

Die Rolle dendritischer Zellen in der experimentellen Atherosklerose

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Manuela Sauter, MSc.

aus Graz/Österreich

Tübingen

2019

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation: 26.07.2019

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Harald Langer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Robert Feil

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Atherosklerose	5
1.2	Pathogenese der Atherosklerose	6
1.3	Dendritische Zellen	7
1.3.1	DCs in der Atherosklerose	9
1.4	Apolipoprotein E	10
1.5	Ziele der Arbeit und Fragestellung	12
2	Material	13
2.1	Geräte	13
2.2	Verbrauchsmaterialien	14
2.3	Reagenzien	14
2.4	Puffer	15
2.5	Medien	16
3	Methoden	17
3.1	Verwendete Mausstämme und deren Haltung	17
3.2	Generierung von Knochenmarks-Chimären	20
3.3	PCR und Agarosegelelektrophorese	21
3.4	Induktion der Atherosklerose bei Knochenmarks-Chimären und DC-Depletion	24
3.5	Bestimmung der Lipidparameter im Serum	25
3.6	Ölrot O Färbung	25
3.7	Durchflusszytometrie / FACS	25
3.8	Proteinbestimmung mittels BCA-Methode	26
3.9	SDS-PAGE	27
3.10	Western Blot	29
3.11	ELISA	30
3.12	DC-Isolierung und Kultivierung	30
3.13	Quantitative RealTime PCR	31
3.14	Einbettung von Gewebe in Paraffin und Herstellung von Gewebeschnitten	32
3.15	Immunhistochemie (IHC)	32
3.16	Nachweis von LacZ in Geweben der „CD11c Reporter Mäuse“	33
3.17	HE-Färbung der „X-Gal-Aorten“	34
3.18	Statistische Methoden	34
4	Resultate	35

4.1 Die Verteilung dendritischer Zellen in Organen von cholesterolreich gefütterten ApoE -/- Mäusen unterscheidet sich signifikant von jener in Wildtyp-Mäusen.....	35
4.2 Nachweis von CD11c+ Zellen in Plaques von „CD11c Reporter Mäusen“	36
4.3 Generierung von Knochenmarkschimären CD11c.DTR in ApoE -/-	39
4.4 Evaluierung der DC-Depletionseffizienz in den Knochenmarkschimären	40
4.5 Die Behandlung mit DT in den KM-Chimären führt zur Depletion von CD11c-einzelpositiven, nicht jedoch von CD11c/CD11b doppelpositiven DCs	42
4.6 Die Behandlung mit DT in den KM-Chimären beeinflusst nicht die Zellzahl von Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten im Blut	43
4.7 Die Langzeitbehandlung mit DT in den KM-Chimären führt nicht zur Bildung von Antikörpern gegen das Toxin	44
4.8 Die Langzeitdepletion dendritischer Zellen führt in den KM-Chimären zu einer signifikant verstärkten Atherosklerose	45
4.9 Die Langzeitdepletion dendritischer Zellen führt in den KM-Chimären zu einem signifikanten Abfall des ApoE-Gehaltes im Serum	47
4.10 Die Behandlung von ApoE -/- Mäusen mit DT wirkt sich nicht signifikant auf die Atherogenese aus	49
4.11 Wildtyp DCs in den KM-Chimären sekretieren ApoE in entstehenden atherosklerotischen Läsionen	50
4.12 In vitro kultivierte DCs aus dem Knochenmark von Wildtyp-Mäusen sekretieren unter acLDL Beladung ApoE und regulieren die Expression von für den Cholesterol-Export wichtigen Gene.....	51
4.13 Generierung von DC- und leberspezifischen ApoE Knockout Mäusen.....	53
4.14 Generierung von transgenen ApoE - Mäusen	56
5 Diskussion	59
6 Zusammenfassung.....	65
7 Summary	66
8 Literaturverzeichnis	67
9 Anhang	73
9.1 Tabellenverzeichnis	73
9.2 Abbildungsverzeichnis	73
9.3 Abkürzungsverzeichnis.....	75
9.4 Erklärung zum Eigenanteil.....	78
9.5 Danksagung	79
9.6 Lebenslauf.....	80
9.7 Publikationen.....	81
9.8 Kongressbeiträge	83

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

Die Atherosklerose (AS) als chronische Gefäßerkrankung der Arterien gilt mit ihren Folgeerkrankungen (koronare Herzkrankheit und Schlaganfall) immer noch als die häufigste Todesursache Europas und den USA, bedingt durch den Lebensstil in der westlichen Welt [1, 2]. Die Mortalitätsrate für Gefäßerkrankungen betrug 2016 für 35 – 60 jährige Männer in England <200 pro 100.000 Einwohner pro Jahr [3]. Doch auch nach Änderungen des Lebensstils und Anwendung medikamentöser Plasma-Cholesterolsenker bleibt die Krankheit Anführer der Statistiken. Die WHO definiert AS als eine „variable Kombination von Intimaveränderungen der Arterien, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlehydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“ [4]. Es handelt sich bei der Atherosklerose also um eine chronisch inflammatorische Erkrankung der großen und mittelgroßen Arterien als Folge von mechanischem Endothelstress und Dyslipidämie gefolgt von einer Leukozytenrekrutierung an die verletzte Gefäßwand, was letztendlich zur Plaque-Entwicklung führt [5, 6].

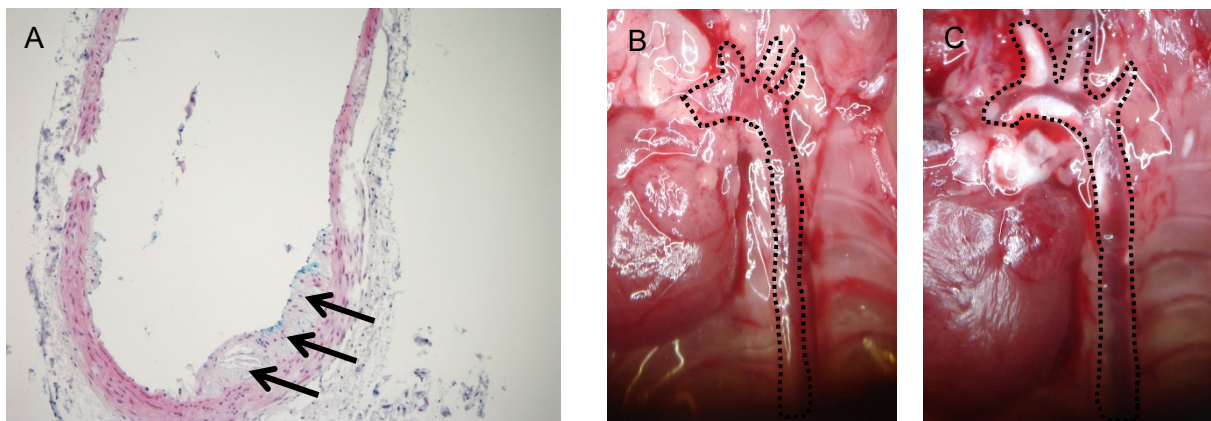


Abbildung 1: (A) Histologischer Querschnitt durch die Aorta einer Apolipoprotein E (ApoE) ^{-/-} Maus, welche unter cholesterolreicher Diät Atherosklerose entwickelte. Der Gefäßschnitt wurde HE-gefärbt und die Plaque (Pfeile) ist gut erkennbar. (B+C) Murine Aorten *in situ*. (B) zeigt die plaquefreie Aorta einer Wildtyp Maus, während (C) die Aorta einer mit cholesterolreicher Diät gefütterten ApoE knockout Maus zeigt. Starke Plaques, vor allem am Aortenbogen und den Verzweigungspunkten, sind deutlich erkennbar.

Hohe Plasmakonzentrationen von Cholesterol, im Speziellen von „low density Lipoprotein“ (LDL), stellen einen der größten Risikofaktoren für die Erkrankung dar [7]. In verschiedenen Studien wurden die Haupt-Risikofaktoren für die Erkrankung definiert. Dies sind vor allem Tabakkonsum, Diabetes mellitus, Dyslipidämie, arterielle Hypertonie, Adipositas sowie höheres Lebensalter, so die Resultate der Tromsø-, Framingham-, Rotterdam- und Procam-Studien [8-13]

1.2 Pathogenese der Atherosklerose

Die Atherosklerose nimmt ihren Beginn nicht erst mit fortgeschrittenem Alter, denn schon bei Kindern konnten in Aortae und Koronararterien sogenannte „fatty streaks“, also Fettstreifen, gefunden werden [14]. Diese finden sich in der Intima der Gefäßwände und beinhalten sogenannte „Schaumzellen“ (das sind Makrophagen, welche Lipide internalisiert haben) sowie T-Zellen [15]. Die Gefäßveränderungen schreiten mit zunehmendem Alter immer schneller fort und dies resultiert im Alter ab 40 Jahren schließlich in Ausbildung von Plaques, Plaquerupturen und deren lebensbedrohlichen Folgen Myokardinfarkt oder Schlaganfall [16, 17]. Dass Zellen des Immunsystems in der Entstehung und Progression der Atherosklerose eine Rolle spielen könnten, wurde bereits 1985 postuliert nachdem in humanen atherosklerotischen Plaques T-Zellen gefunden wurden [18].

Durch die einleitend beschriebenen Risikofaktoren wird eine Entzündungsreaktion initialisiert, welche in einer endothelialen Dysfunktion, dem ersten Stadium in der Pathogenese, resultiert [19]. In weiterer Folge kommt es zu einer Modifikation von sich unter Hypercholesterinämie in der Arterienwand ansammelnden LDL zu oxidiertem LDL (oxLDL). Dieses wiederum begünstigt zusammen mit weiteren vom entzündeten Endothel exprimierten Mediatoren wie zum Beispiel VCAM-1 (vascular cell-adhesion-molecule 1) eine Rekrutierung und Adhäsion von Monozyten, welche in der Intima der betroffenen Gefäße zu Makrophagen differenzieren und über ihre Scavenger-Rezeptoren oxLDL phagozytieren, was sie in der Folge zu Schaumzellen werden lässt und in Gemeinschaft mit T-Zellen zum Bestandteil der „fatty streaks“ [20-23].

Im weiteren Verlauf der Atherogenese kommt es zur Einwanderung glatter Muskelzellen aus der Media der Gefäßwand in den subendothelialen Raum, was

wiederum die Kollagensynthese fördert und in einer Bildung einer fibrösen Kappe auf der Plaque resultiert [24]. Kritisch ist die Umwandlung von der stabilen zur instabilen Plaque: Im Plaquezentrum kommt es zur Ausbildung eines nekrotischen Kerns, welcher Cholesterin und apoptotische Zellen beinhaltet. Von Makrophagen sezernierte Metalloproteinasen führen zum Abbau der zellulären Matrix und es kommt zur Aufweichung der Plaque [25]. Wenn es letztendlich zu einer Plaque-Ruptur und in weiterer Folge zur Thrombusbildung kommt, ist dies durch eine konsekutive Minderperfusion des Gewebes distal der Rupturstelle die häufigste Ursache des Myokardinfarktes [26].

1.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) spielen eine Schlüsselrolle als professionell antigen-präsentierende Zellen (APC), welche in geringer Anzahl in verschiedenen Geweben von Säugetieren vorkommen [27, 28]. Sie sind involviert in verschiedene Prozesse sowohl des angeborenen als auch erworbenen Immunsystems [29]. Ihre Hauptaufgabe liegt in der Regulation des Immunsystems. Sie wurden 1868 erstmals von Paul Langerhans in der Haut gefunden und beschrieben und folglich als „Langerhans-Zellen“ bezeichnet. Als antigen-präsentierende Zellen wurden sie 1973 identifiziert von Steinman et al., welcher dafür 2011 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin verliehen bekam und die Bezeichnung „dendritische Zellen“ einführte [30].

DCs werden zusammen mit Makrophagen zur myeloischen Zellreihe gezählt und entstehen wie alle Zellen des Knochenmarks aus einer gemeinsamen „cluster of differentiation“ (CD) 34-exprimierenden Stammzelle im Knochenmark [31]. Die DCs differenzieren sich aus im Blut zirkulierenden Vorläuferzellen [32]. Diese Vorläuferzellen gelangen über den Blutstrom in ihr Zielgewebe, wo sie zu unreifen DCs differenzieren, die auf ihrer Oberfläche das Integrin alpha X, auch als CD11c bezeichnet, exprimieren [32]. Unreife DCs können Antigene phagozytieren und über „major histocompatibility complex“ (MHC)-II auf ihrer Oberfläche präsentieren, sind aber nicht in der Lage, naive T-Zellen zu stimulieren. Von ihrem Zielgewebe aus migrieren unreife DCs in lymphoide Organe wie Milz oder Lymphknoten, wo sie

schließlich zu reifen DCs differenzieren, auf ihrer Oberfläche die Phagozytose-vermittelnden Rezeptoren verlieren und dafür kostimulatorische Moleküle (CD80/86, CD40), antigen-präsentierende Oberflächenmarker wie MHC-I und II und Adhäsionsmoleküle wie CD11a, CD50, CD54, CD86 exprimieren. Auch CD83 wird von reifen DCs exprimiert – es ist das charakteristischste Merkmal reifer DCs [33]. Reife DCs können T-Zellen ihre Antigene präsentieren, welche in Folge zu T-Effektorzellen wie TH1 oder TH2 differenzieren. DCs sezernieren auch Interleukin-12 (IL-12), ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches ebenfalls die Differenzierung von T-Zellen zu T-Effektorzellen zur Folge hat [34, 35]. Die Interaktion zwischen T-Zellen und DCs wird über T-Zell-Rezeptoren vermittelt, als „immunologische Synapse“ bezeichnet und ist auch von membrangebundenen Liganden wie CD83 abhängig [36].

DCs lassen sich im Menschen abhängig von ihren immunologischen Aufgaben, ihrer Lokalisation und ihrem Ursprung in mehrere Subtypen einteilen: Konventionelle, myeloide DCs (cDC), plasmazytoide DCs (pDC), welche schwächer Antigen-präsentierend sind als cDCs, jedoch die Interferon (IFN) Typ I Antwort zur Bekämpfung von bakteriellen und viralen Infekten initiieren [37], sowie inflammatorische DCs, welche aber nur nach inflammatorischen Stimuli auftreten [38]. In Mäusen können die konventionellen DCs (cDCs) eingeteilt werden in migratorische und Lymphgewebs-residente Subtypen und eine weitere Klassifizierung kann aufgrund der CD8 α und CD4 Oberflächenexpression erfolgen. Außerdem lassen sich murine DCs aufteilen in plasmazytoide DCs (pDCs) und inflammatorische DCs, zum Beispiel „granulocyte macrophage colony stimulating factor“ (GM-CSF)-induzierte Monozyten-stämmige DCs oder „tumour necrosis factor“ (TNF)- α und „inducible nitric oxid synthase“ (iNOS)-produzierende DCs welche im Krankheitsgeschehen auftreten und unter nicht-pathogenen Umständen nicht zu finden sind. Generell ist die Unterscheidung zwischen Makrophagen und DCs jedoch schwierig [38-41]. Choi et al. Haben verschiedene Marker zur Unterscheidung der Subtypen in der murinen Atherosklerose vorgeschlagen [42], über die genaue Funktion einzelner Subtypen ist jedoch in der Atherosklerose bisher nur wenig bekannt.

