mit Isofluran. An Tag 5 wurde entweder muriner Tumornekrosefaktor (TNF) α (50 ng/mL, in 1 mL sterilem PBS) oder PBS in die Luftpolster injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden wurde den Versuchstieren Blut entnommen, bevor die Tiere terminiert und die Reservoirs mit 2 mL HBSS gespült wurden. Die absoluten Zellzahlen der Spülflüssigkeit wurden manuell ausgezählt. Die Auszählung der Blutzellen erfolgte mit einem automatischen Blutanalysegerät von Sysmex. Das Vollblut der Tiere sowie die Spülflüssigkeit der Luftpolster wurden für die anschließende Analyse mittels Durchflusszytometrie weiterverarbeitet (vgl. 3.4).

3.6 HUVEC-Kultur und Immunfluoreszenzfärbung kultivierter Zellen

Endothelzellen menschlicher Nabelvenen (*human endothelial cells*, HUVECs) wurden auf Objektträgern von Ibidi in *Endothelial Cell Growth Medium* bis zum Erreichen eines subkonfluenten Wachstums kultiviert. Die Objektträger wurden zuvor mit einer in PBS verdünnten 0,4%igen Kollagenlösung inkubiert, da eine Kollagenbeschichtung hilft die Adhäsion und das Wachstum der HUVECs in Kultur zu verbessern. Zwischen der dritten bis fünften Passage wurden die Zellen zu Versuchen herangezogen.

Ein Teil der HUVECs wurde für acht Stunden mit TNF α inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Die eine Hälfte der stimulierten und der nicht-stimulierten Zellen wurde mit 2%igem PFA für 20 Minuten fixiert, die andere Hälfte wurde für ein anschließendes intrazelluläres *mAB-staining* mit dem Fixations- und Permeabilisationspuffer des *Cytofix/Cytoperm*TM Kits für 20 Minuten behandelt. Nach einem kurzen Waschschrift der nicht-permeabilisierten HUVECs mit PBS beziehungsweise der permeabilisierten HUVECs mit *Perm/Wash buffer* des Kits, wurden die Zellen mit 10%igem humanem Serum für 30 Minuten blockiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern, bevor sie mit einem *rabbit anti-human CCL20/-macrophage inflammatory protein-3 α* Antikörper von Abcam beziehungsweise einer *rabbit*-Isotypkontrolle für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die Zellen wurden erneut gewaschen und anschließend mit einem *goat-anti-rabbit Alexa-fluor 488* Antikörper für 45 Minuten bei Raumtemperatur versetzt. Zur Darstellung der Zellnuclei wurden die HUVECs mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) gegengefärbt (vgl. 3.2).

Alle Bilder wurden mit einem Leica *DM 4000B* Fluoreszenzmikroskop und einer JVC *KY-F75U* Kamera aufgenommen. Die Analyse erfolgte mit dem Programm *Diskus* (vgl. 3.2).

3.7 *In vitro* Adhäsions-Assay

Mit Hilfe einer Flusskammer kann die Adhäsion von zirkulierenden Zellen an das Gefäßendothel unter physiologischen Flussbedingungen *in vitro* untersucht werden [47]. *SV40-transformed mouse lymphatic endothelial cells* (SVECs) beziehungsweise HUVECs wurden in 35 mm Kulturschalen in *Dulbecco's Modified Eagle's medium* (DMEM) mit 5% fötalem Rinderserum (*fetal bovine serum*, FBS) bis zum Erreichen eines konfluenten Wachstums kultiviert. Der einschichtige Zellrasen der Endothelzellen diente als Boden der Flusskammer. Ein Teil der murinen SVECs (mEC) sowie der HUVECs wurden vor Versuchsdurchführung über Nacht mit $\text{TNF}\alpha$ (10ng/mL) inkubiert. Der andere Teil wurde unbehandelt gelassen.

Murine Monozyten wurden aus dem Blut von $\text{Ldlr}^{-/-}$ und $\text{Ccr6}^{-/-}\text{Ldlr}^{-/-}$ Mäusen mittels *Histopaque 1083*, gemäß Anleitung des Herstellers, isoliert und in HBSS suspendiert. Die verwendete HBSS-Lösung beinhaltete zusätzlich 10 mmol/L HEPES und 0,5% Serumalbumin pro $0,8 \times 10^6$ Zellen/ml. MonoMac6-Zellen, monozytische Zellen menschlichen Ursprungs, wurden in einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml verwendet. Die murinen Monozyten wurden mit 1 μM des Fluoreszenzindikators BCECF-AM, die humanen mit 1 μM des Fluoreszenzfarbstoffes Calcein-AM gelabelt. Unmittelbar vor Durchführung der Flusseexperimente wurden den verschiedenen Monozyten Calcium- und Magnesiumionen in einer 1 mM Endkonzentration hinzugegeben. In einem Teil der Versuchsreihe wurden zusätzlich neutralisierende *goat anti-human CCL20*-Antikörper von R&D Systems beziehungsweise eine *goat*-Isotypkontrolle in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zugegeben.

Die Kulturschalen mit mECs beziehungsweise HUVECs wurden in einer Flusskammer platziert und mit den murinen beziehungsweise humanen Monozyten perfundiert. Die Scherrate betrug bei allen Versuchen 1,5 dynes/cm². Die Versuchsreihe wurde mit Hilfe eines Olympus *IX50* Mikroskops, ausgestattet mit einer JVC *FY-550* Videokamera und einem JVC *DVM-700* hard disk-Rekorder, visualisiert. Die Zahl der fest adhärennten Zellen wurde über einen Zeitraum von fünf Minuten mit Hilfe eines Linienrasters manuell in multiplen Feldern (mindestens sieben pro Versuchsansatz) ausgezählt und als adhärennte Zellen/mm² quantifiziert.

Die Flow-Experimente wurden in Kooperation mit Frau Dr. Ela Karshovska und Herrn Prof. Dr. Christian Weber vom Institut für Prophylaxe und Epidemiologie von Kreislauferkrankungen der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

3.8 Intravitalmikroskopie

Die Intravitalmikroskopie bezeichnet eine Mikroskopie am lebenden Organismus und dient zur Beobachtung von physiologischen Vorgängen *in vivo*. Um die Interaktion zwischen Gefäßendothel und Leukozyten in $Ldlr^{-/-}$ sowie $Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-}$ Mäusen untersuchen zu können, wurde hier den beiden Versuchsgruppen nach einer achtwöchigen *western-type* Diät 0,02%iges Rhodamin-G i.v. zur Färbung der zirkulierenden Leukozyten injiziert. Unter intraperitonealer Narkose mit 0,3 mg/kg Ketamin und 0,6 mg/kg Medetomidin, wurden die Halsschlagadern der Tiere freigelegt. Der Arrest (mindestens 430 Sekunden [s]) der Rhodamin-gelabelten Leukozyten wurde mit einem Olympus *BX51* Epifluoreszenzmikroskop unter 20-facher Wasserimmersion visualisiert, mit Hilfe einer Digitalkamera aufgezeichnet und anschließend mit der *Cell-R* Software von Olympus ausgewertet.

Die Intravitalmikroskopie der Knockout-Mäuse wurde von Frau Prof. Dr. Alma Zerneck-Madsen des Instituts für Experimentelle Biomedizin des Universitätsklinikums Würzburg durchgeführt.

3.9 Quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) – bestehend aus den drei Reaktionsschritten: Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation – dient zur Vervielfältigung von DNA beziehungsweise RNA *in vitro*. Während des Denaturierungsschrittes erfolgt eine Trennung der Doppelstränge der Ausgangs-DNA (Matrize), um in einem weiteren Schritt die Anlagerung der im Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimern zu ermöglichen. Nach erfolgreichem Annealing der Primer beginnt mit Hilfe des Enzyms Taq-Polymerase die Elongation der DNA, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die mit der Matrize identisch ist. Nach Abschluss eines jeden Zyklus verdoppelt sich also theoretisch die Menge der Matrizen-

DNA. Die quantitative *real-time* PCR ist eine Weiterentwicklung der Standard-PCR, unter anderem rezensiert durch Kubista *et al.* [48].

Die RNA der HUVECs beziehungsweise mECs wurde mit Hilfe des *RNeasy Mini* Kits entsprechend der Herstellerangaben extrahiert. Um einzelsträngige RNA vervielfachen zu können, ist zunächst eine reverse Transkription der RNA in eine stabilere, doppelsträngige copy-DNA notwendig: Zur Synthese der cDNA wurden in den Reaktionsansätzen gleiche Mengen an *random hexamer primers* und Matrizen-RNA (1 μ g) verwendet. Für eine anschließende, quantitative *SYBR-green* Real-time PCR wurden spezifische Primerpaare für humane beziehungsweise murine CCL20 mRNA (humanes CCL20: 5'-GCTGCTACTCCACCTCTGCG-3', 5'-ATTGGCCAGCTGCCGTGTGA-3'; murines CCL20: 5'-GCCTCTCGTACATACAGACGC-3', 5'-CCAGTTCTGCTTTGGATCAGC-3') sowie die konstitutiv exprimierte Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (humane HPRT: 5'-GGCTCCGTTATGGCGACCCG-3', 5'-CGAGCAAGACGTTTCAGTCCTGTCC-3'; murine HPRT: 5'-TCCTCCTCAGACCGCTTT -3', 5'-CCTGGTTCATCATCG-CTAATC-3') verwendet. Nach einer initialen Denaturierung bei 95° Celsius für zehn Minuten folgten 40 Zyklen mit einer Denaturierung bei 95° Celsius für 15 Sekunden und einer Primerhybridisierung bei 60° Celsius für 60 Sekunden.

Nach der PCR-Amplifikation wurden Dissoziationskurven angefertigt, um nachvollziehen zu können, ob eine Vervielfältigung der gewünschten PCR-Produkte stattgefunden hat. Mittels Δ Ct-Methode wurde eine Standardkurve erstellt und so das quantitative Ausmaß der Amplifikation bestimmt; die HPRT diene bei den Berechnungen als *housekeeping* Gen.

3.10 Serumcholesterin- und Triglyceridmessung

Nach achtwöchiger *western-type* Diät wurde bei *Ldlr*^{-/-} sowie *Ccr6*^{-/-}*Ldlr*^{-/-} Mäusen Bestimmungen des totalen Serumcholesterols und der totalen Serumtriglyceride durchgeführt. Dazu wurde den Tieren Blut abgenommen, die zellulären Bestandteile des Blutes abzentrifugiert und anschließend das Serum mit Hilfe enzymgekoppelter Reaktionen des *Amplex Red Cholesterol Assay* Kits beziehungsweise des *EnzyChrom Triglyceride Assay* Kits, gemäß der Herstellerangaben, kolorimetrisch analysiert.

3.11 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der Software *Prism 6.0*, je nach Voraussetzungen, mit einem entsprechenden statistischen Verfahren: Verwendet wurden der Zweistichproben-Student-T-Test auf einen Mittelwertunterschied zweier Gruppen, Varianzanalysen (*analysis of variance*, ANOVA) mittels Dunnett's Test für multiple Mittelwertvergleiche, sowie der nicht-parametrische Mann-Whitney-U- und Kruskal-Wallis-Test. Als statistisch signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Plaques

Um die Rolle von CCR6 in der Pathogenese der Atherosklerose untersuchen zu können, wurden $Ccr6^{-/-}$ mit $Ldlr^{-/-}$ Mäusen gekreuzt, um Doppel-Knockouttiere zu generieren, welche anfällig für die Entwicklung atherosklerotischer Plaques sind. Elf $Ldlr^{-/-}$ sowie dreizehn $Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-}$ Mäuse männlichen Geschlechts erhielten ab einem Alter von acht Wochen ausschließlich eine fettreiche *western-type* Diät, bevor sie im Alter von 16 Wochen zur Analyse herangezogen wurden.

In Übereinstimmung mit früheren Forschungsergebnissen aus dem $Ccr6^{-/-}ApoE^{-/-}$ Mausmodell [40] waren in der histologischen Analyse – mittels *Picrosirius red*, *Gabe's Aldehyde Fuchsin* und *Oil-red-O* – die atherosklerotischen Läsionen der Doppel-Knockouttiere sowohl im Aortensinus als auch in der gesamten Aorta deutlich geringer ausgeprägt als die der $Ldlr^{-/-}$ Kontrollgruppe (vgl. Abbildung 6 A-D). In Immunfluoreszenzfärbungen des Aortensinus zeigte sich, dass die Reduktion der Plaquebildung mit einer signifikant verringerten Akkumulation von Makrophagen im Aortensinus der $Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-}$ Mäuse assoziiert war (vgl. Abbildung 7 A und B). Die Zahl der $CD3^{+}$ T-Zellen unterschied sich zwischen den $Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-}$ Mäusen und den Kontrolltieren nicht (vgl. Abbildung 7 C). Hingegen war der Anteil an α -Aktin exprimierenden glatten Muskelzellen in den $Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-}$ Plaques erhöht (vgl. Abbildung 7 D). Das höhere Maß an glatten Muskelzellen spricht für einen stabileren Plaquephänotyp der Doppel-Knockouttiere, auch wenn keine Veränderung im Kollagengehalt der Läsionen der beiden Gruppen nachgewiesen werden konnte (vgl. Abbildung 7 E). Das Körpergewicht, der Serumcholesterinspiegel sowie der Serumtriglyceridspiegel der $Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-}$ Tiere unterschieden sich nicht von dem der $Ldlr^{-/-}$ Tiere (vgl. Tabelle 2), sodass weitgehend ausgeschlossen werden kann, dass die beobachteten Unterschiede in den Versuchsgruppen in der Plaqueentwicklung sowie -zusammensetzung durch unterschiedlich ausgeprägte Blutfettspiegel oder einen Diätfehler zu erklären sind.

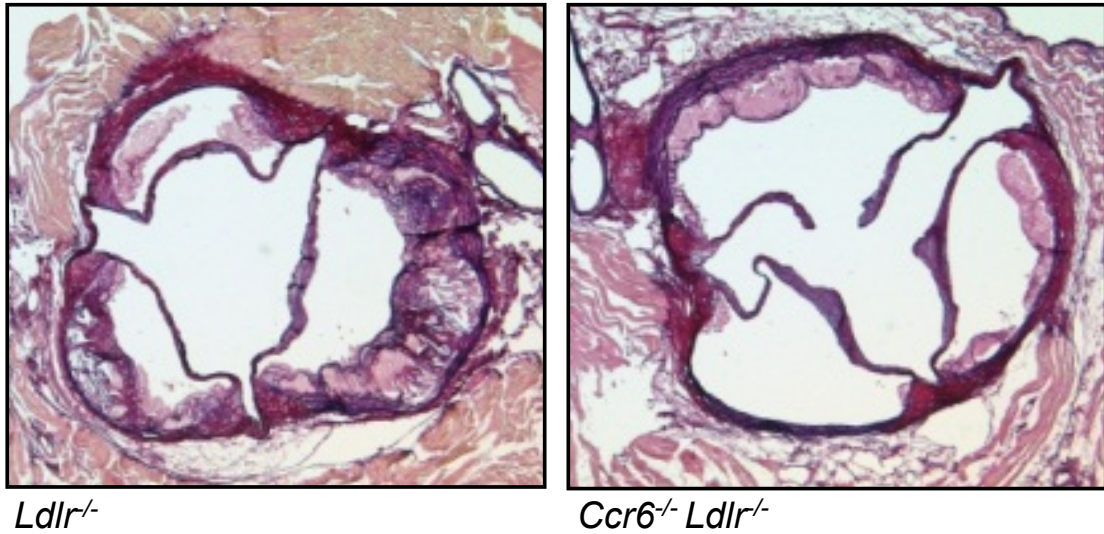
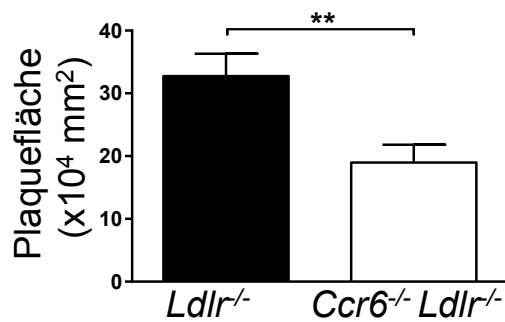
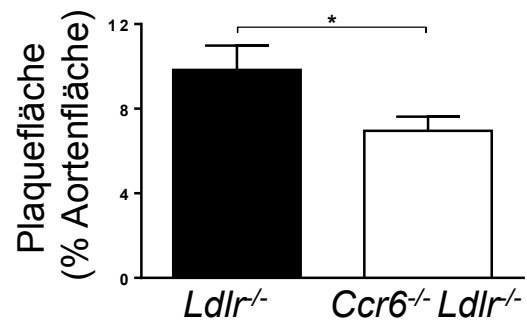
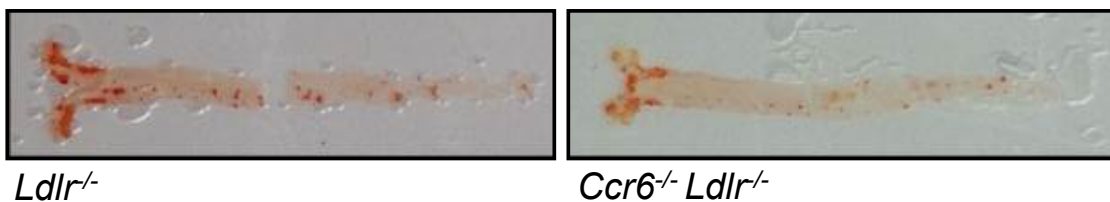
A**B****C****D**

Abbildung 6: **Ein CCR6-Knockout reduziert das Ausmaß der Atherosklerose in *Ldlr*^{-/-} Mäusen.** A - D) Analyse der Plaquegröße in *Ldlr*^{-/-} (n = 10) und *Ccr6*^{-/-}*Ldlr*^{-/-} Mäusen (n = 13) nach acht Wochen fettreicher *western type* Diät. A, B) Repräsentative Schnitte der Aortenwurzel gefärbt mit Picosirus red und Gabe's Aldehyde Fuchsin und Quantifizierung der Plaquegröße (Originalvergrößerung: x 10). C, D) Quantifizierung des Plaqueanteils relativ zur Gesamtoberfläche der Aorta und repräsentative Schnitte der thorakoabdominalen Aorta gefärbt mit Oil-Red-O. Experimentator: Helga Manthey und Stefanie Barnsteiner. * p < 0,05; ** p < 0,01.

