

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jens W. Fischer

**Untersuchung des Einflusses des Lymphotoxin β Rezeptors
auf die Funktion von Leukozyten und speziell von Makrophagen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Jan Nikolaus Waldheim
2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Maria Grandoch

Zweitgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Dr. Miriam Margherita Cortese-Krott

Meiner Frau und meinen Eltern

*„Anfangs wollt ich fast verzagen,
Und ich glaubt' ich trüg' es nie,
Und ich hab' es doch getragen, –
Aber fragt mich nur nicht, wie?“*

Heinrich Heine

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Grandoch M, Feldmann K, Göthert JR, Dick LS, Homann S, Klatt C, Bayer JK, **Waldheim JN**, Rabausch B, Nagy N, Oberhuber A, Deenen R, Köhler K, Lehr S, Homey B, Pfeffer K, Fischer JW. Deficiency in lymphotoxin β receptor protects from atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Circ Res.* 2015;116(8):e57-68

Zusammenfassung

Der Lymphotoxin β Rezeptor (LT β R) gehört zur Tumor-Nekrose-Faktoren-Superfamilie. Als LT β R-Liganden sind Lymphotoxin $\alpha_1\beta_2$ (LT $\alpha_1\beta_2$) und *LIGHT* (*lymphotoxin-like inducible protein that competes with glycoprotein D for binding herpesvirus entry mediator on T cells*) bekannt, die über den LT β R den klassischen und alternativen NF κ B-Weg aktivieren und in Inflammationsprozesse eingebunden sein können. Zudem ist der LT β R essentiell für die Ausbildung sekundär lymphatischer Organe. Durch LT β R-Aktivierung konnten sowohl proinflammatorische Wirkungen bei zahlreichen Krankheitsbildern wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis, der autoimmunen Pankreatitis und viralen Hepatitiden, als auch antiinflammatorische Effekte z.B. im Rahmen der akuten Kolitis gezeigt werden. Hiesige Untersuchungen zeigten, dass Apolipoprotein E (*Apoe*) und *Lt β r*-doppeldefiziente Mäuse (*Apoe*^{-/-}/*Lt β r*^{-/-}), die 15 Wochen eine fett- und cholesterinreiche Western-Diät erhielten, eine geringere Ausprägung atherosklerotischer Plaques sowie eine reduzierte Anzahl an Makrophagen in den atherosklerotischen Läsionen zeigten als die entsprechenden *Apoe*-defizienten Kontrolltiere (*Apoe*^{-/-}). Speziell Makrophagen und zirkulierende Monozyten sind bei der Entstehung der Atherosklerose essentiell und spielen eine entscheidende Rolle für die Plaqueentstehung und die Plaquegröße.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Einfluss des LT β R auf die Eigenschaften von Leukozyten und speziell die der Makrophagen zu untersuchen. Dabei wurden a) das Migrationsverhalten von Leukozyten in die Peritonealhöhle und aus der Peritonealhöhle heraus unter dem Einfluss inflammatorischer Stimuli, b) das Proliferations- und c) das *Spreading*-Verhalten von Knochenmark-generierten Makrophagen *Apoe*-defizienter bzw. *Apoe/Lt β r*-doppeldefizienter Mäuse vergleichend betrachtet. Zudem wurde das Blutbild und speziell die Fraktion der Leukozyten unter Berücksichtigung von Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten untersucht.

Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens wurde die Leukozytenzahl in der Peritonealhöhle fünf Tage nach intraperitonealer (i.p.) Thioglykolat-Injektion sowie zusätzlich vier Stunden nach i.p. Lipopolysaccharid (LPS)-Injektion bestimmt. Zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens wurden Knochenmarksmakrophagen u.a. mit *M-CSF-1* oder einem am LT β R agonistisch wirkenden Antikörper bzw. LT $\alpha_1\beta_2$ für 48 Stunden stimuliert und anschließend die Zellzahl bestimmt. Zur Untersuchung des *Spreading*-Verhaltens wurden Knochenmarksmakrophagen zwei Stunden in Zellmedium auf *Coverslips* inkubiert, dann fixiert, gefärbt und die Zellfläche vermessen.

Die Anzahl an Leukozyten im Blut *Apoe/Lt β r*-doppeldefizienter Mäuse beider Geschlechter war signifikant höher als die im Blut *Apoe*-defizienter Mäuse. Dies betraf alle Fraktionen der Leukozyten (Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten) gleichermaßen.

Hinsichtlich der Leukozytenmigration in die Peritonealhöhle nach Thioglykolat-induzierter Peritonitis zeigte sich unter Berücksichtigung der beim *Apoe*^{-/-}/*Lt β r*^{-/-} vorliegenden Leukozytose kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen. Allerdings führte die i.p. Gabe von LPS vier Stunden vor Zellisolierung zu einer signifikant reduzierten Anzahl isolierter Zellen beim *Apoe*^{-/-} verglichen mit dem *Apoe*^{-/-}/*Lt β r*^{-/-}, was vermutlich auf die reduzierte Migration LT β R-defizienter Zellen aus der Peritonealhöhle heraus zurückzuführen ist. In *Apoe*-defizienten Kontrolltieren führte die Stimulation des LT β R über 48 Stunden mit dem selektiven Liganden LT $\alpha_1\beta_2$ zu einer signifikant erhöhten Proliferation der Makrophagen im Vergleich zu den unstimulierten Makrophagen. Ursächlich ist möglicherweise die stärkere Adhäsion LT β R-exprimierender Makrophagen *in vitro*, die durch ein signifikant verstärktes *Spreading* im Vergleich zu den LT β R-defizienten Makrophagen zwei Stunden nach Aussaat zum Ausdruck kam. Zusammenfassend ließ sich bei den Untersuchungen somit ein proliferativer Effekt bei Makrophagen *in vitro*, möglicherweise bedingt durch eine stärkere Adhäsion, und eine verstärkte Migration von Leukozyten unter Stimulation mit LPS aus der Peritonealhöhle heraus beim *Apoe*^{-/-} im Vergleich zum *Apoe*^{-/-}/*Lt β r*^{-/-} feststellen.

Summary

The lymphotoxin β receptor (LT β R) belongs to the tumor necrosis factor superfamily. Lymphotoxin $\alpha_1\beta_2$ (LT $\alpha_1\beta_2$) and LIGHT (lymphotoxin-like inducible protein that competes with glycoprotein D for binding herpesvirus entry mediator on T cells) are known as LT β R ligands. These LT β R ligands activate the classical and alternative NF κ B pathway via LT β R and could be involved in inflammatory processes. In addition, LT β R is essential for the formation of secondary lymphatic organs. By LT β R activation proinflammatory effects in many pathologies such as rheumatoid arthritis, autoimmune pancreatitis and viral hepatitis as well as anti-inflammatory effects e.g. in acute colitis were demonstrated. Previous studies have shown decreased amounts of atherosclerotic lesions and a reduced number of macrophages in the atherosclerotic lesions in Apolipoprotein E- (*Apoe*) and *Lt β r*-double-deficient mice (*Apoe*^{-/-}/*Lt β r*^{-/-}) that had received a fatty and cholesterol-rich Western diet for 15 weeks, compared to *Apoe*-deficient control animals (*Apoe*^{-/-}). Specifically, macrophages and circulating monocytes are essential in the development of atherosclerosis and play a crucial role in plaque formation and determination of plaque growth.

The aim of the present study has therefore been to investigate the influence of LT β R on leukocyte and especially macrophage function. To this end, a) migration of leukocytes into the peritoneal cavity and out of the peritoneal cavity under the influence of inflammatory stimuli, b) proliferation and c) spreading of bone marrow-derived macrophages were compared regarding *Apoe*-deficient and *Apoe/Lt β r*-double-deficient mice. In addition, the blood cell count and especially the fraction of leukocytes including monocytes, granulocytes and lymphocytes was examined.

To investigate the migratory capacity, leukocyte count in the peritoneal cavity was determined five days after intraperitoneal (i.p.) thioglycolate injection and additionally four hours after i.p. Lipopolysaccharide (LPS) injection. To examine proliferation, bone marrow-derived macrophages were used i.a. stimulated with M-CSF-1, LT β R agonistic antibody or LT $\alpha_1\beta_2$ for 48 hours followed by determination of cell number. To study the spreading behavior, bone marrow-derived macrophages were incubated in cell medium on coverslips for two hours. Thereafter, these macrophages were fixed, stained and the cell area was measured.

The number of leukocytes in the blood of *Apoe/Lt β r*-double-deficient mice of both sexes was significantly higher than those in the blood of *Apoe*-deficient mice. All fractions of leukocytes (monocytes, granulocytes and lymphocytes) were equally affected.

There was no significant difference between the genotypes regarding leukocyte migration into the peritoneal cavity after thioglycolate-induced peritonitis when taking the apparent leukocytosis in *Apoe*^{-/-}/*Lt β r*^{-/-} into account. However, i.p. injection of LPS four hours before cell isolation resulted in a significantly reduced number of isolated cells in the *Apoe*^{-/-} compared to the *Apoe*^{-/-}/*Lt β r*^{-/-}, presumably due to the reduced migration of LT β R-deficient cells out of the peritoneal cavity. In *Apoe*-deficient control animals, stimulation of LT β R for 48 hours with the selective ligand LT $\alpha_1\beta_2$ resulted in significantly increased macrophage proliferation compared to unstimulated macrophages. This might be based upon an increased adhesion of LT β R-expressing macrophages in vitro, which was shown by a significantly increased spreading compared to the LT β R-deficient macrophages two hours after seeding. In summary, a pro-proliferative effect on macrophages in vitro, possibly due to increased adhesion, and an increased migratory capacity of leukocytes under stimulation with LPS out of the peritoneal cavity in *Apoe*^{-/-} compared to the *Apoe*^{-/-}/*Lt β r*^{-/-} were observed.

Abkürzungsverzeichnis

ABCA1	<i>ATP-binding cassette transporter A1</i>
ACK-Puffer	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat-Puffer
ApoE, Apoe	Apolipoprotein E
BMI	<i>Body-Mass-Index</i>
BM-MSCs	<i>bone marrow-derived mesenchymal stem cells</i>
bp	<i>base pair</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
c-IAP1	<i>cellular inhibitor of apoptosis protein 1</i>
ca.	circa
CCL	C-C-Motiv-Chemokin-Ligand
CCR	C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm	Zentimeter
cm²	Quadratcentimeter
CMV	Cytomegalievirus
CX₃CR1	Chemokinrezeptor CX ₃ CR1
DC	<i>dendritic cell</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered saline</i>
DSS	<i>Dextran Sodium Sulfate</i>
EAE	experimentell induzierte Autoimmun-Encephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>

G	<i>Gauge</i>
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
GS	Größenstandard
HCC	<i>Hepatocellular carcinoma</i>
HCl	Salzsäure
HDL	<i>high-density lipoprotein</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HVEM	<i>herpesvirus entry mediator</i>
HZ	Heterozygot-Kontrolle
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IκBα	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha</i>
IKK$\alpha/\beta/\gamma$	<i>inducing kinase complex</i>
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase
i.p.	intraperitoneal
IU	<i>international unit</i>
kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	<i>Knockout (Apoe^{-/-}/Ltβr^{-/-})</i>
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LIGHT	<i>lymphotoxin-like inducible protein that competes with glycoprotein D for binding herpesvirus entry mediator on T cells</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LTα	Lymphotoxin α
LT$\alpha_1\beta_2$	Lymphotoxin $\alpha_1\beta_2$

LTβ	Lymphotoxin β
LTβR, <i>Ltβr</i>	Lymphotoxin β Rezeptor
LTβR-AK	agonistisch wirkender Lymphotoxin β Rezeptor-Antikörper
LTβR-Ig	antagonistisch wirkendes Lymphotoxin β Rezeptor-Immunglobulin
<i>LTIC</i>	<i>lymphoid tissue inducer cells</i>
<i>LTOC</i>	<i>lymphoid tissue organizer cells</i>
<i>Ly6C</i>	<i>lymphocyte antigen 6C</i>
M	Molar (mol/L)
m²	Quadratmeter
<i>Mac-1</i>	<i>macrophage-1 antigen</i>
<i>MadCAM-1</i>	<i>mucosal addressin cell adhesion molecule 1</i>
<i>M-CSF-1</i>	<i>Macrophage colony-stimulating factor-1</i>
<i>mGBP</i>	<i>murine guanylate-binding protein</i>
min	Minute
<i>MIP</i>	<i>macrophage inflammatory protein</i>
μL	Mikroliter
mL	Milliliter
μM	Mikromolar
mM	Millimolar
μm	Mikrometer
mm	Millimeter
mm²	Quadratmillimeter
<i>mRNA</i>	<i>messenger ribonucleic acid</i>
<i>Msr1</i>	<i>Macrophage Scavenger Receptor 1</i>
NaCl	Natriumchlorid
<i>NFκB</i>	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
<i>NIK</i>	<i>NFκB-inducing kinase</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle

NR4A1	Nukleärer Rezeptor 4A1
oxLDL	oxidiertes <i>low-density lipoprotein</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
qPCR	Quantitative <i>Real-Time-PCR</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
rRNA	ribosomale <i>ribonucleic acid</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Natriumlaurylsulfat)
sec	Sekunde
SEM	<i>standard error of the mean</i>
Smac	<i>second mitochondria-derived activator of caspase</i>
SR-A	<i>Scavenger Receptor Class A</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TIM	<i>TRAF-interacting motifs</i>
TLO	Tertiär lymphatische Organe
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tnfr	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRAF	<i>TNF-Receptor-associated factors</i>
TRIM30α	<i>tripartite motif 30α</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
VCAM-1	<i>vascular adhesion molecule-1</i>
WT	Wildtyp (<i>Apoe</i> ^{-/-})

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Entstehung der Atherosklerose.....	1
1.2	Monozyten und Makrophagen	3
1.3	Der Lymphotoxin β Rezeptor	4
1.3.1	Liganden des Lymphotoxin β Rezeptors	5
1.3.2	Signaltransduktion des Lymphotoxin β Rezeptors	5
1.3.3	Funktionen des Lymphotoxin β Rezeptors	6
1.3.3.1	Proinflammatorische Wirkung.....	6
1.3.3.2	Antiinflammatorische Wirkung	8
1.3.3.3	Ausbildung von sekundär und tertiär lymphatischen Organen	9
1.3.3.4	Wirkung auf den Lipidstoffwechsel	9
1.4	Ziele dieser Arbeit.....	10
2	Material und Methoden.....	12
2.1	Material	12
2.1.1	Geräte	12
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	13
2.1.3	Chemikalien, Medien und Reagenzien.....	14
2.1.4	Puffer und Lösungen	16
2.1.5	Stimulantien.....	16
2.1.6	Kits	17
2.1.7	Enzyme	17
2.1.8	Oligonukleotide.....	18
2.1.9	Software und Internet-Ressourcen.....	18
2.1.10	Statistische Auswertung	19
2.2	Methoden	19
2.2.1	Tiere und Genotypisierung	19
2.2.2	Bestimmung des Blutbildes	22
2.2.3	Isolierung von Peritonealzellen	22
2.2.4	Zellzählung	23
2.2.5	Isolierung von Peritonealzellen nach LPS-Stimulation.....	23
2.2.6	Isolierung von Knochenmarkszellen.....	23
2.2.7	Proliferationsmessung an Knochenmarksmakrophagen.....	24
2.2.8	Untersuchung des <i>Spreading</i> -Verhaltens	26
2.2.9	RNA-Isolierung	26
2.2.10	Quantitative <i>Real-Time-PCR</i> (qPCR).....	27

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	VIII
3 Ergebnisse.....	28
3.1 Gewicht und Größe.....	28
3.2 Blutbild.....	29
3.3 Bestimmung der Anzahl peritonealer Leukozyten.....	31
3.3.1 Leukozytenzahl in der Peritonealhöhle männlicher Mäuse.....	32
3.3.2 Leukozytenzahl in der Peritonealhöhle weiblicher Mäuse.....	33
3.3.3 Migrationsverhalten nach LPS-Stimulation.....	34
3.4 Knochenmarksmakrophagen.....	36
3.4.1 Anzahl an Monozyten und deren Vorläuferzellen im Knochenmark.....	36
3.4.2 Proliferation von Knochenmarksmakrophagen.....	38
3.4.3 <i>Spreading</i> der Knochenmarksmakrophagen.....	42
3.4.4 Expression von <i>Scavenger Receptor Class A (CD204)</i>	44
4 Diskussion.....	45
4.1 Einfluss der LT β R-Defizienz auf das Blutbild.....	45
4.2 Einfluss des LT β R auf das Migrationsverhalten <i>in vivo</i>	47
4.3 Einfluss des LT β R auf das Proliferationsverhalten <i>in vitro</i>	50
4.4 Kritik und Ausblick.....	54
5 Literatur- und Quellenverzeichnis.....	56

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, den Einfluss des Lymphotoxin β Rezeptors (LT β R) auf die Immunzellfunktion im Rahmen der akzelerierten Atherosklerose bei Apolipoprotein E (*ApoE*)-defizienten Mäusen zu untersuchen. Ausgehend von der anfänglichen Beobachtung, dass *ApoE/Lt β r*-doppeldefiziente Mäuse, die 15 Wochen eine fett- und cholesterinreiche Western-Diät erhielten, eine signifikant geringere Plaqueausprägung zeigten als die entsprechenden *ApoE*-defizienten Kontrolltiere, wurden im Rahmen dieser Studie Ursachen dafür erforscht. Dabei fiel vor allem eine signifikant reduzierte Anzahl an Makrophagen in den atherosklerotischen Läsionen der *ApoE/Lt β r*-doppeldefizienten Mäuse im Vergleich zu den *ApoE*-defizienten Kontrolltieren auf [1].

Dies warf die Frage auf, welchen Einfluss der LT β R bzw. dessen Aktivierung auf die Eigenschaften, genauer die Funktionen von Makrophagen hat.

1.1 Entstehung der Atherosklerose

„Atherosklerotische Läsionen (Atherome) sind asymmetrische fokale Verdickungen der innersten Gewebeschicht von Arterien, der Intima. Diese enthalten Zellen, Elemente interzellulärer Matrix, Lipide und Ablagerungen“ [2]. Damit stellt die Atherosklerose eine Unterform der Arteriosklerose dar, die als Oberbegriff für Verhärtungen der Arterien neben der Atherosklerose z.B. auch die Mönckeberg-Sklerose einschließt [3].

Hinsichtlich der Entstehung von Atherosklerose geht man davon aus, dass es initial u.a. zu einer Aktivierung von Endothelzellen beispielsweise durch oxidiertes *low-density lipoprotein* (oxLDL) in der Intima arterieller Gefäße kommt. Diese führt im Folgenden zu einer Dysfunktion und damit einhergehend zur Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, welche die Adhäsion von Leukozyten, darunter auch Monozyten, und Thrombozyten ermöglicht. Zudem erhöht sich die Permeabilität des Endothels für Plasmalipide wie LDL. Eingewanderte Monozyten inkorporieren oxLDL über *Scavenger*-Rezeptoren und werden zu sogenannten Schaumzellen [2]. So bilden sich *fatty streaks* in der Intima, die zu einer Verdickung der Gefäßwand führen [4]. Zudem kommt es zur Aktivierung von Makrophagen über *Toll-like* Rezeptoren (TLR), was zu einer Produktion von inflammatorischen Zytokinen, Proteasen und zytotoxischen Sauerstoffverbindungen sowie Stickstoffradikalen führt [2].

Durch Ansammlung weiterer Entzündungszellen und Lipide schreitet die Plaque-Progression voran und es bildet sich eine Kernregion, die von glatten Muskelzellen und kollagenreicher Matrix umschlossen ist. Die Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren befördert das Plaquewachstum. Außerdem führt die Gefäßneubildung in der Plaque zum Eindringen

weiterer Blutbestandteile in die atherosklerotischen Läsionen [4]. Sezernierte Proteasen bewirken eine fortschreitende Zerstörung der Plaquekappe, was eine Erosion und Plaqueruptur zur Folge hat. Die Freisetzung von Plaquebestandteilen und der entstehende Gewebedefekt aktivieren die Koagulation und Thrombusbildung und damit ein Vorschreiten der Gefäßverengung. Zunehmende Verengung oder die Verschleppung von Thromben im Rahmen der Plaqueruptur können dann zur Ausbildung der Symptome der Koronaren Herzkrankheit (KHK) oder gar einem Infarkt – vornehmlich einem Myokardinfarkt – führen [4].

Somit wird die Atherosklerose als chronisch-entzündliche Erkrankung angesehen, deren Entstehung durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener immunologischer Zelltypen charakterisiert ist [4].

Speziell Makrophagen und ihre Vorläuferzellen im Blut, die Monozyten, sind bei der Entstehung der Atherosklerose früh beteiligt [5] und spielen eine entscheidende Rolle für die Plaqueentstehung [6] und die Plaquegröße [7]. Bei den beteiligten Monozyten unterscheidet man zwei Gruppen, die sich über die unterschiedliche Ausprägung mehrerer Oberflächenmarker definieren und charakterisieren lassen. Bei Mäusen handelt es sich dabei um eine kurzlebige inflammatorische Untergruppe ($CX_3CR1^{low}CCR2^+Ly6C^{hi}$), die bei Entzündungen ins Gewebe rekrutiert wird, und eine Gruppe Monozyten ($CX_3CR1^{hi}CCR2^-Ly6C^{low}$), die gekennzeichnet ist durch ein CX_3CR1 -abhängiges *homing* in nicht entzündetem Gewebe. Es konnte gezeigt werden, dass die Gruppen der $Ly6C^{hi}$ -Monozyten sowie der $Ly6C^{low}$ -Monozyten, die bei Mäusen gefunden wurden, Korrelate humaner Monozyten-Untergruppen sind. So entsprechen die murinen $CX_3CR1^{low}CCR2^+Ly6C^{hi}$ -Monozyten den klassischen humanen $CD14^{hi}CD16^-$ -Monozyten und die murinen $CX_3CR1^{hi}CCR2^-Ly6C^{low}$ -Monozyten den humanen $CD14^+CD16^+CD64^-$ -Monozyten [8, 9].

Untersuchungen zur Atherosklerose am murinen Modell ergaben, dass beide Monozyten-Populationen eine wichtige Rolle im Rahmen dieser Erkrankung spielen. So führte eine Hyperlipidämie bei *Apoe*-defizienten Mäusen zu einer starken Infiltration von Plaques durch $Ly6C^{hi}$ -Monozyten, deren erhöhte Zahl bedingt war durch eine verlängerte Überlebenszeit, eine verstärkte Proliferation sowie eine verminderte Transformation in $Ly6C^{low}$ -Monozyten [10]. $Ly6C^{low}$ -Monozyten exprimieren den Chemokinrezeptor CCR5, welcher mit dem Vorschreiten der Atherosklerose assoziiert ist und vorrangig für die Migration von $Ly6C^{low}$ -Monozyten in die atherosklerotischen Läsionen verantwortlich ist [11]. Eine CCR5-Defizienz führte in Untersuchungen zu einer verminderten Anzahl von Monozyten bzw. Makrophagen in arteriellen Plaques sowie zu einer höheren Stabilität solcher Läsionen [12]. Auch die Ergebnisse der Arbeiten an unserem Institut und die darauf basierenden Schlussfolgerungen messen der Aktivierung des CCR5 eine wesentliche Bedeutung bei der Entstehung der Atherosklerose bei. So konnte gezeigt werden, dass Monozyten *Apoe*-defizienter Mäuse

nach Stimulation mit einem agonistischen $LT\beta R$ -Antikörper oder dem selektiven Liganden Lymphotoxin $\alpha_1\beta_2$ ($LT\alpha_1\beta_2$) signifikant mehr *mRNA* (*messenger ribonucleic acid*) des Chemokins CCL5, ein Ligand des CCR5, exprimieren als unstimulierte Monozyten. Zudem waren die CCL5-Spiegel im Blut *ApoE*-defizienter Mäuse signifikant höher als die bei *ApoE/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen. Vor diesem Hintergrund wird angenommen, dass die Aktivierung des $LT\beta R$ zu einer vermehrten Sezernierung von CCL5 durch *Ly6C^{low}*-Monozyten führt, welches eine autokrine Stimulation dieser Zellen zur Folge hat und damit ihre Migration in die Gefäßwand befördert [1].

1.2 Monozyten und Makrophagen

Monozyten, die Vorläufer der Makrophagen, gehören mit 9-20 μm zu den größten Zellen unter den Leukozyten [13]. Ihr Anteil an diesen liegt bei 5-10%. Hinsichtlich Größe, Gehalt an Granula sowie der Morphologie ihres Kerns variieren Monozyten stark [9].

Bei der Hämatopoese gilt es zu unterscheiden zwischen der embryonalen oder auch primitiven Hämatopoese im Dottersack sowie der fetalen und adulten oder auch definitiven Hämatopoese zunächst u.a. in der Leber und beim Erwachsenen im Knochenmark [14], [15]. Die der primitiven Hämatopoese entstammenden primitiven Makrophagen wandern in unterschiedliche Gewebe ein. Im Vergleich zu adulten Makrophagen zeigen diese ein ausgeprägtes Proliferationsverhalten, keine Peroxidase-Aktivität und gehen nicht aus Monozytenvorläufern hervor [15].

Beim adulten Organismus erfolgt die Hämatopoese und im Rahmen derer die Bildung von Monozyten im Knochenmark. Von pluripotenten Stammzellen ausgehend bilden sich zunächst u.a. gemeinsame Vorläuferzellen von Granulozyten und Monozyten (sog. *granulocyte/monocyte colony-forming units*). Diese entwickeln sich unter dem Einfluss von *Macrophage colony-stimulating factor-1* (*M-CSF-1*) zu alleinigen Monozyten-Vorläuferzellen, den sog. *Monocyte colony-forming units*. Aus diesen differenzieren sich Monoblasten, dann Promonozyten und schließlich Monozyten [9], [16].

In Gewebe eingewanderte primitive Makrophagen und adulte Monozyten, die dort weiter zu Makrophagen differenzieren, werden als residente Makrophagen bezeichnet. Sie dienen u.a. der Gewebemöostase z.B. dem Eisen-Recycling durch Phagozytose alter oder geschädigter Erythrozyten in der Milz [17]. Je nach Gewebe zeigen sie dabei spezifische Expressionsmuster [18]. Das Verhältnis von aus dem Dottersack stammenden primitiven Makrophagen zu definitiven Makrophagen variiert in den unterschiedlichen Geweben [18]. Im ZNS, wo die Gewebemakrophagen als Mikroglia bezeichnet werden, überwiegen Makrophagen aus dem Dottersack [19], die sich selbst Monozyten-unabhängig erneuern [20]. Diese weisen ein höheres proliferatives Potential auf und proliferieren *CSF-1*-Rezeptor-

und *CSF-1*-unabhängig im Vergleich zu adulten Makrophagen [19]. Bei Zerstörung dieser residenten Makrophagen kann aber ein Ersatz durch adulte zirkulierende Monozyten erfolgen [21].