1.3.1 DCs in der Atherosklerose

Makrophagen stellen die größte Zellpopulation in der atherosklerotischen Plaque dar, jedoch sind auch andere Zellen des Immunsystems vorhanden wie DCs und auch T-Zellen. Diese sind ebenso involviert in Immunreaktionen während der Atherogenese [43-47].

Neben der Proliferation ortsständiger Zellen scheint auch die Rekrutierung dendritischer Zellen in den Läsionsbereich für den Prozess der Atheroprogression bedeutsam zu sein [48, 49]. Tatsächlich mehren sich Hinweise, dass sich dendritische Zellen in der atherosklerotisch veränderten Gefäßwand (vor allem in der vulnerablen Plaqueschulter) anreichern [50, 51]. Der Großteil der DCs in fortgeschrittenen Plaques scheint aktiviert zu sein (Expression von kostimulatorischen Molekülen, wie z. B. CD83 und CD86, und Cytokinen) und mit T-Zellen zu „clustern“ [50, 52]. Die pathophysiologische Rolle dieser dendritischen Zellen ist allerdings unklar und es sind sogar widersprüchliche Daten beschrieben worden [53-55].

So wurde in einem Modell vorgeschlagen, dass die Akkumulation und ein „Entrapment“ von dendritischen Zellen (DCs) zu einer lokalen inflammatorischen Reaktion im Bereich der entstehenden Läsion führt und dadurch die Atherosklerose fortschreitet [53, 54]. Sogar eine Induktion einer Autoimmunreaktion durch DCs in diesem Kontext, die potentielle Autoantigene wie oxidiertes LDL oder Hitzeschockproteine involviert, wurde als potentieller Mechanismus vorgeschlagen, wie DCs die Atherogenese beeinflussen könnten [53, 54]. Im Gegensatz dazu zeigte eine weitere Studie, die ein indirektes *in vivo* Modell der Expression des antiapoptotischen Gens hBCL2 unter dem CD11c Promoter verwendet, so dass die Lebensspanne der DCs verlängert wird, also eine forcierte Expansion von DCs, erstaunlicherweise einen atheroprotektiven Phänotyp [55]. In einer anderen Studie wurde das *in vivo* Modell der CD11c-Diphtheriatoxinrezeptor (DTR) Maus eingesetzt, durch das eine DC - Kurzzeitdepletion von wenigen Tagen erreicht werden kann, was mit erniedrigten Plasmacholesterolspiegeln einherging [56]. Diese Studie konnte auch zeigen, dass DCs genauso wie Makrophagen durch Aufnahme von Lipiden zu Schaumzellen differenzieren können [56].

Zu diesem Zeitpunkt existieren keine Daten bezüglich eines Effekts von chronischer Depletion von DCs, was jedoch fundamental ist, da Atherosklerose bekanntermaßen eine chronische Erkrankung ist.

Da es so viele unterschiedliche Subtypen unter den DCs gibt und nicht alleine „die dendritische Zelle“, ist es auch schwierig, die Rolle der DCs im Allgemeinen in der Atherosklerose zu bestimmen. Dass es selbst bei definierten DC-Subtypen nicht einfach ist, zeigen auch verschiedene Studien mit teils sehr widersprüchlichen Ergebnissen.

Studien, die sich auf die Rolle von CD8 α ⁺ und CD103⁺ cDC1 konzentrierten, führten zu widersprüchlichen Ergebnissen, wobei diesem DC-Subtyp anti-atherogene, pro-atherogene oder gar keine Effekte zugeschrieben wurden. Daher sind weitere Studien erforderlich, um den Beitrag von cDCs zur Atherosklerose zu untersuchen. Den pDCs kann zusammenfassend eine entscheidende Rolle bei der MHCII-abhängigen Antigenpräsentation zugesprochen werden, um pro-atherogene T-Zell-Antworten und Atherosklerose zu vermitteln. Andere Effektormoleküle oder weitere Subtypen innerhalb der pDCs müssen jedoch noch untersucht werden [57].

Wenn in der vorliegenden Arbeit von DCs die Rede ist, sind damit CD11c-exprimierende Antigen-präsentierende Zellen gemeint.

1.4 Apolipoprotein E

Lipoproteine sind nicht-kovalente Aggregate aus Lipiden und Proteinen. Sie bilden Mizellenartige Partikel mit Cholesterinestern und Triacylglyceriden im Kern sowie Proteinen, Phospholipiden und den Hydroxygruppen nicht-veresterten Cholesterins in der Hülle. Die Lipoproteine werden zum Transport von Lipiden, Cholesterin und Cholesterylesters im Blut benötigt [58-60]. Aufgrund ihrer physikalischen Dichte lassen sich die Lipoproteine einteilen in Chylomikronen, „very low density lipoproteine“ (VLDL), „low density lipoprotein“ (LDL), „high density lipoproteine“ (HDL). Als Apolipoprotein wird der Proteinanteil von Lipoproteinen bezeichnet. Die Apolipoproteine werden hauptsächlich in den Geweben, die Lipoproteine synthetisieren, produziert, also vor allem in der Leber. Apolipoprotein E (ApoE) ist ein ca. 34kD großes multifunktionales Plasmaglykoprotein bestehend aus 299 Aminosäuren, das vor allem für seine Fähigkeit bekannt ist, das Cholesterin im

Plasma zu senken und vor Atherosklerose zu schützen [61]. Als hochaffiner Ligand für den Lipoproteinrezeptor niedriger Dichte (LDLR), das LDLR-verwandte Protein (LRP) und Heparansulfat-Proteoglykan (HSP) ist ApoE an der Rezeptor-vermittelten Clearance der verbleibenden Lipoproteine in der Leber beteiligt [61, 62]. Das humane ApoE-Gen liegt auf Chromosom 19, umfasst 4 Exons sowie 3 Introns und ist polymorph [63, 64]. Es wird transkriptionell aktiviert durch den „liver x receptor“ (LXR) sowie den „peroxisome proliferator-activated receptor γ “ (PPAR- γ). Das sind nukleare Rezeptoren, welche Heterodimere mit Retinoidrezeptoren bilden [65]. Man findet beim Menschen drei ApoE Allele: ApoE2, ApoE3 und ApoE4 [66]. Die entsprechenden Proteine unterscheiden sich in einer Aminosäure an Position 112 oder 158 [67]. ApoE2 wird in Verbindung mit Typ-III-Hyperlipoproteinämie gebracht [68]. ApoE3 ist die am häufigsten auftretende Form (ca. 64 % der Bevölkerung sind homozygote ApoE3 Träger). ApoE4 korreliert positiv mit Atherosklerose [61] und Alzheimer-Krankheit [69], beeinträchtigter kognitiver Funktion und reduziertem Neuritenwachstum [70].

Obwohl die Leber die Hauptquelle für Plasma-ApoE ist, haben Studien gezeigt, dass extrahepatische ApoE-Quellen, einschließlich Makrophagen, bis zu 10% der Plasma-ApoE-Spiegel ausmachen [71-73]. Knochenmarks-Transferstudien haben gezeigt, dass bei ApoE -/- Mäusen sogar eine 10% ige Wiederherstellung der ApoE-Plasmaspiegel durch Makrophagen ausreicht, um die Cholesterinspiegel im Plasma zu normalisieren und die Bildung von Atherosklerose zu verhindern [74, 75]. Darüber hinaus ist bekannt, dass das Fehlen von aus Makrophagen stammendem ApoE sowohl im Wildtyp (WT) [76] als auch in Ldlr -/- Mäusen [77] die ApoE-Spiegel im Plasma verringert. Somit trägt Makrophagen-abgeleitetes ApoE wesentlich zu den ApoE-Spiegeln im Plasma bei. Trotz der gut etablierten atheroprotektiven Eigenschaften von Makrophagen-abgeleitetem ApoE [74, 75] sind die Folgen seines Mangels auf Atherosklerose jedoch weniger gut verstanden [76-80]. Es wurde in sämtlichen genannten Studien veröffentlicht, dass die Makrophagen verantwortlich sind für das Bereitstellen des ApoE, wobei jedoch bis jetzt nicht näher die Zellpopulation aus dem Knochenmark definiert wurde, welche das ApoE sezerniert

1.5 Ziele der Arbeit und Fragestellung

Die Atherosklerose stellt auch heute noch die häufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern dar. Obwohl diese Erkrankung in den letzten Jahrzehnten im Mittelpunkt vieler Forschungsprojekte stand, ist bis heute nicht vollständig geklärt, welche Zelltypen an der Entstehung und am Fortschreiten der Krankheit beteiligt sind bzw. welche Zelltypen atheroprotektiv wirken.

Ziel dieser Arbeit war es daher vorrangig, ein Tiermodell zu entwickeln, welches ermöglicht, die spezifische Rolle der DCs in der Atherosklerose zu untersuchen. Es existiert bis zum jetzigen Zeitpunkt kein Tiermodell, welches ermöglicht, einen bestimmten Zelltyp spezifisch und über einen längeren Zeitraum hinweg zu depletieren. Ein solches Modell sollte daher, mit Hilfe von CD11c-DTR transgenen sowie ApoE knockout Mäusen und von Knochenmarkschimären, im Rahmen dieser Dissertation entwickelt werden. Mit Hilfe dieses Modells sollte dann die Rolle der DCs in der Atherosklerose und die zugrundeliegenden Mechanismen aufgeklärt werden. Zudem sollte mit Hilfe dieses Langzeit-Depletionsmodells der Zelltyp näher definiert werden, welcher durch Sekretion von ApoE im Plasma die Mäuse vor Atherosklerose schützt, da in bisherigen Studien nur davon ausgegangen wurde, dass es sich dabei um die Makrophagen handle.

2 Material

2.1 Geräte

Tabelle 1: verwendete Geräte

Gerät:	Hersteller:
Blot Apparatur TRANS-BLOT® SD	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Brutschrank CO ₂ Inkubator MCO-18 AIC	SANYO, Gunma-Ken, Japan
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektrophorese Kammer XCell SureLock™	Invitrogen, Carlsbad, USA
ELISA Lesegerät Microplate Reader 550	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Feinwaage ED 6202S	Sartorius, Göttingen
Lichtmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena
Odyssey® Infrared Membran Scanner	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
pH-Meter	Hanna Instruments, Kehl a.R.
Pipetten Eppendorf research (Automatik Pipetten)	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank HERAsafe	Hereaus, Hanau
Wasseraufbereitungssystem TKA-GenPure	TKA, Niederelbert
Wasserbad Typ 1003	GFL, Burgwedel
Zellzählautomat KX-21N	Sysmex, Kobe, Japan
Zentrifuge Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Multifuge® 3S+	Hereaus, Hanau
LightCycler 480	Roche Deutschland

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Immobilon®FL Transfer (PVDF-)Membran	Millipore, Billerica, USA
Glas-Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Costar, Bodenheim
6-Well Platte MultivellTM	Becton Dickinson, Heidelberg
96-Well Platte costar®	Corning Incorporated, Corning, USA
Western Blot Kassetten 1,0 mm	Invitrogen, Carlsbad, USA
Whatman-Filter Gel Blotting Papier	Whatman, Dassel

2.3 Reagenzien

Tabelle 3: verwendete Reagenzien

Material	Bezugsquelle
Acrylamid Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe
APS	Carl Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Bovines Serumalbumin Fraktion V 96%	AppliChem, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Fetales Kälberserum	PAA, Pasching, Österreich
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
RPMI 1640-Medium	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline, PBS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Diphtherietoxin	Sigma-Aldrich, München
4% PFA	Sigma-Aldrich, München
GMCSF	Peprotech, USA
X-Gal	Sigma-Aldrich, München

2.4 Puffer

Tabelle 4: verwendete Puffer und deren Zusammensetzung

Puffer	Zusammensetzung
1,5 M Tris-Puffer pH 8,8	45,4 g Tris dH ₂ O ad 200 ml Mit HCL auf pH 8,8 einstellen Mit dH ₂ O auf 250 ml auffüllen
1 M Tris-Puffer pH 6,8	12,21 g Tris (121,1 g/mol MG) dH ₂ O ad 70 ml Mit HCL auf pH 6,8 einstellen Mit dH ₂ O auf 100 ml auffüllen
10x Elektrophoresepuffer	30 g Tris (121,1 g/mol MG) 144 g Glycin 10 g SDS Mit dH ₂ O auf 1000 ml auffüllen
10x Blot-Puffer	30 g Tris 112,6 g Glycin Mit dH ₂ O auf 1000 ml auffüllen
4x Lämmli Puffer	250 mM Tris, pH 6.8, 3 g 4% SDS, 4 g 40% Glycerol, 40 ml Pyronin Y 40 mg etwas Bromphenolblau dH ₂ O ad 100 ml Vor gebrauch 20% β-Mercaptoethanol hinzufügen
PBS-T Puffer (0,1% Tween)	1000 ml dH ₂ O 2 Stück PBS Tabletten (PBS Tablets) 1 ml Tween 20
50x TAE-Puffer	242,2 g/l TRIS 37,2 g/l EDTA In 500ml dH ₂ O. Mit konzentrierter Essigsäure auf pH 8,0 einstellen, dann mit dH ₂ O auf 1000 ml auffüllen.

MATERIAL

RIPA Puffer	5 ml 1 M Tris-Cl pH 7.4 3 ml 5 M NaCl 5 ml 20% NP-40 5 ml 10% Natrium Deoxycholate 0.5 ml 20% SDS 81.5 ml dH ₂ O
Citratpuffer	41ml tri-Natriumcitrat-dihydrat 0,1M (2,94g in 100ml dH ₂ O) 9ml Citronensäure 0,1M (1,92g in 100ml dH ₂ O) 450ml dH ₂ O
FACS Puffer	0,5% BSA und 0,05% NaN ₃ in PBS
Fixierlösung X-Gal Färbung	2% Formaldehyd und 0,2% Glutaraldehyd in PBS (bei 4°C gelagert ca. 4 Wochen haltbar)
X-Gal Färbelösung	2mM MgCl ₂ 2,5mM K ₃ Fe(CN) ₆ 2,5mM K ₄ Fe(CN) ₆ In PBS. 500 ml herstellen. Vor Gebrauch X-Gal Stocklösung (40mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside in DMSO) in der Endkonzentration 1mg/ml zugeben.