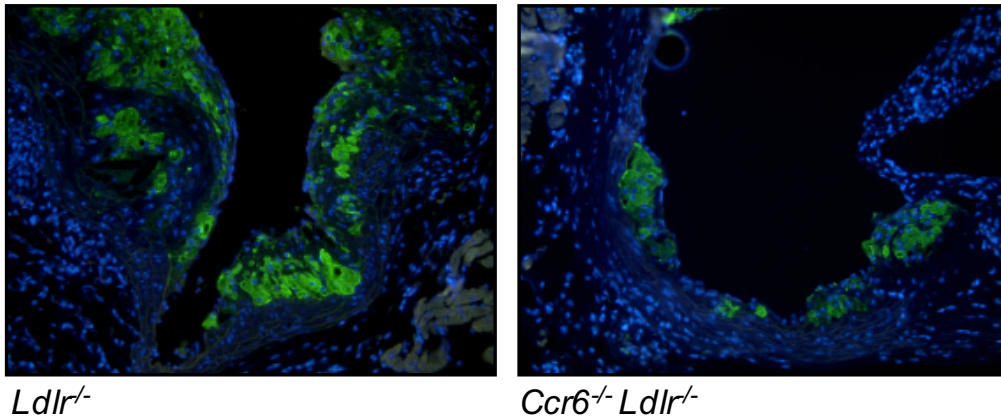
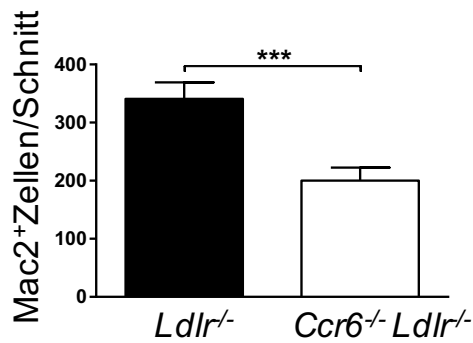
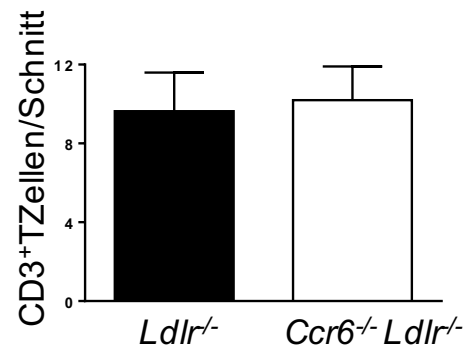
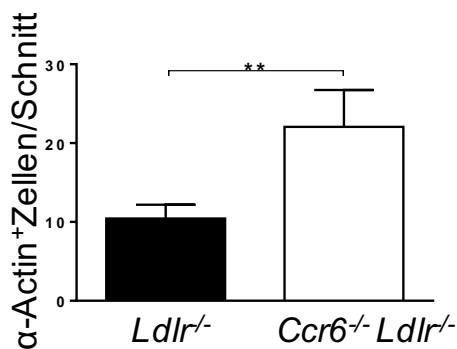
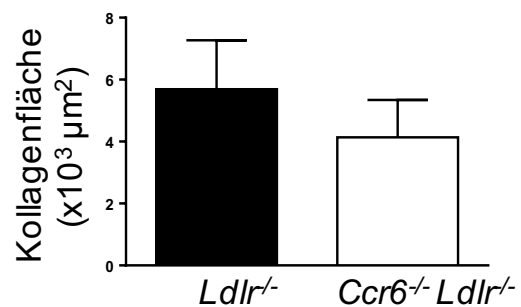
A**B****C****D****E**

Abbildung 7: CCR6-Knockout reduziert das Ausmaß der Atherosklerose in *Ldlr*^{-/-} Mäusen. A - E) Analyse der Plaquezusammensetzung in *Ldlr*^{-/-} (n = 10) und *Ccr6*^{-/-}*Ldlr*^{-/-} Mäusen (n = 13) nach acht Wochen fettreicher *western type* Diät. A, B) Gefärbte Mac-2⁺ Makrophagen in Schnitten der Aortenwurzel (Originalvergrößerung: x 40) und Quantifizierung der Makrophagenzahl pro Schnitt. C - E) Quantifizierung der CD3⁺ T-Zellen (C), α-smooth muscle actin⁺ glatten Muskelzellen (D) und des Kollagengehalts (E) pro Schnitt. Experimentator: Helga Manthey und Stefanie Barnsteiner. ** p < 0,01; *** p < 0,001.

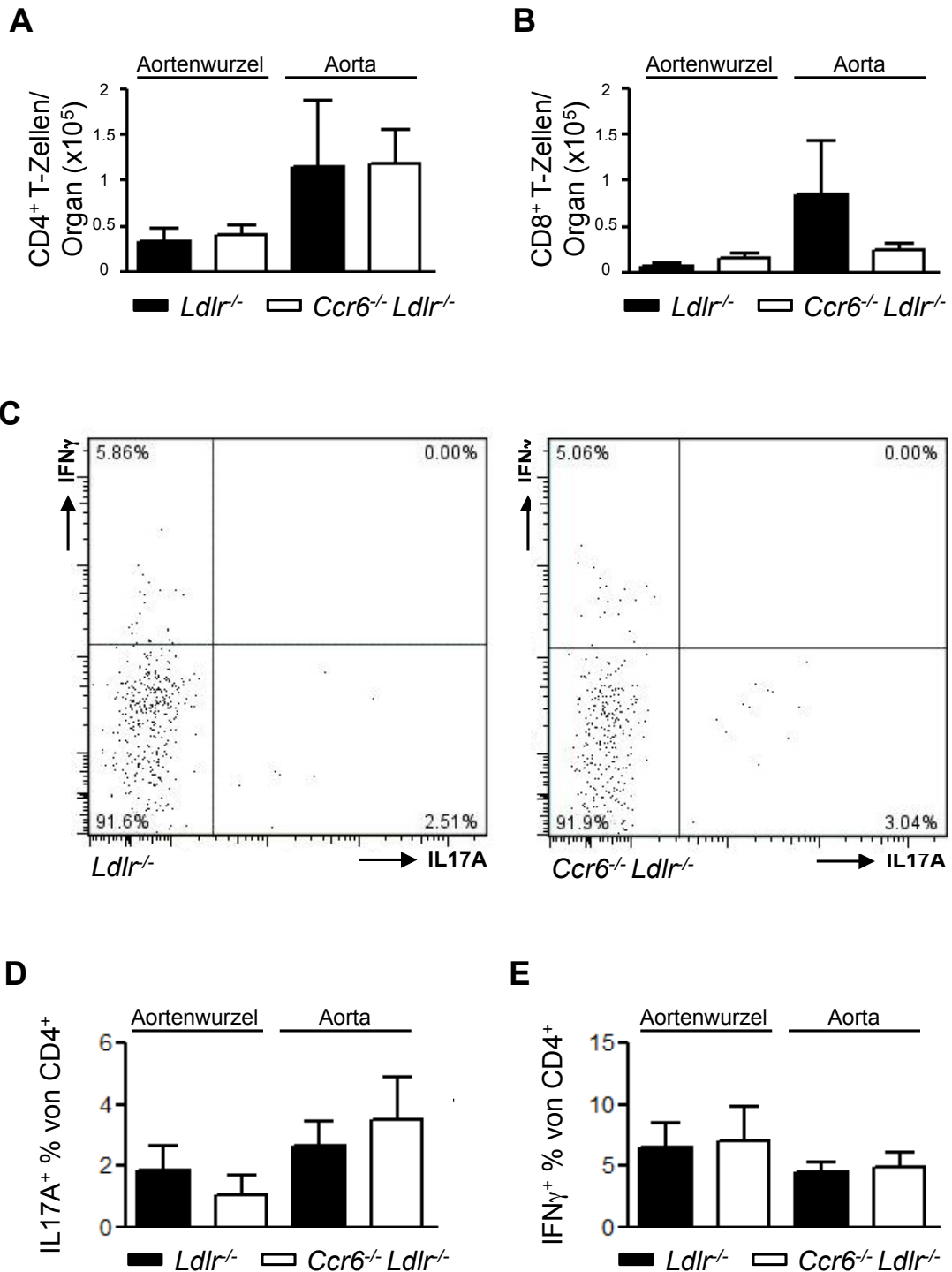
	Ldlr^{-/-}	Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-}
Körpergewicht [g]	31,24 ± 0,97	30,76 ± 0,76
Serumcholesterin [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	16185 ± 666,1	14321 ± 835,5
Serumtriglyceride [mmol/L]	8,65 ± 0,46	9,36 ± 0,66

Tabelle 2: **Körpergewicht, Serumcholesterin und -triglyceride** der Ldlr^{-/-} (n=11) und Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-} Mäuse (n=13) nach acht Wochen *western-type* Diät.

4.2 T-Zellphänotyp der Plaques

Anhand einer durchflusszytometrischen Analyse wurde der Phänotyp und die Polarisation der CD3⁺ T-Zellen der Läsionen – deren Gesamtzahl sich in der immunhistochemischen Analyse der Aortensinus der beiden Gruppen nicht unterschied – in enzymatisch-verdaulichem Aortengewebe untersucht. Dazu wurden die Aortensinus und die Aorten der Ldlr^{-/-} und der Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-} Tiere, die für acht Wochen eine fettreiche *western-type* Diät erhielten, heraus präpariert und enzymatisch zu einer Einzelzellsuspension abgebaut. Anschließend erfolgte eine Färbung für T-Zelloberflächenmarker CD3, CD4, und CD8 sowie intrazelluläre Färbungen der T-Helfer-Subgruppen anhand der Zytokine INF- γ und IL-17A.

Wie schon in der immunhistochemischen Analyse war die Gesamtzahl der CD3⁺ T-Zellen im Aortensinus oder der Aorta der beiden Gruppen auch in der Durchflusszytometrie unverändert (Daten nicht abgebildet). Auch die Anzahl der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in den Aortensinus und den Aorten unterschieden sich zwischen den Ldlr^{-/-} und den Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-} Tieren nicht (vgl. Abbildung 8 A und B). Durch eine intrazelluläre Färbung von für Th17-Zellen beziehungsweise Th1-Zellen charakteristischen Zytokinen wurde der Phänotyp der CD4⁺ T-Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass IL-17A⁺ Th17-Zellen und INF- γ ⁺ Th1-Zellen einen ähnlichen Anteil der gesamten CD4⁺ T-Zellen beider Gruppen ausmachen (vgl. Abbildung 8 C-E). Auch für CD8⁺ T-Zellen wurde diese intrazelluläre Färbung durchgeführt: Die CD8⁺ T-Zellen waren nahezu negativ für die intrazelluläre IL-17A Färbung (< 0,15 % IL-17A⁺ CD8⁺ T-Zellen, vgl. Abbildung 8 F). Die INF- γ Expression der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen war, wie bei den CD4⁺ T-Zellen, zwischen den beiden Versuchsgruppen unverändert (vgl. Abbildung 8 G). Zusammenfassend weisen die Befunde der Immunhistochemie so wie der Durchflusszytometrie darauf hin, dass eine CCR6-Defizienz keinen signifikanten Einfluss auf die T-Zellrekrutierung in die atherosklerotischen Läsionen sowie die T-Zellpolarisation innerhalb der Plaques ausübt.



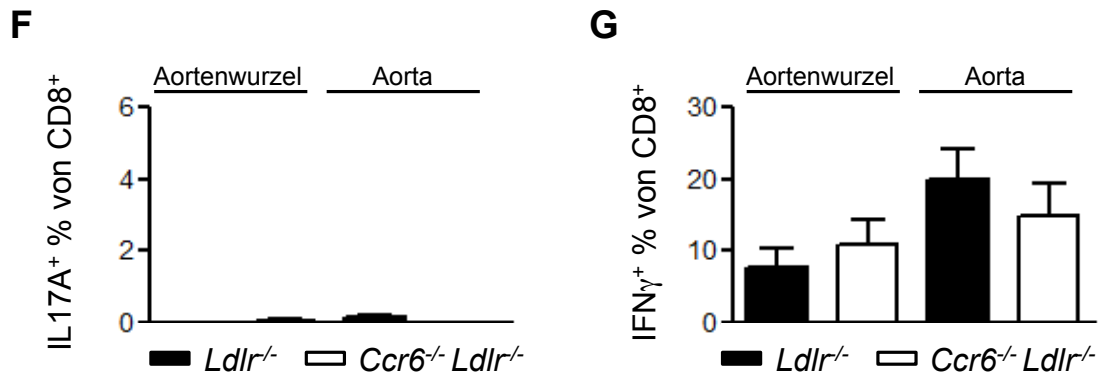


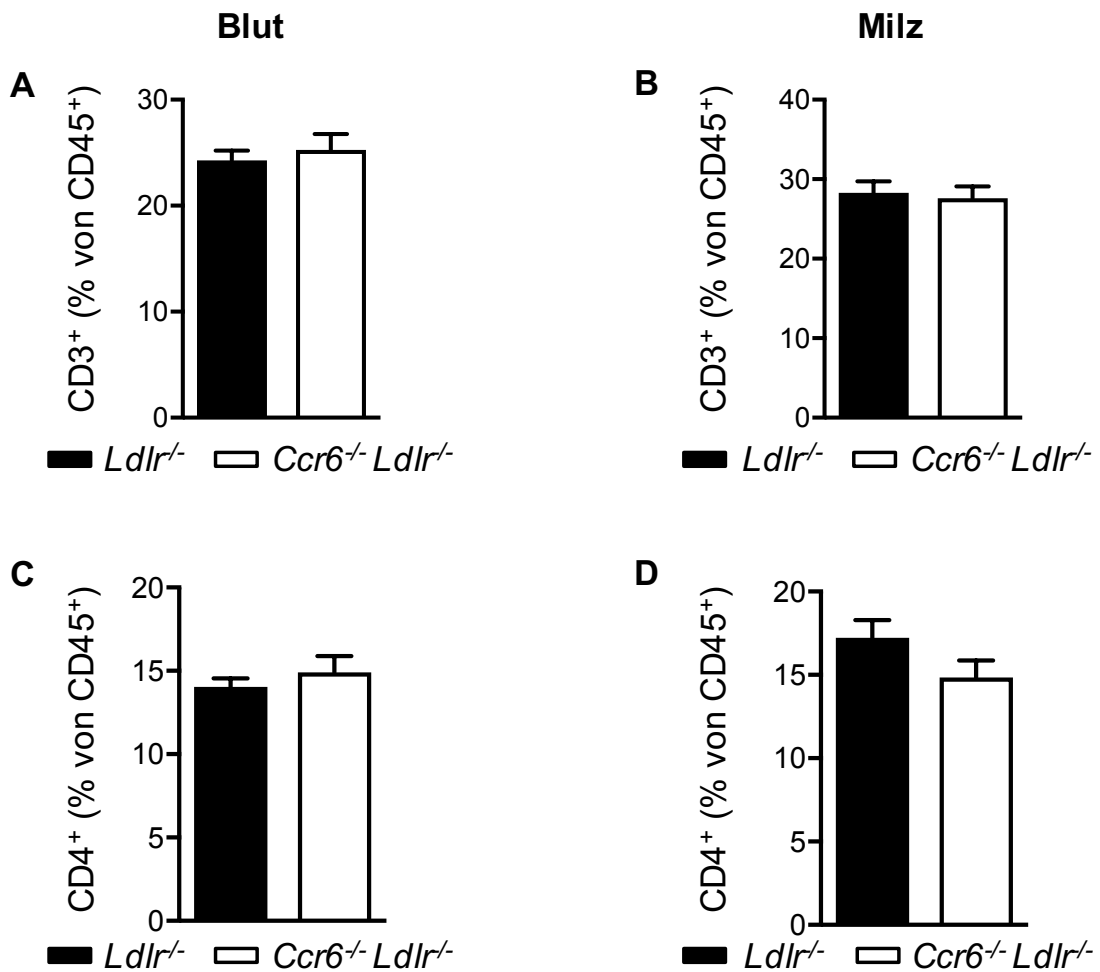
Abbildung 8: **CCR6-Knockout beeinflusst den T-Zellphänotyp inflammatorisch-veränderter Gefäße nicht.** A - G) Durchflusszytometrische Analyse von enzymatisch zu Einzelzellsuspensionen abgebauten Aorten und Aortenwurzeln von *Ldlr*^{-/-} (n = 5) und *Ccr6*^{-/-}*Ldlr*^{-/-} (n = 6) Mäusen nach acht Wochen *western type* Diät. A) Gesamtzahl der CD4⁺ und B) CD8⁺ T-Zellen in den Aortenwurzeln sowie den Aorten. C) Repräsentative Dot-plots (aus den Proben der Aorta) und D, E) der prozentuale Anteil von IL-17A⁺ Th17 und INF γ ⁺ Th1 an CD4⁺ T-Zellen der Aortenwurzeln und der Aorta. F) Prozentualer Anteil von IL-17A⁺ und G) INF γ ⁺ Zellen an CD8⁺ T-Zellen der Aortenwurzeln und der Aorta. Experimentator: Helga Manthey.

4.3 Systemischer T-Zellphänotyp

Während der Atherogenese kann es zu einer systemischen Aktivierung von T-Zellen kommen [7] [30]. Um solch eine systemische T-Zellaktivierung zu erfassen und den systemischen T-Zellphänotyp zu bestimmen, wurden aus dem Blut und der Milz stammende Leukozyten nach achtwöchiger fettreicher *western-type* Diät mittels Durchflusszytometrie analysiert; Es erfolgte eine Färbung für die Oberflächenmarker CD3, CD4, CD8, CD25, die Zytokine INF- γ und IL-17A, den Transkriptionsfaktor FoxP3 sowie für die Aktivierungsmarker CD44 und CD62L.