Residente Makrophagen entstammen somit verschiedenen Quellen, wobei die aus dem Dottersack oder der fetalen Hämatopoese stammenden Makrophagen im Ruhezustand dominieren, während adulte Makrophagen nach Zerstörung dieser Populationen meist als Ersatz dienen [18].

Im Blut lassen sich bei Mäusen und Menschen, wie unter 1.1 bereits ausgeführt, zwei Gruppen von Monozyten unterscheiden. Eine kurzlebige inflammatorische Untergruppe – murine $CX_3CR1^{low}CCR2^+Ly6C^{hi}$ - bzw. humane $CD14^{hi}CD16^-$ -Monozyten – und die Untergruppe der murinen $CX_3CR1^{hi}CCR2^-Ly6C^{low}$ - bzw. humanen $CD14^+CD16^+CD64^-$ -Monozyten. Die erste Gruppe wandert unter inflammatorischen Einflüssen in Gewebe ein und differenziert dort zu inflammatorischen Makrophagen oder Dendritischen Zellen (*DC*) [8]. Im Ruhezustand allerdings wandeln sie sich getriggert durch den Transkriptionsfaktor NR4A1 – ein nukleärer Rezeptor – zur zweiten beschriebenen Untergruppe, den $CX_3CR1^{hi}CCR2^-Ly6C^{low}$ -Monozyten, um [22]. Ursprünglich ging man davon aus, dass diese allgemein Vorläufer der residenten Makrophagen seien [9]. Heute sieht man diese als residente Blut-Makrophagen, die geschädigte Endothelzellen phagozytieren und so für die vasculäre Homöostase sorgen [23].

Auch in der Peritonealhöhle lassen sich zwei Gruppen von Makrophagen unterscheiden: große und kleine peritoneale Makrophagen. Dabei überwiegt die Fraktion der großen Makrophagen im Ruhezustand, während sich bei einer Entzündung herbeigeführt durch Thioglykolat oder Lipopolysaccharid (LPS) das Verhältnis zugunsten der kleinen Makrophagen ändert. Die großen Makrophagen verschwinden und es rücken $Ly6C^{hi}$ -Monozyten aus dem Blut nach, die zu kleinen Makrophagen werden [24]. Nach Abklingen der Entzündung kommt es dann zur Proliferation der verbliebenen, ursprünglichen residenten Makrophagen und zum Wiederherstellen der Ausgangssituation [25].

1.3 Der Lymphotoxin β Rezeptor

Der $LT\beta R$ gehört zur Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF) [26]. Bei dem Rezeptor handelt es sich um ein Typ-I-Transmembran glykoprotein (intrazellulärer C-Terminus), bei dem vier cysteinreiche Wiederholungen in der extrazellulären Domäne die Spezifität für die Liganden bestimmen [27]. Statt einer intrazellulären Todesdomäne trägt der $LT\beta R$ ein oder mehrere *TRAF-interacting motifs (TIMs)*, die bei Aktivierung des Rezeptors mit bestimmten *TNF-Receptor-associated factors (TRAF)* interagieren [28]. *TRAF 2, 3* und *5* können an die *TIMs* des $LT\beta R$ binden. Dabei sind *TRAF3* hauptsächlich am $LT\beta R$ -vermittelten Zelltod und

TRAF2 und *TRAF5* an der Aktivierung des *NFκB* (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*)-Signalweges beteiligt [29], [30], [31].

Zur Aktivierung bildet der $LT\beta R$ wie seine Liganden Trimere [27].

Exprimiert wird der $LT\beta R$ auf Zellen sämtlicher Organe wie Leber, Lunge, Herz, Niere, Milz und Lymphknoten, außerdem auf Monozyten und Epithelzellen sowie glatten Muskelzellen und Fibroblasten [32], [33], [34]. Auf Lymphozyten wird er unter Normalbedingungen nicht exprimiert [35]. In einer Untersuchung zum Krankheitsbild des systemischen Lupus erythematoses konnte bei Patienten allerdings eine Expression des $LT\beta R$ auf verschiedenen Untergruppen von T-Zellen nachgewiesen werden. Bei gesunden Probanden exprimierten die T-Zellen den $LT\beta R$ aber nicht [36].

1.3.1 Liganden des Lymphotoxin β Rezeptors

Es sind zwei Liganden bekannt, die an den $LT\beta R$ binden – $LT\alpha_1\beta_2$ und *LIGHT* (*Lymphotoxin-like inducible protein that competes with glycoprotein D for binding herpesvirus entry mediator on T cells*).

$LT\alpha_1\beta_2$ ist ein Heterotrimer, das sich aus $LT\alpha$ und $LT\beta$ zusammensetzt. $LT\alpha$ kommt nur in sezernierter Form vor und verbindet sich mit $LT\beta$, das in der Zellmembran der es exprimierenden Zellen verankert ist [37]. $LT\alpha_1\beta_2$ ist ein selektiver Ligand des $LT\beta R$ [26], wobei dessen Bindungsspezifität durch die $LT\beta$ -Untereinheit bestimmt wird [38]. Exprimiert wird $LT\alpha_1\beta_2$ auf aktivierten Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) [39].

LIGHT bildet Homotrimere und liegt entweder in sezernierter oder membrangebundener Form vor [40], [41]. *LIGHT* ist kein selektiver Ligand des $LT\beta R$, denn *LIGHT* bindet zusätzlich u.a. an den *HVEM* (*herpesvirus entry mediator*) [41]. Dieser Ligand wird von aktivierten T-Zellen, unreifen *DC*, intestinalen NK-Zellen und Monozyten exprimiert [41], [42], [43], [44].

1.3.2 Signaltransduktion des Lymphotoxin β Rezeptors

Bei der Signaltransduktion des $LT\beta R$ wird zwischen einem klassischen und einem alternativen Signalweg unterschieden, an deren Ende jeweils die Aktivierung von Faktoren der *NFκB*-Familie steht.

Beim klassischen Signalweg kommt es durch Bindung des Heterotrimers $LT\alpha_1\beta_2$ zur Trimerisierung des Rezeptors. Daraufhin binden *TRAF2*, 3 und 5 an die entsprechenden zytosolischen Bindungsstellen des $LT\beta R$ [45]. Dies ermöglicht die Aktivierung des *IKK*-Komplexes (*IKKα/β/γ* – *inducing kinase complex*) mittels Phosphorylierung und Ubiquitinierung und das Lösen von p50/p65-*NFκB*-Dimeren von deren Inhibitor *IκBα* (*nuclear*

factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha), indem dieser wiederum phosphoryliert, ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut wird [46], [47].

Die Aktivierung des alternativen LT β R-Signalwegs führt zur Stabilisierung von *NIK* (*NF κ B-inducing kinase*). In der Zelle ist *NIK* an einen Komplex aus *TRAF2/3* und *c-IAP1* (*cellular inhibitor of apoptosis protein 1*) gebunden, was zu seiner Ubiquitinierung und dem anschließenden Abbau im Proteasom führt. Durch Bindung mehrerer Heterotrimeren von LT $\alpha_1\beta_2$ kann es zur Clusterbildung von LT β R-Trimeren kommen. Diese werden dann in Form von Vesikeln Dynamin-2-abhängig in die Zelle aufgenommen, wobei das intrazelluläre Kompartiment des Rezeptors ins Zytosol reicht. Die Bindung des Komplexes aus *TRAF2/3* und *c-IAP1* an den Rezeptor führt in der Folge schließlich zur Ubiquitinierung von *TRAF3*. Dies wiederum verhindert die Degradierung von *NIK* und führt zu dessen Stabilisierung. Nach Autophosphorylierung aktiviert *NIK* *IKK α* , welches die Umwandlung des *NF κ B*-Dimers p100/RelB durch Phosphorylierung zu p52/RelB ermöglicht [45], [48], [49], [50].

Zur Familie der *NF κ B*-Transkriptionsfaktoren gehören u.a. *NF κ B1* (p105/p50), *NF κ B2* (p100/p52), p65 (RelA) und RelB [51]. Diese bilden Homo- oder Heterodimere und binden dann an den entsprechenden Sequenzen der Promotorregion, was zur Transkription zahlreicher Gene und Expression von Chemokinen, Zytokinen und Adhäsionsmolekülen führt und für die Ausbildung lymphatischer Organe von großer Bedeutung ist [51], [52], [53]. Über den klassischen Weg kommt es u.a. zur Aktivierung von Genen, die für Chemokine wie *macrophage inflammatory protein* (*MIP-1* und *2*) und Adhäsionsmoleküle wie *vascular adhesion molecule-1* (*VCAM-1*) oder *intercellular adhesion molecule-1* (*ICAM-1*) codieren [51], [52]. Über den alternativen Weg werden Gene aktiviert, die für wichtige Chemokine und Zytokine in der Entwicklung lymphatischer Organe codieren [52].

1.3.3 Funktionen des Lymphotoxin β Rezeptors

Die bislang bekannten Funktionen des LT β R sind vielfältig, was mit Sicherheit auch auf dessen Expression in zahlreichen Geweben und in der Membran vieler Zelltypen zurückzuführen ist. So soll im Folgenden u.a. sowohl seine Rolle als Mediator proinflammatorischer wie antiinflammatorischer Reaktionen als auch sein essentieller Einfluss auf die Ausbildung sekundär lymphatischer Organe dargestellt werden.

1.3.3.1 Proinflammatorische Wirkung

Der proinflammatorische Einfluss des LT β R konnte bislang bei verschiedenen Krankheitsbildern nachgewiesen werden.

In Studien wurde gezeigt, dass sowohl die Interaktion zwischen LT $\alpha_1\beta_2$ als auch *LIGHT* mit

dem $LT\beta R$ eine Rolle im Rahmen der Entzündungsreaktion der rheumatoiden Arthritis spielt [54], [55], [56], [57]. Dabei stellten Takemura et al. fest, dass die $LT\beta R$ -Aktivierung bei einer Untergruppe von Patienten relevant war, bei denen sich im Rahmen der Entzündungsreaktion Follikel mit Keimzentrum bildeten, die Follikulär Dendritische Zellen enthielten [54].

Fava et al. konnten im Tiermodell zeigen, dass durch vorherige Gabe eines antagonistischen $LT\beta R$ -Antikörpers ($LT\beta R$ -Ig) vor der Immunisierung mit Typ-II-Kollagen die Ausbildung einer Arthritis verhindert werden kann. Zudem führte die gleichzeitige Gabe des $LT\beta R$ -Ig bei Immunisierung mit Typ-II-Kollagen nur zu einer abgeschwächten Entzündungsreaktion [58].

Auch beim Krankheitsbild der chronischen Kolitis führte die Behandlung mit einem $LT\beta R$ -Ig zu einer klinischen wie histologischen Abschwächung der Entzündung [59]. Die Hemmung des $LT\beta R$ -Signalweges hatte hierbei eine Minderung der Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie $TNF\alpha$, der Interleukine (IL) 1, 6 und 8 sowie von *LIGHT* zur Folge. Zudem wurde eine verminderte Expression von *MadCAM-1* (*mucosal addressin cell adhesion molecule 1*) auf intestinalem Epithel festgestellt, was zu einer verminderten Margination und Extravasation von Lymphozyten in entzündete Areale führte [60], [61].

Im Falle der autoimmunen Pankreatitis konnte ebenfalls die wesentliche Rolle der Interaktion zwischen $LT\alpha_1\beta_2$ und dem $LT\beta R$ nachgewiesen werden. Die Blockade des $LT\beta R$ mittels $LT\beta R$ -Ig führte auch hier zu einem Rückgang der Entzündung sowie zu einer deutlich reduzierten Expression von Chemokinen und Zytokinen [62].

Ebenfalls wurde der Einfluss des $LT\beta R$ auf die Entzündungsreaktion am murinen Modell der experimentell induzierten Autoimmun-Encephalomyelitis (EAE) untersucht. Eine Blockade des $LT\beta R$ -Signalweges schützte vor der Entwicklung einer EAE. Dem lag ein Ausbleiben der sekundären T-Zell-Antwort zu Grunde. Relevant dabei war auch hier die Hemmung der Interaktion zwischen $LT\alpha_1\beta_2$ und dem $LT\beta R$ [63]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Gabe von $LT\beta R$ -Ig zu einer Verringerung der Demyelinisierung und einer ausgeprägten Förderung der Remyelinisierung führt [64].

Bei viralen Hepatitiden konnte eine vermehrte Expression von $LT\alpha$ und $LT\beta$ auf Zellen der Leber festgestellt werden [65], [66]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine durch genetische Veränderung vermittelte Überexpression von $LT\alpha$ und $LT\beta$ zur Ausbildung einer Virus-unabhängigen Hepatitis und im Folgenden eines hepatozellulären Karzinoms (*HCC*) führt. Eine Behandlung mit $LT\beta R$ -Ig konnte die Inflammation reduzieren und vor einem *HCC* schützen [67]. Darüber hinaus konnte aber ebenfalls gezeigt werden, dass die Aktivierung des $LT\beta R$ essentiell für die Regeneration der Leber nach einer Hepatektomie ist [68].

Im Rahmen einiger Infektionen ist der proinflammatorische Einfluss der $LT\beta R$ -Aktivierung allerdings auch von entscheidender Bedeutung für eine suffiziente Abwehr der jeweiligen

Pathogene.

LT β R-defiziente Mäuse zeigten so sowohl nach intranasaler Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* als auch nach intraperitonealer Infektion mit *Listeria monocytogenes* eine signifikant erhöhte Bakterienlast in Lunge und Leber bzw. Leber und Milz im Vergleich zu den Tieren ohne LT β R-Defizienz. Als Ursache wird dabei eine gestörte Aktivierung von Makrophagen durch eine eingeschränkte Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS) angenommen [69].

Die Relevanz des LT β R für die Abwehr des Cytomegalievirus (CMV) konnte ebenfalls beobachtet werden. Hierbei war die LT β R-Aktivierung neben der des TNF-Rezeptors 1 für die Induktion von IFN β (Interferon β) in mit CMV infizierten Fibroblasten verantwortlich [70].

Zuletzt konnte die Beteiligung des LT β R an der Abwehr des Parasits *Toxoplasma gondii* nachgewiesen werden. Im Wesentlichen war dies bedingt durch die Induktion von Typ II Interferon, das verantwortlich ist für eine Hochregulation von *mGBPs* (*murine guanylate-binding protein*), die einen wichtigen Abwehrmechanismus einer Infektion mit diesem Parasiten darstellen [71].

1.3.3.2 Antiinflammatorische Wirkung

Neben dieser Vielzahl nachgewiesener proinflammatorischer Einflüsse der LT β R-Aktivierung im Rahmen von Entzündungsreaktionen unterschiedlicher Genese konnte die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Hehlhans an der Uniklinik Regensburg einen durch den LT β R vermittelten antiinflammatorischen Effekt bei der akuten Kolitis zeigen. Im murinen Modell der durch *Dextran Sodium Sulfate* (DSS) induzierten akuten Kolitis konnte dieser im Wesentlichen auf die Interaktion zwischen LT $\alpha_1\beta_2$ auf T-Zellen und dem LT β R auf Makrophagen zurückgeführt werden [72], [73]. Diese Schlussfolgerung ließ sich aus den Ergebnissen der Untersuchung verschiedener Modelle ableiten. So führte die Behandlung mit LT β R-Ig wie der LT β R-*knock-down* zu einer verstärkten intestinalen Entzündungsreaktion durch protrahierte Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF, IL-6 und IFN γ . Gleiches zeigte sich bei LT α/β -defizienten Mäusen und Mäusen mit selektiv LT β -defizienten T-Zellen [72]. Die Ablation des LT β R speziell auf Makrophagen und Neutrophilen führte ebenfalls zu einer Verstärkung der akuten Kolitis [73]. Die Relevanz hämatopoetischer Zellen im Vergleich zu Stromazellen für diesen Effekt konnte auch mittels Experimenten an Knochenmark-Chimären belegt werden [74]. Untersuchungen zur Aufklärung dieser antiinflammatorischen Wirkung ergaben, dass die LT β R-Aktivierung zur *NF κ B*-abhängigen Expression des immunmodulierenden Moleküls *TRIM30 α* (*tripartite motif 30 α*) führt [73]. *TRIM30 α* ist bekannt als negativer Regulator der über den *TLR4* durch LPS-Bindung vermittelten Expression proinflammatorischer Faktoren.

So ist *TRIM30α* selbst ein Effektormolekül des *TLR4*-Signalweges und wirkt im Sinne eines negativen *Feedback*-Mechanismus hemmend auf dessen Signalkaskade ein [75]. Somit ließ sich schlussfolgern, dass der antiinflammatorische Effekt der *LTβR*-Aktivierung auf eine gesteigerte Expression von *TRIM30α* zurückzuführen ist, welches seinerseits regulierend auf die über LPS und den *TLR4* vermittelte *NFκB* -Aktivierung einwirkt [73].

1.3.3.3 Ausbildung von sekundär und tertiär lymphatischen Organen

Eine lange bekannte und sehr wesentliche Funktion des *LTβR* liegt in der Entwicklung sekundär lymphatischer Organe. Eine *LTβR*-Defizienz führt zum Fehlen aller Lymphknoten und Peyer-Plaques [76], da zur Ausbildung dieser Strukturen während der Embryogenese u.a. eine Interaktion zwischen *LTα₁β₂* auf den sogenannten *lymphoid tissue inducer cells (LTIC)* und dem *LTβR* auf *lymphoid tissue organizer cells (LTOC)* essentiell ist. Durch den Ligand-Rezeptor-Kontakt kommt es zur Expression von Adhäsionsmolekülen wie *VCAM-1* und *MAdCAM-1* auf den *LTOC* und durch *Feedback*-Stimulation der *LTIC* zur Ausbildung von Integrinen auf den *LTIC* als entsprechende Bindungspartner dieser Adhäsionsmoleküle [77], [78], [79].

Gleichzeitig zeigte sich bei *Ltβr*-defizienten Mäusen eine Leukozytose, v.a. bedingt durch eine Lymphozytose [76]. Im Rahmen der Arbeiten mit *ApoE/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen an unserem Institut konnte zusätzlich eine signifikant erhöhte Zahl an Neutrophilen und Monozyten im Blut festgestellt werden, wobei letztere durch eine Erhöhung der *Ly6C^{low}*-Fraktion bedingt war [1].

Daneben wird dem *LTβR* eine wichtige Rolle in der Ausbildung tertiär lymphatischer Organe (TLO) beigemessen. Hierbei handelt es sich um ektopes lymphatisches Gewebe, das in seiner Struktur sekundär lymphatischen Organen ähnelt. Typischerweise wird die Entstehung tertiär lymphatischer Organe im Rahmen chronischer Entzündungen beobachtet. Ein Beispiel dafür ist die Ausbildung von TLO in der Adventitia der Aorta *ApoE*-defizienter Mäuse durch Aktivierung glatter Muskelzellen in der Media über den *LTβR* mit anschließender Chemokinfreisetzung [33].

1.3.3.4 Wirkung auf den Lipidstoffwechsel

Neben den vielfältigen immunologischen Funktionen des *LTβR* ist auch ein Einfluss auf den Lipidstoffwechsel bzw. die Lipidhomöostase festgestellt worden. Untersuchungen dazu fokussierten die Interaktion von T-Zellen, die *LIGHT* überexprimierten, mit Hepatozyten. Die *LTβR*-Aktivierung auf den Hepatozyten hatte eine ausgeprägte Expressionsminderung von

Leberlipase zur Folge, was mit einem gestörten Fettstoffwechsel einherging und zu deutlich erhöhten Cholesterin- und Triglyceridspiegeln führte [80].

Auch auf die Beteiligung von Makrophagen am Lipidstoffwechsel nimmt der $LT\beta R$ Einfluss. Makrophagen exprimieren den Transporter *ABCA1* (*ATP-binding cassette transporter A1*), der u.a. Cholesterin an die Zelloberfläche transportiert, wo es in den Lipidstoffwechsel eingeschleust und Bestandteil von *high-density lipoprotein (HDL)* wird. [81]. In *Tnfr1*- und *Tnfr2*-defizienten Makrophagen führte die Aktivierung von $LT\beta R$ zum verminderten Abbau des *ABCA1* [82].

1.4 Ziele dieser Arbeit

Die Vorergebnisse der Arbeitsgruppe ergaben, dass *Apoe/Ltβr*-doppeldefiziente Mäuse, die 15 Wochen eine fett- und cholesterinreiche Western-Diät erhielten, eine signifikant geringere Ausprägung atherosklerotischer Plaques zeigten als die entsprechenden *Apoe*-defizienten Kontrolltiere. Zudem war die Anzahl an Makrophagen in diesen Läsionen signifikant reduziert [1]. Dies legte nahe, den Einfluss des $LT\beta R$ allgemein auf Leukozyten und speziell auf die Eigenschaften und die Funktion von Makrophagen näher zu untersuchen. Dabei wurde der *Ltβr-knockdown* in diesem Kontext an *Apoe*-defizienten Tieren untersucht, da diese *Apoe*-Defizienz ein etabliertes Modell zur Untersuchung der akzelerierten Atherosklerose darstellt [83].

Zunächst sollte in einem ersten Schritt der allgemeine Phänotyp von *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen und *Apoe*-defizienten Kontrolltiere hinsichtlich Größe und Gewicht verglichen werden, da auch diese basalen morphologischen Charakteristika einen Einfluss auf Atherogenese und -progression, aber auch Immunzellfunktionen besitzen. Anschließend galt es, Auswirkungen des $LT\beta R$ auf das Blutbild und speziell die Fraktion der Leukozyten zu betrachten.

Basierend auf Voruntersuchungen zur Atherosklerose an *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen, welche eine reduzierte Anzahl von Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen aufwiesen, sollte nachfolgend der zugrundeliegende Mechanismus hierfür näher eingegrenzt werden. Der Fokus der Arbeit lag daher auf der Untersuchung des Proliferations- und *Spreading*-Verhaltens von Knochenmarksmakrophagen sowie des Migrationsverhaltens von Leukozyten in die Peritonealhöhle und aus der Peritonealhöhle heraus unter dem Einfluss inflammatorischer Stimuli bei *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen im Vergleich zu den *Apoe*-defizienten Kontrolltieren. So konnte der Einfluss des $LT\beta R$ auf die Immunzellfunktionen im Vergleich zur chronischen Inflammation der Atherosklerose sowohl unter basalen Bedingungen (Knochenmarksmakrophagen) als auch unter akuten

inflammatorischen Bedingungen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

	Hersteller, Ort
Analysenwaage 2011 MP2	Sartorius, Göttingen
<i>Animal Blood Counter Vet abc, ID: 55893</i>	Scil <i>animal care company</i> GmbH, Viernheim
Bio-Rad <i>Universal Hood II</i>	Bio-Rad <i>Laboratories</i> , Segrate (Mailand), Italien
Brutschrank Heracell™ 150i	<i>Thermo Scientific</i> , Karlsruhe
<i>Centrifuge 5810</i>	Eppendorf AG, Hamburg
<i>Centrifuge 5810 R</i>	Eppendorf AG, Hamburg
<i>Centrifuge 5415 R</i>	Eppendorf AG, Hamburg
<i>Countess™ automated cell counter</i>	Invitrogen™, <i>Thermo Fisher Scientific Life Technologies</i> GmbH, Darmstadt
Flockeneisbereiter SPR 165	NordCap GmbH & Co. KG, Bremen
Gelkammer Agagel <i>Midi-Wide</i>	Biometra GmbH, Göttingen
Inkubator Thermostat 5320	Eppendorf AG, Hamburg
Magnetrührer RH <i>basic 2</i> IKAMAG®	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
<i>Mastercycler gradient</i>	Eppendorf AG, Hamburg
<i>Mastercycler personal</i>	Eppendorf AG, Hamburg
<i>Microplate Reader Synergy Mx</i>	BioTek, Winooski, VT, USA
Mikroskop Olympus CK40	Olympus, Hamburg
Mikroskop Zeiss Axio <i>Observer Z.1</i>	Carl Zeiss <i>Microlmaging</i> GmbH, Göttingen
<i>Multipette® stream</i>	Eppendorf AG, Hamburg
NanoDrop 1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

Pipette 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL: eppendorf <i>research</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette: Pipetman 20 µL, 100 µL, 1000 µL	Gilson, Middleton, USA
Präzisionswaage MC 1	Satorius, Göttingen
<i>StepOnePlus™ Real-Time PCR System</i>	<i>Life Technologies™</i> , Singapur
Sterilbank Heraeus <i>LaminAir Safety bench</i> HLB 2448	<i>Labexchange</i> – Die Laborgerätebörse GmbH, Burladingen
Sterilbank <i>Safe</i> 2020	<i>Thermo Scientific</i> , Karlsruhe
Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer <i>comfort</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Vortex Genius3	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Waage KS 38	Beurer GmbH, Ulm
Wasserbad	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

	Hersteller, Ort
Adhäsions-Objektträger SuperFrost® plus, Art.-Nr.: 03-0060	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen
<i>Cell strainer</i> 100µm Nylon, Ref. 352360	BD <i>Biosciences</i> , Heidelberg
Deckgläser 12mm Durchmesser	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim/Rhön
<i>Eppendorfcup</i> 0,2 mL, 0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL	Eppendorf AG, Hamburg
<i>Feather</i> Skalpell, <i>Figuration</i> 21 Art.-Nr.: 21-SKFS-21	<i>Feather Safety Razor Co.</i> , Osaka, Japan
Kanüle Sterican® Standardkanülen (20G, 22G, 24G, 27G)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
<i>Multiwell</i> -Platte (24-well), Art.-Nr.: 662160	Greiner <i>Bio-One</i> GmbH, Frickenhausen

<i>Multiwell-Platte (96-well),</i> Art.-Nr.: 655180	Greiner <i>Bio-One</i> GmbH, Frickenhausen
Pasteurpipetten, Katalog-Nr.: 747715 und 747720	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Pipettenspitzen: 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1000 μ L – <i>Tip One</i>	Starlab GmbH, Hamburg
Plastikpipetten: 5 mL, 10 mL, 25 mL COSTAR® Sterilpipette	<i>Corning Incorporated</i> , New York, USA
Petrischale 100 x 20mm, Art.-Nr.: 664160	Greiner <i>Bio-One</i> GmbH, Frickenhausen
Spritze (1 mL, 3 mL, 5 mL, 20 mL)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterilfilter Filtropur S, Ref.: 83.1826.001	Sarstedt, Nümbrecht
<i>Tube</i> , 15 mL, 50 mL PP, <i>Screw Cap</i>	Greiner <i>Bio-One</i> GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen (25 und 75 cm ²)	Greiner <i>Bio-One</i> GmbH, Frickenhausen
Zellschaber: <i>Cell Scraper</i> 90020	SPL <i>Life Sciences Co.</i> , Eumhyeon-ri, Naechon-myeon, Korea