2.5 Medien

Tabelle 5: verwendete Medien und deren Zusammensetzung

Medium	Zusammensetzung
DC Medium	500ml RPMI 50ml FBS 5,5ml HEPES 5,5ml Penicillin/Streptomycin Lösung 1,8µl β-Mercaptoethanol 0,1µl GMCSF pro ml Medium

3 Methoden

3.1 Verwendete Mausstämme und deren Haltung

B6.129P-ApoE^{tm1Unc} (ApoE^{-/-})

Bei der ApoE^{-/-} Maus wurde gezielt das für Apolipoprotein E kodierende Gen mutiert. Der Donorstamm ist 129P2/OlaHsd, daher der Name. Die Mäuse wurden dann 12 Generationen auf C57Bl/6J rückgekreuzt, so dass von einem Anteil $\leq 0,1\%$ des Donorgenoms (129P) in den ApoE^{-/-} ausgegangen wird. C57Bl/6J wird also als Wildtypkontrolle verwendet, da die ApoE^{-/-}-Mäuse homozygot gezüchtet werden und somit keine Kontrollen aus der Kolonie anfallen. Die ApoE^{-/-} Maus ist ein weit verbreitetes Mäusemodell der Atherosklerose und entwickelt, besonders schnell unter cholesterinreicher Diät, atherosklerotische Läsionen an den Prädilektionsstellen (Aortenbogen, Bifurcation der Carotiden usw.) mit ähnlichen Entwicklungsphasen wie beim Menschen. Schon ohne spezielle Diät ist der Plasmacholesterinspiegel der ApoE^{-/-} Mäuse im Alter von 6 Wochen mit ca. 500 mg/dl fünfmal höher als derjenige von Wildtyp-Mäusen. Bei ApoE^{-/-} Mäusen, die 6 Wochen mit einer 0,15%igen Cholesterin-Diät gefüttert wurden, sind am Endothel adhärente mononukleäre Zellen, darunter vereinzelt auch schon Schaumzellen, nachweisbar. Über das fatty streak-Stadium bis zur Entwicklung der fibrösen Kappe ähnelt die Atherogenese bei der ApoE^{-/-} Maus sehr derjenigen des Menschen

C57Bl/6J (Wildtyp)

Alle verwendeten Knockout- bzw. transgene Mäuse weisen C57Bl/6J genetischen Hintergrund auf. Daher wurden in allen beschriebenen Versuchen C57Bl/6J Tiere als Kontrolltiere verwendet.

C6.FVB-Tg(Itgax-DTR/EGFP)57Lan/J

Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR) vermittelter konditionaler und gezielter Zell-Knockout:

Das Diphtherietoxin (DT) ist ein Exotoxin aus dem Bakterium *Corynebacterium diphtheriae* und setzt sich zusammen aus zwei Untereinheiten (Toxin A und B). Der Wirkungsmechanismus beruht auf der Hemmung der Proteinsynthese. Dabei bindet die B-Untereinheit des Toxins an den DTR auf der Zelloberfläche, es kommt zur Spaltung in ein A-Fragment und ein B-Fragment. Fragment A gelangt über Rezeptorvermittelte Endozytose in die Wirtszelle und verhindert durch enzymatische Spaltung des Elongationsfaktor EF-2 die Proteinsynthese [81, 82]. Mäuse und Ratten sind allerdings unempfindlich gegenüber DT aufgrund von Unterschieden im Zelloberflächenrezeptor welcher den DT-B-Teil des Diphtherietoxin erkennt [83].

Indem man in transgenen Mäusen den DT-Rezeptor einer empfindlichen Spezies (z.B. Affe) unter der Kontrolle eines Zell- oder Gewebespezifischen Promotors exprimiert, ist es möglich nach DT-Injektion spezifisch die entsprechenden Zellen abzutöten.

In CD11c-DTR Mäusen ist die DTR-Expression unter Kontrolle des CD11c-Promotors. Alle murinen dendritischen Zellen exprimieren CD11c. Durch intraperitoneale Applikation von Diphtherietoxin können in diesen Mäusen nun transitorisch dendritische Zellen *in vivo* depletiert werden und so Effekte von DCs untersucht werden [84].

Ein Problem dieses Modells ist allerdings, dass mehr als 1-2 Injektionen von Diphtherietoxin letal für die Mäuse sind, was jedoch durch nicht-hämatopoetische CD11c positive Zellen verursacht wird (möglicherweise Zellen des Neuralsystems). Eine Methode, dies zu umgehen, ist die Knochenmarkstransplantation von CD11c-DTR Mäusen in ApoE^{-/-} -Empfänger-Mäuse. In diesem System können nun DCs in atherosklerotischen ApoE-defizienten Mäusen chronisch depletiert werden.

ApoE^{-/-} x CD11c.^{cre} x LacZ^{fl/fl}

Es wurden ApoE^{-/-} Mäuse gekreuzt mit CD11c.cre positiven (B6.Cg-Tg(Itgax-cre)1-1Reiz/J) Mäusen und LacZ floxed (B6;129S4-Gt(ROSA)26Sor^{tm1Sor}/J) Mäusen, um eine sogenannte „CD11c Reportermaus“ zu erhalten: Diese Mäuse exprimieren das LacZ Gen in allen CD11c positiven Zellen. Das Genprodukt des LacZ Gens, die β -Galaktosidase, kann den zunächst farblosen Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid („Xgal“) zu einem blauen Produkt umsetzen.

ApoEfl/fl x CD11c.cre Mäuse

Es wurden B6.129S6-Apoetm1.1Mae/MazzJ, bei denen loxP Stellen das Exon 3 des ApoE Gens flankieren, verwendet. Mit Hilfe dieses Mausstammes lässt sich also das ApoE Gen zellspezifisch ausschalten. Für dieses Projekt wurden die Mäuse mit CD11c.cre positiven Mäusen (B6.Cg-Tg(Itgax-cre)1-1Reiz/J) gekreuzt, sodass bei den Tieren das ApoE Gen in allen CD11c.cre positiven Zellen ausgeschaltet ist.

ApoEfl/fl x Alb.cre Mäuse

Es wurden B6.129S6-Apoetm1.1Mae/MazzJ mit Alb.cre positiven Mäusen (B6.Cg-Speer6-ps1Tg(Alb-cre)21Mgn/J) gekreuzt, sodass bei den Tieren das ApoE Gen in allen Albumin-exprimierenden Zellen ausgeschaltet ist.

*ApoE2, ApoE3 und ApoE4 Mäuse (B6.129P2-Apoe^{tm1(APOE*2)Mae} N9, B6.129P2-Apoe^{tm1(APOE*3)Mae} N9, B6.129P2-Apoe^{tm1(APOE*4)Mae} N9)*

Beim Menschen weist das ApoE Gen einen Polymorphismus auf: hauptsächlich treten 3 Allele auf: ApoE2, ApoE3 und ApoE4. Die dazugehörigen Proteine unterscheiden sich in einer Aminosäure an Position 112 beziehungsweise 158.

Mit Hilfe von Mäusen, welche kein endogenes Maus-ApoE exprimieren, jedoch transgen sind für jeweils eines der 3 humanes ApoE Allele sind, wurden in dieser Arbeit ebenfalls Versuche durchgeführt. Die Mäuse weisen einen C57Bl/6J und 129Sv Hintergrund auf.

Alle Mausstämme wurden initial über Charles River Laboratories Internationals, Inc. USA bezogen und in der eigenen Tierhaltung weiter gezüchtet, außer die ApoE2, ApoE3 und ApoE4 Mäuse, welche bei Taconic Biosciences, USA bezogen wurden.

Verwendet wurden jeweils männliche und weibliche Mäuse. Die Mäuse wurden in offener Käfighaltung in Gruppen von mindestens zwei bis maximal fünf Tieren bei ad libido Fütterung sowie freiem Zugang zu Trinkwasser gehalten. Bei bestrahlten Mäusen (Knochenmarkschimären) erfolgte die Unterbringung in „Individually ventilated cages“ (IVCs).

Alle beschriebenen Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt.

3.2 Generierung von Knochenmarks-Chimären

6 Wochen alte, weibliche Rezipienten-Mäuse wurden in einer Caesium-Bestrahlungsquelle einer Dosis von 2 x 6,5Gy Gamma-Strahlung (Cs^{147}) im Abstand von vier Stunden ausgesetzt. 24 Stunden nach der zweiten Bestrahlung erfolgte der Knochenmarkstransfer.

Dazu wurden den Spendertieren nach Isofluran-Betäubung und Tötung durch Genickbruch die Femuren und Tibiae entnommen und das Knochenmark folgendermaßen isoliert:

Die Knochen wurden sauber freipräpariert von Muskeln und Sehnen, in Ethanol circa 1-2 Minuten desinfiziert und zweimal in DC-Medium gespült. Danach wurden beide Epiphysen unter sterilen Bedingungen eröffnet und das Knochenmark mit Medium durch eine 27G Kanüle in ein 50ml Falcon Röhrchen gespült.

Nachdem das Knochenmark durch einen 70 μm Filter gefiltert wurde, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten, wurden die Zellen in PBS gewaschen, gezählt und 5 x 10⁶ Zellen pro Empfängertier in Insulinspritzen in einem Gesamtvolumen von 150 μl portioniert.

Die Injektion erfolgte nach kurzer Isofluran-Betäubung retrobulbär.

Nach erfolgter Bestrahlung wurde den Tieren Antibiotikum (Baytril) 1ml/100ml für 2 Wochen über das Trinkwasser verabreicht und ein erfolgreiches Engraftment des Spenderknochenmarkes abgewartet (3-4 Wochen).

Um den erfolgreichen Transfer zu überprüfen, wurde drei Wochen post Transfer Blut retrobulbär entnommen, die DNA daraus mittels Qiagen Kit isoliert und mittels PCR auf Vorhandensein des DTR-Transgens untersucht.

3.3 PCR und Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) können Fragmente definierter Sequenz aus einem DNA-Gemisch selektiv amplifiziert werden. Die Grundlage hierfür ist die Fähigkeit von DNA-Polymerasen, einen Einzelstrang mit Hilfe kurzer doppelsträngiger Bereiche (als Primer bezeichnet) zu einem Doppelstrang aufzupolymerisieren.

Die Primersequenzen für die Genotypisierungen sowie die Master Mixe und Temperaturprogramme sind in den Tabellen 6 bis 9 dargestellt.

Tabelle 6: verwendete Primer und deren Sequenzen

Primer	Sequenz 5' --> 3'
ApoE (oIMR0180)	GCC TAG CCG AGG GAG AGC CG
ApoE (oIMR0181)	TGT GAC TTG GGA GCT CTG CAG C
ApoE (oIMR0182)	GCC GCC CCG ACT GCA TCT
ApoE flox for	GGC TTA GTG GGT AAA GGT GCT
ApoE flox rev	GAC TAG GCA GGT GTG GAA TTA GA
Alb CRE for	ACG ACC AAG TGA CAG CAA TG
Alb CRE rev	CTC GAC CAG TTT AGT TAC CC
CD11c cre (oIMR7841)	ACT TGG CAG CTG TCT CCA AG
CD11c cre (oIMR7842)	GCG AAC ATC TTC AGG TTC TG
CD11c cre (oIMR8744)	CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG
CD11c cre (oIMR8745)	GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT
DTR (oIMR1801)	GGG ACC ATG AAG CTG CTG CCG
DTR (oIMR1802)	TCA GTG GGA ATT AGT CAT GCC
DTR (oIMR8744)	CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG
DTR (oIMR8745)	GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT
LacZ (BB01)	CTC TGC TGC CTC CTG GCT TCT
LacZ (BB02)	CGA GGC GGA TCA CAA GCA ATA
LacZ (RF127)	GCG AAG AGT TTG TCC TCA ACC

Tabelle 7: Master-Mixe für PCRs

	µl
Primers jeweils	1
My Taq HS Red Mix, 2x	12,5
Wasser (dH ₂ O)	x-25
Template	1
gesamt	25

Tabelle 8: Temperaturprogramm 1 für PCRs

Temperatur (in °C)	Zeit
94	3min
94	15sec
Genspezifisch	15sec
72	1min 10sec
72	5min
4	∞

Tabelle 9: PCR Temperaturprogramme für ApoE floxed und Alb.cre

	Temperatur (in °C)	Zeit	
	94	2 min	
Wiederholung der Schritte 2-4 für 10 Zyklen (touchdown)	94	20 sec	
	65	15 sec	0.5°C pro Zyklus Abnahme
	68	10 sec	
Wiederholung der Schritte 6-8 für 28 Zyklen	94	15 sec	
	60	15 sec	
	72	10 sec	
	72	2 min	
	10	∞	

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können doppelsträngige DNA-Fragmente im elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Detektiert werden können diese Fragmente mit Hilfe des Farbstoffes Ethidiumbromid, welcher die Fähigkeit besitzt, zwischen den DNA-Basen zu interkalieren und unter UV-Licht zu fluoreszieren.

Zur Auftrennung wurde in dieser Arbeit 1% Agarosegel verwendet. Dafür wurden 1g Agarose (UltraPure™) in 100ml 1× TAE-Puffer unter Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Die fertige Lösung wurde in die Gießstation gegossen, wobei sich die Menge nach der aufzutragenden Probenmenge richtete. Ein geeigneter Kamm wurde eingesetzt und das Gel bei Raumtemperatur (RT) 30–60 Minuten lang zum Aushärten stehen gelassen. Nach Aushärten des Gels wurde der Kamm entfernt, das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit 1× TAE-Puffer überschichtet.

Zum Auftragen der Proben wurden diese davor mit einer entsprechenden Menge Probenpuffer versetzt und in die einzelnen Geltaschen pipettiert. Ein entsprechender Standard wurde mit aufgetragen und das Gel bei 90V und 400mA ca. 50 Minuten laufen gelassen. Zur Visualisierung der DNA-Banden wurden die Gele anschließend in einem Ethidiumbromid-Bad 30 Minuten lang gefärbt. Die Gele wurden mit Hilfe einer Geldokumentationsanlage der Firma Vilber (Frankreich) und der Analyse-Software „quantum-capt“ abgebildet und fotografiert.

3.4 Induktion der Atherosklerose bei Knochenmarks-Chimären und DC-Depletion

Nach einer Rekonvaleszenzzeit von 3-4 Wochen wurde mit der Fütterung einer cholesterinreichen Diät (Firma Ssniff, S8127-E510, EF, 10mm, Paigen) begonnen. Zeitgleich wurden die Tiere zweimal pro Woche mit einer Dosis von 200ng/Tier Diphtherietoxin intraperitoneal injiziert. Als Vehikel diente PBS, das Gesamtvolumen der Injektionen betrug jeweils 250µl. Den Kontrolltieren wurde jeweils nur PBS injiziert.

Die Fütterung sowie DT-Behandlung erfolgte über einen Zeitraum von sechs Wochen. Die Untersuchung der Tiere erfolgte 24 Stunden nach der letzten Injektion.

3.5 Bestimmung der Lipidparameter im Serum

Für die Gewinnung des Serums wurden die Tiere unter Isofluran-Betäubung entblutet, das Blut 30 Minuten lang stehen gelassen und anschließend bei 1000g zehn Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum in ein frisches Reaktionsgefäß pipettiert. Die Bestimmung von gesamt Cholesterin, Triglyceriden, HDL und LDL erfolgte colorimetrisch mittels Testkits der Firma Abcam.

3.6 Ölrot O Färbung

Bei Ölrot O handelt es sich um einen fettlöslichen, rot färbenden Azofarbstoff, welcher zur Färbung von Lipiden bzw. Triglyzeriden eingesetzt werden kann.

In dieser Arbeit wurde der Farbstoff eingesetzt, um atherosklerotische Plaques in den Aorten der Versuchstiere darzustellen und zu quantifizieren.

Dazu wurden die entnommenen und sauber präparierten Gefäße für 24 Stunden bei 4°C in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Anschließend wurden die Gefäße ein bis zwei Minuten in dH₂O gewaschen und danach für drei Minuten in 50% Ethanol überführt. Die Gefäße wurden dann 25 bis 30 Minuten in der Ölrot O Gebrauchslösung gefärbt (60ml Stocklösung – 0,5g Ölrot in 100ml 100% Ethanol – plus 40ml dH₂O), ein bis zwei Minuten in dH₂O gespült und anschließend bis zum Mikroskopieren wieder in 4% Paraformaldehyd bei 4°C gelagert.