Die Gesamtzahl sowie die relative Häufigkeit der CD3⁺ T-Zellen unterschieden sich weder innerhalb des Bluts noch der Milz (vgl. Abbildung 9 A, B). Auch die Verteilung der CD3⁺ T-Zellsubtypen CD4⁺ und CD8⁺ variierte zwischen den *Ldlr*^{-/-} und *Ccr6*^{-/-}*Ldlr*^{-/-} Mäusen nicht (vgl. Abbildung 9 C, D und G, H). Ebenso wenig zeigte sich ein Unterschied in der T-Zellaktivierung (vgl. Abbildung 9 E, F und I, J), welche durch eine hohe Expression des Oberflächemarkers CD44 [49] sowie eine niedrige Expression von CD62L [50] charakterisiert ist. In Übereinstimmung mit der FACS-Analyse atherosklerotischer Gefäße zeigten auch die intrazellulären Zytokin-

färbungen für $\text{INF-}\gamma$ und IL-17A im Blut und in der Milz keinen signifikanten Unterschied in der systemischen Th1- oder Th17 T-Zellpolarisation (vgl. Abbildung 10 A, B und C, D). Zudem war keine Veränderung des $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$ Treg-Spiegels im Vergleich zwischen den beiden Versuchsgruppen zu erkennen (vgl. Abbildung 10 E, F).



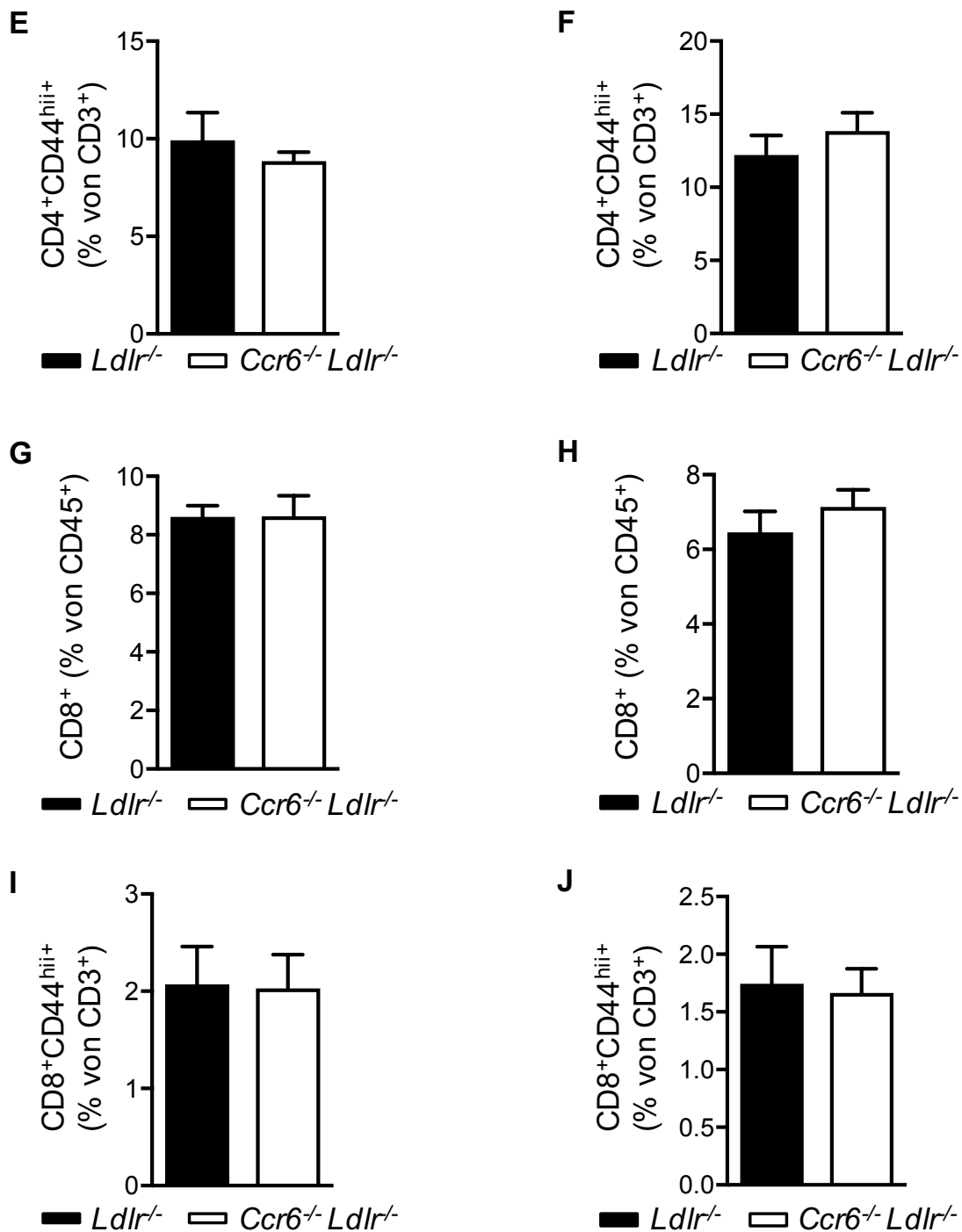


Abbildung 9: Ein CCR6-Knockout beeinflusst die systemische T-Zellantwort nicht. A - J) Durchflusszytometrische Analyse von Blut (A, C, E, G, I) und Milzgewebe (B, D, F, H, J) von *Ldlr*^{-/-} (n = 11) und *Ccr6*^{-/-}*Ldlr*^{-/-} Mäusen (n = 13) nach acht Wochen fettreicher *western type* Diät. A, B) Prozentualer Anteil von CD3⁺ Zellen an der Gesamtzahl der CD45⁺ Leukozyten. C, D) Prozentualer Anteil von CD4⁺ Zellen an der Gesamtzahl der CD45⁺ Leukozyten. E, F) Prozentualer Anteil von aktivierten CD44^{hi} CD4⁺ Zellen. G, H) Prozentualer Anteil von CD8⁺ Zellen an der Gesamtzahl der CD45⁺ Leukozyten. I, J) Prozentualer Anteil von aktivierten CD44^{hi} CD8⁺ Zellen. Experimentator: Helga Manthey und Stefanie Barnsteiner.

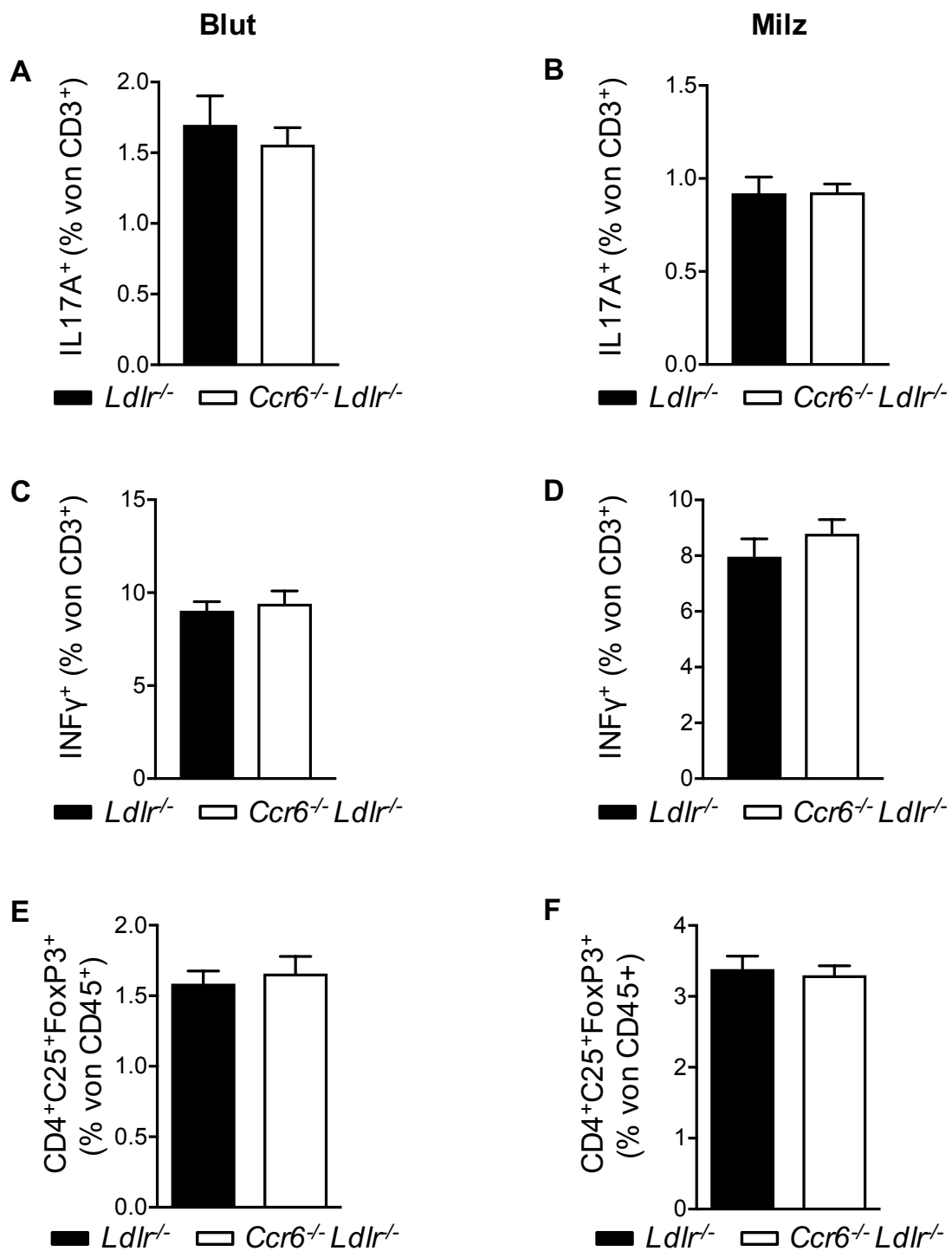
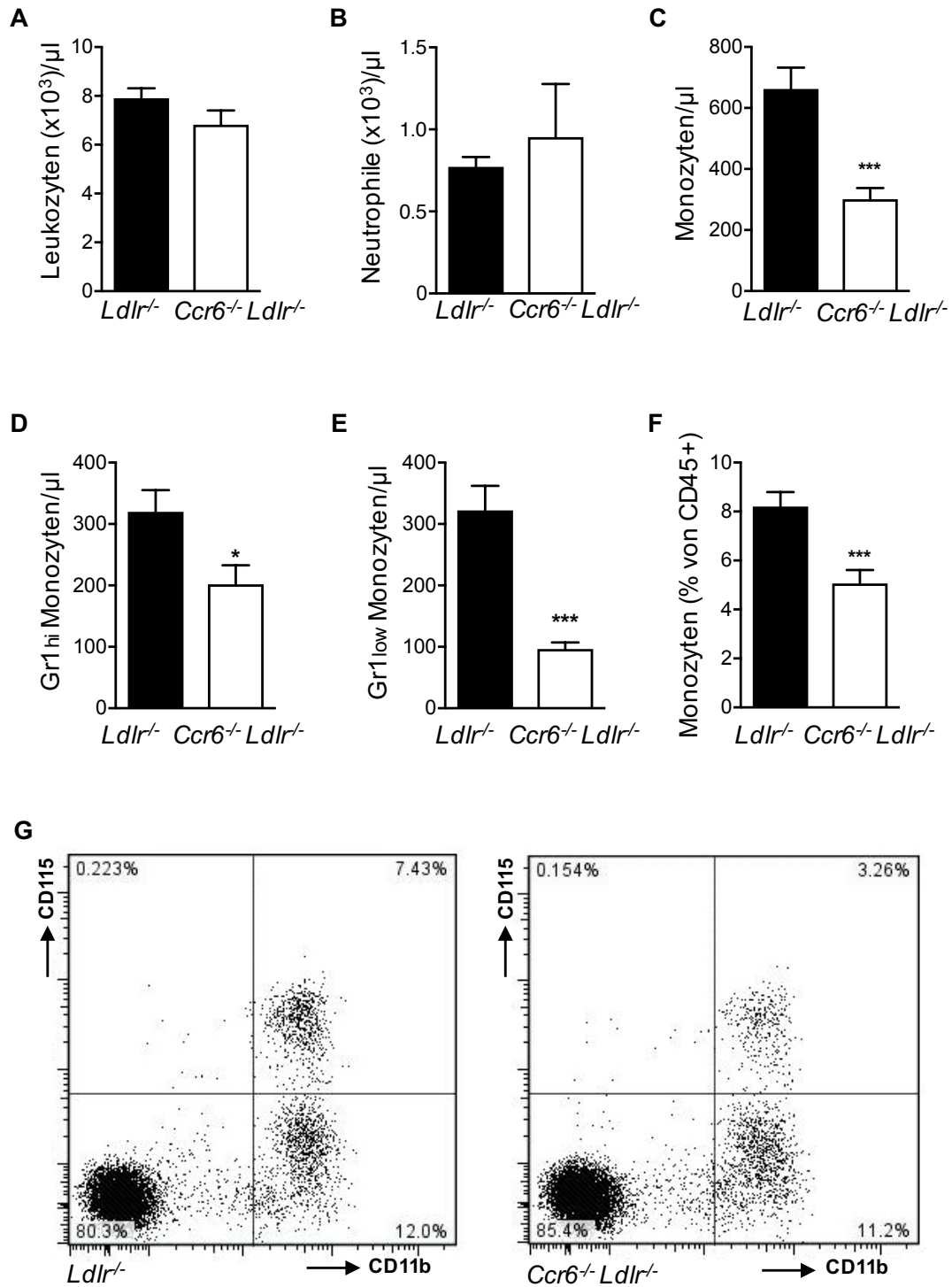


Abbildung 10: Ein CCR6-Knockout beeinflusst die systemische T-Helferzellantwort nicht. A - F) Durchflusszytometrische Analyse von Blut (A, C, E) und Milzgewebe (B, D, F) von *Ldlr*^{-/-} (n = 11) und *Ccr6*^{-/-}*Ldlr*^{-/-} Mäusen (n = 13) nach acht Wochen fettreicher *western type* Diät. A, B) Prozentualer Anteil von IL-17A⁺ Zellen an CD3⁺ T-Zellen. C, D) Prozentualer Anteil von INFγ⁺ Zellen an CD3⁺ T-Zellen. E, F) Prozentualer Anteil von CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen. Experimentator: Helga Manthey.

4.4 Mobilisierung peripherer Monozyten

Da sich in der Immunhistochemie in atherosklerotischen Plaques der $Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-}$ Mäuse eine deutlich geringere Anzahl von Makrophagen gezeigt hat (vgl. Abbildung 7 A und B) und die Akkumulation der Monozyten in der Gefäßwand abhängig von deren Prävalenz in der Zirkulation ist [24], wurde die Zahl der im Blut zirkulierenden Monozyten bei $Ldlr^{-/-}$ und $Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-}$ Mäusen nach acht Wochen fettreicher *western-type* Diät mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Auch wenn sich die Gesamtzahl der Leukozyten und der Neutrophilen der beiden Gruppen nicht signifikant unterschied (vgl. Abbildung 11 A und B), konnte in der Durchflusszytometrie eine starke Abnahme der Häufigkeit sowie der absoluten Zahlen der $CD11b^{+}CD115^{+}$ Monozyten im Blut der an Hypercholesterinämie leidenden $Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-}$ Mäusen nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 11 C und F). Die $CD11b^{+}CD115^{+}$ Monozyten von Mäusen können in zwei große Subtypen unterteilt werden (vgl. 1.5): Sowohl die Untergruppe der $Gr-1^{high}$ Monozyten als auch die $Gr-1^{low}$ Monozyten waren in den $Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-}$ Mäusen nach achtwöchiger *western-type* Diät signifikant vermindert (vgl. Abbildung 11 D und E).

Unter den inflammatorischen Bedingungen der Atherosklerose werden Monozyten überwiegend aus dem Knochenmark und der Milz mobilisiert und emigrieren an den Ort der Entzündung [24] [45]. In der durchflusszytometrischen Analyse des Knochenmarks konnte ein nicht-signifikanter Anstieg der Monozyten festgestellt werden (vgl. Abbildung 11 H). In der Milz zeigte sich dieser Trend nicht: Die Monozytenzahl der Milz war bei $Ldlr^{-/-}$ und $Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-}$ Mäusen gleich (vgl. Abbildung 11 I). Darüber hinaus fand sich bei jungen, gesunden $Ldlr^{-/-}$ und $Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-}$ Mäusen, die normale Kost erhielten, kein Unterschied in der Anzahl der im Blut zirkulierenden Monozyten (vgl. Abbildung 16 F), was darauf hindeutet, dass die Monozytenzahl in der Peripherie durch CCR6 spezifisch unter inflammatorischen Bedingungen reguliert wird.