2.1.3 Chemikalien, Medien und Reagenzien

	Hersteller, Ort
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Alexa Fluor® 488 Phalloidin, Katalog-Nr.: A12379	<i>Thermo Fisher Scientific Life Technologies</i> GmbH, Darmstadt
<i>Bovine Serum Albumin (BSA)</i> , A7906	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Chloroform, Katalog-Nr.: 22711.324	VWR International GmbH, Darmstadt
<i>DMEM, Low Glucose, Pyruvate (Gibco®)</i> , Katalog-Nr.: 31885-023	<i>Thermo Fisher Scientific Life Technologies</i> GmbH, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe
Farbstoff Gelelektrophorese, SYBR® <i>Safe</i> <i>DNA Gel Stain</i> , Lot.-Nr.: 1263692	<i>Thermo Fisher Scientific Life Technologies</i> GmbH, Darmstadt

<i>Fetal Calf Serum (FCS)</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt</i>
Ficoll Paque™ PLUS, Produkt-Nr: 17-1440-02	<i>GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg</i>
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethan- sulfonsäure (HEPES), H4034	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
Isopropanol	<i>Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe</i>
Natriumchlorid, S7653	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
Penicillin-Streptomycin (10.000 <i>units</i> /mL)	<i>Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt</i>
peqGOLD <i>TriFast</i> ™, Katalog-Nr.: 30-2010	<i>VWR International GmbH, Darmstadt</i>
Roti®-Histofix 4 %, Bestell-Nr.: P087.3	<i>Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe</i>
Roti®-Mount <i>FluorCare</i> DAPI, Bestell-Nr.: HP20.1	<i>Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe</i>
Rotitest® Vital, Art.-Nr.: 0069.1	<i>Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe</i>
<i>RPMI</i> 1640 Medium, GlutaMAX™ (Gibco®), Katalog-Nr.: 61870-010	<i>Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt</i>
<i>Supplemented DMEM</i>	
- <i>DMEM</i> (1g/mL Glukose)	s.o.
- 15 mM HEPES	s.o.
- 100 IU/mL Penicillin	s.o.
- 100 µg/mL Streptomycin	s.o.
<i>Supplemented DMEM mit FCS</i>	
- <i>supplemented DMEM</i>	s.o.
- 10% hitzeinaktiviertes <i>FCS</i>	s.o.
tri-Natriumcitrat-Dihydrat, Bestell-Nr.: 106448	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Triton™ X-100	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
Trypanblau: <i>Trypan Blue Stain</i> (0.4%) for use with the <i>Countess® Automated Cell Counter</i> (Invitrogen™)	<i>Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt</i>

2.1.4 Puffer und Lösungen

	Hersteller, Ort
<i>DPBS (1X) Dulbecco's Phosphate Buffered, DPBS, no calcium, no magnesium (Gibco®),</i> Katalog-Nr.: 14190-094	<i>Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt</i>
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Bestell-Nr.: 8040	Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe
Ery-Lyse-Puffer (1x): Ammoniumchlorid- Kaliumhydrogencarbonat-Puffer (ACK-Puffer)	
- 0,15 M NH ₄ Cl, Bestell-Nr.: K298	Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe
- 1 mM KHCO ₃ , Bestell-Nr.: P748	Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe
- 0,1mM Na ₂ EDTA pH 7,2-7,4	s.o.
Lysispuffer	
- 100 mM TRIS	s.u.
- 5 mM EDTA	s.o.
- 0,2% SDS	s.u.
- 200 mM Natriumchlorid	s.o.
- ddH ₂ O	
TBE-Puffer	
- 0,09 M TRIS	s.u.
- 0,03 M Borsäure, Bestell-Nr.: 5935	Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe
- 2 mM EDTA	
<i>Sodium dodecyl sulfate (SDS), L6026</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan), Bestell-Nr.: 4855	Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe

2.1.5 Stimulantien

	Hersteller, Ort
<i>Anti-Murine RANTES (CCL5),</i> Quelle: <i>Polyclonal Rabbit,</i> Katalog- Nr.: 500-P118	PeproTech Germany, Hamburg

<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor from mouse</i> , M9170	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
<i>Monoclonal Anti-Rat IgG2a antibody produced in mouse, clone R2A-2, ascites fluid</i> , R0761	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
<i>Lipopolysaccharides from Salmonella enterica serotype minnesota</i> , L7011	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
LT β R-AK, Mouse, mAb 5G11 Katalog-Nr.: HM1079	Hycult Biotech, Plymouth Meeting, PA, USA
Rekombinantes humanes LT $\alpha_1\beta_2$, HEK293-derived, Katalog-Nr.: 8884-LY	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
<i>Thioglycolate medium</i> , T9032	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

2.1.6 Kits

	Hersteller, Ort
QuantiTect Reverse Transcription Kit (200), Katalog-Nr.: 205313	Qiagen GmbH, Hilden
Platinum [®] SYBR [®] Green qPCR SuperMix-UDG Kits	Life Technologies [™] , Carlsbad, CA, USA

2.1.7 Enzyme

	Hersteller, Ort
Dispase II (<i>neutral protease, grade II</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Proteinase K Solution, Katalog-Nr.: 25530-049	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
Taq-DNA-Polymerase, Katalog-Nr.: 12217	Ampliqon, Skovlunde, Dänemark

2.1.8 Oligonukleotide

	Hersteller, Ort
LT β R4: CTG-GTA-TGG-GGT-TGA-CAG-CG	<i>Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt</i>
LT β R7: TGT-CAG-CCG-GGG-ATG-TCC-TG	<i>Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt</i>
Größenstandard: 100 bp DNA Ladder, Artikel-Nr.: GC-015-004	<i>BioAxis Genecraft Products, Köln</i>
HSU TK: ATT-CGC-CAA-TGA-CAA-GAC-GCT-GG	<i>Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt</i>
18S Vorwärts-Primer 5'-3' GCAATTATTCCCCATGAACG Rückwärts-Primer 5'-3' GGCCTCACTAAACCATCCAA	<i>Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt</i>
Msr1 Vorwärts-Primer 5'-3' GCAATTATTCCCCATGAACG Rückwärts-Primer 5'-3' GGCCTCACTAAACCATCCAA	<i>Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt</i>

2.1.9 Software und Internet-Ressourcen

	Programm
Bildverarbeitung	<i>ImageJ, Version 2.0.0; https://imagej.net</i>
Bildverarbeitung	<i>ZEN lite 2012 SP2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen</i>
Gelelektrophorese	<i>Quantity One 4.5.2</i>
Grafiken	<i>GraphPad Prism6[®], GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA</i>
Literaturrecherche	<i>Pubmed: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed</i>

Literaturverzeichnis	<i>EndNote</i> X8.1, Thomson Reuters, New York City, USA
qPCR-Auswertung	<i>StepOne™ Software Version 2.3</i> , Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
RNA-Konzentrationsbestimmung	ND 1000 V3.8.0, Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
Schreibprogramm	Microsoft® Word für Mac 2016
Statistische Analysen	<i>GraphPad Prism6®</i> , GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA

2.1.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mithilfe der *GraphPad Prism Software* Version 6 (*GraphPad Software, Inc.*, La Jolla, CA, USA).

Zum Vergleich zweier Datensätze wurde der ungepaarte *Student's t-test* angewandt. Der Test nach Grubbs diente der Identifizierung von Ausreißern zum Niveau $\alpha = 0,05$. Bei Vorliegen eines p-Wertes $< 0,05$ wurden die Ergebnisse als signifikant unterschiedlich gewertet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte plus Standardfehler des Mittelwertes (*SEM* [standard error of the mean]).

2.2 Methoden

2.2.1 Tiere und Genotypisierung

Homozygote *ApoE*-defiziente Mäuse auf einem C57BL/6J-Hintergrund wurden vom Taconic *Laboratory* (Hudson, NY, USA) bezogen. Die homozygoten *Ltβr*-defizienten Mäuse wurden von Prof. Dr. med. K. Pfeffer (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Zwecks Generierung *ApoE/Ltβr*-doppeldefizienter Mäuse wurden beide Stämme über vier Generationen gekreuzt und der Genotyp mithilfe eines 1449 *Single-Nucleotide Polymorphism Panel* (Taconic, Hudson, NY, USA) kontrolliert. Das Aktenzeichen des Landesamts für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz lautet: Az. 84-02.04.2011.A165, das ZETT: G165/11.

Um zusätzlich eine Überprüfung des ausgewiesenen Genotyps der jeweiligen Versuchstiere zu ermöglichen, wurden die Schwanzspitzen der Mäuse gesammelt sowie stichprobenartig aufgearbeitet und mittels Polymerase-Kettenreaktion (*PCR*) und Gelelektrophorese der

jeweilige Genotyp nachgewiesen.

Zunächst wurden die Schwanzspitzen durch Zugabe von 500 μL Lysispuffer sowie 0,5 μL Proteinase K und anschließendes Schütteln bei 55°C und 750 *rpm* über Nacht im Thermomixer *compact* (Eppendorf AG, Hamburg) lysiert. Nach Zentrifugation bei 16000 g für 10 min bei Raumtemperatur wurde der Überstand in ein neues *Eppendorfcup* überführt und die DNA mit 500 μL Isopropanol gefällt. Es folgte erneut eine Zentrifugation bei 16000 g für 10 min bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen und die ausgefällte DNA mit 500 μL Ethanol (75%) gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 16000 g für 10 min bei Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und anschließend in 50 μL Wasser resuspendiert. In sterilen 0,2mL-*Eppendorfcups* wurden nun je 2,5 μL DNA-Probenlösung mit 22,5 μL *PCR-Master-Mix* gemischt. Dieser setzte sich folgendermaßen zusammen (Mengenangaben pro DNA-Probenlösung):

1. 12,5 μL *Taq-DNA-Polymerase*
2. 0,5 μL LT β R4 (50 μM)
3. 0,5 μL LT β R7 (50 μM)
4. 0,5 μL HSU TK (50 μM)
5. 8,5 μL H₂O

Es folgte dann die *PCR* im Gerät *Mastercycler gradient* bzw. *Mastercycler personal* (Eppendorf AG, Hamburg). Zur Amplifikation entsprechender Fragmente wurde folgendes Programm, wie in Tabelle 1 aufgeführt, verwendet:

		Temperatur	Dauer
1. Schritt:	Denaturierung	95°C	5 min
2. Schritt:	Denaturierung	94°C	1 min
30 Zyklen	<i>Primer-Annealing</i>	63°C	30 sec
	Elongation	77°C	90 sec
33. Schritt	Termination	72°C	5 min

Tabelle 1: Programm zur Amplifikation entsprechender Fragmente im *Mastercycler gradient* bzw. *Mastercycler personal* (Eppendorf AG, Hamburg) mittels Polymerase-Kettenreaktion.

Im Anschluss an die *PCR* folgte die Auswertung mithilfe der Gelelektrophorese. Dazu wurde ein Gel aus einer 2%igen Agarose-Lösung hergestellt und anschließend in die mit TBE-Puffer gefüllte Kammer gelegt. Nun wurden die Taschen mit den *PCR*-Produkten befüllt. Daneben wurden außerdem ein Größenstandard (100 *bp*) und eine Probe eines heterozygoten Genotyps mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 79 Volt/cm und einer Laufzeit von ca. 90 min. Im Anschluss daran wurde das Gel mithilfe eines UV-Gerätes fo-

tografisch ausgewertet und der Genotyp jeweils durch das Vorliegen entsprechender Banden ermittelt. Dabei waren den Genotypen die in Tabelle 2 aufgeführten Banden bzw. Fragmentlängen zuzuordnen.

<i>Apoe</i> ^{-/-}	Bande bei ca. 600 <i>bp</i>
<i>Apoe</i> ^{-/-} / <i>Ltβr</i> ^{-/-}	Bande bei ca. 200 <i>bp</i>
Heterozygot	Banden bei ca. 200 <i>bp</i> und 600 <i>bp</i>

Tabelle 2: Fragmentlängen in Basenpaaren (*bp*), die den einzelnen Genotypen zuzuordnen waren.

Abbildung 1 zeigt exemplarisch ein Foto zweier Gele, auf denen die Proben aus den aufbereiteten Schwanzspitzen der Mäuse aufgetragen wurden. Bei Vorliegen eines *Apoe*^{-/-}/*Ltβr*^{-/-}-Genotyps war ein Fragment mit einer Länge von 200 *bp*, beim Vorliegen eines *Apoe*^{-/-}-Genotyps eines mit einer Länge von 600 *bp* zu erwarten. Zur Orientierung wurden zudem sowohl ein Größenstandard als auch eine Probe eines heterozygoten Genotyps aufgetragen, wodurch Vergleichsbanden beider Fragmente markiert wurden. Aufgrund der Kürze des Fragments des *Apoe*^{-/-}/*Ltβr*^{-/-} entsprach diesem die untere, während dem Fragment des *Apoe*^{-/-} die obere der beiden Banden zuzuordnen war.

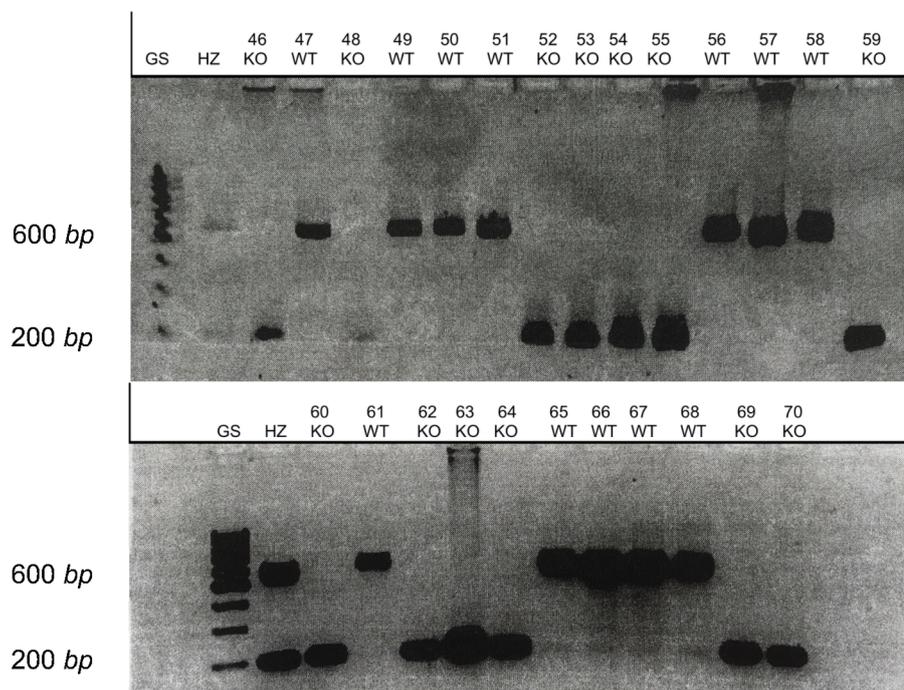


Abb. 1: Elektrophoresegel mit *DNA*-Proben der Versuchstiere Nr. 46-70 zur Überprüfung des ausgewiesenen Genotyps. Die Abbildung zeigt Fotos zweier Gele, auf denen speziell für den entsprechenden Genotypennachweis gewonnene *DNA*-Proben der Versuchstiere mittels Elektrophorese aufgetrennt wurden. Links ist jeweils der Größenstandard (GS) sowie eine Vergleichsprobe eines heterozygoten Genotyps (HZ) aufgetragen. Daneben sind die Nummern der Tiere (46-70) mit den jeweils vom Gel abgelesenen Genotypen benannt. Diese entsprachen in allen Fällen den ausgewiesenen Genotypen. *Apoe*^{-/-}/*Ltβr*^{-/-} sind als *Knockout* (KO), *Apoe*^{-/-} als Wildtyp (WT) gekennzeichnet.

Die nach dieser Methode ermittelten Genotypen entsprachen in allen Fällen den jeweils ausgewiesenen Genotypen.

Die Fütterung, jegliche Behandlung lebender Tiere – insbesondere auch das Generieren der Knochenmark-Chimären – sowie die Tötung der Tiere für die im Folgenden beschriebenen Versuche erfolgten durch Kerstin Freidel und Prof. Dr. med. Maria Grandoch (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Düsseldorf). Alle weiteren Arbeiten mit und an den getöteten Tieren – insbesondere die Isolierung des Knochenmarks sowie der Peritonealzellen sowie die weitere Aufbereitung des gewonnenen Materials – erfolgten mit Ausnahme der quantitativen *Real-Time-PCR*, welche von Julia Bayer (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Düsseldorf) durchgeführt wurde, durch den Verfasser dieser Arbeit, Jan Nikolaus Waldheim.

2.2.2 Bestimmung des Blutbildes

Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme zwölf Wochen alt. Ab einem Alter von acht Wochen wurden sie mit einer fett- und cholesterinreichen Western-Diät (21% Butterfett, 0,15% Cholesterin) gefüttert (ssniff-Spezialdiäten GmbH, Soest, Art.-Nr. S8200-E010).

Zur Bestimmung des Blutbildes wurden den Mäusen nach Tötung und Präparation des Thorax 300 µL Blut mittels Herzpunktion entnommen. Die Antikoagulation erfolgte mit Citrat im Verhältnis 1:10 (30 µL tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 3,2%). Die Zählung der Blutzellen wurde mithilfe des *Animal Blood Counter Vet abc* (Scil animal care company GmbH, Viernheim) durchgeführt.

2.2.3 Isolierung von Peritonealzellen

Auch die Mäuse, aus denen Peritonealzellen isoliert wurden, waren zum Zeitpunkt der Versuche zwölf Wochen alt und wurden ab der achten Lebenswoche mit einer fett- und cholesterinreichen Western-Diät (s. 2.2.2) gefüttert. Die Isolierung der Peritonealzellen erfolgte dann nach einem Protokoll von A. Ray [84].

Fünf Tage vor Isolierung der Zellen wurde den Mäusen 3%iges Thioglykolat i.p. injiziert. Zur Isolierung der Peritonealzellen wurden die Mäuse getötet, danach wurden 3 mL steriles *PBS* und 1 mL Luft mithilfe einer Kanüle mit einem Durchmesser von 0,55 mm (24 G) i.p. injiziert. Zur Ablösung adhärenter Zellen wurden die Mäuse nun ca. 1 min in den Händen gerollt. Anschließend wurde das Fell mit Ethanol (70%) desinfiziert und auf einer Seite des Abdomens vorsichtig abpräpariert. Mithilfe einer Kanüle mit einem Durchmesser von 0,7 mm (22 G) wurde nun die intraperitoneale Flüssigkeit entnommen und in einem 15mL-

Reaktionsgefäß auf Eis gesammelt. Dabei wurden in der Regel zwischen 2 mL und 2,75 mL intraperitoneale Flüssigkeit gewonnen.

Zur Aufbereitung der *Lavage* erfolgten zunächst eine Zentrifugation bei 290 g für 5 min bei Raumtemperatur und anschließend nach Verwerfen des Überstandes die Zugabe von 1 mL Ery-Lyse-Puffer (ACK-Puffer) für 2 min auf Eis zur Lyse der Erythrozyten.

Nach einer weiteren Zentrifugation bei 290 g für 5 min bei Raumtemperatur und Verwerfen des Überstandes wurden das Pellet in 1 mL *RPMI* (1% Penicillin/Streptomycin, 10% *FCS*) resuspendiert und die Zellen maschinell wie unter 2.2.4 beschrieben gezählt.

2.2.4 Zellzählung

Die Bestimmung von Gesamtzellzahl, Lebendzellzahl und die Berechnung des Anteils lebender Zellen (*Viability*) erfolgte mithilfe des Gerätes *Countess™ automated cell counter* (*Life Technologies* GmbH, Darmstadt). Dazu wurden 10 µL der Zellsuspension (in der Regel 1 mL) mit 10 µL Trypanblau versetzt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden dann 10 µL dieser Suspension in die entsprechende Kammer pipettiert.

2.2.5 Isolierung von Peritonealzellen nach LPS-Stimulation

Als Stimulus wurde nach einem Protokoll von C. Cao [85] Lipopolysaccharid (LPS) verwendet. Auch diese Tiere waren zum Zeitpunkt der Versuche zwölf Wochen alt und wurden in den letzten vier Wochen mit einer fett- und cholesterinreichen Western-Diät (s. 2.2.2) gefüttert. Fünf Tage vor Isolierung der Zellen wurde den Mäusen 3%iges Thioglykolat i.p. injiziert. Vier Stunden vor Isolierung der Zellen wurde den Mäusen 100 µL LPS-Lösung (5 µg/mL) zur Stimulation oder 100 µL *PBS* zur Kontrolle i.p. injiziert. Die Isolierung erfolgte dann weiter wie unter 2.2.3 beschrieben.

2.2.6 Isolierung von Knochenmarkszellen

Die Isolierung der Knochenmarkszellen erfolgte mit einigen Änderungen nach einem Protokoll von Zhang et al. [86]. Vor Präparation der Mäuse wurden die Tiere gewogen und die nasoanale Länge gemessen. Anschließend wurden nach Desinfektion mit Ethanol (70%) Fell und Muskeln an den Hinterbeinen abpräpariert und die dislozierten Beine weiter in sterilem *PBS* von Muskelresten befreit. Danach erfolgte die Eröffnung von Femur und Tibia jeweils an beiden Enden der Knochen. Mithilfe einer Kanüle mit einem Durchmesser von 0,4 mm (27 G) wurden die Knochen mit sterilem *PBS* gespült und die Flüssigkeit in einem 50mL-Reaktionsgefäß auf Eis gesammelt. Die Entfernung größerer Fremdkörper erfolgte mithilfe

eines 100µm-Nylonfilters. Im Anschluss daran folgte eine Zentrifugation bei 500 g für 10 min bei Raumtemperatur. Nun wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 5 mL *supplemented DMEM* (1% Penicillin/Streptomycin) resuspendiert. Im Anschluss daran wurden 5 mL Ficoll Paque™ PLUS in einem 15mL-Reaktionsgefäß mit den 5 mL Knochenmarkssuspension vorsichtig überschichtet und es folgte eine Zentrifugation bei 450 g ohne Bremse für 35 min bei Raumtemperatur. Dadurch wurden Plasma, mononukleäre Zellen, Granulozyten und Erythrozyten in ihre Fraktionen aufgeteilt. Der Ring unterhalb des Plasmas, der nahezu nur mononukleäre Zellen enthält (siehe Abb. 2), wurde abgenommen und dann in ein neues 50mL-Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 500 g für 10 min bei 4°C. Anschließend wurden der Überstand verworfen, das Pellet in 1 mL *supplemented DMEM* (1% Penicillin/Streptomycin, 10% FCS) resuspendiert und die Zellen maschinell wie unter 2.2.4 beschrieben gezählt.

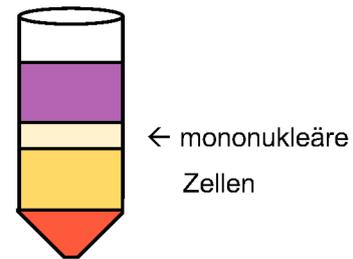


Abb. 2: Auftrennung der zellulären Bestandteile des Knochenmarks mittels Gradientenzentrifugation mit Ficoll Paque™ PLUS. Der Ring unterhalb des Plasmas und oberhalb der Ficoll-Phase enthält nahezu nur mononukleäre Zellen.

Der Ring unterhalb des Plasmas, der nahezu nur mononukleäre Zellen enthält (siehe Abb. 2), wurde abgenommen und dann in ein neues 50mL-Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 500 g für 10 min bei 4°C. Anschließend wurden der Überstand verworfen, das Pellet in 1 mL *supplemented DMEM* (1% Penicillin/Streptomycin, 10% FCS) resuspendiert und die Zellen maschinell wie unter 2.2.4 beschrieben gezählt.

Ca. 10^7 Zellen wurden dann in eine 25 cm²-Zellkulturflasche mit 10 mL *supplemented DMEM* (1% Penicillin/Streptomycin, 10% FCS) und 10 ng/mL *M-CSF-1* ausgesät. Nach 24 Stunden wurden der Zellüberstand in eine 75 cm²-Zellkulturflasche überführt und nochmals 10 mL *supplemented DMEM* (1% Penicillin/Streptomycin, 10% FCS) und 10 ng/mL *M-CSF-1* zugesetzt. Nach weiteren vier Tagen erfolgte eine erneute Zugabe von 10 mL *supplemented DMEM* (1% Penicillin/Streptomycin, 10% FCS) und 10 ng/mL *M-CSF-1*. Nach weiteren drei Tagen war die Ernte der differenzierten Makrophagen für weitere Experimente möglich. Die Inkubation erfolgte jeweils im Brutschrank Heracell™ 150i (*Thermo Scientific*, Karlsruhe) bei 37°C und 5% CO₂.

2.2.7 Proliferationsmessung an Knochenmarksmakrophagen

Zunächst wurden die Knochenmarksmakrophagen geerntet. Nach Absaugen des Mediums und einem Waschschrift mit 15 mL eisgekühltem *PBS* wurden die Zellen mit 5 mL Dispase (1 mg/mL) für 5-10 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden 10 mL *DMEM* (1% Penicillin/Streptomycin, 10% FCS) zugegeben und die bereits abgelösten Zellen in ein 50mL-Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Die restlichen adhärennten Zellen wurden nochmals mit 3 mL Dispase (1 mg/mL) für 5-10 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Dann wurden 7 mL

DMEM (1% Penicillin/Streptomycin, 10% *FCS*) zugegeben und 7 mL in das gleiche 50mL-Reaktionsgefäß überführt. Die verbliebenen adhärenen Zellen wurden mithilfe der übrigen 3 mL Suspension und eines Zellschabers vorsichtig abgelöst und in das gleiche 50mL-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 500 g für 10 min bei 4°C. Das Pellet wurde in 500 µL *DMEM* (1% Penicillin/Streptomycin, 10% *FCS*) resuspendiert und die Zellen wurden maschinell wie unter 2.2.4 beschrieben gezählt. Die Zellsuspension wurde dann bis zur Aussaat auf Eis gestellt.

Die Aussaat erfolgte auf einer *Multiwell*-Platte mit 96 *wells*. Je zwei *wells* à 5000 lebender Zellen (= 5000 lebende Zellen/34 mm²) wurden pro Bedingung bzw. Kontrolle in einem Gesamtvolumen von je 100 µL *DMEM* (1% Penicillin/Streptomycin, 10% *FCS*) inklusive der jeweiligen Stimulantien ausgesät. Zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens unter verschiedenen Bedingungen erfolgte die Inkubation mit *M-CSF-1* (10 ng/mL), einem am LTβR agonistisch wirkenden Antikörper (10 µg/mL), dem selektiven Liganden des LTβR LTα₁β₂ (1 µg/mL), CCL-5 (50 ng/mL), den entsprechenden Kontrollsubstanzen (siehe Tabelle 3) oder ohne weitere Stimulation.