Die Quantifizierung der atherosklerotischen Läsionen erfolgte nach Fotografieren der Gefäße am Zeiss Mikroskop und anschließender Messung der Plauefläche mittels AxioVision Software.

3.7 Durchflusszytometrie / FACS

Mit der Bezeichnung Durchflusszytometrie wird ein Verfahren bezeichnet, welches die Analyse von Zellen, die mit großer Geschwindigkeit an einer elektrischen Spannung oder einem Lichtstrahl vorbei fließen, ermöglicht. Dabei sind je nach Form, Struktur, und Färbung der Zellen verschiedenste Zelleigenschaften ableitbar.

Die Menge des durch die passierende Zelle gestreuten Lichts korreliert mit ihrer Größe und ihrer Komplexität. Dabei stellt das Vorwärtsstreulicht (FSC = *Forward*

Scatter) ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel dar. Es hängt vom Zellvolumen ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = *Side Scatter*) hingegen zeigt die Brechung des Lichts im rechten Winkel an und hängt ab von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der enthaltenen Vesikel.

Beim FACS (fluorescence-activated cell sorting) verwendet man fluoreszenzmarkierte Antikörper, welche an bestimmte Zielantigene auf der Zelloberfläche binden und mit Hilfe verschiedener Laser im Gerät detektiert werden können [85].

Für die FACS Analysen in dieser Arbeit wurden Einzel-Zellsuspensionen durch Filterung des Gewebes (Milz, Lymphknoten, EDTA-Antikoaguliertes Vollblut, Aorten) durch 40µm Filter hergestellt und zu 1×10^7 Zellen pro 100µl portioniert. Die Zellen wurden in 4°C kaltem FACS Puffer gewaschen (1500rpm, 5 Minuten), die FC Rezeptoren mittels Blocking Reagens (Biolegends) 20 Minuten auf Eis blockiert (1µl pro 100µl Zellsuspension) und die gesuchten Antigene mittels spezifischer Antikörper 30 Minuten auf Eis in Dunkelheit gefärbt. Danach erfolgte ein weiterer Wasch-Schritt in FACS Puffer und eine Fixierung der Zellen in 1% PFA für 15 Minuten auf Eis. Nach erneutem Waschen in FACS Puffer waren die Zellen für die Analyse bereit. Als Kontrolle dienten ungefärbte Zellen sowie Zellen, welche mittels unspezifischen Kontroll-IgG Antikörpern gefärbt wurden.

Die Analyse erfolgte auf einem FACSCalibur der Firma BD Biosciences mit Hilfe der Cellquest Pro Software desselben Herstellers.

Sämtliche FACS Antikörper sowie die entsprechenden Isotyp-Kontroll-AK wurden von der Firma Biolegend, SanDiego USA bezogen.

3.8 Proteinbestimmung mittels BCA-Methode

Für die Proteinbestimmung wurde ein BCA-Testkit der Firma Pierce, Illinois, USA verwendet [Pierce Illinois USA, BCA Protein Assay Kit, <http://www.piercenet.com/files/1745as4.pdf>].

Die Reaktion beruht auf der Reduktion von Cu^{+2} zu Cu^{+1} von Proteinen in alkalischem Medium und der hochsensitiven und -selektiven kalorimetrischen

Detektion des Kupfer- Kations mit Hilfe der Bicinchonsäure (BCA), auch bekannt als "Biuret-Reaktion" [86]. Die Farbreaktion ist bei 562nm detektierbar.

Eine Standard-Verdünnungsreihe von bovinem Serumalbumin (BSA) (2mg/ml) in RIPA-Puffer wurde hergestellt (1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80). Als Leerwert diente RIPA-Puffer. Jeweils 10µl Probe beziehungsweise Standard wurden in einer Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) vorgelegt. Das BCA Reagens wurde frisch vorbereitet, indem eine 1:50 Verdünnung von Lösung B in Lösung A hergestellt wurde. Davon wurden jeweils 200µl auf die Proben pipettiert und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Absorption wurde bei 562nm im Plattenlesegerät vermessen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit Hilfe der Eichkurve berechnet.

3.9 SDS-PAGE

Mit Hilfe der SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese) können Proteine nach ihren Molekulargewichtsunterschieden aufgetrennt werden. Das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) überdeckt dabei durch seine stark negative Ladung die negative Eigenladung der Proteine, indem es mit einem konstanten Verhältnis von 1,4g SDS pro 1g Protein bindet. So spielt die Eigenladung der Proteine in der weiteren Auftrennung keine Rolle mehr. Die analytische Auftrennung der Proteine erfolgt durch Verwendung von Polyacrylamidgelen mit diskontinuierlichem Puffersystem. Das bedeutet, dass die Proteine vor der eigentlichen Auftrennung in einem Sammelgel fokussiert werden und anschließend in ein höherprozentiges Trenngel übergeleitet werden, wo die eigentliche Separation stattfindet.

Das erforderliche 10% Trenngel wurde anhand Tabelle 10 hergestellt. In dieser Arbeit wurden 4,5% Sammelgele verwendet.

Deren Herstellung erfolgte ebenfalls nach der in Tabelle 10 dargestellten Rezeptur nach Lämmli [87].

Tabelle 10: Rezeptur der verwendeten Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE nach Lämmli

Komponente	10% Trenngel	4,5% Sammelgel
30% (w/v) Acrylamid	3,3 ml	1,5ml
1,5M Tris-HCl pH 8,8	2,5ml	–
0,5M Tris-HCl pH 6,6	–	2,5ml
dH ₂ O	4,1ml	5,9ml
10% SDS	100µl	100µl
TEMED	9µl	20µl
10% APS	27µl	60µl

Nach dem Gießen der Trenngellösung in die Gelkassetten wurde diese mit Isopropanol überschichtet um eine gerade, glatte Oberfläche zu gewährleisten. Nach dem Auspolymerisieren der Trenngele wurde das Isopropanol entfernt, die frisch zubereitete Sammelgellösung darauf pipettiert und ein Kamm eingesetzt. Nach vollständiger Polymerisierung des Sammelgels wurden die Gelkassetten in die Elektrophoresekammer gesetzt, welche dann mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt wurde. Die Proben wurden nach Entfernen des Kamms in die Geltaschen, welche vorab mit Puffer gespült wurden, pipettiert.

Als Molekulargewichtsstandard wurden 7µl des „prestained Page Ruler“ (Firma ThermoFisher Scientific, USA) aufgetragen. Leere Taschen wurden mit Gelladepuffer aufgefüllt um einen geraden Lauf der Proben zu erzielen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte circa eine Stunde lang (so lange, bis die Bromphenolblau-Front den unteren Trenngelrand erreicht hatte) bei 80V und 400mA.

3.10 Western Blot

Der Begriff Western Blot bezeichnet die Übertragung von Proteinen von einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Trägermembran. Anschließend können über die Bindung von Antikörpern spezifisch Proteine nachgewiesen werden. Um unspezifische Antikörperbindungen an freien Bindungsstellen auf der Membran zu verhindern, müssen diese zuvor blockiert werden. Dies geschieht mit Hilfe von in PBST-Puffer gelöstem Milchpulver. Nach Inkubation der Membran mit von für das interessierende Protein hochspezifischen primären Antikörpern geschieht der Nachweis in einer anschließenden Reaktion mit einem sekundären Antikörper beziehungsweise ein an diesen gebundenes Enzym welches eine Reaktion katalysiert, die ein leicht nachweisbares Endprodukt ergibt.

Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine, zuvor in Methanol aktivierte, Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Transfermembran bei 15V und 100mA eine Stunde lang geblottet. Dazu wurde ein "Sandwich" bestehend aus (in Blotpuffer getränktem) Filter, Membran, Gel, (in Blotpuffer getränktem)Filter (von unten nach oben) gebaut und in die Semidryblot-Kammer eingesetzt. Anschließend wurden die freien Bindestellen der Membran durch Inkubation über Nacht bei 4°C schwenkend in 10% (w/v) Magermilchpulver in 1× PBST Puffer blockiert. Am Folgetag wurde die Membran mit dem primären Antikörper eine Stunde lang bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal jeweils zehn Minuten lang in 1× PBST-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem zweiten, fluoreszenzmarkierten Antikörper wiederum leicht schwenkend eine Stunde lang bei RT. Es folgten noch einmal drei Waschschrte in 1× PBST-Puffer.

Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte über die Detektion des fluoreszenten Sekundär-Antikörpers mit Hilfe des Odyssey Scanners. Um abschließend alle auf die Membran geblotteten Proteine darstellen zu können wurde die PVDF-Membran circa zehn Sekunden lang mit Coomassie-Brilliant-Blue Lösung gefärbt und danach circa zehn Minuten lang entfärbt. Zur Detektion von ApoE wurde ein Antikörper der Firma Abcam (ab20874) verwendet.

3.11 ELISA

Die Bezeichnung Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) steht für ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren. Hierbei werden enzymmarkierte Antikörper eingesetzt, über welche mittels Farbreaktion bestimmte Zielproteine in Proben qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden können. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei ELISAs eingesetzt: Zur Quantifizierung von DT-Antikörpern in Serum wurde ein ELISA im Eigenbau verwendet.

Für den Test wurde eine 96-Kavitätenplatte mit 2µg/ml DT (Mutante CRM197, List Biological Laboratories) bei 4°C über Nacht beschichtet und die freien Bindestellen der Platte am Folgetag mit 0,5% BSA in PBS für zwei Stunden bei RT blockiert. Anschließend wurden die Seren (aus retrobulbär gewonnenem Blut) der DT-behandelten Chimären (bzw. der Kontrolltiere) aufgetragen und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Als Standard diente ein monoklonaler Antikörper gegen DT (7F2, IgG₁ isotype; Abcam). Nach dreimaligem Waschen mit 0,5% PBST wurde ein biotinylierter Goat anti Mouse IgG1 (SBA) Antikörper in einer Konzentration von 1µg/ml auf die Platte pipettiert, eine Stunde bei RT inkubiert und nach erneutem, dreimaligen Waschen Alkalische-Phosphatase gekoppeltes Streptavidin (1:3000, Roche) aufgetragen.

Das in den Seren vorhandene IgG wurde anschließend mit Hilfe einer Alkalische-Phosphatase Substrat Lösung (0,4mg/ml, Roche) visualisiert und die optische Dichte (OD) bei 405nm versus 570nm mit der Standard Kurve verglichen.

Zur Quantifizierung von ApoE im Serum der Knochenmarkschimären (aus retrobulbär entnommenem Blut gewonnen) wurde ein ELISA Kit der Firma Abcam nach Herstellerangabe durchgeführt.

3.12 DC-Isolierung und Kultivierung

Die dendritischen Zellen, welche in dieser Arbeit für *in vitro* Versuche verwendet wurden, wurden aus dem Knochenmark von C57Bl/6J Mäusen isoliert.

Dazu wurden nach Isofluran-Betäubung und Genickbruch die Femuren und Tibiae entnommen, sauber von Muskeln und Sehnen freipräpariert und in Ethanol desinfiziert (ein bis zwei Minuten). Nach zweimaligem waschen der Knochen in DC-Medium wurden die Epiphysen beidseits durchgeschnitten und das Knochenmark

mit DC-Medium mit Hilfe einer 27G Kanüle in ein 50ml Falcon Röhrchen gespült. Danach wurden die Zellen durch einen 70µm Filter in frische Röhrchen pipettiert und bei 1250rpm fünf Minuten pelletiert. Es folgte die Lyse der Erythrozyten mit Hilfe von kaltem Ammoniumchlorid. Dazu wurde das Zellpellet in 1ml Ammoniumchlorid resuspendiert und fünf Minuten lang inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in DC-Medium (18ml pro Maus mit 1,8µl GMCSF) resuspendiert und zu jeweils 3ml in eine 6-Kavitätenplatte aufgeteilt. Alle zwei Tage erfolgte ein Medienwechsel. Am Tag 7 nach Isolierung waren die DCs fertig ausdifferenziert und konnten für Versuche verwendet werden.

3.13 Quantitative RealTime PCR

Die Real-Time-quantitative-PCR (q-PCR) oder quantitative Echtzeit-PCR, beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Zusätzlich ist mit dieser Methode auch eine Quantifizierung der gewonnenen DNA möglich. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Die Fluoreszenz steigt dabei proportional zu der Menge der PCR-Produkte. Die Quantifizierung erfolgt jeweils am Ende eines sich aus mehreren Zyklen zusammensetzenden Laufs in der exponentiellen Phase der PCR.

Für die q-PCR mussten die Zellen zuerst geerntet und danach deren mRNA isoliert sowie in cDNA umgeschrieben werden.

Dazu wurden die DCs mit DC-Medium in ein 50ml Falcon Röhrchen gespült und bei 1250rpm fünf Minuten lang pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und aus dem Zellpellet die mRNA mit Hilfe des Qiagen RNeasy Mini Kits nach Herstellerangaben isoliert. Nach dem DNase Verdau wurde die erhaltene mRNA mit Hilfe des Promega Kits in cDNA umgeschrieben. Die zu untersuchenden Gene wurden mit Hilfe spezifischer Primer und SYBR-Green Master Mix im Roche LightCycler 480 detektiert.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der zugehörigen Software über die Ct-Werte.

3.14 Einbettung von Gewebe in Paraffin und Herstellung von Gewebeschnitten

Um Paraffin-Schnitte herstellen zu können, mussten die entnommenen Maus-Organe über Nacht bei 4°C in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert werden. Danach wurde das Gewebe in entsprechende Einbettförmchen überführt und zum Entwässern durch eine aufsteigende Alkoholreihe gezogen:

1h 70% Ethanol (EtOH)

1h 80% EtOH

1h 95% EtOH

2 x 1h 100% EtOH

2 x 1h Roti-Histol

Anschließend wurden die Förmchen zwei Stunden lang bei 60°C in Paraffin gelagert und konnten danach in entsprechenden Metallförmchen mit flüssigem Paraffin eingebettet werden. Zum Aushärten wurden die Förmchen auf eine Kühlplatte gestellt und anschließend bis zum Schneiden bei 4°C oder bei -20°C gelagert.

Geschnitten wurden die Präparate am Mikrotom in einer Stärke von 5µm. Anschließend wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei RT zum Trocknen stehen gelassen.

3.15 Immunhistochemie (IHC)

Mittels immunhistochemischer Färbung können über eine Antigen-Antikörper Reaktion Proteine in Gewebsschnitten dargestellt werden.

Dazu wurden die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte zuerst entparaffiniert, indem sie zweimal zehn Minuten in Roti-Histol getaucht wurden und anschließend jeweils fünf Minuten lang durch eine absteigende Alkoholreihe gezogen wurden: 2 x 100% EtOH, 1 x 95% EtOH, 1 x 70% EtOH, 1 x dH₂O 30 Sekunden. Anschließend wurden die Objektträger in PBS überführt.

Zur Antigendemaskierung, welche nach Formalin-Fixierung des Gewebes notwendig ist, da Vernetzungen der Membranproteine mit Formaldehydmolekülen entstehen und somit die Bindung des Primär-Antikörpers an das Antigen erschweren können, wurden die Präparate 3 x fünf Minuten in Citratpuffer (pH6) bei 360 Watt in der Mikrowelle aufgekocht.