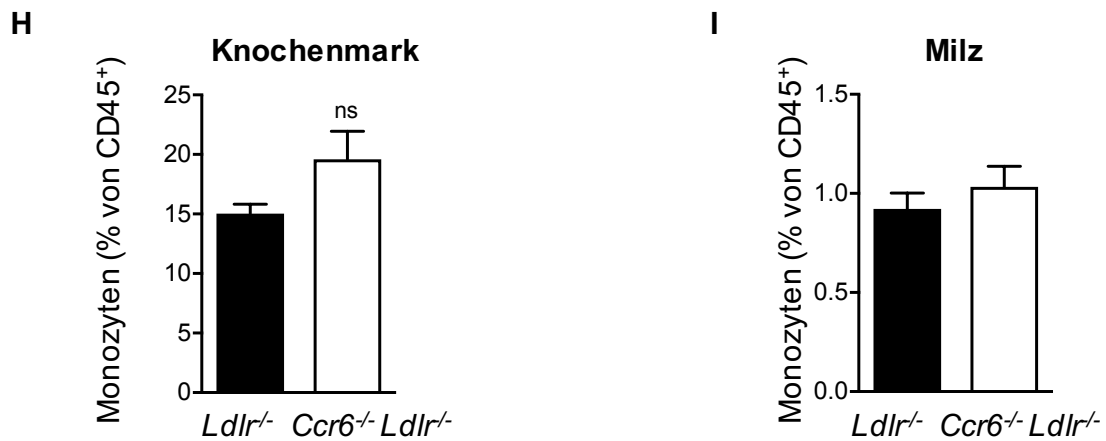


Abbildung 11: **CCR6 reguliert Anzahl zirkulierender Monozyten bei Hypercholesterinämie in Mäusen.** Durchflusszytometrische Blutanalyse von Ldlr^{-/-} (n = 11) und Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-} Mäusen (n = 13) nach acht Wochen fettreicher *western type* Diät. A - E) Absolute Zahlen von CD45⁺ Leukozyten (A), SSC^{high}CD11b⁺CD115⁻Gr1^{high} Neutrophilen (B), CD11b⁺CD115⁺ Monozyten (C), CD11b⁺CD115⁺Gr1^{high} Monozyten (D), CD11b⁺CD115⁺Gr1^{low} Monozyten (E) in Ldlr^{-/-} und Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-} Mäusen nach acht Wochen fettreicher *western type* Diät. F, G) Prozentualer Anteil von CD11b⁺CD115⁺ Monozyten an CD45⁺ Leukozyten (F) und repräsentative Dot-plots (G) im Blut. H, I) Prozentualer Anteil von CD11b⁺CD115⁺ Monozyten an CD45⁺ Leukozyten in Knochenmark (H) und Milz (I). Experimentator: Helga Manthey und Stefanie Barnsteiner. * p < 0,05; *** p < 0,001; n.s - nicht signifikant.

4.5 Expression von CCL20

Im ApoE-defizienten Tiermodell konnte bereits gezeigt werden, dass CCL20 in atherosklerotischen Läsionen an gleicher Stelle wie Makrophagen und Endothelzellen lokalisiert werden kann [40]. Zudem ist bekannt, dass die Expression von CCL20 in Endothelzellen durch inflammatorische Zytokine induziert wird [51].

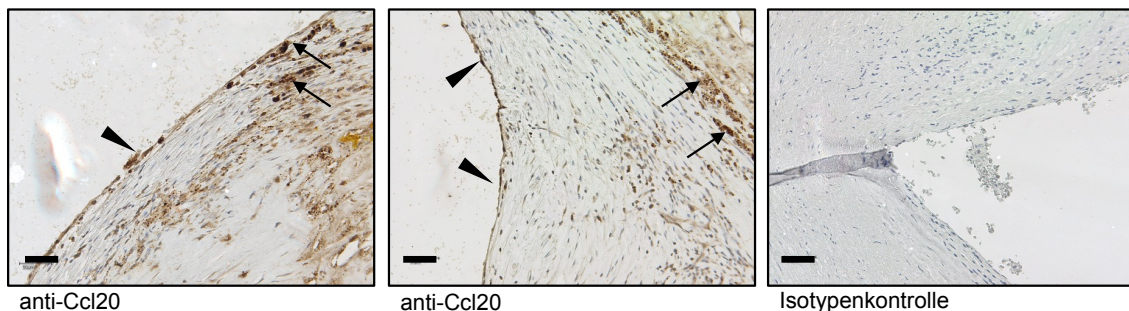


Abbildung 12: **CCL20 wird in atherosklerotischen Plaques des Menschen exprimiert.** Repräsentative Schnitte atherosklerotischer Plaques aus humanen Karotiden zur immunhistochemischen Analyse von CCL20 und Isotypenkontrolle (Originalvergrößerung: x 200): durch CCL20-Antikörper gefärbte luminalen Endothelzellen (Pfeilspitzen) und intraläsionale Zellen (Pfeile). Experimentator: Clément Cochain in Kooperation mit Herrn PD Dr. Jaroslav Pelisek. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Den bisherigen Erkenntnissen entsprechend konnte mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen eine Expression von CCL20 in den Plaques humaner Karotidarterien beobachtet werden: Sowohl die das Gefäßlumen auskleidenden Endothelzellen als auch Zellen innerhalb der Plaques – vermutlich Leukozyten sowie glatte Muskelzellen – waren mittels eines spezifischen CCL20-Antikörpers deutlich anfärbbar (vgl. Abbildung 12). Weiter konnte mittels *real-time* PCR-Analysen von Zellkulturversuchen mit humanen Endothelzellen (HUVECs) gezeigt werden, dass eine Stimulation von HUVECs mit dem inflammatorischen Zytokin $TNF\alpha$, im Vergleich zu nicht-stimulierten Zellen, eine zeitabhängige Hochregulierung des Expressionslevels von CCL20-mRNA nach sich zieht (vgl. Abbildung 13 A). Gleichermäßen führte die Stimulation muriner Endothelzellen (mECs) mit $TNF\alpha$ oder mit Lipopolysacchariden (LPS) – als Bestandteil der bakterieller Zellwand gram⁻ Bakterien über *Pattern-Recognition*-Rezeptoren ebenso entzündungsvermittelnd (vgl. 1.2) – zu einer starken Hochregulierung des mittels *real-time* PCR bestimmten CCL20-mRNA-Spiegels der mECs (vgl. Abbildung 13 B). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in Immunfluoreszenz-

färbungen ebenfalls mit $\text{TNF}\alpha$ stimulierter und anschließend für das intrazelluläre *mAB-staining* permeabilisierter HUVECs: Die Stimulation führte zu einem Anstieg des CCL20-Proteingehalts innerhalb der stimulierten Endothelzellen (vgl. Abbildung 13 C). Außerdem war eine Zunahme der Oberflächenexpression des CCL20-Protein auf stimulierten, aber nicht permeabilisierten HUVECS zu verzeichnen (vgl. Abbildung 13 C), was eine Immobilisierung von CCL20 auf der Zelloberfläche nahelegt. Diese Ergebnisse zeigen, dass CCL20 auch im menschlichen Organismus in atherosklerotisch veränderten Gefäßen exprimiert und durch inflammatorische Stimuli, wie $\text{TNF}\alpha$ oder den *Toll-like*-Rezeptor 4 (TLR4) Liganden LPS, die Expression von CCL20 in Endothelzellen induziert wird.

4.6 Monozytenarrest via CCL20/CCR6

An der Zelloberfläche exprimierte Zytokine können bei dem Arrest von Leukozyten beteiligt sein [16]. Auf Grund der vermuteten Oberflächenexpression von CCL20 durch Endothelzellen (vgl. 4.5), wurde eine mögliche Rolle des CCL20-CCR6-Paares bei der Adhäsion von Monozyten an das Gefäßendothel untersucht. Für den Adhäsions-Assay wurde ein Versuchsaufbau mit einer Flusskammer gewählt, mittels derer sich physiologische Flussbedingungen *in vitro* simulieren lassen können [47]. Während aus *Ldlr*^{-/-} Tieren isolierte und fluoreszenzmarkierte Monozyten an $\text{TNF}\alpha$ -stimulierte mECs adherieren konnten, fand bei aus *Ccr6*^{-/-}*Ldlr*^{-/-} Tieren stammenden Monozyten keine Anhaftung an den einschichtigen Zellrasen muriner Endothelzellen statt (vgl. Abbildung 14 A und B). An nicht-stimulierte mECs konnten weder Monozyten der *Ldlr*^{-/-} noch die der *Ccr6*^{-/-}*Ldlr*^{-/-} Mäusen adherieren (vgl. Abbildung 14 B). Umgekehrt konnte durch eine funktionelle Neutralisation des Chemokins CCL20 durch einen spezifischen CCL20-Antikörper die Adhäsion von humanen MonoMac6 Zellen an $\text{TNF}\alpha$ -aktivierte HUVECs (vgl. Abbildung 14 C) unterbunden werden. Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass auf der Zelloberfläche aktivierter Endothelzellen präsentiertes CCL20 unter Flussbedingungen einen direkten, CCR6-abhängigen Arrest von Leukozyten vermittelt.

Um die Bedeutung von CCR6 für den Arrest von Leukozyten *in vivo* ermitteln zu können, wurde an *Ldlr*^{-/-} sowie *Ccr6*^{-/-}*Ldlr*^{-/-} Mäuse nach achtwöchiger *western-type* Diät eine Intravitalmikroskopie der Karotiden durchgeführt. In den dafür exponierten Karotiden von *Ccr6*^{-/-}*Ldlr*^{-/-} Mäusen konnte im Vergleich zu den *Ldlr*^{-/-} Tieren eine verringerte Adhäsion von Rhodamin-markierten Leukozyten beobachtet wer-

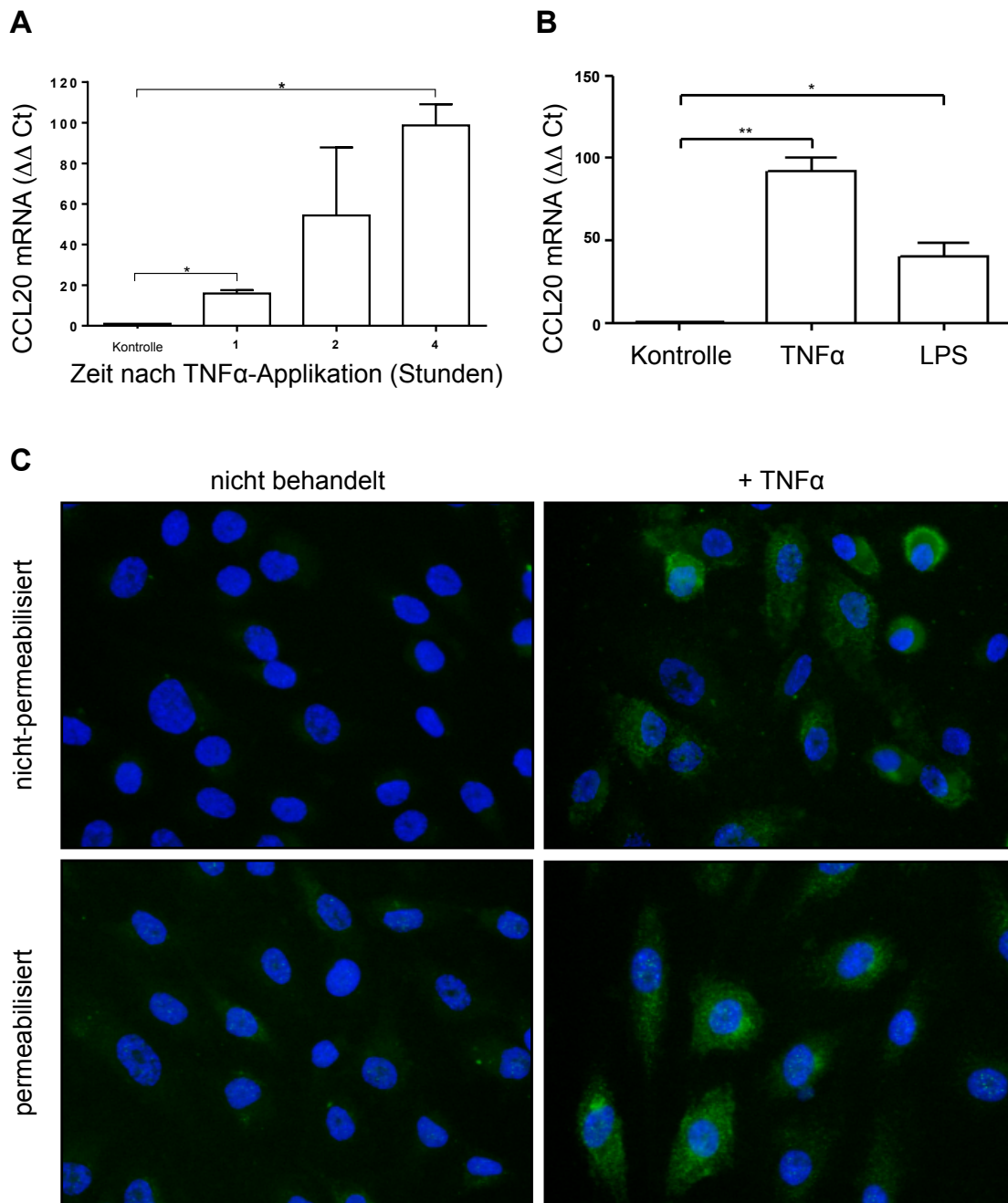


Abbildung 13: **CCL20 wird durch proinflammatorische Stimuli in murinen und humanen Endothelzellen induziert.** A) HUVECs wurden für die angegebene Zeit mit PBS oder TNF α inkubiert. Die Expression von CCL20-mRNA (n = 2/Zeitpunkt) wurde mittels Real-time PCR analysiert (relativ zu HPRT). B) mECs wurden mit PBS, TNF α oder LPS für vier Stunden behandelt und die Expression von CCL20-mRNA (n = 2/Bedingung) wurde mittels Real-time PCR analysiert (relativ zu HPRT). C) Repräsentative Bilder von auf Objektträgern kultivierten HUVECs. Die Zellen wurden acht Stunden mit PBS oder TNF α inkubiert und anschließend einer immunhistochemischen Färbung für intrazelluläres sowie oberflächlich exprimiertes CCL20 unterzogen (Originalvergrößerung: x 100). Experimentator: Stefanie Barnsteiner. * p < 0,05; ** p < 0,01.

den (vgl. Abbildung 14 D und E). In diesem Zusammenhang zu unterstreichen ist, dass sich das mRNA-Expressionlevel der Integrine α M, β 1, β 2 und α 4 – klassische Adhäsionsmoleküle – weder zwischen den Gr-1^{high} noch den Gr-1^{low} Monozyten der Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-} beziehungsweise der Ldlr^{-/-} Mäuse unterschied (vgl. Abbildung 15 A und B). Die verminderte Adhäsion CCR6-defizienter Monozyten ist also wahrscheinlich nicht auf eine herabgesetzte Integrinexpression der Knockouttiere zurückzuführen.

4.7 Monozytenrekrutierung unter inflammatorischen Bedingungen

Um weiteren Aufschluss über die Rolle von CCR6 in der Leukozytenrekrutierung unter akut inflammatorischen Bedingungen zu erhalten, wurde bei normal gefütterten Ldlr^{-/-} und Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-} Mäusen durch die Injektion steriler Luft ein subkutaner *air pouch* angelegt. Eine nachfolgende Instillation von TNF α induzierte sowohl in Ldlr^{-/-} also auch in Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-} Mäusen einen signifikanten Anstieg der Gesamtzellzahl der in die Pouches rekrutierten Zellen im Vergleich zu den Kontrolltieren, welchen an Stelle von TNF α PBS injiziert wurde (vgl. Abbildung 16 A). Die durchflusszytometrische Analyse der rekrutierten Zellen zeigte, dass die Gesamtzahl der Monozyten und insbesondere der inflammatorischen Gr-1^{high} Monozyten in den mit TNF α behandelten Ldlr^{-/-} Mäusen anstieg, während im Aspirat der Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-} Mäuse, welchen zuvor ebenfalls TNF α in die Pouches injiziert worden war, kein Anstieg der Monozytenzahlen zu verzeichnen war (vgl. Abbildung 16 B und C). Gr-1^{low} Monozyten waren in den Pouchflüssigkeiten der Ldlr^{-/-} und der Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-} Mäuse in geringerem Maße nachweisbar und durch die Instillation des Zytokins TNF α konnte kein Anstieg dieser Subgruppe verzeichnet werden (vgl. Abbildung 16 D). Dies lässt vermuten, dass in diesem Modell antiinflammatorische Gr-1^{low} Monozyten nicht rekrutiert werden. Die Zahl der Neutrophilen stieg nach TNF α -Instillation in der Pouchflüssigkeit beider Genotypen deutlich an (vgl. Abbildung 16 E). In der Rekrutierung von CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺INF γ ⁺ und CD4⁺IL-17A⁺ T-Zellen nach der Instillation von TNF α wurde wiederum weder bei Ldlr^{-/-} noch bei Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-} Mäusen eine signifikante Veränderung festgestellt (vgl. Abbildung 17 A - D). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch CCR6 spezifisch inflammatorische Monozyten an den Ort der Entzündung rekrutiert werden, die Akkumulation von Neutrophilen oder T-Zellen – Th17 T-Zellen mit eingeschlossen – hingegen nicht