Stimulanz	Entsprechende Kontrolle
<i>M-CSF-1</i>	<i>PBS</i>
agonistisch wirkender Antikörper	Immunglobulin G
LTα ₁ β ₂	<i>PBS</i> mit 0,1% BSA
CCL-5	<i>PBS</i> mit 0,1% BSA

Tabelle 3: Stimulantien und die entsprechenden Kontrollsubstanzen für die Proliferationsversuche.

Die Zellen wurden dann für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Dann wurden in jedes *well* 10 µL Rotitest® Vital (Carl Roth GmbH + CO. KG) gegeben und es folgte eine Inkubation lichtgeschützt bei 37°C und 5% CO₂ für zwei Stunden. Zur Kontrolle wurden ebenfalls zwei ausschließlich 100 µL Medium enthaltende *wells* mit Rotitest® Vital versetzt. Anschließend wurde die Absorption in den einzelnen *wells* bei 450 nm mithilfe des *Microplate Reader Synergy Mx* (BioTek, Winooski, VT, USA) gemessen. Die Hintergrundaktivität wurde von den erhaltenen Absorptionswerten subtrahiert. Pro Bedingung wurden in je zwei *wells* Zellen ausgesät und deren Absorptionswerte gemittelt.

Dieser Methode zur relativen Quantifizierung der Zellzahl liegt zugrunde, dass lebende Zellen das im Rotitest® Vital enthaltene Tetrazoliumsalz reduzieren. Die Menge des dabei entstehenden Formazan-Farbstoffs kann dann mittels kolorimetrischer Absorptionmessung quantifiziert werden.

2.2.8 Untersuchung des *Spreading*-Verhaltens

Die Ernte der Zellen erfolgte wie unter 2.2.7 beschrieben. Für die Aussaat wurde eine *Multiwell*-Platte mit 24 *wells* mit einliegenden Deckgläsern (Durchmesser 12 mm) verwendet. Pro Genotyp wurden je zwei *wells* à 40.000 lebender Zellen in 500 μ L *DMEM* (1% Penicillin/Streptomycin, 10% *FCS*) (= 40.000 lebende Zellen/1,9 cm²) ausgesät. Es folgte eine Inkubation für zwei Stunden bei 37°C und 5% CO₂. Dann erfolgte zweimal ein Waschschriff mit je 1 mL *PBS* pro *well*. Anschließend wurden die Zellen mit 1 mL Formaldehyd (Roti®-Histofix 4%, Carl Roth GmbH + CO. KG) für 10 min fixiert und anschließend zweimal mit *PBS* gewaschen. Zur Permeabilisation erfolgte nun die Zugabe von Triton X 100 (0,1%) für 2 min. Nach zweimaligem Waschen mit *PBS* wurden die Zellen lichtgeschützt mit Alexa Fluor® 488 Phalloidin (*Thermo Fisher Scientific Life Technologies* GmbH, Darmstadt) für 20 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit *PBS* und einmaligem Waschen mit destilliertem Wasser wurden die Deckgläser auf Objektträger übertragen und die Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol gefärbt. Fotos der Zellen wurden mithilfe des Mikroskops Zeiss Axio Observer Z.1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jöttingen) erstellt und die Fläche der einzelnen Zellen mithilfe des Programms *ImageJ* ausgemessen. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit dem Programm *ZEN lite 2012 SP2* (Zeiss, Oberkochen).

2.2.9 RNA-Isolierung

Zunächst wurden die geernteten, abzentrifugierten Knochenmarkszellen durch Resuspendieren mit 1 mL *Trizol* konserviert und anschließend bis zur *RNA*-Isolierung bei -80°C eingefroren. Zu Beginn der *RNA*-Isolierung wurde die Probe bei 37°C aufgetaut und anschließend 1 mL der Probe mit 200 μ L Chloroform für 3-5 min bei Raumtemperatur versetzt. Es folgte eine Zentrifugation bei 16000 g für 10 min bei 4°C.

Danach wurde der Überstand mit Isopropanol im Verhältnis 1:1 versetzt und für 15 min bei 4°C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 16000 g für 30 min bei 4°C. Nach Verwerfen des Überstandes wurden 0,5 mL Ethanol (70%) zugegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 16000 g für 10 min bei 4°C wurde der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und anschließend in 20 μ L *RNase*-freiem Wasser (Merck Millipore, Darmstadt) auf Eis resuspendiert. Es folgte eine Inkubation der Probe bei 65°C für 5 min und im Anschluss daran die Konzentrationsbestimmung der *RNA* mithilfe des Gerätes NanoDrop 1000 (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) und dem Programm „ND 1000“. Zur *RNA*-Analyse mithilfe der *Real-Time-PCR* wurde nun die *RNA* in *cDNA* transkribiert. Dies erfolgte mithilfe des *QuantiTect Reverse Transcription Kits* (Qiagen, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers im Gerät *Mastercycler gradient* bzw. *Mastercycler personal* (Eppendorf AG,

Hamburg). Anschließend wurden die Proben auf Eis mit Wasser auf eine Konzentration von 8,3 ng RNA pro μL verdünnt.

2.2.10 Quantitative *Real-Time-PCR* (qPCR)

Die Analyse der *mRNA*-Genexpression des *Macrophage Scavenger Receptor 1 (Msr1)* erfolgte mittels *StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Life Technologies™, Singapur)* unter Verwendung des *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG Kits (Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA)* mit zugesetztem ROX-Farbstoff. Für die Reaktion wurden 2,083 ng/ μL *cDNA* sowie 0,625 pmol/ μL des jeweiligen Vorwärts- und Rückwärts-*Primers* in einem Endvolumen von 20 μL eingesetzt. Die verwendeten *Primer* wurden über *Thermo Fisher (Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt)* bezogen. Ihre Sequenzen sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Die Reaktionsbedingungen für die qPCR und die anschließende Dissoziationskurve wurden dem Herstellerprotokoll des *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG Kits* entnommen. Zur Auswertung wurde die *StepOne™ Software Version 2.3 (Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt)* verwendet. Die relative Quantifizierung wurde nach der $\Delta\Delta\text{Cq}$ -Methode vorgenommen, wobei die *mRNA*-Expression des Zielgens um die Expression der endogenen Kontrolle (18S *rRNA*) korrigiert wurde.

Gen	Vorwärts-Primer 5'-3'	Rückwärts-Primer 5'-3'
18S	GCAATTATTCCCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCCAA
<i>Msr1</i>	GCAATTATTCCCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCCAA

Tabelle 4: Für die qPCR verwendete *Primer*.

3 Ergebnisse

3.1 Gewicht und Größe

Zur phänotypischen Charakterisierung und zum Vergleich *Apoe*-defizienter und *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienter Mäuse hinsichtlich Gewichts, Größe und *Body-Mass-Index (BMI)* wurden Mäuse beider Genotypen gewogen sowie die nasoanale Länge gemessen. In Abbildung 3 sind die Mittelwerte der Gewichte, der Körperlängen sowie der daraus berechneten *Body-Mass-Indices* in kg/m^2 der weiblichen und männlichen *Apoe*-defizienten und *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäuse dargestellt.

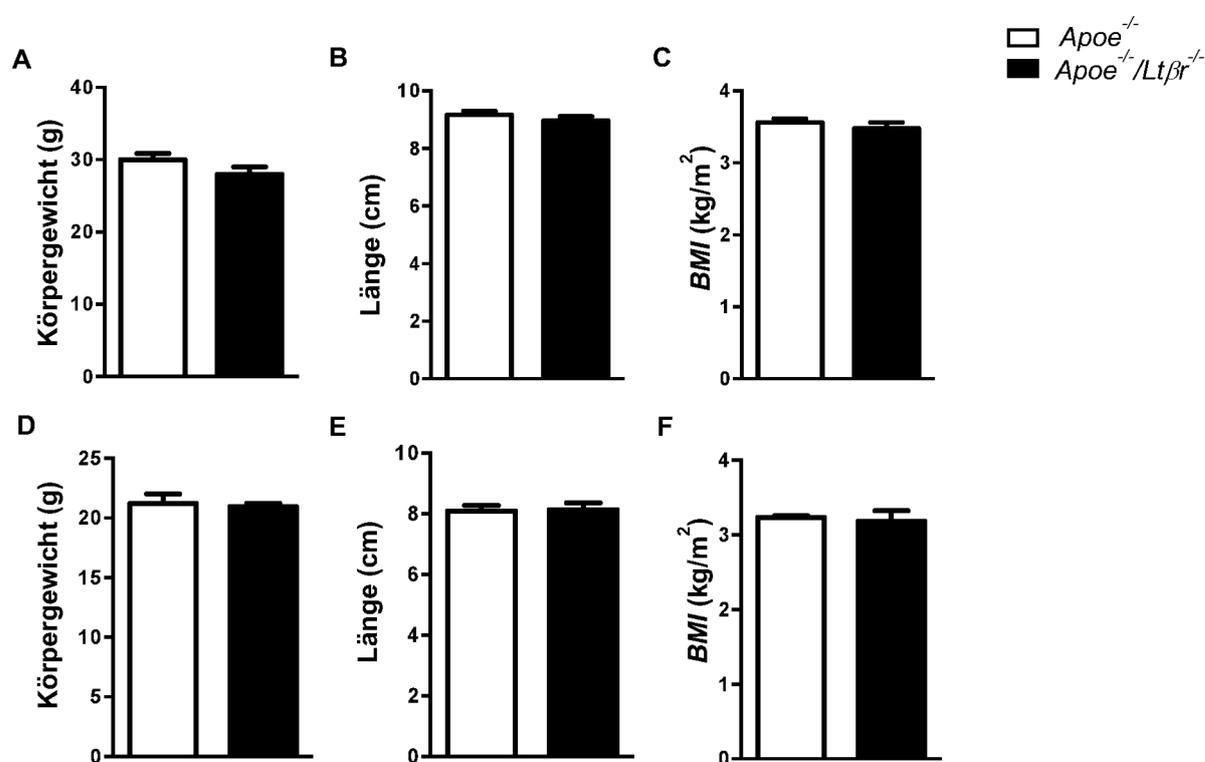


Abb. 3: Körpergewicht, Länge und *Body-Mass-Index (BMI)* von männlichen (A-C) und weiblichen (D-F) *Apoe*-defizienten und *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen. Die Abbildung zeigt das Körpergewicht in Gramm (A, D), die Länge der Mäuse in Zentimeter (B, E) sowie den aus diesen Werten bestimmten *Body-Mass-Index (BMI)* in kg/m^2 (C, F). Angegeben ist der jeweilige Mittelwert \pm SEM; A-C: n = 7; D-F: n = 5.

Es zeigte sich weder bei den weiblichen noch bei den männlichen Mäusen ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der erhobenen Parameter zwischen *Apoe*-defizienten und *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen.

3.2 Blutbild

Da der LT β R wie beschrieben einen Einfluss auf die Ausbildung sekundär lymphatischer Organe hat, wurden auch beim vorliegenden Modell der akzelerierten Atherosklerose Veränderungen im hämatopoetischen System untersucht.

Nach vier Wochen Fütterung mit einer fett- und cholesterinreichen Western-Diät wurden die Anzahl an Erythrozyten, Leukozyten und deren Subpopulationen sowie der Hämatokrit im Blut männlicher und weiblicher *Apoe*-defizienter und *Apoe/Lt β r*-doppeldefizienter Mäuse bestimmt. Abbildung 4 A-C zeigt die Mittelwerte der Anzahl an Erythrozyten und Leukozyten sowie des Hämatokrits im Blut männlicher *Apoe*-defizienter und *Apoe/Lt β r*-doppeldefizienter Mäuse. Zudem sind in Abbildung 4 D-F die einzelnen Fraktionen der Leukozyten im Vergleich zwischen den beiden Genotypen dargestellt. Abbildung 5 zeigt das Gleiche für weibliche *Apoe*-defiziente und *Apoe/Lt β r*-doppeldefiziente Mäuse.

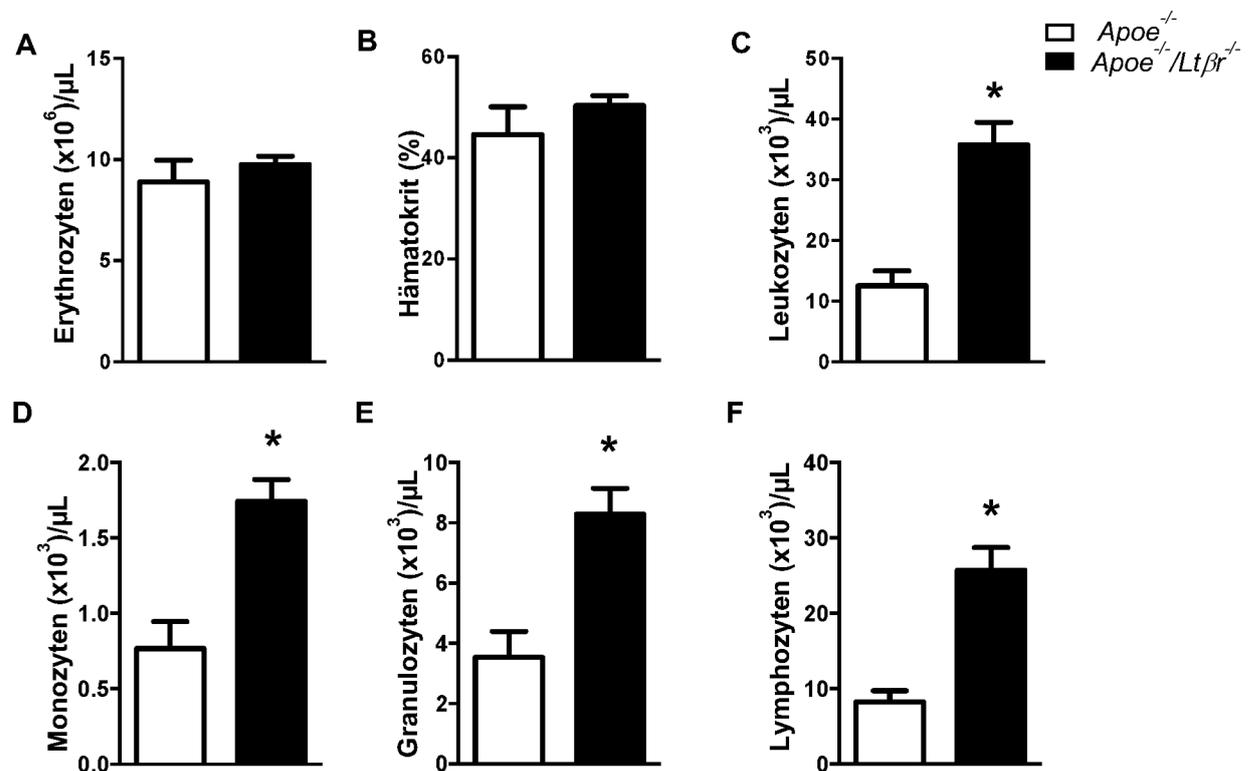


Abb. 4: Anzahl an Erythrozyten, Leukozyten, Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten sowie der Hämatokrit im Blut männlicher *Apoe*-defizienter und *Apoe/Lt β r*-doppeldefizienter Mäuse im Alter von zwölf Wochen. **A** zeigt die Erythrozytenzahl pro μ L Blut. **B** gibt den Hämatokrit in % an. **C** zeigt die Leukozytenzahl pro μ L Blut. **D** zeigt die Monozytenzahl pro μ L Blut. **E** zeigt die Granulozytenzahl pro μ L Blut. **F** zeigt die Lymphozytenzahl pro μ L Blut. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM; *p < 0,05; A-B: n = 5/7; C-F: n = 6/7.

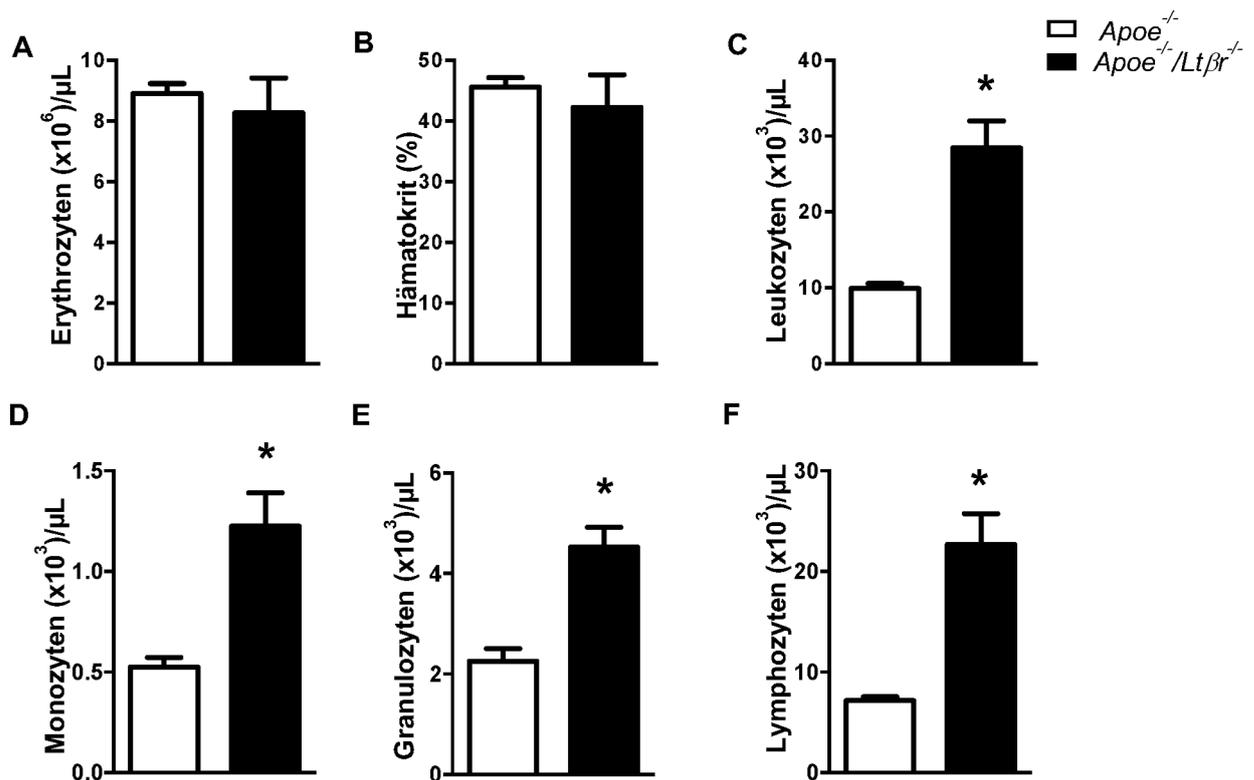


Abb. 5: Anzahl an Erythrozyten, Leukozyten, Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten sowie der Hämatokrit im Blut weiblicher *Apoe*-defizienter und *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienter Mäuse im Alter von zwölf Wochen. **A** zeigt die Erythrozytenzahl pro μL Blut. **B** gibt den Hämatokrit in % an. **C** zeigt die Leukozytenzahl pro μL Blut. **D** zeigt die Monozytenzahl pro μL Blut. **E** zeigt die Granulozytenzahl pro μL Blut. **F** zeigt die Lymphozytenzahl pro μL Blut. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM; * $p < 0,05$; $n = 4$.

Hinsichtlich der Anzahl an Erythrozyten und des Hämatokrits zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen sowohl bei den männlichen als auch den weiblichen Mäusen. Die Anzahl an Leukozyten im Blut *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienter Mäuse beider Geschlechter war hingegen signifikant höher als die im Blut *Apoe*-defizienter Mäuse. Gleiches galt für die Fraktionen der Leukozyten – Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten.

Im Rahmen des Projekts der Arbeitsgruppe wurde auch mit Knochenmark-Chimären gearbeitet. Dabei wurde u.a. Knochenmark *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienter Mäuse *Apoe*-defizienten Mäusen transplantiert und umgekehrt. Auch diesen wurde Blut wie oben beschrieben entnommen und die Blutbilder wurden bestimmt. So ließ sich näher differenzieren, ob für die erhöhte Anzahl im Blut zirkulierender Leukozyten der *LTβR*-*knockdown* auf den Blut- oder den Stromazellen beispielsweise lymphatischer Organe ursächlich war. Abbildung 6 zeigt die Mittelwerte der Anzahl an Leukozyten sowie deren einzelnen Fraktionen im Vergleich zwischen *Apoe*-defizienten Mäusen, denen Knochenmark

Apoe/Ltβr-doppeldefizienter Mäuse transplantiert wurde und *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen, denen Knochenmark *Apoe*-defizienter Mäuse transplantiert wurde.

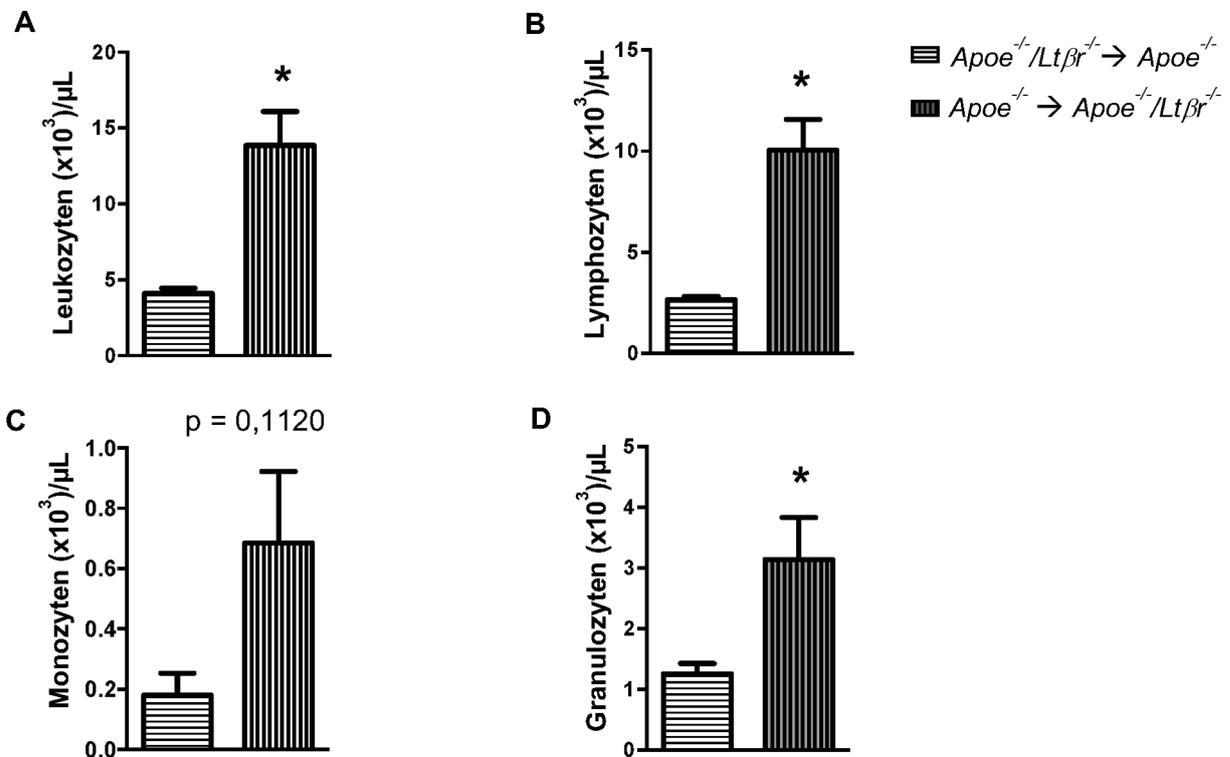


Abb. 6: Anzahl an Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten im Blut männlicher Knochenmark-Chimären *Apoe*-defizienter und *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienter Mäuse im Alter von zwölf Wochen. A zeigt die Leukozytenzahl pro μL Blut. B zeigt die Lymphozytenzahl pro μL Blut. C zeigt die Monozytenzahl pro μL Blut. D zeigt die Granulozytenzahl pro μL Blut. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM; *p < 0,05; n = 6/5.

Die Auswertung der Blutbilder der Knochenmark-Chimären ergab eine signifikant erhöhte Anzahl an zirkulierenden Leukozyten bei *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen, denen Knochenmark *Apoe*-defizienter Mäuse transplantiert wurde, im Vergleich zu *Apoe*-defizienten Mäusen, die Knochenmark *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienter Mäuse erhielten. Dies galt auch für die Lymphozyten und die Granulozyten, allerdings nicht für die Monozyten (p = 0,1120).

3.3 Bestimmung der Anzahl peritonealer Leukozyten

Das Modell der akzelerierten Atherosklerose geht mit einer chronischen Inflammation einher. Wie oben beschrieben, wurden hier deutliche Unterschiede in Abhängigkeit von der Expression des LTβR beobachtet. Nachfolgend wurde daher die Immunzellrekrutierung

infolge eines akuten inflammatorischen Stimulus am Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis untersucht. Hierzu wurden die Mäuse ab einem Alter von acht Wochen für vier Wochen mit einer fett- und cholesterinreichen Western-Diät gefüttert. Anschließend erfolgte fünf Tage vor der Isolierung der Peritonealzellen eine intraperitoneale Thioglykolat-Injektion. Nach intraperitonealer *Lavage* und Erythrozyten-Lyse wurde die Anzahl der isolierten Zellen mittels *CountessTM automated cell counter* (Life Technologies GmbH, Darmstadt) ermittelt. Da die Menge gewonnener Flüssigkeit bei der *Lavage* der verschiedenen Versuche geringfügig variierte, wurde zur Standardisierung zudem die Zellzahl pro Milliliter *Lavage* berechnet.

3.3.1 Leukozytenzahl in der Peritonealhöhle männlicher Mäuse

Bei den *Apoe/Ltβr*-doppelseffizienten Mäusen wurden etwa doppelt so viele und damit signifikant mehr Leukozyten aus der Peritonealhöhle isoliert als bei den *Apoe*-defizienten Mäusen (Abb. 7, Teil A). Dies galt auch für die Leukozytenzahl pro Milliliter *Lavage* (Abb. 7, Teil B). Unter Berücksichtigung der Anzahl zirkulierender Leukozyten im Blut hingegen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen hinsichtlich der intraperitonealen Leukozytenzahl (Abb. 7, Teil C).