Nach Abkühlen der Küvette wurden die Schnitte dreimalig 2 Minuten lang in PBST (0,05%) gewaschen. Unspezifische Bindestellen wurden blockiert durch eine 30-minütige Inkubation mit „Protein Block Serum-free“ von Dako. Danach wurden die Schnitte eine Stunde lang bei RT mit dem Primärantikörper (bzw. einem unspezifischen Kontrollantikörper oder PBS) in PBS inkubiert. Nach fünfmaligen Waschen in 0,05% PBST, jeweils 2 Minuten, erfolgte die Inkubation mit einem biotinyliertem Sekundärantikörper (Universal-Gemisch von Dako: anti-rabbit, anti-mouse, anti-goat) und anschließend erneutes, fünfmaliges Waschen in 0,05% PBST jeweils 2 Minuten lang. Nach dem Wasch-Schritt wurden die Gewebeschnitte mit einer Streptavidin-HRP Lösung inkubiert, erneut gewaschen (5 x 2 Minuten) und anschließend eine 3,3'-Diaminobenzidine (DAB)-Lösung auf die Schnitte aufgebracht. Nach erfolgter Farbreaktion wurde erneut gewaschen (5 x 2 Minuten) und entweder nach erneutem Blockieren ein weiterer Primärantikörper aufgetragen, welcher dann mit HistoGreen detektiert wurde, oder gleich die Kernfärbung mit Mayers Hämalaun (1:5 verdünnt) durchgeführt. Es folgte das Bläuen der Schnitte durch Überführung in Leitungswasser für 10 Minuten. Zum Eindecken wurden die Schnitte erst entwässert durch die aufsteigende Alkoholreihe (Schrittweise 70% bis 100% EtOH jeweils ca. 30 Sekunden, danach 1 x 5 Minuten Roti Histol) und die Schnitte mit Eindeckmedium (Eukitt) und einem Deckgläschen eingedeckt und über Nacht getrocknet.

3.16 Nachweis von LacZ in Geweben der „CD11c Reporter Mäuse“

Zur Organentnahme wurden die Mäuse durch Entbluten unter tiefer Isofluran-Narkose getötet. Um restliches Blut aus den Gefäßen und Organen zu entfernen, wurde die rechte Aorta carotis durchgeschnitten und eine Kanüle in die Spitze des linken Ventrikels eingeführt. Durch diese Kanüle wurde die Maus mit Hilfe einer Spritze zuerst langsam mit eiskaltem PBS Puffer und anschließend mit Fixierpuffer perfundiert. Die zu untersuchenden Organe bzw. die Aorta wurden vorsichtig entnommen und in eine 10cm Petrischale mit PBS überführt. Darin wurde die Aorta sauber präpariert, sodass sie am Ende frei von umgebendem Fett war.

Anschließend wurde die Aorta in ein 1,5ml Eppendorfer Reaktionsgefäß mit Fixierpuffer überführt und 20 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurde die Aorta

dreimal 5 Minuten mit PBS bei RT vorsichtig schwenkend gewaschen und anschließend in die X-Gal Färbelösung überführt. Gefärbt wurde über Nacht bei RT lichtgeschützt und vorsichtig schwenkend.

Anschließend wurde erneut dreimal 5 Minuten in PBS gewaschen und die Organe in 70% Ethanol bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

Die Blaufärbung wurde mikroskopisch untersucht und ausgewertet.

3.17 HE-Färbung der „X-Gal-Aorten“

Nach der Entparaffinierung (Siehe Kapitel 3.15) wurden die Gefäße aus 70% Ethanol für 5 Minuten in dH₂O überführt. Anschließend wurden sie für 5 Minuten in Mayers Hämalaun (Firma Merck, 1:5 mit dH₂O verdünnt) getaucht, kurz mit Leitungswasser gespült und anschließend in einer Wanne mit Leitungswasser 15 Minuten gebläut. Danach wurden sie in 1% Eosin für 3 Minuten getaucht und mit dH₂O ausgewaschen. Danach wurden sie durch die aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung geführt (70% Ethanol 10sek, 80% Ethanol 10sek, 95% Ethanol 10sek, 2x 100% Ethanol 5min, Roti-Histol 5min) und eingedeckt mit Eukitt.

Bei dieser Färbung erscheinen die Zellkerne blau (Hämalaun) und das Zytoplasma rot (Eosin).

3.18 Statistische Methoden

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des zweiseitigen Student's t-Test berechnet. Die Testergebnisse wurden in Abhängigkeit des p-Wertes wie folgt gekennzeichnet: * für $p < 0,05$, n.s. für $p > 0,05$.

4 Resultate

Dendritische Zellen treten in humanen atherosklerotischen Plaques auf [88, 89]. Welche Rolle sie in der Atherosklerose einnehmen, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nicht bekannt. Diese Rolle sollte mit Hilfe eines Tiermodelles, welches eine chronische DC-Depletion ermöglicht, untersucht werden. Es existiert bis zum jetzigen Zeitpunkt kein Tiermodell, welches die Depletion eines bestimmten Zelltyps über einen längeren Zeitraum hinweg ermöglicht. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Tiermodell zur chronischen DC-Depletion etabliert werden, um die Rolle dieser Zellen in der Atherosklerose zu evaluieren. An die CD11c positiven Zellen der Spendertiere ist zudem auf genetischer Ebene das Green Fluorescent Protein (GFP) gekoppelt, was eine Detektion dieser Zellen vereinfacht.

4.1 Die Verteilung dendritischer Zellen in Organen von cholesterolreich gefütterten ApoE -/- Mäusen unterscheidet sich signifikant von jener in Wildtyp-Mäusen

Zur Überprüfung, wie sich DCs in atherosclerotischen ApoE -/- Mäusen hinsichtlich ihres Auftretens verhalten, wurden die Tiere über einen Zeitraum von acht Wochen mit cholesterolreicher Diät gefüttert. Als Kontrolltiere dienten mit Standard-Diät gefütterte, gleichaltrige ApoE -/- sowie Wildtyp (C57Bl/6J) Mäuse. Am Ende des Versuches wurden die Organe entnommen, Einzelzellsuspensionen hergestellt und mittels FACS auf den DC-Marker CD11c sowie MHC-II analysiert. Abbildung 2 zeigt die DC-Verteilung in diesen Organen. Es ist zu sehen, dass die Zahl der DCs in den Aorten der atherosklerotischen Tiere signifikant erhöht ist.

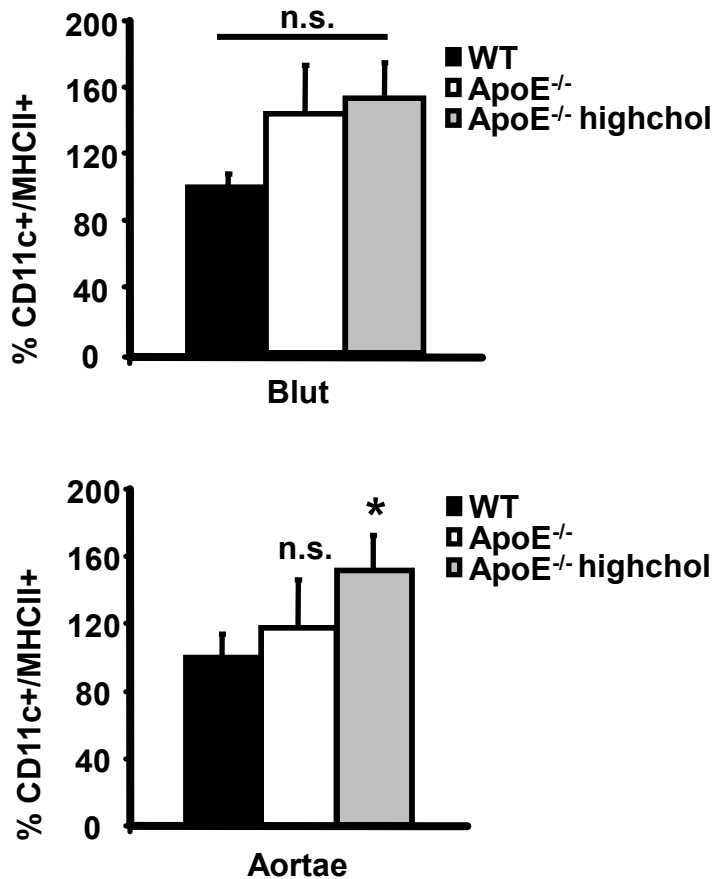


Abbildung 2: FACS Analyse dendritischer Zellen (CD11c und MHC-II) in Blut und Aorten von atherosklerotischen ApoE^{-/-} Mäusen. Während sich im Blut ein leichter, jedoch statistisch nicht signifikanter Anstieg von DCs bei ApoE^{-/-} Mäusen zeigt, ist in den Gefäßen der cholesterolreich gefütterten Tiere die DC-Zahl signifikant erhöht. Das Experiment wurde insgesamt fünfmal durchgeführt. In den Diagrammen dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung.

4.2 Nachweis von CD11c⁺ Zellen in Plaques von „CD11c Reporter Mäusen“

Um DCs in Plaques von ApoE^{-/-} Mäusen bildlich darstellen zu können, wurden sogenannte „CD11c Reporter Mäuse“ generiert (siehe Abbildung 3).

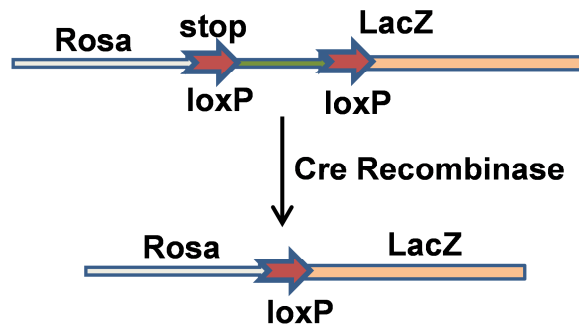


Abbildung 3: Generierung einer CD11c-Reportermaus. Mäuse mit ApoE ^{-/-} Hintergrund wurden mit Mäusen, welche das "gefloxte" LacZ Gen tragen sowie mit Mäusen, die transgen für die cre-Rekombinase unter CD11c Promotor Kontrolle sind gekreuzt, um ApoE ^{-/-} x CD11c.cre x LacZ^{fl/fl} Mäuse zu erhalten.

Die Mäuse wurden schließlich mit Standard- oder cholesterolreicher (Western) Diät gefüttert und mittels X-Gal Färbung die CD11c positiven Zellen in den cre positiven Mäusen nachgewiesen. Zu sehen ist, dass diese Zellen vermehrt am Rand sowie auf der Oberfläche der Plaques sitzen (Abbildung 4). Um zu untersuchen, wie sich die DCs bei fortschreitender Plaquebildung verhalten, wurden die Mäuse unterschiedlich lange mit cholesterolreicher Diät gefüttert und in den Plaques die DCs wiederum mittels X-Gal Färbung nachgewiesen. Abbildung 5 zeigt, dass die DCs in den entstehenden Plaques mit Fortschreiten der Atherogenese akkumulieren.

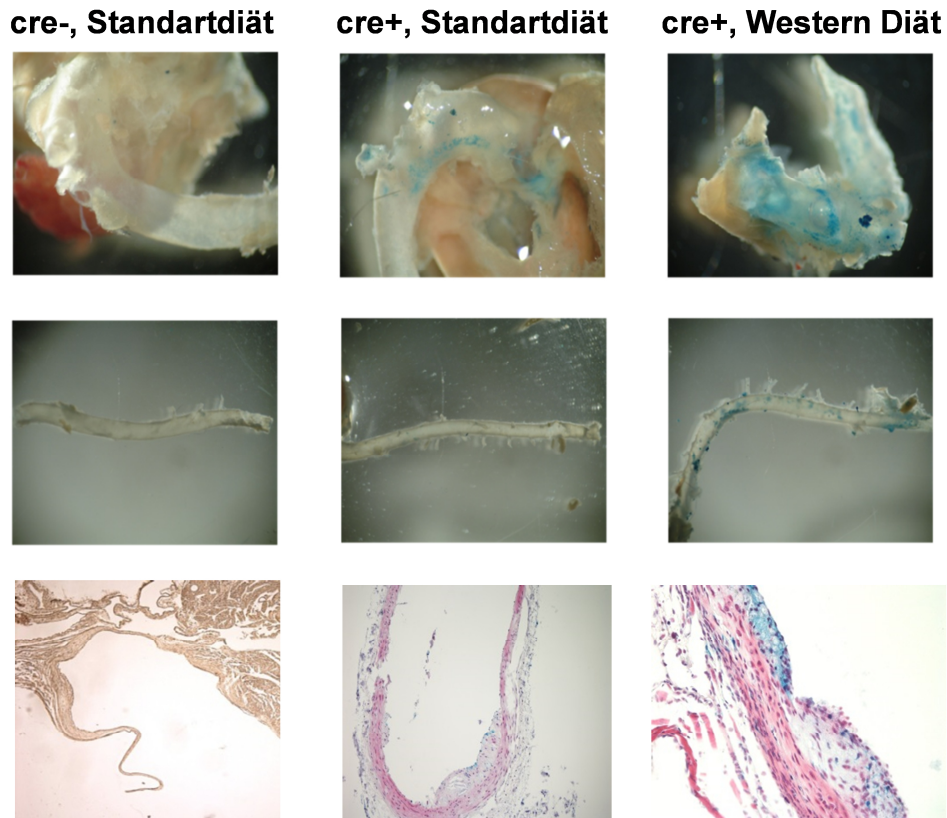


Abbildung 4: Nachweis der CD11c positiven Zellen mittels X-Gal-Färbung in Plaques der Reportermäuse. In cre-negativen Tieren ist sowohl makro- als auch mikroskopisch keine Blaufärbung erkennbar während man bei den cre-positiven Tieren mit Zunahme der Plaquefläche auch eine Zunahme der blau erscheinenden CD11c positiven Zellen erkennen kann.

