



Die Rolle von CD84 in der Immunzellrekrutierung der Atherosklerose
The role of CD84 in the immune cell recruitment of atherosclerosis

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Biomedizin

Vorgelegt von

Malte Lippert

aus

Berlin

Würzburg, 2020

Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

- Vorsitzender:** Prof. Dr. Stefan Störk
1. Betreuerin: Prof. Dr. Alma Zerneck-Madsen
2. Betreuer: Dr. Erik Henke
3. Betreuer: Prof. Dr. Bernhard Nieswandt

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Meinen lieben Eltern.

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS.....	VIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IX
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 DIE ATHEROSKLEROSE UND IHRE KLINISCHE BEDEUTUNG	1
1.2 PATHOGENESE UND IMMUNOLOGISCHE GRUNDLAGEN IN DER ATHEROSKLEROSE	1
1.3 BEDEUTUNG DES IMMUNSYSTEMS IN DER ATHEROSKLEROSE	7
1.4 ADHÄSION UND TRANSMIGRATION VON MONOZYTEN	8
1.5 EXPERIMENTELLE MAUSMODELLE.....	12
1.6 CD84.....	12
1.7 FORSCHUNGSFRAGEN – CD84 IN DER ATHEROSKLEROSE.....	15
2 MATERIALIEN	18
2.1 VERBRAUCHSMATERIAL	18
2.2 INSTRUMENTE	19
2.3 REAKTIONSKITS.....	20
2.4 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	20
2.5 REAGENZIEN FÜR DIE ZELLKULTUR	21
2.6 ANTIKÖRPER	22
2.7 SOFTWARE	24
2.8 PUFFER UND MEDIEN.....	24
2.9 MAUSSTÄMME UND ZELLINIEN	25
3 METHODEN	26
3.1 CD84-DEFIZIENTES TIERMODELL.....	26
3.2 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	27
3.2.1 <i>Isolation des Knochenmarks aus Femur und Tibia.....</i>	<i>27</i>
3.2.2 <i>Erzeugung von Makrophagen aus dem Knochenmark der Maus.....</i>	<i>27</i>
3.2.3 <i>Auftauen und Einfrieren von Zellen</i>	<i>27</i>
3.2.4 <i>Ablösen adhärenter Zellen.....</i>	<i>28</i>
3.2.5 <i>Splitten adhärenter Zellen</i>	<i>28</i>
3.2.6 <i>Isolation glatter Muskelzellen aus der murinen Aorta</i>	<i>28</i>
3.2.7 <i>Enzymatische Gewebeverdauung.....</i>	<i>29</i>
3.3 <i>IN VIVO</i> EXPERIMENTE.....	30
3.3.1 <i>Hintergliedmaßen-Ischämiemodell</i>	<i>30</i>
3.3.2 <i>Air Pouch-Modell für Zellrekrutierung.....</i>	<i>31</i>
3.3.3 <i>Modell der gemischten Knochenmarkchimäre.....</i>	<i>32</i>
3.4 <i>IN VITRO</i> EXPERIMENTE.....	34

3.4.1	<i>Immunhistochemische Analyse muriner Plaques</i>	34
3.4.2	<i>In vitro Adhäsions-Assay</i>	35
3.4.3	<i>Chemotaktischer in vitro Transmigrations-Assay</i>	38
3.4.4	<i>Integrinexpression auf Monozyten</i>	39
3.4.5	<i>Löslicher-Ligand basierter Adhäsions Assay</i>	40
3.4.6	<i>Zellviabilität und Lumineszenz ATP Assay</i>	41
3.5	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	42
3.6	STATISTIK	42
4	ERGEBNISSE	44
4.1	IMMUNHISTOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER MURINEN PLAQUES	44
4.2	ZELLVIABILITÄT VON MAKROPHAGEN	49
4.3	HINTERGLIEDMABEN-ISCHÄMIEMODELL	50
4.4	<i>AIR POUCH</i> -MODELL FÜR ZELLREKRUTIERUNG	56
4.5	ADHÄSION VON MONOZYTEN <i>IN VITRO</i>	58
4.6	CHEMOTAKTISCHE TRANSMIGRATION VON MONOZYTEN <i>IN VITRO</i>	60
4.7	GEMISCHTE KNOCHENMARKCHIMÄRE	62
4.8	INTEGRINEXPRESSION AUF MONOZYTEN	67
4.9	EXPRESSION UND AKTIVIERUNG VON LFA-1 AUF T-ZELLEN	70
5	DISKUSSION	72
5.1	IMMUNHISTOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER MURINEN PLAQUES	72
5.2	ÜBERLEBENSFÄHIGKEIT VON MAKROPHAGEN <i>IN VITRO</i>	75
5.3	IMMUNZELLREKRUTIERUNG UNTER INFLAMMATORISCHEN BEDINGUNGEN <i>IN VIVO</i>	77
5.4	ADHÄSION UND CHEMOTAKTISCHE TRANSMIGRATION VON MONOZYTEN <i>IN VITRO</i>	80
5.5	IMMUNZELLREKRUTIERUNG BEI GEMISCHTEN KNOCHENMARKCHIMÄREN	82
5.6	INTEGRINEXPRESSION UND -AKTIVIERUNG AUF IMMUNZELLEN	84
5.7	CONCLUSIO	86
6	ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	88
	LITERATURVERZEICHNIS	91
	DANKSAGUNG	102
	CURRICULUM VITAE	102
	PUBLIKATIONEN	105
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	106
	ANHANG	Elektronischer Datenträger

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die zehn häufigsten Todesursachen weltweit.....	1
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Atherogenese vom gesunden Endothel bis zur Ausbildung einer vulnerablen Plaque.....	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Akkumulation und Modifizierung von Monozyten, Makrophagen und vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) in frühen atherosklerotischen Läsionen.....	5
Abbildung 4: Transmigrationskaskade von Monozyten und daran beteiligten Molekülen.	11
Abbildung 5: Die Banddarstellung des homophilen Dimers CD84.	13
Abbildung 6: Kreuzung von Mäusen, denen sowohl das CD84-Gen als auch das ApoE-Gen fehlt, resultiert in Mäusen mit dem Doppel-Knockout-Genotyp ApoE.CD84 ^{-/-}	26
Abbildung 7: <i>In vitro</i> Adhäsions-Assay.	37
Abbildung 8: <i>In vitro</i> Transmigrations-Assay.....	39
Abbildung 9: Repräsentative Schnitte durch die Aortenwurzel der Versuchstiere nach acht Wochen unter HFD.	44
Abbildung 10: Ausmaß der Atherosklerose sowie der Anteil an Makrophagen, des nekrotischen Kernes und Kollagen innerhalb der atherosklerotischen Plaque in ApoE ^{-/-} -Mäusen nach acht Wochen HFD.	46
Abbildung 11: Ausmaß der Atherosklerose sowie der Anteil an Makrophagen, des nekrotischen Kernes, des Kollagens und glatten Muskelzellen innerhalb der atherosklerotischen Plaque in ApoE ^{-/-} -Mäusen nach 16 Wochen HFD.....	48
Abbildung 12: Zellviabilität von CD84 ^{-/-} und WT-Makrophagen unter Stimulation mit 10 und 20 µg/mL CHX sowie mit 10 und 50 µg/mL oxLDL.	50
Abbildung 13: Immunzellzahlen im Blut der Mäuse 24 Stunden nach operativem Eingriff.....	52
Abbildung 14: Immunzellzahlen im ischämischen und nicht-ischämischen Muskel der Hintergliedmaßen 24 Stunden nach operativem Eingriff.	53
Abbildung 15: Immunzellzahlen im Blut der Mäuse 72 Stunden nach operativem Eingriff.....	54

Abbildung 16: Immunzellzahlen im ischämischen und nicht-ischämischen Muskel der Hintergliedmaßen 72 Stunden nach operativem Eingriff.	55
Abbildung 17: Zahlen der Zellpopulationen innerhalb des subkutanen Luftpolsters 24 Stunden nach Injektion von 50 ng TNF- α	57
Abbildung 18: Durchflusszytometrische Analyse der CD115 ⁺ Ly6G ⁻ Monozyten nach Isolation der Zellen aus dem Knochenmark.	58
Abbildung 19: Adhärente CFSE-markierte Monozyten fünf Minuten nach dem Start des Flusses.	59
Abbildung 20: Adhärente Monozyten beider untersuchter Genotypen an das unstimulierte und stimulierte Endothel 5 Minuten nach Start des Flusses.	60
Abbildung 21: Transmigration innerhalb der Boyden-Kammer jeweils ohne und mit Zugabe von CCL2.	62
Abbildung 22: Durchflusszytometrische Analyse der Monozyten aus dem Blut.	63
Abbildung 23: Durchflusszytometrische Analyse der Makrophagen aus der Aorta.	64
Abbildung 24: Anzahl an Monozyten und T-Zellen im Blut der Knochenmarkchimären.	65
Abbildung 25: Anzahl an Monozyten und T-Zellen in der Aorta der Knochenmarkchimären.	65
Abbildung 26: Darstellung des Verhältnisses der Zellen aus dem Blut zu Zellen in der Aorta aus CD84-positiven und CD84-defizienten Mäusen.	66
Abbildung 27: Integrinexpression auf der Zelloberfläche von Monozyten aus dem Knochenmark von B6 sowie B6.CD84 ^{-/-} Mäusen.	68
Abbildung 28: Integrinexpression auf der Zelloberfläche von Monozyten aus dem Blut von B6 sowie B6.CD84 ^{-/-} Mäusen.	69
Abbildung 29: Anteil an T-Zellen, auf denen ICAM-1-Fc gebunden ist. Mittlere Fluoreszenz-Intensität als Indikator für die ICAM-1-Fc-Bindungspotenz der Zellen.	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Unterschiede zwischen den Monozyten-Subgruppen beim Menschen und bei der Maus.....	9
Tabelle 2: Verbrauchsmaterial.....	18
Tabelle 3: Instrumente.....	20
Tabelle 4: Reaktionskits.....	20
Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien.....	21
Tabelle 6: Reagenzien für die Zellkultur.....	22
Tabelle 7: Antikörper.....	24
Tabelle 8: Software.....	24
Tabelle 9: Puffer und Medien.....	25
Tabelle 10: Mausstämme und Zelllinien.....	25
Tabelle 11: Übersicht über die <i>in vivo</i> Experimente.....	30
Tabelle 12: Übersicht über die <i>in vitro</i> Experimente.....	34

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
APC	Antigen presenting cell
ApoE	Apolipoprotein E
BMDC	Bone marrow-derived dendritic cells
BSA	Bovine serum albumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCL	CC-Chemokinligand
CCR	CC-Chemokinrezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CHX	Cycloheximid
CLL	Chronisch-lymphatische Leukämie
CXCL	CXC-Ligand
CXCR	CXC-Rezeptor
Cy3/5.5/7	Cyanin 3/5.5/7
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindole
DC	Dendritic cell
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
EAT-2	Ewing's Sarcoma-associated Transcript 2
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
ECM	Extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERT	EAT-2 related transducer
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FcεRI	High-affinity receptor for the Fc region of immunoglobulin E
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
g	Gravitationskraft

GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl) ethansulfonsäure
Hi	High
ICAM	Intercellular adhesion molecule
ICOS	Inducible costimulatory molecule
IFN α	Interferon alpha
IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
ITSM	Immunrezeptor-Tyrosin-Switch-Motive
JAM	Junctional Adhesion Molecule
KCl	Potassium chloride
kDa	Kilodalton
LDL	Low-density lipoprotein
Ldlr	Low-density lipoprotein receptor
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
lo	low
log	Logarithmus
LOX-1	Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1
LPS	Lipopolysaccharide
Ly6C	Lymphocyte antigen 6 complex, locus C
Ly6G	Lymphocyte antigen 6 complex, locus G
M	Molarity
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
mac	Macrophage
Mac-1	Macrophage-1 antigen
MAPK	Mitogen-activated protein Kinase
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
MDP	Macrophage and DC progenitor
MFI	Mean fluorescence intensity
MgCl ₂	Magnesium chloride
ml/mm	Milliliter/Millimeter
mM	Millimolar

Na ₂ HPO ₄	Disodium phosphate
NaCl	Sodium chloride
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
ng/μg/mg/g	Nano-/Mikro-/Milli-/gram
NK cells	Natural killer cells
oxLDL	Oxidised low-density lipoprotein
PBS	Phosphate buffered saline
PD-1/PDL-1	Programmed cell death (ligand) 1
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
PET	Polyethylene terephthalate
PFA	Paraformaldehyde
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PSGL1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1
Rcf	relative centrifugal force
rpm	Revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Room temperature
SAP	SLAM-associated Protein
SEM	Standard error of mean
SL-AA	Soluble-ligand-based adhesion assay
SLAM	Signaling Lymphocyte Activation Molecule
SMA	Smooth muscle cell actin
SMC	Smooth muscle cell
SVEC	SV-40-transformed mouse lymphatic endothelial cells
Tfh	T follicular helper cell
TGFα/β	Transforming growth factor alpha/beta
Th1/2/17	T helper Type 1/2/17 cell
TNFα	Tumor necrosis factor alpha
Treg	regulatory T cells
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VLA-4	Very late antigen-4
VSMC	Vascular smooth muscle cell
WT	Wildtype
μl/μm	Mikroliter/Mikrometer

1 Einleitung

1.1 Die Atherosklerose und ihre klinische Bedeutung

Die Atherosklerose ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der arteriellen Gefäßwand, deren Folgeerscheinungen weltweit zu den Haupttodesursachen gehören (s. Abbildung 1). Zu den wichtigsten klinischen Manifestationen der Atherosklerose zählen die koronare Herzkrankheit (KHK), die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) und die zerebrale Ischämie (Schlaganfall).

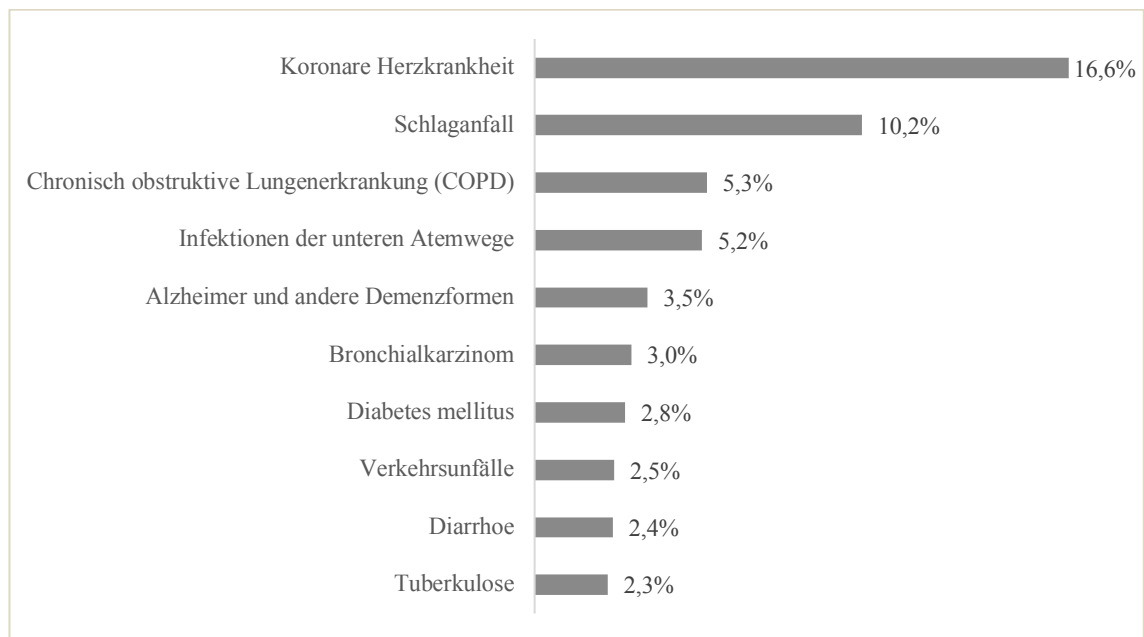


Abbildung 1: Die zehn häufigsten Todesursachen weltweit. Die Zahlen beziehen sich auf die weltweiten Todeszahlen aus dem Jahr 2016 in Prozent. Dabei sind rund 54% aller Todesfälle auf die zehn häufigsten Todesursachen zurückzuführen (eigene Darstellung in Anlehnung an: World Health Organization, 2018).

1.2 Pathogenese und immunologische Grundlagen in der Atherosklerose

Die genaue Pathophysiologie der Atherogenese ist zum großen Teil unbekannt, jedoch können bestimmte Bedingungen, Merkmale oder Gewohnheiten die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung der Atherosklerose erhöhen (Rafieian-Kopaei, Setorki, Doudi, Baradaran, & Nasri, 2014).

Die wichtigsten Risikofaktoren wie hoher Cholesterin- und *low-density-lipoprotein* (LDL)-Spiegel, niedriger *high-density-lipoprotein* (HDL)-Spiegel, Diabetes mellitus, Adipositas, arterielle Hypertonie, Nikotinabusus und inaktiver Lebensstil können kontrolliert und die Entwicklung der Atherosklerose mittels frühzeitiger Interventionen ver-

zögert werden. Daneben existieren nicht-modifizierbare Risikofaktoren, wie männliches Geschlecht und hohes Lebensalter (Owen, Lindsay, Choudhury, & Fayad, 2011; Ross, 1993; Weber & Noels, 2011). Im Allgemeinen gilt die Atherosklerose als eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Arterienwand (Ross, 1999).

Während ein Teil des Prozesses, der zur Ausbildung atherosklerotischer Plaques führt, bereits bekannt sind, bleiben wesentliche Schritte, die zum genaueren Verständnis dieser Gefäßerkrankung und dadurch zu der Erforschung eines möglichen Therapieansatzes beitragen würden, im Verborgenen.

Die früheste Art der atherosklerotischen Läsionen, die so genannten Fettstreifen (*fatty streaks*), kommen bereits bei Säuglingen und Kleinkindern häufig vor (Napoli et al., 1997) und bestehen aus subendothelialen Ablagerungen von Lipiden, mit Cholesterin beladenen Makrophagenschaumzellen und T-Zellen, was eine frühe entzündliche Komponente des Prozesses unterstreicht (Stary et al., 1994).

Sowohl die angeborene (Lundberg & Hansson, 2010; Weber & Noels, 2011; Weber, Zerneck, & Libby, 2008) als auch die adaptive (Ait-Oufella, Sage, Mallat, & Tedgui, 2014; Andersson, Libby, & Hansson, 2010) Immunantwort spielen eine entscheidende Rolle bei der Bildung und des Wachstums atherosklerotischer Läsionen.

Der zugrundeliegende chronisch-entzündliche Prozess innerhalb der Wand großer und mittlerer elastischer und muskulärer Arterien findet insbesondere an Prädilektionsstellen, wie zum Beispiel arteriellen Verzweigungsstellen mit gestörter laminarer Strömung und geringem, oszillierenden Scherstress, statt (Weber & Noels, 2011).

Die modifizierte *Response-to-injury* Hypothese besagt, dass dem entzündlichen Prozess eine Dysfunktion des Gefäßendothels, der Zellauskleidung der Gefäßwand, vorausgeht (s. Abbildung 2), die zu Veränderungen in der Permeabilität führt (Ross, 1999), was wiederum in der vermehrten Aufnahme und Speicherung von zirkulierenden Lipiden wie cholesterinhaltigen LDL resultieren kann (Hansson & Hermansson, 2011).

LDL transportiert Cholesterin im Blut von der Leber zu den einzelnen Zellen im Organismus. Diese Partikel enthalten unter anderem verestertes Cholesterin und Triglyceride, die von einer Hülle aus Phospholipiden, freiem Cholesterin und Apolipoprotein B100 (ApoB100) umgeben sind. Zirkulierende LDL-Partikel können sich in der Intima, der innersten Schicht der Arterie, ansammeln. Hier bindet ApoB100 über ionische Wechselwirkungen an Proteoglykane der extrazellulären Matrix (Tabas, Williams, & Boren, 2007).

Durch die subendotheliale Retention der LDL-Partikel kann es in der Intima zu oxidativen Veränderungen kommen, die durch enzymatischen Angriff von Myeloperoxidase und Lipoxygenasen oder durch reaktive Sauerstoffspezies, Phenoxyradikalzwischenprodukte oder Peroxynitrit, die in der Intima als Folge von Entzündungen entstehen, verursacht werden können. Die Peroxidation von Fettsäureresten in Phospholipiden, Cholesterinestern und Triglyceriden erzeugt reaktive Aldehyde und verkürzte Lipide (Hansson & Hermansson, 2011; Skalen et al., 2002), welche in der Folge, verstärkt durch den turbulenten Blutfluss an den arteriellen Verzweigungspunkten, die Ausbildung eines pro-inflammatorischen Endothelzellphänotyps und die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen provozieren können, die für die Rekrutierung zirkulierender Immunzellen in die Intima relevant sind (Gimbrone & Garcia-Cardena, 2016).

Es kommt weiterhin zur verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Selektin und VCAM-1 auf der Endotheloberfläche. Dies wirkt synergistisch mit sezernierten Chemokinen wie CCL2, CCL5, CXCL10 und CX3CL1, um Immunzellen anzulocken (Zernecke, Shagdarsuren, & Weber, 2008). Die Hemmung von CCR2, CX3CR1 und CCR5 verhindert die Rekrutierung von Monozyten bei hyperlipidämischen Mäusen und blockiert fast vollständig die Bildung von atherosklerotischen Plaques (Combadiere et al., 2008). Der von aktivierten Endothelzellen sezernierte Makrophagen-Koloniestimulierende Faktor (M-CSF), bewirkt eine Differenzierung von Monozyten in der Intima zu Makrophagen. Bei den Makrophagen kommt es zur Hochregulation bestimmter Rezeptoren, wie etwa dem Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) (Morawietz, 2007), die in der Folge insbesondere moderat modifiziertes oxidiertes LDL (oxLDL) aufnehmen können. Ebenfalls kommt es zur Expression von CD36, welches als Scavenger-Rezeptor wesentlich an der Aufnahme von vollständig oxidiertem LDL beteiligt ist (Park, 2014). Die daraus resultierende Cholesterinakkumulation verwandelt diese Makrophagen schließlich in die für die atherosklerotische Läsion charakteristischen Schaumzellen (Hansson & Libby, 2006).

Neben Makrophagen, die die Hauptzellpopulation innerhalb der atherosklerotischen Plaques bilden, gelangen auch andere Immunzellen wie T-Zellen (Paulsson, Zhou, Tornquist, & Hansson, 2000), B-Zellen oder dendritische Zellen (Zernecke, 2015) in das Gebiet der atherosklerotischen Läsion.

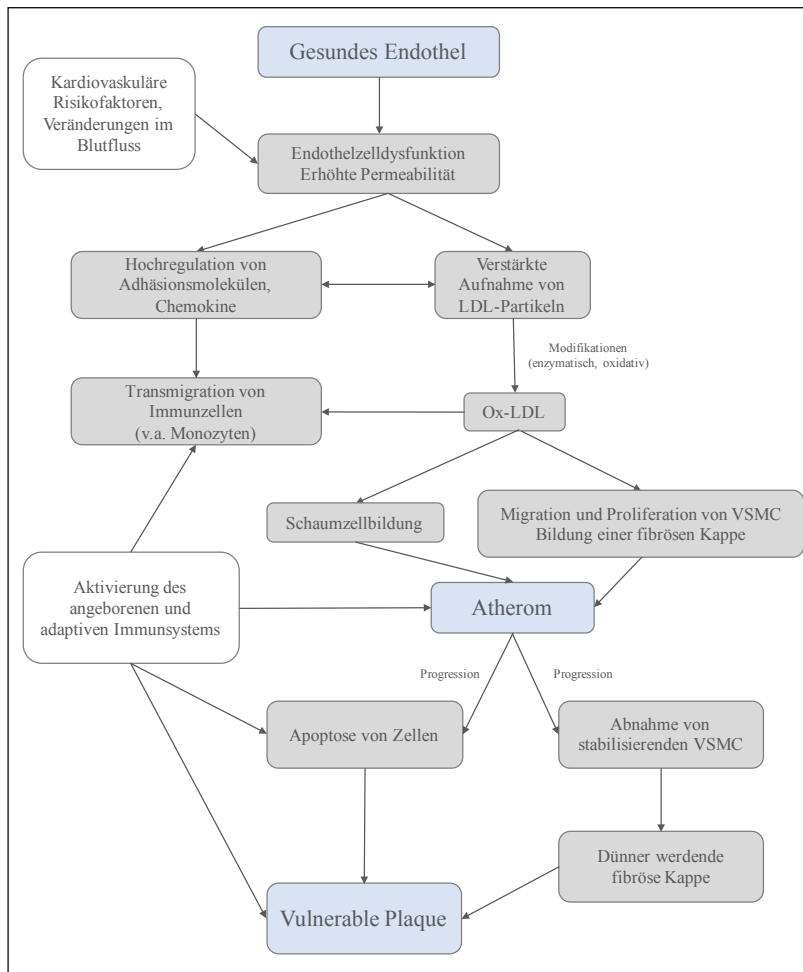


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Atherogenese vom gesunden Endothel bis zur Ausbildung einer vulnerablen Plaque (eigene Darstellung).

Die Entzündungsreaktion ruft die Migration und Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) aus der Media in die Intima hervor, wo sie die Produktion von extrazellulärer Matrix (ECM), Kollagen und Elastin vorantreiben und sich in makrophagenartige Schaumzellen mit reduzierter Expression von VSMC-Markern differenzieren können (Chappell et al., 2016; Gomez & Owens, 2012; Rong, Shapiro, Trogan, & Fisher, 2003). Zwar sind die VSMC für den Großteil der Kollagenproduktion verantwortlich, dennoch spielen Endothelzellen in dieser Hinsicht ebenfalls eine Rolle (Canfield, Wren, Schor, Grant, & Schor, 1992). Unkontrollierte Kollagenakkumulation kann in der Folge zur Volumenzunahme der Plaque und zu einer Progression der arteriellen Stenose führen (Rekhter, 1999).

Durch die Apoptose und Seneszenz und die Ausbildung von VSMC abgeleiteten makrophagenartigen Zellen können darüber hinaus weitere Entzündungsprozesse gefördert werden (Bennett, Sinha, & Owens, 2016).

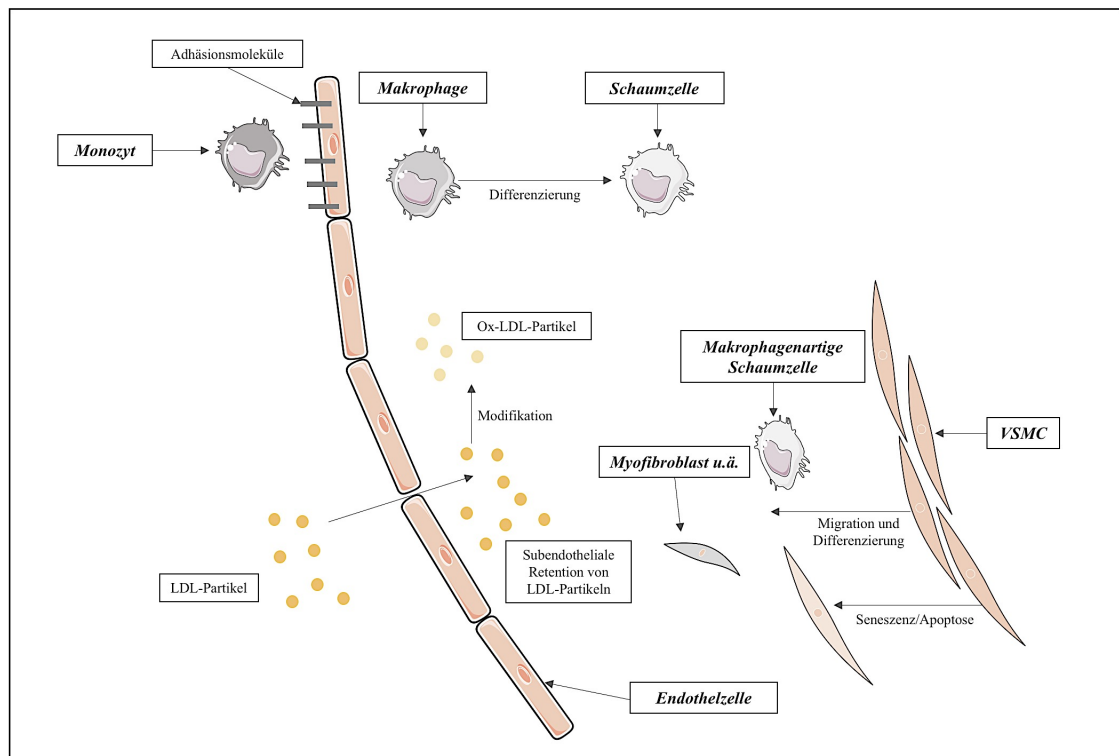


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Akkumulation und Modifizierung von Monozyten, Makrophagen und vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) in frühen atherosklerotischen Läsionen (eigene Darstellung in Anlehnung an Hansson & Hermansson, 2011; Libby, Ridker & Hansson, 2011).

T-Zellen werden parallel zu Makrophagen durch analoge Mechanismen rekrutiert, die unter anderem Adhäsionsmoleküle und Chemokine umfassen. Zwar sind diese in der Läsion nicht so reichlich vorhanden wie Makrophagen, können jedoch proatherogene Mediatoren produzieren, die damit zum Wachstum der Läsionen und Progression der Atherosklerose beitragen können (Hansson, Robertson, & Soderberg-Naucler, 2006). T-Helferzellreaktionen sind unter anderem dafür bekannt, die Läsionsbildung zu modulieren. Während Th1 T-Zellen u.a. Interferon (IFN)- γ produzieren und damit die Atherosklerose eher fördern, wirken regulatorische (Tregs) eher protektiv. Th2 T-Zellen können je nach sezernierten Mediatoren proatherogene oder protektive Funktionen aufweisen. Auch Th17 T-Zellen scheinen eine wichtige Rolle zu spielen, wobei die Funktion dieser Zellen noch nicht endgültig aufgeklärt ist. Es gibt dabei sowohl Hinweise für eine pathogene als auch protektive Funktion dieser Zellen (Ait-Oufella et al., 2014).

B-Zellen und Mastzellen sind zwar innerhalb der Läsionen nur gelegentlich existent, auf der abluminalen, adventitiellen Seite der atherosklerotischen Arterie hingegen reichlich vorhanden, wo sie sich außerhalb des fortgeschrittenen Atheroms ansammeln, sich zu tertiären lymphatischen Strukturen mit Keimzentren entwickeln können und ebenfalls

einen Einfluss auf die Atherogenese ausüben (Grabner et al., 2009; Kovanen, 2007; Tsiantoulas, Diehl, Witztum, & Binder, 2014).

Auch dendritische Zellen (DCs) haben einen Einfluss auf die Atherosklerose. Sie können als Brücke zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem fungieren und Antigene phagozytieren, verarbeiten und den T-Zellen präsentieren (Gautier et al., 2009). Außerdem können sie den Krankheitsverlauf durch Beeinflussung des Lipidstoffwechsels und der Lipidaufnahme aus dem Blutkreislauf modulieren (Paulson et al., 2010). Es gibt dabei jedoch diverse Subgruppen dieser Zellreihe, die unterschiedliche Funktionen im Rahmen der Atherogenese übernehmen können (Zernecke, 2015).

Einige Schaumzellen in der sich entwickelnden Intimaläsion sterben durch Apoptose ab (Weber & Noels, 2011). Zwar werden die apoptotischen Zellen teilweise durch Efferozytose abgebaut, jedoch verbleibt ein beträchtlicher Teil dieser Zellen in der atherosklerotischen Plaque (Van Vre, Ait-Oufella, Tedgui, & Mallat, 2012).

Obwohl eine bedeutende Anzahl von sich aus Makrophagen entwickelten Schaumzellen durch längeren endoplasmatischen Retikulumstress und pro-apoptischen Reize in die Apoptose eintritt, ist eine fortgeschrittene Plaque durch eine starke Anhäufung von Makrophagen gekennzeichnet (Martinet, Schrijvers, & De Meyer, 2012).

Apoptotische Makrophagen werden in fortgeschrittenen Läsionen teilweise nicht effektiv mittels Phagozytose beseitigt, ein Zustand, der als defekte Efferozytose bekannt ist und zu sekundärer Nekrose und Verstärkung von Entzündungsreaktionen führt (Linton et al., 2016).

Die Akkumulation von apoptotischen Zellen, Trümmern und Cholesterinkristallen trägt im weiteren Verlauf zur Ausbildung eines nekrotischen Kerns innerhalb der atherosklerotischen Läsion bei.

Die sogenannten "Schulter-Regionen" im Bereich der Randzone der Plaque werden stark von T-Zellen und Mastzellen infiltriert, die Enzyme und proinflammatorische Mediatoren sezernieren, die den Entzündungsprozess weiter voranschreiten lassen. Fibroatheromatöse Plaques werden von einer fibrösen Kappe aus Kollagen und vaskulären glatten Muskelzellen bedeckt, die mittels proteolytischer Abbauprozesse, unter anderem durch Matrixmetalloproteinasen (MMPs) (Johnson, 2017), in der Ausbildung einer dünner und instabiler werdenden Kappe resultiert (Yla-Herttuala et al., 2011). Dies stellt wiederum einen Risikofaktor für die potentielle im Verlauf stattfindende Ruptur einer Plaque dar.

Dieses Ereignis kann zur Freisetzung prothrombotischer Moleküle zur luminalen Seite des Blutgefäßes der Plaque führen, wodurch sich im Rahmen der physiologischen Blutgerinnungskaskade ein Thrombus bilden, der letztendlich, abhängig von der Lokalisation, besagte lebensbedrohliche Folgeerscheinungen, wie beispielsweise einen Myokardinfarkt, nach sich ziehen kann.

1.3 Bedeutung des Immunsystems in der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist ein komplexer immunologischer Prozess mit unterschiedlich sich gegenseitig beeinflussenden Faktoren, der bislang noch nicht vollständig verstanden ist und weiterhin, auch aufgrund seiner immensen klinischen Bedeutung, Gegenstand der heutigen Forschung ist. Dabei spielen, wie bereits erwähnt, sowohl angeborene als auch adaptive Immunmechanismen eine entscheidende Rolle (Hansson & Hermansson, 2011).

Eine Vielzahl unterschiedlicher Immunzellen, wie Monozyten, Makrophagen B- und T-Zellen, DCs, Mastzellen sowie verschiedene Zytokine sind in den Prozess der Atherosklerose involviert (Cochain & Zerneck, 2015; Hansson & Hermansson, 2011; Kovanen, 2007; Zerneck, 2015; Zerneck et al., 2008). Monozyten sind Zellen, die im Blut, Knochenmark und in der Milz zirkulieren. Makrophagen hingegen sind phagozytäre Zellen, die in lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben vorkommen (Gordon, 2002). Zu den Orten der Hämatopoese, die für die Bildung von Monozyten und anderen Immunzellen während der Atherogenese wichtig sind, zählen unter anderem das Knochenmark und die Milz (Robbins et al., 2012).

Die Monozyten können sich in zwei Haupttypen von Makrophagen weiter differenzieren. Grob unterschieden werden bei dieser Klassifikation zum einen die Makrophagen, die Entzündungen weiter fördern, die als klassisch aktivierte (oder M1) Makrophagen bezeichnet werden, und zum anderen die anti-inflammatorischen und pro-regenerativen, die als alternativ aktivierte (oder M2) Makrophagen bezeichnet werden (Martinet et al., 2012). Es scheint so, als würden diese Makrophagen in menschlichen Atheromen koexistieren und dabei unterschiedliche Aufgaben übernehmen (Butcher & Galkina, 2012). Diese Einteilung wird mittlerweile allerdings als obsolet betrachtet, da die Realität bei dieser Klassifikation nur bedingt abgebildet wird, es zu artifiziell und zu stark vereinfacht ist. Es konnte in atherosklerotischen Läsionen eine große Heterogenität diverser phänotypischer Makrophagen gezeigt werden (Cochain et al., 2018).