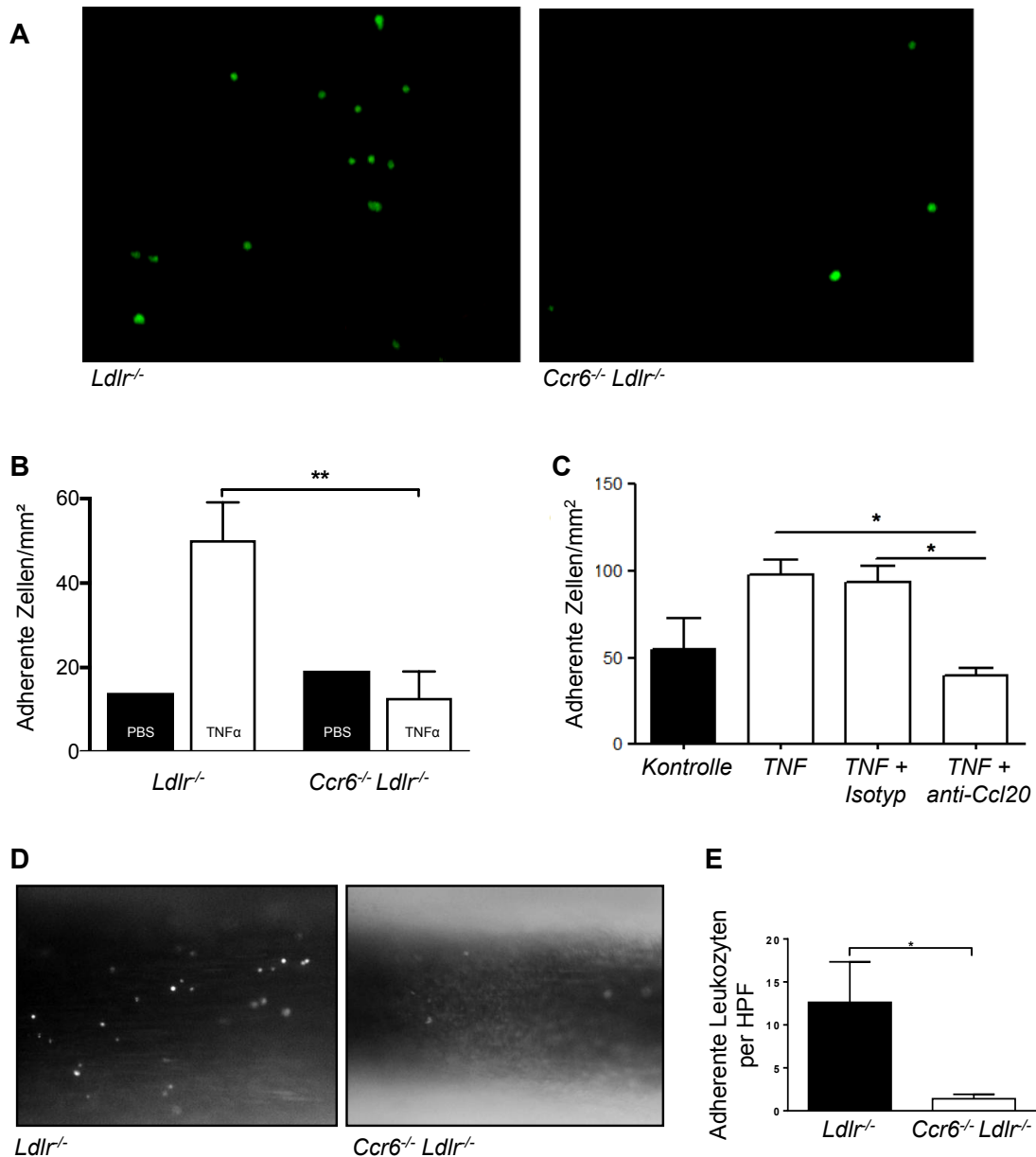


Abbildung 14: CCR6/CCL20 vermittelt Adhäsion von Monozyten an entzündlich verändertes Endothel A, B) Über Nacht mit TNF α stimulierte murine Endothelzellen (mECs) wurden unter Flussbedingungen mit aus *Ldlr*^{-/-} (n = 6) und *Ccr6*^{-/-}*Ldlr*^{-/-} Tieren (n = 6) isolierten und fluoreszenzmakierten Monozyten (grün) perfundiert. Repräsentative Aufnahmen (A) und Quantifizierung (B) adhärenter Monozyten nach vierminütiger Perfusion. C) Adhäsion von MonoMac6 Zellen an TNF α stimulierte humane Endothelzellen (HUVECs) bei gleichzeitiger Präsenz von neutralisierenden anti-CCL20-Antikörpern oder Isotypenkontrolle. D, E) Karotiden von *Ldlr*^{-/-} (n = 4) und *Ccr6*^{-/-}*Ldlr*^{-/-} Tieren (n = 4) wurden nach acht Wochen fettreicher *western type* Diät freigelegt. Repräsentative Bilder (D) und Quantifizierung (E) am Gefäßendothel adhärerender, Rhodamin G-gelabelter Leukozyten in der Intravalmikroskopie. Experimentator: A, B) Stefanie Barnsteiner in Kollaboration mit Frau Dr. Ela Karshovska. C) Frau Dr. Ela Karshovska. E, D) Alma Zerneck. * p < 0,05; ** p < 0,01.

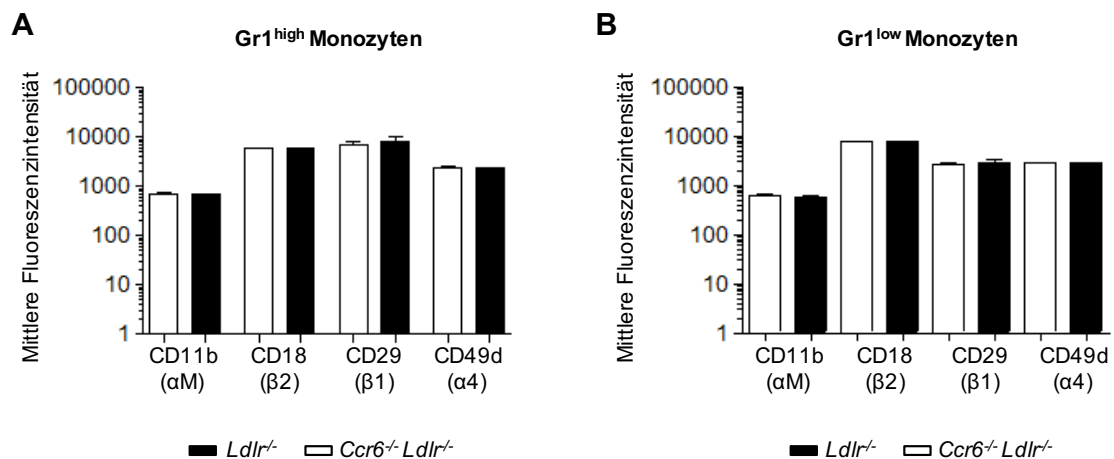


Abbildung 15: **CCR6/CCL20 vermittelt Adhäsion unabhängig von Integrinen** A, B) FACS-Analyse der Integrinexpression von Gr-1^{high} (A) und Gr-1^{low} Monozyten (B) in *Ldlr*^{-/-} (n = 4) und *Ccr6*^{-/-}*Ldlr*^{-/-} Tieren (n = 4) nach acht Wochen fettreicher *western type* Diät. Experimentator: Clement Cochain. * p < 0,05; ** p < 0,01.

über CCR6 reguliert wird. Hervorzuheben ist außerdem, dass sich die Zahl der im Blut zirkulierenden Monozyten zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen unter Normalfutter bei diesem akuten Entzündungsmodell, im Gegensatz zu den Tieren des Diätversuchs 4.4, nicht unterschied (vgl. Abbildung 16 E).

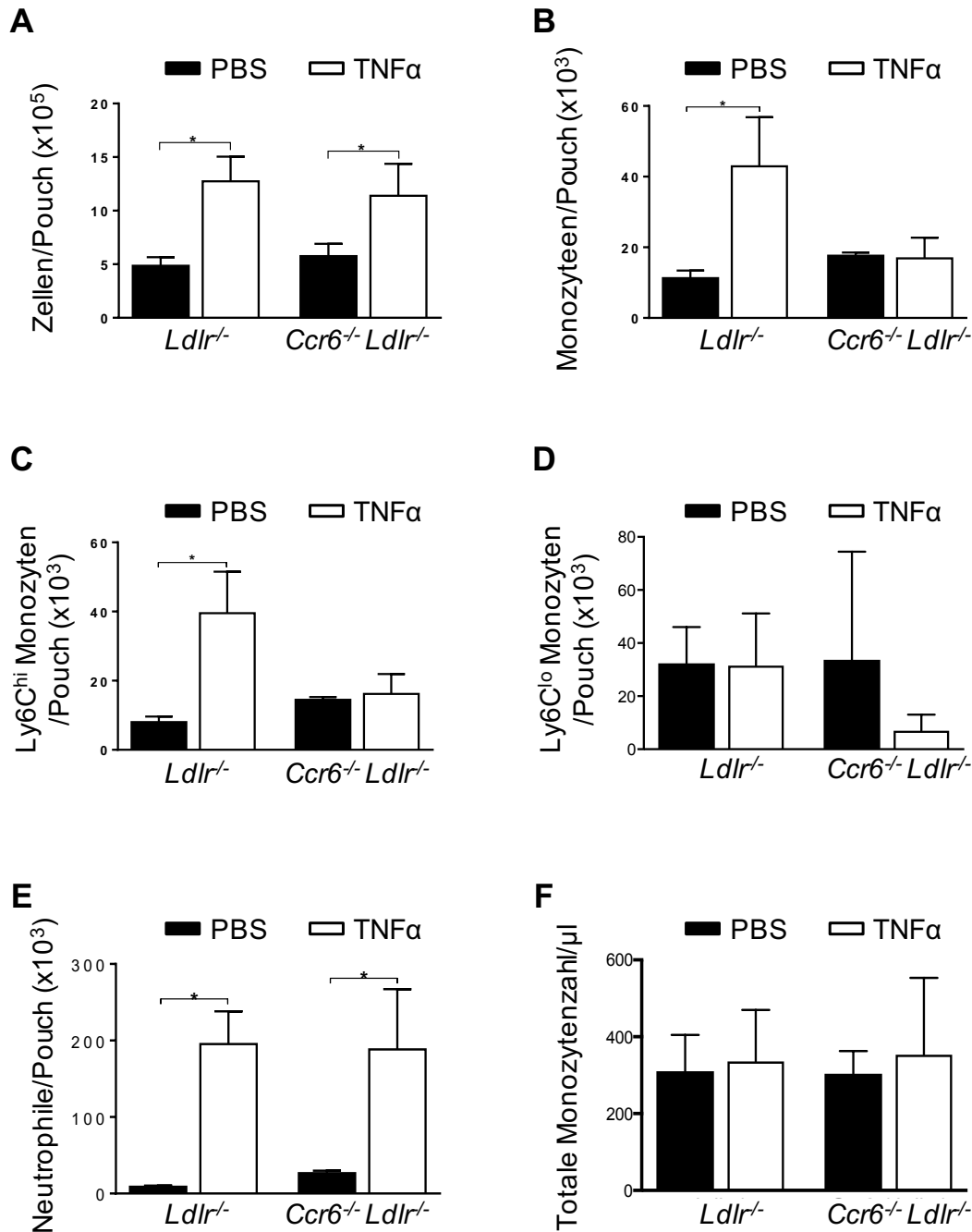


Abbildung 16: CCR6 kontrolliert Monozytenrekrutierung an den Entzündungsort A-E) In *Ldlr*^{-/-} (n = 8) und *Ccr6*^{-/-}*Ldlr*^{-/-} Tieren (n = 8) angelegte *air pouches* wurde TNF α oder zur Kontrolle PBS injiziert und nach 20 Stunden gewaschen um die Zellrekrutierung zu analysieren. A) Absolute Zellzahlen, B) Anzahl von CD115⁺ Monozyten, C) Anzahl von CD115⁺Gr-1^{high} Monozyten, D) Anzahl von CD115⁺Gr-1^{low} Monozyten, E) Anzahl von Neutrophilen in der Pouchflüssigkeit. F) Anzahl von CD115⁺ Monozyten im peripheren Blut der Tiere. Experimentator: Stefanie Barnsteiner. * p < 0,05; n.s - nicht signifikant.

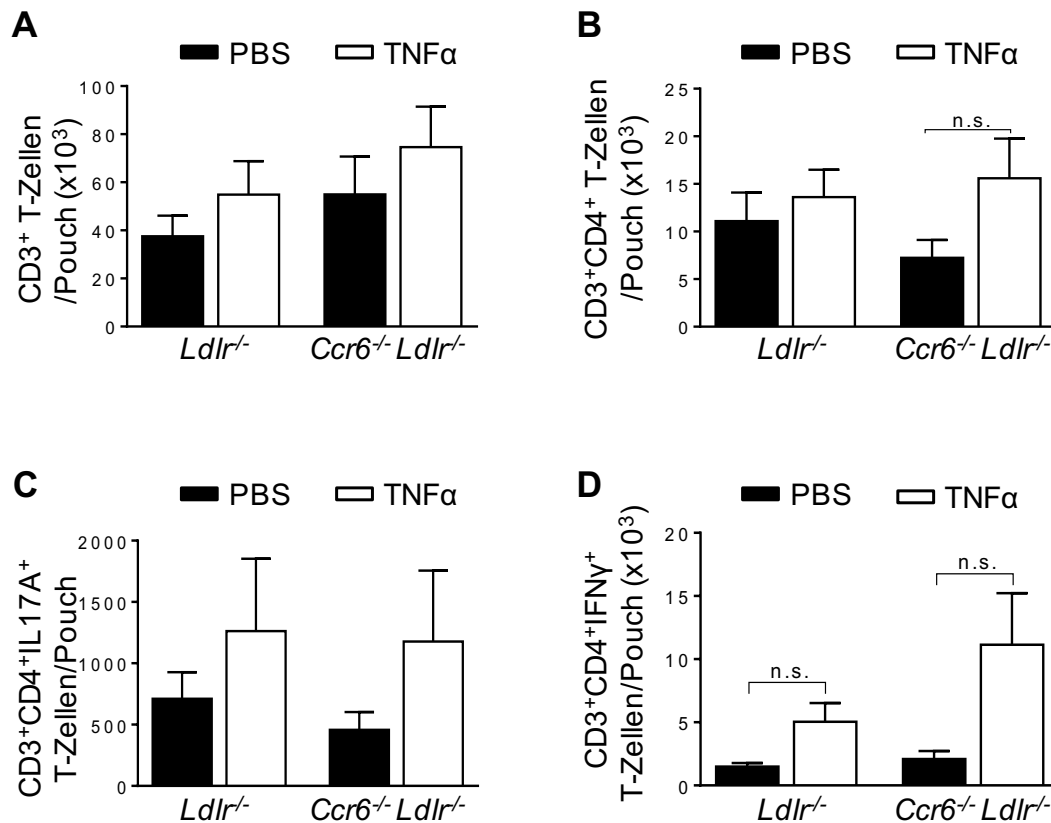


Abbildung 17: **CCR6 beeinflusst die Rekrutierung von T-Zellen bei akuten Reaktionen nicht.** A-D) In *Ldlr*^{-/-} (n = 8) und *Ccr6*^{-/-}*Ldlr*^{-/-} Tieren (n = 8) angelegte *air pouches* wurde TNF α oder zur Kontrolle PBS injiziert und nach 20 Stunden gewaschen um die Zellrekrutierung zu analysieren. A) Anzahl von der gesamten CD3⁺ T-Zellen, B) Anzahl von CD4⁺CD3⁺ T-Zellen, C) Anzahl von Th17 und D) Anzahl von Th1 Zellen in der Spülflüssigkeit. Experimentator: Stefanie Barnsteiner. * p < 0,05; n.s - nicht signifikant.

5 Diskussion

Die genetische Deletion des Chemokinrezeptors CCR6 führte in an Hypercholesterinämie leidenden $Ldlr^{-/-}$ Mäusen zu einer signifikant verminderten Anzahl der im Blut zirkulierenden Monozyten. Auch die Größe der atherosklerotischen Plaques sowie deren Makrophagengehalt waren in den Doppel-Knockouttieren signifikant verringert. Darüber hinaus konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass der CCR6-Ligand, das Chemokin CCL20, unter inflammatorischen Bedingungen von Endothelzellen exprimiert und auf der Zelloberfläche präsentiert wird und somit direkt an der Adhäsion von Monozyten an das Endothel beteiligt ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass CCR6 insbesondere für die Rekrutierung von Monozyten an den Ort der Entzündung benötigt wird, hingegen die Rekrutierung anderer Leukozytensubtypen, insbesondere auch von T-Zellen und Th17 T-Zellen, nicht unter dem Einfluss der CCR6/CCL20-Achse steht. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass mittels CCR6 im Rahmen einer Hypercholesterinämie und während der Pathogenese der Atherosklerose spezifisch eine Monozyten-vermittelte Entzündungsreaktion gesteuert, nicht aber die Antwort inflammatorischer oder regulatorischer T-Zellen moduliert wird.

5.1 Mobilisierung peripherer Monozyten via CCR6

Die Zahl der im Blut zirkulierenden Monozyten, als bestimmender Faktor der Atheroskleroseentstehung [21], war in den $Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-}$ Mäusen deutlich reduziert. Diese Beobachtungen in $Ldlr^{-/-}$ Tieren decken sich mit den Erkenntnissen, die aus dem $Ccr6^{-/-}ApoE^{-/-}$ Modell gewonnen wurden [40] [52]. Dies lässt vermuten, dass die Anzahl peripherer Monozyten während der Atherogenese maßgeblich über die CCL20/CCR6-Achse kontrolliert wird. Während in dieser Studie eine verringerte Zahl von $Gr-1^{high}$ sowie von $Gr-1^{low}$ Monozyten im Blut beobachtet wurde, beschrieben Wan *et al.* eine selektive Abnahme der inflammatorischen $Gr-1^{high}$ Monozytenfraktion [40]. Diese Abweichungen könnten sowohl durch eine unterschiedliche Nährstoffzusammensetzung als auch Dauer der Diät zu erklären oder aber auf grundsätzliche Unterschiede zwischen dem $ApoE^{-/-}$ und dem $Ldlr^{-/-}$ Tiermodell zurückzuführen sein.

Unter akut-inflammatorischen Bedingungen in einem *air pouch*-Modell mit Tieren, welchen keine spezielle hochkalorische Diät erhielten, fanden sich hingegen keine Ver-

änderung der peripheren Monozytenzahlen. Im Rahmen dieses *air pouch*-Versuches konnte somit zum ersten Mal gezeigt werden, dass bei normal gefütterten, nicht an Hypercholesterinämie leidenden $Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-}$ Mäusen die Anzahl der im Blut zirkulierenden Monozyten nicht von einer CCR6-Defizienz beeinflusst wird. In Zusammenschau sprechen diese Ergebnisse dafür, dass CCR6 die Mobilisierung von Monozyten spezifisch im Rahmen chronisch-inflammatorischer Bedingungen, wie sie auch unter einer Hypercholesterinämie herrschen, kontrolliert. In Einklang mit diesen Ergebnissen kann bei an Atherosklerose erkrankten Mäusen sowie auch Menschen eine Hochregulierung des CCR6-Liganden CCL20 beobachtet werden [39] [40] [41].