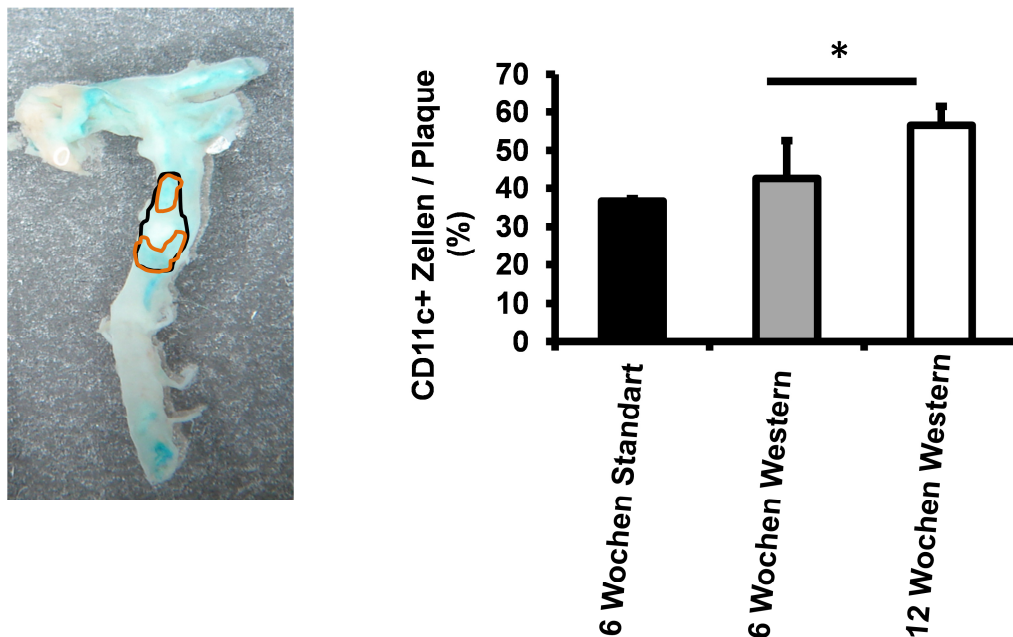


Abbildung 5: Quantifizierung der blau gefärbten CD11c positiven Zellen in den Plaques der Reportermause. Die Plaquesfläche wurde ausgemessen und die blaugefärbte Fläche (CD11c positive Zellen) ins Verhältnis gesetzt mittels „Image J Software“. Die Werte stammen aus 5 unterschiedlichen Versuchen. Gezeigt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen. Das Bild repräsentiert die Aorta eines Versuchstieres, welches über 12 Wochen mit Western Diät gefüttert wurde. Die Linien dienen der Veranschaulichung, wie ausgemessen und ausgewertet wurde (schwarze Linie: gesamter Plaque, orange Linie: CD11c positive Fläche).

4.3 Generierung von Knochenmarkschimären CD11c.DTR in ApoE -/-

Zur Generierung der Knochenmarks-Chimären wurde Knochenmark von CD11c.DTR transgenen Tieren in mit einer (ohne nachfolgende Transfusion) lethalen Dosis an Gamma-Strahlung (2 x 6,5Gy) behandelten ApoE -/- Mäuse transferiert.

Um einen erfolgreichen Knochenmarkstransfer nachzuweisen, wurde zwei Wochen nach dem Transfer Blut zur DNA-Isolierung entnommen und das DTR-Transgen mittels PCR nachgewiesen (siehe Abbildung 6), wobei zum Nachweis des Transgens die Genotypisierungsprimer der CD11c.DTR Mäuse verwendet wurden.

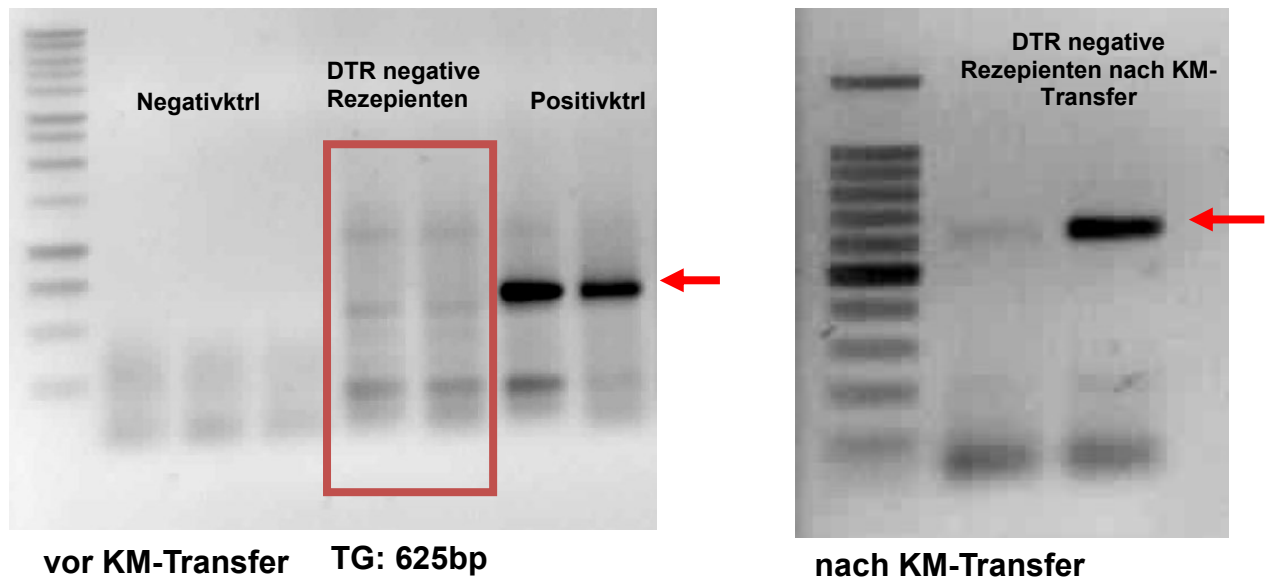


Abbildung 6: Nachweis des erfolgreichen KM-Transfers mittels PCR. Im Blut der DTR-negativen ApoE -/- Rezipienten, wo vor dem Transfer kein Transgen nachgewiesen werden konnte, wurde zwei Wochen nach dem Transfer das DTR-Transgen (625bp) im Blut mittels PCR detektiert.

4.4 Evaluierung der DC-Depletionseffizienz in den Knochenmarkschimären

Nach erfolgreichem „Engraftment“ des Spenderknochenmarks in den Rezipienten drei Wochen nach Transfer, wurde mit der Fütterung von cholesterolreichem Futter sowie der Diphtherietoxin-Injektion zweimal wöchentlich begonnen. Gestartet wurde mit einer Dosis von 4ng DT pro Gramm Körpergewicht. Da diese Dosis sich für eine Langzeitdepletion als zu gering erwies, wurde sie auf die doppelte Menge erhöht. Abbildung 7 zeigt, dass mit dieser höheren Dosis eine erfolgreiche Depletion über einen Zeitraum von sechs Wochen erzielt werden konnte.

Sechs Wochen nach dieser Behandlung wurden den Tieren die Milzen entnommen, Einzelzellsuspensionen hergestellt und auf das Vorhandensein von DC-Markern (CD11c und GFP) mittels FACS untersucht. Wie in Abbildung 8 zu sehen, betrug die Depletionseffizienz nach sechs Wochen circa 80% im Vergleich zu den kontrollbehandelten Chimären.

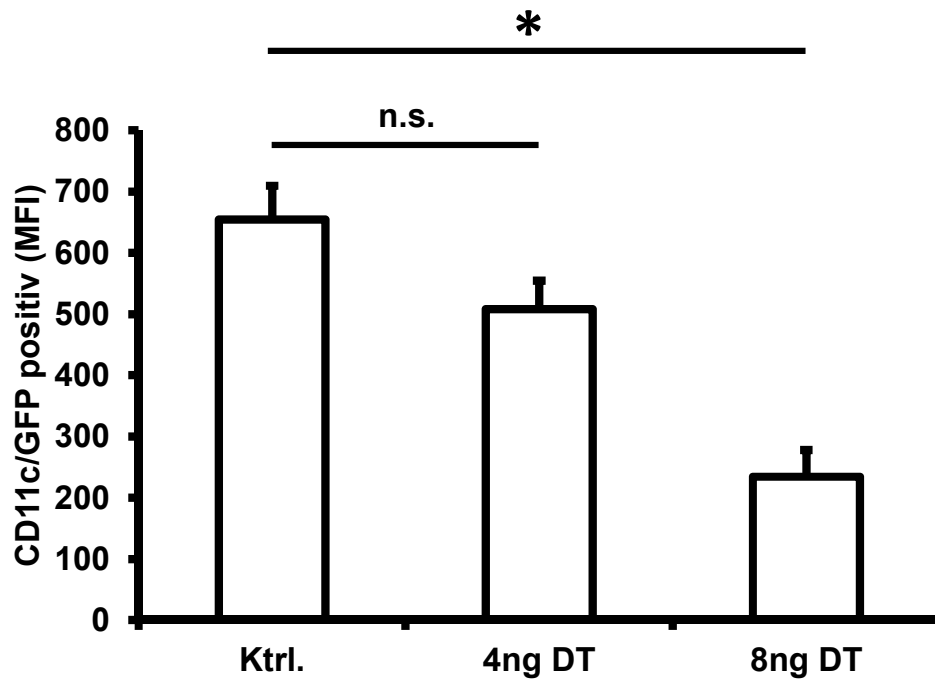


Abbildung 7: Dosiermittlung von DT für eine erfolgreiche Langzeitdepletion. Die KM-Chimären wurden mit 4ng oder 8ng DT pro Gramm Körpergewicht über einen Zeitraum von 6 Wochen behandelt. Danach wurden die Milzen entnommen, Einzelsuspensionen angefertigt und mittels FACS Analyse auf das Vorhandensein der DC-Marker CD11c und GFP analysiert. Nur mit 8ng/g KG konnte eine signifikante Verminderung der DC Zahl über einen Zeitraum von sechs Wochen erreicht werden. Das Experiment wurde insgesamt fünfmal durchgeführt. Im Diagramm dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung.

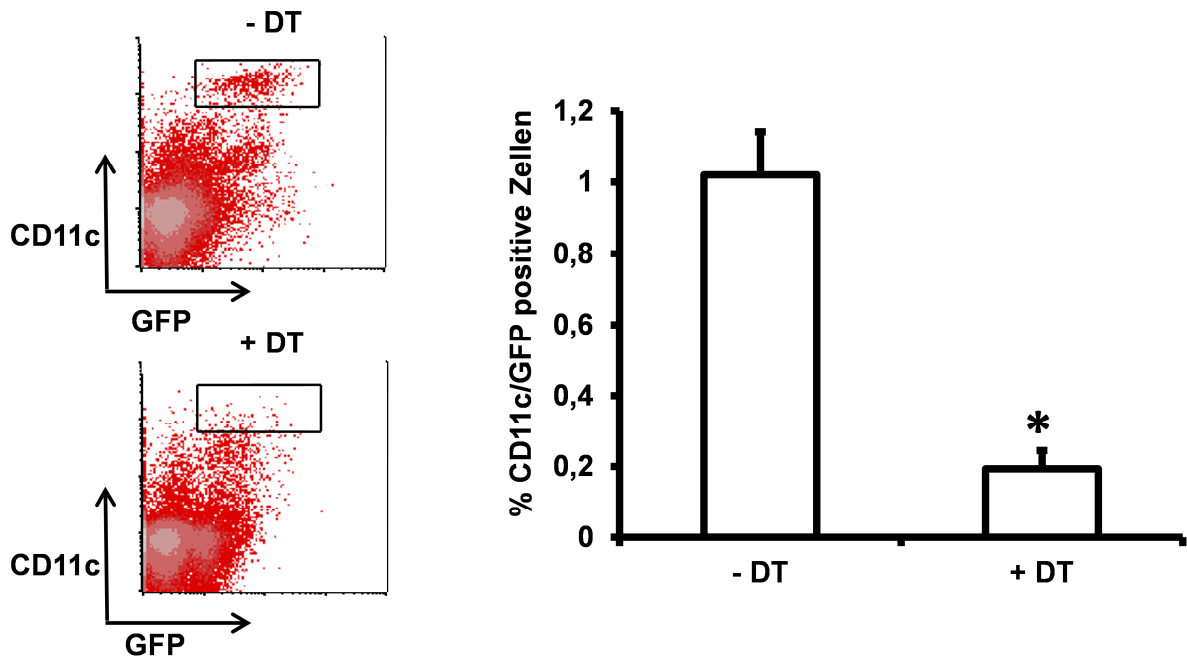


Abbildung 8: Evaluierung der DC-Depletionseffizienz. 6 Wochen nach Start der cholesterolreichen Diät und der DT Injektionen wurden die Milzen entnommen und Einzelzellsuspensionen im FACS auf das Vorhandensein von CD11c und GFP untersucht. Selbst nach diesem langen Depletionszeitraum wurde noch eine signifikante Reduktion der DCs erreicht. Dargestellt sind repräsentative Dotplots eines Experimentes (links: undepletierte Kontrolle, links: langzeitdepletierte Chimäre). Das Experiment wurde insgesamt fünfmal durchgeführt. Im Diagramm dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung.

4.5 Die Behandlung mit DT in den KM-Chimären führt zur Depletion von CD11c-einzelpositiven, nicht jedoch von CD11c/CD11b doppelpositiven DCs

Es gibt in der Zirkulation einige verschiedene DC-Subtypen, welche sich aufgrund ihrer Oberflächenmarker voneinander unterscheiden. Um zu untersuchen, welcher DC-Subtyp in unseren Knochenmarkschimären depletiert wird, untersuchten wir in den Milz-Einzelzellsuspensionen die DCs auf das Vorhandensein eines weiteren Oberflächenmarkers, CD11b. Wie in Abbildung 9 zu erkennen, ist die Zahl der CD11c einzelpositiven DCs nach sechswöchiger DT-Behandlung signifikant verringert. Außerdem „verschwindet“ in den depletierten Tieren eine Zellpopulation, welche geringgradig CD11c positiv und CD11b positiv ist, während eine weitere Zellpopulation, welche CD11b stark und CD11c mittelstark exprimiert, zunimmt. Eine weitere Analyse der depletierten CD11c stark positiven Zellpopulation zeigt, dass diese Zellen CD103 positiv sind.

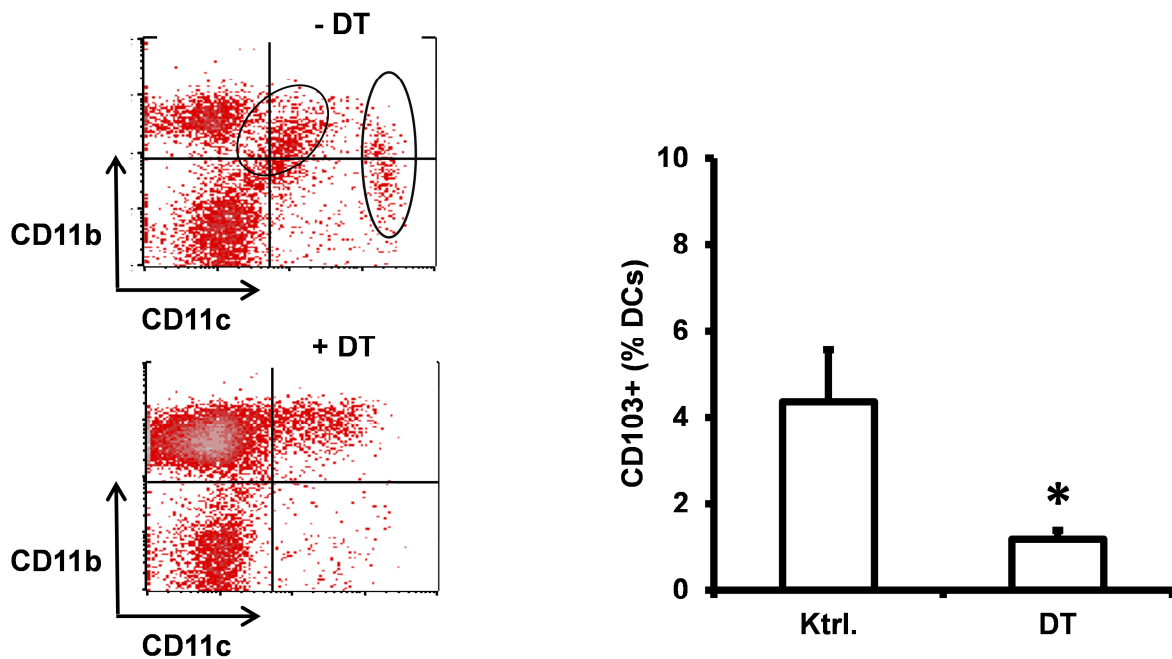


Abbildung 9: Evaluierung der depletierten DC-Subsets. Die FACS Analyse zeigt, dass zwar die CD11c einzelpositiven DCs signifikant depletiert wurden, nicht jedoch die CD11c/CD11b doppelpositiven Zellen. Die Analyse auf CD103 ergab eine signifikante Reduktion in den DCs der mit DT behandelten Chimären. Dargestellt sind repräsentative Dotplots eines Experimentes. Das Experiment wurde insgesamt fünfmal durchgeführt. In den Diagrammen dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung.