Zu den immunologischen Funktionen von Monozyten und Makrophagen zählen unter anderem die Phagozytose anderer Zellen und toxischer Moleküle (z.B. Ox-LDL), die Produktion entzündlicher Zytokine und die Differenzierung in entzündliche DCs, Makrophagen oder Schaumzellen (Varol, Yona, & Jung, 2009). Monozyten und Makrophagen nehmen eine besondere Rolle in der Atherogenese ein, nicht zuletzt, da sie bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Atherosklerose anwesend sind und an der Ausbildung sogenannter Fettstreifen (*fatty streaks*) in einem erheblichen Maße mitwirken (Napoli et al., 1997).

Dabei ist die Rekrutierung zirkulierender Monozyten aus dem Blutstrom insbesondere in den frühen Phasen der Erkrankung von Bedeutung, den Großteil der Makrophagenakkumulation in bereits etablierten atherosklerotischen Läsionen macht jedoch die Proliferation der rekrutierten Makrophagen aus (Robbins et al., 2013).

Wie bereits oben beschrieben, spielen eine Vielzahl weiterer Faktoren der angeborenen und adaptiven Immunität eine nicht minder entscheidende Rolle für die Entstehung und das Wachstum von atherosklerotischen Läsionen. Das Immunsystem scheint also maßgeblich an der Entstehung der Atherosklerose mitzuwirken (Hansson & Hermansson, 2011).

1.4 Adhäsion und Transmigration von Monozyten

Monozyten spielen generell neben weiteren Immunzellen, wie zum Beispiel T-Zellen, B-Zellen und DCs, eine zentrale Rolle bei der Gewebehomöostase, der Immunität und der Förderung und Auflösung des physiologischen Prozesses der Entzündung (Ginhoux & Jung, 2014).

Viele Immunzellen üben dabei einen großen Teil ihrer Funktionen außerhalb des Gefäßkompartiments aus, was eine Migration aus dem Gefäßsystem in das entsprechende Gewebe erforderlich macht (Gerhardt & Ley, 2015). Die Rekrutierung von im Blut zirkulierenden Monozyten an den Ort der Verletzung oder der Infektion innerhalb des Gewebes und der erste Schritt der Diapedese durch das Endothel sind entscheidende Ereignisse in der frühen Phase entzündlicher Prozesse. Entscheidend ist ebenso die darauffolgende Monozytendifferenzierung in entzündliche Makrophagen oder TNF- und iNOS-produzierende dendritische Zellen (TIP-DCs) und die nachfolgenden Entzündungsreaktionen (Gerhardt & Ley, 2015; Serbina, Salazar-Mather, Biron, Kuziel, & Pamer, 2003).

Im Prozess der Atherosklerose wird davon ausgegangen, dass ein Großteil der Monozyten und Makrophagen während der Plaqueprogression aus dem Blut von zirkulierenden Monozyten stammen (Woollard & Geissmann, 2010).

Da in dieser Arbeit der Fokus insbesondere auf den Monozyten liegt, folgt eine Beschreibung der Monozyten-Subgruppen und die Transmigrationskaskade, die charakteristisch für die Rekrutierung von Monozyten ist.

Monozyten werden auf Grundlage der Expression von Chemokinrezeptoren und spezifischen Oberflächenmolekülen in Subgruppen unterteilt (s. Tabelle 1). Ly6Chi Monozyten stellen etwa 2-5% der zirkulierenden weißen Blutkörperchen in einer Maus unter nicht-entzündlichen Bedingungen dar und werden im Rahmen einer Entzündung schnell an die Entzündungsorte rekrutiert (Serbina, Jia, Hohl, & Pamer, 2008). Entscheidend für diesen Prozess ist dabei u.a. die starke Expression des CCR-2-Rezeptors, welcher ebenfalls bedeutsam für die Mobilisierung proinflammatorischer Ly6Chigh Monozyten aus dem Knochenmark ist (Kurihara, Warr, Loy, & Bravo, 1997; Tsou et al., 2007).

Eine weitere Subgruppe von Monozyten bei der Maus sind die sogenannten Ly6C^{low} Monozyten (auch als CX₃CR1^{hi} bekannt), die im Blutstrom seltener anzutreffen und für das sogenannte Patrouillieren bekannt sind (Auffray et al., 2007).

Subgruppe	Chemokin-Rezeptoren	Funktionen
Maus		
Ly6C ^{hi}	CCR2 ^{hi} , CX ₃ CR1 ^{low}	Pro-inflammatorisch, antimikrobiell
Ly6C ^{low}	CCR2 ^{low} , CX ₃ CR1 ^{hi}	Patrouillieren, frühe Immunantwort, Gewebereparatur
Mensch		
Klassisch	CCR2 ^{hi} , CX ₃ CR1 ^{low}	Ähnlich den Ly6C ^{hi} Monozyten
Intermediär	CCR2 ^{low} , CX ₃ CR1 ^{hi}	Pro-inflammatorisch
Nicht-klassisch	CCR2 ^{low} , CX ₃ CR1 ^{hi}	Patrouillieren, anti-viral

Tabelle 1: Unterschiede zwischen den Monozyten-Subgruppen beim Menschen und bei der Maus (eigene Darstellung in Anlehnung an Shi & Pamer, 2011).

Ein streng regulierter, mehrstufiger Prozess, bestehend aus einer Reihe von Wechselwirkungen zwischen Immun- und Endothelzellen, geht dem eigentlichen Transmigrationsschritt voraus. Für Monozyten wird vermutet, dass dieser Prozess im Wesentlichen der ursprünglich für neutrophile Granulozyten etablierten Kaskade entspricht. Diese besteht im Wesentlichen aus den Schritten des Erkennens der Zelle, des Rollens, des langsamen Rollens, der Adhäsion, der Adhäsionsverstärkung, des intraluminalen

Crawlings sowie letztendlich der Transmigration der Immunzelle durch das Endothel. Dabei sind einige spezifische Moleküle für die Rekrutierung von Monozyten in das Zielgewebe von besonderer Bedeutung (Cochain & Zernecke, 2015; Mestas & Ley, 2008). Im Prozess der Transmigration aktivieren zunächst entzündliche Zytokine wie bspw. TNF- α oder IL-1 β , die von Gewebe-Makrophagen sezerniert werden, vorübergehend das Endothel.

Sie induzieren die schnelle Expression von Adhäsionsmolekülen, vor allem der Adhäsionsmoleküle E-Selectin und P-Selectin, des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1) und des vaskulären Zelladhäsionsmoleküls-1 (VCAM-1), sowie die Präsentation von gebundenen Chemokinen auf der luminalen Oberfläche des Endothels (Imhof & Aurrand-Lions, 2004; Min et al., 2005). Dieser Prozess ist ebenfalls entscheidend im Rahmen der Atherosklerose (Collins et al., 2000).

Die exprimierten Selektine interagieren mit P-Selektin-Glykoprotein-Liganden-1 (PSGL-1), welche auf allen Monozyten, insbesondere auf Ly6C^{hi}-Monozyten, exprimiert werden. Diese Wechselwirkung ermöglicht es den Monozyten, auf dem Endothel zu rollen und den Scherstress des Blutflusses zu überwinden (An et al., 2008).

Auch andere Proteine, wie das auf Monozyten exprimierte VLA-4 (*very late antigen-4*), auch bekannt als $\alpha_4\beta_1$ Integrin, das Integrin $\alpha M\beta 2$ (*Macrophage-1 antigen*, Mac-1) oder LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen 1*) sind entscheidende Faktoren für das Rollen der Monozyten auf dem aktivierten Endothel (Issekutz, 1995; Mestas & Ley, 2008; Xu, Manivannan, Crane, Dawson, & Liversidge, 2008).

LFA-1, welches sich aus den Untereinheiten αL (CD11a) und $\beta 2$ (CD18) zusammensetzt (Springer, 1990), wird auf allen Leukozyten exprimiert und ist ein entscheidendes Integrin, welches während des Transmigrationsprozesses an die Interzellulären Adhäsionsmoleküle-1, -2 und -3 (ICAM-1, ICAM-2 und ICAM-3) bindet, die auf Leukozyten oder Endothelzellen exprimiert werden (Gahmberg, Tolvanen, & Kotovuori, 1997; Issekutz, 1995; Marlin & Springer, 1987; C. H. Wong, Heit, & Kubes, 2010).

Integrine im Allgemeinen sind zwar konstitutiv auf Leukozyten vorhanden, binden ihre Liganden allerdings nur nach einer Aktivierung. Dabei unterscheidet man zwischen der Erhöhung der Affinität (Bindungsstärke einzelner Rezeptoren) und der Avidität (Gesamtheit der Affinitäten) der Integrine (Hogg et al., 2002; Konstandin et al., 2006).

Die Adhäsion der Immunzellen an das aktivierte Endothel wird außerdem durch C-C und C-X-C Chemokine, wie CCL2, CCL5, CXCL10 und CX₃CL1 durch Aktivierung

der Immunzellen vermittelt, die im Progress der Atherosklerose eine entscheidende Rolle spielen (Luscinskas et al., 2000; Zerneck et al., 2008; Zerneck & Weber, 2014).

Viele Infektionen induzieren zum Beispiel die Expression von CCL2 (auch bekannt als MCP-1) und CCL7 (auch bekannt als MCP-3), die beide an CCR2 binden können und dadurch zum einen die Mobilisation von Monozyten aus dem Knochenmark und zum anderen ihre Rekrutierung in das entzündete Gebiet vorantreiben können (Tsou et al., 2007).

Ly6C^{low}-Monozyten reagieren insbesondere auf den CX₃C-Liganden 1 (CX₃CL1, auch bekannt als Fraktalkin), ein membrangebundenes Chemokin, das in unterschiedlichen Gewebearten exprimiert wird, was zu einem verstärkten Patrouillieren von Ly6C^{low} und einer verstärkten Rekrutierung von Ly6C^{hi}-Monozyten führt (Auffray et al., 2009).

Ein weiterer entscheidender Schritt zur Vorbereitung der Transmigration der Immunzelle ist das sogenannte intraluminale *Crawling*, welches unter anderem auch von den Leukozytenintegrinen LFA-1 und Mac-1 sowie den Endothelliganden ICAM-1 und ICAM-2 (*Intercellular Adhesion Molecule*) abhängt (C. H. Wong et al., 2010). Dabei breiten sich Monozyten aus und polarisieren, um bevorzugte Paravasationsstellen zu lokalisieren (Schenkel, Mamdouh, & Muller, 2004).

Um das Gefäß zu verlassen, müssen die Monozyten schließlich während der Transmigration das Endothel, die Lamina basalis und die eingebetteten Perizyten überwinden, wobei weitere Adhäsions- und Transportmoleküle, wie PECAM-1, JAMS oder CD99 (Gerhardt & Ley, 2015) entscheidende Faktoren darstellen (s. Abbildung 4).

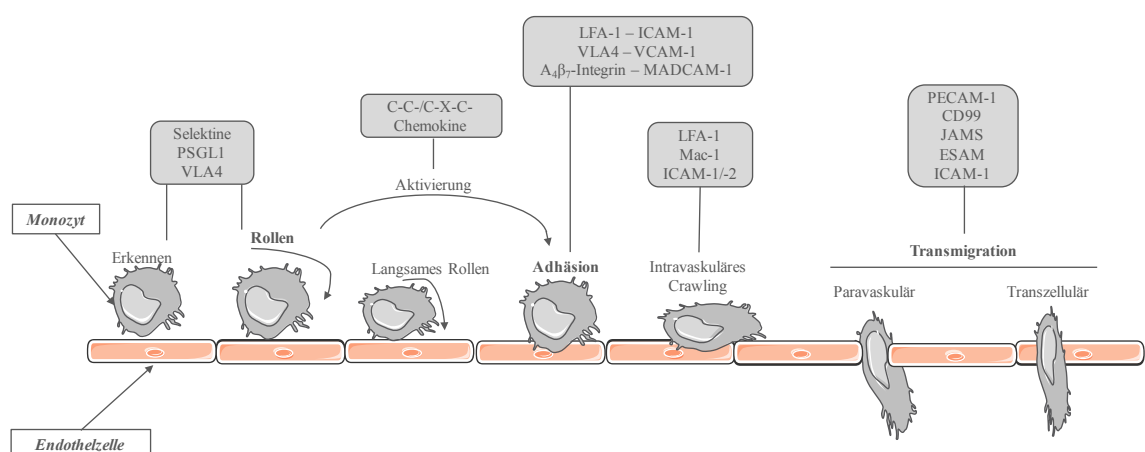


Abbildung 4: Transmigrationskaskade von Monozyten und daran beteiligten Molekülen (eigene Darstellung in Anlehnung an Ley, Laudanna, Cybulsky, & Nourshargh, 2007).

1.5 Experimentelle Mausmodelle

LDL-Rezeptor (Ldlr)- und Apolipoprotein E (ApoE)-defiziente Mäuse sind häufig verwendete Tiermodelle, die im Rahmen der Atheroskleroseforschung die spezifische Untersuchung unterschiedlicher Komponenten des Immunsystems, die für die Pathogenese entscheidend sind, möglich machen.

Die Entwicklung atherosklerotischer Plaques wird durch die Deletion dieser für den Cholesterin- und Fettstoffwechsel relevanten Gene hervorgerufen, welche pathogenetisch vergleichbar mit den Hyperlipoproteinämien des Menschen sind (Hansson & Hermansson, 2011; Lichtman, Cybulsky, & Lusinskas, 1996; Weber & Noels, 2011).

Dennoch unterscheiden sich beide Mausmodelle in einigen Aspekten voneinander (Getz & Reardon, 2016). Ein *Knockout* des Ldl-Rezeptors führt nur unter einer fettreichen Diät, der sogenannten Western-Type Diät zur Ausbildung atherosklerotischer Plaques. Im Gegensatz dazu kann ein Knockout im ApoE-Gen durch die gestörte *Clearance* der aus der Nahrung aufgenommenen Fette zu einer Hypercholesterinämie und dadurch zur Entstehung der Atherosklerose führen (Zhang, Reddick, Piedrahita, & Maeda, 1992).

Bei beiden Mausmodellen existiert also die Neigung zur Entstehung der Atherosklerose innerhalb weniger Wochen, weshalb beide für die Untersuchung unterschiedlicher Prozesse innerhalb der Atherogenese bei Mäusen gut geeignet sind.

1.6 CD84

Das CD84 (*Cluster of Differentiation 84*) Gen kodiert für ein Transmembran-Glykoprotein vom Typ 1, welches ein Mitglied der Familie der SLAM (*Signaling Lymphocyte Activation Molecule*) ist (s. Abbildung 5). Diese Familie bildet eine Untergruppe der größeren CD2-Zelloberflächenrezeptor-Ig-Superfamilie. Das kodierte Protein ist ein homophiles Adhäsionsmolekül, das von unterschiedlichen Immunzellpopulationen, einschließlich Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, Dendritischen Zellen und Mastzellen, exprimiert wird (Fagerberg et al., 2014; Romero et al., 2004).

Es handelt sich um ein einkettiges Zelloberflächenprotein mit einer berechneten molekularen Masse von 39 kDa, das nach extrazellulär vier potentielle N-Glykosylierungsstellen enthält, während der Zytoplasma-Schwanz der Transmembranregion vier Tyrosine aufweist (de la Fuente, Pizcueta, Nadal, Bosch, & Engel, 1997).

Das CD84 von Mensch und Maus teilen sich eine hohe Homologie und eine ähnliche Domänenorganisation (Uniprot Beitrittsnummer Q9UIB8 und Q18PI6; (de la Fuente et al., 1999)).

Wie bei anderen Mitgliedern der SLAM-Familie, vermittelt die N-terminale Ig-variable Domäne homophile Interaktionen von CD84 bei Menschen und Mäusen (Martin et al., 2001; Romero et al., 2005). Dabei interagiert es stark mit anderen CD84-Molekülen und bildet dabei einen orthogonalen homophilen Dimer (Yan et al., 2007).

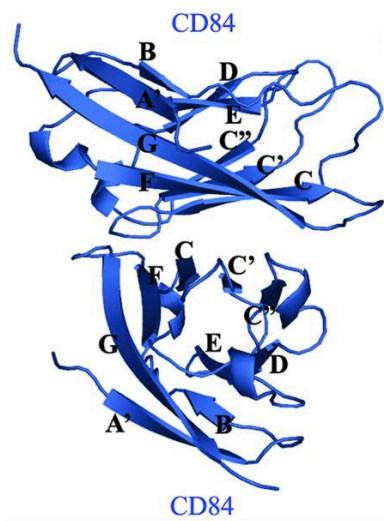


Abbildung 5: Die Banddarstellung des homophilen Dimers CD84 ((Quelle: Yan et al., 2007), Genehmigung zur Reproduktion siehe elektronischer Anhang).

Der C-terminale intrazelluläre Teil von CD84 trägt zwei Immunrezeptor-Tyrosin-Switch-Motive (ITSM), die das SH2 (SRC Homologie 2)-Domänen enthaltenden intrazellulären Signalmolekül-Adapter SLAM-assoziiertes Protein SAP (SH2D1A) sowie das EAT-2 (SH2D1B) binden können (Morra et al., 2001; Tangye, van de Weerd, Avery, & Hodgkin, 2002). Dabei spielt die Tyrosinphosphorylierung der C-terminalen Region mittels der Src-Kinase Lck (*lymphocyte kinase*), eine wesentliche Rolle (Tangye, Nichols, Hare, & van de Weerd, 2003). Zu den SLAM-Rezeptoren generell ist bekannt, dass SAP weitere Kinasen aktivieren kann, wodurch es mittels Phosphorylierungen an den Rezeptoren der SLAM-Familie zur Verstärkung von Reaktionen wie NK-Zellaktivierung und TH2-Zellpriming kommen kann. Die SAP-bezogenen Adapter EAT2 und *EAT2-related transducer* ERT (SH2D1C) wiederum können aktivierende Signale, insbesondere der NK-Zellen, hemmen (Veillette, 2006). SAP wird in T-Zellen,

NK-Zellen, NKT-Zellen, Eosinophilen, Thrombozyten, und einigen B-Zell-Populationen exprimiert. Das EAT2-Protein wird in NK-Zellen, DCs, Thrombozyten, B-Zellen, aktivierten T-Zellen und Makrophagen exprimiert (Morra et al., 2001; Roncagalli et al., 2005). Durch die Bindung verschiedener Liganden und darauffolgende intrazelluläre Signalkaskaden, können wichtige immunologische Mechanismen durch Aktivierungs- oder Inhibierungsprozesse durch Mitglieder der SLAM-Familie reguliert werden (Veillette, 2006).

Es hat sich gezeigt, dass CD84 als kostimulatorisches Molekül fungiert, welches unter anderem die Adhäsion von T- und B-Zellen reguliert und zu einer verlängerten Zell-Zell-Bindung führen kann, die für eine optimale Immunreaktion innerhalb des Keimzentrums von lymphatischen Organen sorgt und für eine funktionierende humorale Immunität erforderlich ist (Cannons et al., 2010; E. B. Wong et al., 2015). Die Fehlfunktion des CD84 scheint auf der anderen Seite eine Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen, wie etwa des X-chromosomalen lymphoproliferativen Syndroms (XLP) zu spielen (Cannons et al., 2010; Morra et al., 2001).

CD84 ist darüber hinaus, auch SAP-unabhängig, in die Aktivierung und Reifung von T-Zellen (Tangye et al., 2003) sowie in die Aktivierung von Makrophagen (Sintes, Romero, de Salort, Terhorst, & Engel, 2010) involviert und kann dabei als kostimulatorisches Molekül für eine vermehrte IFN-Gamma-Sekretion sorgen (Martin et al., 2001). LPS-stimulierte Makrophagen zeigen beim Vorhandensein von CD84, im Vergleich zu knock-down Makrophagen, eine verstärkte MAPK-Phosphorylierung und NF- κ B Aktivierung und eine signifikant erhöhte Sekretion von TNF- α und MCP-1 (CCL2) sowie eine verminderte Sekretion von IL-10- und IL-6. Gleichzeitig zeigt sich in LPS-stimulierten CD84 knock-down Makrophagen eine verminderte TNF- α und IL-6 Produktion. CD84 ist also in der Lage, Signalwege stromabwärts zu modulieren und unter anderem Effektorfunktionen von Makrophagen zu regulieren (Sintes et al., 2010). In menschlichen Mastzellen kann CD84 außerdem Fc ϵ RI (hochaffiner Rezeptor des IgE) vermittelte Signale, Degranulation und Zytokin-Sekretion negativ regulieren (Alvarez-Errico et al., 2011).

Darüber hinaus konnte bei dem Kawasaki Syndrom (KD), einer inflammatorischen Gefäßerkrankung unklarer Ätiologie, gezeigt werden, dass Immunzellen in den betroffenen Herzkranzgefäßen eine deutliche Hochregulation von CD84-Molekülen aufweisen (Reindel et al., 2014). Das ist ein Indiz für die Annahme proinflammatorischer Funktionen von CD84, unter anderem im Gewebe von Arterien. Die Überexpression von CD84

dient darüber hinaus als ein wichtiger Überlebensmechanismus der Tumorzellen in der Pathogenese der Chronisch-lymphatischen Leukämie (CLL) (Binsky-Ehrenreich et al., 2014). Im Rahmen dessen kann es eine Tumorprogression durch die Hochregulierung der Expression von PD-1 und PD-L1 ermöglichen, die die T-Zell-vermittelte Antitumorreaktion unterdrücken (Lewinsky et al., 2018).

CD84-defiziente Mäuse zeigten hinsichtlich der Rolle auf Thrombozyten unveränderte Blutungszeiten und normale arterielle Thrombusbildung, was darauf hindeutet, dass CD84 hinsichtlich thrombotischer Prozesse keine wesentliche Funktion innehat (Hofmann et al., 2014).

Es lässt sich konstatieren, dass CD84 in der Lage ist, unterschiedliche immunologische Prozesse in vielfältiger Weise zu beeinflussen und eine wichtige Rolle in der Pathogenese immunvermittelter Erkrankungen spielt.

1.7 Forschungsfragen – CD84 in der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist, wie bereits oben beschrieben, eine chronisch-entzündliche Erkrankung mit vielfältigen immunologischen Einflüssen seitens des angeborenen und adaptiven Immunsystems. CD84 wiederum spielt eine wichtige Rolle bei immunmodulatorischen, insbesondere proinflammatorischen Prozessen. Davon sind Immunzellen betroffen, wie etwa Monozyten, Makrophagen, DCs, T- und B-Zellen und Mastzellen, die CD84 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren und ihrerseits entscheidende funktionelle Eigenschaften im Rahmen der Pathogenese der Atherosklerose besitzen (Hansson & Hermansson, 2011; Zaiss et al., 2003).

In Makrophagen zeigt sich bei Anwesenheit von CD84 eine erhöhte Sekretion der Zytokine TNF- α und MCP-1 (CCL2), welche neben ihren allgemein proinflammatorischen Funktionen, auch eine spezifisch atherosklerose-fördernde Charakteristik aufweisen (Sintes et al., 2010; Zerneck et al., 2008).

Ebenso provoziert die Anwesenheit von CD84 eine verstärkte Sekretion von IFN- γ aus Lymphozyten (Martin et al., 2001), welches als Zytokin mehrere Auswirkungen auf die Atherogenese in allen Stadien hat und dadurch letztendlich zur Plaque-Entwicklung und -Reifung beitragen kann (Voloshyna, Littlefield, & Reiss, 2014).

Darüber hinaus zeigt sich eine Überexpression des CD84 auf Immunzellen in der Pathogenese des Kawasaki Syndroms (KD) (Reindel et al., 2014), was dafür spricht, dass es in akut- und chronisch-inflammatorischen Erkrankungen der Wand arterieller Gefäße

vermehrt vorkommt und dort einen Einfluss auf die Progression entzündlicher Prozesse hat.

Ein weiterer Punkt ist, dass die Proliferation und das Überleben von rekrutierten Immunzellen innerhalb atherosklerotischer Plaques entscheidend für das Wachstum der Läsion sind. Hinsichtlich der Überlebensfähigkeit von Zellen leistet CD84, zumindest im Rahmen der Chronisch-lymphatischen Leukämie (CLL), einen Beitrag (Binsky-Ehrenreich et al., 2014), was auf eine CD84-vermittelte Interaktion von CLL-Zellen mit ihrer Mikroumgebung zurückzuführen war (Marom et al., 2017).

CD84 sorgt für einen idealen T-B-Zellkontakt, der wiederum für eine produktive humorale Immunität, eine optimale T-follikuläre Helferfunktion und die Bildung des Keimzentrums notwendig ist (Cannons et al., 2010).

Es ist in die Aktivierung und Reifung von T-Zellen involviert (Tangye et al., 2003), welche nach der Aktivierung proatherogene Mediatoren freisetzen und dadurch unter anderem zum Wachstum atherosklerotischer Läsionen und zum Fortschreiten der Atherosklerose beitragen (Hansson et al., 2006).

Die beschriebenen Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass CD84 aufgrund seiner vielseitigen Funktionen im Rahmen immunologischer und pathologischer Prozesse, nicht zuletzt innerhalb der arteriellen Gefäßwand, einen wichtigen Einfluss auf chronisch-entzündliche Entwicklungen und Erkrankungen im lebenden Organismus hat.

Da die Atherosklerose eine chronisch-entzündliche Erkrankung repräsentiert, liegt die Vermutung nahe, dass CD84 den Verlauf dieser Erkrankung mitbeeinflussen kann.

Ziel dieser Arbeit ist es, ein tieferes Verständnis der Eigenschaften und Funktionen von CD84 zu erwerben. Dabei steht die Untersuchung der Rolle von CD84 im Rahmen der Atherosklerose im Mittelpunkt.

Hierbei gilt es, den Einfluss dieses Moleküls auf die Atherogenese im Allgemeinen sowie hinsichtlich seiner Funktionen bei der Immunzellrekrutierung, zu spezifizieren. Dabei stellt die Analyse der atherosklerotischen Läsionen sowie der Einfluss von CD84 auf die Zelladhäsion und Transmigration von Monozyten, einen zentralen Teil der Arbeit dar.

Darüber hinaus werden weitere für die Atherosklerose zentrale Eigenschaften von CD84 hinsichtlich der Überlebenscharakteristik von Makrophagen oder der Integrinaktivierung, die im Rahmen der Rekrutierung von Immunzellen eine große Rolle spielt, erforscht.

Ziel dabei ist es, letztendlich ein potenzielles Angriffsziel pharmakologischer Wirkstoffe (sogenanntes *Drug Target*) zu identifizieren, um langfristig die Erkrankung in ihrer Entstehung verhindern oder bereits bestehende atherosklerotische Veränderungen in ihrer Weiterentwicklung hemmen zu können und damit die Wahrscheinlichkeit tödlicher Folgeerscheinungen, wie etwa den Myokardinfarkt oder den zerebralen Insult, reduzieren zu können.

2 Materialien

2.1 Verbrauchsmaterial

Sofern nicht anders angegeben wurden alle Verbrauchsmaterialien, wie 1/1,5/15/50 mL tubes, PCR tubes, 3,5/10/15 cm Zellkultur Schalen, 6-/24-/96-well Platten und Pipettenspitzen von Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), Injektionsnadeln und Spritzen von Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
0.45 µm Filter	Sartorius, Göttingen, Deutschland
12 well Chamber, removable	ibidi GmbH, Planegg / Martinsried, Deutschland
96-Well White Solid Platte	Daigger scientific, Illinois, USA
Bindfaden Seraflex, USP 6/0, 75cm	Serag Wiessner, Naila, Deutschland
Desinfektionsmittel Terralin® liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
EDTA Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
High-Fat-Diet (15% Milchfett, 1,25% Cholesterin)	Altromin Spezialfutter GmbH Lage, Deutschland
Insert, 24 Well, PET 5 µm	Sarstedt Nümbrecht, Deutschland
Kammerobjektträger mit herausnehmbarer 12-fach Silikonkammer für Zellkultur und Immunfluoreszenzfärbung	ibidi GmbH, Planegg / Martinsried, Deutschland
Kryoröhrchen 2ml	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Nitrilhandschuhe SensiCare® 200	Medline Industries, Kleve, Deutschland
Pasteurpipette 5 mL	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Perfusions-Set Yellow-and-green: Länge 50 cm, ID 1,6 mm, 10 mL Reservoir	ibidi GmbH, Planegg / Martinsried, Deutschland
Pipettenspitze Combitip	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pre-Separation Filter 30 µm	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany
Verschlussfolie PARAFILM®	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Zellsieb 70 µm cell strainer	Greiner Bio-One, Kremsmünster Österreich
µ-Slide I Luer 0,4 mm	ibidi GmbH, Planegg / Martinsried, Deutschland

Tabelle 2: Verbrauchsmaterial.

2.2 Instrumente

Instrumente	Hersteller
Biosafety Werkbank(Kl.2), Nuair Cell-guard Class 2 Biosafety Cabinet	NuAire Plymouth, USA
Brutschrank, Heracell™ VIOS 160i CO ₂ /O ₂ -Inkubatoren	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Durchflusszytometrie, BD FACS CANTO II	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Einkanalpipette 0,5-10 µL / 2-20 µL, 20- 200 µL/ 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
ELISA microplate reader, Infinite® 200 PRO series	Tecan Trading AG, Schweiz
Feinwaage EMB	KERN & SOHN GmbH, Balingen, Deutschland
Flockeneisbereiter Scotsman AF 103	Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien
Fluoreszenzmikroskop Axioskop Hämozytometer nach Neubauer	Zeiss, Oberkochen, Deutschland Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland
Ibidi Pump System	ibidi GmbH, Planegg / Martinsried, Deutschland
Intravitalmikroskop BX51WI	Olympus AG Tokio, Japan
Intravitalmikroskop Kamera C11440	Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan
Kamera HVF202	Hitachi, Präfektur Japan
Laborschüttler Heidolph Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Lichtmikroskop Leica DM4000 BLED	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskop SX210	Olympus AG, Tokio, Japan
Lichtmikroskop VisiScope® IT404	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
MACS multi stand	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Glad- bach, Germany
Multipette® plus 200 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette Controller accu-jet® pro	BrandTech Scientific, Essex, CT, USA
Scheren und Pinzetten	Fine Science Tools, Heidelberg, Germany
Serologische Pipette 5 mL/ 10 mL / 25 mL	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Sysmex KX 21N	Sysmex AG Kobe, Japan
Thermomixer Comfort/Standard	Eppendorf, Hamburg, Germany
Thermoschüttler TS100	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Transferkammer Trans-Blot® Cell	Trans-Blot® Cell

UV-Tisch TFX 35	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Vakuum-Pumpe	Vaccubrand, Wertheim, Deutschland
Vortex-Genie K-550-GE	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Wasserbad 3043	Köttermann GmbH & Co KG Uetze/Hänigsen, Deutschland
Zentrifuge 5810	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge VWR-Galaxy MiniStar	VWR International, Radnor Pennsylvania, USA

Tabelle 3: Intrumente.

2.3 Reaktionskits

Reaktionskits	Hersteller
CD115 MicroBead Kit, mouse	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
LS columns (130-042-401) MidiMACS Starting Kit (LS)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Monocyte Isolation Kit (BM), mouse	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
T Cell Isolation Kit II, mouse	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland

Tabelle 4: Reaktionskits.

2.4 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ca ²⁺ -Chloride	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Calcein-AM violett	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
CC-Chemokinligand 2 (CCL2)	ProSpec Technologies Inc., Ontario, Canada
Collagen	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Collagenase I	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Collagenase II	Columbus, Ohio, USA
Collagenase XI	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cytofix	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
DAPI	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Essigsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol	Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Deutschland
FACS staining Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gelatine	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isofluran	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland
Ketavet 100 mg/mL	Pfizer, New York City, USA
Lipopolysaccharides	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Luminescent Zellviabilitätsassay CellTiter-Glo®	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Methanol	Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Deutschland
Mg ²⁺ -Chloride	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Mowiol®4-88	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Murine TNF- α	ReproTech, Milwaukee, Wisconsin, USA
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
OCT-Compound	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Oxidized Human LDL (oxLDL)	Alfa Aesar, Massachusetts, USA
Rhodamin 6G Chloride	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Rhodamin G	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Xylavet 20 mg/mL	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland

Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien.

2.5 Reagenzien für die Zellkultur

Reagenz	Hersteller
2-Mercaptoethanol (50 mM)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
4% Paraformaldehyde (PFA)	
Absolute ethanol, non-denatured	AppliChem (Darmstadt, Germany)
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cytofix	BD Biosciences, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + Glutamax	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Fetal calf serum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GM-CSF	Peptotech, Hamburg, Deutschland
Hank's balanced salt solution (HBSS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
HBSS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heparin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
HEPES	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
L-Glutamine	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Nicht-essentielle Aminosäuren	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Penicillin-Streptomycin	GE Healthcare Life Sc., Fairfield, CT, USA
Phosphate buffered saline (PBS) 1X	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Poly-L-lysine solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Recombinant Human ICAM-1/CD54 Fc	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Red Blood Cell (RBC) Lysis Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RPMI1640	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Sodiumpyruvate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
StemPro Accutase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Trypsin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tabelle 6: Reagenzien für die Zellkultur.

2.6 Antikörper

Antikörper	Farbstoff	Klon	Hersteller
CD115	APC PE	AFS98	eBioscience, Deutschland
CD11b	V500 PerCPcy5.5	M1/70	eBioscience, Deutschland
CD18	FITC	M18/2	eBioscience, Deutschland
CD29	PECy7	HMb1-1	eBioscience, Deutschland
CD3	V450	17A2	eBioscience, Deutschland
CD3 (MCA1477)		CD3-12	AdB Serotec,

CD4	V500	GK1.5	Deutschland eBioscience, Deutschland
CD44	PerCP-Cy5.5	1M7	eBioscience, Deutschland
CD45	PE Cy7 APC Cy7	30-F11	BD Biosciences, Deutschland
CD45.1	PE-Cy7	A20	BD Biosciences, Deutschland
CD45.2	APC-Cy7	104	BD Biosciences, Deutschland
CD49d	PerCP-Fluor 710	R1-2	eBioscience, Deutschland
CD62L	FITC	MEL-14	BD Biosciences, Deutschland
CD84	FITC	JER1	Zur Verfügung ge- stellt durch Prof. Nieswandt, RVZ, Würzburg, Deutschland
CD8a	PeCy7	53-6.7	eBioscience, Deutschland
CXCR5		SPRCL5	eBioscience, Deutschland
F(ab') ₂	PE		Thermo Fisher Sci- entific, Waltham, MA, USA
F4/80	PE	BM8	eBioscience, Deutschland
Fc-Rezeptor (CD16/32)			Thermo Fisher Sci- entific, Waltham, MA, USA
Live/dead	E780		BD Biosciences, Deutschland
Ly6C	APC	AL-21	BD Biosciences, Deutschland
Ly6G	V450 FITC	1A8	BD Biosciences, Deutschland
Mac2 (CL8942AP)		M3/38	Cedarlane, Kanada
NK1.1	PeCy7	PK136	eBioscience, Deutschland
PD1		J43	eBioscience, Deutschland
TCR- $\gamma\delta$	FITC	GL3	eBioscience, Deutschland
TCR- β	PerCP-Cy5.5	H57-597	eBioscience, Deutschland

α -Smooth Muscle-Cy3 (C6198)	1A4	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
-------------------------------------	-----	-----------------------------------

Tabelle 7: Antikörper.

2.7 Software

Software	Hersteller
Diskus Viewer Software	Hilgers, Königswinter, Deutschland
FlowJo 10.0 Software	Treestar Inc., USA
i-control Microplate Reader Software	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
ImageJ	Wayne Rasband
GraphPad Prism	GraphPad Software Inc., USA
Microsoft Office	Office 2013
PumpControl Software	ibidi GmbH, Planegg / Martinsried, Deutschland
VisiView Software	Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland

Tabelle 8: Software.