Im Rahmen akuter Entzündungsreaktionen hängt die Rekrutierung der Monozyten vermutlich in einem größeren Maße von der Signaltransduktion anderer Chemokinrezeptoren, wie zum Beispiel CCR2 [53], oder dem Peptidhormon Angiotensin II-AT1 [54] ab, über welche eine Ausschwemmung von Monozyten aus dem Knochenmark beziehungsweise der Milz reguliert werden kann. Sowohl im Knochenmark als auch durch eine extramedulläre Hämatopoese in der Milz reifen Monozyten heran, die zur Pathogenese der Atherosklerose beitragen [45]. Im Rahmen dieser Studie konnte keine signifikante Akkumulation von Monozyten in diesen Organen der $Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-}$ Mäuse festgestellt werden, auch wenn im Knochenmark ein Trend zu steigenden Monozytenzahlen zu beobachten war. In Zusammenschau mit den Ergebnissen von Wan *et al.* [40], welche einen Anstieg der Monozytenzahl im Knochenmark beobachten konnten, wäre es möglich, dass CCR6 auch eine Rolle in der Mobilisierung von Monozyten aus dem Knochenmark spielt.

5.2 Monozytenrekrutierung via CCR6

CCR6 kontrolliert die Mobilisierung von Monozyten in die Blutbahn unter chronisch-entzündlichen Bedingungen; die Rolle von CCR6 in der Chemotaxis von Monozyten konnte beispielsweise von Wan *et al.* [40] beschrieben werden. Aber auch die Adhäsion und Rekrutierung der Monozyten an den Ort der Entzündung scheinen sowohl während chronischer als auch akuter Entzündungsreaktionen mittels des CCL20-CCR6-Paares reguliert zu werden. Darauf weist die Beobachtung hin, dass im Rahmen eines *air pouch*-Versuches – ein Modell für akute Entzündungsprozesse und Zellrekrutierung – eine genetische Deletion von CCR6 die Rekrutierung inflammatorischer Monozyten unterbindet; eine Beobachtung die mit früheren Studien überein-

stimmt [55]. Auch wenn dies wahrscheinlich zum Großteil Folge einer verminderten Chemotaxis CCR6-defizienter Monozyten ist, so könnte auch die gestörte Vermittlung adhäsiver Effekte, über direkte Ligand-Rezeptor-Interaktionen zwischen CCL20 und CCR6, dabei von Bedeutung sein.

Das den Pouch auskleidende Granulationsgewebe – hauptsächlich bestehend aus Fibroblasten, Makrophagen und Mastzellen – entspricht am ehesten einer Synovialmembran [56]. Es können jedoch auch Endothelzellen nachgewiesen werden, die unter inflammatorischen Bedingungen Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 exprimieren, welche an der Adhäsion und Transmigration von Leukozyten in den Extravasalraum beteiligt sind [57] [58] [59]. Obgleich das auskleidende Gewebe nicht vollkommen dem Gefäßendothel gleichzusetzen ist, so können an Hand des *air pouch*-Modells gewonnene Erkenntnisse in Zusammenschau mit den Befunden des *in vitro* Flussversuches doch wichtige Hinweise über die Mechanismen der Rekrutierung der zirkulierenden Leukozyten in die Gefäßwand liefern.

Um die Rolle der CCL20/CCR6-Achse in der Monozytenrekrutierung zu verifizieren, wären weiterführend *fate mapping*-Modelle, wie beispielsweise ein adoptiver Zelltransfer markierter, CCR6-defizienter Monozyten zielführend. Mit einem solchen Ansatz könnten nicht nur Unterschiede in der Rekrutierung der verschiedenen Monozytensubgruppen durch einen CCR6-Knockout genauer untersucht werden, sondern – ähnlich wie bei Robbins *et al.* [26] – auch, ob CCR6 eine Rolle für die Zellhomöostase und lokale Proliferation von Plaquemakrophagen spielt.

5.3 Monozytenarrest und die Bedeutung von CCL20

In vitro führten sowohl die genetische Deletion von CCR6 als auch die Neutralisation von CCL20 mittels eines spezifischen Antikörpers zu einem verminderten Arrest von Monozyten an entzündlich veränderten Endothelzellen unter Flussbedingungen. Somit konnte neben der Fähigkeit, die Zahl der zirkulierenden Monozyten während einer chronischen Entzündung zu regulieren, eine bisher nicht bekannte Rolle des CCL20/CCR6-Signalweges in der Adhäsion von Monozyten beschrieben werden.

Bemerkenswert ist weiter, dass eine TNF α -vermittelte Aktivierung von Endothelzellen eine Hochregulierung der CCL20-mRNA nach sich zog, welche zugleich mit einer vermehrten Retention des CCL20-Proteins an der Zelloberfläche assoziiert war. Auf der Oberfläche von Endothelzellen können Chemokine mit Hilfe von Heparansulfat-Proteoglykanen (HS-PGs), die ein ubiquitärer Bestandteil der extrazellulären Matrix

(EZM) sind, präsentiert werden [60]. Es wurde bereits beschrieben, dass Heparin CCL20 binden kann [61]. *In vitro* konnte der Chemokinrezeptorligand CCL20 intrazellulär sowie auch an der Zelloberfläche von Endothelzellen lokalisiert werden. Somit kann gemutmaßt werden, dass auch CCL20 über Heparansulfat-Proteoglykane seinem Rezeptor CCR6 präsentiert wird. Unterstützt wird die These, dass CCL20 auf der Zelloberfläche von Endothelzellen retiniert wird und *via* Ligand-Rezeptor-Interaktionen die Rekrutierung CCR6-exprimierender Monozyten aus dem Blut bewirkt – ein initialer Schritt in der Entstehung atherosklerotischer Läsionen – durch die CCR6-Abhängigkeit des Leukozytenarrests an atherosklerotisch veränderten Gefäßen *in vivo*. Weitere Hinweise für die vermutete Präsentation *via* Heparansulfat-Proteoglykane könnten mit Hilfe des Enzyms Heparinase III gewonnen werden. Heparinase III ist eine Protease und führt zur Degradation von Heparansulfat-Proteoglykanen [62], sodass beispielsweise in der Immunfluoreszenzfärbung gegen CCL20 nach einer Heparinasebehandlung von stimulierten Endothelzellen eine verminderte Präsentation von CCL20 an der Zelloberfläche zu beobachten sein sollte. Zudem könnte mittels Flussversuchen die Auswirkungen einer Heparinasebehandlung auf die Adhäsion von Monozyten *in vitro* untersucht werden.

Die über CCL20/CCR6 vermittelte Adhäsion von Monozyten hängt möglicherweise, neben den oben beschriebenen direkten Ligand-Rezeptor-Interaktionen, auch von einer CCR6 vermittelten Integrinaktivierung ab. Auch wenn die Expression verschiedenster Integrine (wie α M, β 1, β 2 und α 4), die bei der Adhäsion von Monozyten beteiligt sind, durch eine CCR6-Defizienz nicht beeinflusst wurde, so kann doch nicht ausgeschlossen werden, dass eine Bindung von CCR6 eine *inside-out* Aktivierung von Integrinen nach sich zieht (vgl. [16]) und dieser Mechanismus ebenfalls zu der CCL20/CCR6 vermittelten Zelladhäsion beiträgt.

Wie in bereits veröffentlichten Berichten [41] konnte auch hier die Expression von CCL20 in humanem atherosklerotischen Plaquegewebe nachgewiesen werden. Allerdings konnte zum ersten Mal eine Expression von CCL20 durch die Endothelzellen humaner atherosklerotischen Läsionen beschrieben werden. Infolgedessen kann davon ausgegangen werden, dass die CCL20/CCR6-abhängige Adhäsion von Monozyten, die *in vitro* und zusätzlich im Tiermodell *in vivo* beobachtet werden konnte, auch im menschlichen Organismus eine Rolle spielt.

CCL20, das von Zellen innerhalb der Plaques wie den glatten Muskelzellen [41] exprimiert wird, könnte zusätzlich zur Immobilisierung von CCL20 auf der Oberfläche von Endothelzellen beitragen oder auch bei der Einwanderung von Monozyten in die Plaques durch chemotaktische Effekte von Bedeutung sein. Wan *et al.* konnten die chemotaktischen Fähigkeiten von CCL20 bereits an ApoE-defizienten Mäusen

in vitro und *in vivo* belegen [40]. Auf Grund der erwähnten Unterschiede der beiden Tiermodelle wäre es interessant, die Rolle von CCL20/CCR6 auf die Chemotaxis auch in *Ldlr*^{-/-} Tieren zu untersuchen. Zusätzlich zu der Verwendung von rekombinantem CCL20, wie hier geschehen, könnte mittels Migrations-Assays durch die Co-Kulturen stimulierter Endothel- beziehungsweise glatter Muskelzellen mit *Ccr6*^{-/-} oder *Ccr6*^{+/+} *Ldlr*^{-/-} Monozyten die pathophysiologische Situation der Atherosklerose nachempfunden werden.

5.4 Monozytensubtypen bei Mensch und Maus

Auch wenn sich die Subtypen muriner und humaner Monozyten nicht vollkommen entsprechen und somit die Übertragbarkeit von Tierstudien auf die Pathogenese der Atherosklerose im menschlichen Organismus erschwert ist, wurde in mehreren Veröffentlichungen versucht, der Funktion der einzelnen Monozytenuntergruppen des Menschen auf den Grund zu gehen [54] [63] [64] [65].

Bei Patienten, die an einer koronaren Herzerkrankung leiden, korreliert die Anzahl an zirkulierenden klassischen $CD14^{\text{high}}CD16^-$ Monozyten – diese werden als das humane Pendant der murinen $Gr-1^{\text{high}}$ Monozyten angesehen [4] [54] – mit der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren und einer positiven Familienanamnese für eine koronare Herzerkrankung [64]. In dieser prospektiven Studie von Rogacev *et al.* mit 951 Patienten konnte zudem gezeigt werden, dass zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse sowohl mit der Anzahl der klassischen $CD14^{\text{high}}CD16^-$ als auch mit der intermediären $CD14^{\text{high}}CD16^+$ Monozyten im Blut assoziiert sind [64]. Für die nicht-klassischen $CD14^{\text{low}}CD16^+$ Monozyten fand sich diese Korrelation jedoch nicht [64]. In Übereinstimmung mit diesen klinischen Daten konnten auf genetischer und auch funktioneller Ebene Belege dafür gesammelt werden, dass die beiden humanen Subtypen $CD14^{\text{high}}CD16^-$ sowie $CD14^{\text{high}}CD16^+$ den murinen $Gr-1^{\text{high}}$ Monozyten und die humanen, nicht-klassischen $CD14^{\text{low}}CD16^+$ den murinen $Gr-1^{\text{low}}$ Monozyten weitgehend entsprechen [27] [28]. Dies deutet darauf hin, dass im Mausmodell gewonnene Erkenntnisse über $Gr-1^{\text{high}}$ Monozyten in der Atherogenese in gewissem Grade auf die pathologischen Vorgänge im menschlichen Organismus bezogen werden können. Beim Menschen sind zudem sogenannte intermediäre $CD14^{\text{high}}CD16^+$ Monozyten beschrieben, die nicht wie zunächst angenommen ein Übergangsstadium zwischen den bekannten Subtypen, sondern eine gesonderte Untergruppe mit spezifischen Funktionen darstellen [66]. Dieser Monozytensubtypus existiert wohl

auch bei Mäusen, seine Rolle in der Atherosklerose wurde bisher jedoch noch nicht hinreichend charakterisiert [20]. Zudem finden sich immer mehr Hinweise darauf, dass Monozyten respektive Makrophagen, abhängig vom lokalen Mikromilieu, weitere, pleiotrope Phänotypen annehmen können und eine Unterscheidung in pro- und antiinflammatorisch die Realität hinlänglich abbildet [67]. Allerdings greifen die meisten *in vitro* Versuche – so auch in der vorliegenden Arbeit geschehen – auf diese bipolare Definition zurück. Um die Komplexität und die genaue Funktion dieser Zellen besser erfassen zu können, wären zukünftig mehr funktionell orientierte Ansätze, wie die bereits erwähnten *fate mapping*-Studien, wünschenswert [67].

In Zusammenschau vieler Einzelergebnisse konnten jedoch Hinweise gesammelt werden, dass die CCL20/CCR6-Achse zum einen die Anzahl zirkulierender Gr-1^{high} Monozyten beeinflusst, und zum anderen auch deren Adhäsion an entzündlich verändertes Endothel und die Akkumulation von Makrophagen in den Plaques vermittelt. Somit könnte die CCL20/CCR6-Achse auch im Menschen die Monozytenmobilisierung und -rekrutierung maßgebend beeinflussen und so einen neuen klinischen Ansatzpunkt zur Unterbindung der Atheroskleroseentstehung darstellen.

5.5 T-Zellhomöostase und die CCL20-CCR6-Achse

Neben seiner Rolle in der Mobilisierung, Adhäsion und Rekrutierung von Monozyten wurde CCR6 auch in seiner Bedeutung für die T-Zellhomöostase während einer Hypercholesterinämie untersucht. Dass IL-17 sezernierende CD4⁺ Th17-Zellen CCR6 exprimieren, wurde bereits vielfach beschrieben und ließ vermuten, dass CCR6 für die Rekrutierung dieser Zellen bei Entzündungsreaktionen, wie zum Beispiel in Rahmen der experimentellen autoimmunen Enzephalitis, relevant ist [42]. Im Kontext der Atherosklerose konnte jedoch kein Unterschied in der Akkumulation der Th17-Zellen in der Aorta oder gar systemische Unterschiede in den CCR6-defizienten Mäusen festgestellt werden, was gegen einen hohen Stellenwert von CCR6 bei der Rekrutierung von Th17-Zellen während der Pathogenese der Atherosklerose spricht. Im Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalitis vermittelt CCR6 neben der Rekrutierung von Th17-Zellen außerdem die von regulatorischen T-Zellen [43]. Auch bei diesem T-Zelltyp konnte bei *Ccr6*^{-/-}*Ldlr*^{-/-} Tieren vor dem Hintergrund der Atherosklerose keine veränderte systemische Frequenz festgestellt werden, so dass CCR6 vermutlich auch keine tragende Rolle in der Homöostase regulatorischer T-Zellen bei Hypercholesterinämie einnimmt.

Bisher wurde die Beobachtung bezüglich der Funktion von CCR6 in der T-Zellhomöostase im Kontext der Atherosklerose noch nicht anhand des ApoE^{-/-} Modells oder einer genetischen Deletion von CCL20 verifiziert. In der Literatur finden sich jedoch auch immer wieder Hinweise, die die Exklusivität des CCL20-CCR6-Paares in Frage stellen [55]: Es wurde gar beschrieben, dass das Chemokin CCL18, für welches lange kein Rezeptor bekannt war, an CCR6 binden und durch die Kontrolle des T-Zellinfluxes eine Aggravierung der Atherosklerose bewirken kann [68]. Allerdings wurde auch CCR8 als ein potentieller CCL18-Rezeptor identifiziert [69]. Um die Bedeutung von CCL20 und CCR6 in der Atherosklerose sowie deren Monogamie weiter ergründen und bisher gewonnene Erkenntnisse verifizieren zu können, wäre folglich ein Ccl20^{-/-} Tiermodell von Nöten. *In vitro* kann eine Deletion von CCL20 durch die funktionelle Neutralisation von CCL20 durch spezifische Antikörper imitiert und so Beobachtungen aus dem Ccr6^{-/-} Tiermodell überprüft werden – wie auch hier in den *in vitro* Flussversuchen geschehen. Nichtsdestotrotz ersetzt eine funktionelle Neutralisation eine genetische Deletion aus diversen offenkundigen Gründen nicht. Ein weiterer Aspekt, den es zu berücksichtigen gilt, sind nicht nur Unterschiede zwischen den beiden gängigen Tiermodellen, sondern auch geschlechtsspezifische Unterschiede: Forschungsstudien – auch die vorliegende – werden jedoch meist mit Versuchstieren männlichen Geschlechts durchgeführt [70], so dass wünschenswert wäre, dass die Erkenntnisse über die Rolle von CCR6 in der Atherosklerose in weiblichen ApoE^{-/-} und LDLR^{-/-} Tieren verifiziert werden würden.

5.6 Conclusio

Die Zusammenschau der Ergebnisse dieser Studie und der Literatur lässt vermuten, dass über die CCL20-CCR6-Achse wichtige Schritte kontrolliert werden, die schlussendlich zur Akkumulation von Makrophagen in der Gefäßwand und der Entstehung von Atherosklerose führen: CCR6 induziert unter chronisch inflammatorischen Bedingungen selektiv eine durch Monozyten vermittelte Entzündungsreaktion und so die Genese atherosklerotischer Läsionen, ohne jedoch die Antwort des adaptiven Immunsystems während der Atherogenese zu beeinflussen. Die CCL20-CCR6-vermittelte Mobilisierung von Monozyten sowie deren Adhäsion und Rekrutierung in die Plaque, kontrolliert zudem den Influx von Monozyten beziehungsweise Makrophagen und somit die Progression der atherosklerotischen Läsionen. Daher könnte CCR6 oder sein Ligand CCL20 ein vielversprechendes pharmakologisches Ziel sein,

um bereits die Entstehung der Atherosklerose zu unterbinden.

6 Zusammenfassung

Der Chemokinrezeptor CCR6 wird von einer Vielzahl unterschiedener Zelltypen exprimiert, wie zum Beispiel Monozyten, Th17-Zellen und regulatorische T-Zellen, die im Zusammenhang mit der Entstehung von Atherosklerose stehen. Um die Bedeutung von CCR6 in der Pathogenese der Atherosklerose bestimmen zu können, wurden $Ccr6^{-/-}$ Mäuse mit $Ldlr^{-/-}$ Mäusen gekreuzt, um Tiere zu erhalten, die anfällig für Atherosklerose und zudem CCR6-defizient sind. Nach acht Wochen pro-atherogener, fettreicher *western-type diet* war die Ausprägung der atherosklerotischen Läsionen im Aortensinus und der gesamten Aorta, sowie deren Gehalt an Plaquemakrophagen in den $Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-}$ Tieren im Vergleich zu den $Ldlr^{-/-}$ Kontrolltieren signifikant vermindert. Die lokale und die systemische Verteilung von T-Zellen sowie die Häufigkeit von Th1-, Th17-Zellen und regulatorischen T-Zellen blieb hingegen unverändert. Im Gegensatz dazu reduzierte sich die Zahl der im Blut zirkulierenden $Gr-1^{high}$ und $Gr-1^{low}$ Monozyten in den $Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-}$ Tieren deutlich. Weiter konnte gezeigt werden, dass über CCR6 *in vitro* die Adhäsion von Monozyten an inflammatorisch verändertes Endothel und *in vivo* die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel der Karotiden vermittelt wird. Des Weiteren wurden in einem *air pouch*-Modell für akute Entzündungsreaktionen mittels CCR6 spezifisch Monozyten, aber keine T-Zellen rekrutiert.