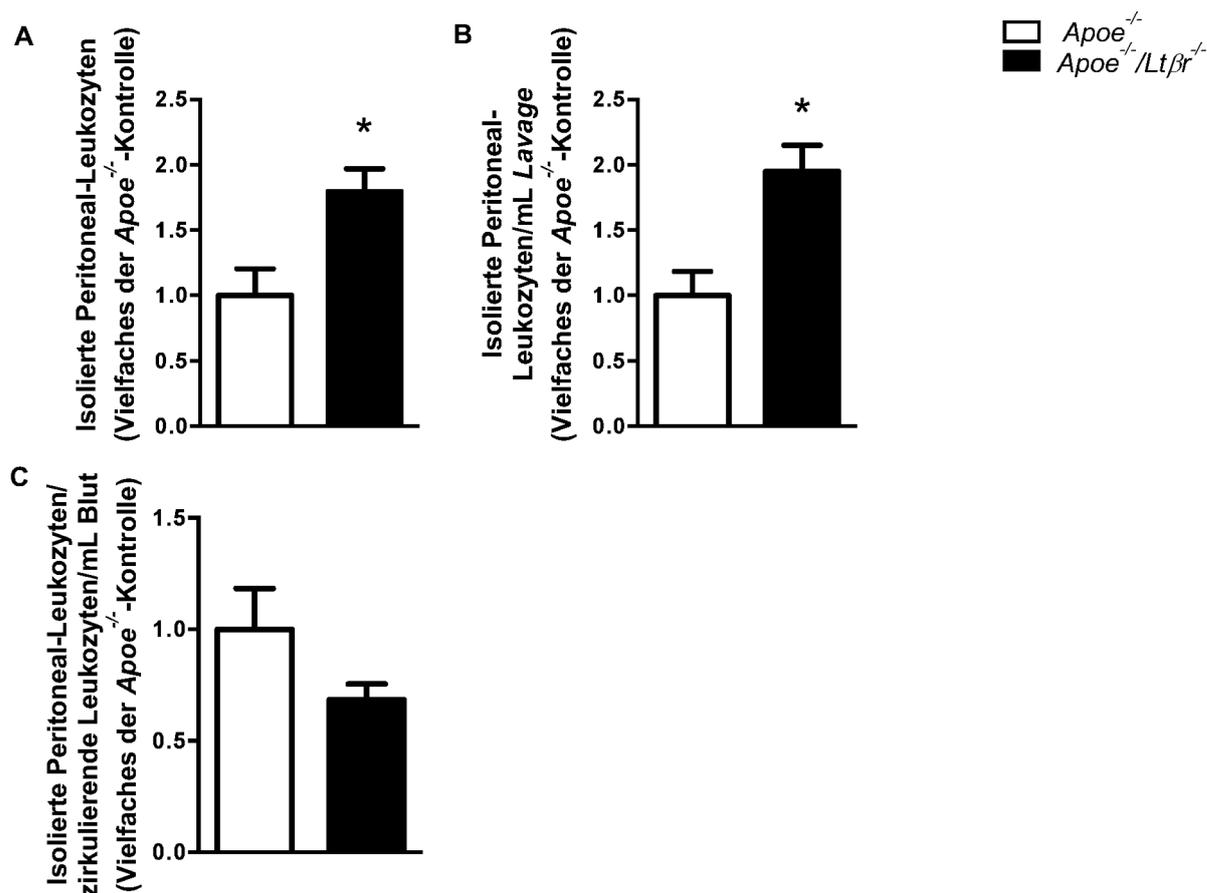


Abb. 7: Anzahl der aus der Peritonealhöhle isolierten Leukozyten pro Maus (A), pro Milliliter Lavage (B) und in Relation zur Anzahl im Blut zirkulierender Leukozyten (C) bei $Apoe/Lt\beta r$ -doppeldefizienten im Vergleich zu $Apoe$ -defizienten männlichen Mäusen. **A** Mittelwert der Zellzahl/Maus bei $Apoe/Lt\beta r$ -doppeldefizienten Mäusen im Vergleich zu $Apoe$ -defizienten Mäusen. **B** Mittelwert der Zellzahl/mL Peritoneal-Lavage bei $Apoe/Lt\beta r$ -doppeldefizienten Mäusen im Vergleich zu $Apoe$ -defizienten Mäusen. **C** Mittelwert der Zellzahl/mL Lavage bezogen auf die Anzahl zirkulierender Leukozyten/mL Blut bei $Apoe/Lt\beta r$ -doppeldefizienten Mäusen im Vergleich zu $Apoe$ -defizienten Mäusen. Angegeben sind die Mittelwerte als Vielfaches des Mittelwertes der $Apoe^{-/-}$ -Kontrolle \pm SEM; * $p < 0,05$; $n = 9$.

3.3.2 Leukozytenzahl in der Peritonealhöhle weiblicher Mäuse

Wie bei den männlichen Mäusen wurden auch hier bei den weiblichen $Apoe/Lt\beta r$ -doppeldefizienten Mäusen etwa doppelt so viele und damit signifikant mehr Leukozyten aus der Peritonealhöhle isoliert als bei den $Apoe$ -defizienten Mäusen (Abb. 8, Teil A). Dies galt auch für die Leukozytenzahl pro Milliliter Lavage (Abb. 8, Teil B). Unter Berücksichtigung der Anzahl zirkulierender Leukozyten im Blut hingegen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen hinsichtlich der intraperitonealen Leukozytenzahl (Abb. 8, Teil C).

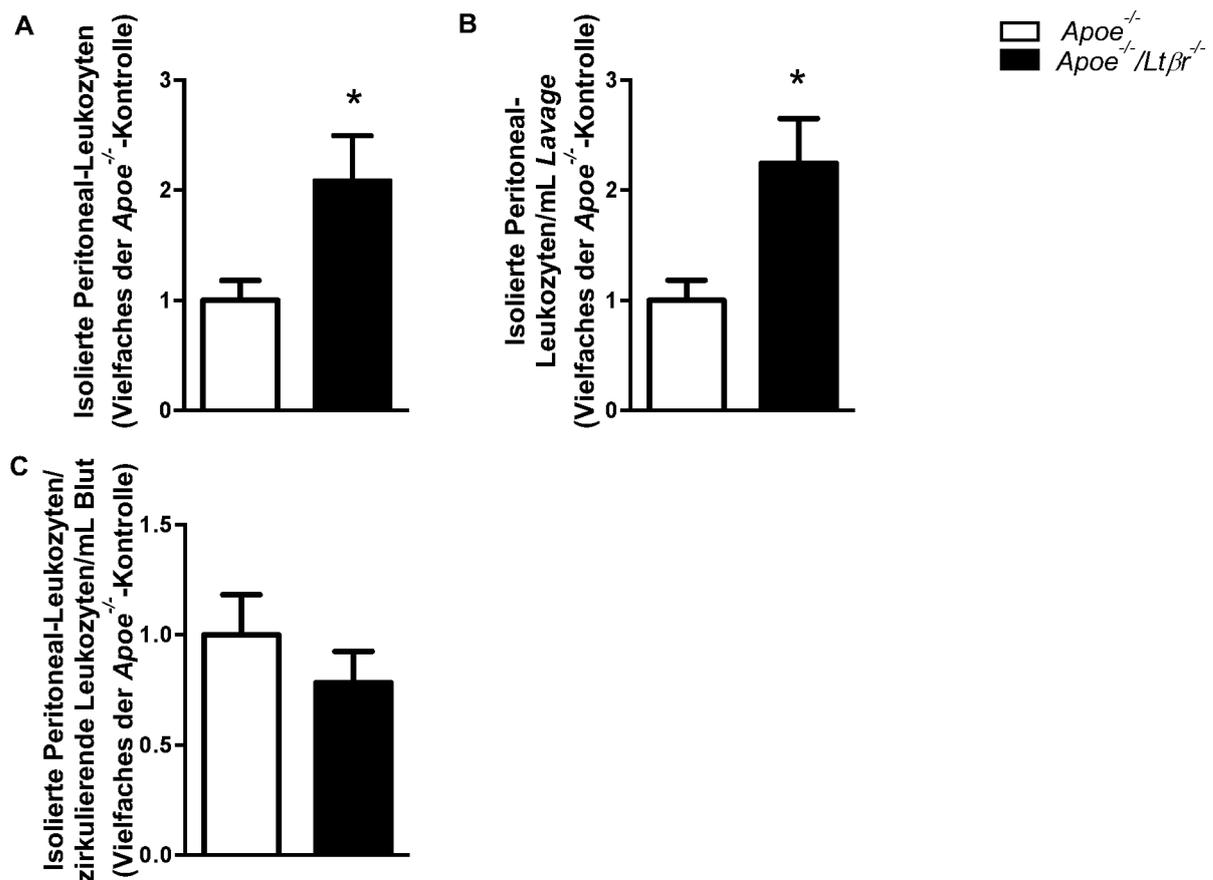


Abb. 8: Anzahl der aus der Peritonealhöhle isolierten Leukozyten pro Maus (A), pro Milliliter Lavage (B) und in Relation zur Anzahl im Blut zirkulierender Leukozyten (C) bei *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten im Vergleich zu *Apoe*-defizienten weiblichen Mäusen. **A** Mittelwert der Zellzahl/Maus bei *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen im Vergleich zu *Apoe*-defizienten Mäusen. **B** Mittelwert der Zellzahl/mL Peritoneal-Lavage bei *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen im Vergleich zu *Apoe*-defizienten Mäusen. **C** Mittelwert der Zellzahl/mL Lavage bezogen auf die Anzahl zirkulierender Leukozyten/mL Blut bei *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen im Vergleich zu *Apoe*-defizienten Mäusen. Angegeben sind die Mittelwerte als Vielfaches des Mittelwertes der *Apoe*^{-/-}-Kontrolle ± SEM; *p < 0,05; n = 6.

3.3.3 Migrationsverhalten nach LPS-Stimulation

Um neben der Immunzellrekrutierung infolge eines akuten inflammatorischen Stimulus aus dem Blut in die Peritonealhöhle zusätzlich das anschließende Migrationsverhalten der Leukozyten aus der Peritonealhöhle heraus untersuchen zu können, wurde männlichen *Apoe*-defizienten und *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen vier Stunden vor der Lavage LPS intraperitoneal injiziert. Kontrolltieren wurde PBS i.p. injiziert.

Die intraperitoneale Injektion von LPS vier Stunden vor der Lavage führte zu einer signifikanten Reduktion der Leukozytenzahl in der Lavage sowohl bei *Apoe*-defizienten wie

Apoe/Ltβr-doppeldefizienten Mäusen im Vergleich zur Leukozytenzahl in der *Lavage* der Kontrolltiere (Abb. 9).

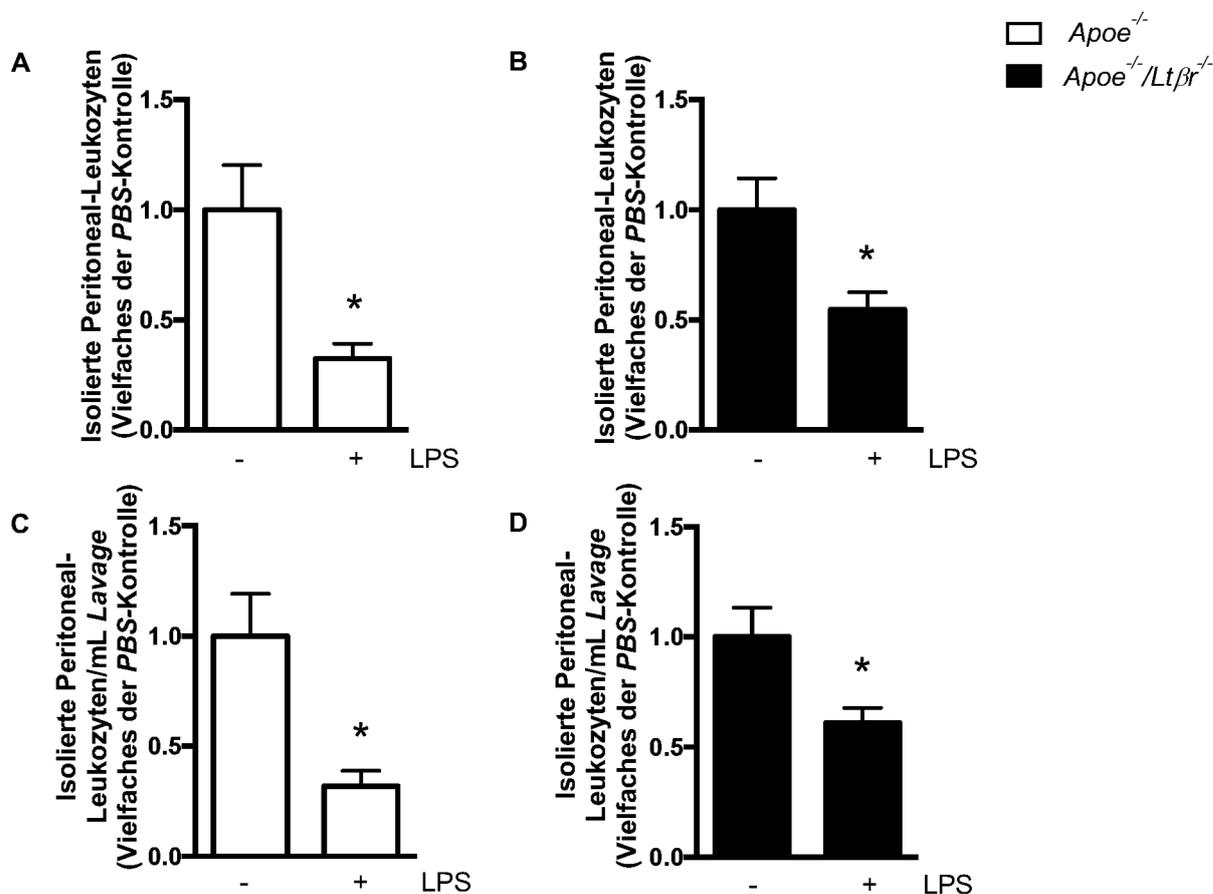


Abb. 9: Anzahl der aus der Peritonealhöhle isolierten Leukozyten nach LPS-Injektion bei *Apoe*-defizienten (A, C) und *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten (B, D) männlichen Mäusen im Verhältnis zur Anzahl isolierter Leukozyten nach *PBS*-Injektion pro Maus (A, B) und pro Milliliter *Lavage* (C, D). A und B Mittelwert der Zellzahl/Maus nach i.p. LPS-Injektion im Vergleich zur *PBS*-Injektion bei *Apoe*-defizienten Mäusen (A) und *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen (B). C und D Mittelwert der Zellzahl/mL Peritoneal-*Lavage* nach i.p. LPS-Injektion im Vergleich zur *PBS*-Injektion bei *Apoe*-defizienten Mäusen (C) und *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen (D). Angegeben sind die Mittelwerte als Vielfaches des Mittelwertes der *PBS*-Kontrolle ± SEM; *p < 0,05; n = 5.

Abbildung 10 dient dem direkten Vergleich der Wirkung der LPS-Injektion bei *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten und *Apoe*-defizienten Mäusen. Im Vergleich zu den *Apoe*-defizienten Mäusen führte die intraperitoneale Injektion von LPS bei den *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen zu einer signifikant geringeren Reduktion der isolierten Leukozytenzahl in der *Lavage* (Abb. 10, Teile A und B). Im Unterschied zu der isolierten Leukozytenzahl nach alleiniger Thioglykolat-Injektion (s. 3.3.1) zeigte sich dieser Effekt auch unter Berücksichtigung der Anzahl zirkulierender Leukozyten im Blut (Abb. 10, Teil C).

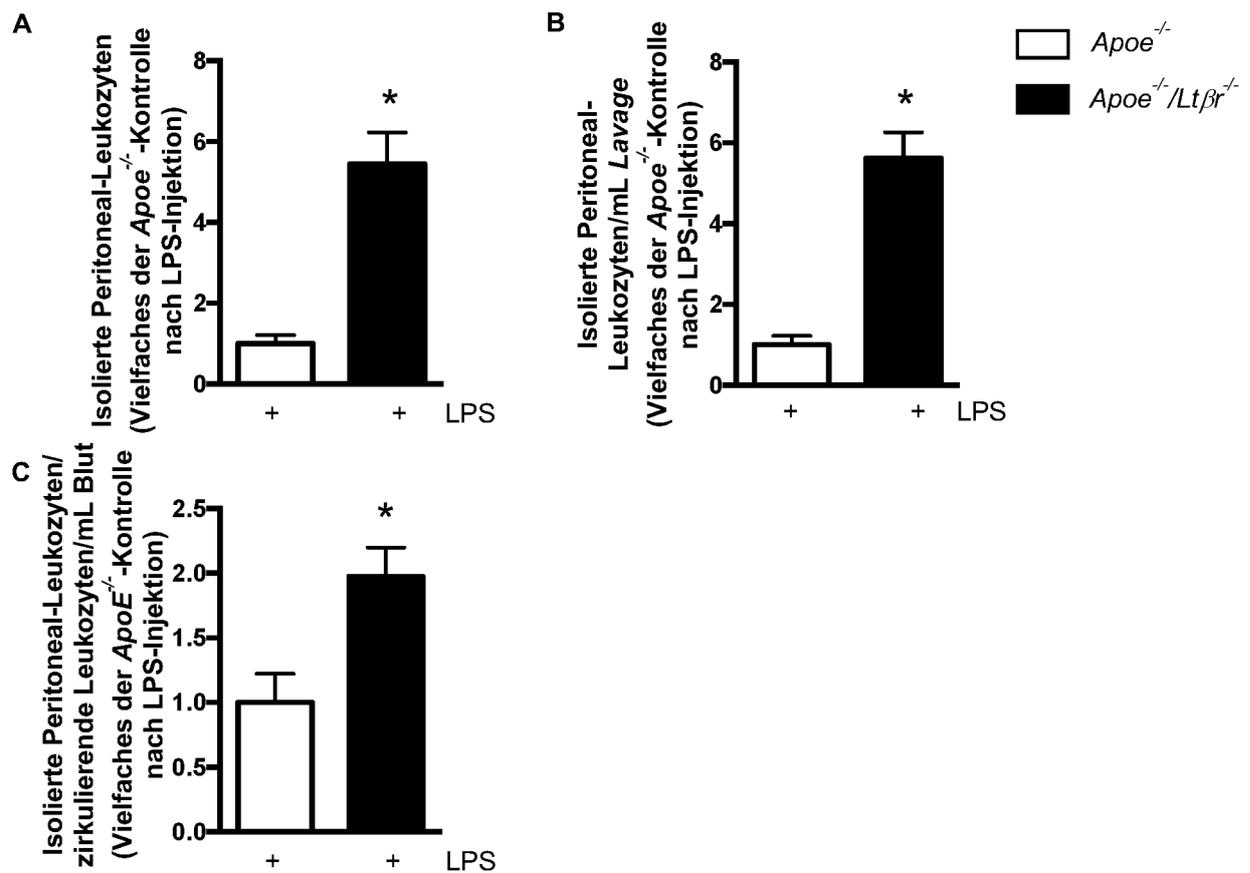


Abb. 10: Anzahl der nach intraperitonealer LPS-Injektion aus der Peritonealhöhle isolierten Leukozyten pro Maus (A), pro Milliliter *Lavage* (B) und in Relation zur Anzahl im Blut zirkulierender Leukozyten (C) bei *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten im Vergleich zu *Apoe*-defizienten männlichen Mäusen. **A** Mittelwert der Zellzahl nach LPS-Injektion/Maus bei *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen im Vergleich zu *Apoe*-defizienten Mäusen. **B** Mittelwert der Zellzahl nach LPS-Injektion/mL Peritoneal-*Lavage* bei *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen im Vergleich zu *Apoe*-defizienten Mäusen. **C** Mittelwert der Zellzahl nach LPS-Injektion/mL *Lavage* bezogen auf die Anzahl zirkulierender Leukozyten/mL Blut bei *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen im Vergleich zu *Apoe*-defizienten Mäusen. Angegeben sind die Mittelwerte als Vielfaches des Mittelwertes der *Apoe*^{-/-}-Kontrolle ± SEM; *p < 0,05; n = 5.

3.4 Knochenmarksmakrophagen

3.4.1 Anzahl an Monozyten und deren Vorläuferzellen im Knochenmark

Um Unterschiede hinsichtlich der Anzahl an Monozyten bzw. deren Vorläuferzellen im Knochenmark beider Genotypen untersuchen zu können, wurde deren Zellzahl im Knochenmark bestimmt. Dazu wurden Femur und Tibia von männlichen und weiblichen *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten und *Apoe*-defizienten Mäusen nach Präparation gespült.

Anschließend erfolgte die weitere Aufbereitung des gewonnenen Materials wie unter 2.2.6 beschrieben.

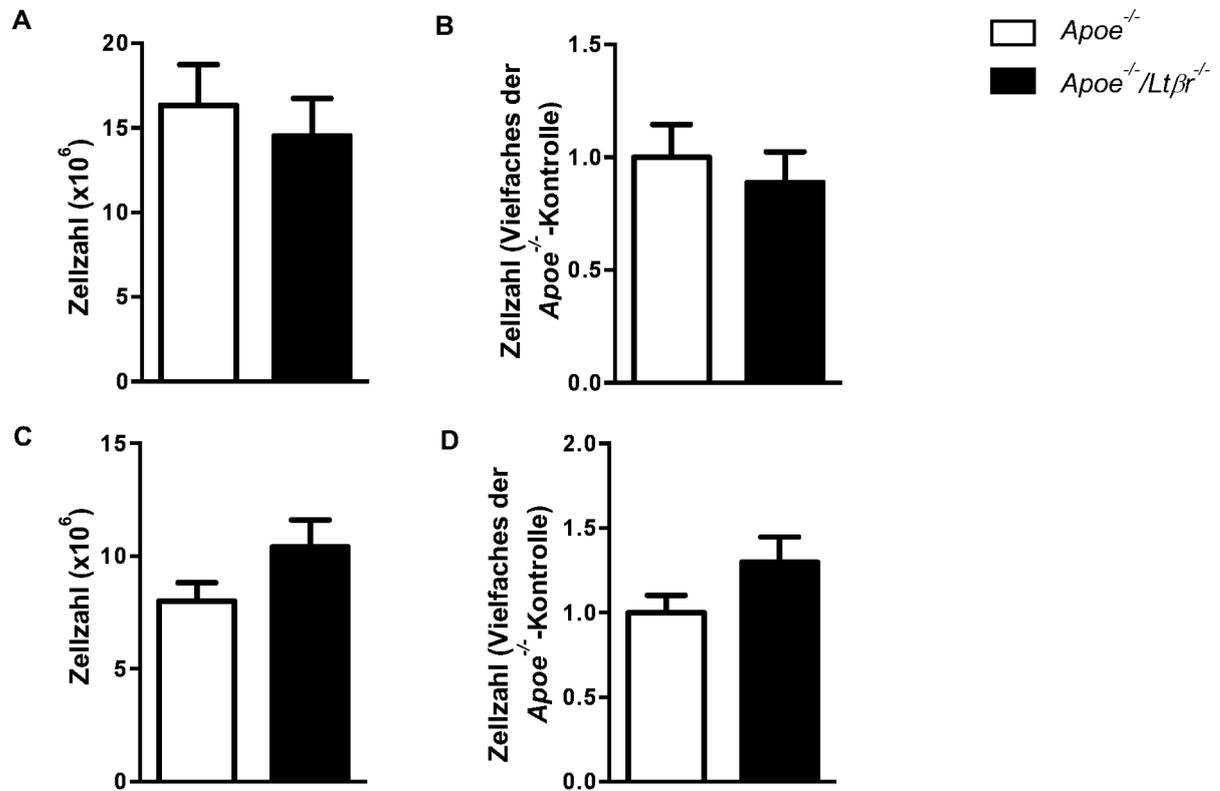


Abb. 11: Knochenmarkszellzahl absolut (A, C) und relativ (B, D) im Vergleich $Apoe/Lt\beta r$ -doppeldefizienter gegenüber $Apoe$ -defizienten männlichen (A, B) und weiblichen (C, D) Mäusen. A Absolute Anzahl an Knochenmarkszellen bei $Apoe/Lt\beta r$ -doppeldefizienten und $Apoe$ -defizienten männlichen Mäusen. **B** Mittelwert der Anzahl an Knochenmarkszellen bei $Apoe/Lt\beta r$ -doppeldefizienten Mäusen im Vergleich zu $Apoe$ -defizienten männlichen Mäusen. **C** Absolute Anzahl an Knochenmarkszellen bei $Apoe/Lt\beta r$ -doppeldefizienten und $Apoe$ -defizienten weiblichen Mäusen. **D** Mittelwert der Anzahl an Knochenmarkszellen bei $Apoe/Lt\beta r$ -doppeldefizienten Mäusen im Vergleich zu $Apoe$ -defizienten weiblichen Mäusen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM; $n = 7$.

Hinsichtlich der Anzahl an Monozyten bzw. deren Vorläuferzellen im Knochenmark zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen $Apoe/Lt\beta r$ -doppeldefizienten und $Apoe$ -defizienten Mäusen sowohl bei männlichen (Abb. 11, Teile A und B) wie weiblichen (Abb. 11, Teile C und D) Mäusen.

3.4.2 Proliferation von Knochenmarksmakrophagen

Um das Proliferationsverhalten von Knochenmarksmakrophagen *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienter und *Apoe*-defizienter Mäuse zu untersuchen, wurden zunächst die aus Vorläuferzellen des Knochenmarks kultivierten Makrophagen beider Genotypen 48 Stunden mit verschiedenen Stimulantien inkubiert. Als Kontrollen dienten die gleichen Volumina der jeweiligen Lösungsmittel der Stimulantien. Nach 48 Stunden wurde mittels kolorimetrischer Absorptionsmessung die Zellzahl relativ quantifiziert.

Zunächst wurde der Einfluss des Wachstumsfaktors *M-CSF-1* auf das Proliferationsverhalten der Makrophagen beider Genotypen untersucht.