2.8 Puffer und Medien

Puffer / Medium	Zusammensetzung	Hersteller
DC-Medium	RPMI-1640, 10% FCS hitzeinaktiviert, 100 U/mL Penicillin-Streptomycin und 0,1% β -Mercaptoethanol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA Gibco, Grand Island, NY, USA
Endothelzellmedium (Medium G)	DMEM, 20% FCS, 100 U/mL Penicillin, 100 U/mL Streptomycin, 2 mM L-Glutamine, 1x nicht-essentielle Aminosäuren, 1x Natriumpyruvat, 25 mM HEPES (pH 7.0–7.6), 100 μ g/mL Heparin, 100 μ g/mL ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Erythrozytenlysepuffer	10 mM KHCO_3 , 155 mM NH_4Cl , 0,1 mM EDTA, pH 7,4	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
HBSS-Puffer	400 mg / L Kaliumchlorid (KCl), 60 mg / L Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), 350 mg / L Natriumbicarbonat (NaHCO_3), 8000 mg / L	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

	Natrumchlorid (NaCl), Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	
HHMC-Perfusionspuffer	1x HBSS, 10 mM Hepes, 0,5% BSA, 1 mM Mg ²⁺ , 1 mM Ca ²⁺	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MACS-Puffer	PBS, 2% BSA, 1mM EDTA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PBS	8g/l NaCl, 0,2g/l KCl, 0,2g/l KH ₂ PO ₄ , 1,4g/l Na ₂ HPO ₄ , H ₂ O	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
VSMC-Medium	DMEM, 10% FCS, 10% Mauserum, 100U/ml Penicillin, 100U/ml Streptomycin, 0,2% Amphotericin B	

Tabelle 9: Puffer und Medien.

2.9 Mäusstämmen und Zelllinien

Mäusstämmen/Zelllinien	Hersteller
C57BL/6J	Jackson Laboratory, Maine, USA
C57BL/6J.129S7-Ldlr ^{tm1Her} /J	Jackson Laboratory, Maine, USA
C57BL/6J.129P2-Apoe ^{tm1Unc} /J	Jackson Laboratory, Maine, USA
C57BL/6J-Cd84 ^{tm1(BN^{ie})}	Zur Verfügung gestellt durch Prof. Nieswandt, RVZ, Würzburg, Deutschland
Immortalized brain-derived Endothelial cells.5, b.End5 [bEND5]	Zur Verfügung gestellt durch Prof. Nieswandt, RVZ, Würzburg, Deutschland

Tabelle 10: Mäusstämmen und Zelllinien (Hofmann et al., 2014; Ishibashi et al., 1993; Piedrahita, Zhang, Hagaman, Oliver, & Maeda, 1992; Steiner, Coisne, Engelhardt, & Lyck, 2011).

3 Methoden

3.1 CD84-defizientes Tiermodell

Um ein Mausmodell zu entwickeln, was anfällig für die Entwicklung atherosklerotischer Plaques ist und gleichzeitig einen CD84-Knockout besitzt, wurden CD84-defiziente (CD84^{-/-}) Mäuse mit Apolipoprotein E-defizienten (ApoE^{-/-}) Mäusen gekreuzt. Alle Mauslinien entstammen dabei dem genetischen Hintergrund der C57BL/6J-Maus (B6) und wurden miteinander verpaart.

Darüber hinaus wurden C57BL/6J und C57BL/6J-Cd84^{-/-} Mäuse für weitere Analysen herangezogen.

Die Mäuse wurden unter bestimmten pathogenfreien Bedingungen gezüchtet und in einem normalen Hell-Dunkel-Zyklus gehalten und hatten dauerhaften Zugang zu Nahrung und Wasser. Für die Induktion der Atherosklerose wurden männliche oder weibliche Mäuse im Alter von sechs oder acht Wochen für acht bzw. zwölf Wochen auf eine fettreiche Ernährung (*Western-Type* Diät) umgestellt (15% Milchfett, 1,25% Cholesterin).

Alle in dieser Arbeit aufgeführten Tierversuche wurden unter direkter Aufsicht und Anleitung zusammen mit Herrn Clément Cochain, Mitarbeiter des Instituts für Experimentelle Biomedizin des Universitätsklinikums Würzburg, durchgeführt. Alle Tierversuche wurden durch die zuständige behördliche Instanz der Regierung von Unterfranken genehmigt (Aktenzeichen 55.2-2532-2-58 und 55.2-2532-2-309) und die Einhaltung der deutschen Tierrechtsbestimmungen sichergestellt.

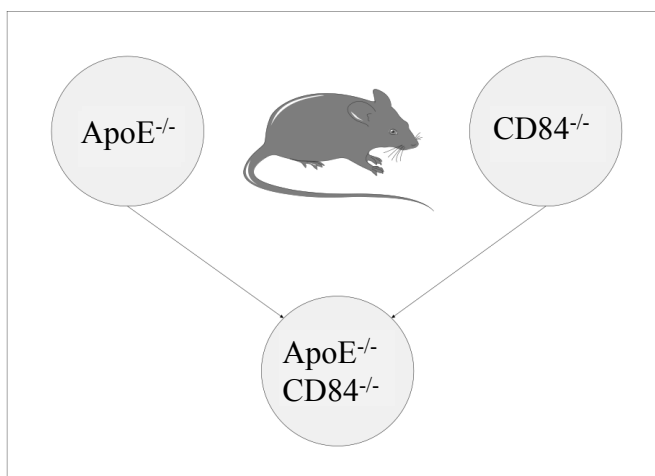


Abbildung 6: Kreuzung von Mäusen, denen sowohl das CD84-Gen als auch das ApoE-Gen fehlt, resultiert in Mäusen mit dem Doppel-Knockout-Genotyp ApoE.CD84^{-/-} (eigene Darstellung).

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Isolation des Knochenmarks aus Femur und Tibia

Die Haut der Maus wurde mittels einer Schere inzidiert, der Femur- und Tibiaknochen aus der Hintergliedmaße herauspräpariert und im sogenannten DC-Medium (RPMI-1640 mit 2 mM L-Glutamin mit 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin-Streptomycin und 0,1% β -Mercaptoethanol) auf Eis gelagert.

Auf der Sicherheitswerkbank wurden die Knochen in 70%-igen Ethanol gereinigt und anschließend in DC-Medium gewaschen. Der Knochen wurde beidseits mithilfe einer Schere eröffnet und von beiden Seiten mittels einer 23-gauge Spritze mit jeweils 1 mL DC-Medium durch einen 70 μ m Filter gespült. Der Filter wurde wiederum mit 3 mL DC-Medium gespült und die Zellsuspension danach bei einer Beschleunigung von 400 g und einer Temperatur von 4°C für fünf Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand entfernt und die Zellen in 2 mL DC-Medium resuspendiert.

3.2.2 Erzeugung von Makrophagen aus dem Knochenmark der Maus

Die isolierten Zellen aus dem Knochenmark wurden in DC-Medium, ergänzt mit 15% L-929 zellkonditioniertem Medium (Hume & Gordon, 1983), resuspendiert. Im Anschluss wurden jeweils 2×10^6 Zellen ausgezählt und in jeweils 1 ml des Nährmediums auf einer 24-well Platte ausgesät und bei 37°C im Zellinkubator inkubiert.

An Tag drei und fünf wurden tote Zellen jeweils durch kurzes Spülen und Abnahme des Mediums entfernt, welches im Anschluss durch frisches Nährmedium ausgewechselt wurde. An Tag sieben waren die Makrophagen reif.

3.2.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Eingefrorene Zellen aus Kryo-Röhrchen wurden durch rasche Zugabe von warmen Medium mithilfe einer sterilen 5 mL Pasteur-Pipette aufgetaut. Nach Zentrifugieren des Röhrchens für 5 Minuten bei 400 g und Raumtemperatur (RT) wurden die Zellen in entsprechendes Medium überführt und entsprechend des spezifischen Zelltyps kultiviert.

Zum Einfrieren wurden adhärenente Endothelzellen (b.End3/5) durch Zugabe von Trypsin abgelöst, wie oben beschrieben zentrifugiert und in ein Kryoröhrchen mit DMEM+GutaMAX mit 45% FCS und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) gegeben und

mittels eines Styropor-Behälters langsam eingefroren und schließlich in einem Eisschrank bei -70°C aufbewahrt.

3.2.4 Ablösen adhärenter Zellen

Adhärenente Zellen konnten nach Abnahme des Nährmediums und einmaligem Spülen mit PBS durch Hinzugabe von Trypsin oder Accutase und anschließender kurzer Inkubation abgelöst und verwendet werden.

3.2.5 Splitten adhärenter Zellen

Das Medium der adhärenenten Zellen wurde entfernt, die Zellen mit 3-4 mL erwärmten PBS gewaschen und 2-3 mL Trypsin hinzugefügt und die Zellen für 3-5 Minuten bei 37°C abgelöst. Die Zellen wurden im Anschluss in ein 50 mL Falcon mit 10 mL Medium transferiert und bei RT und 400 rcf zentrifugiert und in entsprechendem Medium resuspendiert. Je nach Zelltyp und Wachstumscharakteristik wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:5 gesplittet und erneut wie zuvor beschrieben kultiviert.

3.2.6 Isolation glatter Muskelzellen aus der murinen Aorta

Die Aorta wurde nach Eröffnung des Brustkorbs und anschließender Entfernung überschüssigen periaortalen Fettgewebes mittels HBSS sauber gespült und für einige Sekunden in 70% Ethanol eingetaucht. Im Anschluss wurden die Aorten mit HBSS gesäubert, zerkleinert und bei RT und 400 rcf für 5 Minuten im 15 mL Röhrchen zentrifugiert. Danach wurden die Aorta in 5 mL Kollagenase-Lösung resuspendiert und für 1,5-2 Stunden unter ständigem Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Kollagenase wurde durch Zugabe von 10 mL DMEM/10% FCS inaktiviert, die Suspension durch einen 70 µm-Zellfilter gegeben und erneut zentrifugiert.

Eine Kammer einer 6-Well-Platte wurde mit etwa 1 mL 0,75% Gelatine bedeckt und bei RT für etwa 30 Minuten belassen, die Gelatine im Abschluss entfernt und durch 3 mL warmes VSMC-Medium ausgetauscht. Die isolierten Zellen wurden in 1 mL VSMC-Medium resuspendiert, in das Medium innerhalb der 6-Well-Platte gegeben und diese in den Zellinkubator gestellt. Nach 2-3 Tagen waren konfluente VSMC sichtbar.

3.2.7 Enzymatische Gewebeverdauung

Um die Zellzusammensetzung innerhalb eines bestimmten Gewebes zu analysieren, ist es notwendig, zu untersuchendes Gewebe von der extrazellulären Matrix zu befreien, um die im Gewebe enthaltenen Zellen zu isolieren.

Zur Auszählung der Blutzellen wurde ein automatisches Blutanalysegerät von Sysmex verwendet.

Das Muskelgewebe wurde nach Extraktion in möglichst kleine Stücke zerteilt, mit Collagenase I (450 U/mL), Collagenase XI (125 U/mL) und Hyaluronidase (60 U/mL) in RPMI versetzt und für 60 Minuten bei 37° Celsius im Thermomixer inkubiert und enzymatisch verdaut.

Das Herz und die Aorta der Maus wurde mit PBS durchgespült. Die Aorta wurde vom umliegenden Fettgewebe befreit, herauspräpariert und mithilfe einer Schere in kleine Stücke zerteilt. Die Stücke wurden in $\leq 200 \mu\text{L}$ *blendzyme* funktionsfähige Lösung gegeben, wobei die Stammlösung (5 mg Roche Liberase Blendzyme TL + 0,4 mL ddH₂O) 1:20 in RPMI 1640 verdünnt wurde. Die Aorta wurde für 30 Minuten bei 37°C und 1400 RPM schüttelnd verdaut. Die Lösung wurde durch einen 70 μm Zellfilter gegeben und anschließend wurden 10 mL PBS hinzugefügt. Durch anschließendes Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes konnten die aortalen Zellen isoliert und für die FACS-Analyse weiterverarbeitet werden.

Die Milz wurde durch einen vorgewaschenen 70 μm Zellfilter gedrückt, welcher daraufhin mit 2-3 mL PBS gespült wurde. Die Zellen wurden danach bei 400 g und einer Temperatur von 4°C für fünf Minuten zentrifugiert und in 3 mL Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und für 7 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 7 mL PBS wurden hinzugefügt, erneut zentrifugiert, in 10 mL PBS resuspendiert und erneut durch einen 70 μm Zellfilter gegeben.

Die Lymphknoten wurden ebenfalls durch einen vorgespülten 70 μm Filter gedrückt, der mit 3 mL PBS gespült wurde. Die Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 400 g und 4°C zentrifugiert und in 2 mL PBS resuspendiert.

Die Einzelzellsuspension wurde in PBS resuspendiert und zum Teil manuell mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und zum anderen Teil für die durchflusszytometrische Analyse weiterverarbeitet.

Die entnommenen Lymphknoten, Milzen und das aus den Femur- und Tibiaknochen gewonnene Knochenmark wurden durch Filter mit einer Porengröße von 70 μm gegeben, um so die Zellen aus dem gewünschten Gewebe zu isolieren

3.3 *In vivo* Experimente

In den folgenden Kapiteln wird die Methodik der durchgeführten *in vivo* Experimente beschrieben (Übersicht s. Tabelle 11).

<i>In vivo</i> Experimente	Zielsetzung
Hintergliedmaßen-Ischämiemodell	Immunzellrekrutierung unter akut-inflammatorischen Bedingungen
<i>Air Pouch</i> -Modell	
Gemischte Knochenmarkchimäre	Immunzellrekrutierung in Plaques von Ldlr ^{-/-} Mäusen

Tabelle 11: Übersicht über die *in vivo* Experimente.

3.3.1 Hintergliedmaßen-Ischämiemodell

Um die Rolle, die CD84 bei der Rekrutierung von Immunzellen unter akut entzündlichen Prozessen einnimmt, zu ermitteln, wurde das Hintergliedmaßen-Ischämiemodell (*Murine Model of Hindlimb Ischemia*) verwendet. In diesem Modell kann eine massive Immunzellrekrutierung durch die Anlage einer Ligatur an der das Bein versorgenden Oberschenkelarterie (*Arteria femoralis*) in den Muskeln der unteren Extremität induziert werden, insbesondere des murinen *Musculus tibialis anterior*. Diese Methode dient also der Untersuchung der Immunzellrekrutierung in ein akut entzündetes Gewebe.

Im Rahmen der akuten Ischämie durch die Unterbindung des Blutstromes hervorgerufen durch die Anlage einer Ligatur an der das Bein hauptsächlich versorgenden Oberschenkelarterie (*A. femoralis*), kommt es zu einer massiven Rekrutierung von Immunzellen in das ischämische Gebiet des unteren Muskels der Hintergliedmaße. Dieser Prozess weist allgemein eine spezifische Charakteristik auf; 24 Stunden nach dem operativen Eingriff, der zu der akuten Ischämie führt, sind hauptsächlich Neutrophile Granulozyten neben anderen inflammatorischen Zellen erkennbar, während 72 Stunden nach der Operation insbesondere Ly6C^{high} Monozyten im Entzündungsgebiet überwiegen (Cochain et al., 2010).

Bei acht bis elf Wochen alten B6 und B6.CD84^{-/-} Mäusen wurde durch Herrn Clément Cochain nach intraperitonealer Injektion von Xylazin (10 mg/kg) und Ketamin (80 mg/kg) zur Narkose und Schmerzlinderung das Fell an einem Hinterlauf abrasiert und die Maus mittels Klebestreifen fixiert. Die Haut wurde mittels einer kleinen Schere inzidiert, der proximale Teil der Arterie von Fettgewebe befreit und von Nerv und Vene

freipräpariert. Nun wurde der Maus mittels eines Seraflex USP 6/0 Bindfadens die Arterie durch Anwendung der chirurgischen Knotentechnik unterbunden und die Wunde im Anschluss gereinigt und mit sterilen Klammern verschlossen.

Die Mäuse wurden anschließend unter Kontrolle und ausreichender Analgesie für 24-72 Stunden im Käfig gehalten.

Ein Teil der operierten Mäuse wurde nach 24 Stunden, ein anderer Teil nach 72 Stunden postoperativ terminiert und daraufhin sowohl venöses Blut (Regan, Fenyk-Melody, Tran, Chen, & Stocking, 2016), als auch der ischämische Muskel der operierten Hintergliedmaße sowie der nicht-ischämische Muskel der nicht operierten Seite entnommen. Nach enzymatischer Gewebeerweichung und Aufbereitung wurden die Zellen für durchflusszytometrische Analysen verwendet.

3.3.2 *Air Pouch-Modell für Zellrekrutierung*

Das Modell des subkutanen Luftpolsters (*air pouch*) kann als Modell zur Untersuchung der Immunzellrekrutierung und der Produktion inflammatorischer Mediatoren während einer akuten Entzündungsreaktion *in vivo* herangezogen werden. Das durch Injektion steriler Luft auf dem Rücken der Maus geschaffene Luftpolster dient der Injektion proinflammatorischer Reizstoffe, welche wiederum eine akute Immunantwort in dem Tier provozieren (Duarte, Vasko, & Fehrenbacher, 2016).

Acht bis elf Wochen alten B6 und B6.CD84^{-/-} wurden durch Herrn Clément Cochain an Tag 0 unter Sedierung durch Isofluran 3 bis 5 mL sterile Luft subkutan auf dem Rücken der Maus injiziert. An Tag 3 wurde das Luftpolster durch erneute Injektion von ca. 3 mL steriler Luft wiederaufgefüllt.

An Tag 5 wurde dem Tier, unter Sedierung durch Isofluran, muriner Tumornekrosefaktor (TNF α) (50 ng/mL in 1 mL sterilem PBS) in das Luftpolster injiziert.

Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde die Maus terminiert und das Reservoir mit 3 mL PBS gespült. Die Menge der gewonnenen Spülflüssigkeit wurde gewogen, wodurch auf die Gesamtmenge der Flüssigkeit, also mitsamt der Menge, die sich bereits nach 24 Stunden in dem Luftpolster befand, berechnet werden konnte. Die absoluten Zellzahlen wurden mithilfe einer Zählkammer nach Neubauer manuell ausgezählt und auf die erhaltene Menge an Spülflüssigkeit errechnet.

Die Spülflüssigkeit der Luftpolster wurde für die anschließende Analyse mittels Durchflusszytometrie weiterverarbeitet.

Die Zellen aus der Spülflüssigkeit wurden mit den Antikörpern CD45 (Klon 30-F11), CD115 (Klon AFS98), Ly6G (Klon 1A8), F4/80 (Klon BM8), NK1.1 (Klon PK136), Ly6C (Klon AL-21) sowie CD11b (Klon M1/70) auf Monozyten und Makrophagen und den Antikörpern CD45 (Klon 30-F11), CD3 (Klon 17A2), TCR- β (Klon H57-597) TCR- $\gamma\delta$ (Klon GL3), CD4 (Klon GK1.5) und CD8a (Klon 53-6.7) auf T-Zellen gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Einzelne Zellpopulationen konnten im Anschluss auf ihren Anteil innerhalb der Spülflüssigkeit errechnet werden.

Durch die Zahlen aus der manuellen Zellzählung sowie den prozentualen Anteil der einzelnen Zellpopulationen, konnte die Menge an Zellen, die in einem Milliliter der Spülflüssigkeit enthalten waren, berechnet werden.

3.3.3 Modell der gemischten Knochenmarkchimäre

Um zu untersuchen, inwieweit CD84 an der Rekrutierung von Immunzellen in die atherosklerotische Plaque beteiligt ist, wurden gemischte Knochenmarkchimären herangezogen.

Knochenmarktransplantationsmodelle werden häufig verwendet, um die Bedeutung hämatopoetischer Zellen in der Atherosklerose zu untersuchen.

Es wurde jedoch berichtet, dass eine Bestrahlung, die erforderlich ist, um das hämatopoetische Kompartiment im Knochenmark der Empfängermause zu erschöpfen, einen intrinsischen Effekt auf das Fortschreiten der Atherosklerose hat (Aparicio-Vergara, Shiri-Sverdlov, de Haan, & Hofker, 2010). Die Auswirkungen auf die Atherosklerose können zwischen chimären $Ldlr^{-/-}$ - oder $ApoE^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu Befunden, die unter Verwendung vollständiger *Knock-Outs* erzielt wurden, unterschiedlich sein. Zum Beispiel zeigten $Ldlr^{-/-}$ Mäuse, denen B7-1/B7-2-T-Zell-Kostimulationssignale fehlen, weniger Atherosklerose aufgrund verminderter T-Zell-Aktivierung (Buono et al., 2004). Da $ApoE^{-/-}$ Mäuse nicht als geeignetes Modell für Knochenmarkchimären-Experimente bei der Untersuchung von Atherosklerose gelten, weil ein Transfer von ApoE im Rahmen der Knochenmarkdepletion und -rekonstitution bei $ApoE^{-/-}$ Tieren nicht ausgeschlossen werden kann, wurden für dieses Experiment $Ldlr^{-/-}$ Mäuse präferiert, um zu gewährleisten, dass eine Bildung atherosklerotischer Plaques in der Maus tatsächlich stattfindet.

Sechs bis acht Wochen alte $Ldlr^{-/-}$ und $CD45.2^{+/+}$ Empfänger-Tiere wurden letal bestrahlt und mit aus dem Knochenmark isolierten Spenderstammzellen 24 Stunden nach

der Bestrahlung rekonstituiert. Dabei wurden dem Tier $3-5 \times 10^6$ Spenderzellen in 200 μL sterilem PBS intravenös injiziert.

Die Spenderstammzellen aus dem Knochenmark stammen zu 50% von CD45.1 Wildtyp-Mäusen und zu 50% von CD84^{-/-} mit CD45.2 Genotyp. Nach einer Ruhezeit von 4 Wochen nach der Transplantation, um die Immunrekonstitution zu ermöglichen, wurden die Tiere für acht Wochen auf eine fettreiche Diät (HFD, 15% Milchfett, 1,25% Cholesterin) gesetzt, um die Entwicklung atherosklerotischer Plaques in den Gefäßwänden zu provozieren und damit die Immunzellrekrutierung zu untersuchen.

Im Anschluss wurden die Aorten isoliert, das Blut, Milz und Lymphknoten extrahiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Während das Blut auf den Anteil an Monozyten und T-Zellen analysiert wurde, wurde die Aorta auf den Anteil an Makrophagen und T-Zellen untersucht.

Die Milzen, das Blut, die paraaortalen und inguinalen Lymphknoten wurden auf T-Zellen und folliculäre T-Helferzellen (Tfh) mit den Antikörpern gegen CD45.1 (Klon A20), CD45.2 (Klon 104), CD4 (Klon GK1.5), CD44 (Klon 1M7), CD62L (Klon MEL-14), CXCR5 (Klon SPRCL5), PD1 (Klon J43) gefärbt. Das Blut und die Milzen wurden auf Monozyten mit den Antikörpern gegen CD45.1 (Klon A20), CD45.2 (Klon 104), CD11b (Klon M1/70), CD115 (Klon AFS98), Ly6C (Klon AL-21) und CD84 (Klon JER1) gefärbt. Die Aorten wurden nach der Durchführung einer Fc-Blockierung mit den Antikörpern gegen CD45.1 (Klon A20), CD45.2 (Klon 104), CD11b (Klon M1/70), CD84 (Klon JER1), Ly6C (Klon AL-21) sowie f4/80 (Klon BM8) gefärbt. Zum Schluss wurden die Zellen aus dem Gewebe mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von CD45.1, CD45.2 und CD84 untersucht.

Die Zellen, die durch die letale Bestrahlung des Empfängertieres nicht erfasst und zerstört wurden, konnten durch Färbung der beiden Marker CD45.2 und CD84 aus der Berechnung exkludiert werden.

Berechnet wurde der Anteil von T-Zellen respektive Monozyten/Makrophagen im Blut und in der Aorta der Tiere, die entweder einen CD45.1 oder einen CD45.2 Oberflächenrezeptor aufwiesen. Danach wurden die prozentualen Anteile der jeweiligen Zellen, die in der Aorta gefunden wurden, ins Verhältnis zu den prozentualen Anteilen der jeweiligen Zellen aus dem Blut gesetzt. So konnte das Verhältnis des 'Chimärismus' errechnet werden.

Durch die Anwendung dieses Modells ist es möglich, CD84-defiziente sowie CD84-positive Immunzellen innerhalb eines Organismus *in vivo* zu untersuchen und einen

direkten Vergleich der Migrationsrate der beiden Zelltypen in die atherosklerotische Plaque, zu erkennen.

3.4 *In vitro* Experimente

In den folgenden Kapiteln wird die Methodik der durchgeführten *in vitro* Experimente beschrieben (Übersicht s. Tabelle 12).

<i>In vitro/ex vivo</i> Experimente	Zielsetzung
Immunhistochemische Analyse muriner Plaques	Atherosklerose in ApoE ^{-/-} Mäusen
Adhäsions-Assay	Adhäsion und chemotaktische Transmigration von Monozyten
Chemotaktische Transmigration	
Integrinexpression	Integrinexpression und -aktivierung auf Monozyten und T-Zellen
Löslicher-Ligand basierter Adhäsions-Assay	
Zellviabilität	Überlebens-/Apoptosecharakteristik von Makrophagen

Tabelle 12: Übersicht über die *in vitro* Experimente.

3.4.1 Immunhistochemische Analyse muriner Plaques

Mithilfe immunhistochemischer Analysen können unter anderem atherosklerotische Plaques auf ihre Größe und Zusammensetzung analysiert werden.

Um die Rolle des CD84 bei der Entwicklung atherosklerotischer Plaques zu untersuchen, wurden ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}.CD84^{-/-} Mäuse acht und 16 Wochen auf *Western-Type* Diät gesetzt.

Die folgenden Schritte wurden bis auf die Analysen der Plaques von Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Biomedizin II des Universitätsklinikums Würzburg durchgeführt.

Die Aorten wurden *in situ* mit *Phosphate-buffered saline* (PBS) und 4%-igem Paraformaldehyd (PFA) gespült. Das Herz und die Milz wurden herauspräpariert, von umliegendem Fettgewebe befreit und die Organe und Aorten wurden in 4%-igem PFA über Nacht fixiert. Die fixierten Organe wurden in *OCT Compound* eingebettet, tiefgefroren und danach 5 µm starke Gewebeschnitte von Herz und Milz mithilfe eines Kryostats hergestellt.

Gabe's Aldehyde Fuchsin-Lösung wurde zur Färbung von atherosklerotischen Plaques in Schnitten der Aortenwurzel verwendet, *Picrosirius red* zur Färbung von Kollagen- und Elastinfasern innerhalb der Plaques.

Die unspezifischen Antikörperbindungen wurden mit 1%-igem BSA blockiert. Im Anschluss wurden die Schnitte mit primären monoklonalen Antikörpern (*mAb*) über Nacht bei 4°C inkubiert. Es wurden Antikörper gegen Makrophagen mit Mac2 (Klon M3/38) und gegen glatte Muskelzellen (SMCs) mit *α -smooth muscle actin* (Klon C6198) verwendet.

Mittels des sekundären Antikörpers konnten diese Bestandteile der atherosklerotischen Plaques sichtbar gemacht und detektiert werden. Die Detektion der Mac2- und CD3-Antikörper erfolgte mittels eines mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexafluor 488-konjugierten, sekundären Antikörper. Die Zellnuclei konnten in Eindeckmedium mit einer DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) Färbung sichtbar gemacht werden.

Die Schnitte wurden mit dem sekundären Antikörper bei Raumtemperatur für circa eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit einem Leica DM4000 B-LED Lichtmikroskop sichtbar gemacht und mit einer Hitachi HVF202 Kamera aufgenommen.

Die Präparationen der Herzen der Versuchstiere sowie Fixierungen, Kryoschnitte, Färbungen, Aufnahme der Schnitte wurden von Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Biomedizin II des Universitätsklinikums Würzburg durchgeführt.

Die Analyse der Plaquegröße, und -zusammensetzung der Aortenwurzel wurde indes durch mich durchgeführt. Die Analyse der immunhistochemischen Färbungen hinsichtlich der Plaquegröße sowie der Zellzusammensetzung erfolgte mit der Diskus Software für digitale Bildanalyse, die Überprüfung des Kollagengehalts mittels der ImageJ Software.

3.4.2 *In vitro* Adhäsions-Assay

Die Adhäsion und im weiteren Sinne die Zellrekrutierung von proinflammatorischen Zellen aus der Blutzirkulation an das Gefäßendothel kann *in vitro* mithilfe einer Flusskammer unter physiologischen Flussbedingungen untersucht werden.

Da Monozyten im Rahmen der Atherosklerose, das heißt unter inflammatorischen Umständen, aus dem Knochenmark mobilisiert werden (Robbins et al., 2012), die über das

Kreislaufsystem in das Entzündungsgebiet gelangen, wurden für den Versuch Monozyten verwendet, die aus dem Knochenmark isoliert wurden.

Da die aus der Aorta isolierten Zellen sowie die SVECs (*SV-40-transformed mouse lymphatic endothelial cells*) nur schwerlich an den verwendeten μ -Slides anhefteten und sich unter Scherbelastung ablösten, wurden Zellen aus der b.End5-Endothelzellreihe verwendet. Dabei handelt es sich um immortalisierte Endothelzellen aus Arterien des Gehirns, die sich ähnlich wie primäre Endothelzellen verhalten und für *in vitro* Adhäsionsversuche geeignet sind (Steiner et al., 2011).

Murine b.End5-Zellen wurden in 100mm Kulturschalen in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) + GlutaMAX mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin bis zum Erreichen eines konfluenten Wachstums kultiviert. 100 μ L der Zellsuspension mit einer Konzentration von 2 Millionen Zellen/mL wurden zwei Tage vor der Versuchsdurchführung in eine μ -Slide I^{0,4} Luer von Ibidi ausgesät und bei 37° C kultiviert.

Um inflammatorische Bedingungen zu schaffen, die denen in dem Entstehungsprozess der Atherosklerose ähneln und dafür zu sorgen, dass die Monozyten an das Endothel adhären, wurde ein Teil der μ -Slides einen Tag vor Versuchsdurchführung mit TNF- α (10 ng/mL) über Nacht inkubiert (Manthey et al., 2013), der andere Teil wurde unbehandelt gelassen.

Tumornekrosefaktor- α gilt als ein Zytokin, welches über Aktivierung mehrerer Signalwege, unter anderem des NF- κ B-Signalweges, eine Entzündungsreaktion vermitteln und verstärken kann (Tedgui & Mallat, 2006).

Integrine, die an der Zelloberfläche exprimiert sind und durch chemische Reize überexprimiert und aktiviert werden können, beeinflussen also das „Rollen“, die Adhäsion und dadurch bedingt die Transmigration von Immunzellen maßgeblich (Ley, Laudanna, Cybulsky, & Nourshargh, 2007). Murine Monozyten wurden nach Extraktion der Tibiae und Femura von B6 und B6.CD84^{-/-} Mäusen aus dem Knochenmark mittels eines *Monoocyte Isolation Kits* (Miltenyi Biotec GmbH), gemäß der Anleitung des Herstellers, isoliert und in *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) inklusive 10 mmol/L HEPES und 0,5% BSA resuspendiert. Ein kleiner Teil der isolierten Monozyten wurden mit Antikörpern gegen CD45 (Klon 30-F11), CD11b (Klon M1/70), CD115 (Klon AFS98), Ly6C (Klon AL-21) und Ly6G (Klon 1A8) gefärbt und durchflusszytometrisch auf ihren tatsächlichen Anteil an Monozyten, also auf ihre Reinheit, geprüft.

Die murinen Monozyten wurden mit 1 μM des Fluoreszenzfarbstoffes CFSE, durch eine 15-30-minütige Inkubation der Zellsuspensionen bei 37°C, gelabelt. Die Monozyten-Zellsuspension wurde im Wasserbad auf 37,5°C erwärmt und es wurden unmittelbar vor der Durchführung des Flussversuches Magnesium- und Calciumionen in einer 1 mM Endkonzentration zu den Monozyten hinzugegeben.

Innerhalb des Flusssystems befanden sich nun insgesamt 6 mL des auf 37°C erwärmten Endothelzellmediums inklusiver der Monozyten.

Die Monozyten wurden in einer Konzentration von $4,1 \times 10^5$ Zellen/mL mittels des *Ibidi Pump Systems* für fünf Minuten und einem eingestellten *Shear stress* von 1.5 dynes/cm² perfundiert (s. Abbildung 7). Die Konzentration entspricht dabei in etwa der eines gesunden Erwachsenen Menschen.

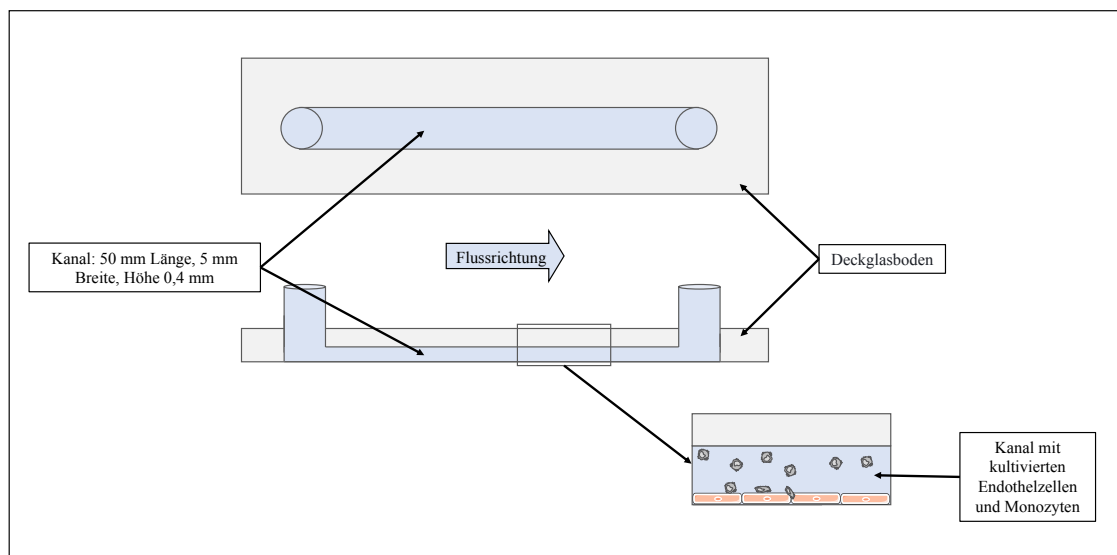


Abbildung 7: *In vitro* Adhäsions-Assay. Der Flusskanal besitzt eine Länge von 50 mm, eine Breite von 5 mm und eine Höhe von 0,4 mm. In dem Kanal werden die Endothelzellen kultiviert und über Nacht mit TNF- α stimuliert. Die Monozyten werden mit CFSE markiert und über das Endothel perfundiert (eigene Darstellung).

Adhärenente Zellen konnten im Anschluss mithilfe eines Leica DM4000 B-LED Lichtmikroskops visualisiert, mit einer Hitachi HVF202 Kamera aufgenommen und mittels der Diskus Software gespeichert werden.

Fünf Minuten nach Sichtbarwerden der ersten Zellen unter der Kamera, wurden von fünf bis sieben nebeneinanderliegenden Ausschnitten der Flusskammer Bilder aufgenommen. Dabei war aufgrund der Aufnahme von zwei bis drei Bildern wenige Sekunden

den nacheinander ein Unterschied zwischen vorbeiströmenden, rollenden und adhären-
ten Zellen gut erkennbar.

Die Bilder konnten mittels ImageJ aufgerufen und adhärente Zellen manuell ausgezählt
werden.

3.4.3 Chemotaktischer *in vitro* Transmigrations-Assay

Die transendotheliale Migration von Monozyten kann mittels des Migrations-Assays
und des Lumineszenz ATP Assay *in vitro* untersucht werden. Murine Monozyten wur-
den nach Extraktion beider Femura und der Tibiae von B6 und B6.CD84^{-/-} Mäusen aus
dem Knochenmark mit Hilfe eines *Monocyte Isolation Kits*, gemäß der Anleitung des
Herstellers (Miltenyi, CD115 MicroBead Kit, mouse), isoliert. Die isolierten Monozy-
ten wurden mit Antikörpern gegen CD45 (Klon 30-F11), CD11b (Klon M1/70), CD115
(Klon AFS98), Ly6C (Klon AL-21) und Ly6G (Klon 1A8) gefärbt und durchflusszyto-
metrisch auf ihre Reinheit untersucht.