4.6 Die Behandlung mit DT in den KM-Chimären beeinflusst nicht die Zellzahl von Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten im Blut

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein Tiermodell zu generieren, welches es ermöglicht, die Rolle eines bestimmten Zelltyps in der Atherosklerose zu untersuchen. Dazu ist es wichtig, dass nur dieser eine Zelltyp, nicht jedoch andere Zellen depletiert werden.

Möglicherweise wirkt sich die langzeitige Behandlung mit DT auch auf Erythrozyten, Thrombozyten oder Leukozyten im Blut aus. Um dies auszuschließen, wurde den Chimären vor Opferung Vollblut retrobulbär entnommen und dieses per Sysmex-Analyseautomat auf diese Parameter untersucht. Abbildung 10 zeigt, dass die Langzeitbehandlung mit DT keinen signifikanten Effekt auf die im Blut zirkulierenden Zellen hinsichtlich ihrer Anzahl hat.

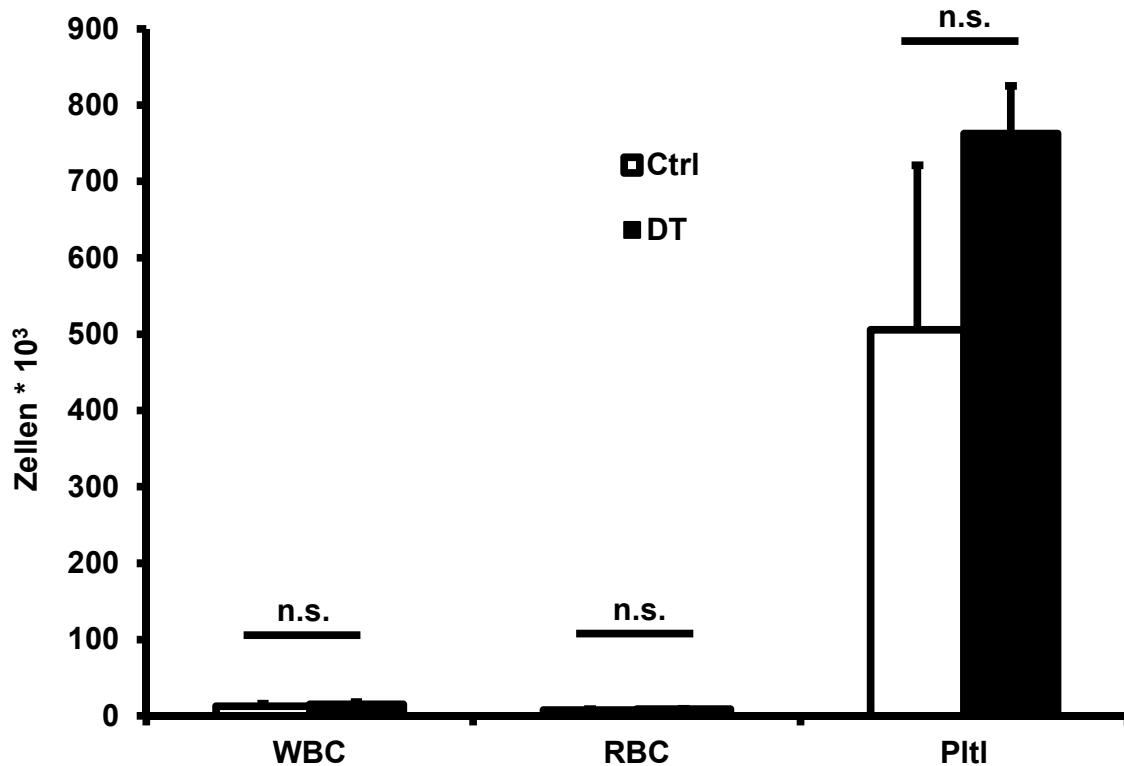


Abbildung 10: Vollblut-Analyse der KM-Chimären nach 6 Wochen Fütterung und Depletion mittels Sysmex auf weiße Blutzellen (WBC), Erythrozyten (RBC) und Thrombozyten (TZ). Die Zahl von WBC sowie RBC ist nicht signifikant verändert. Es befinden sich tendenziell mehr Thrombozyten im Blut der DT-behandelten Tiere, dieser Unterschied ist jedoch ebenfalls nicht signifikant. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten +/- Standardabweichung.

4.7 Die Langzeitbehandlung mit DT in den KM-Chimären führt nicht zur Bildung von Antikörpern gegen das Toxin

Bei der Behandlung von Säugetieren mit diversen Substanzen ist es nicht unwahrscheinlich, dass sie Antikörper gegen diese generieren. Daher musste ausgeschlossen werden, dass die Knochenmarkschimären während der Langzeitdepletion ebenfalls Antikörper gegen DT entwickeln, welche das Toxin neutralisieren und somit unwirksam machen könnten. Dazu wurde ein ELISA durchgeführt, welcher im Serum der Tiere spezifisch IgG Antikörper gegen das Toxin detektieren sollte. Es konnten nach 6-wöchiger Depletion IgG Antikörper gegen DT, jedoch in sehr geringer Konzentration, nachgewiesen werden (siehe Abbildung 11).

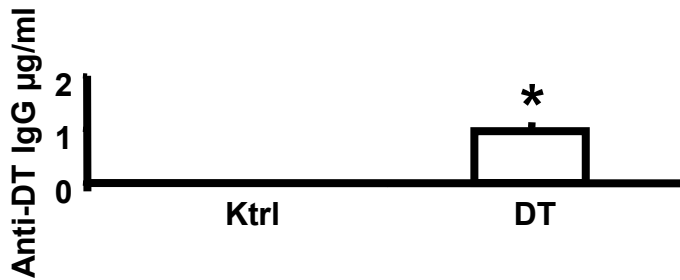


Abbildung 11: ELISA im Serum der langzeitdepletierten KM-Chimären. Es konnten IgG AK gegen DT in sehr geringer Konzentration im Vergleich zu den nicht-depletierten Kontrolltieren gemessen werden, bei denen die IgG Werte unterhalb der Nachweisgrenze lagen.

4.8 Die Langzeitdepletion dendritischer Zellen führt in den KM-Chimären zu einer signifikant verstärkten Atherosklerose

Die Fragestellung dieser Arbeit lautete, ob DCs zu einem Fortschreiten der Atherosklerose beitragen oder ob diese eine atheroprotektive Wirkung besitzen. Um diese Frage zu beantworten, wurden den Tieren nach Ende des Versuches die zuvor mit 4% PFA perfusionsfixierten Aorten entnommen und nach Ölrot O – Färbung die Atherosklerose durch Ausmessen der Plaque- im Vergleich zur Gesamtfläche der Gefäße quantifiziert. Das Ergebnis der Analyse zeigt, dass die langzeitdepletierten Tiere eine signifikant größere Plaquefläche in den Gefäßen aufweisen als die nicht-depletierten Tiere (siehe Abbildung 12). Des Weiteren wurden die Lipidwerte im Serum der Tiere mittels enzymatischem Assay untersucht. Auch hier zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. So sind die Triglyzerid (TG)-Werte, das Gesamtcholesterol sowie das LDL bei den DT-behandelten Tieren signifikant höher als bei den Kontrolltieren (siehe Abbildung 13).

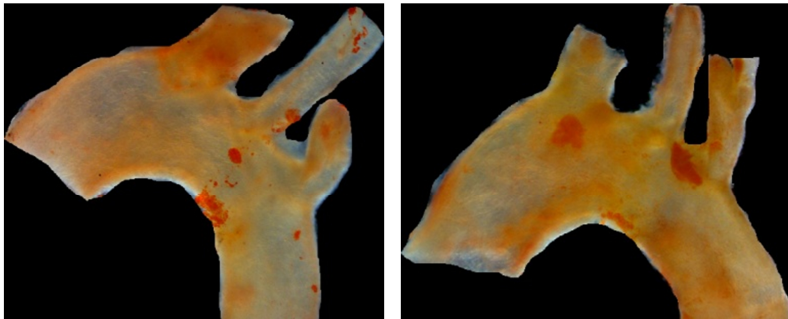
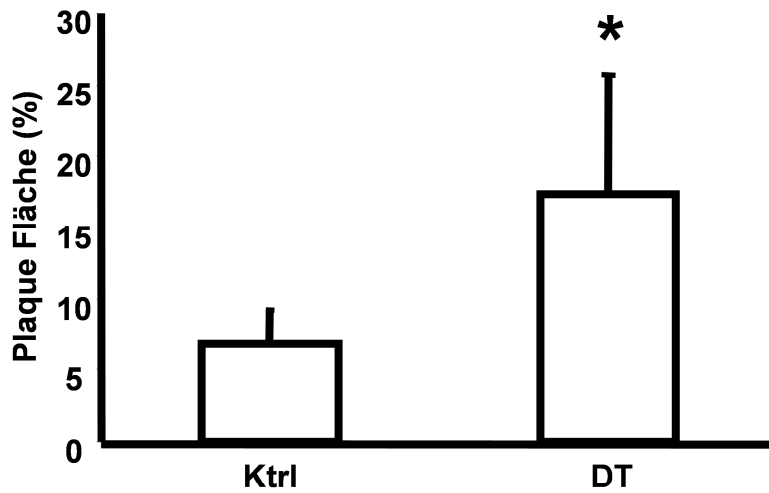


Abbildung 12: Quantifizierung der atherosklerotischen Läsionen in den langzeitdepletierten KM-Chimären. Die mit 4% PFA perfusionsfixierten Gefäße wurden mittels Ölrot O gefärbt und die Plaquefläche mittels AxioVision Software ausgemessen. Die Aorten der behandelten Tiere weisen eine signifikant größere Plaquefläche im Vergleich zu den Kontrolltieren auf. Im Diagramm dargestellt sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten +/- Standardabweichung. Die Bilder zeigen repräsentative Ölrot O Färbungen aus jeweils einem Kontrolltier (links) sowie einem behandelten Tier (rechts).

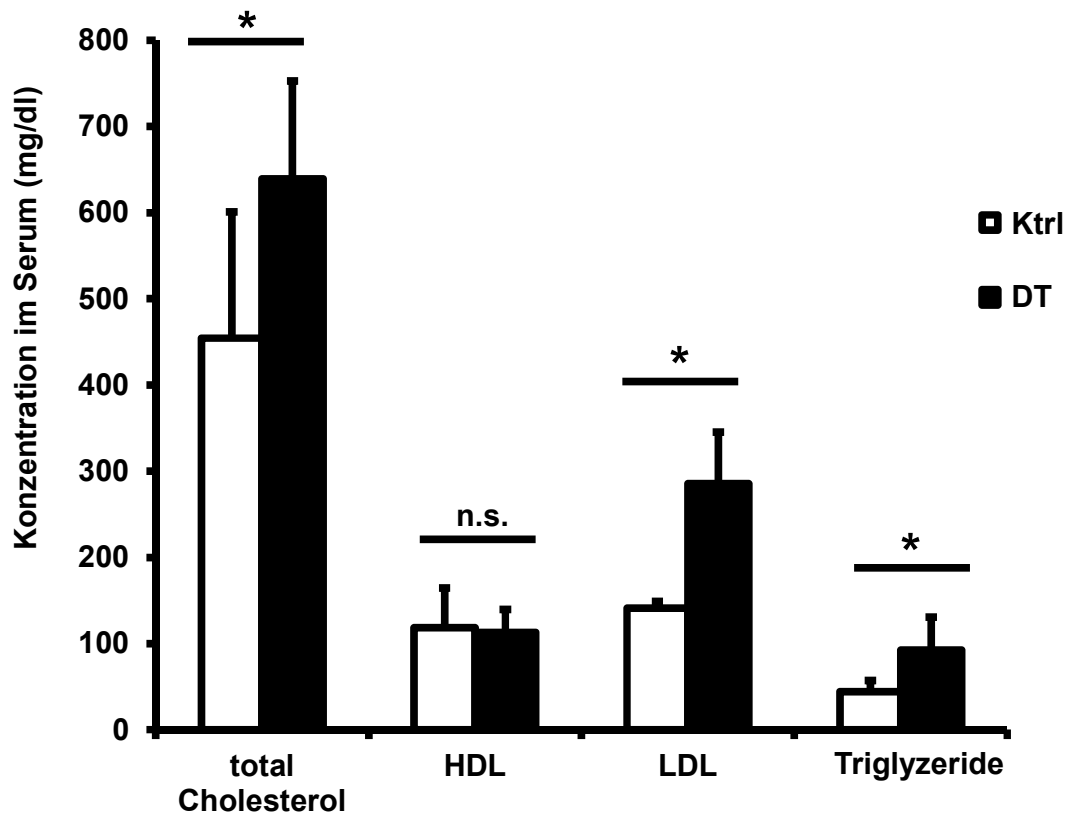


Abbildung 13: Ermittlung der Lipidparameter im Serum der langzeitbehandelten KM-Chimären. Gemessen wurden Triglyzeride, Gesamtcholesterol, HDL sowie LDL mittels enzymatischem Assay. Bis auf HDL waren alle gemessenen Parameter bei den DT-behandelten Chimären signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten +/- Standardabweichung.

4.9 Die Langzeitdepletion dendritischer Zellen führt in den KM-Chimären zu einem signifikanten Abfall des ApoE-Gehaltes im Serum

Nach der Etablierung des Langzeit-Depletionsmodelles sollte an der Aufklärung des den Effekten zugrunde liegenden Mechanismus gearbeitet werden. Es ist bereits publiziert, dass Knochenmark aus Wildtypmäusen ApoE -/- Mäuse vor Atherosklerose schützt, da die Wildtyp-Makrophagen die ApoE -/- Maus mit Apolipoprotein E versorgen. Die ApoE - Serumwerte dieser Mäuse betragen zwar nur 20% des Gehaltes bei Wildtypmäusen, schützen die Tiere aber dennoch [74]. Deshalb war der nächste Schritt dieser Arbeit, den ApoE-Serumgehalt der KM-Chimären zu überprüfen. Dazu wurde einerseits ein Western Blot des Serums und andererseits ein ELISA zur Detektion des ApoE-Gehaltes durchgeführt.

Die Ergebnisse beider Untersuchungen zeigen, dass in den DT-behandelten Tieren die ApoE Menge im Serum signifikant reduziert ist (siehe Abbildungen 14).