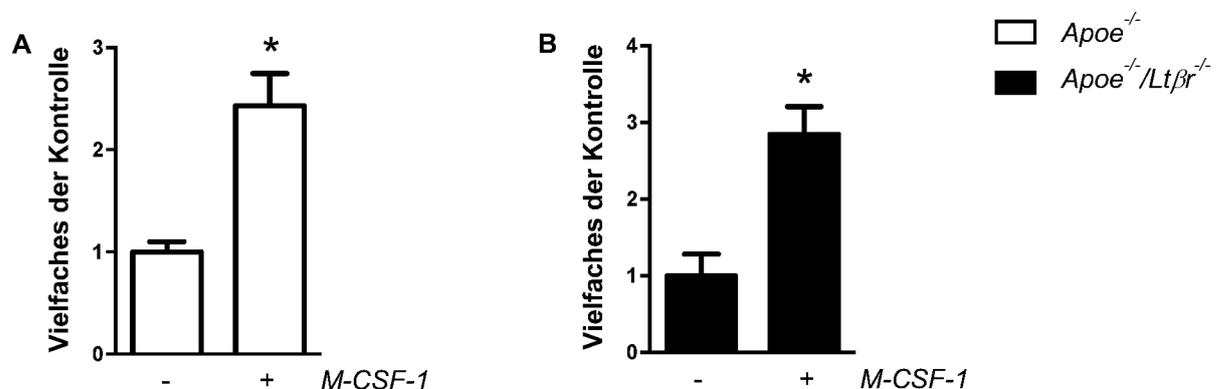


Abb. 12: Einfluss von *M-CSF-1* auf die Makrophagenproliferation bei *Apoe*-defizienten (A) und *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten (B) männlichen Mäusen. Nach Kultivierung der Makrophagen für 48h mit oder ohne *M-CSF-1* wurde die Zellzahl mittels kolorimetrischer Absorptionsmessung relativ quantifiziert. Angegeben sind die Mittelwerte der Absorptionsmittelwerte als Vielfaches des Mittelwertes der Absorptionsmittelwerte der Kontrolle \pm SEM; *p < 0,05; A: n = 11; B: n = 8.

Bei den *Apoe*-defizienten Mäusen zeigte sich unter Stimulation mit *M-CSF-1* eine signifikante, etwa um den Faktor 2,4 höhere Zellzahl und damit gesteigerte Proliferation im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (Abb. 12, Teil A). Bei den *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen resultierte die Stimulation mit *M-CSF-1* ebenfalls in einer signifikanten, etwa um den Faktor 2,84 erhöhten Zellzahl und damit gesteigerter Proliferation im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (Abb. 12, Teil B).

Um den Einfluss des LTβR auf das Proliferationsverhalten analysieren zu können, wurden im Folgenden Makrophagen beider Genotypen mit einem am LTβR agonistisch wirkenden Antikörper bzw. dem selektiven LTβR-Liganden LTα₁β₂ inkubiert.

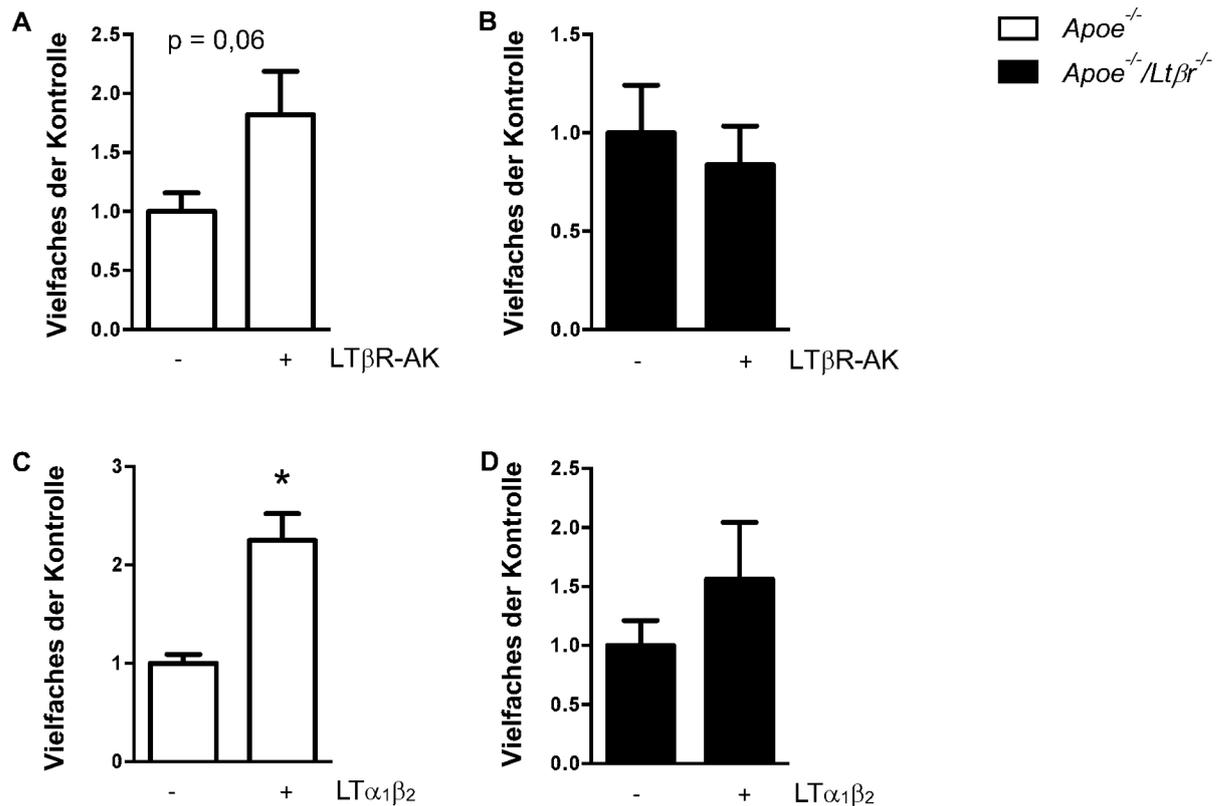


Abb. 13: Einfluss von agonistisch wirkendem LTβR-Antikörper (A, B) und selektivem Liganden (LTα1β2) (C, D) auf die Makrophagenproliferation bei *Apoe*-defizienten (A, C) und *Apoe/Ltβr*-doppelfdefizienten (B, D) männlichen Mäusen. Nach Kultivierung der Makrophagen für 48h mit dem agonistisch wirkenden LTβR-Antikörper (A, B) bzw. dem selektiven Liganden LTα1β2 (C, D) oder zur jeweiligen Kontrolle mit IgG (A, B) bzw. 0,1% BSA (C, D) wurde die Zellzahl mittels kolorimetrischer Absorptionsmessung relativ quantifiziert. Angegeben sind die Mittelwerte der Absorptionsmittelwerte als Vielfaches des Mittelwertes der Absorptionsmittelwerte der Kontrolle ± SEM; *p < 0,05; A: n = 8; p = 0,06; B: n = 5; C: n = 7; D: n = 5.

Bei den *Apoe*-defizienten Mäusen zeigte sich unter Stimulation mit dem selektiven Liganden des LTβR LTα1β2 eine signifikant, etwa um den Faktor 2,25 höhere Zellzahl und damit gesteigerte Proliferation im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (Abb. 13, Teil C). Auch die Stimulation mit dem agonistischen Antikörper des LTβR führte zu einer etwa um den Faktor 1,8 höheren Zellzahl, aber damit nicht signifikant gesteigerten Proliferation (p = 0,06) (Abb. 13, Teil A). Bei den *Apoe/Ltβr*-doppelfdefizienten Mäusen zeigten beide Stimulantien keinen signifikanten Einfluss auf die Zellzahl und damit die Proliferation der Makrophagen (Abb. 13, Teile B und D). Dass die LTβR-Stimulation der Makrophagen der *Apoe*-defizienten Mäuse tatsächlich einen pro-proliferativen Effekt hatte, zeigt Abbildung 14.

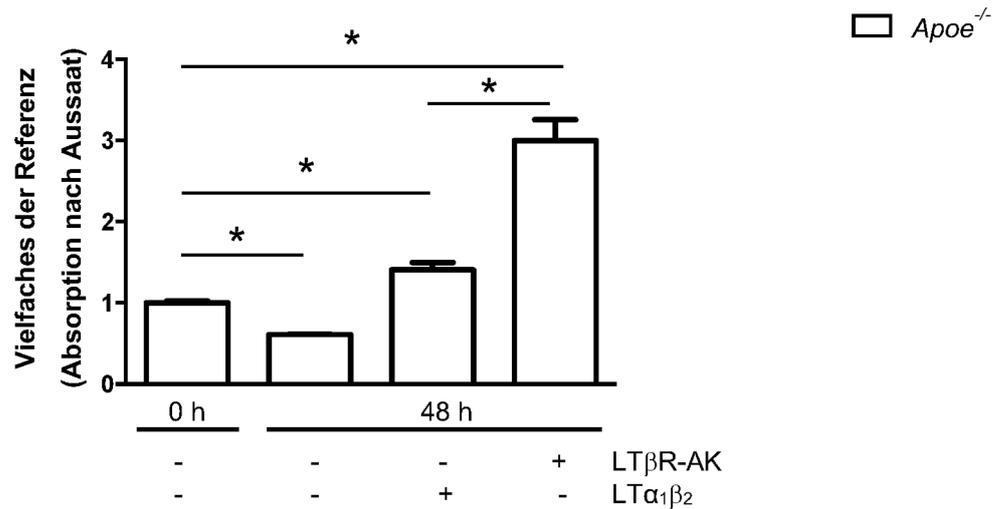


Abb. 14: Einfluss von agonistisch wirkendem LTβR-Antikörper und selektivem Liganden LTα1β2 auf die Makrophagenproliferation bei *Apoe*-defizienten männlichen Mäusen innerhalb der ersten 48 Stunden. Unmittelbar nach Aussaat oder nach Kultivierung der Makrophagen für 48h entweder ohne Stimulanz oder mit agonistisch wirkendem LTβR-Antikörper bzw. selektivem Liganden LTα1β2 wurde die Zellzahl mittels kolorimetrischer Absorptionsmessung relativ quantifiziert. Angegeben sind die Mittelwerte der Absorptionsmittelwerte als Vielfaches des Mittelwertes der Absorptionsmittelwerte unmittelbar nach Aussaat ± SEM; *p < 0,05; n = 3.

Die Gegenüberstellung des Vielfachen der Absorptionsmittelwerte nach 48 Stunden im Vergleich zum Zeitpunkt der Aussaat zeigt, dass die LTβR-Stimulation über 48 Stunden zu einer Erhöhung der Zellzahl führte. Bei Ausbleiben der Stimulation hingegen kam es zu einer signifikanten Reduzierung der Zahl vitaler Zellen über 48 Stunden im Vergleich zur Zellzahl nach Aussaat. Zudem war in dieser Datenreihe der Einfluss des agonistisch wirkenden LTβR-Antikörpers auf die Makrophagen-Proliferation signifikant stärker ausgeprägt als die des selektiven Liganden LTα1β2.

Abbildung 15 zeigt den Vergleich zwischen dem pro-proliferativen Einfluss der LTβR-Stimulation und der Stimulation mit *M-CSF-1*.

Im direkten Vergleich der LTβR-Stimulation sowie der Stimulation mit dem Wachstumsfaktor *M-CSF-1* zeigte sich ein ähnlich starker Einfluss auf die Proliferation der Makrophagen.

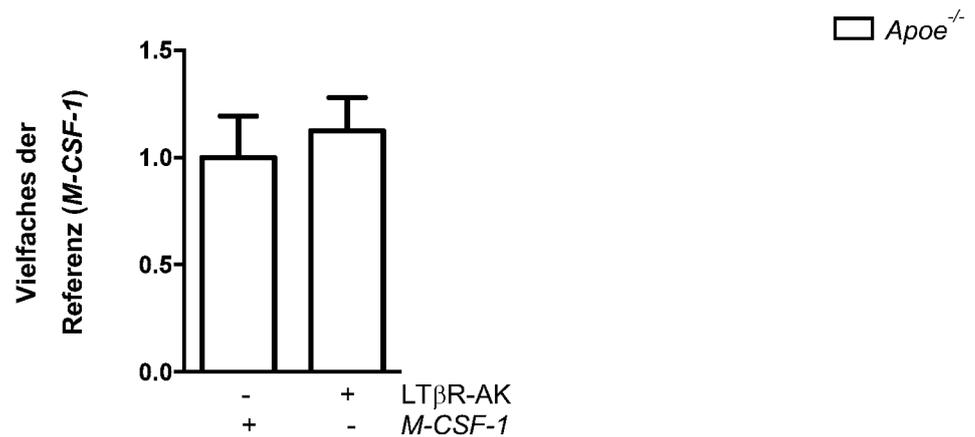


Abb. 15: Vergleich des Einflusses von agonistisch wirkendem LTβR-Antikörper und M-CSF-1 auf die Makrophagenproliferation bei Apoe-defizienten männlichen Mäusen. Nach Kultivierung der Makrophagen für 48h mit dem agonistisch wirkenden LTβR-Antikörper oder M-CSF-1 wurde die Zellzahl mittels kolorimetrischer Absorptionsmessung relativ quantifiziert. Angegeben sind die Mittelwerte der Absorptionsmittelwerte als Vielfaches des Mittelwertes der Absorptionsmittelwerte der mit M-CSF-1 stimulierten Makrophagen ± SEM; n = 7.

Ausgehend von den Vorergebnissen der Arbeitsgruppe, dass die Stimulation des LTβR zur Expression von CCL5 durch Makrophagen führt, sollte auch die Wirkung von CCL5 auf die Proliferation der Makrophagen Apoe-defizienter Mäuse untersucht werden.

Die Stimulation mit CCL5 führte zu keinem Anstieg der Proliferation im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (Abb. 16, Teil A). Die gemessene Absorption als Maß für die Zahl vitaler Zellen entsprach nach CCL5-Stimulation sogar nur etwa 20% derer nach Stimulation der Makrophagen mit dem agonistisch wirkenden LTβR-Antikörper (Abb. 16, Teil B).

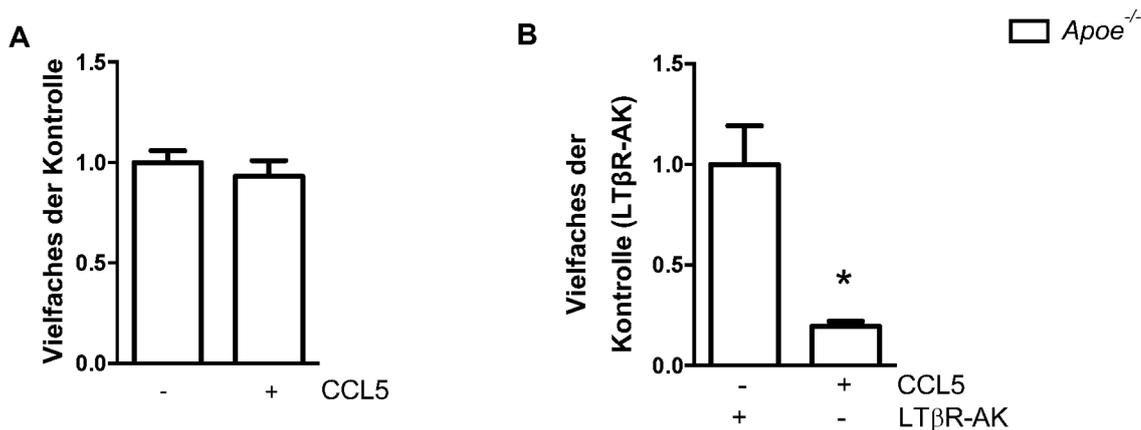


Abb. 16: Einfluss von CCL5 auf die Makrophagenproliferation bei *Apoe*-defizienten männlichen Mäusen. Nach Kultivierung der Makrophagen für 48h mit CCL5 oder zur Kontrolle mit 0,1% BSA wurde die Zellzahl mittels kolorimetrischer Absorptionsmessung relativ quantifiziert. **A** zeigt dabei den Einfluss von CCL5 auf die Makrophagenproliferation im Vergleich zu dessen Kontrolle. **B** zeigt den Einfluss von CCL5 auf die Makrophagenproliferation im Vergleich zur Stimulation der Zellen mit dem agonistisch wirkenden LTβR-Antikörper. Angegeben sind die Mittelwerte der Absorptionen als Vielfaches des Mittelwertes der Absorptionen der jeweiligen Referenz \pm SEM; * $p < 0,05$; $n = 5$.

3.4.3 Spreading der Knochenmarksmakrophagen

Um zu untersuchen, ob die Ursache des pro-proliferativen Effekts der LTβR-Aktivierung ein verändertes Adhäsionsverhalten der Makrophagen *Apoe*-defizienter Mäuse ist, wurde das *Spreading*-Verhalten von Knochenmarksmakrophagen *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienter und *Apoe*-defizienter Mäuse analysiert. Dazu wurden die aus Vorläuferzellen des Knochenmarks kultivierten Makrophagen beider Genotypen auf ihr *Spreading*-Verhalten hin untersucht. Abbildung 17 zeigt den Mittelwert der Zellfläche des *Apoe*^{-/-}/*Ltβr*^{-/-} als Vielfaches des Mittelwertes der *Apoe*^{-/-}-Kontrolle. Abbildung 18 zeigt Fotos der gefärbten Zellen. Teil A zeigt eine Übersichts- und eine Detailaufnahme der Makrophagen einer *Apoe*-defizienten Maus. Teil B zeigt das Gleiche für die Makrophagen einer *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Maus. Den Ergebnissen zufolge war die Anhaftungsfläche der Makrophagen *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienter Mäuse zwei Stunden nach der Aussaat signifikant, etwa um 30 %, kleiner als die der Makrophagen *Apoe*-defizienter Mäuse.

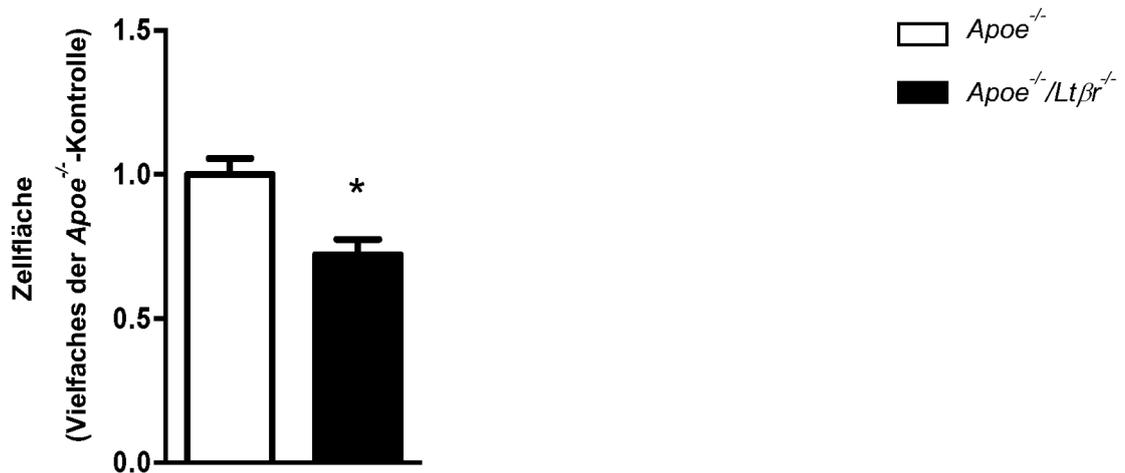


Abb. 17: Zellfläche der Knochenmarksmakrophagen *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienter im Vergleich zu *Apoe*-defizienter männlicher Mäuse zwei Stunden nach Aussaat. Die Abbildung zeigt den Mittelwert der Zellfläche des *Apoe^{-/-}/Ltβr^{-/-}* als Vielfaches des Mittelwertes der *Apoe^{-/-}*-Kontrolle \pm SEM; *p < 0,05; n = 5.

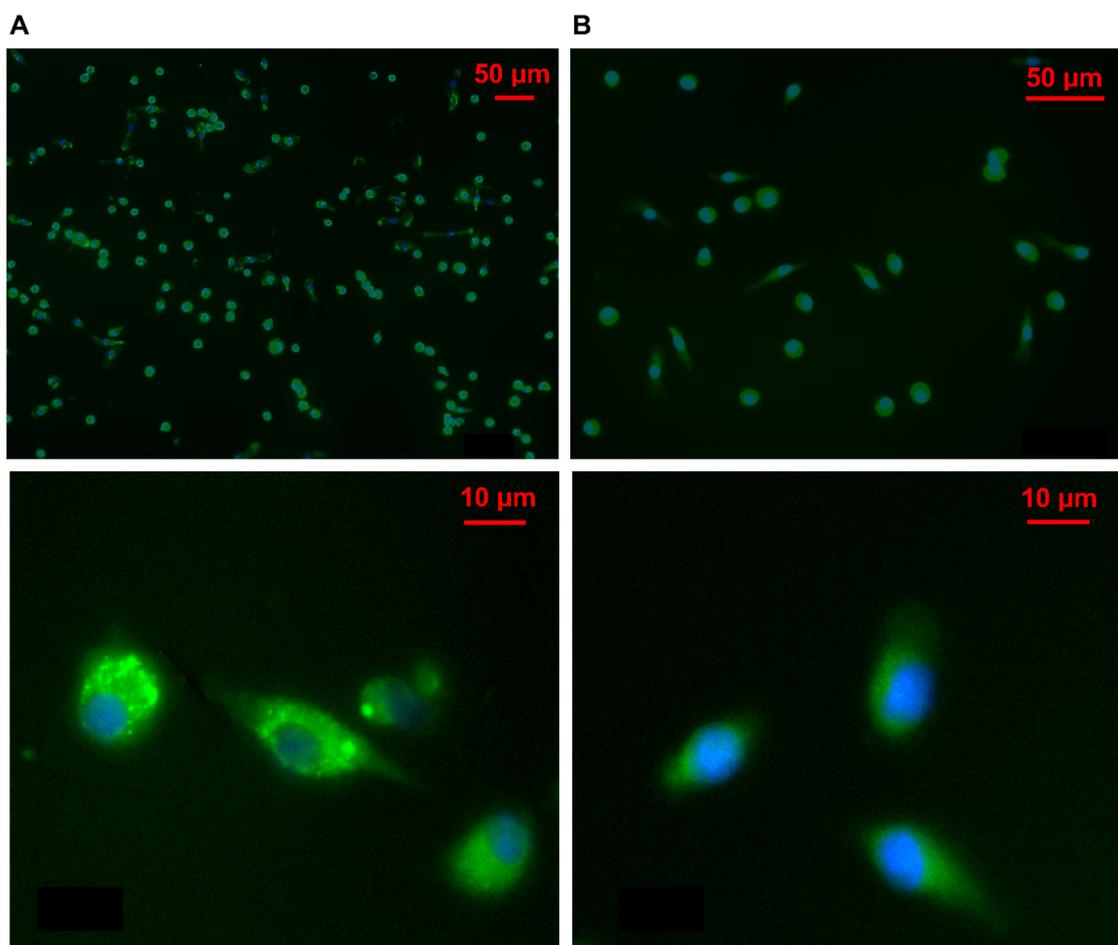


Abb. 18: *Spreading* von Knochenmarksmakrophagen *Apoe*-defizienter (A) und *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienter männlicher Mäuse (B) zwei Stunden nach Aussaat. A zeigt im oberen Teil eine Übersichtsaufnahme in einer 200-fachen Vergrößerung und darunter eine Detailaufnahme in 1000-facher Vergrößerung der angefärbten Makrophagen einer *Apoe*-defizienten Maus. B zeigt im oberen Teil eine Übersichtsaufnahme in einer 400-fachen Vergrößerung und darunter eine Detailaufnahme in 1000-facher Vergrößerung der angefärbten Makrophagen einer *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Maus.

3.4.4 Expression von *Scavenger Receptor Class A (CD204)*

Um die Ursache des unterschiedlichen *Spreading*-Verhaltens näher untersuchen zu können, wurde die Expression des u.a. an der Adhäsion von Makrophagen beteiligten *Scavenger Receptor Class A (SR-A)* untersucht. Hierzu wurde dessen *mRNA*-Expression bei beiden Genotypen mittels *Real-Time-PCR* ermittelt.

Bei unstimulierten Makrophagen zeigte sich kein signifikant unterschiedliches Expressionsmuster hinsichtlich der *mRNA*-Expression des *SR-A* bei den beiden Genotypen (Abb. 19).

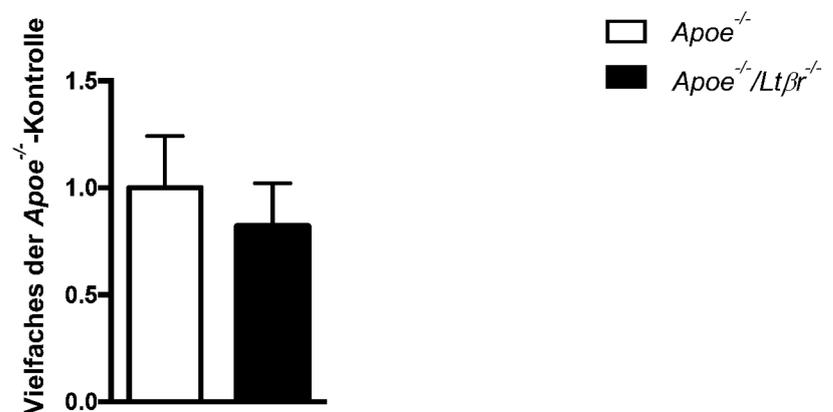


Abb. 19: *mRNA*-Expression des *Scavenger Receptor Class A (CD204)* bei *Apoe*-defizienten und *Apoe/Ltbr*-doppelfdefizienten männlichen Mäusen. Die *mRNA*-Expression des *Scavenger Receptor Class A (CD204)* wurde mittels *Real-Time-PCR* bei unstimulierten Makrophagen beider Genotypen bestimmt. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte als Vielfaches des Mittelwertes der *Apoe*-defizienten Mäuse \pm SEM; n = 6/5.

4 Diskussion

Apoe/Ltβr-doppeldefiziente Mäuse, die 15 Wochen eine fett- und cholesterinreiche Western-Diät erhielten, zeigten eine signifikant geringere Ausprägung atherosklerotischer Plaques und eine signifikant reduzierte Anzahl an Makrophagen in diesen Läsionen als die entsprechenden *Apoe*-defizienten Kontrolltiere [1]. Dies legte nahe, den Einfluss des LTβR allgemein auf Leukozyten und speziell auf die Eigenschaften und die Funktion von Makrophagen näher zu untersuchen. Dabei konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Wirkung des LTβR auf die Zahl zirkulierender Leukozyten sowie das Proliferations-, *Spreading*- und Migrationsverhalten der Makrophagen näher charakterisiert werden. Zunächst wurden Analysen der basalen Unterschiede hinsichtlich Größe, Gewicht und dem sich daraus errechnenden *BMI* der Mäuse vorgenommen, welche ebenfalls einen Einfluss auf Immunzellen und deren Funktion besitzen können. Hier wurden keine Unterschiede festgestellt. Es zeigten sich dabei wie auch bei allen anderen sowohl mit weiblichen und männlichen Mäusen durchgeführten Versuchen keine geschlechtsspezifischen Unterschiede, weshalb im Folgenden nicht nochmals zwischen beiden Geschlechtern differenziert wird.