Die Boyden-Kammern wurden alsdann in einer 24-well-Platte bereitet. Pro Tier wurden
fünf Wells mit 500 µl RPMI und 0,5% BSA befüllt, drei davon beinhalteten das Zytokin
CC-Chemokinligand 2 (CCL2), auch bekannt als Monocyte Chemotactic Protein 1
(MCP-1), in einer Konzentration von 20 ng/mL als Chemoattraktans. CCL2 wird von
Immunzellen sezerniert und hat einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung
atherosklerotischer Läsionen, wobei es zur Transmigration adhärenter Monozyten in
den subendothelialen Raum beiträgt (Lin, Kakkar, & Lu, 2014; Luscinskas et al., 2000;
Zernecke & Weber, 2014).

Zwei Wells wurden als Kontrolle herangezogen und ein *Well* als Total-Bezugswert mit
 1×10^5 Monozyten in 500 µl RPMI und 0,5% BSA befüllt. Die Kammern wurden durch
eine nicht beschichtete Polyethylenterephthalat (PET) Membran mit einer Porengröße
von 5 µm getrennt (Chen, 2005). In die oberen Kammern wurden jeweils 1×10^5 Mo-
nozyten in 100 µL RPMI + 0,5% BSA gegeben. Die Zellen wurden nun für 4 Stunden
bei 37 °C inkubiert (s. Abbildung 8).

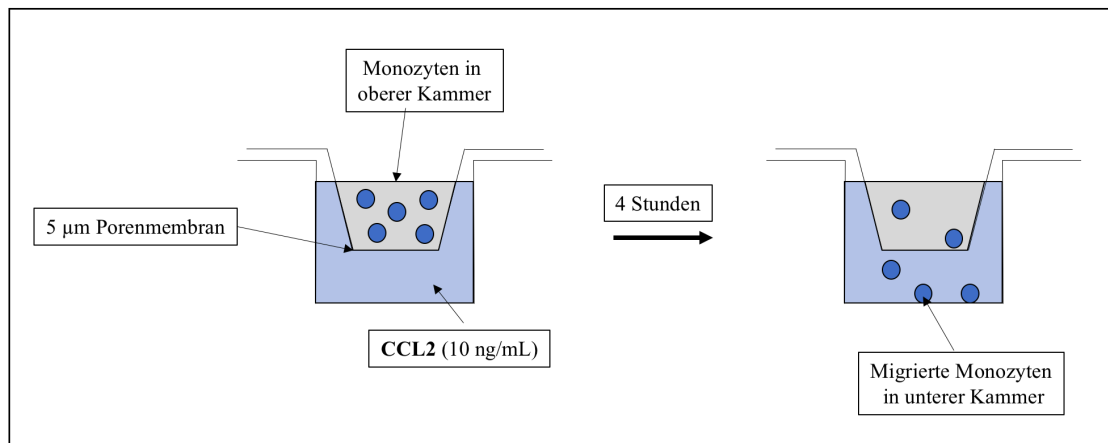


Abbildung 8: *In vitro* Transmigrations-Assay (eigene Darstellung).

Im Anschluss wurden die Inserts entfernt, 250 µl *CellTiter-Glo pro Well* hinzugegeben, für 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt, wodurch die Zellen lysiert wurden und das intrazelluläre ATP freigesetzt werden konnte und im Anschluss in einer *96-Well White Solid* Platte in einem ELISA *microplate reader* auf den Anteil der migrierten Zellen, basierend auf dem ATP-Gehalt, untersucht.

Die gemessene Stärke der Lumineszenz korreliert dabei direkt mit dem ATP-Gehalt und damit mit dem Lebendzellanteil, das heißt den migrierten Zellen durch die Porenmembran, in der unteren Kammer.

Der Anteil der migrierten Zellen konnte dann mit Hilfe des Total-Bezugswerts errechnet werden.

3.4.4 Integrinexpression auf Monozyten

Um zu überprüfen, ob es einen Unterschied bezüglich der Expression von Integrinen auf der Zelloberfläche von Monozyten aus dem Blut und aus dem Knochenmark von CD84-defizienten und WT-Mäusen gibt, wurde die Integrinexpression mittels durchflusszytometrischer Analyse durch die Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität ermittelt. Die Zellen wurden auf die Expression von Integrin α -M (CD11b), Integrin β -2 (CD18), Integrin β -1 (CD29) und Integrin α -4 (CD49d) untersucht.

Dafür wurde das Blut und das Knochenmark sowohl von B6, als auch von B6.CD84^{-/-} extrahiert, das Blut durch Erythrozytenlysepuffer von Erythrozyten befreit und beides in einer 96-well Platte mittels Durchflusszytometrie auf die Expression der Integrine mit Antikörpern gegen CD11b (Klon M1/70), CD115 (Klon AFS98), Ly6C (Klon AL-21)

und Ly6G (Klon 1A8) CD18 (Klon M18/2), CD29 (Klon HMb1-1) und CD49d (Klon R1-2), analysiert.

3.4.5 Löslicher-Ligand basierter Adhäsions Assay

Um die Funktion des CD84 in Hinblick auf die Rolle bei der Adhäsion von Immunzellen an das Endothel weiter zu spezifizieren, wurde der lösliche-Ligand-basierte Adhäsions Assay angewandt.

Dabei wird die Expression und Aktivierung von LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen 1*) auf der Oberfläche von T-Zellen aus der Milz überprüft, exemplarisch für weitere im Blut zirkulierende Immunzellen.

Dafür wurden T-Zellen aus der Milz von B6 und B6.CD84^{-/-} Mäusen mit dem *Pan-T-Cell Isolation Kit II (mouse)* nach dem Protokoll des Herstellers isoliert.

Die Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/mL in RPMI entweder mit oder ohne IL-2 (100 IU/mL) für 48 Stunden kultiviert.

Dieses verursacht unter anderem die Aktivierung von T-Zellen, ist für den Erhalt von regulatorischen T-Zellen (Tregs) mitverantwortlich und für die Differenzierung von T-Zellen in definierte Effektor-T-Zellen entscheidend (Boyman & Sprent, 2012).

Die Zellen wurden in PBS+0,5% BSA zweimal gewaschen. In 1,5 mL low-bind Reaktionsgefäße wurden zuerst 10 μ L von 400 μ g/mL *Recombinant Human ICAM-1/CD54 Fc* sowie 10 μ L PBS+0,5% BSA gegeben. Pro Maus wurden jeweils drei Reaktionsgefäße befüllt. Die drei Reaktionsgefäße wurden mit jeweils 20 μ L der IL-2 stimulierten Zellen, sowie einmal mit 10 μ L PBS 0,5% BSA als Negativkontrolle, 10 μ L PMA als Positivkontrolle + 2mM Mg²⁺ 3,6 mM Ca²⁺ (Endkonzentration 10^{-8} M PMA 0,5 mM Mg²⁺ 0,9 mM Ca²⁺) und 10 μ L 40 mM Mg²⁺ + 4 mM EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure) (Endkonzentration 10 mM Mg²⁺ + 1 mM EGTA) befüllt.

Die Reaktionsgefäße mit einem Volumen von jeweils insgesamt 40 μ L wurden nun für 15 Minuten bei 37°C inkubiert, um die Aktivierung des LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen 1*) und eine Bindung des ICAM-1 Fc hervorzurufen. Im Anschluss konnte die Reaktion durch Zugabe von 40 μ L 37°C warmen 4% PFA (Paraformaldehydlösung) und 5 Minuten andauernder Inkubation gestoppt werden. Daraufhin wurden pro Gefäß 500 μ L kalter FACS-Puffer hinzugefügt und die Gefäße auf Eis gelegt.

Nach dem Waschen wurde das an das LFA-1 gebundene ICAM-1-Fc durch den R-PE-konjugierten *Goat Anti-Human F(ab')₂* Antikörper in PBS 1% FCS in einer Konzentration von 1/50 bei 4°C für 20 Minuten gefärbt.

Im Anschluss konnte die Intensität der Fluoreszenz und der prozentuale Anteil an Zellen, auf denen das LFA-1 aktiviert wurde mittels Durchflusszytometrie sichtbar gemacht werden (Konstandin et al., 2006).

3.4.6 Zellviabilität und Lumineszenz ATP Assay

Um die Rolle des CD84 für das Überleben und die Aktivierung von Zellen, in diesem Fall von Makrophagen, zu analysieren, wurde der Lumineszenz ATP Assay verwendet. Die Zellviabilität korreliert stark mit der metabolischen Aktivität und damit dem ATP-Gehalt von Zellen. Der Nachweis der Zellvitalität bestimmter Zellen beruht in diesem Assay auf dem Gehalt an ATP. Die Stärke der Lumineszenz korreliert wiederum direkt mit dem ATP-Gehalt innerhalb der Zellen (Posimo et al., 2014).

Knochenmark wurde aus Tibia- und Femurknochen von acht bis elf Wochen alten B6 und B6.CD84^{-/-} Mäusen gewonnen und eine Makrophagen-Kultur angelegt.

Ausdifferenzierte Makrophagen wurden zum einen Teil mit Cycloheximid (10 µg/mL und 20 µg/mL), zum anderen mit oxidiertem *low-density* Lipoprotein (oxLDL) (10 µg/mL und 50 µg/mL) für 24 Stunden inkubiert und Kontrollmakrophagen unbehandelt belassen.

Die Anwesenheit des oxLDL soll bei den Makrophagen eine Situation simulieren, die im Rahmen der Atherogenese ebenfalls vorzufinden ist und Makrophagen aktiviert und zur verstärkten Expression spezifischer Rezeptoren anregt (Hansson & Libby, 2006).

Cycloheximid (CHX) wirkt auf der anderen Seite als Translationshemmer bei eukaryotischen Zellen und führt durch Unterbinden der Proteinbiosynthese an den Ribosomen zur Wachstumshemmung und zum Absterben der Zellen.

Es wird also die Fähigkeit der Makrophagen hinsichtlich des verstärkten oder verminderten Überlebens und der verstärkten oder verminderten Proliferation *in vitro* überprüft. Das *CellTiter-Glo* wurde den Zellen hinzugegeben, für 15 Minuten bei Raumtemperatur belassen und geschüttelt, wodurch die Zellen lysiert und das intrazelluläre ATP freigesetzt wurde. Im Anschluss konnte das Lumineszenzlevel entsprechend der Menge an ATP und damit dem Lebendzellanteil mittels eines ELISA *microplate reader* ermittelt werden.

Dadurch konnte der Unterschied in der Proliferations- und Überlebensrate zwischen B6 und B6.CD84^{-/-} Makrophagen durch die Stimulation mit CHX und oxLDL analysiert werden.

3.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt es, Zellen anhand ihrer Struktur, Form und Färbung, etwa mit Antikörpern gegen Oberflächenproteine, zu differenzieren und zu sortieren. Dadurch ist es möglich ausgewählte Zellsuspensionen auf die Zellzusammensetzung zu untersuchen. Zellen passieren einen Laserstrahl und emittieren dabei optische Signale, die von dem Analysegerät erkannt werden. Dabei korreliert die Form und Größe der Zelle mit dem Anteil des gestreuten Lichts. Verwendete Antikörper können dabei helfen, ausgewählte Oberflächenmerkmale einzelner Subpopulationen erkenntlich zu machen und Zellen nach ausgesuchten Kriterien zu sortieren.

Einzelzellsuspensionen mit einem Anteil von maximal 1×10^6 Zellen wurden dafür in PBS mit 1% FCS vollständig gewaschen und in 25 μ L PBS mit 1% FCS und 25 μ L FACS-Färbepuffer resuspendiert. Spezifische Antikörper gegen Oberflächenantigene wurden je nach Angabe des Herstellers und der Konzentration an Zellen in einem Verhältnis von 1: 50 bis 1: 800 zugegeben und die Zellen für 30 Minuten bei 4°C, vor Licht geschützt, inkubiert. Teilweise wurden Zellen zunächst 20 Minuten mit einem Anti-Fc-Rezeptor (CD16/32) bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungen an Zellbestandteile der hinzugefügten Antikörper zu vermeiden. Nach der Färbung wurden die Zellen zweimal mit 150 μ L PBS mit 1% FCS pro Probe vollständig gewaschen und sofort bis zum Beginn der durchflusszytometrischen Messung auf Eis gelagert.

3.6 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte mittels der Software GraphPad Prism. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Eine normalverteilte Zufallsgröße nimmt mit einer Wahrscheinlichkeit von weniger als 5% einen Wert an, der sich vom Erwartungswert um mehr als die zweifache Standardabweichung unterscheidet. Daher gilt ein p-Wert von $\leq 5\%$ als statistisch signifikant (*), von $\leq 1\%$ als sehr signifikant (**), und von $\leq 0,1\%$ als hochsignifikant (***)).

Oberhalb der in dieser Arbeit dargestellten Graphen wird die jeweilige Stärke der Signifikanz durch genannte Berechnung graphisch dargestellt. Die Grundgesamtheit wird mit „n“ angegeben.

Für den Unterschied im Mittelwert zweier Gruppen wurde der Student-T-Test verwendet, für Varianzanalysen bei multiplen Mittelwertsvergleichen der nicht-parametrische Mann-Whitney-U- und Krustal-Wallis-Test. Zur Identifizierung von statistischen Ausreißern (*Outlier*) wurde der *Grubbs' test for outliers* verwendet.

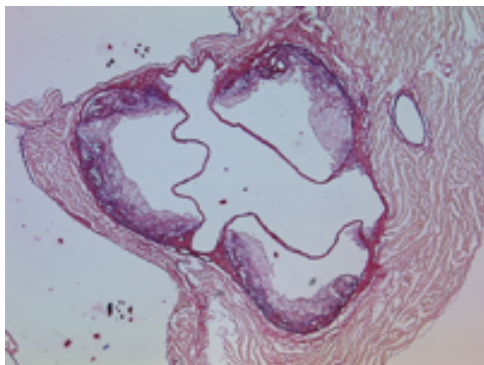
4 Ergebnisse

4.1 Immunhistochemische Charakterisierung der murinen Plaques

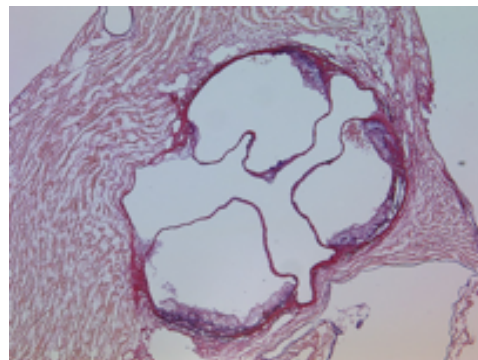
Um herauszufinden, ob CD84 einen Einfluss auf die Entstehung und Weiterentwicklung der Atherosklerose in der Maus aufweist, wurden Apolipoprotein E-defiziente (ApoE^{-/-}) mit CD84-defizienten (CD84^{-/-}) Tieren gekreuzt, um Doppelknockout-Tiere zu generieren, die kein CD84 exprimieren und gleichzeitig suszeptibel für die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen sind.

Für die immunhistochemische Analyse der Aortensinuse der Tiere wurden acht ApoE^{-/-} und neun Apo.CD84^{-/-} Mäuse im Alter von acht Wochen für insgesamt acht Wochen auf *Western-Type* Diät gesetzt. Im Anschluss daran wurden die Aorten extrahiert und Schnitte der Aortenwurzeln der Tiere angefertigt, welche letztendlich mittels beschriebener immunhistochemischer Färbungen auf deren Plaquegröße und -zusammensetzung analysiert werden konnten.

Bei Mäusen nach acht Wochen unter HFD ergaben die immunhistochemischen Analysen, dass die Größe der atherosklerotischen Plaques in der Aortenwurzel insgesamt ($p=0,0037$) im Doppelknockout (ApoE.CD84^{-/-}) signifikant kleiner, als im einfachen Knockout (ApoE^{-/-}) waren (s. Abbildung 9 und Abbildung 10).



ApoE^{-/-}



ApoE.CD84^{-/-}

Abbildung 9: Repräsentative Schnitte durch die Aortenwurzel der Versuchstiere nach acht Wochen unter HFD, Färbung mit *Gabes's Aldehyde Fuchsin* und *Picrosirius red*.

Ebenso wurden die Plaques auf ihren Gehalt an Kollagen, Makrophagen (Mac2) und den Anteil des nekrotischen Kerns (*necrotic core*) analysiert und berechnet. Daten für glatte Muskelzellen (gegen *α -smooth muscle actin*) konnten aufgrund zu geringer Mengen existenter Zellen oder einer insuffizienten immunhistochemischen Färbung nicht erhoben werden und werden deshalb hier nicht präsentiert.

Es konnte ein signifikant geringerer prozentualer Anteil an Makrophagen (Mac2) ($p=0,032$) innerhalb der Plaque sowie ein geringerer Anteil an Kollagen (*Picrosirius red*) ($p=0,0024$) im Doppelknockout festgestellt werden.

Bezüglich des Anteils des nekrotischen Kerns ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p=0,7394$) (s. Abbildung 10).

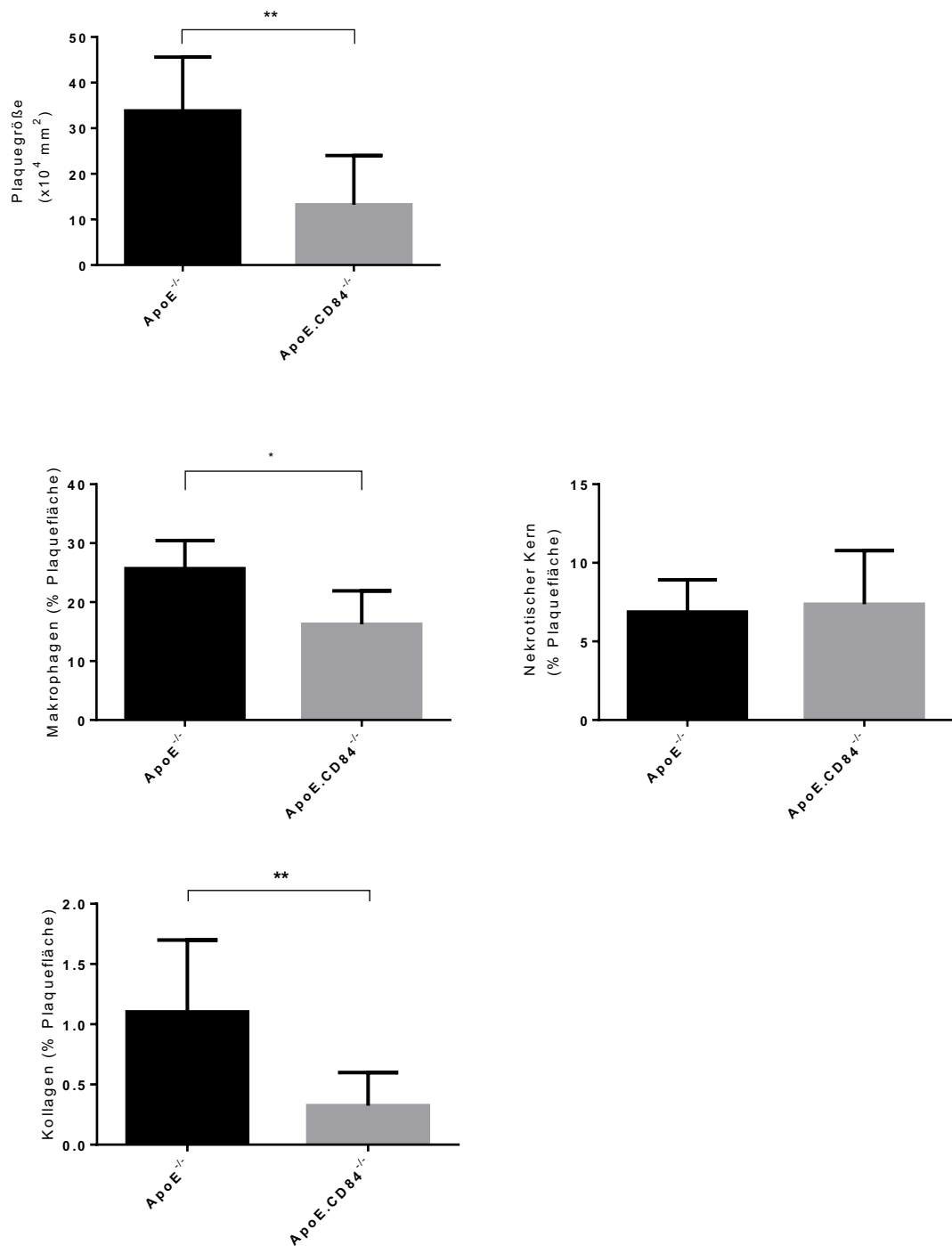


Abbildung 10: Ausmaß der Atherosklerose sowie der Anteil an Makrophagen, des nekrotischen Kernes und des Kollagens innerhalb der atherosklerotischen Plaque in ApoE^{-/-}-Mäusen nach **acht Wochen** HFD. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert ± SEM (n=8 ApoE^{-/-} und 9 ApoE.CD84^{-/-} Mäuse), *p≤ 5%, **p≤ 1%.

Für eine Dauer von 16 Wochen wurden weitere neun ApoE^{-/-} und elf ApoE^{-/-}.CD84^{-/-} Mäuse verwendet, auf *High Fat Diet* gesetzt und deren Aortenwurzeln im Anschluss immunhistochemisch analysiert.

Auch nach 16-wöchiger Diät waren signifikante Unterschiede bezüglich der Größe atherosklerotischer Plaques insgesamt (p=0,0068) erkennbar.

Der Anteil an Plaquemakrophagen war in den ApoE^{-/-}.CD84^{-/-} Tieren ebenfalls erniedrigt (p=0,0303). Bezüglich des Anteils des Kollagens (*Picrosirius red*) (p=0,5436), des nekrotischen Kerns (p=0,2138) sowie des Gehalts an glatten Muskelzellen (gegen α -*smooth muscle actin*) (p=0,0982) ergab die Analyse keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Genotypen (s. Abbildung 11).

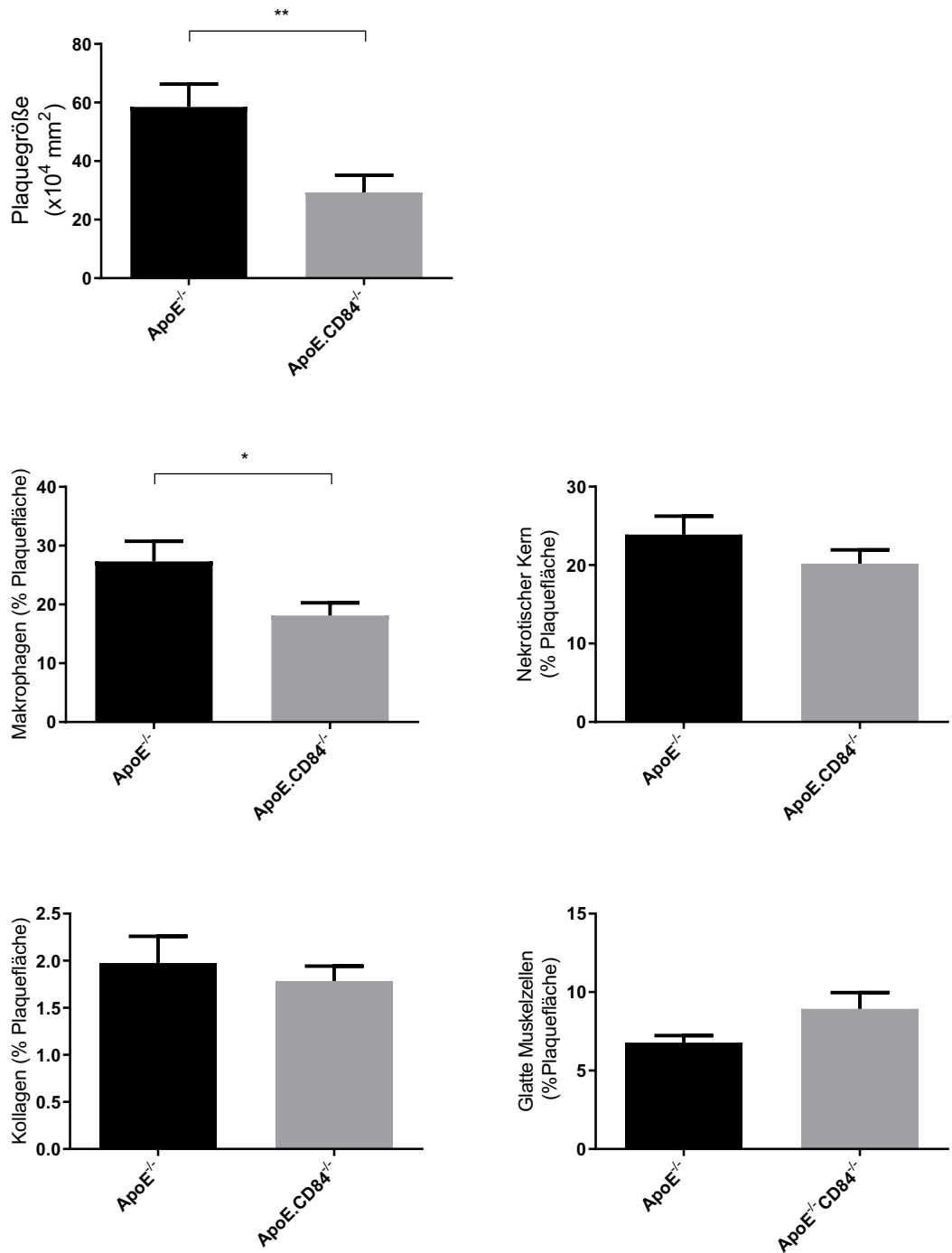


Abbildung 11: Ausmaß der Atherosklerose sowie der Anteil an Makrophagen, des nekrotischen Kernes, des Kollagens und glatten Muskelzellen innerhalb der atherosklerotischen Plaque in ApoE^{-/-}-Mäusen nach **16 Wochen** HFD. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert ± SEM (n= 9 ApoE^{-/-} und 11 ApoE.CD84^{+/-} Mäuse), *p≤ 5%, **p≤ 1%.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich bei ApoE^{-/-}.CD84^{-/-}, verglichen mit ApoE^{-/-} Mäusen, die sich acht und 16 Wochen auf *High Fat Diet* befanden eine signifikant geringere Plauefläche ausbildet. Darüber hinaus kann gezeigt werden, dass prozentual weniger Makrophagen innerhalb dieser atherosklerotischen Plaques akkumulieren.

4.2 Zellviabilität von Makrophagen

Durch den Zellviabilitätsassay kann der Unterschied in der Proliferations- und Überlebensrate zwischen B6 und B6.CD84^{-/-} Makrophagen mittels der Stimulation mit CHX als Kontrolle des Zelltods und oxLDL analysiert werden. Die Anwesenheit des oxLDL soll bei den Makrophagen eine Situation simulieren, die im Rahmen der Atherogenese ebenfalls existent ist, Makrophagen aktiviert und zur verstärkten Expression spezifischer Rezeptoren anregt. Cycloheximid (CHX) wirkt auf der anderen Seite als Translationshemmer bei eukaryotischen Zellen und führt durch Unterbinden der Proteinbiosynthese an den Ribosomen zur Wachstumshemmung und zum Absterben der Zellen (Hansson & Libby, 2006).

Nach der Kultivierung der Makrophagen aus dem Knochenmark der Tiere und der Inkubation mit den beschriebenen Substanzen und Dosierungen für 24 Stunden, wurde der Lebendzellanteil der untersuchten Makrophagen, wie oben beschrieben, im ATP-Lumineszenz-Assay nach der Zugabe von *CellTiter-Glo* mittels des ELISA *microplate readers* ermittelt.

Die Zellviabilität korreliert dabei stark mit der metabolischen Aktivität und damit dem ATP-Gehalt der Zellen. Der Nachweis der Zellvitalität bestimmter Zellen beruht auf dem Gehalt von ATP im Zellinneren. Die Stärke der Lumineszenz korreliert wiederum direkt mit dem ATP-Gehalt aus den Zellen (Posimo et al., 2014).

Erkennbar ist, dass der Lebendzellanteil unter dem Einfluss von CHX sowohl bei WT- als auch CD84^{-/-}-Makrophagen abnimmt, sodass bei einer Konzentration 10 µg/ml etwa ein Viertel und bei 20 µg/ml fast keine Zelle überlebt.

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in dem Lebendzellanteil an Makrophagen weder bei einer Dosis von 10 µg/ml (p=0,1339) noch von 20 µg/ml (p=0,7106) CHX zwischen den beiden untersuchten Genotypen.

Unter dem Einfluss von 10µg/ml oxLDL ist kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Genotypen erkennbar (p=0,1602). Es ist geringer Anstieg des Lebend-

zellanteils sowohl bei den WT ($101,3 \pm 5,111$, $n=3$ Mäuse pro Gruppe) als auch bei den $CD84^{-/-}$ -Makrophagen ($115,1 \pm 6,174$, $n=3$ Mäuse pro Gruppe).

Bei einer Konzentration von $50\mu\text{g/ml}$ ist ebenfalls eine Zunahme des Lebendzellanteils bei WT-Makrophagen ($141,7 \pm 11,13$, $n=3$ Mäuse pro Gruppe) und $CD84^{-/-}$ -Makrophagen ($123,0 \pm 4,151$, $n=3$ Mäuse pro Gruppe) erkennbar, sodass sich eine angedeutete positive Korrelation der Zellzahlen mit der Dosis des oxLDL, nicht jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen zeigt ($p=0,1907$) (s. Abbildung 12).

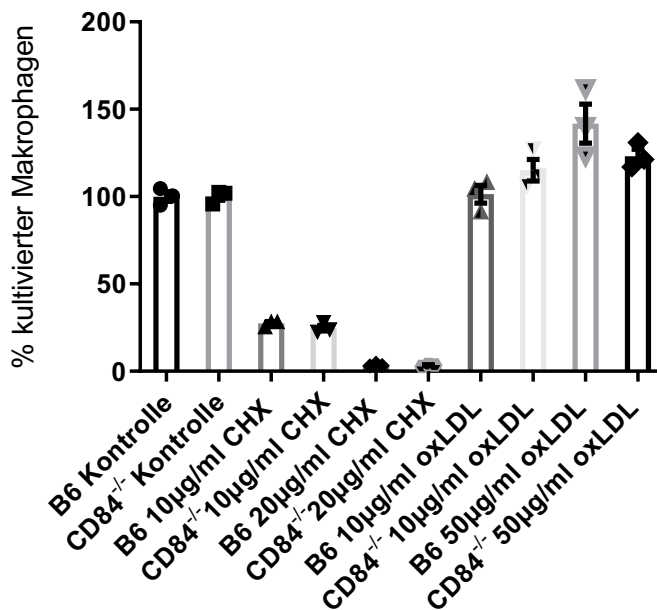


Abbildung 12: Zellviabilität von $CD84^{-/-}$ und WT-Makrophagen unter Stimulation mit 10 und 20 $\mu\text{g/mL}$ CHX sowie mit 10 und 50 $\mu\text{g/mL}$ oxLDL. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm SEM ($n=3$ Mäuse pro Gruppe).

Die Ergebnisse zeigen keine signifikanten Differenzen hinsichtlich des Zelltods und der Überlebensrate sowie der durch oxLDL induzierten Proliferationsrate der untersuchten Zellen zwischen $CD84^{+/+}$ und $CD84^{-/-}$ Makrophagen.

4.3 Hintergliedmaßen-Ischämiemodell

Um der Frage nachzugehen, ob und inwieweit CD84 einen Einfluss auf die Rekrutierung inflammatorischer Immunzellen unter akuter Entzündung hat, wurde das Hintergliedmaßen-Ischämiemodell mit unterbundener Oberschenkelarterie (*Arteria femoralis*) als *in vivo* Modell angewandt. Aus der induzierten Ischämie der Unterschenkelmuskula-

tur der Tiere resultiert eine Infiltration des entzündeten Gewebes von Immunzellen aus der Blutzirkulation, welche mit einer spezifischen Charakteristik hinsichtlich der Abfolge und Intensität der Akkumulation umschriebener immunzytologischer Phänotypen im extravasalen Gewebe einhergeht (Cochain et al., 2010).

Für das Experiment der 24-stündigen Ischämie wurden 11 WT (B6) und 11 CD84-Knockout (B6.CD84^{-/-}) herangezogen und im Alter von acht bis elf Wochen einer Arterienligatur der Oberschenkelarterie einer hinteren Extremität der Tiere unter Narkose unterzogen. Für das Experiment der 72-stündigen Ischämie wurden 10 WT und 10 CD84^{-/-} Tiere verwendet.

Zu beiden Zeitpunkten wurde das Blut, der ischämische und der nicht-ischämische Muskel der Mäuse extrahiert, das Muskelgewebe enzymatisch verdaut und die Zellen mittels Durchflusszytometrie auf ihre Zellzusammensetzung analysiert.

Die Mäuse zeigen 24 Stunden nach der Operation keine Unterschiede hinsichtlich der im Blutkreislauf zirkulierenden Immunzellzahlen im Verhältnis zu CD45⁺ Leukozyten zwischen WT und CD84^{-/-} Mäusen.

Dies gilt für die ermittelten Zellzahlen der Ly6G⁺ neutrophilen Granulozyten (p=0,0683), der CD11b⁺CD115⁺Ly6C^{high} (p=0,6296) und CD11b⁺CD115⁺Ly6C^{low} Monozyten (p=0,6695).

Es können jedoch sowohl mehr CD3⁺CD4⁺ (p=0,0059) als auch CD3⁺CD8⁺ T-Zellen (p=0,002) im Blut der CD84-defizienten Mäuse beobachtet werden (s. Abbildung 13).

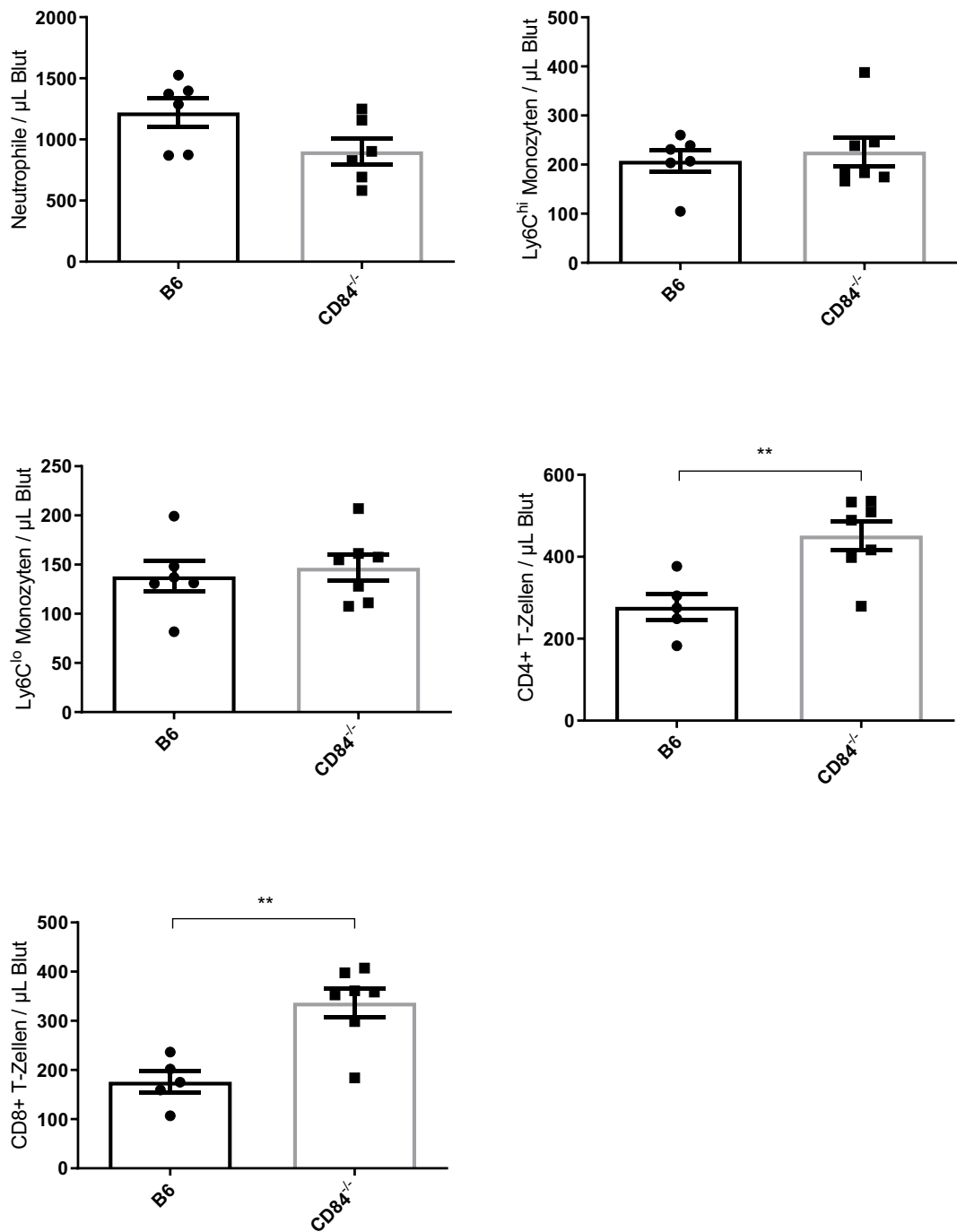


Abbildung 13: Immunzellzahlen im Blut der Mäuse 24 Stunden nach operativem Eingriff. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm SEM (n=5 B6 und 7 CD84^{-/-} Mäuse), **p \leq 1%.