Summa summarum konnte die Bedeutung von CCR6 auf verschiedenen Ebenen der Pathogenese der Atherosklerose gezeigt werden: Während CCR6 für die Hypercholesterinämie assoziierte adaptive Immunantwort entbehrlich ist, reguliert es die Mobilisierung, Adhäsion und Rekrutierung von Monozyten und kontrolliert über diese Mechanismen die Akkumulation von Makrophagen und Genese atherosklerotischer Läsionen. CCR6 und sein Ligand CCL20 könnten somit vielversprechende Ziele neuer pharmakologischer Therapieansätze sein, um auch die Atherogenese im Menschen zu unterbinden.

Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden im Dezember 2013 im Journal *Thrombosis and Haemostasis* unter dem Titel "*CCR6 selectively promotes monocyte mediated inflammation and atherogenesis in mice*" in geteilter Erstautorenschaft von Helga Manthey, Clément Cochain und Stefanie Barnsteiner veröffentlicht. Sofern keine anderen Angaben gemacht werden, wurden alle Experimente von Stefanie Barnsteiner geplant, durchgeführt oder ausgewertet.

Literaturverzeichnis

- [1] WHO. The top 10 causes of death, fact sheet n. 310. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>, May 2014.
- [2] R. Ross. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*, 138(5 Pt 2):S419–20, 1999.
- [3] V. Kumar, A. K. Abbas, and J. C. Aster, editors. *Robbins and Cotran, Pathologic Basis of Disease*. Elsevier Saunders, 9th edition edition, 2015.
- [4] C. Weber, A. Zerneck, and P. Libby. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol*, 8(10):802–15, 2008.
- [5] G. K. Hansson and A. Hermansson. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol*, 12(3):204–12, 2011.
- [6] C. Weber and H. Noels. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*, 17(11):1410–22, 2011.
- [7] E. Galkina and K. Ley. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annu Rev Immunol*, 27:165–97, 2009.
- [8] A. H. Lichtman, M. Cybulsky, and F. W. Luscinskas. Immunology of atherosclerosis: the promise of mouse models. *Am J Pathol*, 149(2):351–7, 1996.
- [9] S. H. Zhang, R. L. Reddick, J. A. Piedrahita, and N. Maeda. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein e. *Science*, 258(5081):468–71, 1992.
- [10] S. Ishibashi, J. L. Goldstein, M. S. Brown, J. Herz, and D. K. Burns. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest*, 93(5):1885–93, 1994.
- [11] T. Matoba, K. Sato, and K. Egashira. Mouse models of plaque rupture. *Curr Opin Lipidol*, 24(5):419–25, 2013.
- [12] A. Zlotnik and O. Yoshie. The chemokine superfamily revisited. *Immunity*, 36(5):705–16, 2012.

- [13] A. Zernecke and C. Weber. Chemokines in atherosclerosis: proceedings resumed. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34(4):742–50, 2014.
- [14] A. Tedgui and Z. Mallat. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*, 86(2):515–81, 2006.
- [15] M. Drechsler, J. Duchene, and O. Soehnlein. Chemokines control mobilization, recruitment, and fate of monocytes in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35(5):1050–5, 2015.
- [16] K. Ley, C. Laudanna, M. I. Cybulsky, and S. Nourshargh. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7(9):678–89, 2007.
- [17] C. Cochain and A. Zernecke. Macrophages and immune cells in atherosclerosis: recent advances and novel concepts. *Basic Res Cardiol*, 110(4):34, 2015.
- [18] R. R. Koenen and C. Weber. Chemokines: established and novel targets in atherosclerosis. *EMBO Mol Med*, 3(12):713–25, 2011.
- [19] C. Auffray, M. H. Sieweke, and F. Geissmann. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 27:669–92, 2009.
- [20] L. Ziegler-Heitbrock. Monocyte subsets in man and other species. *Cell Immunol*, 289(1-2):135–9, 2014.
- [21] F. K. Swirski, P. Libby, E. Aikawa, P. Alcaide, F. W. Lusinskas, R. Weisleder, and M. J. Pittet. Ly-6chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest*, 117(1):195–205, 2007.
- [22] F. Tacke, D. Alvarez, T. J. Kaplan, C. Jakubzick, R. Spanbroek, J. Llodra, A. Garin, J. Liu, M. Mack, N. van Rooijen, S. A. Lira, A. J. Habenicht, and G. J. Randolph. Monocyte subsets differentially employ *ccr2*, *ccr5*, and *cx3cr1* to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 117(1):185–94, 2007.
- [23] O. Soehnlein, M. Drechsler, Y. Doring, D. Lievens, H. Hartwig, K. Kemmerich, A. Ortega-Gomez, M. Mandl, S. Vijayan, D. Projahn, C. D. Garlachs, R. R. Koenen, M. Hristov, E. Lutgens, A. Zernecke, and C. Weber. Distinct functions of chemokine receptor axes in the atherogenic mobilization and recruitment of classical monocytes. *EMBO Mol Med*, 5(3):471–81, 2013.

- [24] C. Combadiere, S. Potteaux, M. Rodero, T. Simon, A. Pezard, B. Esposito, R. Merval, A. Proudfoot, A. Tedgui, and Z. Mallat. Combined inhibition of ccl2, cx3cr1, and ccr5 abrogates ly6c(hi) and ly6c(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation*, 117(13):1649–57, 2008.
- [25] A. Zerneck and C. Weber. Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, 86(2):192–201, 2010.
- [26] C. S. Robbins, I. Hilgendorf, G. F. Weber, I. Theurl, Y. Iwamoto, J. L. Figueiredo, R. Gorbato, G. K. Sukhova, L. M. Gerhardt, D. Smyth, C. C. Zavitz, E. A. Shikatani, M. Parsons, N. van Rooijen, H. Y. Lin, M. Husain, P. Libby, M. Nahrendorf, R. Weissleder, and F. K. Swirski. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med*, 19(9):1166–72, 2013.
- [27] J. Cros, N. Cagnard, K. Woollard, N. Patey, S. Y. Zhang, B. Senechal, A. Puel, S. K. Biswas, D. Moshous, C. Picard, J. P. Jais, D. D’Cruz, J. L. Casanova, C. Trouillet, and F. Geissmann. Human cd14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via tlr7 and tlr8 receptors. *Immunity*, 33(3):375–86, 2010.
- [28] M. A. Ingersoll, R. Spanbroek, C. Lottaz, E. L. Gautier, M. Frankenberger, R. Hoffmann, R. Lang, M. Haniffa, M. Collin, F. Tacke, A. J. Habenicht, L. Ziegler-Heitbrock, and G. J. Randolph. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood*, 115(3):e10–9, 2010.
- [29] A. Gistera and G. K. Hansson. The immunology of atherosclerosis. *Nat Rev Nephrol*, 2017.
- [30] S. Taleb, A. Tedgui, and Z. Mallat. Adaptive t cell immune responses and atherogenesis. *Curr Opin Pharmacol*, 10(2):197–202, 2010.
- [31] J. L. Witztum and A. H. Lichtman. The influence of innate and adaptive immune responses on atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*, 9:73–102, 2014.
- [32] S. Taleb, A. Tedgui, and Z. Mallat. Interleukin-17: friend or foe in atherosclerosis? *Curr Opin Lipidol*, 21(5):404–8, 2010.
- [33] F. Gong, Z. Liu, J. Liu, P. Zhou, Y. Liu, and X. Lu. The paradoxical role of il-17 in atherosclerosis. *Cell Immunol*, 297(1):33–9, 2015.

- [34] D. Engelbertsen, S. Rattik, A. Knutsson, H. Bjorkbacka, E. Bengtsson, and J. Nilsson. Induction of t helper 2 responses against human apolipoprotein b100 does not affect atherosclerosis in apoe^{-/-} mice. *Cardiovasc Res*, 103(2):304–12, 2014.
- [35] E. Maganto-Garcia, M. L. Tarrío, N. Grabie, D. X. Bu, and A. H. Lichtman. Dynamic changes in regulatory t cells are linked to levels of diet-induced hypercholesterolemia. *Circulation*, 124(2):185–95, 2011.
- [36] R. Klingenberg, N. Gerdes, R. M. Badeau, A. Gistera, D. Strodthoff, D. F. Kettelhuth, A. M. Lundberg, M. Rudling, S. K. Nilsson, G. Olivecrona, S. Zoller, C. Lohmann, T. F. Luscher, M. Jauhiainen, T. Sparwasser, and G. K. Hansson. Depletion of foxp3⁺ regulatory t cells promotes hypercholesterolemia and atherosclerosis. *J Clin Invest*, 123(3):1323–34, 2013.
- [37] M. Baba, T. Imai, M. Nishimura, M. Kakizaki, S. Takagi, K. Hieshima, H. Nomiyama, and O. Yoshie. Identification of ccr6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed cc chemokine larc. *J Biol Chem*, 272(23):14893–8, 1997.
- [38] E. Schutyser, S. Struyf, and J. Van Damme. The cc chemokine ccl20 and its receptor ccr6. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14(5):409–26, 2003.
- [39] A. Yilmaz, B. Lipfert, I. Cicha, K. Schubert, M. Klein, D. Raithel, W. G. Daniel, and C. D. Garlisch. Accumulation of immune cells and high expression of chemokines/chemokine receptors in the upstream shoulder of atherosclerotic carotid plaques. *Exp Mol Pathol*, 82(3):245–55, 2007.
- [40] W. Wan, J. K. Lim, M. S. Lionakis, A. Rivollier, D. H. McDermott, B. L. Kelsall, J. M. Farber, and P. M. Murphy. Genetic deletion of chemokine receptor ccr6 decreases atherogenesis in apoe-deficient mice. *Circ Res*, 109(4):374–81, 2011.
- [41] O. Calvayrac, R. Rodriguez-Calvo, J. Alonso, J. Orbe, J. L. Martin-Ventura, A. Guadall, M. Gentile, O. Juan-Babot, J. Egido, O. Beloqui, J. A. Paramo, C. Rodriguez, and J. Martinez-Gonzalez. Ccl20 is increased in hypercholesterolemic subjects and is upregulated by ldl in vascular smooth muscle cells: role of nf-kappab. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(11):2733–41, 2011.
- [42] T. Korn, E. Bettelli, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. Il-17 and th17 cells. *Annu Rev Immunol*, 27:485–517, 2009.

- [43] T. Yamazaki, X. O. Yang, Y. Chung, A. Fukunaga, R. Nurieva, B. Pappu, N. Martin-Orozco, H. S. Kang, L. Ma, A. D. Panopoulos, S. Craig, S. S. Watowich, A. M. Jetten, Q. Tian, and C. Dong. Ccr6 regulates the migration of inflammatory and regulatory t cells. *J Immunol*, 181(12):8391–401, 2008.
- [44] H. W. Ziegler-Heitbrock, E. Thiel, A. Futterer, V. Herzog, A. Wirtz, and G. Riethmuller. Establishment of a human cell line (mono mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer*, 41(3):456–61, 1988.
- [45] C. S. Robbins, A. Chudnovskiy, P. J. Rauch, J. L. Figueiredo, Y. Iwamoto, R. Gorbato, M. Etzrodt, G. F. Weber, T. Ueno, N. van Rooijen, M. J. Mulligan-Kehoe, P. Libby, M. Nahrendorf, M. J. Pittet, R. Weissleder, and F. K. Swirski. Extramedullary hematopoiesis generates ly-6c(high) monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. *Circulation*, 125(2):364–74, 2012.
- [46] H. Selye. Effect of inflammation upon the growth of transplantable neoplasms as demonstrated by the double granuloma-pouch technique. *Br J Cancer*, 11(4):550–3, 1957.
- [47] C. Weber, R. Alon, B. Moser, and T. A. Springer. Sequential regulation of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrin avidity by cc chemokines in monocytes: implications for transendothelial chemotaxis. *J Cell Biol*, 134(4):1063–73, 1996.
- [48] M. Kubista, J. M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonak, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjoback, B. Sjogreen, L. Strombom, A. Stahlberg, and N. Zoric. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27(2-3):95–125, 2006.
- [49] B. F. Haynes, M. J. Telen, L. P. Hale, and S. M. Denning. Cd44—a molecule involved in leukocyte adherence and t-cell activation. *Immunol Today*, 10(12):423–8, 1989.
- [50] T. M. Jung, W. M. Gallatin, I. L. Weissman, and M. O. Dailey. Down-regulation of homing receptors after t cell activation. *J Immunol*, 141(12):4110–7, 1988.
- [51] A. Meissner, O. Zilles, R. Varona, K. Jozefowski, U. Ritter, G. Marquez, R. Hallmann, and H. Korner. Cc chemokine ligand 20 partially controls adhesion of naive b cells to activated endothelial cells under shear stress. *Blood*, 102(8):2724–7, 2003.
- [52] W. Wan and P. M. Murphy. Regulation of atherogenesis by chemokine receptor ccr6. *Trends Cardiovasc Med*, 21(5):140–4, 2011.

- [53] N. V. Serbina and E. G. Pamer. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor *ccr2*. *Nat Immunol*, 7(3):311–7, 2006.
- [54] F. K. Swirski, M. Nahrendorf, M. Etzrodt, M. Wildgruber, V. Cortez-Retamozo, P. Panizzi, J. L. Figueiredo, R. H. Kohler, A. Chudnovskiy, P. Waterman, E. Aikawa, T. R. Mempel, P. Libby, R. Weissleder, and M. J. Pittet. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*, 325(5940):612–6, 2009.
- [55] H. Wen, C. M. Hogaboam, N. W. Lukacs, D. N. Cook, S. A. Lira, and S. L. Kunkel. The chemokine receptor *ccr6* is an important component of the innate immune response. *Eur J Immunol*, 37(9):2487–98, 2007.
- [56] J. C. Edwards, A. D. Sedgwick, and D. A. Willoughby. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. *J Pathol*, 134(2):147–56, 1981.
- [57] V. Azcutia, M. Stefanidakis, N. Tsuboi, T. Mayadas, K. J. Croce, D. Fukuda, M. Aikawa, G. Newton, and F. W. Luscinskas. Endothelial *cd47* promotes vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation and participates in t cell recruitment at sites of inflammation in vivo. *J Immunol*, 189(5):2553–62, 2012.
- [58] P. A. Tessier, P. H. Naccache, K. R. Diener, R. P. Gladue, K. S. Neote, I. Clark-Lewis, and S. R. McColl. Induction of acute inflammation in vivo by staphylococcal superantigens. ii. critical role for chemokines, *icam-1*, and *tnf-alpha*. *J Immunol*, 161(3):1204–11, 1998.
- [59] T. Gerhardt and K. Ley. Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovasc Res*, 107(3):321–30, 2015.
- [60] H. Lortat-Jacob. The molecular basis and functional implications of chemokine interactions with heparan sulphate. *Curr Opin Struct Biol*, 19(5):543–8, 2009.
- [61] H. Lortat-Jacob, A. Grosdidier, and A. Imberty. Structural diversity of heparan sulfate binding domains in chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(3):1229–34, 2002.
- [62] K. Pojasek, Z. Shriver, Y. Hu, and R. Sasisekharan. Histidine 295 and histidine 510 are crucial for the enzymatic degradation of heparan sulfate by heparinase iii. *Biochemistry*, 39(14):4012–9, 2000.

- [63] E. Shantsila, A. Devitt, and G. Y. Lip. Circulating monocytes and atherogenesis: from animal experiments to human studies. *Thromb Haemost*, 104(2):191–3, 2010.
- [64] K. S. Rogacev, B. Cremers, A. M. Zawada, S. Seiler, N. Binder, P. Ege, G. Grosse-Dunker, I. Heisel, F. Hornof, J. Jeken, N. M. Rebling, C. Ulrich, B. Scheller, M. Bohm, D. Fliser, and G. H. Heine. Cd14⁺⁺cd16⁺ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J Am Coll Cardiol*, 60(16):1512–20, 2012.
- [65] M. Hristov and C. Weber. Differential role of monocyte subsets in atherosclerosis. *Thromb Haemost*, 106(5):757–62, 2011.
- [66] L. Ziegler-Heitbrock and T. P. Hofer. Toward a refined definition of monocyte subsets. *Front Immunol*, 4:23, 2013.
- [67] C. Cochain and A. Zernecke. Macrophages in vascular inflammation and atherosclerosis. *Pflugers Arch*, 469(3-4):485–499, 2017.
- [68] A. Y. Lee, T. K. Phan, M. D. Hulett, and H. Korner. The relationship between ccr6 and its binding partners: does the ccr6-ccl20 axis have to be extended? *Cytokine*, 72(1):97–101, 2015.
- [69] S. A. Islam, M. F. Ling, J. Leung, W. G. Shreffler, and A. D. Luster. Identification of human ccr8 as a ccl18 receptor. *J Exp Med*, 210(10):1889–98, 2013.
- [70] G. S. Getz and C. A. Reardon. Do the apoe^{-/-} and ldlr^{-/-} mice yield the same insight on atherogenesis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 36(9):1734–41, 2016.