4.1 Einfluss der LTβR-Defizienz auf das Blutbild

Zunächst wurde das Blut der Tiere hinsichtlich seiner Zellbestandteile untersucht. Die Interaktion zwischen dem LTβR und dessen Liganden ist essentiell für die Ausbildung von sekundär lymphatischen Organen [76]. Außerdem ist bekannt, dass der LTβR auf Subpopulationen der Leukozyten, u.a. auch auf Monozyten, exprimiert wird [32]. Daher ist ein Einfluss einer LTβR-Defizienz auf die Zahl zirkulierender Leukozyten und speziell die der Monozyten zu erwarten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass *Ltβr*-defiziente Mäuse eine Leukozytose, v.a. bedingt durch eine Lymphozytose, aber auch eine Monozytose und eine Erhöhung der neutrophilen Granulozyten aufweisen [76], [1]. Diese Ergebnisse wurden auch durch Messung der Blutbilder im Rahmen dieser Arbeit bestätigt. Sowohl hinsichtlich der Leukozyten als auch ihrer Fraktionen – Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten – wurde bei den *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen eine signifikant höhere Anzahl an zirkulierenden Zellen bestimmt als bei den *Apoe*^{-/-}-Kontrolltieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass die LTβR-Defizienz keine Auswirkungen auf die Erythrozytenzahl sowie den Hämatokrit hat. Da Lymphozyten im Vergleich zu Monozyten und Granulozyten den LTβR nicht exprimieren, war zu vermuten, dass der Effekt der deutlich erhöhten Leukozytenzahl bei den *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen zumindest teils auf die LTβR-Defizienz auf den Stromazellen zurückzuführen ist. Um diese Annahme bestätigen zu können, wurden

ebenfalls die Blutbilder der im Rahmen des Projekts generierten Knochenmark-Chimären gemessen. Hier zeigte sich eine signifikant erhöhte Leukozytenzahl bei den *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen, denen Knochenmark von *Apoe*-defizienten Tieren transplantiert worden war, im Vergleich zu den *Apoe*-defizienten Mäusen, die Knochenmark von *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Tiere erhalten hatten. Dies galt auch für die differenzierte Betrachtung der Fraktionen von Lymphozyten und Granulozyten. Die Zahl der Monozyten war zwar ebenfalls erhöht, allerdings nicht signifikant. Aus diesen Ergebnissen ließ sich ableiten, dass für die erhöhte Leukozytenzahl im Blut bei den *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen maßgeblich nicht die LTβR-Defizienz auf den hämatopoetischen, sondern auf den Stromazellen verantwortlich zu sein scheint.

In der Fraktion der Lymphozyten war v.a. die Zahl der B-Zellen erhöht [1]. Ursache dafür könnte sein, dass aufgrund fehlender sekundär lymphatischer Organe das *homing* der Lymphozyten z.B. in Lymphknoten gestört ist [76] und es dadurch zu einer Lymphozytose kommt.

Grandoch et al. konnten zeigen, dass die erhöhte Anzahl zirkulierender Monozyten bei *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen hauptsächlich durch eine Vergrößerung der *Ly6C^{low}*-Fraktion bedingt ist. Dieser Effekt zeigte sich nicht im Knochenmark der Tiere. Mittels Fluoreszenz-Markierung der *Ly6C^{low}*-Monozyten konnte aber eine verminderte Invasion dieser Fraktion in atherosklerotische Läsionen nachgewiesen werden. Deshalb ist ein Defekt in der Rekrutierung speziell der *Ly6C^{low}*-Monozyten als Ursache für die erhöhte Monozytenzahl im Blut *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienter Mäuse wahrscheinlich [1]. Somit wäre hier anders als im Falle der Lymphozyten die LTβR-Expression auf den Monozyten und nicht auf den Stromazellen ursächlich für die erhöhte Anzahl an zirkulierenden Monozyten bei den *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen. Tatsächlich ist die Zahl der Monozyten im Blut der *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäuse, denen Knochenmark von *Apoe*-defizienten Tieren transplantiert wurde, zwar erhöht, es besteht aber kein signifikanter Unterschied. Bezüglich der Granulozyten lässt sich vermuten, dass ebenfalls ein Defekt in der Rekrutierung Ursache der erhöhten Anzahl zirkulierender Zellen ist. Grandoch et al. zeigten, dass besonders die Fraktion der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten bei den *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen erhöht war im Vergleich zu den *Apoe*-defizienten Mäusen [1]. Drechsler et al. konnten feststellen, dass alleine eine cholesterin- und fettreiche Diät bei *Apoe*-defizienten Mäusen zu einer Neutrophilie führte. Darüber hinaus konnte diese Arbeitsgruppe nachweisen, dass Neutrophile wie auch die *Ly6C^{low}*-Monozyten u.a. CCR5- und CCL5-abhängig im Rahmen der Atherosklerose in die Gefäßwand großer Arterien einwandern [87]. Daher könnte der LTβR-vermittelte Effekt auf die CCL5-Expression auch hier für eine verminderte Migration der Neutrophilen *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienter Mäuse verantwortlich

sein [1]. Dagegen spricht allerdings, dass die Zahl der Granulozyten im Blut der *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäuse, denen Knochenmark von *Apoe*-defizienten Tieren transplantiert wurde, signifikant höher war als bei den *Apoe*-defizienten Mäusen, die Knochenmark der *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäuse erhielten. Somit scheint auch hier die LTβR-Defizienz auf den Stromazellen von Relevanz zu sein.

4.2 Einfluss des LTβR auf das Migrationsverhalten *in vivo*

Ein Ziel der Arbeit war es, den Einfluss des LTβR auf die Immunzellfunktion unter inflammatorischen Bedingungen zu charakterisieren. Um die Immunzellrekrutierung *in vivo* infolge eines akuten inflammatorischen Stimulus untersuchen zu können, wurde das vielfach genutzte Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis gewählt. Verglichen mit der Zahl isolierter Zellen ohne Vorliegen einer Inflammation führte die Thioglykolat-Injektion zu einem massiven Anstieg der Zellzahl in der Peritonealhöhle [1]. Hier konnte fünf Tage nach Auslösen einer Thioglykolat-vermittelten Entzündung bei *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen eine signifikant höhere Zahl an Zellen aus der Peritonealhöhle isoliert werden als bei den *Apoe*^{-/-}-Kontrolltieren. Bellingan et al. untersuchten u.a. die Kinetik der Zellzahl und die Zusammensetzung der Zellpopulationen nach i.p. Thioglykolat-Injektion bei Mäusen. Dabei wurde an Tag fünf nach Thioglykolat-Applikation die größte Anzahl an Leukozyten aus der Peritonealhöhle isoliert. Mit mehr als 85% waren dies vor allem Makrophagen [88]. Melnicoff et al. gelang es, nach i.p. Thioglykolat-Injektion mittels Fluoreszenz-Markierung zwischen den Fraktionen residenter und rekrutierter Peritonealmakrophagen zu differenzieren. Hier zeigte sich nach Injektion eine schnelle Abnahme der Zahl residenter und eine deutliche Zunahme der Fraktion rekrutierter Makrophagen. An Tag fünf nach Thioglykolat-Injektion lag der Anteil von rekrutierten Makrophagen an der Gesamtzahl der Peritonealmakrophagen bei nahezu 100% [89]. Auch Ghosn et al. konnten zwei Gruppen von Makrophagen in der Peritonealhöhle differenzieren, die sich in ihrer Größe unterscheiden. Dabei überwiegt die Fraktion der großen Makrophagen im Ruhezustand, während sich bei einer Entzündung herbeigeführt durch Thioglykolat oder LPS das Verhältnis zugunsten der kleinen Makrophagen ändert. Die großen Makrophagen verschwinden und es rücken *Ly6C^{hi}*-Monozyten aus dem Blut nach, die zu kleinen Makrophagen werden, die durch ein *Ly6C^{low}*-Expressionsmuster gekennzeichnet sind [24]. Neben den *Ly6C^{hi}*-Monozyten kommt es als unmittelbare Immunantwort auf eine peritoneale Inflammation aber auch zur Invasion von patrouillierenden *Ly6C^{low}*-Monozyten. Dabei sind diese die ersten einwandernden Entzündungszellen kurz nach Auslösen einer i.p. Infektion mit *Listeria monocytogenes* [90]. Vor diesem Hintergrund ist zur Untersuchung des Migrationsverhaltens von Leukozyten in Folge einer intraperitonealen Inflammation der gewählte Zeitpunkt fünf Tage nach

Thioglykolat-Injektion optimal. Zudem ist davon auszugehen, dass es sich bei den Leukozyten in der *Lavage* zu einem Großteil um aus dem Blut in die Peritonealhöhle migrierte Makrophagen handelt. Da im Rahmen dieser Arbeit allerdings keine weitere Differenzierung der isolierten Zellen erfolgt ist, wird hier allgemein von Leukozyten gesprochen. Da bei den *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen im Vergleich zu den *Apoe*^{-/-}-Kontrolltieren eine Leukozytose vorlag, stellte sich die Frage, ob auch relativ betrachtet mehr Zellen bei den *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen nach i.p. Injektion des Thioglykolats in die Peritonealhöhle einwandern als bei den *Apoe*^{-/-}-Kontrolltieren. Daher wurde die Zahl der isolierten Leukozyten pro Milliliter *Lavage* auf die der zirkulierenden Leukozyten pro Milliliter Blut bezogen. Unter Berücksichtigung der Anzahl zirkulierender Leukozyten im Blut zeigte sich kein Unterschied zwischen den Genotypen hinsichtlich der Anzahl der Leukozyten in der Peritonealhöhle. Daher gibt es relativ betrachtet keinen Unterschied zwischen den Genotypen hinsichtlich der Migration von Leukozyten und somit vermutlich auch der von Monozyten in die Peritonealhöhle. Diese Ergebnisse legen nahe, dass für die Einwanderung der Leukozyten und speziell der Monozyten in die Peritonealhöhle vermutlich andere Mechanismen verantwortlich sind als für die Migration in die Gefäßwand [1].

Weiter wurde untersucht, welche Auswirkung die zusätzliche i.p. Injektion von LPS fünf Tage nach Thioglykolat-Gabe und vier Stunden vor der *Lavage* der Peritonealhöhle auf das Migrationsverhalten der Zellen hat. Die i.p. Gabe von LPS hatte sowohl bei den *Apoe*-defizienten als auch den *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen eine deutliche Reduktion der Zellzahl in der *Lavage* zur Folge verglichen mit den Kontrolltieren, die statt LPS nur *PBS* i.p. erhielten. Cao et al. haben unter ähnlichen Bedingungen den Einfluss von LPS auf das Migrationsverhalten von Peritonealmakrophagen untersucht. Im Fokus stand dabei das Adhäsionsmolekül *Mac-1* (*macrophage-1 antigen*), welches zu den Integrinen zählt. Ohne LPS-Gabe kam es sechs bis acht Tage nach Thioglykolat-Injektion zu einer Normalisierung der intraperitonealen Zellzahl ähnlich der vor Thioglykolat-Gabe sowohl bei den *Mac-1*-defizienten als auch den *Mac-1*-exprimierenden Mäusen. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die durch LPS-getriggerte Migration der Makrophagen *Mac-1*-abhängig ist. So wurden vier Stunden nach LPS-Injektion bei den *Mac-1*-kompetenten Mäusen signifikant weniger Leukozyten aus der Peritonealhöhle isoliert als bei den *Mac-1*-defizienten Mäusen. Durch Markierung der Peritonealmakrophagen konnte nachgewiesen werden, dass dies auf eine *Mac-1*-abhängige Migration der Makrophagen in die drainierenden Lymphknoten sowie ins Blut zurückzuführen war. Die Migration aus dem Blut in die Peritonealhöhle hingegen wurde durch die *Mac-1*-Defizienz nicht negativ beeinflusst bzw. sogar gesteigert [85]. Somit ist zu vermuten, dass sich die Reduktion der Zellzahl in der *Lavage* beider Genotypen nach LPS-Injektion durch einen gesteigerten Efflux der Zellen in die drainierenden Lymphknoten bzw. in die Blutbahn erklären lässt.

Cao et al. zeigten, dass als Reaktion auf die LPS-Stimulation ca. 30% der Peritonealmakrophagen in die drainierenden Lymphknoten und 40% zurück ins Blut migrierten [85]. Da *Apoe/Ltβr*-doppeldefiziente Mäuse keine sekundär lymphatischen Organe ausbilden, wäre somit zu erwarten, dass bei diesen Mäusen lediglich eine Migration der Makrophagen zurück ins Blut erfolgt und diese damit weniger stark ausgeprägt ist als bei den *Apoe*-defizienten Mäusen. Tatsächlich reduzierte sich die Zahl der Zellen in der *Lavage* der *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäuse, denen LPS i.p. injiziert wurde, lediglich um ca. 40% im Vergleich zu denen, die *PBS* erhielten. Dies entspricht genau dem Anteil, der laut Cao et al. nach LPS-Stimulation zurück ins Blut migriert. Bei den *Apoe*-defizienten Mäusen hingegen reduzierte sich die Zahl der Zellen in der *Lavage*, denen LPS i.p. injiziert wurde, um ca. 70% im Vergleich zu denen, die *PBS* erhielten. Dies entspricht dem Anteil an Zellen, die laut Cao et al. nach LPS-Stimulation in die Lymphknoten und ins Blut migrieren. Damit lässt sich erklären, weshalb der Effekt der LPS-Stimulation bei den *Apoe*-defizienten Mäusen stärker ausgeprägt ist als bei den *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen und weshalb die Zellzahl in der *Lavage* nach LPS-Injektion bei den *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen auch unter Berücksichtigung deren Leukozytose etwa doppelt so groß ist als bei den *Apoe*-defizienten Mäusen.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Makrophagen der *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäuse weniger *Mac-1* exprimieren und daher in geringerem Maße nach LPS-Stimulation aus der Peritonealhöhle migrieren als die der Kontrolltiere. Zwei Ursachen dafür wären denkbar: entweder wirkt die $LT\beta R$ -Aktivierung direkt auf die *Mac-1*-Expression ein oder die $LT\beta R$ -Aktivierung verstärkt die Wirkung von LPS. Letzterer Vermutung widersprechen die Ergebnisse von Wimmer et al., die im Rahmen der akuten Dextranatriumsulfat-induzierten Kolitis eine antiinflammatorische Wirkung der $LT\beta R$ -Aktivierung zeigen konnten. Diese beruht auf einer Hemmung des über LPS aktivierten *TLR4*-Signalweges [73]. Somit wäre bei den *Apoe*-defizienten im Vergleich zu den *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen eher eine weniger starke Wirkung durch LPS zu erwarten. Daher wäre bei dieser Annahme wahrscheinlich, dass die $LT\beta R$ -Aktivierung direkt Einfluss auf die *Mac-1*-Expression nimmt. Aufgrund dieser Überlegungen wäre es interessant, die *Mac-1*-Expression beider Genotypen unter Einfluss von LPS experimentell zu bestimmen und ebenfalls Veränderungen in der Expression nach Stimulation des $LT\beta R$ zu untersuchen. Daneben ist allerdings auch denkbar, dass die jeweiligen Bindungspartner von *Mac-1* auf den Stromazellen der *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäuse vermindert exprimiert werden und daher die Migration bei diesen Mäusen geringer ausgeprägt ist. Um differenzieren zu können, ob die $LT\beta R$ -Defizienz auf den hämatopoetischen Zellen oder den Stromazellen für den beobachteten Einfluss von LPS auf die Migration verantwortlich ist, wäre die Untersuchung der *in vivo*

Migration bei Knochenmark-Chimären von Interesse. Durch Untersuchungen an einem solchen Modell könnte auch verifiziert werden, ob sich tatsächlich der Hauptanteil an der verminderten Migration bei den *ApoE/Ltβr*-doppeldefizienten Mäusen durch die fehlenden Lymphknoten erklären lässt.

4.3 Einfluss des LTβR auf das Proliferationsverhalten *in vitro*

Neben dem *in vivo* Migrationsverhalten von Peritonealmakrophagen wurde ebenfalls der Einfluss des LTβR auf die Proliferation von Knochenmarksmakrophagen untersucht, da auch eine Veränderung hier für die beobachteten Effekte einer erhöhten Anzahl zirkulierender Zellen bzw. reduzierten Anzahl gewebständiger Makrophagen verantwortlich sein könnte. Hinsichtlich der Anzahl an Knochenmarksmakrophagen zeigte sich kein wesentlicher Unterschied weder bei beiden Genotypen noch bei beiden Geschlechtern. Auch gibt es anders als im Blut bezüglich des Verhältnisses von *Ly6C^{low}*- zu *Ly6C^{hi}*-Monozyten bei beiden Genotypen keinen Unterschied im Knochenmark [1]. In atherosklerotischen Läsionen konnte ebenfalls keine vermehrte Proliferation der Makrophagen bei einem der beiden Genotypen festgestellt werden [1]. *In vitro* hingegen konnte ein Einfluss verschiedener Stimuli auf die Proliferation von aus Knochenmarksvorläuferzellen gereiften Makrophagen gezeigt werden. *M-CSF-1* ist hauptsächlich für die Differenzierung von Monozyten und Makrophagen im Knochenmark und Blut verantwortlich sowie als Proliferationsstimulus bekannt [9], [16], [91]. Daher war ein Einfluss von *M-CSF-1* auf die Proliferation der Makrophagen beider Genotypen zu erwarten. Verglichen mit den unstimulierten Makrophagen zeigte sich bei beiden Genotypen ein signifikanter Einfluss auf die Proliferation. Außerdem wurde der Einfluss der direkten LTβR-Stimulation sowohl mit einem am LTβR agonistisch wirkenden Antikörper als auch dem spezifischen Liganden $LT\alpha_1\beta_2$ auf die Proliferation untersucht. Bei den *ApoE*-defizienten Makrophagen konnte ein deutlicher Einfluss der LTβR-Aktivierung auf die Zahl vitaler Zellen nach 48 Stunden Stimulation festgestellt werden. Dieser Effekt war ähnlich ausgeprägt wie der nach Stimulation mit *M-CSF-1*. Somit könnte eine Ursache für den pro-proliferativen Effekt der LTβR-Aktivierung eine vermehrte Expression von *M-CSF-1* sein, was dann zu einer auto- oder parakrinen Stimulation der Makrophagen führt.

Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die pro-proliferative Effekte des LTβR allerdings bei anderen Zellpopulationen als der hier untersuchten zeigen. So untersuchten Heo et al. den Einfluss von *LIGHT* auf humane *BM-MSCs* (*bone marrow-derived mesenchymal stem cells*). Diese exprimieren nicht den *HVEM*, weshalb der LTβR hier der einzige Bindungspartner dieses Liganden ist. Die Gruppe konnte nachweisen, dass die LTβR-Aktivierung direkt auf die Regulierung des Zellzyklus wirkte. Den Zellzyklus

antreibende Faktoren wie Cyclin B, D, E sowie Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) wurden vermehrt exprimiert, während ihr Inhibitor p27 (CDK-Inhibitor 1B) vermindert exprimiert wurde. Über Aktivierung u.a. von *NFκB* wurde zudem das Zellüberleben gesteigert [92].

Daneben wurde der Einfluss des LTβR auf das Wachstum von Tumoren unterschiedlicher Entitäten untersucht. Eine Untersuchung davon erfolgte an humanen Melanomzellen, die den LTβR exprimieren. Dhawan et al. wiesen nach, dass die Stimulation mit einem agonistischen LTβR-Antikörper über die Aktivierung des klassischen *NFκB*-Signalweges zu einer Proliferation von Melanomzellen führt [93].

Neben einer direkten Wirkung auf die Proliferation wäre auch denkbar, dass die LTβR-Aktivierung indirekt auf die Proliferation der Makrophagen einwirkt. Ausgangspunkt der Arbeit war die Feststellung, dass LTβR-defiziente Mäuse eine geringere Ausbildung atherosklerotischer Läsionen zeigen und dies v.a. verbunden ist mit einer geringeren Migration von Makrophagen genauer von *Ly6C^{low}*-Monozyten in die Gefäßwand [1]. Für die Migration der *Ly6C^{low}*-Monozyten ist der CCR5 von wesentlicher Bedeutung [11]. Durch Analyse der Expression verschiedener Chemokine und deren Rezeptoren konnte die Arbeitsgruppe an unserem Institut zeigen, dass die Monozyten der *Apoe*-defizienten Mäuse zwar nicht vermehrt den CCR5, jedoch den CCR5-Liganden CCL5 exprimieren. Somit wird eine vermehrte LTβR-abhängige autokrine Stimulation der *Ly6C^{low}*-Monozyten angenommen, die eine vermehrte Migration dieser Monozyten in die Gefäßwand vermittelt [1]. Aus diesem Grund war es naheliegend zu überprüfen, ob der pro-proliferative Effekt der LTβR-Aktivierung u.a. auch auf eine vermehrte CCL5-Expression zurückzuführen ist. Die alleinige Stimulation mit CCL5 zeigte keinen Effekt auf die Proliferation der Makrophagen beider Genotypen. Der Effekt der Stimulation mit dem agonistischen LTβR-Antikörper auf die Proliferation war sogar fünfmal so stark ausgeprägt als der der Stimulation mit CCL5. Somit ließ sich die vermehrte CCL5-Expression durch die Makrophagen als Ursache für die vermehrte Proliferation ausschließen.

Weiter wäre denkbar, dass die LTβR-Aktivierung antiapoptotisch auf die Makrophagen wirkt. Ausgehend von den Absorptionswerten unmittelbar nach der Aussaat, konnte gezeigt werden, dass unter LTβR-Stimulation mit Ligand oder agonistischem Antikörper tatsächlich eine Proliferation der Zellen bis zur Messung nach 48 Stunden erfolgte. Blieben die Zellen unstimuliert, war die gemessene Absorption nach 48 Stunden sogar geringer als direkt nach Aussaat. Das zeigt, dass das Ausbleiben der LTβR-Stimulation bei einem Teil der Zellen zum Zelltod führte. In der Literatur wird allerdings vielfach auf die pro-apoptotische Wirkung der LTβR-Aktivierung hingewiesen. Dies zeigten z.B. Kuai et al., die eine dieser Wirkung zugrundeliegende Signaltransduktion des LTβR nach Bindung von *LIGHT* nachwiesen. So stellten sie nach LTβR-Aktivierung eine verstärkte Freisetzung von *Smac* (*second*

mitochondria-derived activator of caspase) fest, welcher durch Interaktion mit *c-IAP1* zu einer Aktivierung der Caspase-Kaskade führt [94].

Eine weitere Möglichkeit, weshalb die Aktivierung des $LT\beta R$ die Proliferation steigert, könnte zudem eine verstärkte Haftung der Makrophagen *Apoe*-defizienter im Vergleich zu denen *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienter Mäuse sein. Haskill et al. zeigten, dass humane Monozyten nach Adhäsion an Plastik vermehrt *CSF-1* exprimierten [95]. Gross schließt aus den Ergebnissen seiner Diplomarbeit, dass Adhärenz bei humanen Makrophagen als Überlebensstimulus dient und ausreichend ist. Dabei stellte er fest, dass die Genexpression bei Kultivierung unter nicht-adhärennten Bedingungen insgesamt verzögert reguliert wurde. Zudem zeigte sich kein Unterschied in der Expression verschiedener Gene zwischen adhärennten Makrophagen, die mit *CSF-1* stimuliert wurden und deren *CSF-1*-Rezeptor blockiert oder nicht blockiert wurde. Daraus schließt er, dass Adhäsion eine ähnliche Wirkung auf Makrophagen hat wie die *CSF-1*-Stimulation [96]. Angenommen die $LT\beta R$ -Aktivierung beeinflusst die Adhäsion der Makrophagen und dies hätte ähnliche Auswirkungen wie die Stimulation mit *CSF-1*, so wäre zu erklären, warum die Stimulation mit *CSF-1* sowie die mit dem agonistisch wirkenden $LT\beta R$ -Antikörper ähnliche Wirkungen auf die Proliferation haben.

Um dies genauer untersuchen zu können, wurde das *Spreading*-Verhalten der Makrophagen beider Genotypen verglichen. Dazu wurden die Zellen für zwei Stunden in Medium inkubiert, die adhärennten Zellen fixiert und mit Alexa Fluor® 488 Phalloidin sowie 4',6-Diamidin-2-phenylindol gefärbt. Anschließend wurde die Fläche der Zellen gemessen. Tatsächlich waren demnach die Makrophagen *Apoe*-defizienter Mäuse im Durchschnitt 30% größer bzw. hatten eine 30% größere Anhaftungsfläche als die der *Apoe/Ltβr*-doppeldefizienten Mäuse. Daraufhin stellte sich die Frage, durch welche Oberflächenmoleküle die Zellanhaftung *in vitro* erfolgt. Wallis et al. konnten zeigen, dass für die Adhäsion *in vitro* v.a. der *CDw18*-Membrankomplex von wesentlicher Bedeutung ist. So zeigten humane Monozyten eines Patienten mit *CDw18*-Defizienz sowie *CDw18*-kompetente humane Monozyten, die mit dem monoklonalen Antikörper 60.3 inkubiert wurden, eine stark eingeschränkte Adhäsion sowie ein deutlich vermindertes *Spreading* auf Plastik [97]. Der monoklonale Antikörper 60.3 richtet sich gegen *CD18* (synonym: Integrin β_2), welches Untereinheit von Adhäsionsmolekülen wie *LFA-1* (*Lymphocyte function-associated antigen 1*; *CD11a/CD18*), *Mac-1* (*CD11b/CD18*) sowie *p150,95* (*CD11c/CD18*) ist [98]. Diese drei Adhäsionsmoleküle werden zum erwähnten *CDw18*-Membrankomplex gezählt. Rosen et al. untersuchten das Adhäsionsverhalten von Makrophagen unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen die Alpha-Untereinheit von *Mac-1* und konnten dadurch zeigen, dass *Mac-1* Ursache des beobachteten Effekts ist [99]. Yakubenko et al. zeigten ebenfalls die Relevanz von *Mac-1* für die Adhäsion an Plastik bei HEK 293 Zellen [100]. Somit wäre eine verstärkte *Mac-1*-Expression als Reak-

tion auf die LT β R-Aktivierung denkbar. Dies ginge einher mit den Ergebnissen zum Migrationsverhalten der Peritonealmakrophagen in Reaktion auf die LPS-Stimulation. Auch hier könnte *Mac-1* das zentrale Oberflächenmolekül sein, wodurch sich die verstärkte Migration von Peritonealmakrophagen aus der Peritonealhöhle *Apoe*-defizienter Mäuse im Vergleich zu *Apoe/Lt β r*-doppeldefizienten Mäusen erklären ließe. Somit wäre es interessant, die *Mac-1*-Expression von Makrophagen der *Apoe*-defizienten Mäuse basal und nach Stimulation mit dem agonistisch wirkenden LT β R-Antikörper oder LPS zu untersuchen sowie die Expressionsrate mit der der Makrophagen *Apoe/Lt β r*-doppeldefizienter Mäuse zu vergleichen.