Während im ischämischen und nicht-ischämischen Muskelgewebe der Hintergliedmaßen bezüglich der Rekrutierung von Ly6G⁺ neutrophilen Granulozyten (p=0,2169) oder CD3⁺ T-Zellen (p=0,3088) kein Unterschied zwischen WT und CD84-defizienten Tieren zu erkennen war, gab es hingegen eine verminderte Zellrekrutierung von proinflammatorischen CD11b⁺CD115⁺Ly6C^{high} Monozyten (p=0,0176) in den ischämischen Muskel von CD84-Knockout Mäusen 24 Stunden nach dem Operativen Eingriff (s. Abbildung 14).

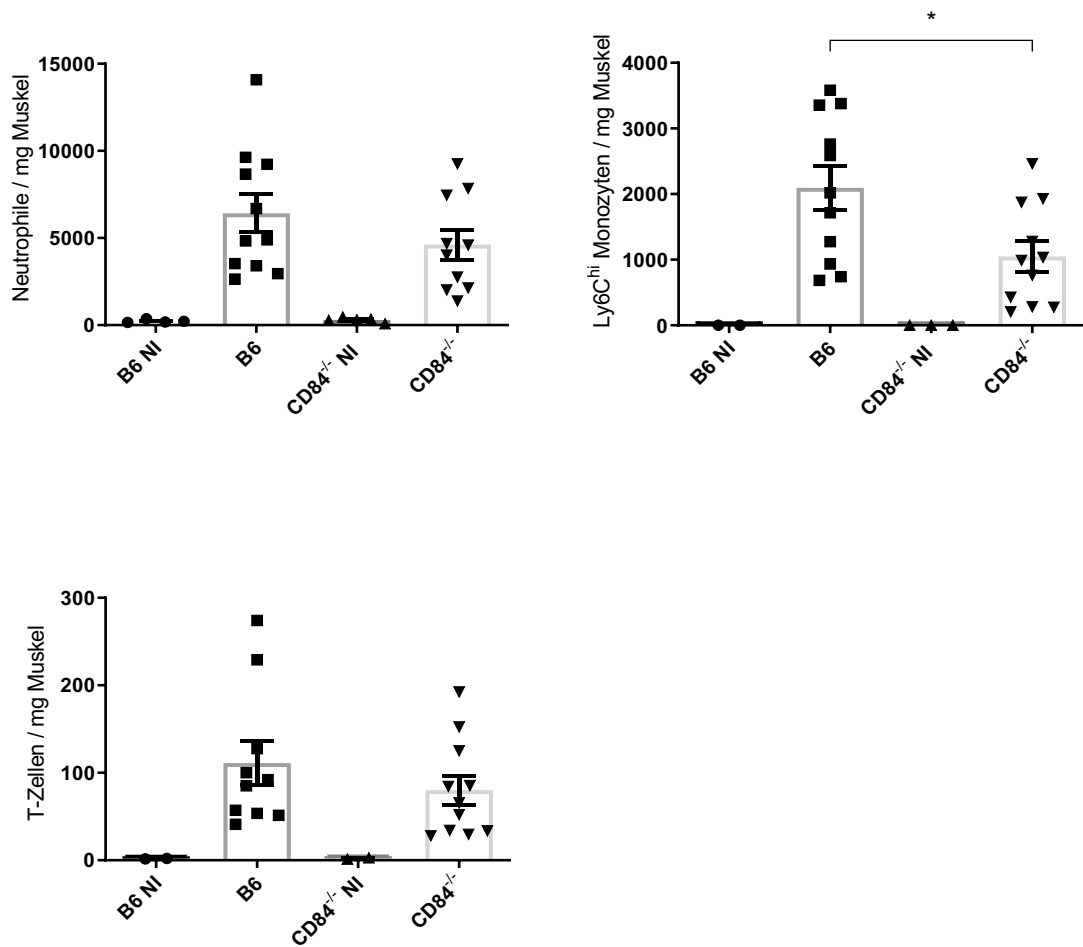


Abbildung 14: Immunzellzahlen im ischämischen und nicht-ischämischen Muskel der Hintergliedmaßen **24 Stunden** nach operativem Eingriff. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert ± SEM (n=11 B6 und 11 CD84^{-/-} Mäuse), *p≤ 5%.

Bei Mäusen 72 Stunden nach Anlage einer Ligatur, waren im Blut der Mäuse keine Zellzahlunterschiede für Ly6G⁺ neutrophile Granulozyten (p=0,4373), CD3⁺ T-Zellen (p=0,0713), Ly6C^{high} (p=0,4425) oder Ly6C^{low} (p=0,4732) zwischen WT und CD84-defizienten Mäusen erkennbar (s. Abbildung 15).

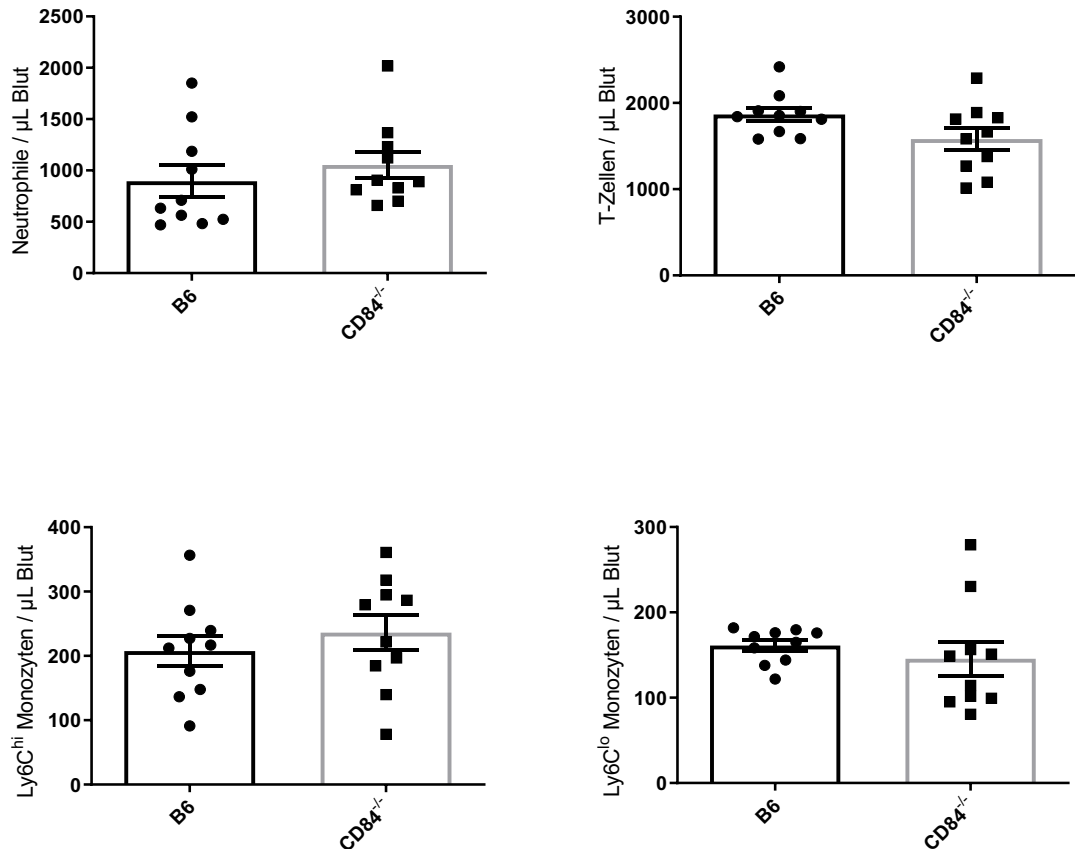


Abbildung 15: Immunzellzahlen im Blut der Mäuse **72 Stunden** nach operativem Eingriff. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm SEM (n=10 Mäuse pro Gruppe).

Auch im Muskelgewebe der Mäuse 72 Stunden nach Induktion einer Ischämie konnten weder für Ly6G⁺ Neutrophile (p=0,0786), CD3⁺ T-Zellen (0,3894) oder Ly6C^{high} Monozyten (p=0,9349) unterschiedliche Zellzahlen zwischen den beiden untersuchten Genotypen beobachtet werden (s. Abbildung 16).

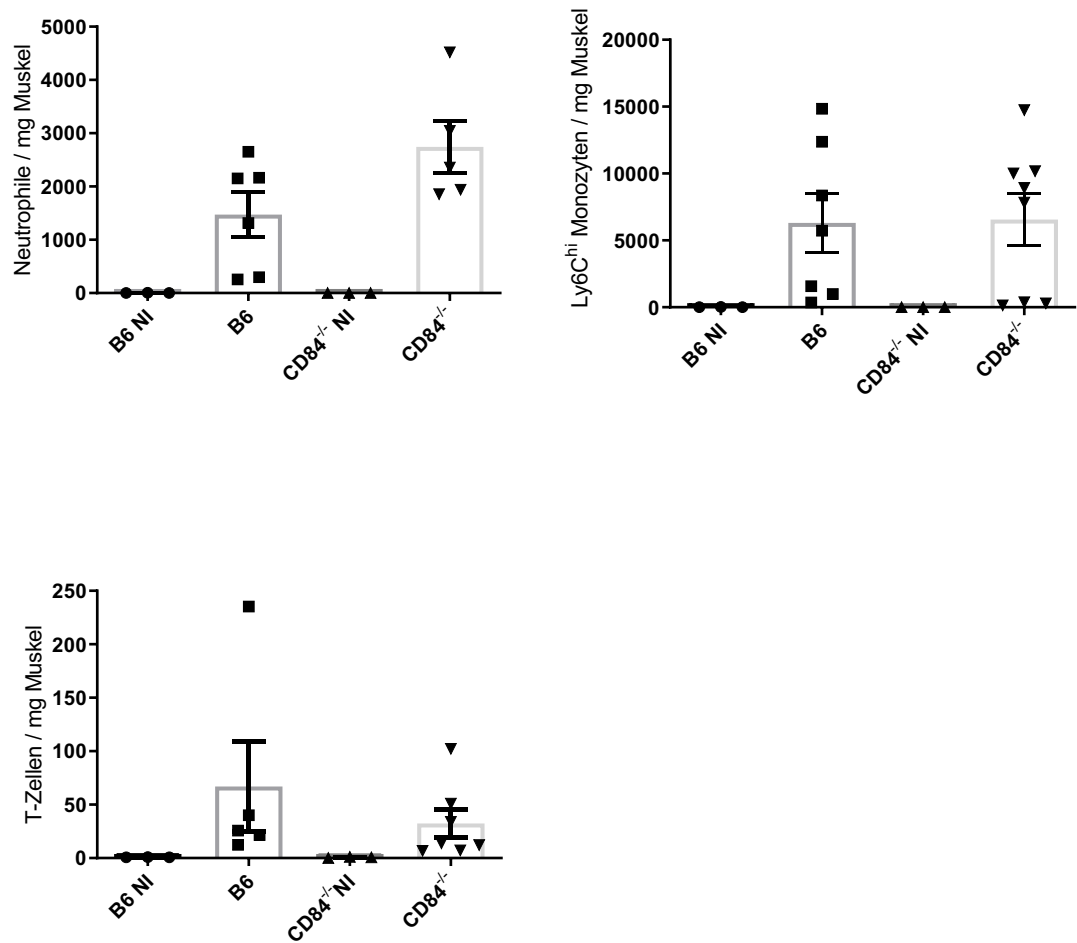


Abbildung 16: Immunzellzahlen im ischämischen und nicht-ischämischen Muskel der Hintergliedmaßen **72 Stunden** nach operativem Eingriff. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm SEM (n=6-8 Mäuse pro Gruppe).

In der Zusammenschau der präsentierten Ergebnisse des Hintergliedmaßen-Ischämie Modells lässt sich erkennen, dass bei Abwesenheit von CD84-Molekülen 24 Stunden nach Induktion der Ischämie, also zu einem sehr frühen Zeitpunkt des Entzündungsprozesses, eine geringere Rekrutierung von proinflammatorischen CD11b⁺CD115⁺Ly6C^{high}-Monozyten in das ischämische Gewebe der Tiere stattfindet. Nach 72 Stunden hingegen ist bei Abwesenheit von CD84 keine veränderte Immunzellrekrutierung erkennbar.

4.4 *Air Pouch*-Modell für Zellrekrutierung

Um weiteren Aufschluss über die Rolle von CD84 bei der Rolle der Immunzellrekrutierung in definierten Arealen unter inflammatorischen Bedingungen zu erhalten, wurde den jeweils neun bis zehn zu untersuchenden normal gefütterten B6.CD84^{-/-} sowie den B6-Kontroll-Tieren ein subkutanes Luftpolster mit 3-5 mL steriler Luft angelegt, in welches an Tag drei eine Reinjektion von 3 mL steriler Luft vorgenommen wurde, um die Manifestation des Luftpolsters zu gewährleisten. In dieses Luftpolster konnte dann an Tag fünf eine Injektion von 50 ng/ml murinem TNF α verdünnt in 1 mL sterilem PBS durchgeführt werden.

Dieser proinflammatorische Reizstoff provoziert wiederum eine akute Immunantwort in dem Tier, was letztendlich in einer Infiltration des entzündeten Bereichs durch zirkulierende Immunzellen resultiert (Duarte, Vasko, & Fehrenbacher, 2016).

24 Stunden nach dieser Maßnahme wurde das Luftpolster (*Air Pouch*) mit 3ml PBS gespült und die Anzahl sowie der Anteil der jeweiligen Populationen an rekrutierten Immunzellen aus dem subkutanen Luftpolster mittels FACS analysiert.

Während sich in dem *Pouch* ohne Chemoattraktans so gut wie keine Zellen befanden (Daten werden aufgrund der zu geringen Zellzahlen nicht präsentiert), konnte man in der Spülflüssigkeit des Luftpolsters, welches mit TNF- α behandelt wurde, einen deutlichen Anstieg an Immunzellen erkennen.

Die Analyse des Aspirats ergab keinen signifikanten Unterschied in den Zellzahlen der rekrutierten Immunzellen in das Luftpolster 24 Stunden nach der Injektion des inflammatorisch wirksamen Chemokins TNF- α .

Weder hinsichtlich der rekrutierten CD11b⁺CD115⁺ Monozyten (p=0,7991), CD11b⁺F4/80⁺ Makrophagen (p=0,2666), Ly6G⁺ Neutrophilen (p=0,4804), noch der CD3⁺ T-Zellen insgesamt (p=0,6536), der CD3⁺CD4⁺ (p=0,9286) oder CD3⁺CD8⁺ T-Zellen (p=0,2731) zeigten sich Unterschiede in Hinblick auf die Immunzellrekrutierung zwischen B6 und CD84^{-/-} Tieren (s. Abbildung 17).

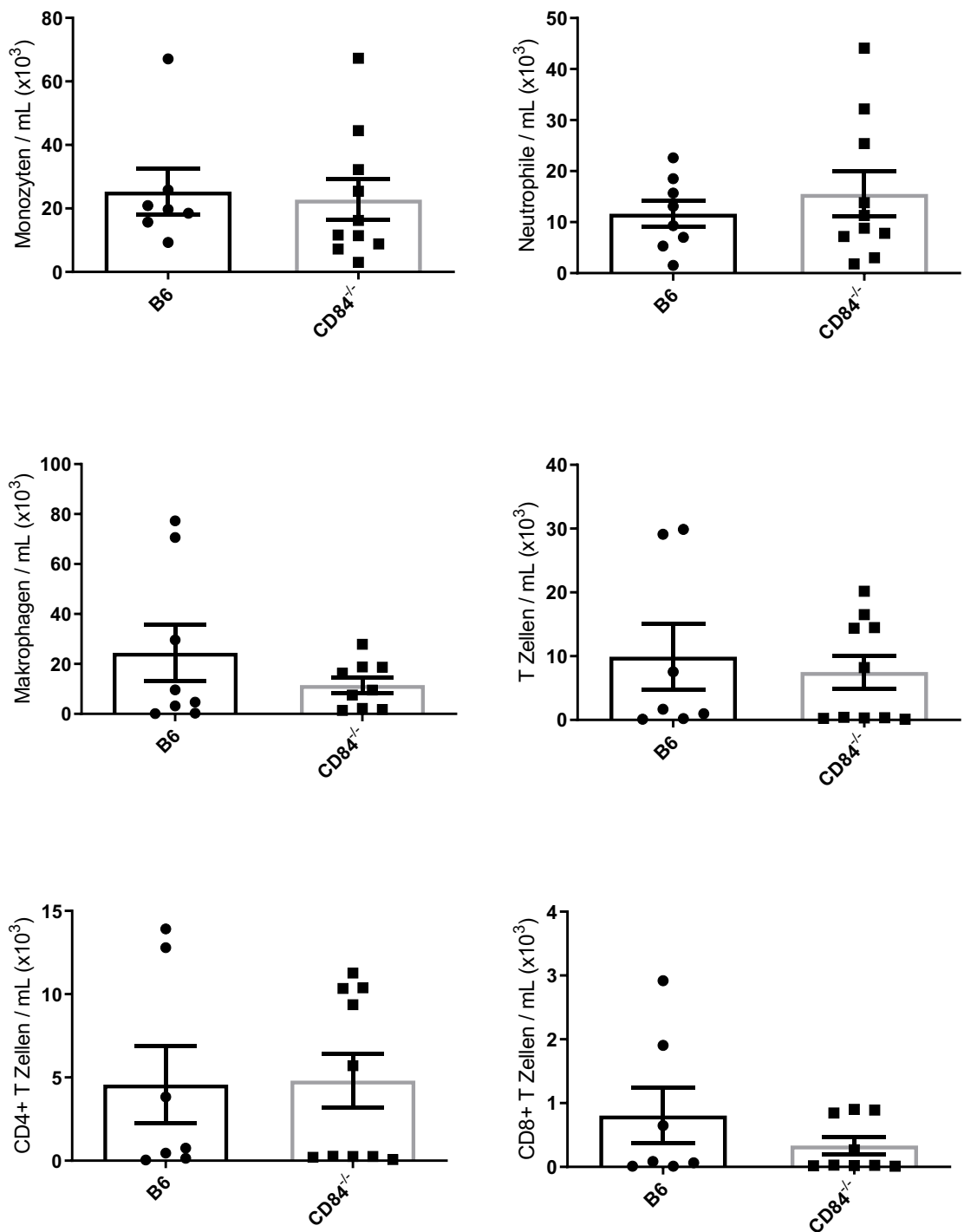


Abbildung 17: Zahlen der Zellpopulationen innerhalb des subkutanen Luftpolsters 24 Stunden nach Injektion von 50 ng TNF- α . Die Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm SEM (n=7 B6 und 10 CD84^{-/-} Mäuse).

Zusammenfassend zeigt sich im Rahmen des *Air-Pouch*-Modells keine veränderte Immunzellrekrutierung bei Abwesenheit von CD84 zu einem Zeitpunkt von 24 Stunden nach der Etablierung des inflammatorischen Zustandes. Dies gilt sowohl für die Rekrutierung von CD11b⁺CD115⁺ Monozyten, CD11b⁺F4/80⁺ Makrophagen, Ly6G⁺ Neutrophile und CD3⁺ T-Zellen in das subkutane Luftpolster der Tiere.

4.5 Adhäsion von Monozyten *in vitro*

Die Adhäsion verschiedener Immunzellen aus der Blutzirkulation an das Gefäßendothel kann *in vitro* mithilfe einer Flusskammer unter physiologischen laminaren Flussbedingungen sichtbar gemacht und analysiert werden.

Durch die Verwendung von einerseits Wildtyp- und andererseits CD84^{-/-} CD115⁺Ly6G⁻ Monozyten innerhalb des Flusssystems, können Rückschlüsse auf die direkte oder indirekte Funktion des CD84 in dem Prozess der Adhäsion gezogen werden.

Die isolierten Monozyten aus dem Knochenmark der Tiere wurden durchflusszytometrisch auf ihren Anteil an CD115⁺Ly6G⁻ Zellen überprüft. Diese Analyse wurde vor jedem Flussversuch mit den isolierten Zellen wiederholt, wobei sich in jedem Versuch ein prozentualer Anteil von über 80% zeigte (Abbildung 18).

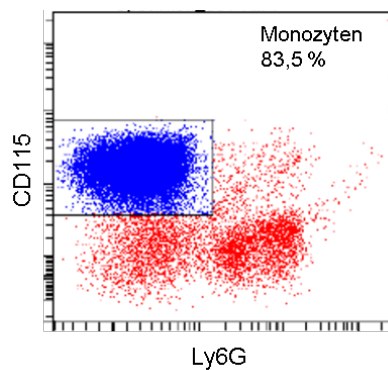


Abbildung 18: Durchflusszytometrische Analyse der CD115⁺Ly6G⁻ Monozyten nach Isolation der Zellen aus dem Knochenmark.

Ein Teil der mit Zellen aus der b.End5-Endothelzellreihe kultivierten μ -Slides I^{0,4} Luer wurden einen Tag vor Versuchsdurchführung mit TNF- α (10 ng/mL) über Nacht inkubiert (Manthey et al., 2013), der andere Teil wurde unbehandelt gelassen.

TNF- α kann als Zytokin diverse Signalwege aktivieren, etwa den NF- κ B-Signalweg und dadurch für eine Vermittlung und Verstärkung von Entzündungsreaktionen sorgen (Tedgui & Mallat, 2006).

Für den Versuchsaufbau wurde ein Flusssystem gewählt, welches den physiologischen Blutfluss zu imitieren vermag. Dafür wurden aus dem Knochenmark isolierte Monozyten nach Stimulation mit Magnesium- und Calciumionen in einer 1 mM Endkonzentration in einer Konzentration von $4,1 \times 10^5$ Zellen/mL mittels des *Ibidi Pump Systems* für fünf Minuten und einem eingestellten *Shear stress* von 1.5 dynes/cm² bei einer Temperatur von 37 °C perfundiert. In der Flusskammer konnte das Endothel, sowie die mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) gelabelten vorbeiströmenden, rollenden sowie adhärenen CD115⁺Ly6G⁻ Monozyten mittels einer Kamera sichtbar gemacht (s. Abbildung 19) und die adhärenen Zellen anhand der aufgenommenen Bilder manuell ausgezählt werden.

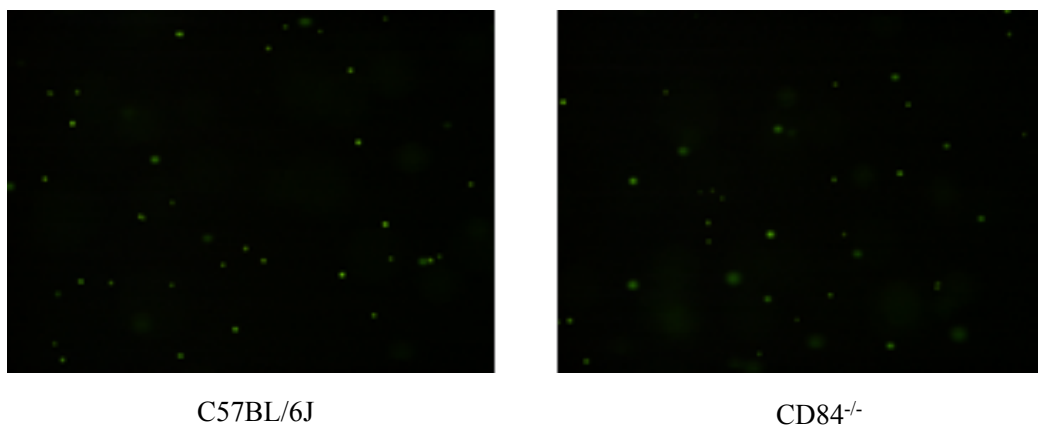


Abbildung 19: Adhärenente CFSE-markierte Monozyten fünf Minuten nach dem Start des Flusses.

Erkennbar war, dass Monozyten auf dem nicht stimulierten Endothel kaum bis gar nicht, auf dem mit 10 ng/mL TNF- α für 24 Stunden stimulierten Endothel hingegen adhären. Dabei war eine signifikant stärkere Adhäsion an das stimulierte Endothel bei B6-Monozyten ($p < 0,0001$) und CD84^{-/-}-Monozyten ($p = 0,0078$), als an das unstimulierte Endothel erkennbar.

Es konnte auf dem stimulierten Endothel keine signifikant veränderte Rate an adhärenen Monozyten aus CD84^{-/-} Mäusen ($p = 0,0533$) an das Endothel 5 Minuten nach dem Start des Flusses beobachtet werden (s. Abbildung 20).

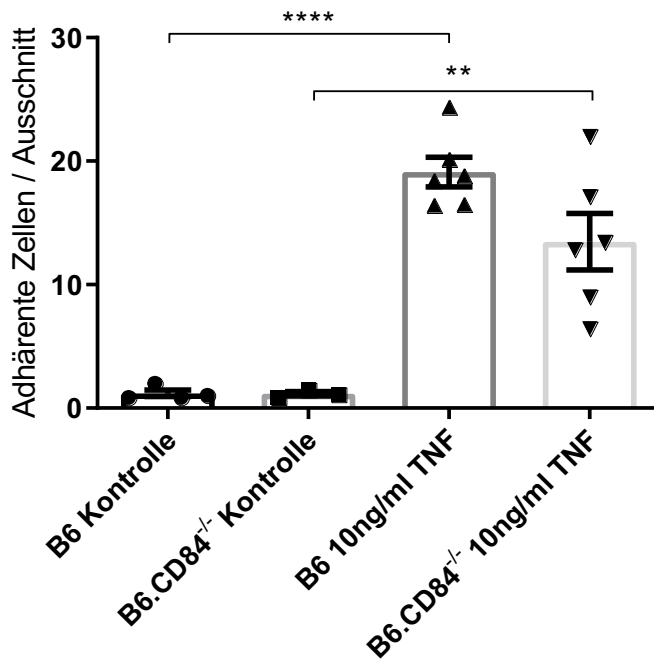


Abbildung 20: Adhärente Monozyten beider untersuchter Genotypen an das unstimulierte und stimulierte Endothel 5 Minuten nach Start des Flusses. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm SEM (n=6 Mäuse und Einzelversuche pro Gruppe), **p \leq 1%, ****p \leq 0,01%.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass sich keine signifikante Differenz in Hinsicht auf die Adhäsion von zirkulierenden Monozyten an das mit TNF- α stimulierte Endothel innerhalb der Flusskammer zeigt.

4.6 Chemotaktische Transmigration von Monozyten *in vitro*

Die Fähigkeit zur chemotaktischen transendothelialen Migration von CD115⁺ Monozyten wurde mittels des Migrations-Assays und des Lumineszenz-ATP-Assays *in vitro* untersucht.

Dafür wurden Monozyten mittels des *Monocyte Isolation Kits* aus dem Knochenmark der Tiere isoliert. Die Boyden-Kammern wurden alsdann in einer 24-well-Platte bereit. Pro Tier wurden fünf Wells mit jeweils 500 μ l RPMI und 0,5% BSA befüllt, drei davon beinhalteten das Zytokin CC-Chemokinligand 2 (CCL2), auch bekannt als *Monocyte Chemotactic Protein 1* (MCP-1), in einer Konzentration von 20 ng/mL als Chemoattraktans. CCL2 kann von Immunzellen sezerniert werden und hat einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen, indem es zur

Transmigration adhärenter Monozyten in den subendothelialen Raum beiträgt (Lin, Kakkar, & Lu, 2014; Luscinskas et al., 2000; Zerneck & Weber, 2014).

Zwei Wells der Boyden-Kammer wurden als Kontrolle herangezogen und ein *Well* als Total-Bezugswert mit 1×10^5 Monozyten in 500 μ l RPMI und 0,5% BSA befüllt. Die Kammern wurden durch eine nicht beschichtete Polyethylenterephthalat (PET) Membran mit einer Porengröße von 5 μ m getrennt. Die Zellen wurden nun für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Inserts wurden entfernt, 250 μ l *CellTiter-Glo* pro *Well* hinzugegeben, für 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt, wodurch die Zellen lysiert wurden und das intrazelluläre ATP freigesetzt werden konnte und im Anschluss in einer *96-Well White Solid* Platte in einem ELISA *microplate reader* auf den Anteil der migrierten Zellen, basierend auf dem ATP-Gehalt, untersucht.

Die gemessene Stärke der Lumineszenz im Lumineszenz-ATP-Assay korreliert direkt mit dem ATP-Gehalt und damit mit dem Lebendzellanteil, das heißt im vorliegenden Fall, mit den durch die Porenmembran in die untere Kammer migrierten Zellen.

Ohne Zugabe des Zytokins CCL2 bzw. MCP-1 in einer Konzentration von 20 ng/mL konnten innerhalb der gegebenen Zeit von vier Stunden in beiden Gruppen unter 4%, der in die obere Kammer gegebenen Monozyten migrieren (B6: $3,785 \pm 0,4938$, n=4 Mäuse, CD84^{-/-}: $3,889 \pm 0,2928$, n=4 Mäuse).

Mit Zugabe des Zytokins waren es in beiden Fällen über 8 bzw. 9% der Monozyten (B6: $9,244 \pm 0,6365$, n=12 Mäuse, CD84^{-/-}: $8,222 \pm 0,4623$, n=12 Mäuse).

Im Vergleich mit und ohne Zugabe des Chemokins CCL2 gab es also sowohl bei CD84-positiven Monozyten (p=0,0003) als auch bei CD84-defizienten Monozyten (p=0,0001) einen signifikanten Unterschied hinsichtlich ihrer Transmigration.

Ein signifikanter Unterschied zwischen dem Anteil an Monozyten, welche für CD84 defizient sind und WT-Monozyten konnte hingegen nicht detektiert werden. Das gilt sowohl für die Transmigration ohne (p=0,8628) als auch mit Zugabe von CCL2 (p=0,2077) (s. Abbildung 21).

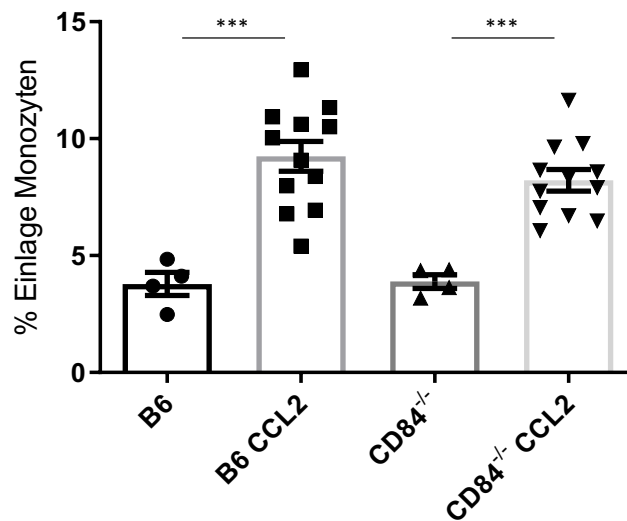


Abbildung 21: Transmigration innerhalb der Boyden-Kammer jeweils ohne und mit Zugabe von CCL2. Anteil migrierter Zellen zwischen CD84^{-/-}-Monozyten und B6 Monozyten. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm SEM (n=4 B6 und 12 CD84^{-/-} Mäuse), ***p \leq 0,1%.

Summa summarum ist im Rahmen des Transmigrationsversuchs mit Hilfe der Boyden-Kammer keine veränderte Transmigration von Monozyten, denen CD84-Moleküle auf der Zelloberfläche fehlen, ersichtlich.

4.7 Gemischte Knochenmarkchimäre

Um zu untersuchen, inwieweit CD84 an der Rekrutierung von Immunzellen in die atherosklerotische Plaque beteiligt ist, wurden gemischte Knochenmarkchimären, wie bereits beschrieben, herangezogen.

Dazu wurden sechs bis acht Wochen alte Ldlr^{-/-}-Mäuse letal bestrahlt und mit jeweils 50% Knochenmarkszellen von CD84^{-/-} mit CD45.2 Genotyp und CD45.1-Wildtypzellen rekonstituiert. Nach einer Ruhezeit von vier Wochen, um die Immunrekonstitution zu ermöglichen, wurden die Tiere für acht Wochen auf eine *High Fat Diet* gesetzt.

Das Blut und die Aorten wurden im Anschluss daran extrahiert und wie beschrieben durchflusszytometrisch analysiert. Dabei konnten die vitalen Leukozyten und im Anschluss nur die Zellen des Spendertieres in die Berechnung inkludiert werden. Exkludiert wurden dabei Zellen vom Empfängertier, die CD45.1 negativ sowie CD84 positiv respektive CD45.2 positiv sowie CD84 positiv waren. Damit konnte verhindert werden, dass residente oder sich im Blutkreislauf befindende Zellen des Empfängertieres mit in die Berechnung einfließen.

Im Anschluss daran wurde wie hier dargestellt nach CD11b⁺CD115⁺ Monozyten und CD11b⁺F4/80⁺ Makrophagen und ebenfalls nach CD3⁺ T-Zellen sortiert, die daraufhin nach CD45.1- und CD45.2-Expression unterteilt werden konnten. Dies wurde für die Zellpopulationen im Blut, wie hier abgebildet für Monozyten, durchgeführt (s. Abbildung 22).

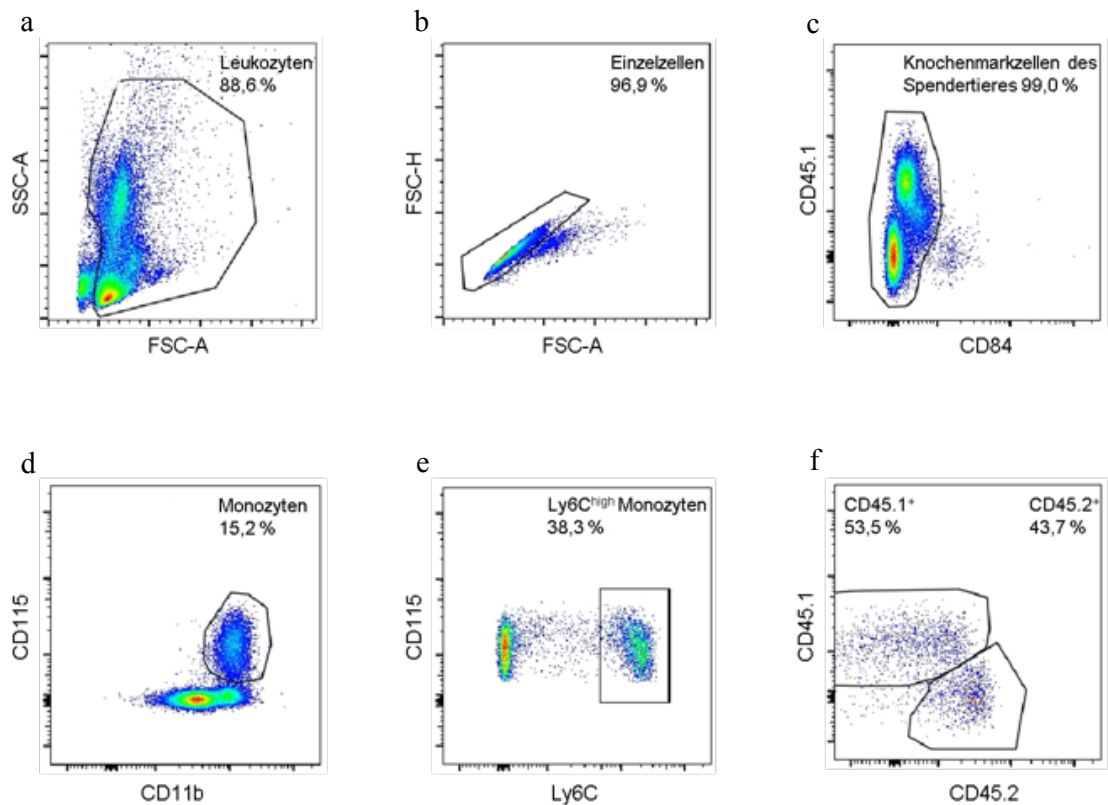


Abbildung 22: Durchflusszytometrische Analyse der Monozyten aus dem Blut. a) Zellrückstände wurden basierend auf SSC/FSC exkludiert. b) Zell-Doublers wurden mittels der Marker FSC-H/-A exkludiert. c) CD45.1⁻CD84⁺ Zellen wurden entfernt. d) CD115⁺ Monozyten wurden eingeschlossen. e) Ly6C^{high} Monozyten wurden inkludiert. f) Diese wurden in CD45.1⁺ und CD45.2⁺ Zellen aufgetrennt.