Abbildungsverzeichnis

- 1 **Zeitlicher Verlauf, morphologische Merkmale und klinische Komplikationen der Atherosklerose.** Modifiziert nach [3]. 2
- 2 **Morphologie einer fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques.**
Eine gesteigerte Endothelpermeabilität sowie eine subendotheliale Akkumulation von Lipidpartikeln führen über einen Influx mononukleärer Zellen, eine Rekrutierung glatter Muskelzellen (*smooth muscle cell*, SMC) und eine Produktion extrazellulärer Matrix zu der Entstehung atherosklerotischer Plaques mit fibröser Kappe. Durch die Apoptose lipidbeladener Schaumzellen sowie anderer Zellen entsteht ein nekrotischer Kern aus Zell- und Lipiddebris bzw. Cholesterinkristallen. T-Zellen finden sich überwiegend in der Schulterregion der Plaques. Modifiziert nach [4]. 4
- 3 **Chemokine und deren Rezeptoren in der Atherosklerose.** Monozyten und Neutrophile werden via CCL2/-20 respektive CXCL12 aus dem Knochenmark mobilisiert. Von dendritischer Zellen sezerniertes CCL17 sowie CCL19/-21 scheinen eine Rolle im *Priming*, der Expansion und Rezirkulation von T-Zellen zu spielen. Per Chemotaxis angelockte Immunzellen werden über Chemokine und deren Rezeptoren in atherosklerotische Plaques rekrutiert. Dieser Vorgang besteht aus dem Rollen der Leukozyten entlang des aktivierten Endothels, deren fester Adhäsion und anschließende transendotheliale Migration. Endothelial immobilisierte Chemokine triggern den Leukozytenarrest über eine G-Protein-Rezeptor-vermittelte Integrinaktivierung. Welche Rolle Chemokine im Zellegress spielen, konnte bisher nicht sicher geklärt werden. Einige Chemokine respektive -rezeptoren sind jedoch an der Homöostase der Plaquezellen und deren Überlebensdauer beteiligt. Modifiziert nach [6], [18]. 7

4	<p>Angeborene Immunabwehr in der Atherosklerose. Intimale Lipidablagerungen führen zur vermehrten Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle und der Rekrutierung von Monozyten. Diese differenzieren unter dem Einfluss lokaler Wachstumsfaktoren zu Makrophagen oder dendritischen Zellen. Zudem wird der Pool der Plaquemakrophagen aus gewebständigen Makrophagenpopulationen gespeist und auch glatte Muskelzellen (<i>smooth muscle cells</i>, SMC) können in Makrophagen-ähnliche Zelltypen transdifferenzieren. Eine <i>Scavenger</i>-Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Lipidpartikeln führt zur Bildung von sogenannten Schaumzellen sowie zur Freisetzung inflammatorischer Mediatoren. Auch Antigen-präsentierende Zellen (APC) wie die dendritischen Zellen nehmen via <i>Scavenger</i>-Rezeptoren Lipidpartikel auf und initiieren die Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Modifiziert nach [6], [29].</p>	9
5	<p>Adaptive Immunabwehr in der Atherosklerose. Antigen präsentierende Zellen (APC) vermitteln über die Präsentation verschiedener Plaque-Antigene die Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Das adaptive Immunsystem spielt eine entscheidende Rolle in der Entstehung, Stabilität und Ruptur atherosklerotischer Läsionen. Von Th17 T-Zellen sezerniertes IL-17A unterstützt die Plaquestabilität via Kollagenproduktion durch die glatten Muskelzellen. Th1-Zellen sezernieren INF-γ, welches zu einer Makrophagenaktivierung und einer Degeneration der stabilisierenden fibrösen Kappe führt und somit die Vulnerabilität der Plaques begünstigt. Regulatorische T-Zellen (Tregs) modulieren die inflammatorischen Prozesse anderer T-Helferzellen. Modifiziert nach [29].</p>	11
6	<p>Ein CCR6-Knockout reduziert das Ausmaß der Atherosklerose in Ldlr^{-/-} Mäusen. A - D) Analyse der Plaquegröße in Ldlr^{-/-} (n = 10) und Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-} Mäusen (n = 13) nach acht Wochen fettreicher <i>western type</i> Diät. A, B) Repräsentative Schnitte der Aortenwurzel gefärbt mit Picrosirius red und Gabe's Aldehyde Fuchsin und Quantifizierung der Plaquegröße (Orginalvergrößerung: x 10). C, D) Quantifizierung des Plaqueanteils relativ zur Gesamtoberfläche der Aorta und repräsentative Schnitte der thorakoabdominalen Aorta gefärbt mit Oil-Red-O. Experimentator: Helga Manthey und Stefanie Barnsteiner. * p < 0,05; ** p < 0,01.</p>	28

- 7 **CCR6-Knockout reduziert das Ausmaß der Atherosklerose in Ldlr^{-/-} Mäusen.** A - E) Analyse der Plaquezusammensetzung in Ldlr^{-/-} (n = 10) und Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-} Mäusen (n = 13) nach acht Wochen fettreicher *western type* Diät. A, B) Gefärbte Mac-2⁺ Makrophagen in Schnitten der Aortenwurzel (Originalvergrößerung: x 40) und Quantifizierung der Makrophagenzahl pro Schnitt. C - E) Quantifizierung der CD3⁺ T-Zellen (C), α -smooth muscle actin⁺ glatten Muskelzellen (D) und des Kollagengehalts (E) pro Schnitt. Experimentator: Helga Manthey und Stefanie Barnsteiner. ** p < 0,01; *** p < 0,001. . . . 29
- 8 **CCR6-Knockout beeinflusst den T-Zellphänotyp inflammatorisch-veränderter Gefäße nicht.** A - G) Durchflusszytometrische Analyse von enzymatisch zu Einzelzellsuspensionen abgebauten Aorten und Aortenwurzeln von Ldlr^{-/-} (n = 5) und Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-} (n = 6) Mäusen nach acht Wochen *western type* Diät. A) Gesamtzahl der CD4⁺ und B) CD8⁺ T-Zellen in den Aortenwurzeln sowie den Aorten. C) Repräsentative Dot-plots (aus den Proben der Aorta) und D, E) der prozentuale Anteil von IL-17A⁺ Th17 und INF γ ⁺ Th1 an CD4⁺ T-Zellen der Aortenwurzeln und der Aorta. F) Prozentualer Anteil von IL-17A⁺ und G) INF γ ⁺ Zellen an CD8⁺ T-Zellen der Aortenwurzeln und der Aorta. Experimentator: Helga Manthey. . . . 32
- 9 **Ein CCR6-Knockout beeinflusst die systemische T-Zellantwort nicht.** A - J) Durchflusszytometrische Analyse von Blut (A, C, E, G, I) und Milzgewebe (B, D, F, H, J) von Ldlr^{-/-} (n = 11) und Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-} Mäusen (n = 13) nach acht Wochen fettreicher *western type* Diät. A, B) Prozentualer Anteil von CD3⁺ Zellen an der Gesamtzahl der CD45⁺ Leukozyten. C, D) Prozentualer Anteil von CD4⁺ Zellen an der Gesamtzahl der CD45⁺ Leukozyten. E, F) Prozentualer Anteil von aktivierten CD44^{hi} CD4⁺ Zellen. G, H) Prozentualer Anteil von CD8⁺ Zellen an der Gesamtzahl der CD45⁺ Leukozyten. I, J) Prozentualer Anteil von aktivierten CD44^{hi} CD8⁺ Zellen. Experimentator: Helga Manthey und Stefanie Barnsteiner. 34

- 10 **Ein CCR6-Knockout beeinflusst die systemische T-Helferzellantwort nicht.** A - F) Durchflusszytometrische Analyse von Blut (A, C, E) und Milzgewebe (B, D, F) von *Ldlr*^{-/-} (n = 11) und *Ccr6*^{-/-}*Ldlr*^{-/-} Mäusen (n = 13) nach acht Wochen fettreicher *western type* Diät. A, B) Prozentualer Anteil von IL-17A⁺ Zellen an CD3⁺ T-Zellen. C, D) Prozentualer Anteil von INF γ ⁺ Zellen an CD3⁺ T-Zellen. E, F) Prozentualer Anteil von CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen. Experimentator: Helga Manthey. 35
- 11 **CCR6 reguliert Anzahl zirkulierender Monozyten bei Hypercholesterinämie in Mäusen.** Durchflusszytometrische Blutanalyse von *Ldlr*^{-/-} (n = 11) und *Ccr6*^{-/-}*Ldlr*^{-/-} Mäusen (n = 13) nach acht Wochen fettreicher *western type* Diät. A - E) Absolute Zahlen von CD45⁺ Leukozyten (A), SSC^{high}CD11b⁺CD115⁻Gr1^{high} Neutrophilen (B), CD11b⁺CD115⁺ Monozyten (C), CD11b⁺CD115⁺Gr1^{high} Monozyten (D), CD11b⁺CD115⁺Gr1^{low} Monozyten (E) in *Ldlr*^{-/-} und *Ccr6*^{-/-}*Ldlr*^{-/-} Mäusen nach acht Wochen fettreicher *western type* Diät. F, G) Prozentualer Anteil von CD11b⁺CD115⁺ Monozyten an CD45⁺ Leukozyten (F) und repräsentative Dot-plots (G) im Blut. H, I) Prozentualer Anteil von CD11b⁺CD115⁺ Monozyten an CD45⁺ Leukozyten in Knochenmark (H) und Milz (I). Experimentator: Helga Manthey und Stefanie Barnsteiner. * p < 0,05; *** p < 0,001; n.s - nicht signifikant. 38
- 12 **CCL20 wird in atherosklerotischen Plaques des Menschen exprimiert.** Repräsentative Schnitte atherosklerotischer Plaques aus humanen Karotiden zur immunhistochemischen Analyse von CCL20 und Isotypenkontrolle (Orginalvergrößerung: x 200): durch CCL20-Antikörper gefärbte luminale Endothelzellen (Pfeilspitzen) und intraläsionale Zellen (Pfeile). Experimentator: Clément Cochain in Kooperation mit Herrn PD Dr. Jaroslav Pelisek. * p < 0,05; ** p < 0,01. 39

- 13 **CCL20 wird durch proinflammatorische Stimuli in murinen und humanen Endothelzellen induziert.** A) HUVECs wurden für die angegebene Zeit mit PBS oder $\text{TNF}\alpha$ inkubiert. Die Expression von CCL20-mRNA (n = 2/Zeitpunkt) wurde mittels Real-time PCR analysiert (relativ zu HPRT). B) mECs wurden mit PBS, $\text{TNF}\alpha$ oder LPS für vier Stunden behandelt und die Expression von CCL20-mRNA (n = 2/Bedingung) wurde mittels Real-time PCR analysiert (relativ zu HPRT). C) Repräsentative Bilder von auf Objektträgern kultivierten HUVECs. Die Zellen wurden acht Stunden mit PBS oder $\text{TNF}\alpha$ inkubiert und anschließend einer immunhistochemischen Färbung für intrazelluläres sowie oberflächlich exprimiertes CCL20 unterzogen (Originalvergrößerung: x 100). Experimentator: Stefanie Barnsteiner. * p < 0,05; ** p < 0,01. 41
- 14 **CCR6/CCL20 vermittelt Adhäsion von Monozyten an entzündlich verändertes Endothel** A, B) Über Nacht mit $\text{TNF}\alpha$ stimulierte murine Endothelzellen (mECs) wurden unter Flussbedingungen mit aus $\text{Ldlr}^{-/-}$ (n = 6) und $\text{Ccr6}^{-/-}\text{Ldlr}^{-/-}$ Tieren (n = 6) isolierten und fluoreszenzmakierten Monozyten (grün) perfundiert. Repräsentative Aufnahmen (A) und Quantifizierung (B) adhärenter Monozyten nach vierminütiger Perfusion. C) Adhäsion von MonoMac6 Zellen an $\text{TNF}\alpha$ stimulierte humane Endothelzellen (HUVECs) bei gleichzeitiger Präsenz von neutralisierenden anti-CCL20-Antikörpern oder Isotypenkontrolle. D, E) Karotiden von $\text{Ldlr}^{-/-}$ (n = 4) und $\text{Ccr6}^{-/-}\text{Ldlr}^{-/-}$ Tieren (n = 4) wurden nach acht Wochen fettreicher *western type* Diät freigelegt. Repräsentative Bilder (D) und Quantifizierung (E) am Gefäßendothel adhärierender, Rhodamin G-gelabelter Leukozyten in der Intravialmikroskopie. Experimentator: A, B) Stefanie Barnsteiner in Kollaboration mit Frau Dr. Ela Karshovska. C) Frau Dr. Ela Karshovska. E, D) Alma Zerneck. * p < 0,05; ** p < 0,01. 43
- 15 **CCR6/CCL20 vermittelt Adhäsion unabhängig von Integrinen** A, B) FACS-Analyse der Integrinexpression von $\text{Gr-1}^{\text{high}}$ (A) und Gr-1^{low} Monozyten (B) in $\text{Ldlr}^{-/-}$ (n = 4) und $\text{Ccr6}^{-/-}\text{Ldlr}^{-/-}$ Tieren (n = 4) nach acht Wochen fettreicher *western type* Diät. Experimentator: Clement Cochain. * p < 0,05; ** p < 0,01. 44

- 16 **CCR6 kontrolliert Monozytenrekrutierung an den Entzündungsort A-E)** In *Ldlr*^{-/-} (n = 8) und *Ccr6*^{-/-}*Ldlr*^{-/-} Tieren (n = 8) angelegte *air pouches* wurde TNF α oder zur Kontrolle PBS injiziert und nach 20 Stunden gewaschen um die Zellrekrutierung zu analysieren. A) Absolute Zellzahlen, B) Anzahl von CD115⁺ Monozyten, C) Anzahl von CD115⁺Gr-1^{high} Monozyten, D) Anzahl von CD115⁺Gr-1^{low} Monozyten, E) Anzahl von Neutrophilen in der Pouchflüssigkeit. F) Anzahl von CD115⁺ Monozyten im peripheren Blut der Tiere. Experimentator: Stefanie Barnsteiner. * p < 0,05; n.s - nicht signifikant. 45
- 17 **CCR6 beeinflusst die Rekrutierung von T-Zellen bei akuten Reaktionen nicht.** A-D) In *Ldlr*^{-/-} (n = 8) und *Ccr6*^{-/-}*Ldlr*^{-/-} Tieren (n = 8) angelegte *air pouches* wurde TNF α oder zur Kontrolle PBS injiziert und nach 20 Stunden gewaschen um die Zellrekrutierung zu analysieren. A) Anzahl von der gesamten CD3⁺ T-Zellen, B) Anzahl von CD4⁺CD3⁺ T-Zellen, C) Anzahl von Th17 und D) Anzahl von Th1 Zellen in der Spülflüssigkeit. Experimentator: Stefanie Barnsteiner. * p < 0,05; n.s - nicht signifikant. 46

Tabellenverzeichnis

1	Hauptrisikofaktoren für die Entstehung einer Atherosklerose. Durch präventive Maßnahmen bezüglich der modifizierbaren Risikofaktoren kann das Auftreten sowie die Progression einer Gefäßkrankung deutlich verringert werden. Modifiziert nach [3].	3
2	Körpergewicht, Serumcholesterin und -triglyceride der $Ldlr^{-/-}$ (n=11) und $Ccr6^{-/-}Ldlr^{-/-}$ Mäuse (n=13) nach acht Wochen <i>western-type</i> Diät.	30

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-präsentierende Zelle
Apo	Apolipoprotein
CCL20	C-C Ligand Typ 20, Synonym: inflammatorisches Makrophagenprotein 3alpha
CCR6	C-C Chemokinrezeptor Typ 6
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD4-T-Zellen	T-Helfer-Zellen
CD8-T-Zellen	Zytotoxische T-Zellen, Synonym siehe: CTL
CTL	<i>Cytotoxic T-lymppocyte</i> , Synonym siehe: CD8
DC	Dentritische Zellen
EZM	Extrazelluläre Matrix
HS-PGs	Heparansulfat-Proteoglykane
HUVECs	<i>Human umbilican vein endothelial cells</i>
IL	Interleukin
INF	Interferon
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	<i>Low-density</i> Lipoprotein
LDLR	<i>Low-density</i> Lipoprotein Rezeptor
MACs	Makrophagen
mECs	Murine Endothelzellen, siehe: SVECs
MIP 3alpha	siehe: CCL20
oxLDL	Oxidiertes <i>low-density</i> Lipoprotein
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> : Polymerasekettenreaktion
SMCs	<i>Smooth muscle cells</i> : glatte Muskelzellen
SVECs	<i>SV40-transformed mouse lymphatic endothelial cells</i>
Th1-Zellen	T-Helfer-Zellensubtyp, INF- γ sezernierend
Th17-Zellen	T-Helfer-Zellensubtyp, IL-17A sezernierend
Th2-Zellen	T-Helfer-Zellensubtyp
Tregs	Regulatorische T-Zellen, IL-10 und TGF- β sezernierend

Danksagung

Mein ausserordentlicher Dank gilt meiner Doktormutter und Mentorin Alma Zerneckemadsen und meiner Betreuerin Helga Manthey - für ihre Unterstützung, weit über die Zeiten dieses Projektes hinaus. Weiter möchte ich Clemens Cochain für seine Hilfe bei der Revision des Papers danken und nicht zuletzt der gesamten AG Zerneckes: Martin Busch - Sweena Chaudhari - Theresa Henninger - Miriam Koch - Luisa Molinari - und insbesondere Melanie Schott - die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Zudem gilt mein Dank Kathrin Hipp für die zahllos geopferten Stunden während der Korrekturzeit und Miriam Küng für die Unterstützung beim Anfertigen der Abbildungen.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Dissertation selbständig angefertigt habe. Übernommene Inhalte wurden von mir eindeutig gekennzeichnet. Die Gelegenheit zum Promotionsverfahren wurde mir nicht kommerziell vermittelt. Insbesondere wurde keine Person oder Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuer bzw. Betreuerinnen für die Anfertigung von Dissertationen sucht. Ich erkläre weiterhin, dass ich die Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten habe. Meine Dissertation wurde weder vollständig noch teilweise schon einmal einer anderen Fakultät mit dem Ziel, einen akademischen Grad zu erzielen, vorgelegt. Ich habe am 29. Oktober 2015 an der Universität Würzburg den Studiengang Experimentelle Medizin mit dem Abschluss Master of Science (Titel der Abschlussarbeit: Charakterisierung von Exon 4-KRAS-Mutationen im Multiplen Myelom) abgeschlossen. Es wurde mir kein akademischer Grad entzogen, noch wurde gegen mich diesbezüglich ein strafrechtliches Ermittlungsverfahren oder Disziplinarverfahren eingeleitet.