Fraser et al. wiesen neben *Mac-1* als weiteres Adhäsionsmolekül auf Makrophagen den *SR-A* (*CD204*) nach [101]. Der *SR-A* steht zudem in engem Zusammenhang mit der Entstehung sowie dem Progress der Atherosklerose [102].

Um verifizieren zu können, ob dieser von den Makrophagen *Apoe*-defizienter Mäuse vermehrt exprimiert wird, erfolgte eine Expressionsanalyse mittels *Real-Time-PCR* auf *Cd204*. Diese zeigte eine leicht erhöhte *mRNA*-Expression des *SR-A* bei den Makrophagen der *Apoe*-defizienten im Vergleich zu den *Apoe/Lt β r*-doppeldefizienten Mäusen. Der Unterschied war allerdings nicht signifikant. Um den Einfluss der LT β R-Aktivierung auf die *SR-A*-Expression genauer untersuchen zu können, wären Expressionsanalysen nach Stimulation des Rezeptors nötig. Denkbar wäre außerdem, dass die LT β R-Aktivierung nicht zu einer vermehrten Transkription der für den *SR-A* codierenden *mRNA*, sondern zu einer vermehrten Expression des *SR-A* auf der Zelloberfläche führt. Dies könnte beispielsweise mittels *FACS*-Analyse untersucht werden.

Zusammenfassend sind folglich mehrere Ursachen in Betracht zu ziehen, die den beobachteten Phänotyp erklären könnten. So ist vor dem Hintergrund der erhobenen Ergebnisse sowohl eine vermehrte *Mac-1*- als auch eine vermehrte *SR-A*-Expression der Makrophagen *Apoe*-defizienter Mäuse im Vergleich zu denen *Apoe/Lt β r*-doppeldefizienter Mäuse denkbar. Für eine vermehrte *Mac-1*-Expression sprechen die Ergebnisse der Migration von Peritonealmakrophagen sowie des *Spreading*-Verhaltens der Knochenmarksmakrophagen. Das *Spreading*-Verhalten ließe sich ebenfalls durch eine vermehrte *SR-A*-Expression erklären, allerdings sprechen die Ergebnisse der *Real-Time-PCR* eher dagegen. Um abschließend klären zu können, welcher der beiden oder ob beide Moleküle für den beobachteten Phänotyp verantwortlich sind, sind weitere Untersuchungen mittels *Real-Time-PCR* oder Durchflusszytometrie nach Stimulation des LT β R auf den Makrophagen nötig.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie der Literaturrecherche legen nahe, dass die vermehrte Adhäsion der LT β R-exprimierenden Makrophagen Ursache der vermehrten Proliferation *in vitro* sein könnte. Möglich ist allerdings auch, dass die anderen diskutierten Mechanismen wie z.B. eine Induktion einer vermehrten *M-CSF-1*-Freisetzung oder eine Modulation des Zellzyklus für die vermehrte Proliferation der Makrophagen verantwortlich sind.

4.4 Kritik und Ausblick

Trotz gewissenhafter Arbeit und sorgfältiger Überlegung hinsichtlich Wahl sowie Konzeption der Methodik gilt es abschließend diese auch kritisch zu reflektieren.

Die Bestimmung des Blutbildes erfolgte bei Tieren, die zwölf Wochen alt waren und vier Wochen eine fett- und cholesterinreiche Diät erhalten hatten. Grund dafür war, dass dies ebenfalls auf die Versuchstiere zutraf, bei denen das Migrationsverhalten *in vivo* auch unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Leukozytenzahl im Blut untersucht wurde. Auf die vorherige Thioglykolat-Gabe wurde bei den Mäusen, bei denen das Blutbild gemessen wurde, allerdings verzichtet, da dies lediglich das Blutbild nach Migration eines Teils der Leukozyten in die Peritonealhöhle gezeigt hätte. Daher war es auch nicht möglich, das Blutbild der Tiere zu erheben, bei denen das Migrationsverhalten *in vivo* untersucht wurde. Trotzdem wäre es ggf. von Relevanz gewesen, ebenfalls die Blutbilder der Versuchstiere nach Thioglykolat-Gabe und LPS-Injektion zu erheben, um mögliche Einflüsse dieser Stimuli abbilden zu können.

Um das Migrationsverhalten der Leukozyten in die Peritonealhöhle bzw. nach LPS-Stimulation aus der Peritonealhöhle heraus genauer charakterisieren zu können, wäre eine Differenzierung der Leukozytensubpopulationen bzw. der isolierten Peritonealzellen sinnvoll gewesen. Somit hätte sich auch die Migration genauer ins Verhältnis zur jeweiligen Leukozytenfraktion im Blut setzen lassen. Dies hätte allerdings eines großen technischen wie zeitlichen Mehraufwands bedurft. So wird im Rahmen dieser Arbeit allgemein von Leukozyten gesprochen.

Das Proliferationsverhalten der Knochenmarksmakrophagen ließ sich leider nur relativ über Absorptionmessungen bestimmen. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Makrophagen und die auch dadurch bedingte relativ geringe Ausbeute an ausgereiften und vitalen Zellen war für die Proliferationsversuche nur eine Aussaat auf einer *Multiwell*-Platte mit 96 *wells* möglich. Ein reproduzierbares erneutes Ablösen der Zellen nach Stimulation über 48 Stunden war somit nicht möglich und die Quantifizierung der Zahl vitaler Zellen am besten durch Absorptionmessung eines Formazan-Farbstoffs zu erreichen, der mittels Umsetzung eines Tetrazoliumsalzes durch lebende Zellen entsteht. Weiter stellt sich die Frage, inwiefern der zwischen den einzelnen Versuchen leicht variierende Anteil an toten Zellen bei der Aussaat Einfluss auf die übrigen Zellen nimmt und deren Überleben sowie die Proliferation beeinflusst.

Um den Einfluss des $LT\beta R$ auf das *Spreading*-Verhalten eindeutig bestimmen zu können, wäre neben der Messung der Zellfläche zwei Stunden nach Aussaat der Zellen ausschließlich in Zellmedium zusätzlich die Stimulation bzw. Vorinkubation der Zellen vor Aussaat mit dem agonistisch wirkenden $LT\beta R$ -Antikörper oder dem selektiven Liganden

LT $\alpha_1\beta_2$ sinnvoll gewesen. Für erste Hinweise sind aber die hier erhobenen Ergebnisse bereits hinreichend. Zudem erfolgte die Aussaat auf Deckgläschen und nicht auf Plastik. Die diskutierten Mechanismen der *in vitro* Adhäsion wurden allerdings auf Plastik untersucht.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass der LT β R bzw. dessen Aktivierung sowohl Einfluss auf die Anzahl der Leukozyten im Blut als auch auf das *in vivo* Migrations- und *in vitro* Proliferationsverhalten hat. Dabei ist für den Einfluss auf die meisten Leukozyten im Blut *Apoe/Lt β r*-doppeldefizienter Mäuse vermutlich die LT β R-Defizienz auf den Stromazellen verantwortlich. Für die pro-proliferative Wirkung sowie das stärker ausgeprägte Migrationsverhalten der Leukozyten bzw. Makrophagen bei den *Apoe*-defizienten Mäusen im Vergleich zu den *Apoe/Lt β r*-doppeldefizienten Mäusen ist hingegen die LT β R-Expression auf den hämatopoetischen Zellen ursächlich. Dabei weisen die Ergebnisse der Literaturrecherche und der durchgeführten Experimente in Zusammenschau darauf hin, dass dabei das Oberflächenmolekül *Mac-1* möglicherweise eine Schlüsselrolle spielt. *Mac-1* ist zum einen als entscheidendes Oberflächenmolekül für die Migration von Makrophagen aus der Peritonealhöhle heraus nach LPS-Stimulation bekannt [85], zum anderen ist *Mac-1* wesentlich an der Adhäsion von Makrophagen auf Plastik beteiligt [99]. Für den beobachteten pro-proliferativen Einfluss der LT β R-Aktivierung scheint nach Betrachtung aller Ergebnisse die verstärkte Adhäsion der Makrophagen der *Apoe*-defizienten Mäuse am wahrscheinlichsten ursächlich zu sein. Auch dies könnte dann auf eine erhöhte *Mac-1*-Expression zurückzuführen sein. Daneben wurde der Einfluss des *SR-A* auf die Adhäsion diskutiert. Mittels *Real-Time-PCR* konnten allerdings keine Unterschiede in der *mRNA*-Expression dieses Oberflächenmoleküls bei unstimulierten Makrophagen beider Genotypen nachgewiesen werden.

Zur genauen Aufklärung der hinter dem beobachteten Phänotyp stehenden Mechanismen sind weitere Untersuchungen nötig. Dabei wären Expressionsanalysen mittels *Real-Time-PCR* oder Durchflusszytometrie hinsichtlich beider Oberflächenmoleküle, *Mac-1* und *SR-A*, nach Stimulation des LT β R bzw. Stimulation mit LPS denkbar.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Grandoch, M., et al., *Deficiency in Lymphotoxin Beta Receptor Protects from Atherosclerosis in apoE-Deficient Mice*. *Circ Res*, 2015.
2. Hansson, G.K., *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(16): p. 1685-95.
3. Riede, U.-N., and Martin Werner., *Allgemeine Und Spezielle Pathologie*. Vol. 2., überarbeitete Auflage. . 2017: Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg,.
4. Weber, C., A. Zernecke, and P. Libby, *The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(10): p. 802-15.
5. Watanabe, T., et al., *Role of macrophages in atherosclerosis. Sequential observations of cholesterol-induced rabbit aortic lesion by the immunoperoxidase technique using monoclonal antimacrophage antibody*. *Lab Invest*, 1985. **53**(1): p. 80-90.
6. Stoneman, V., et al., *Monocyte/macrophage suppression in CD11b diphtheria toxin receptor transgenic mice differentially affects atherogenesis and established plaques*. *Circ Res*, 2007. **100**(6): p. 884-93.
7. Swirski, F.K., et al., *Monocyte accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(27): p. 10340-5.
8. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties*. *Immunity*, 2003. **19**(1): p. 71-82.
9. Gordon, S. and P.R. Taylor, *Monocyte and macrophage heterogeneity*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(12): p. 953-64.
10. Swirski, F.K., et al., *Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(1): p. 195-205.
11. Tacke, F., et al., *Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(1): p. 185-94.
12. Brauersreuther, V., et al., *Ccr5 but not Ccr1 deficiency reduces development of diet-induced atherosclerosis in mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(2): p. 373-9.
13. Zilles, K., and Bernhard Tillmann *Anatomie*. 2010: Heidelberg: Springer.
14. Orkin, S.H. and L.I. Zon, *Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology*. *Cell*, 2008. **132**(4): p. 631-44.
15. Takahashi, K., F. Yamamura, and M. Naito, *Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: a light-microscopic, enzyme-*

- cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study.* J Leukoc Biol, 1989. **45**(2): p. 87-96.
16. Rieger, M.A., et al., *Hematopoietic cytokines can instruct lineage choice.* Science, 2009. **325**(5937): p. 217-8.
 17. Ganz, T., *Macrophages and systemic iron homeostasis.* J Innate Immun, 2012. **4**(5-6): p. 446-53.
 18. Haldar, M. and K.M. Murphy, *Origin, development, and homeostasis of tissue-resident macrophages.* Immunol Rev, 2014. **262**(1): p. 25-35.
 19. Ginhoux, F., et al., *Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages.* Science, 2010. **330**(6005): p. 841-5.
 20. Ajami, B., et al., *Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life.* Nat Neurosci, 2007. **10**(12): p. 1538-43.
 21. Capotondo, A., et al., *Brain conditioning is instrumental for successful microglia reconstitution following hematopoietic stem cell transplantation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(37): p. 15018-23.
 22. Hanna, R.N., et al., *The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C- monocytes.* Nat Immunol, 2011. **12**(8): p. 778-85.
 23. Carlin, L.M., et al., *Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal.* Cell, 2013. **153**(2): p. 362-75.
 24. Ghosn, E.E., et al., *Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(6): p. 2568-73.
 25. Davies, L.C., et al., *A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage populations after acute inflammation.* Eur J Immunol, 2011. **41**(8): p. 2155-64.
 26. Crowe, P.D., et al., *A lymphotoxin-beta-specific receptor.* Science, 1994. **264**(5159): p. 707-10.
 27. Banner, D.W., et al., *Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation.* Cell, 1993. **73**(3): p. 431-45.
 28. Dempsey, P.W., et al., *The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily.* Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(3-4): p. 193-209.
 29. Mosialos, G., et al., *The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family.* Cell, 1995. **80**(3): p. 389-99.
 30. Force, W.R., et al., *Discrete signaling regions in the lymphotoxin-beta receptor for tumor necrosis factor receptor-associated factor binding, subcellular localization, and*

- activation of cell death and NF-kappaB pathways.* J Biol Chem, 2000. **275**(15): p. 11121-9.
31. Nakano, H., et al., *TRAF5, an activator of NF-kappaB and putative signal transducer for the lymphotoxin-beta receptor.* J Biol Chem, 1996. **271**(25): p. 14661-4.
32. Force, W.R., et al., *Mouse lymphotoxin-beta receptor. Molecular genetics, ligand binding, and expression.* J Immunol, 1995. **155**(11): p. 5280-8.
33. Grabner, R., et al., *Lymphotoxin beta receptor signaling promotes tertiary lymphoid organogenesis in the aorta adventitia of aged ApoE-/- mice.* J Exp Med, 2009. **206**(1): p. 233-48.
34. Browning, J.L. and L.E. French, *Visualization of lymphotoxin-beta and lymphotoxin-beta receptor expression in mouse embryos.* J Immunol, 2002. **168**(10): p. 5079-87.
35. Murphy, M., et al., *Expression of the lymphotoxin beta receptor on follicular stromal cells in human lymphoid tissues.* Cell Death Differ, 1998. **5**(6): p. 497-505.
36. Yin, C., et al., *Pathological significance and regulatory mechanism of lymphotoxin beta receptor overexpression in T cells of patients with systemic lupus erythematosus.* J Biomed Res, 2017.
37. Browning, J.L., et al., *Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface.* Cell, 1993. **72**(6): p. 847-56.
38. Williams-Abbott, L., et al., *The lymphotoxin-alpha (LTalpha) subunit is essential for the assembly, but not for the receptor specificity, of the membrane-anchored LTalpha1beta2 heterotrimeric ligand.* J Biol Chem, 1997. **272**(31): p. 19451-6.
39. Ware, C.F., et al., *Expression of surface lymphotoxin and tumor necrosis factor on activated T, B, and natural killer cells.* J Immunol, 1992. **149**(12): p. 3881-8.
40. Granger, S.W., et al., *Genomic characterization of LIGHT reveals linkage to an immune response locus on chromosome 19p13.3 and distinct isoforms generated by alternate splicing or proteolysis.* J Immunol, 2001. **167**(9): p. 5122-8.
41. Mauri, D.N., et al., *LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator.* Immunity, 1998. **8**(1): p. 21-30.
42. Tamada, K., et al., *LIGHT, a TNF-like molecule, costimulates T cell proliferation and is required for dendritic cell-mediated allogeneic T cell response.* J Immunol, 2000. **164**(8): p. 4105-10.
43. Cohavy, O., et al., *LIGHT is constitutively expressed on T and NK cells in the human gut and can be induced by CD2-mediated signaling.* J Immunol, 2005. **174**(2): p. 646-53.
44. Harrop, J.A., et al., *Herpesvirus entry mediator ligand (HVEM-L), a novel ligand for HVEM/TR2, stimulates proliferation of T cells and inhibits HT29 cell growth.* J Biol

- Chem, 1998. **273**(42): p. 27548-56.
45. Ganef, C., et al., *Induction of the alternative NF-kappaB pathway by lymphotoxin alphabeta (LTalphabeta) relies on internalization of LTbeta receptor*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(21): p. 4319-34.
 46. Karin, M. and Y. Ben-Neriah, *Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 621-63.
 47. Ghosh, S. and M. Karin, *Missing pieces in the NF-kappaB puzzle*. Cell, 2002. **109 Suppl**: p. S81-96.
 48. Sanjo, H., et al., *Allosteric regulation of the ubiquitin:NIK and ubiquitin:TRAF3 E3 ligases by the lymphotoxin-beta receptor*. J Biol Chem, 2010. **285**(22): p. 17148-55.
 49. Liao, G., et al., *Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation*. J Biol Chem, 2004. **279**(25): p. 26243-50.
 50. Vallabhapurapu, S. and M. Karin, *Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 693-733.
 51. Bonizzi, G. and M. Karin, *The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity*. Trends Immunol, 2004. **25**(6): p. 280-8.
 52. Dejardin, E., et al., *The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways*. Immunity, 2002. **17**(4): p. 525-35.
 53. Senftleben, U., et al., *Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway*. Science, 2001. **293**(5534): p. 1495-9.
 54. Takemura, S., et al., *Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis*. J Immunol, 2001. **167**(2): p. 1072-80.
 55. Braun, A., et al., *Lymphotoxin beta-mediated stimulation of synoviocytes in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(7): p. 2140-50.
 56. Pierer, M., et al., *The TNF superfamily member LIGHT contributes to survival and activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2007. **46**(7): p. 1063-70.
 57. Ishida, S., et al., *LIGHT induces cell proliferation and inflammatory responses of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via lymphotoxin beta receptor*. J Rheumatol, 2008. **35**(6): p. 960-8.
 58. Fava, R.A., et al., *A role for the lymphotoxin/LIGHT axis in the pathogenesis of murine collagen-induced arthritis*. J Immunol, 2003. **171**(1): p. 115-26.
 59. Mackay, F., et al., *Both the lymphotoxin and tumor necrosis factor pathways are involved in experimental murine models of colitis*. Gastroenterology, 1998. **115**(6): p. 1464-75.
 60. Stopfer, P., et al., *Blocking lymphotoxin-beta receptor activation diminishes*

- inflammation via reduced mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) expression and leucocyte margination in chronic DSS-induced colitis.* Clin Exp Immunol, 2004. **136**(1): p. 21-9.
61. An, M.M., et al., *Lymphotoxin beta receptor-Ig ameliorates TNBS-induced colitis via blocking LIGHT/HVEM signaling.* Pharmacol Res, 2005. **52**(3): p. 234-44.
62. Seleznik, G.M., et al., *Lymphotoxin beta receptor signaling promotes development of autoimmune pancreatitis.* Gastroenterology, 2012. **143**(5): p. 1361-74.
63. Gommerman, J.L., et al., *A role for surface lymphotoxin in experimental autoimmune encephalomyelitis independent of LIGHT.* J Clin Invest, 2003. **112**(5): p. 755-67.
64. Plant, S.R., et al., *Lymphotoxin beta receptor (Lt betaR): dual roles in demyelination and remyelination and successful therapeutic intervention using Lt betaR-Ig protein.* J Neurosci, 2007. **27**(28): p. 7429-37.
65. Lee, S.H., et al., *The hepatitis B virus X protein up-regulates lymphotoxin alpha expression in hepatocytes.* Biochim Biophys Acta, 2005. **1741**(1-2): p. 75-84.
66. Lowes, K.N., et al., *Upregulation of lymphotoxin beta expression in liver progenitor (oval) cells in chronic hepatitis C.* Gut, 2003. **52**(9): p. 1327-32.
67. Haybaeck, J., et al., *A lymphotoxin-driven pathway to hepatocellular carcinoma.* Cancer Cell, 2009. **16**(4): p. 295-308.
68. Anders, R.A., et al., *Contribution of the lymphotoxin beta receptor to liver regeneration.* J Immunol, 2005. **175**(2): p. 1295-300.
69. Ehlers, S., et al., *The lymphotoxin beta receptor is critically involved in controlling infections with the intracellular pathogens Mycobacterium tuberculosis and Listeria monocytogenes.* J Immunol, 2003. **170**(10): p. 5210-8.
70. Benedict, C.A., et al., *Lymphotoxins and cytomegalovirus cooperatively induce interferon-beta, establishing host-virus detente.* Immunity, 2001. **15**(4): p. 617-26.
71. Behnke, K., et al., *The Lymphotoxin beta Receptor Is Essential for Upregulation of IFN-Induced Guanylate-Binding Proteins and Survival after Toxoplasma gondii Infection.* Mediators Inflamm, 2017. **2017**: p. 7375818.
72. Jungbeck, M., et al., *Blocking lymphotoxin beta receptor signalling exacerbates acute DSS-induced intestinal inflammation--opposite functions for surface lymphotoxin expressed by T and B lymphocytes.* Mol Immunol, 2008. **45**(1): p. 34-41.
73. Wimmer, N., et al., *Lymphotoxin-beta receptor activation on macrophages ameliorates acute DSS-induced intestinal inflammation in a TRIM30alpha-dependent manner.* Mol Immunol, 2012. **51**(2): p. 128-35.
74. Wege, A.K., et al., *LTbetaR expression on hematopoietic cells regulates acute inflammation and influences maturation of myeloid subpopulations.* Innate Immun, 2014. **20**(5): p. 461-70.

75. Shi, M., et al., *TRIM30 alpha negatively regulates TLR-mediated NF-kappa B activation by targeting TAB2 and TAB3 for degradation*. Nat Immunol, 2008. **9**(4): p. 369-77.
76. Futterer, A., et al., *The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues*. Immunity, 1998. **9**(1): p. 59-70.
77. Honda, K., et al., *Molecular basis for hematopoietic/mesenchymal interaction during initiation of Peyer's patch organogenesis*. J Exp Med, 2001. **193**(5): p. 621-30.
78. Yoshida, H., et al., *Different cytokines induce surface lymphotoxin-alpha on IL-7 receptor-alpha cells that differentially engender lymph nodes and Peyer's patches*. Immunity, 2002. **17**(6): p. 823-33.
79. Randall, T.D., D.M. Carragher, and J. Rangel-Moreno, *Development of secondary lymphoid organs*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 627-50.
80. Lo, J.C., et al., *Lymphotoxin beta receptor-dependent control of lipid homeostasis*. Science, 2007. **316**(5822): p. 285-8.
81. Oram, J.F. and J.W. Heinecke, *ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease*. Physiol Rev, 2005. **85**(4): p. 1343-72.
82. Edgel, K.A., R.C. Leboeuf, and J.F. Oram, *Tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin-alpha increase macrophage ABCA1 by gene expression and protein stabilization via different receptors*. Atherosclerosis, 2010. **209**(2): p. 387-92.
83. Plump, A.S., et al., *Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells*. Cell, 1992. **71**(2): p. 343-53.
84. Ray, A. and B.N. Dittel, *Isolation of mouse peritoneal cavity cells*. J Vis Exp, 2010(35).
85. Cao, C., et al., *A specific role of integrin Mac-1 in accelerated macrophage efflux to the lymphatics*. Blood, 2005. **106**(9): p. 3234-41.
86. Zhang, X., R. Goncalves, and D.M. Mosser, *The isolation and characterization of murine macrophages*. Curr Protoc Immunol, 2008. **Chapter 14**: p. Unit 14.1.
87. Drechsler, M., et al., *Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis*. Circulation, 2010. **122**(18): p. 1837-45.
88. Bellingan, G.J., et al., *In vivo fate of the inflammatory macrophage during the resolution of inflammation: inflammatory macrophages do not die locally, but emigrate to the draining lymph nodes*. J Immunol, 1996. **157**(6): p. 2577-85.
89. Melnicoff, M.J., P.K. Horan, and P.S. Morahan, *Kinetics of changes in peritoneal cell populations following acute inflammation*. Cell Immunol, 1989. **118**(1): p. 178-91.
90. Auffray, C., et al., *Monitoring of blood vessels and tissues by a population of*

- monocytes with patrolling behavior*. Science, 2007. **317**(5838): p. 666-70.
91. Stanley, E.R., D.M. Chen, and H.S. Lin, *Induction of macrophage production and proliferation by a purified colony stimulating factor*. Nature, 1978. **274**(5667): p. 168-70.
 92. Heo, S.K., et al., *LIGHT (TNFSF14) Increases the Survival and Proliferation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells*. PLoS One, 2016. **11**(11): p. e0166589.
 93. Dhawan, P., et al., *The lymphotoxin-beta receptor is an upstream activator of NF-kappaB-mediated transcription in melanoma cells*. J Biol Chem, 2008. **283**(22): p. 15399-408.
 94. Kuai, J., et al., *Endogenous association of TRAF2, TRAF3, cIAP1, and Smac with lymphotoxin beta receptor reveals a novel mechanism of apoptosis*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 14363-9.
 95. Haskill, S., et al., *Adherence induces selective mRNA expression of monocyte mediators and proto-oncogenes*. J Immunol, 1988. **140**(5): p. 1690-4.
 96. Gross, T., *Effects of M-CSF and Adherence on Human Monocyte to Macrophage Differentiation*, in *Naturwissenschaftliche Fakultät III Biologie und Vorklinische Medizin*. 2010, Universität Regensburg.
 97. Wallis, W.J., et al., *Human monocyte adherence to cultured vascular endothelium: monoclonal antibody-defined mechanisms*. J Immunol, 1985. **135**(4): p. 2323-30.
 98. Todd, R.F., 3rd, *The continuing saga of complement receptor type 3 (CR3)*. J Clin Invest, 1996. **98**(1): p. 1-2.
 99. Rosen, H. and S. Gordon, *Monoclonal antibody to the murine type 3 complement receptor inhibits adhesion of myelomonocytic cells in vitro and inflammatory cell recruitment in vivo*. J Exp Med, 1987. **166**(6): p. 1685-701.
 100. Yakubenko, V.P., et al., *A molecular basis for integrin alphaMbeta 2 ligand binding promiscuity*. J Biol Chem, 2002. **277**(50): p. 48635-42.
 101. Fraser, I., D. Hughes, and S. Gordon, *Divalent cation-independent macrophage adhesion inhibited by monoclonal antibody to murine scavenger receptor*. Nature, 1993. **364**(6435): p. 343-6.
 102. Babaev, V.R., et al., *Reduced atherosclerotic lesions in mice deficient for total or macrophage-specific expression of scavenger receptor-A*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(12): p. 2593-9.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen herzlich danken, die mir bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt in erster Linie meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Maria Grandoch für die Überlassung des interessanten Themas, die stets engagierte Betreuung und kritische Supervision beim Verfassen der Arbeit.

Danken möchte ich allen, die mich mit Geduld in die Versuchsmethoden im Labor eingearbeitet haben. Insbesondere möchte ich Kerstin Freidel erwähnen, die immer ein offenes Ohr für Nachfragen und wenn nötig eine helfende Hand für mich hatte.

Nicht zuletzt gilt mein Dank selbstverständlich auch meiner Frau und meinen Eltern, die mich stets auf dem langen Weg zum Abschluss dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.