Ebenso wurden die Zellpopulationen, wie hier für die CD11b⁺F4/80⁺ Makrophagen exemplarisch dargestellt, in der Aorta der Knochenmarkchimäre durchflusszytometrisch untersucht (s. Abbildung 23).

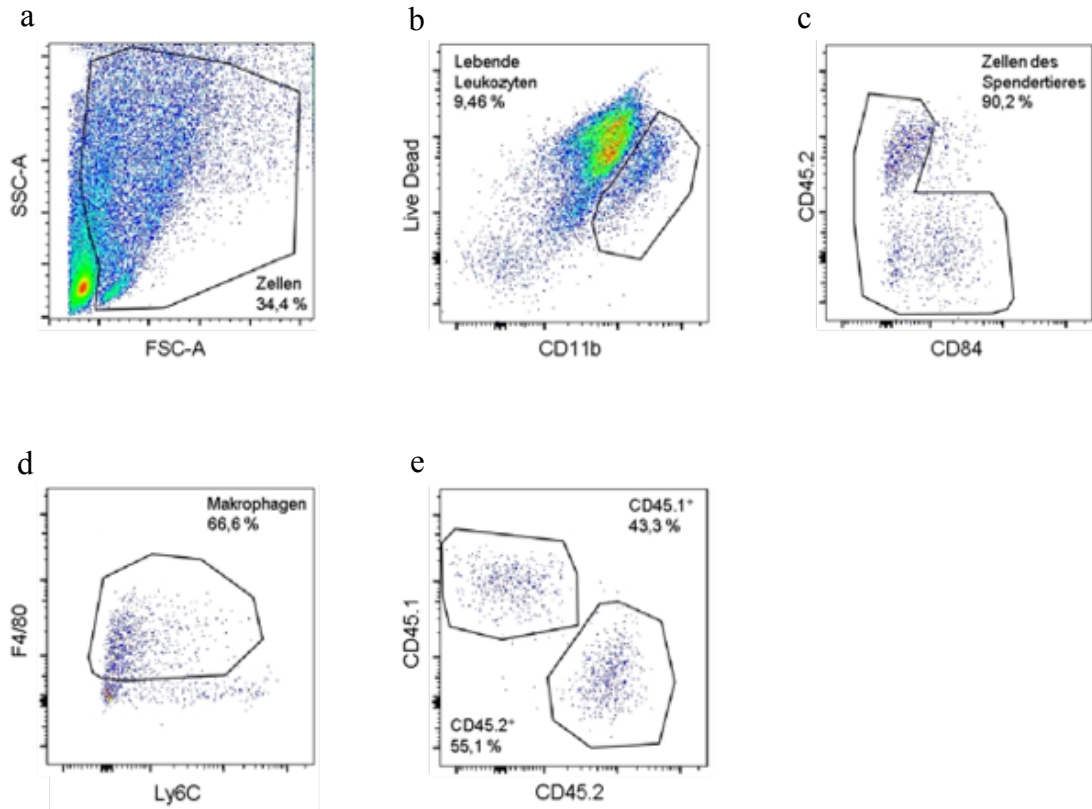


Abbildung 23: Durchflusszytometrische Analyse der Makrophagen aus der Aorta. a) Zellrückstände wurden basierend auf SSC/FSC exkludiert. b) Tote Zellen wurden exkludiert. c) CD45.2⁺.CD84⁺ wurden ausgeschlossen. d) Makrophagen wurden mittels F4/80-Marker herausgefiltert. e) Die Makrophagen wurden in CD45.1⁺ und CD45.2⁺ Zellen aufgetrennt.

Das Verhältnis des Chimärismus wurde berechnet, in dem der prozentuale Anteil der jeweiligen Zelltypen aus der Aorta durch den Anteil an Zellen in dem Blut der Tiere bestimmt wurde. Ein Wert von 1 entspricht dabei einer normalen Immunzellrekrutierung des untersuchten Zelltyps, ein Wert von >1 einer verstärkten und ein Wert von <1 einer defekten Rekrutierung der Zellen aus dem Blut in die Aorta des Tieres.

Während im Blut kein Unterschied des Anteils an CD11b⁺CD115⁺ Monozyten ($p=0,9303$) zu erkennen war, gab es im Blut der Ldlr^{-/-}-Empfängertiere signifikant mehr CD84^{-/-}-T-Zellen ($p < 0,0001$) (s. Abbildung 24).

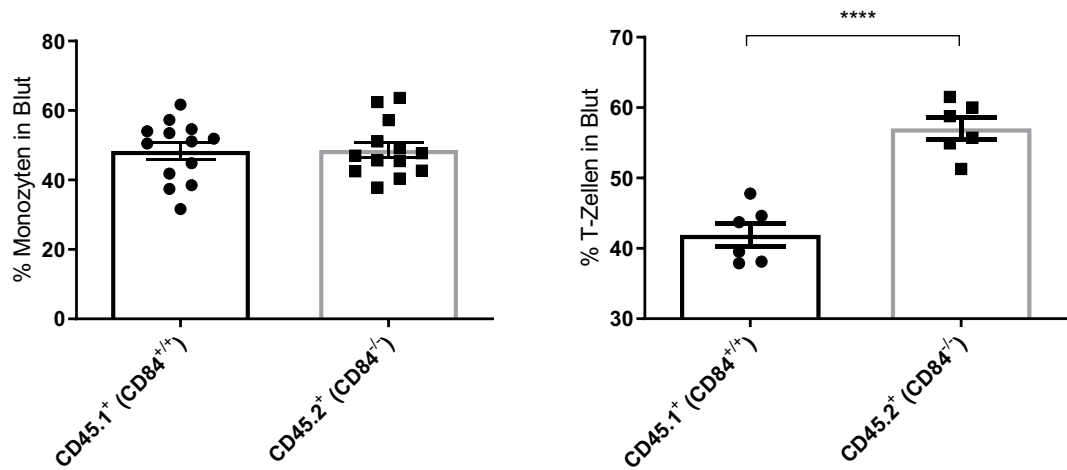


Abbildung 24: Anzahl an Monozyten und T-Zellen im Blut der Knochenmarkchimären. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm SEM (n=6-13 Mäuse pro Gruppe), ****p \leq 0,01%.

In der Aorta der Empfängertiere konnte ein ähnlicher Anteil von CD11b⁺F4/80⁺ Makrophagen der beiden Genotypen gefunden werden (p=0,3451). Im gleichen Verhältnis, in dem mehr CD84-defiziente CD3⁺T-Zellen im Blut der Mäuse gefunden wurden, konnten CD84-defiziente CD3⁺T-Zellen auch in der Aorta der untersuchten Tiere entdeckt werden (p < 0,0001) (s. Abbildung 25).

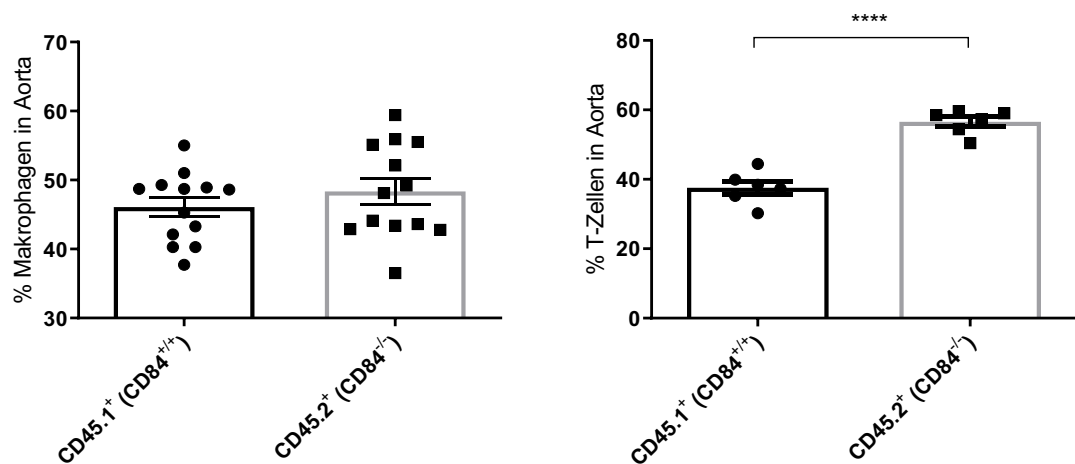


Abbildung 25: Anzahl an Monozyten und T-Zellen in der Aorta der Knochenmarkchimären. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm SEM (n=6-13 Mäuse pro Gruppe), ****p \leq 0,01%.

Der berechnete Chimärismus beträgt für CD84-defiziente CD11b⁺CD115⁺ Monozyten und CD11b⁺F4/80⁺ Makrophagen in etwa 1 ($1,007 \pm 0,04376$, n=13 Mäuse).

Dies gilt ebenfalls für CD84-positive Monozyten und Makrophagen ($0,9725 \pm 0,03723$, n=13 Mäuse). Dabei ist kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen ersichtlich (p= 0,5485).

Für CD3⁺ T-Zellen, die CD84 exprimieren ($0,9030 \pm 0,06175$, n=6 Mäuse), als auch für CD3⁺ T-Zellen, die CD84-defizient sind, ergibt sich ein Wert von knapp 1 ($0,9959 \pm 0,04261$, n=6 Mäuse).

Dabei zeigt sich auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen (p= 0,2442) (s. Abbildung 26).

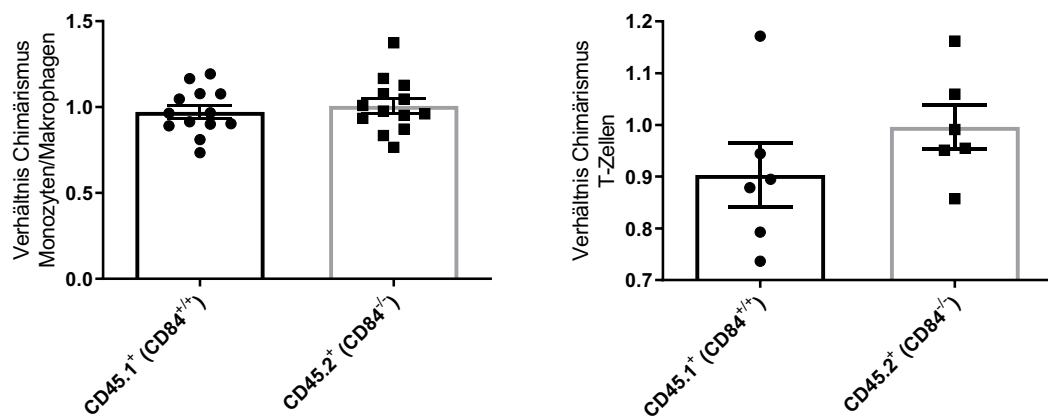


Abbildung 26: Darstellung des Verhältnisses der Zellen aus dem Blut zu Zellen in der Aorta aus CD84-positiven und CD84-defizienten Mäusen. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm SEM (n=6-13 Mäuse pro Gruppe).

In Zusammenschau der Ergebnisse lässt eine erhöhte Anzahl von CD45.2⁺ (CD84^{-/-}) T-Zellen im Blut und in der Aorta der Ldlr^{-/-} Knochenmarkchimäre erkennen.

Es lassen sich keine signifikanten Differenzen hinsichtlich der Rekrutierung zwischen den beiden untersuchten Genotypen von im Blut zirkulierenden CD11b⁺CD115⁺ Monozyten oder CD3⁺ T-Zellen in die Aorta der Tiere nachweisen.

4.8 Integrinexpression auf Monozyten

Um zu überprüfen, ob es einen Unterschied in Hinblick auf die Expression von Integrinen auf der Zelloberfläche von Monozyten aus dem Knochenmark und aus dem Blut der Tiere gibt, konnte mittels durchflusszytometrischer Analyse die mittlere Fluoreszenzintensität der mit Antikörpern markierten Integrine auf der Oberfläche der CD115⁺CD11b⁺ Monozyten ermittelt werden. Die ermittelte Fluoreszenzintensität kann dabei einen Hinweis auf die Menge der untersuchten Integrine auf der Oberfläche der Monozyten geben.

Es wurden die vier Integrine α -M (CD11b), β -2 (CD18), β -1 (CD29) und α -4 (CD49d) auf der Oberfläche von Monozyten, die aus dem Knochenmark und aus dem Blut der Tiere gewonnen wurden, untersucht.

Auf CD115⁺ Monozyten, die aus dem Knochenmark der Mäuse gewonnen wurden, konnte weder hinsichtlich der CD11b ($p=0,8771$), der CD18 ($p=0,6236$), CD29 ($p=0,062$) noch der CD49d-Integrine ($p=0,4179$) ein Unterschied der mittleren Fluoreszenzintensität zwischen den zugrundeliegenden Genotypen festgestellt werden (s. Abbildung 27).

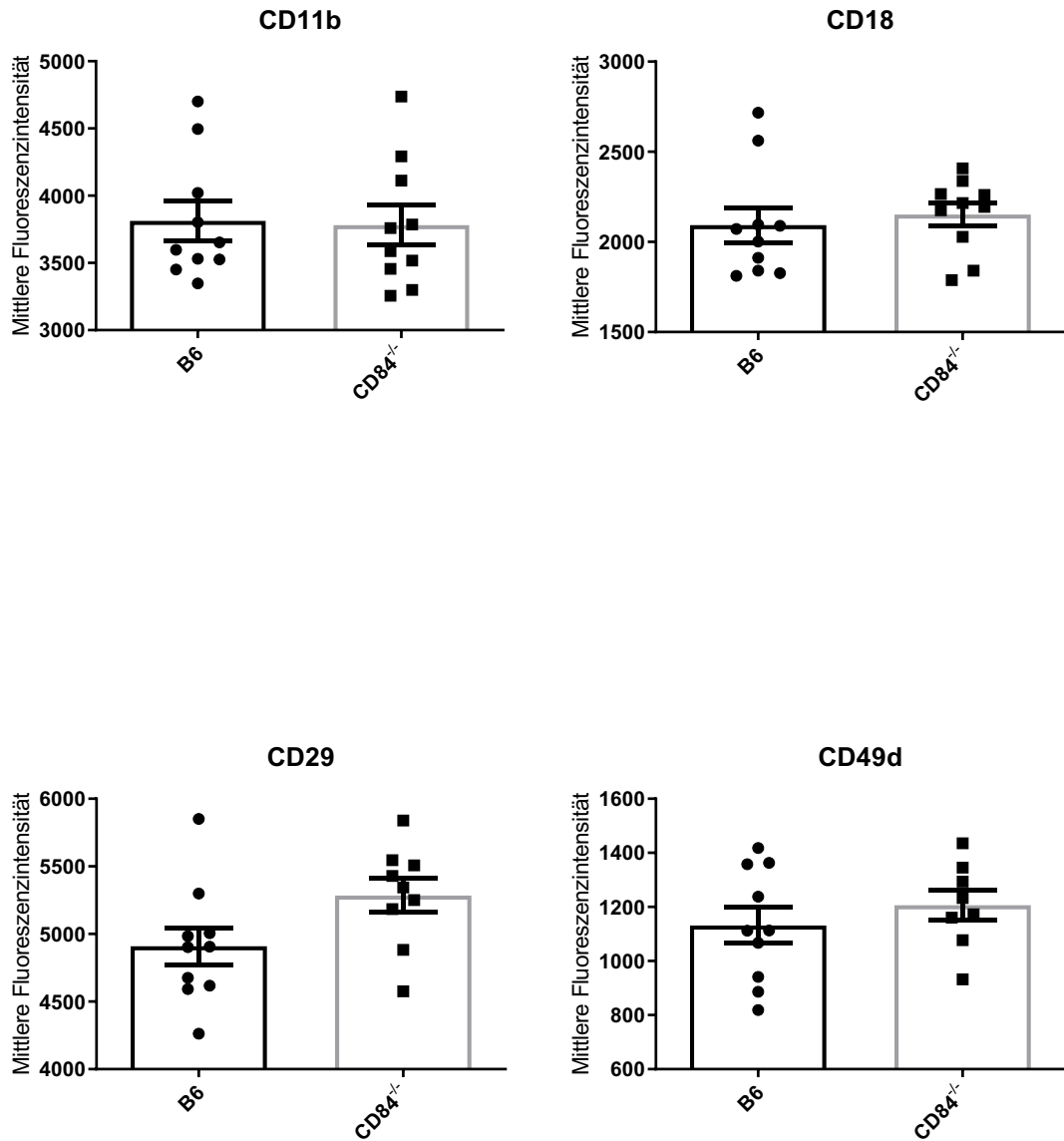


Abbildung 27: Integrinexpression auf der Zelloberfläche von Monozyten aus dem Knochenmark von B6 sowie B6.CD84^{-/-} Mäusen. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert ± SEM (n=10 B6 und 8 CD84^{-/-} Mäuse).

Auch auf CD115⁺ Monozyten von B6- und CD84^{-/-}-Mäusen, die aus dem Blut der Tiere gewonnen wurden, konnte weder hinsichtlich der CD11b (p=0,8449), der CD18 (p=0,636), CD29 (p=0,2249) noch der CD49d-Integrine (p=0,3686) ein Unterschied hinsichtlich der mittleren Fluoreszenzintensität ermittelt werden (s. Abbildung 28).

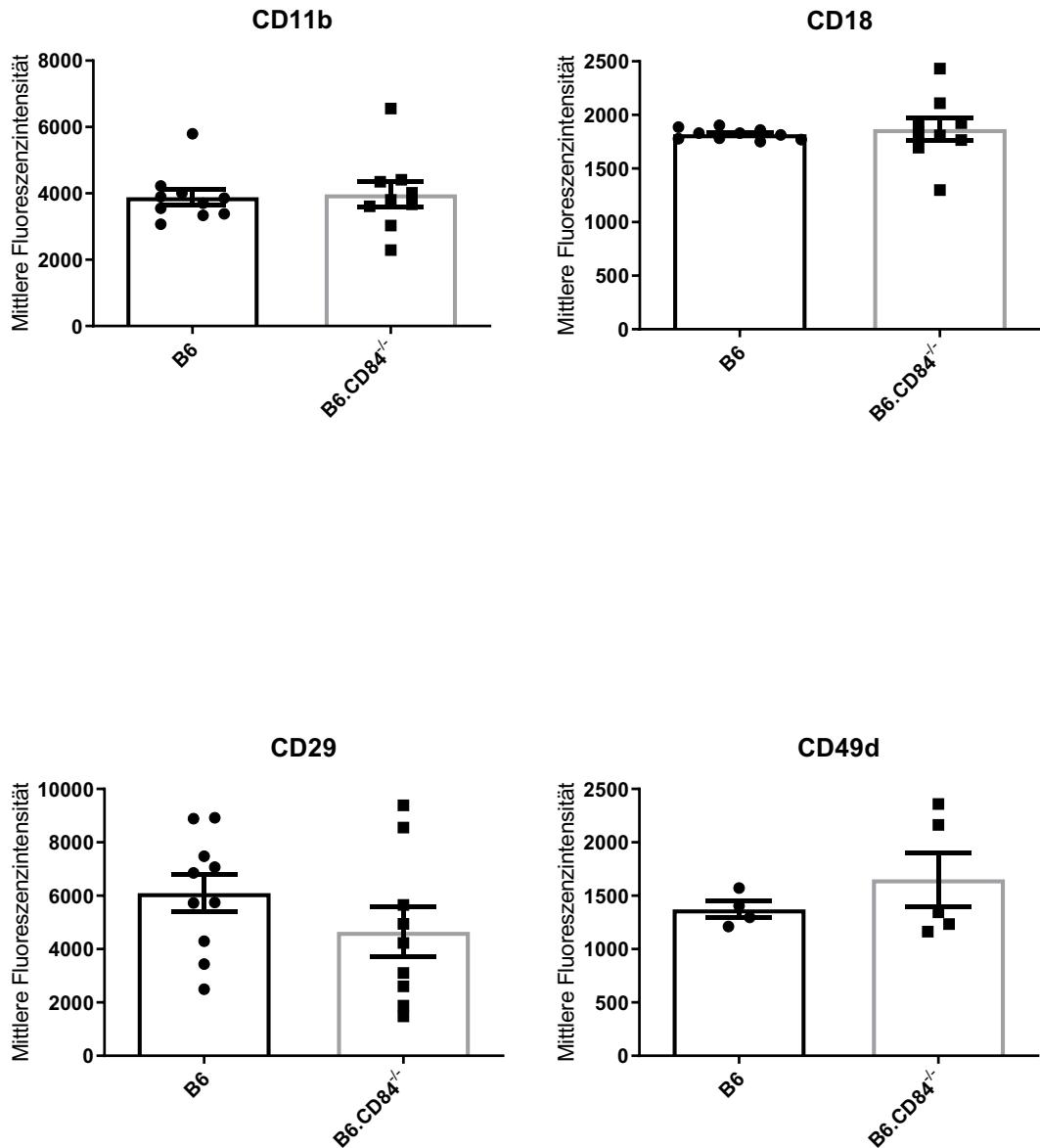


Abbildung 28: Integrinexpression auf der Zelloberfläche von Monozyten aus dem Blut von B6 sowie B6.CD84^{-/-} Mäusen. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert ± SEM (n=4-10 Mäuse pro Gruppe).

Es lässt sich also zusammenfassend keine signifikante Differenz in Hinblick auf die Expression umschriebener Integrine auf der Oberfläche der Zellen erkennen. Dies gilt sowohl für CD115⁺ Monozyten, die aus dem Knochenmark gewonnen wurden, als auch für die Monozyten aus dem Blut der Tiere.

4.9 Expression und Aktivierung von LFA-1 auf T-Zellen

Um den zellintrinsic Einfluss von CD84 auf die Aktivierung von Integrinen auf der Oberfläche von T-Zellen, insbesondere des LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen 1*), welches als Ligand für ICAM-1, -2 und -3 (*Intercellular adhesion molecule 1,2,3*) fungiert, zu überprüfen, wurde der lösliche-Ligand-basierte Adhäsions Assay (SL-AA) angewandt.

Die T-Zellen wurden aus der Milz der Tiere wie oben beschrieben gewonnen und mittels 100 IU/mL IL-2 für 48 Stunden kultiviert. Dies verursacht unter anderem die Aktivierung von T-Zellen, ist für den Erhalt von regulatorischen T-Zellen (Tregs) mitverantwortlich und für die Differenzierung von T-Zellen in definierte Effektor-T-Zellen entscheidend (Boyman & Sprent, 2012).

Daraufhin wurden die Zellen zu einem Teil mit einer Endkonzentration von 10^{-8} M PMA, 0,5 mM Mg^{2+} und 0,9 mM Ca^{2+} und zu einem anderen Teil mit 40 mM Mg^{2+} + 4 mM EGTA für jeweils 15 Minuten bei 37°C zur Aktivierung des LFA-1 und Bindung von Fluoreszenz-markierten ICAM-1-Fragmenten angeregt.

Letztlich konnte der prozentuale Anteil an T-Zellen, welche ICAM-1-Fc gebunden hatten und die mittlere Fluoreszenzintensität der Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt werden.

Bei aktivierten T-Zellen, auf denen ICAM-1-Fc gebunden wurde, konnte eine dezente, aber signifikante Differenz beobachtet werden. Dabei zeigte sich eine verminderte Bindung von ICAM-1-Fc an mit Mg^{2+} Ionen und EGTA stimulierte $CD3^{+} CD84^{-/}$ T-Zellen im Vergleich zu Wildtyp $CD3^{+}$ T-Zellen ($p=0,0497$), hinsichtlich der mittleren Fluoreszenzintensität konnte hingegen kein Unterschied gesehen werden ($p=0,2324$).

Demgegenüber zeigte sich bei mit PMA stimulierten Zellen kein Unterschied bezüglich des Anteils der $CD3^{+}$ T-Zellen, die ICAM-1-Fc gebunden hatten ($p=0,0845$), jedoch war eine signifikant geringere mittlere Fluoreszenzintensität bei $CD3^{+}CD84^{-/}$ T-Zellen erkennbar ($p=0,0293$) (s. Abbildung 29).

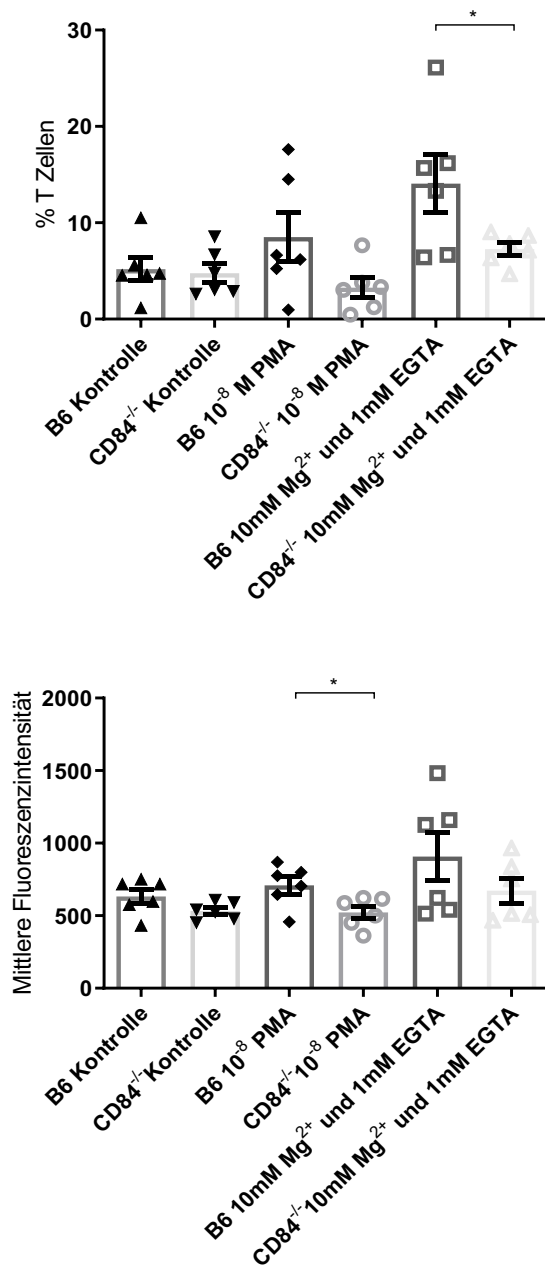


Abbildung 29: Anteil an T-Zellen, auf denen ICAM-1-Fc gebunden ist. Mittlere Fluoreszenz-Intensität als Indikator für die ICAM-1-Fc-Bindungspotenz der Zellen. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert ± SEM (n=6 Mäuse pro Gruppe), *p≤ 5%.

In Zusammenschau der Ergebnisse zeigt sich unter Stimulation mit EGTA ein geringerer prozentualer Anteil an CD3⁺CD84^{-/-} T-Zellen, die ICAM-1-Fc binden. Gleichzeitig weisen CD3⁺CD84^{-/-} T-Zellen, die mit PMA stimuliert wurden, eine signifikant geringere mittlere Fluoreszenzintensität auf.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle von CD84 im Rahmen der Atherogenese in Bezug auf die genannten Eigenschaften, insbesondere der Immunzellrekrutierung, zu spezifizieren. Aufbauend auf den Erkenntnissen, werden im Folgenden die Ergebnisse hinsichtlich der formulierten Forschungsinhalte diskutiert und die Forschungsfragen beantwortet.

Die Ergebnisse werden dabei auf ihre wichtigsten Aspekte hin untersucht und neue Erkenntnisse, Gemeinsamkeiten, Unterschiede und Limitationen basierend auf der wissenschaftlichen Literatur herausgearbeitet und interpretiert.

Dabei werden zunächst die Ergebnisse der immunhistochemischen Plaqueanalyse aus den Aorten von ApoE^{-/-} Mäusen diskutiert. Darauf folgt die Diskussion zu den Ergebnissen der Überlebensfähigkeit von Makrophagen. Die Diskussion zur Analyse der Immunzellrekrutierung unter akut-inflammatorischen und unter chronisch-inflammatorischen Bedingungen *in vivo* und *in vitro* in die Aortenwand von Ldlr^{-/-} Mäusen nimmt im Anschluss den größten Bestandteil der Arbeit ein. Abschließend steht im letzten Teil der Diskussion die Analyse der präsentierten Ergebnisse zur Integrinexpression und -aktivierung auf der Oberfläche von Immunzellen im Mittelpunkt.

5.1 Immunhistochemische Charakterisierung der murinen Plaques

Die Daten der immunhistochemischen Analysen der Aorten von ApoE^{-/-}-Mäusen zeigen, dass sich sowohl nach acht Wochen, als auch nach 16 Wochen auf *Western-Type* Diät atherosklerotische Plaques bei Abwesenheit von CD84 deutlich geringer ausprägen, als in Tieren, in denen CD84 vorhanden ist.

Diese Ergebnisse zeigen zum ersten Mal, dass CD84 einen Einfluss auf die Entstehung der Atherosklerose, im Sinne einer Atheroskleroseförderung, zu haben scheint.

Dies passt zu der eingangs formulierten Hypothese, dass CD84 aufgrund seiner, in der wissenschaftlichen Literatur beschriebenen, immunmodulatorischen funktionellen Eigenschaften (Cannons et al., 2010; Martin et al., 2001; Sintes et al., 2010; Tangye et al., 2003), auch im Rahmen pathologischer Entwicklungen der arteriellen Gefäßwand (Reindel et al., 2014), für den chronisch-inflammatorischen Prozess der Atherogenese von Bedeutung ist.

Ein genauer Mechanismus, auf welchem Wege CD84 dabei Einfluss nimmt, ist allerdings unklar.

Ferner lässt sich konstatieren, dass das Verhältnis der Plaquefläche zur Aortenfläche im Verlauf des Prozesses zu den beiden untersuchten Zeitpunkten in etwa konstant zunimmt. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass CD84 die Entstehung der Atherosklerose bereits zu einem frühen Zeitpunkt beeinflusst.

Die Daten zeigen weiterhin, dass sowohl in jüngeren als auch älteren atherosklerotischen Läsionen der untersuchten ApoE.CD84^{-/-} Mäuse prozentual geringere Mengen an Plaquemakrophagen akkumulieren.

Da die Rekrutierung von Monozyten in die Intima arterieller Blutgefäße einen der ersten und wichtigsten Schritte im Rahmen der Entwicklung der Atherosklerose darstellt (Cochain & Zerneck, 2017; Hansson & Libby, 2006), ist ein Einfluss von CD84 auf die Rekrutierung dieser in der Atherogenese zentralen Monozyten denkbar. Dies kann eine Erklärung für die reduzierte Makrophagenakkumulation in Plaques der CD84-defizienten Tiere darstellen.

Ebenfalls anzunehmen ist ein von der Immunzellrekrutierung unabhängiger Prozess, der zum geringeren Anteil von Makrophagen innerhalb der atherosklerotischen Läsion beiträgt, etwa aufgrund des in der Literatur beschriebenen Einflusses von CD84 auf die Überlebensrate von Immunzellen bei Erkrankungen, wie der CLL (Binsky-Ehrenreich et al., 2014). Da auch die Proliferation der Makrophagen einen erheblichen Einfluss auf die Progression der atherosklerotischen Plaque hat (Robbins et al., 2013), könnte auch dieser Aspekt eine bedeutende Rolle in diesem Zusammenhang spielen. Dabei scheint die proliferative Aktivität normalerweise in frühen stärker als in späteren Läsionen ausgeprägt zu sein (Cochain & Zerneck, 2017; Lhotak et al., 2016), wodurch sich der gezeigte prozentual relativ stabil bleibende Anteil an Makrophagen zu beiden untersuchten Zeitpunkten erklären ließe.

Bezüglich der hier präsentierten Daten gilt es zu berücksichtigen, dass auch VSMC aus der Media in die Plaque migrieren und dort unterschiedliche Phänotypen annehmen können, einschließlich eines makrophagenähnlichen Phänotyps mit Expression von Makrophagenmarkern und parallelem Verlust von SMC-Markern (Bennett et al., 2016; Chappell et al., 2016; Cochain & Zerneck, 2017). Diese Zellplastizität stellt wiederum die potentielle Quelle einer unpräzisen Berechnung des Gehalts an Plaquemakrophagen dar. Gleichwohl zeigen die Daten eine signifikante Differenz hinsichtlich der Makrophagenakkumulation innerhalb der atherosklerotischen Läsionen zwischen den untersuchten Genotypen, die aus der Abwesenheit von CD84 im untersuchten Organismus resultieren.

Hinsichtlich des Anteils des nekrotischen Kerns an den aortalen Plaques der Tiere ist eine Progression im Laufe der Atherogenese erkennbar, jedoch ergeben sich zu beiden gemessenen Zeitpunkten keine Unterschiede zwischen ApoE^{-/-} Mäusen bei Präsenz oder Abwesenheit von CD84.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass CD84 weder in jüngeren noch in älteren atherosklerotischen Plaques einen Einfluss auf die Entwicklung des nekrotischen Kerns ausübt.

Die Ergebnisse zeigen weiterhin keine Unterschiede zwischen den untersuchten Genotypen hinsichtlich des Anteils an glatten Muskelzellen in älteren Tieren, während Daten zu glatten Muskelzellen von acht Wochen alten Tieren nicht erhoben werden konnten. Letzteres ließe sich durch eine zu diesem Zeitpunkt insgesamt zu geringe Menge an SMC innerhalb der Plaque oder durch eine insuffiziente immunhistochemische Färbung der Zellen erklären.

Im Verlauf der Entwicklung atherosklerotischer Plaques ruft das progrediente Entzündungsmilieu die verstärkte Migration und Proliferation von VSMC aus der Media in die Intima von betroffenen Arterien hervor, wo diese unter anderem die Produktion von extrazellulärer Matrix (ECM) und Kollagen vorantreiben (Chappell et al., 2016; Gomez & Owens, 2012; Rong et al., 2003). Die Menge an Kollagen korreliert also auch unmittelbar mit der Menge an SMC innerhalb der Plaque. Es gilt dabei allerdings zu beachten, dass ein Teil der migrierten VSMC innerhalb der Plaque einen differentiellen Phänotyp annehmen kann, indem sie etwa Makrophagenmarker exprimieren, während gleichzeitig VSMC-Marker-positive Zellen in der Läsion von anderen Zellen, wie Makrophagen oder adventitiellen Zellen abstammen können (Bennett et al., 2016). Dies hat zur Konsequenz, dass der ermittelte SMC-Anteil kritisch zu bewerten ist, da er nicht zwangsläufig die Realität abbildet.

Die vorliegenden Daten zeigen nur innerhalb jüngerer atherosklerotischer Läsionen einen veränderten Kollagengehalt zwischen den untersuchten Genotypen. So weisen Plaques aus ApoE.CD84^{-/-} Mäusen nach acht Wochen einen geringeren Kollagengehalt auf, als ApoE^{-/-} Mäuse. Insgesamt konnten innerhalb der Plaques beider Gruppen nur sehr geringe Mengen an Kollagen beobachtet werden.

Eine direkte Korrelation zwischen der Akkumulation von SMC und dem Gehalt an Kollagen in den untersuchten atherosklerotischen Plaques war nicht ersichtlich.

Nichtsdestotrotz bleibt die Tatsache bestehen, dass eine Kollagenproduktion bei Abwesenheit von CD84 innerhalb jüngerer Plaques vermindert zu sein scheint, nicht jedoch innerhalb älterer Plaques.

Eine Aufklärung dieses Faktums bleibt nicht unwesentlich aufgrund der fehlenden Daten hinsichtlich der Menge an glatten Muskelzellen diffizil. Dennoch könnte bedingt durch die intensivierte proinflammatorische Komponente innerhalb jüngerer Plaques bei CD84^{+/+} Mäusen auch eine verstärkte Migration von VSMC in die Plaque stattfinden, die dort, nach einer phänotypischen Veränderung von kontraktilen zu synthetisierenden VSMC (Campbell & Campbell, 1994; Stegemann, Hong, & Nerem, 2005), die Synthese der ECM, insbesondere von Kollagen, vorantreiben könnte.

In älteren atherosklerotischen Plaques kann eine Degradierung der Zahl dieser Zellen, unter anderem durch Apoptose und weiterhin ein vermehrter Abbau von Extrazellulärmatrix mittels Matrixmetalloproteinasen (MMPs) stattfinden und zu dieser Tatsache beitragen (Clarke et al., 2006; Galis, Sukhova, Lark, & Libby, 1994).

Während also bei Abwesenheit von CD84 in jüngeren Plaques eine verminderte Kollagensynthese vorhanden ist, stellen beschriebene Prozesse in älteren Läsionen eine mögliche Ursache für den ausgeglichenen Gehalt von Kollagen zwischen den untersuchten Genotypen dar.

In Zusammenschau der präsentierten Daten und der Ergebnisse aus der wissenschaftlichen Literatur lässt sich schlussfolgern, dass CD84 immunmodulierende Eigenschaften besitzt und einen fördernden Einfluss auf chronisch-inflammatorische Prozesse, wie die Atherosklerose hat.

Die Daten zeigen darüber hinaus einen eindeutigen Unterschied hinsichtlich der Makrophagenakkumulation innerhalb der atherosklerotischen Plaque zwischen ApoE^{-/-} Mäusen, die CD84 exprimieren und solchen, bei denen CD84 absent ist.

Aufgrund dessen wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk auf die Rolle von CD84 hinsichtlich der Immunzell- und speziell der Monozytenrekrutierung gelegt.

5.2 Überlebensfähigkeit von Makrophagen *in vitro*

Ein Erklärungsansatz für den reduzierten Gehalt an Plaquemakrophagen ist, dass CD84-defiziente Makrophagen nach ihrer Rekrutierung in die atherosklerotische Plaque eine differente Charakteristik hinsichtlich der Proliferation oder Apoptose, im Vergleich zu

CD84-positiven Makrophagen aufweisen. Substanzen, denen sie in dem Milieu ausgesetzt sind, könnten dabei eine wichtige Rolle spielen.

Frühere Arbeiten zeigen, dass die Überexpression von CD84 im Rahmen der CLL einen wichtigen Überlebensmechanismus von lymphatischen Tumorzellen repräsentiert (Binsky-Ehrenreich et al., 2014). Dabei führt die Blockierung von CD84 *in vitro* und *in vivo* zu einer gestörten Interaktion von CLL-Zellen mit ihrer Mikroumgebung, woraus in der Folge der induzierte Zelltod resultiert (Marom et al., 2017). Dies kann durch eine Hochregulierung der Expression von PD-1 und PD-L1 ermöglicht werden, was in der Folge zu einer unterdrückten T-Zell-vermittelten Antitumorreaktion führt (Lewinsky et al., 2018). Bei diesen Daten gilt es jedoch kritisch zu berücksichtigen, dass es sich bei dem untersuchten Krankheitsbild um eine neoplastische lymphoproliferative Erkrankung aus der Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome handelt, bei welcher es zur Proliferation entarteter B-Zellen kommt (Hallek et al., 2008), die nicht mit physiologisch existenten B-Zellen des funktionsfähigen Immunsystems gleichzusetzen sind.

Die zugrundeliegenden Ergebnisse bestätigen, dass Makrophagen unter Einfluss von Cycloheximid (CHX) – je nach Dosis entweder durch Apoptose oder Nekrose – untergehen, wie es andere Arbeiten ebenfalls zeigten (Li, Kuan, Lee, Huang, & Chang, 2014). Dabei ergibt sich allerdings keine signifikante Differenz zwischen CD84-positiven und -defizienten Makrophagen *ex vivo*. Ähnlich verhält es sich bei Makrophagen nach Stimulation mit oxidiertem *Low-density* Lipoprotein (oxLDL), die dadurch aktiviert und zur Hochregulation bestimmter Rezeptoren angeregt werden sollen (Hansson & Libby, 2006). In der Literatur zeigte sich, dass niedrige Dosen von oxLDL oder kurze oxLDL-Behandlungen zu einem gesteigerten Makrophagenüberleben, verstärkter DNA-Synthese und zu einer verbesserten proliferativen Reaktion auf M-CSF führen (Hamilton et al., 1999).

Es kommt zwar unter Stimulation mittels oxLDL zu einer sichtbaren geringgradigen Vermehrung der Zellen, welches sich durch eine gesteigerte Proliferation der Zellen erklären ließe, jedoch scheint die Abwesenheit von CD84 auf der Oberfläche von Makrophagen keine veränderte Aktivierung oder Proliferation der Zellen zu bewirken.

Diese Daten sollten allerdings kritisch bewertet werden, da die Makrophagen lediglich mit den Substanzen CHX und oxLDL für einen kurzen Zeitraum von etwa 24 Stunden stimuliert wurden. Im Entzündungsprozess der Atherosklerose werden die Makrophagen jedoch mittels zahlreicher Zytokine, Chemokine und anderer beschriebener Fakto-

ren hinsichtlich ihrer Aktivierung, Proliferation und Differenzierung reguliert (Cochain & Zerneck, 2017), was in diesem Experiment hingegen keine Berücksichtigung findet. Frühere Arbeiten zeigen, dass die Proliferation der Makrophagen für etwa 87% der Makrophagenakkumulation in bereits etablierten atherosklerotischen Läsionen verantwortlich ist, während die Rekrutierung aus dem Blutstrom zirkulierender Monozyten nur in den frühen Phasen der Erkrankung von Bedeutung ist (Robbins et al., 2013). Die gewählte Zeitspanne von 24 Stunden lässt in diesem Experiment zwar eine Änderung der Aktivität der Zellen zu, vernachlässigt jedoch den Aspekt der potentiell veränderten Zellproliferation innerhalb eines längeren Zeitraumes, welche ebenfalls ein Erklärungsansatz für die ermittelten Differenzen hinsichtlich der Plaquemakrophagenakkumulation darstellt. Diese Daten geben nichtsdestotrotz Hinweise darauf, dass die Abwesenheit von CD84 auf Makrophagen weder zu einem verstärkten Untergang noch zu einer veränderten Aktivierung der Zellen *in vitro* führt.

Um die Rolle von CD84 auf die Überlebens- und Proliferationscharakteristik von Monozyten und Makrophagen innerhalb der atherosklerotischen Läsion zu verifizieren, sind in der Zukunft weitere Untersuchungen, hinsichtlich des Einflusses von CD84 auf die langfristige Viabilität der Immunzellen unter Berücksichtigung weiterer zentraler Einflussfaktoren innerhalb der Mikroumgebung der atheromatösen Plaque, erstrebenswert.

5.3 Immunzellrekrutierung unter inflammatorischen Bedingungen *in vivo*

Die Daten des *in vivo* Hintergliedmaßen-Ischämie Experiments (*Model of Hindlimb Ischemia*) zeigen, dass sich 24 Stunden nach Unterbindung der Femoralarterie (*A. femoralis*) auf einer Seite des Tieres, mehr CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Blut der CD84^{-/-} Mäuse, verglichen mit dem Blut von CD84^{+/+} Mäusen, befinden.

Abgesehen davon können weder nach 24 noch nach 72 Stunden Abweichungen in Hinblick auf Blutzellzahlen zwischen den beiden untersuchten Genotypen festgestellt werden.

Die durchflusszytometrische Analyse des Muskelgewebes zeigt, dass die Unterbindung der Femoralarterie, demzufolge die Induktion einer Ischämie der Skelettmuskulatur des Unterschenkels der Maus, eine massive Immunzellrekrutierung von Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen und T-Zellen mit einer spezifischen Charakteristik nach sich

zieht, was mit bisherigen Arbeiten vereinbar ist (Cochain et al., 2010; Gute, Ishida, Yarimizu, & Korthuis, 1998).

Die vorliegenden Daten zeigen, dass nach einer Ischämiezeit von 24 Stunden weniger proinflammatorische Ly6C^{high} Monozyten bei CD84^{-/-} Mäusen, verglichen mit B6 Kontroll-Mäusen, in das ischämische Skelettmuskelgewebe rekrutiert werden.

Das spricht dafür, dass CD84 einen funktionellen Einfluss auf die frühe Zellrekrutierung von im Blut zirkulierenden proinflammatorischen Monozyten in das ischämische Gewebe hat. Hierbei gilt es allerdings, das relativ hohe Maß der Variabilität der einzelnen Werte innerhalb des Experiments zu berücksichtigen.

Weiterhin sollte in der Gesamtbetrachtung berücksichtigt werden, dass diese Zellreihe nur in der frühesten Phase des Entzündungsprozesses eine verminderte Akkumulation aufweist. Ebenfalls sind diese zirkulierenden proinflammatorischen Monozyten isoliert von diesem Phänomen betroffen, da Neutrophile ebenso wie T-Zellen keine Veränderung in Hinblick auf ihre inflammatorische Zellrekrutierung aufweisen.

Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass CD84, zumindest im Rahmen der ischämischen Entzündungsreaktion, einen Einfluss auf die frühe akute Phase der Immunzellrekrutierung von umschriebenen Ly6C^{high} Monozyten der Maus haben könnte, während andere im Blutstrom zirkulierende Immunzellen durch die Abwesenheit von CD84 davon offensichtlich nicht betroffen sind.

Die im Rahmen dieses Experimentes vorherrschenden Bedingungen der akuten Entzündung stehen zwar nicht repräsentativ für den chronisch-entzündlichen Prozess der Entstehung atherosklerotischer Plaques innerhalb der Intima arterieller Blutgefäße, können aber einen Hinweis auf die Immunzellrekrutierung in das Gewebe unter entzündlichen Bedingungen im Allgemeinen liefern. Dieser Prozess ist im Rahmen der Monozyten- bzw. Makrophagenakkumulation im Kontext der Pathogenese der Atherosklerose von zentraler Bedeutung.

Während eine Immunzellrekrutierung im Rahmen des *Air Pouch*-Modells ohne Injektion von Chemokinen, wie in diesem Fall TNF- α , kaum stattfindet, bewirkt bereits eine Injektion von 50ng TNF- α eine massive Immunzellrekrutierung aller untersuchten Immunzellreihen in das subkutane Luftpolster. Diese Erkenntnisse decken sich mit den Daten vieler Autoren, die TNF- α als Zytokin eine wichtige Rolle hinsichtlich der Immunzellrekrutierung bei inflammatorischen Prozessen zuschreiben (Ende et al., 2014;

Ley et al., 2007; Min et al., 2005). Dies ist auch für die Leukodiapedese im Rahmen der Atherogenese von großer Relevanz (McKellar, McCarey, Sattar, & McInnes, 2009).

Weder CD84-defiziente Monozyten, Makrophagen, T-Zellen oder Neutrophile zeigen, verglichen mit CD84^{+/+}-Immunzellen, einen Unterschied hinsichtlich der Rekrutierung in das angelegte subkutane Luftpolster.

Das deutet darauf hin, dass CD84 keinen Einfluss auf die Rekrutierung der untersuchten Immunzellen unter akut-entzündlichen Bedingungen hat. Dies gilt zumindest für die Infiltration des subkutanen Luftpolsters unter Anwesenheit von TNF- α nach einer Zeit von 24 Stunden.

Das etablierte subkutane Luftpolster stellt ein *in vivo* Modell dar, mit dem die Komponenten einer akuten und chronischen Entzündung adäquat untersucht werden können (Duarte et al., 2016; Edwards, Sedgwick, & Willoughby, 1981). Nichtsdestotrotz gilt es auch hier gewisse Limitationen zu berücksichtigen. Denn es wird im Rahmen des beschriebenen *in vivo* Modells die Immunzellrekrutierung in das resultierende Luftpolster betrachtet, also in einen luftgefüllten Hohlraum, ausgekleidet mit Granulationsgewebe – hauptsächlich bestehend aus Fibroblasten, Makrophagen und Mastzellen – dessen Struktur mit Merkmalen der Synovialmembran von Gelenken übereinstimmt (Edwards et al., 1981). Dies entspricht also nicht dem Prozess der Immunzellrekrutierung durch das Gefäßendothel in die Intima der arteriellen Wand, wie es im Rahmen der Atherogenese stattfindet. Obgleich das auskleidende Gewebe nicht vollkommen dem Gefäßendothel entspricht, kann dieses *in vivo* Modell dennoch einen Hinweis auf eine potentiell veränderte Rekrutierung der zirkulierenden Zellen des Immunsystems unter akut-entzündlichen Bedingungen geben.

Die ermittelten Zahlen dieses *in vivo* Experiments, lassen darauf schließen, dass die Abwesenheit von CD84 auf der Oberfläche der Zellpopulationen keinen Einfluss auf die Immunzellrekrutierung unter akut-inflammatorischen Verhältnissen hat.

Da die Daten dieser beiden *in vivo* Experimente für die Immunzellrekrutierung unter akut-entzündlichen Verhältnissen keine kongruenten Ergebnisse in Bezug auf die Ly6C^{hi} Monozyten liefern, erscheint eine kausale Bewertung diffizil. Die beiden verwendeten Modelle unterscheiden sich allerdings in mehreren Aspekten voneinander und sind deshalb als autarke Modelle zu betrachten. Hinzu kommt, dass nicht spezifische Subpopulationen, sondern vielmehr die Monozyten in ihrer Gesamtheit aus der Lavage

des Luftpolsters betrachtet wurden, was dazu führen kann, dass sich die Daten nicht direkt miteinander vergleichen lassen.

Unter genannten Gesichtspunkten zeigen diese Daten aber *summa summarum*, dass CD84 einen potentiellen Einfluss auf die frühe Zellrekrutierung von proinflammatorischen Ly6C^{hi} Monozyten unter akut-entzündlichen Bedingungen in der Maus hat.

5.4 Adhäsion und chemotaktische Transmigration von Monozyten *in vitro*

Unter inflammatorischen Bedingungen, im Rahmen des *in vitro* Adhäsions Modells, zeigen aus dem Knochenmark gewonnene Monozyten eine verstärkte Adhäsion an das mit TNF- α stimulierte Endothel. Das deckt sich mit Arbeiten, die zeigen, dass dieses Zytokin die Adhäsion von Monozyten an das Endothel fördert, indem es eine Entzündungsreaktion induziert (Tedgui & Mallat, 2006) und die Expression verschiedener proadhäsiver Gene, wie etwa VCAM-1 oder ICAM-1 hochreguliert (Ende et al., 2014). Diese Integrine begünstigen in der Folge die Adhäsion und die daraus resultierende Diapedese der Leukozyten (Ley et al., 2007).

Es zeigt sich hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen CD84-positiven und CD84-negativen Monozyten hinsichtlich ihrer Adhäsionsrate an das stimulierte Endothel. Die Ergebnisse der Untersuchung bestätigen daher den fehlenden Einfluss von CD84 auf die Adhäsionscharakteristik zirkulierender Monozyten an Endothelzellen *ex vivo*. Der Anteil von Monozyten an den isolierten und perfundierten Zellen lag in jedem Telexperiment bei über 80%, sodass sich Rückschlüsse der Adhäsionsfähigkeit nicht vollständig, jedoch weitestgehend, den Monozyten zuschreiben lassen.

Kritisch zu betrachten ist, dass eine relativ hohe Streuung der gemessenen Daten zu beobachten ist. Berücksichtigen sollte man darüber hinaus ebenfalls, dass für den Flussversuch keine direkt aus der Aorta der Maus gewonnenen Endothelzellen, aufgrund der insuffizienten Haftung der Zellen im Flusskanal, verwendet werden konnten. Stattdessen kamen die immortalisierten b.End5 Zellen zum Einsatz, welche durch Transformation von primären Hirn-Endothelzellkulturen aus Mäusen gewonnen werden (Steiner et al., 2011; Wagner & Risau, 1994).

Letztendlich lässt dieses *in vitro* Adhäsionsmodell zwar keine direkten Rückschlüsse auf die physiologischen Verhältnisse, die in der Aorta vorherrschen und die pathologischen Gegebenheiten, die im Rahmen der Atherogenese entscheidend sind, zu. Dennoch gibt dieses Experiment einen wertvollen Hinweis darauf, dass CD84 keinen Einfluss auf

die Fähigkeit der Monozyten zur Adhäsion an stimulierte Endothelzellen im arteriellen Blutgefäßsystem der Maus hat.

Die Daten des chemotaktischen Transmigrationsmodells zeigen, dass ohne Zugabe eines Chemoattraktans zwar eine geringe Menge der aus dem Knochenmark isolierten Monozyten, in die untere Kammer migrieren, sich der Anteil jedoch bei Zugabe von CCL2 (MCP-1) signifikant erhöht. Das deckt sich mit dem bisherigen Kenntnis von CCL2, welches am Ort einer Entzündung von einer Vielzahl an Immunzellen sezerniert und als Chemoattraktans fungieren kann. In der Folge kommt es zur Adhäsion und Transmigration zirkulierender Monozyten in den subendothelialen Raum, was dadurch, im Rahmen der Atherogenese, den Nährboden für die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen bereiten kann (Lin et al., 2014; Luscinskas et al., 2000; Zerneck & Weber, 2014).

Es können jedoch keine signifikanten Differenzen in Hinblick auf die Menge der migrierten Zellen festgestellt werden. Die CD84-defizienten Monozyten scheinen im selben Maße durch die Porenmembran zu migrieren wie die Monozyten, welche CD84 exprimieren, was sowohl bei An- als auch Abwesenheit des Chemoattraktans CCL2 (MCP-1) zu beobachten ist.

Diese Daten sprechen dafür, dass unter Abwesenheit von CD84 keine Veränderung hinsichtlich der Migrationsfähigkeit respektive der chemotaktischen Aktivität von Monozyten innerhalb der Boyden-Kammer stattfindet.

Obwohl *in vitro* oder *ex vivo* Experimente fast nie alle Faktoren miteinbeziehen können, die im lebenden Organismus einen Einfluss auf biochemische Vorgänge haben, spiegeln sie dennoch einzelne Aspekte eines komplexen Prozesses, wie in diesem Falle die Transmigration von Monozyten, wider.

Als Limitation dieses Versuches ist jedoch die fehlende Transmigration der Zellen durch eine Lage aus Endothelzellen zu nennen, welche eine wichtige und komplexe Rolle hinsichtlich der Interaktion mit Immunzellen im Rahmen eines entzündlichen Geschehens, wie etwa der Atherosklerose, während der Transmigration aus dem Blutkreislauf in das Gewebe repräsentiert (Mestas & Ley, 2008).

Der Ligand CCL2 mit seinem Rezeptor CCR2 nehmen zwar unter inflammatorischen Bedingungen bei der Mobilisierung von Monozyten aus dem Knochenmark eine entscheidende Rolle ein (Serbina & Pamer, 2006). Für die Transmigration aus dem Blutgefäß in den subendothelialen Raum im Rahmen der physiologischen Immunzellrekrutie-

zung, ist hingegen das Zusammenspiel diverser weiterer beschriebener Chemokine von Bedeutung (Serbina & Pamer, 2006; Soehnlein et al., 2013; Zerneck & Weber, 2014). Folglich lassen diese Daten vielmehr Rückschlüsse auf die chemotaktischen Fähigkeiten der Monozyten durch CCL2 zu und dienen weniger der Beurteilung der direkten Transmigrationsfähigkeit von Monozyten aus dem Blutkreislauf in den subendothelialen Raum.

In Zusammenschau der präsentierten Ergebnisse dieser *in vitro* Experimente lässt sich konstatieren, dass die Abwesenheit von CD84 weder einen Einfluss auf die Regulation der Adhäsionsfähigkeit von Monozyten an das Endothel unter physiologischen Flussverhältnissen noch auf chemotaktische Charakteristika von Monozyten hat.

5.5 Immunzellrekrutierung bei gemischten Knochenmarkchimären

Das Ziel dieses Experiments war die Untersuchung der Rekrutierung aus dem Knochenmark stammender CD84-suffizienter und -defizienter Leukozyten in atherosklerotische Läsionen muriner Aorten.

Die Ergebnisse zeigen keine signifikanten Abweichungen zwischen den untersuchten Genotypen in Hinblick auf die Zahlen von Monozyten und Makrophagen im Blut und in der Aorta der Tiere.

Anders präsentieren sich die Daten für T-Zellen, bei denen sich sowohl im Blut als auch aus der Aorta der Tiere signifikant höhere Werte für CD84-defiziente T-Zellen finden lassen.

Es zeigt sich, dass das Verhältnis des prozentualen Anteils an rekrutierten Makrophagen in die Aorta zu dem Anteil an Monozyten im Blut der Tiere sowohl für CD45.1 (CD84^{+/+}) als auch CD45.2 (CD84^{-/-}) Monozyten und Makrophagen in etwa 1 betrifft, was für eine stabil bleibende Rekrutierung der Monozyten in die atherosklerotischen Plaques der *Ldlr*^{-/-} Mäuse spricht. Im Vergleich zwischen den ermittelten Werten ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen.

CD45.1 (CD84^{+/+}) T-Zellen zeigen zwar tendenziell eine leicht verminderte Rekrutierung in die Aortenwand, im Vergleich zu CD45.2 (CD84^{-/-}) T-Zellen, allerdings lässt sich auch hier kein signifikanter Unterschied erkennen.

Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass CD84 keinen Einfluss auf die Menge der jeweils rekrutierten Zellen in die Aortenwand, im Rahmen atherosklerotischer Pro-

zesse, hat. Dies gilt zumindest für Monozyten bzw. Makrophagen und T-Zellen in *Ldlr*^{-/-} Mäusen nach acht Wochen auf *Western-Type* Diät.

Es bestand die Gefahr einer potentiell ausbleibenden Depletion von im Blutkreislauf zirkulierenden und im Gewebe sowie sekundär lymphatischen Organen residenten CD45.2-positiven Zellen der bestrahlten Empfängertiere. Dies könnte die Erklärung für die erhöhten CD45.2-positiven T-Zellzahlen liefern, die im Blut sowie der Aorta der Tiere ermittelt und als CD84-negativ gewertet wurden. Dies konnte jedoch mittels durchflusszytometrische Exklusion dieser Zellen in der Auswertung mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Durch die Berechnung des Verhältnisses des prozentualen Anteils der Zellen aus dem Blut durch den Anteil der Zellen aus der Aorta der Tiere konnte, dessen ungeachtet, die Migrationsrate der Zellen in den subendothelialen Raum der Aorta ermittelt werden.

Die Frage nach den erhöhten Zahlen für CD84^{-/-} T-Zellen in der Blutzirkulation der *Ldlr*^{-/-} Knochenmarkchimären bleibt jedoch bestehen und sollte durch zukünftige Forschungsarbeiten, die sich dieser Thematik widmen, aufgeklärt werden.

Zu berücksichtigen gilt es, dass in diesem Experiment das *Ldlr*^{-/-} Mausmodell angewandt wurde und die Ergebnisse folglich nicht zweifelsfrei mit jenen des *ApoE*^{-/-} Mausmodells zu vergleichen sind, da beide Mausmodelle grundlegende Differenzen aufweisen (Emini Veseli et al., 2017; Getz & Reardon, 2016). Dies ist der Tatsache geschuldet, dass *ApoE*^{-/-} Mäuse nicht als adäquates Modell für Knochenmarkchimären-Experimente bei der Untersuchung von Atherosklerose gelten, weil ein Transfer von *ApoE* im Rahmen der Knochenmarkdepletion und -rekonstitution bei *ApoE*^{-/-} Tieren nicht ausgeschlossen werden kann. Darüber gilt als weitere Limitation zu nennen, dass eine Bestrahlung, die erforderlich ist, um das hämatopoetische Kompartiment im Knochenmark der Empfängermäuse zu erschöpfen, einen intrinsischen Effekt auf den Progress der Atherosklerose haben kann (Aparicio-Vergara, Shiri-Sverdlov, de Haan, & Hofker, 2010). Die Auswirkungen auf die Atherosklerose können zwischen chimären *Ldlr*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Befunden, die unter Verwendung vollständiger *Knock-Outs* erzielt wurden, unterschiedlich sein. *Ldlr*^{-/-} Mäuse etwa, denen B7-1/B7-2-T-Zell-Kostimulationssignale fehlen, zeigen aufgrund einer verminderten T-Zell-Aktivierung weniger atherosklerotische Veränderungen (Buono et al., 2004).

Nichtsdestotrotz geben diese Daten Hinweise darauf, dass die Abwesenheit von CD84 keine veränderte Immunzellrekrutierung von Monozyten oder T-Zellen im Rahmen der Atherogenese in *Ldlr*^{-/-} Mäusen nach sich zieht.

5.6 Integrinexpression und -aktivierung auf Immunzellen

Integrine repräsentieren eine wichtige Gruppe von Zelladhäsionsrezeptoren, die in den komplexen Prozess der Regulation von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen involviert sind (Berlin et al., 1995; Issekutz, 1995).

Um auszuschließen, dass CD84 die Monozytenadhäsion mittels Modulation der Integrinexpression oder -aktivierung im Rahmen einer direkten Chemokin-Rezeptor-Interaktion oder einer indirekten Integrin-Interaktion reguliert, wurden Monozyten aus dem Knochenmark und aus dem Blut auf die Expression der Integrine auf deren Zelloberfläche untersucht.

Dabei wurde die Expression der Integrine α -M (CD11b) und Integrin β -2 (CD18) unter anderem als Anteile von Integrin α M β 2 (*Macrophage-1 antigen*, Mac-1) sowie CD18 auch als Anteil von LFA-1 (Springer, 1990) und Integrin β -1 (CD29), Integrin α -4 (CD49d) unter anderem als Untereinheiten des Integrins α 4 β 1 (VLA-4) mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die Ergebnisse der Expression der untersuchten Zelladhäsionsmoleküle decken sich mit der Literatur, die zeigt, dass diese Integrine konstitutiv auf Immunzellen, einschließlich der Monozyten exprimiert werden (Berlin et al., 1995; Dunne, Ballantyne, Beaudet, & Ley, 2002; Issekutz, 1995).

Die Expression der untersuchten Integrine auf der Zelloberfläche der Monozyten unterscheidet sich nicht zwischen den zugrundeliegenden Genotypen, weder hinsichtlich der Expression auf Monozyten aus der Blutzirkulation, noch auf Monozyten aus dem Knochenmark der Tiere.

Die Expression dieser Integrine (α M, β 1, β 2, α 4) auf der Zelloberfläche der Monozyten, scheint also nicht durch die Abwesenheit von CD84 beeinflusst zu werden, was unweigerlich zu der Schlussfolgerung führt, dass CD84 keinen Einfluss auf den Phänotyp der Zellen in Hinsicht auf genannte Integrine hat. Da die gewählte durchflusszytometrische Analyse lediglich eine quantitative Bestimmung und weniger einen Rückschluss auf potentielle Konformationsänderungen genannter konstitutiv exprimierter Integrine zulässt, wären weiterführende Forschungsarbeiten in Hinblick auf eine veränderte Aktivierung der untersuchten Integrine auf Monozyten und anderen Immunzellen interessant.

Als ein im Rahmen der Transmigrationskaskade von Immunzellen, entscheidendes Integrin, wurde die Aktivierung von LFA-1 auf T-Zellen mittels des löslichen Ligand-basierten Adhäsions Assays (SL-AA) untersucht.

LFA-1 setzt sich aus den Untereinheiten α L (CD11a) und β 2 (CD18) zusammen (Springer, 1990), wird auf der Oberfläche von Leukozyten exprimiert und bindet während des Transmigrationsprozesses nach zellintrinsischer Aktivierung an die Interzellulären Adhäsionsmoleküle ICAM-1, 2 und 3, die auf Leukozyten oder Endothelzellen exprimiert werden (Gahmberg et al., 1997; Issekutz, 1995; Marlin & Springer, 1987; C. H. Wong et al., 2010). Die Aktivierung der Integrine wird dabei durch die Erhöhung der Affinität und/oder Avidität vermittelt (Hogg et al., 2002; Konstandin et al., 2006).

Die Veränderungen der Affinität von LFA-1 können mittels divalenten Kationen wie Mg^{2+} induziert werden (Takagi & Springer, 2002), während seine Avidität mittels Inkubation mit Phorbolestern wie PMA gesteigert werden kann (Konstandin et al., 2006; Stewart, Cabanas, & Hogg, 1996).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Zugabe von Mg^{2+} und EGTA die Bindung von ICAM-1-Fc deutlicher steigert als die Inkubation der Zellen mit PMA.

Dabei konnte eine signifikant verstärkte Affinität im Anteil der T-Zellen sowie eine signifikant erhöhte Avidität von $CD84^{+/+}$ im Vergleich zu $CD84^{-/-}$ T-Zellen hinsichtlich deren Immunfluoreszenz gesehen werden.

Dabei gilt es allerdings zu berücksichtigen, dass die zugrundeliegende Literatur zur Methodik des SL-AA eine deutlich stärkere Affinität, als die hier präsentierte, aufweist. Eine Erhöhung der Avidität von LFA-1 nach PMA-Zugabe, wie hier im Vergleich zur Kontrolle diskret erkennbar ist, wird in der Literatur im Rahmen des SL-AA nicht beschrieben (Konstandin et al., 2006).

Nichtsdestotrotz sind die vorliegenden Ergebnisse insofern interessant, als dass sie einen Hinweis auf den Einfluss von CD84 auf die zellintrinsische Aktivierung, insbesondere durch die gezeigte veränderte Affinität des für die Immunzellrekrutierung wichtigen Integrins LFA-1, geben.

Die untersuchten T-Zellen können dabei, unter Vorbehalt, repräsentativ für alle LFA-1-exprimierenden Immunzellen, einschließlich der Monozyten, stehen, bei denen dieser Mechanismus auch im Rahmen der atherosklerotischen Immunzellrekrutierung eine wichtige Stellung einnimmt (Watanabe & Fan, 1998).

Letztendlich lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen ableiten, dass CD84 die konstitutive Expression untersuchter Integrine auf Monozyten und T-Zellen nicht, die Aktivierung, zumindest von LFA-1, jedoch in gewisser Weise beeinflussen kann.

Als Limitation gilt zu berücksichtigen, dass eine Wiederholung und Erweiterung des Experiments notwendig ist, um mögliche Effekte auf die Änderung der Affinität und darüber hinaus auch auf die Avidität von LFA-1 sowie weiterer Integrine, die an der Immunzellrekrutierung im Rahmen der Atherosklerose beteiligt sind, noch eindeutiger zeigen zu können.

5.7 Conclusio

Die Ergebnisse dieser Arbeit und der Literatur lassen vermuten, dass CD84 einen Einfluss auf die Entstehung der Atherosklerose hat.

Dies resultiert aus der Plaqueanalyse von ApoE^{-/-} Mäusen, die zeigt, dass sich bei Abwesenheit von CD84 neben einer verminderten Plaquegröße auch eine geringere Makrophagenakkumulation innerhalb der Läsionen in der Aortenwurzel entwickelt.

Eine veränderte Viabilität von Makrophagen *in vitro* scheint indes keine Erklärung für diese Tatsache zu liefern, jedoch sollten sich weiterführende Forschungsarbeiten auch dem Einfluss von CD84 auf die langfristige Überlebens- und Proliferationscharakteristik von Makrophagen innerhalb des chronisch-inflammatorischen Mikromilieus der atheromatösen Plaque, widmen.

Eine verminderte Rekrutierung ist unter akut-inflammatorischen Bedingungen für proinflammatorische CD84-defiziente Ly6C^{high} Monozyten *in vivo* im Hintergliedmaßen-Ischämiemodell erkennbar, während sich weder eine geringere Adhäsion der Zellen an das Endothel, noch eine verminderte, durch CCL2 respektive MCP-1 provozierte, chemotaktische Transmigration *in vitro* zeigt.

Ebenso scheint CD84 keinen Einfluss auf die Immunzellrekrutierung in atherosklerotische Plaques von Ldlr^{-/-}-Knochenmarkchimären zu haben.

Ein Erklärungsansatz für die verminderte Rekrutierung unter akut-entzündlichen Bedingungen könnte weniger eine Veränderung der konstitutiven Expression von Integrinen, jedoch eine veränderte Integrinaktivierung auf Immunzellen darstellen.

Die funktionelle Bedeutung von CD84 hinsichtlich der Aktivierung von Integrinen sollte durch zukünftige Forschungsarbeiten weiter spezifiziert werden.

Diese Arbeit kann zum besseren Verständnis des Prozesses der Atherogenese und der funktionellen Bedeutung von CD84 in diesem Zusammenhang sowie im Rahmen der Immunzellrekrutierung und Integrinaktivierung beitragen.

Die neu gewonnenen Erkenntnisse können im Zusammenspiel mit weiterführenden Forschungsarbeiten in Zukunft dabei helfen, durch neu identifizierte pharmakologische Therapieansätze in Bezug auf CD84, spezifischer in inflammatorische Prozesse, wie die Atherosklerose, einzugreifen.

6 Zusammenfassung / Summary

CD84 ist ein Transmembran-Glykoprotein vom Typ 1, welches ein Mitglied der Familie der SLAMF5 ist. Es ist ein homophiles Adhäsionsmolekül, das von unterschiedlichen Immunzellpopulationen exprimiert wird, einschließlich Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, T-Zellen, dendritischen Zellen und Mastzellen, die im Zusammenhang mit der Entstehung der Atherosklerose stehen.

Um die funktionelle Bedeutung von CD84 in der Pathogenese der Atherosklerose bestimmen zu können, wurden CD84^{-/-} Mäuse mit ApoE^{-/-} Mäusen gekreuzt, um Tiere zu erhalten, die CD84-defizient und anfällig für Atherosklerose waren.

Die Bedeutung dieses Moleküls für die Atherogenese sowie für die Adhäsion, Transmigration, Immunzellrekrutierung allgemein und Integrinexpression und -aktivierung wurde im Mausmodell *in vivo* und *in vitro* untersucht.

Nach acht und 16 Wochen pro-atherogener, fettreicher *Western-Type* Diät waren die Ausprägung der atherosklerotischen Läsionen in der Aortenwurzel, sowie deren Gehalt an Makrophagen in den ApoE^{-/-}.CD84^{-/-} Tieren im Vergleich zu den ApoE^{-/-} Kontrolltieren signifikant vermindert.

Weiter zeigten die Ergebnisse, dass die Viabilität von Makrophagen, denen CD84 fehlte, *in vitro* nicht verändert war.

Der Einfluss von CD84 auf die akute Immunzellrekrutierung wurde mittels verschiedener *in vivo* und *in vitro* Experimente untersucht. Eine verminderte Rekrutierung von CD84^{-/-} proinflammatorischer Ly6Chigh Monozyten konnte *in vivo* im Rahmen des Hintergliedmaßen-Ischämie Modells festgestellt werden, nicht hingegen im *Air pouch*-Modell.

Es konnte weiterhin weder eine Veränderung der Adhäsion und chemotaktischen Transmigration von Monozyten *in vitro* noch der Immunzellrekrutierung in atherosklerotische Läsionen in Ldlr^{-/-} Mäusen *in vivo* bei Abwesenheit von CD84 festgestellt werden.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass CD84 zwar keine Bedeutung für die Integrinexpression auf Monozyten hat, jedoch für die adäquate Aktivierung von LFA-1 auf T-Zellen.

Diese Arbeit trägt *summa summarum* zum verbesserten Verständnis des Prozesses der Atherogenese sowie der funktionellen Bedeutung von CD84 innerhalb dieses Prozesses sowie im Rahmen der Immunzellrekrutierung und Integrinaktivierung bei.

Diese Erkenntnisse könnten in Zukunft dabei helfen, durch die Entwicklung neuer pharmakologischer Therapieansätze, spezifischer in von CD84 mitregulierte inflammatorische Prozesse, wie die Atherosklerose, einzugreifen.

Dies könnte im Zusammenspiel mit Forschungsarbeiten gelingen, die weitere präzise Erkenntnisse zu spezifischen funktionellen Eigenschaften von CD84 hinsichtlich der Immunzellrekrutierung und Integrinaktivierung liefern.

CD84 is a type 1 transmembrane glycoprotein which is a member of the SLAMF5 family. It is a homophilic adhesion molecule expressed by different immune cell populations, including monocytes, macrophages, granulocytes, T cells, dendritic cells and mast cells, which are associated with the development of atherosclerosis.

To determine the functional role of CD84 in the pathogenesis of atherosclerosis, CD84^{-/-} mice were crossed with ApoE^{-/-} mice to generate animals that were CD84-deficient and susceptible to atherosclerosis.

The importance of this molecule for atherogenesis as well as for adhesion, transmigration, immune cell recruitment in general and integrin expression and activation was investigated *in vivo* and *in vitro* in the mouse model.

After eight and 16 weeks of pro-atherogenic, high-fat western type diet, the expression of atherosclerotic lesions in the aorta and the macrophage content of the ApoE^{-/-}.CD84^{-/-} animals was significantly reduced compared to the ApoE^{-/-} control animals.

Furthermore, the results showed that the viability of macrophages lacking CD84 was not altered *in vitro*.

The influence of CD84 on acute immune cell recruitment was investigated by different *in vivo* and *in vitro* experiments. A reduced recruitment of CD84^{-/-} proinflammatory Ly6Chigh monocytes was observed *in vivo* in the murine model of hindlimb ischemia, but not in the air pouch model.

Furthermore, neither an alteration in adhesion and chemotactic transmigration of monocytes *in vitro* nor in immune cell recruitment to atherosclerotic lesions could be detected in Ldlr^{-/-} mice *in vivo* in the absence of CD84.

Furthermore, it could be shown that although CD84 is not important for integrin expression on monocytes, it is important for the adequate activation of LFA-1 on T cells.

In summary, this work contributes to the further understanding of the process of atherogenesis and the functional significance of CD84 within this process as well as in the context of immune cell recruitment and integrin activation.

These findings may help to develop new pharmacological therapeutic approaches to intervene more specifically in inflammatory processes co-regulated by CD84, such as atherosclerosis.

Research that address the specific functional characteristics of CD84 with respect to immune cell recruitment and integrin activation could help to further resolve the contribution of CD84 to atherosclerosis.

Literaturverzeichnis

- Ait-Oufella, H., Sage, A. P., Mallat, Z., & Tedgui, A. (2014). Adaptive (T and B cells) immunity and control by dendritic cells in atherosclerosis. *Circ Res*, *114*(10), 1640-1660. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302761
- Alvarez-Errico, D., Oliver-Vila, I., Ainsua-Enrich, E., Gilfillan, A. M., Picado, C., Sayos, J., & Martin, M. (2011). CD84 negatively regulates IgE high-affinity receptor signaling in human mast cells. *J Immunol*, *187*(11), 5577-5586. doi:10.4049/jimmunol.1101626
- An, G., Wang, H., Tang, R., Yago, T., McDaniel, J. M., McGee, S., . . . Xia, L. (2008). P-selectin glycoprotein ligand-1 is highly expressed on Ly-6Chi monocytes and a major determinant for Ly-6Chi monocyte recruitment to sites of atherosclerosis in mice. *Circulation*, *117*(25), 3227-3237. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.771048
- Andersson, J., Libby, P., & Hansson, G. K. (2010). Adaptive immunity and atherosclerosis. *Clin Immunol*, *134*(1), 33-46. doi:10.1016/j.clim.2009.07.002
- Aparicio-Vergara, M., Shiri-Sverdlov, R., de Haan, G., & Hofker, M. H. (2010). Bone marrow transplantation in mice as a tool for studying the role of hematopoietic cells in metabolic and cardiovascular diseases. *Atherosclerosis*, *213*(2), 335-344. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.05.030
- Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., . . . Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*, *317*(5838), 666-670. doi:10.1126/science.1142883
- Auffray, C., Fogg, D. K., Narni-Mancinelli, E., Senechal, B., Trouillet, C., Saederup, N., . . . Geissmann, F. (2009). CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med*, *206*(3), 595-606. doi:10.1084/jem.20081385
- Bennett, M. R., Sinha, S., & Owens, G. K. (2016). Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res*, *118*(4), 692-702. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306361
- Berlin, C., Bargatze, R. F., Campbell, J. J., von Andrian, U. H., Szabo, M. C., Hasslen, S. R., . . . Butcher, E. C. (1995). alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell*, *80*(3), 413-422. doi:10.1016/0092-8674(95)90491-3
- Binsky-Ehrenreich, I., Marom, A., Sobotta, M. C., Shvidel, L., Berrebi, A., Hazan-Halevy, I., . . . Shachar, I. (2014). CD84 is a survival receptor for CLL cells. *Oncogene*, *33*(8), 1006-1016. doi:10.1038/onc.2013.31
- Boyman, O., & Sprent, J. (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol*, *12*(3), 180-190. doi:10.1038/nri3156
- Buono, C., Pang, H., Uchida, Y., Libby, P., Sharpe, A. H., & Lichtman, A. H. (2004). B7-1/B7-2 costimulation regulates plaque antigen-specific T-cell responses and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*, *109*(16), 2009-2015. doi:10.1161/01.CIR.0000127121.16815.F1

- Butcher, M. J., & Galkina, E. V. (2012). Phenotypic and functional heterogeneity of macrophages and dendritic cell subsets in the healthy and atherosclerosis-prone aorta. *Front Physiol*, 3, 44. doi:10.3389/fphys.2012.00044
- Campbell, J. H., & Campbell, G. R. (1994). The role of smooth muscle cells in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 5(5), 323-330. doi:10.1097/00041433-199410000-00003
- Canfield, A. E., Wren, F. E., Schor, S. L., Grant, M. E., & Schor, A. M. (1992). Aortic endothelial cell heterogeneity in vitro. Lack of association between morphological phenotype and collagen biosynthesis. *J Cell Sci*, 102 (Pt 4), 807-814.
- Cannons, J. L., Qi, H., Lu, K. T., Dutta, M., Gomez-Rodriguez, J., Cheng, J., . . . Schwartzberg, P. L. (2010). Optimal germinal center responses require a multistage T cell:B cell adhesion process involving integrins, SLAM-associated protein, and CD84. *Immunity*, 32(2), 253-265. doi:10.1016/j.immuni.2010.01.010
- Chappell, J., Harman, J. L., Narasimhan, V. M., Yu, H., Foote, K., Simons, B. D., . . . Jorgensen, H. F. (2016). Extensive Proliferation of a Subset of Differentiated, yet Plastic, Medial Vascular Smooth Muscle Cells Contributes to Neointimal Formation in Mouse Injury and Atherosclerosis Models. *Circ Res*, 119(12), 1313-1323. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309799
- Chen, H. C. (2005). Boyden chamber assay. *Methods Mol Biol*, 294, 15-22.
- Clarke, M. C., Figg, N., Maguire, J. J., Davenport, A. P., Goddard, M., Littlewood, T. D., & Bennett, M. R. (2006). Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat Med*, 12(9), 1075-1080. doi:10.1038/nm1459
- Cochain, C., Rodero, M. P., Vilar, J., Recalde, A., Richart, A. L., Loinard, C., . . . Silvestre, J. S. (2010). Regulation of monocyte subset systemic levels by distinct chemokine receptors controls post-ischaemic neovascularization. *Cardiovasc Res*, 88(1), 186-195. doi:10.1093/cvr/cvq153
- Cochain, C., Vafadarnejad, E., Arampatzi, P., Pelisek, J., Winkels, H., Ley, K., . . . Zerneck, A. (2018). Single-Cell RNA-Seq Reveals the Transcriptional Landscape and Heterogeneity of Aortic Macrophages in Murine Atherosclerosis. *Circ Res*, 122(12), 1661-1674. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.312509
- Cochain, C., & Zerneck, A. (2015). Macrophages and immune cells in atherosclerosis: recent advances and novel concepts. *Basic Res Cardiol*, 110(4), 34. doi:10.1007/s00395-015-0491-8
- Cochain, C., & Zerneck, A. (2017). Macrophages in vascular inflammation and atherosclerosis. *Pflugers Arch*, 469(3-4), 485-499. doi:10.1007/s00424-017-1941-y
- Collins, R. G., Velji, R., Guevara, N. V., Hicks, M. J., Chan, L., & Beaudet, A. L. (2000). P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med*, 191(1), 189-194.
- Combadiere, C., Potteaux, S., Rodero, M., Simon, T., Pezard, A., Esposito, B., . . . Mallat, Z. (2008). Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytes and almost abolishes

- atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation*, 117(13), 1649-1657. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.745091
- de la Fuente, M. A., Pizcueta, P., Nadal, M., Bosch, J., & Engel, P. (1997). CD84 leukocyte antigen is a new member of the Ig superfamily. *Blood*, 90(6), 2398-2405.
- de la Fuente, M. A., Tovar, V., Pizcueta, P., Nadal, M., Bosch, J., & Engel, P. (1999). Molecular cloning, characterization, and chromosomal localization of the mouse homologue of CD84, a member of the CD2 family of cell surface molecules. *Immunogenetics*, 49(4), 249-255. doi:10.1007/s002510050490
- Duarte, D. B., Vasko, M. R., & Fehrenbacher, J. C. (2016). Models of Inflammation: Carrageenan Air Pouch. *Curr Protoc Pharmacol*, 72, 5 6 1-9. doi:10.1002/0471141755.ph0506s72
- Dunne, J. L., Ballantyne, C. M., Beaudet, A. L., & Ley, K. (2002). Control of leukocyte rolling velocity in TNF-alpha-induced inflammation by LFA-1 and Mac-1. *Blood*, 99(1), 336-341. doi:10.1182/blood.v99.1.336
- Edwards, J. C., Sedgwick, A. D., & Willoughby, D. A. (1981). 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), 147-156. doi:10.1002/path.1711340205
- Emini Veseli, B., Perrotta, P., De Meyer, G. R. A., Roth, L., Van der Donckt, C., Martinet, W., & De Meyer, G. R. Y. (2017). Animal models of atherosclerosis. *Eur J Pharmacol*, 816, 3-13. doi:10.1016/j.ejphar.2017.05.010
- Ende, G., Poitz, D. M., Wiedemann, E., Augstein, A., Friedrichs, J., Giebe, S., . . . Jellinghaus, S. (2014). TNF-alpha-mediated adhesion of monocytes to endothelial cells-The role of ephrinA1. *J Mol Cell Cardiol*, 77, 125-135. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.10.010
- Fagerberg, L., Hallstrom, B. M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., . . . Uhlen, M. (2014). Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 13(2), 397-406. doi:10.1074/mcp.M113.035600
- Gahmberg, C. G., Tolvanen, M., & Kotovuori, P. (1997). Leukocyte adhesion--structure and function of human leukocyte beta2-integrins and their cellular ligands. *Eur J Biochem*, 245(2), 215-232.
- Galis, Z. S., Sukhova, G. K., Lark, M. W., & Libby, P. (1994). Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 94(6), 2493-2503. doi:10.1172/JCI117619
- Gautier, E. L., Huby, T., Saint-Charles, F., Ouzilleau, B., Pirault, J., Deswaerte, V., . . . Lesnik, P. (2009). Conventional dendritic cells at the crossroads between immunity and cholesterol homeostasis in atherosclerosis. *Circulation*, 119(17), 2367-2375. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.807537
- Gerhardt, T., & Ley, K. (2015). Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovasc Res*, 107(3), 321-330. doi:10.1093/cvr/cvv147
- Getz, G. S., & Reardon, C. A. (2016). Do the Apoe^{-/-} and Ldlr^{-/-} Mice Yield the Same Insight on Atherogenesis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 36(9), 1734-1741. doi:10.1161/ATVBAHA.116.306874

- Gimbrone, M. A., Jr., & Garcia-Cardena, G. (2016). Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*, *118*(4), 620-636. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306301
- Ginhoux, F., & Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol*, *14*(6), 392-404. doi:10.1038/nri3671
- Gomez, D., & Owens, G. K. (2012). Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, *95*(2), 156-164. doi:10.1093/cvr/cvs115
- Gordon, S. (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, *111*(7), 927-930. doi:10.1016/s0092-8674(02)01201-1
- Grabner, R., Lotzer, K., Dopping, S., Hildner, M., Radke, D., Beer, M., . . . Habenicht, A. J. (2009). Lymphotoxin beta receptor signaling promotes tertiary lymphoid organogenesis in the aorta adventitia of aged ApoE^{-/-} mice. *J Exp Med*, *206*(1), 233-248. doi:10.1084/jem.20080752
- Gute, D. C., Ishida, T., Yarimizu, K., & Korthuis, R. J. (1998). Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem*, *179*(1-2), 169-187. doi:10.1023/a:1006832207864
- Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Dohner, H., . . . International Workshop on Chronic Lymphocytic, L. (2008). Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*, *111*(12), 5446-5456. doi:10.1182/blood-2007-06-093906
- Hamilton, J. A., Myers, D., Jessup, W., Cochrane, F., Byrne, R., Whitty, G., & Moss, S. (1999). Oxidized LDL can induce macrophage survival, DNA synthesis, and enhanced proliferative response to CSF-1 and GM-CSF. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *19*(1), 98-105.
- Hansson, G. K., & Hermansson, A. (2011). The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol*, *12*(3), 204-212. doi:10.1038/ni.2001
- Hansson, G. K., & Libby, P. (2006). The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, *6*(7), 508-519. doi:10.1038/nri1882
- Hansson, G. K., Robertson, A. K., & Soderberg-Naucler, C. (2006). Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*, *1*, 297-329. doi:10.1146/annurev.pathol.1.110304.100100
- Hofmann, S., Braun, A., Pozgaj, R., Morowski, M., Vogtle, T., & Nieswandt, B. (2014). Mice lacking the SLAM family member CD84 display unaltered platelet function in hemostasis and thrombosis. *PLoS One*, *9*(12), e115306. doi:10.1371/journal.pone.0115306
- Hogg, N., Henderson, R., Leitinger, B., McDowall, A., Porter, J., & Stanley, P. (2002). Mechanisms contributing to the activity of integrins on leukocytes. *Immunol Rev*, *186*, 164-171. doi:10.1034/j.1600-065x.2002.18614.x
- Hume, D. A., & Gordon, S. (1983). Optimal conditions for proliferation of bone marrow-derived mouse macrophages in culture: the roles of CSF-1, serum, Ca²⁺, and adherence. *J Cell Physiol*, *117*(2), 189-194. doi:10.1002/jcp.1041170209

- Imhof, B. A., & Aurrand-Lions, M. (2004). Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol*, 4(6), 432-444. doi:10.1038/nri1375
- Ishibashi, S., Brown, M. S., Goldstein, J. L., Gerard, R. D., Hammer, R. E., & Herz, J. (1993). Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest*, 92(2), 883-893. doi:10.1172/JCI116663
- Ishibashi, S., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Herz, J., & Burns, D. K. (1994). Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest*, 93(5), 1885-1893. doi:10.1172/JCI117179
- Issekutz, T. B. (1995). In vivo blood monocyte migration to acute inflammatory reactions, IL-1 alpha, TNF-alpha, IFN-gamma, and C5a utilizes LFA-1, Mac-1, and VLA-4. The relative importance of each integrin. *J Immunol*, 154(12), 6533-6540.
- Johnson, J. L. (2017). Metalloproteinases in atherosclerosis. *Eur J Pharmacol*, 816, 93-106. doi:10.1016/j.ejphar.2017.09.007
- Jonasson, L., Holm, J., Skalli, O., Bondjers, G., & Hansson, G. K. (1986). Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*, 6(2), 131-138.
- Konstandin, M. H., Sester, U., Klemke, M., Weschenfelder, T., Wabnitz, G. H., & Samstag, Y. (2006). A novel flow-cytometry-based assay for quantification of affinity and avidity changes of integrins. *J Immunol Methods*, 310(1-2), 67-77. doi:10.1016/j.jim.2005.12.005
- Kovanen, P. T. (2007). Mast cells: multipotent local effector cells in atherothrombosis. *Immunol Rev*, 217, 105-122. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00515.x
- Kurihara, T., Warr, G., Loy, J., & Bravo, R. (1997). Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med*, 186(10), 1757-1762.
- Lewinsky, H., Barak, A. F., Huber, V., Kramer, M. P., Radomir, L., Sever, L., . . . Shachar, I. (2018). CD84 regulates PD-1/PD-L1 expression and function in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*, 128(12), 5465-5478. doi:10.1172/JCI96610
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., & Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7(9), 678-689. doi:10.1038/nri2156
- Lhotak, S., Gyulay, G., Cutz, J. C., Al-Hashimi, A., Trigatti, B. L., Richards, C. D., . . . Austin, R. C. (2016). Characterization of Proliferating Lesion-Resident Cells During All Stages of Atherosclerotic Growth. *J Am Heart Assoc*, 5(8). doi:10.1161/JAHA.116.003945
- Li, Y. C., Kuan, Y. H., Lee, S. S., Huang, F. M., & Chang, Y. C. (2014). Cytotoxicity and genotoxicity of chlorhexidine on macrophages in vitro. *Environ Toxicol*, 29(4), 452-458. doi:10.1002/tox.21771
- Lichtman, A. H., Cybulsky, M., & Luscinskas, F. W. (1996). Immunology of atherosclerosis: the promise of mouse models. *Am J Pathol*, 149(2), 351-357.
- Lin, J., Kakkar, V., & Lu, X. (2014). Impact of MCP-1 in atherosclerosis. *Curr Pharm Des*, 20(28), 4580-4588.

- Linton, M. F., Babaev, V. R., Huang, J., Linton, E. F., Tao, H., & Yancey, P. G. (2016). Macrophage Apoptosis and Efferocytosis in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ J*, *80*(11), 2259-2268. doi:10.1253/circj.CJ-16-0924
- Lundberg, A. M., & Hansson, G. K. (2010). Innate immune signals in atherosclerosis. *Clin Immunol*, *134*(1), 5-24. doi:10.1016/j.clim.2009.07.016
- Luscinskas, F. W., Gerszten, R. E., Garcia-Zepeda, E. A., Lim, Y. C., Yoshida, M., Ding, H. A., . . . Rosenzweig, A. (2000). C-C and C-X-C chemokines trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Ann N Y Acad Sci*, *902*, 288-293.
- Manthey, H. D., Cochain, C., Barnsteiner, S., Karshovska, E., Pelisek, J., Koch, M., . . . Zerneck, A. (2013). CCR6 selectively promotes monocyte mediated inflammation and atherogenesis in mice. *Thromb Haemost*, *110*(6), 1267-1277. doi:10.1160/TH13-01-0017
- Marlin, S. D., & Springer, T. A. (1987). Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell*, *51*(5), 813-819.
- Marom, A., Barak, A. F., Kramer, M. P., Lewinsky, H., Binsky-Ehrenreich, I., Cohen, S., . . . Shachar, I. (2017). CD84 mediates CLL-microenvironment interactions. *Oncogene*, *36*(5), 628-638. doi:10.1038/onc.2016.238
- Martin, M., Romero, X., de la Fuente, M. A., Tovar, V., Zapater, N., Esplugues, E., . . . Engel, P. (2001). CD84 functions as a homophilic adhesion molecule and enhances IFN-gamma secretion: adhesion is mediated by Ig-like domain 1. *J Immunol*, *167*(7), 3668-3676.
- Martinet, W., Schrijvers, D. M., & De Meyer, G. R. (2012). Molecular and cellular mechanisms of macrophage survival in atherosclerosis. *Basic Res Cardiol*, *107*(6), 297. doi:10.1007/s00395-012-0297-x
- McKellar, G. E., McCarey, D. W., Sattar, N., & McInnes, I. B. (2009). Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease. *Nat Rev Cardiol*, *6*(6), 410-417. doi:10.1038/nrcardio.2009.57
- Mestas, J., & Ley, K. (2008). Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*, *18*(6), 228-232. doi:10.1016/j.tcm.2008.11.004
- Min, J. K., Kim, Y. M., Kim, S. W., Kwon, M. C., Kong, Y. Y., Hwang, I. K., . . . Kwon, Y. G. (2005). TNF-related activation-induced cytokine enhances leukocyte adhesiveness: induction of ICAM-1 and VCAM-1 via TNF receptor-associated factor and protein kinase C-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells. *J Immunol*, *175*(1), 531-540.
- Morawietz, H. (2007). LOX-1 and atherosclerosis: proof of concept in LOX-1-knockout mice. *Circ Res*, *100*(11), 1534-1536. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.101105
- Morra, M., Lu, J., Poy, F., Martin, M., Sayos, J., Calpe, S., . . . Terhorst, C. (2001). Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells. *EMBO J*, *20*(21), 5840-5852. doi:10.1093/emboj/20.21.5840
- Napoli, C., D'Armiento, F. P., Mancini, F. P., Postiglione, A., Witztum, J. L., Palumbo, G., & Palinski, W. (1997). Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation

- of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*, 100(11), 2680-2690. doi:10.1172/JCI119813
- Owen, D. R., Lindsay, A. C., Choudhury, R. P., & Fayad, Z. A. (2011). Imaging of atherosclerosis. *Annu Rev Med*, 62, 25-40. doi:10.1146/annurev-med-041709-133809
- Park, Y. M. (2014). CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Exp Mol Med*, 46, e99. doi:10.1038/emm.2014.38
- Paulson, K. E., Zhu, S. N., Chen, M., Nurmohamed, S., Jongstra-Bilen, J., & Cybulsky, M. I. (2010). Resident intimal dendritic cells accumulate lipid and contribute to the initiation of atherosclerosis. *Circ Res*, 106(2), 383-390. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.210781
- Paulsson, G., Zhou, X., Tornquist, E., & Hansson, G. K. (2000). Oligoclonal T cell expansions in atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20(1), 10-17.
- Piedrahita, J. A., Zhang, S. H., Hagaman, J. R., Oliver, P. M., & Maeda, N. (1992). Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(10), 4471-4475. doi:10.1073/pnas.89.10.4471
- Posimo, J. M., Unnithan, A. S., Gleixner, A. M., Choi, H. J., Jiang, Y., Pulugulla, S. H., & Leak, R. K. (2014). Viability assays for cells in culture. *J Vis Exp*(83), e50645. doi:10.3791/50645
- Rafieian-Kopaei, M., Setorki, M., Douidi, M., Baradaran, A., & Nasri, H. (2014). Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med*, 5(8), 927-946.
- Regan, R. D., Fenyk-Melody, J. E., Tran, S. M., Chen, G., & Stocking, K. L. (2016). Comparison of Submental Blood Collection with the Retroorbital and Submandibular Methods in Mice (*Mus musculus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 55(5), 570-576.
- Reindel, R., Bischof, J., Kim, K. Y., Orenstein, J. M., Soares, M. B., Baker, S. C., . . . Rowley, A. H. (2014). CD84 is markedly up-regulated in Kawasaki disease arteriopathy. *Clin Exp Immunol*, 177(1), 203-211. doi:10.1111/cei.12327
- Rekhter, M. D. (1999). Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. *Cardiovasc Res*, 41(2), 376-384. doi:10.1016/s0008-6363(98)00321-6
- Robbins, C. S., Chudnovskiy, A., Rauch, P. J., Figueiredo, J. L., Iwamoto, Y., Gorbатов, R., . . . Swirski, F. K. (2012). Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6C(high) monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. *Circulation*, 125(2), 364-374. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.061986
- Robbins, C. S., Hilgendorf, I., Weber, G. F., Theurl, I., Iwamoto, Y., Figueiredo, J. L., . . . Swirski, F. K. (2013). Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med*, 19(9), 1166-1172. doi:10.1038/nm.3258
- Romero, X., Benitez, D., March, S., Vilella, R., Miralpeix, M., & Engel, P. (2004). Differential expression of SAP and EAT-2-binding leukocyte cell-surface molecules CD84, CD150 (SLAMF6), CD229 (Ly9) and CD244 (2B4). *Tissue Antigens*, 64(2), 132-144. doi:10.1111/j.1399-0039.2004.00247.x

- Romero, X., Zapater, N., Calvo, M., Kalko, S. G., de la Fuente, M. A., Tovar, V., . . . Engel, P. (2005). CD229 (Ly9) lymphocyte cell surface receptor interacts homophilically through its N-terminal domain and relocalizes to the immunological synapse. *J Immunol*, *174*(11), 7033-7042.
- Roncagalli, R., Taylor, J. E., Zhang, S., Shi, X., Chen, R., Cruz-Munoz, M. E., . . . Veillette, A. (2005). Negative regulation of natural killer cell function by EAT-2, a SAP-related adaptor. *Nat Immunol*, *6*(10), 1002-1010. doi:10.1038/ni1242
- Rong, J. X., Shapiro, M., Trogan, E., & Fisher, E. A. (2003). Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(23), 13531-13536. doi:10.1073/pnas.1735526100
- Ross, R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, *362*(6423), 801-809. doi:10.1038/362801a0
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, *340*(2), 115-126. doi:10.1056/NEJM199901143400207
- Schenkel, A. R., Mamdouh, Z., & Muller, W. A. (2004). Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nat Immunol*, *5*(4), 393-400. doi:10.1038/ni1051
- Serbina, N. V., Jia, T., Hohl, T. M., & Pamer, E. G. (2008). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol*, *26*, 421-452. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326
- Serbina, N. V., & Pamer, E. G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol*, *7*(3), 311-317. doi:10.1038/ni1309
- Serbina, N. V., Salazar-Mather, T. P., Biron, C. A., Kuziel, W. A., & Pamer, E. G. (2003). TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity*, *19*(1), 59-70.
- Shi, C., & Pamer, E. G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*, *11*(11), 762-774. doi:10.1038/nri3070
- Sintes, J., Romero, X., de Salort, J., Terhorst, C., & Engel, P. (2010). Mouse CD84 is a pan-leukocyte cell-surface molecule that modulates LPS-induced cytokine secretion by macrophages. *J Leukoc Biol*, *88*(4), 687-697. doi:10.1189/jlb.1109756
- Skalen, K., Gustafsson, M., Rydberg, E. K., Hulten, L. M., Wiklund, O., Innerarity, T. L., & Boren, J. (2002). Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*, *417*(6890), 750-754. doi:10.1038/nature00804
- Soehnlein, O., Drechsler, M., Doring, Y., Lievens, D., Hartwig, H., Kemmerich, K., . . . Weber, C. (2013). Distinct functions of chemokine receptor axes in the atherogenic mobilization and recruitment of classical monocytes. *EMBO Mol Med*, *5*(3), 471-481. doi:10.1002/emmm.201201717
- Springer, T. A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, *346*(6283), 425-434. doi:10.1038/346425a0
- Stary, H. C., Chandler, A. B., Glagov, S., Guyton, J. R., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M. E., . . . Wissler, R. W. (1994). A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on

- Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 89(5), 2462-2478.
- Stegemann, J. P., Hong, H., & Nerem, R. M. (2005). Mechanical, biochemical, and extracellular matrix effects on vascular smooth muscle cell phenotype. *J Appl Physiol (1985)*, 98(6), 2321-2327. doi:10.1152/jappphysiol.01114.2004
- Steiner, O., Coisne, C., Engelhardt, B., & Lyck, R. (2011). Comparison of immortalized bEnd5 and primary mouse brain microvascular endothelial cells as in vitro blood-brain barrier models for the study of T cell extravasation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31(1), 315-327. doi:10.1038/jcbfm.2010.96
- Stewart, M. P., Cabanas, C., & Hogg, N. (1996). T cell adhesion to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is controlled by cell spreading and the activation of integrin LFA-1. *J Immunol*, 156(5), 1810-1817.
- Tabas, I., Williams, K. J., & Boren, J. (2007). Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation*, 116(16), 1832-1844. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.676890
- Takagi, J., & Springer, T. A. (2002). Integrin activation and structural rearrangement. *Immunol Rev*, 186, 141-163. doi:10.1034/j.1600-065x.2002.18613.x
- Tangye, S. G., Nichols, K. E., Hare, N. J., & van de Weerd, B. C. (2003). Functional requirements for interactions between CD84 and Src homology 2 domain-containing proteins and their contribution to human T cell activation. *J Immunol*, 171(5), 2485-2495.
- Tangye, S. G., van de Weerd, B. C., Avery, D. T., & Hodgkin, P. D. (2002). CD84 is up-regulated on a major population of human memory B cells and recruits the SH2 domain containing proteins SAP and EAT-2. *Eur J Immunol*, 32(6), 1640-1649. doi:10.1002/1521-4141(200206)32:6<1640::AID-IMMU1640>3.0.CO;2-S
- Tedgui, A., & Mallat, Z. (2006). Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*, 86(2), 515-581. doi:10.1152/physrev.00024.2005
- Tsiantoulas, D., Diehl, C. J., Witztum, J. L., & Binder, C. J. (2014). B cells and humoral immunity in atherosclerosis. *Circ Res*, 114(11), 1743-1756. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.301145
- Tsou, C. L., Peters, W., Si, Y., Slaymaker, S., Aslanian, A. M., Weisberg, S. P., . . . Charo, I. F. (2007). Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest*, 117(4), 902-909. doi:10.1172/JCI29919
- Van Vre, E. A., Ait-Oufella, H., Tedgui, A., & Mallat, Z. (2012). Apoptotic cell death and efferocytosis in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32(4), 887-893. doi:10.1161/ATVBAHA.111.224873
- Varol, C., Yona, S., & Jung, S. (2009). Origins and tissue-context-dependent fates of blood monocytes. *Immunol Cell Biol*, 87(1), 30-38. doi:10.1038/icb.2008.90
- Veillette, A. (2006). Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Nat Rev Immunol*, 6(1), 56-66. doi:10.1038/nri1761

- Voloshyna, I., Littlefield, M. J., & Reiss, A. B. (2014). Atherosclerosis and interferon-gamma: new insights and therapeutic targets. *Trends Cardiovasc Med*, 24(1), 45-51. doi:10.1016/j.tcm.2013.06.003
- Wagner, E. F., & Risau, W. (1994). Oncogenes in the study of endothelial cell growth and differentiation. *Semin Cancer Biol*, 5(2), 137-145.
- Watanabe, T., & Fan, J. (1998). Atherosclerosis and inflammation mononuclear cell recruitment and adhesion molecules with reference to the implication of ICAM-1/LFA-1 pathway in atherogenesis. *Int J Cardiol*, 66 Suppl 1, S45-53; discussion S55. doi:10.1016/s0167-5273(98)00147-8
- Weber, C., & Noels, H. (2011). Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*, 17(11), 1410-1422. doi:10.1038/nm.2538
- Weber, C., Zernecke, A., & Libby, P. (2008). The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol*, 8(10), 802-815. doi:10.1038/nri2415
- Wong, C. H., Heit, B., & Kubes, P. (2010). Molecular regulators of leucocyte chemotaxis during inflammation. *Cardiovasc Res*, 86(2), 183-191. doi:10.1093/cvr/cvq040
- Wong, E. B., Soni, C., Chan, A. Y., Domeier, P. P., Shwetank, Abraham, T., . . . Rahman, Z. S. (2015). B cell-intrinsic CD84 and Ly108 maintain germinal center B cell tolerance. *J Immunol*, 194(9), 4130-4143. doi:10.4049/jimmunol.1403023
- Woollard, K. J., & Geissmann, F. (2010). Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol*, 7(2), 77-86. doi:10.1038/nrcardio.2009.228
- World Health Organization. (2018). Deaths by cause, age, sex, by country and by region, 2000-2016. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- Xu, H., Manivannan, A., Crane, I., Dawson, R., & Liversidge, J. (2008). Critical but divergent roles for CD62L and CD44 in directing blood monocyte trafficking in vivo during inflammation. *Blood*, 112(4), 1166-1174. doi:10.1182/blood-2007-06-098327
- Yan, Q., Malashkevich, V. N., Fedorov, A., Fedorov, E., Cao, E., Lary, J. W., . . . Almo, S. C. (2007). Structure of CD84 provides insight into SLAM family function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(25), 10583-10588. doi:10.1073/pnas.0703893104
- Yla-Herttuala, S., Bentzon, J. F., Daemen, M., Falk, E., Garcia-Garcia, H. M., Herrmann, J., . . . Tokgozoglul, L. (2011). Stabilisation of atherosclerotic plaques. Position paper of the European Society of Cardiology (ESC) Working Group on atherosclerosis and vascular biology. *Thromb Haemost*, 106(1), 1-19. doi:10.1160/TH10-12-0784
- Zaiss, M., Hirtreiter, C., Rehli, M., Rehm, A., Kunz-Schughart, L. A., Andreesen, R., & Hennemann, B. (2003). CD84 expression on human hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*, 31(9), 798-805.
- Zernecke, A. (2015). Dendritic cells in atherosclerosis: evidence in mice and humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35(4), 763-770. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303566

- Zernecke, A., Shagdarsuren, E., & Weber, C. (2008). Chemokines in atherosclerosis: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(11), 1897-1908. doi:10.1161/ATVBAHA.107.161174
- Zernecke, A., & Weber, C. (2014). Chemokines in atherosclerosis: proceedings resumed. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34(4), 742-750. doi:10.1161/ATVBAHA.113.301655
- Zhang, S. H., Reddick, R. L., Piedrahita, J. A., & Maeda, N. (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*, 258(5081), 468-471.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter und Mentorin Prof. Dr. Alma Zernecke-Madsen für das Thema, die vielfältigen mir zur Verfügung gestellten Arbeitsmöglichkeiten und für die fachliche und persönliche Unterstützung und Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit. Der regelmäßige konstruktive Austausch auf fachlicher und persönlicher Ebene waren mir immer eine große Hilfe und haben mich stets positiv beeinflusst und ermutigt.

Dr. Clément Cochain danke ich herzlich für die intensive Betreuung, Hilfestellung und wertvollen Ratschläge im Labor und zu dieser Arbeit während der gesamten Zeit. Weiterhin danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Biomedizin des Universitätsklinikums Würzburg, die einen maßgeblichen Anteil an der Realisierung dieser Arbeit haben. Hervorzuheben sind hierbei insbesondere Dr. Jesús Gil Pulido, Prof. Dr. Elke Butt, Petra Hönig-Liedl, Melanie Schott und Paulina Stürzebecher. Ebenfalls danke ich den Mitgliedern meines Promotionskomitees Dr. Erik Henke und Prof. Dr. Bernhard Nieswandt für Ihre Unterstützung. Außerdem danke ich der Graduate School of Life Sciences (GSLs) Würzburg für die Begleitung, materielle sowie immaterielle Unterstützung während der gesamten Zeit. Darüber hinaus danke ich der Deutschen Herzstiftung e.V. für die Förderung des Projektes im Rahmen des Kaltbach-Doktorandenstipendiums zwischen Februar 2018 und Januar 2019.

Mein besonderer Dank gilt schließlich meinen Eltern und meiner gesamten Familie, die mir alles ermöglicht haben und stets unterstützend hinter mir standen sowie insbesondere Thyra für ihre stetige wundervolle persönliche Unterstützung in allen Situationen, vielen Dank!

Publikationen

Gil-Pulido J, Cochain C, Lippert MA, Schneider N, Butt E, Amézaga N, et al. (2017) Deletion of Batf3-dependent antigen-presenting cells does not affect atherosclerotic lesion formation in mice. PLoS ONE 12(8): e0181947. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.018194>

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Die Rolle von CD84 in der Immunzellrekrutierung der Atherosklerose“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