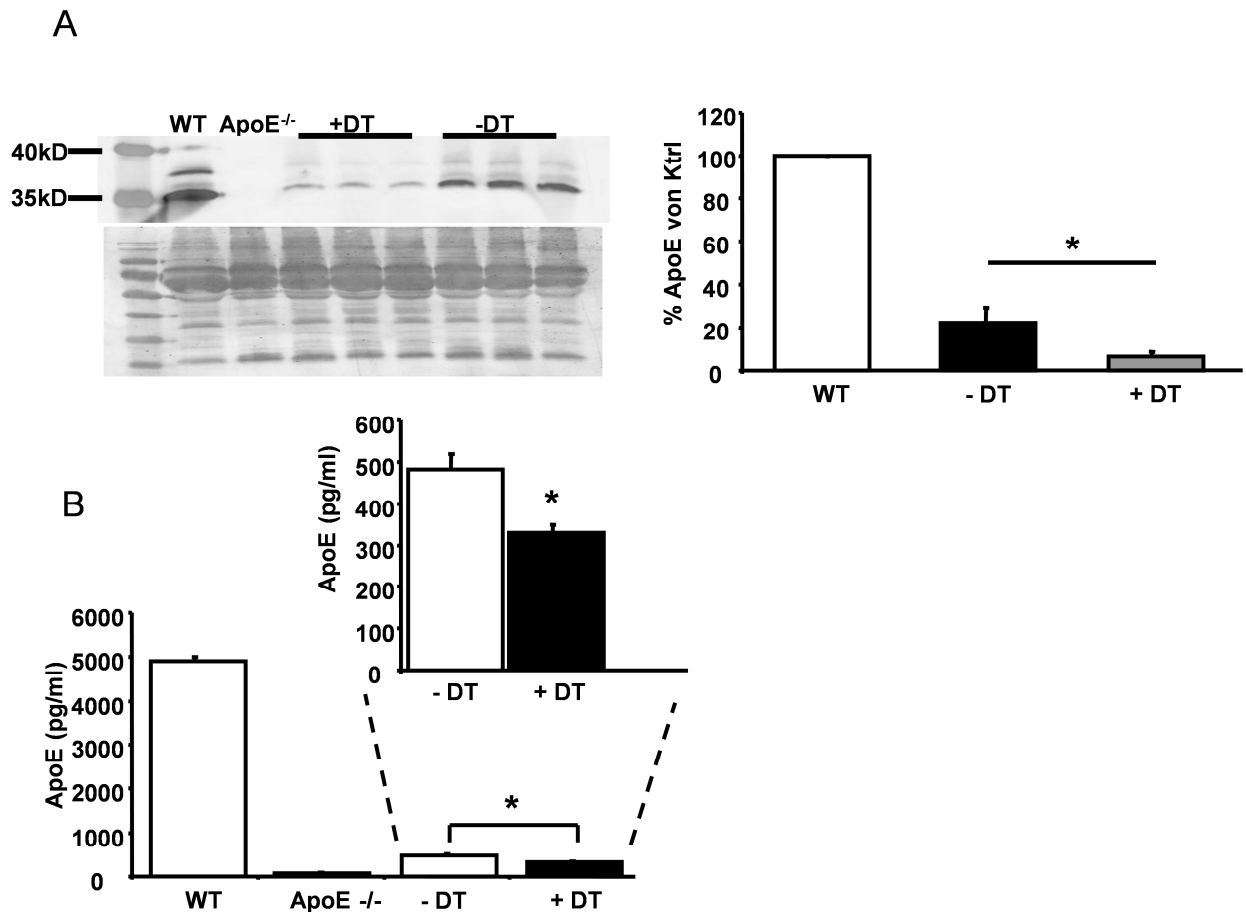


Abbildung 14: Quantifizierung des ApoE Gehaltes im Serum der KM-Chimären mittels Western Blot und ELISA. A) Das Serum der Tiere wurde nach abgeschlossenem Versuch auf ein 12% SDS Gel aufgetragen. ApoE wurde mittels Western Blot auf einer Höhe von 36kDa mit einem ApoE spezifischen Antikörper detektiert. Die Coomassie-Färbung der Membran nach dem Blot dient als Ladekontrolle. Spuren: 1: WT (C57Bl6); 2: ApoE -/-; 3 – 5: Chimären DTR in ApoE -/-, Langzeit depletiert; 6 – 8: Chimären DTR in ApoE -/-, unbehandelt. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Banden. DT-behandelte Chimären weisen einen signifikant geringeren ApoE Gehalt im Serum auf im Vergleich zu den Kontrolltieren. B) Quantifizierung von ApoE im Serum mittels ELISA. Hier wurden auch Proben von Chimären, welche nur einmalig mit DT behandelt wurden, untersucht. Auch bei den einmalig behandelten Tieren kam es zu einer signifikanten Reduktion von ApoE im Serum.

4.10 Die Behandlung von ApoE -/- Mäusen mit DT wirkt sich nicht signifikant auf die Atherogenese aus

Eine wichtige Frage dieses Projektes war, ob das Diphtherietoxin selbst die Atherogenese fördert, unabhängig von seiner depletierenden Wirkung auf die DTR-positiven DCs. Dazu wurden ApoE -/- Tiere, welche nicht bestrahlt wurden und kein CD11c.DTR Knochenmark erhalten haben, äquivalent zu den Chimären sechs Wochen lang cholesterolreich gefüttert und zweimal wöchentlich mit DT behandelt. Am Ende des Versuches wurden ihnen die Aorten entnommen und die Atherosklerose mittels Ausmessung der Plaqueläche nach Ölrot O Färbung quantifiziert. Wie aus Abbildung 15 ersichtlich, konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Plaqueläche zwischen DT-behandelten und unbehandelten ApoE -/- Mäusen festgestellt werden.

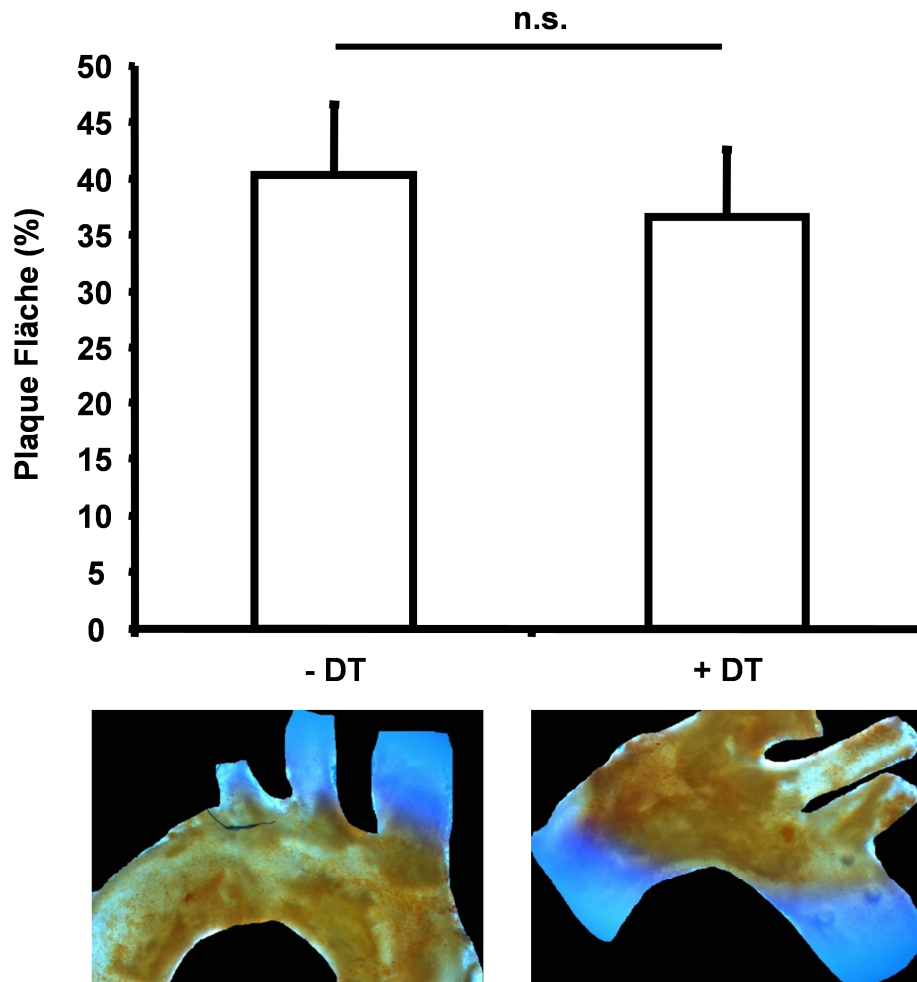


Abbildung 15: Quantifizierung der atherosklerotischen Läsionen in DT-behandelten ApoE^{-/-} Mäusen. Die mit 4% PFA perfusionsfixierten Gefäße wurden mittels Ölrot O gefärbt und die Plaquefläche mittels AxioVision Software ausgemessen. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen festzustellen. Im Diagramm dargestellt sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten +/- Standardabweichung. Die Bilder zeigen repräsentative Ölrot O Färbungen aus jeweils einem Kontrolltier (links) sowie einem behandelten Tier (rechts).

4.11 Wildtyp DCs in den KM-Chimären sekretieren ApoE in entstehenden atherosklerotischen Läsionen

Ein direkter Nachweis der ApoE Sekretion durch DCs sollte mittels Immunhistochemie (IHC) erbracht werden. Dazu wurden Paraffinschnitte von entnommenen Herzen der undepletierten Chimären entnommen und auf CD11c sowie ApoE mit Hilfe spezifischer Antikörper cogefärbt. Es konnte gezeigt werden, dass in entstehenden Plaques von undepletierten KM-Chimären ApoE sekretiert wird (Abbildung 16).

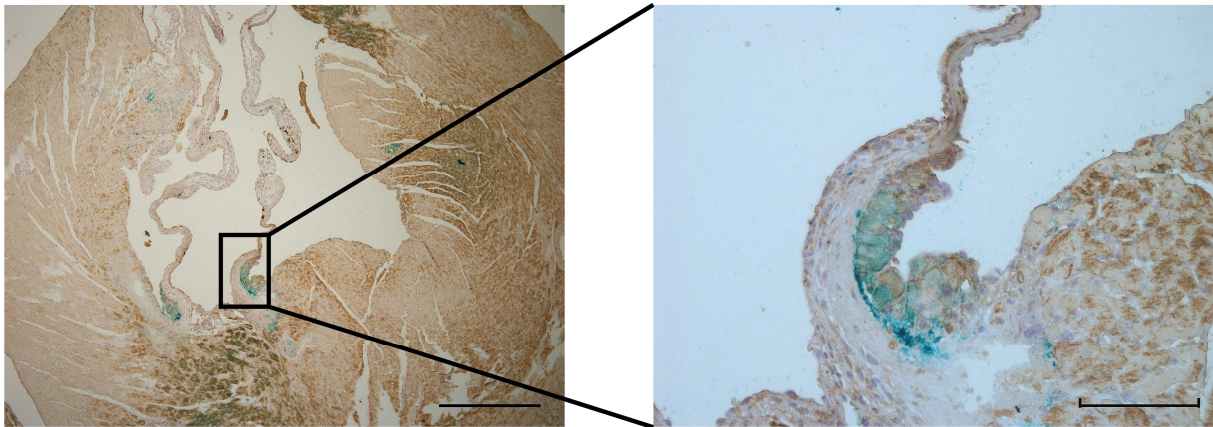


Abbildung 16: Nachweis von CD11c (braun) und ApoE (grün) in der entstehenden Plaque an Herzen von undepletierten KM-Chimären mittels IHC. Links gezeigt ist ein Übersichtsbild in 100-facher Vergrößerung, rechts davon ein Ausschnitt in 200-facher Vergrößerung.

4.12 In vitro kultivierte DCs aus dem Knochenmark von Wildtyp-Mäusen sekretieren unter acLDL Beladung ApoE und regulieren die Expression von für den Cholesterol-Export wichtigen Gene

Die mit Hilfe der KM-Chimären generierten *in vivo* Daten sollten ergänzt werden mit Untersuchungen an *in vitro* kultivierten, aus Knochenmark isolierten DCs. Diese wurden, um atherosklerotische Bedingungen *in vitro* nachzuahmen, mit 10µg/ml acLDL beladen um 24 Stunden nach Beladung die ApoE-Sekretion im Kulturüberstand mittels Western Blot zu untersuchen. Außerdem wurden die Zellen nach dem Versuch geerntet, deren mRNA isoliert und in der generierten cDNA mittels qPCR die Expression von Genen untersucht, die im Cholesterol-Export eine wichtige Rolle spielen. Abbildung 17 zeigt, dass mit acLDL beladene DCs signifikant mehr ApoE sekretieren als die unbeladenen Kontrollzellen.

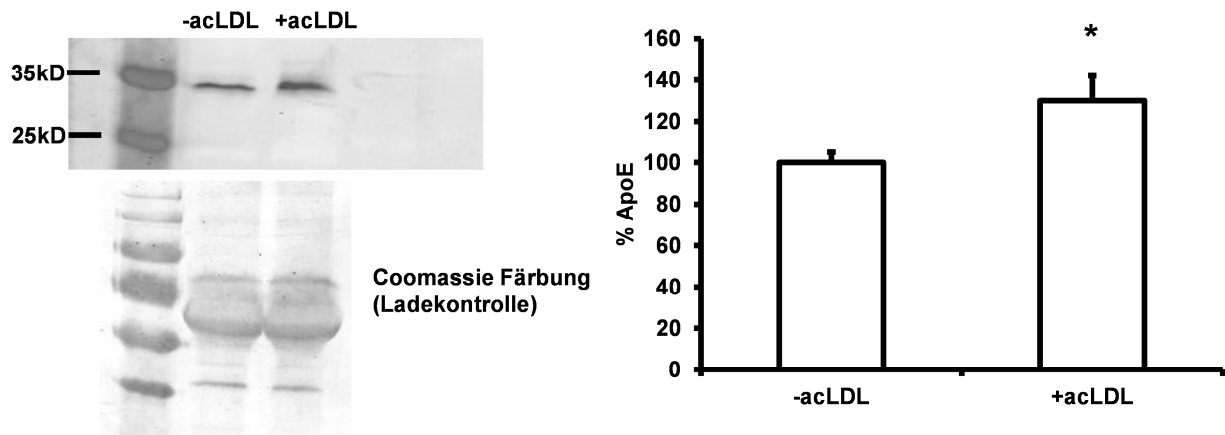


Abbildung 17: Quantifizierung des ApoE Gehaltes im Überstand kultivierter Knochenmarks-DCs mittels Western Blot. Der Kulturüberstand wurde auf ein 12% SDS Gel aufgetragen. ApoE wurde mittels Western Blot auf einer Höhe von 36kDa mit einem ApoE spezifischen Antikörper detektiert. Die Coomassie-Färbung der Membran nach dem Blot diente als Ladekontrolle. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Banden. Mit acLDL beladene DCs sekretieren signifikant mehr ApoE als unbeladene Zellen.

Abbildung 18 zeigt, wie die Gene LXR, ABCA1, ABCG1 sowie ApoE in mit acLDL beladenen DCs reguliert werden. Der Liver X Receptor liegt „upstream“ von ApoE. Als Kontrollexperiment wurden daher Knochenmarks-DCs von LXR-Knockout Mäusen mittels qPCR verglichen mit WT-Knochenmarks-DCs. Unter acLDL Beladung sekretieren LXR-knockout DCs signifikant weniger ApoE (siehe Abbildung 18).

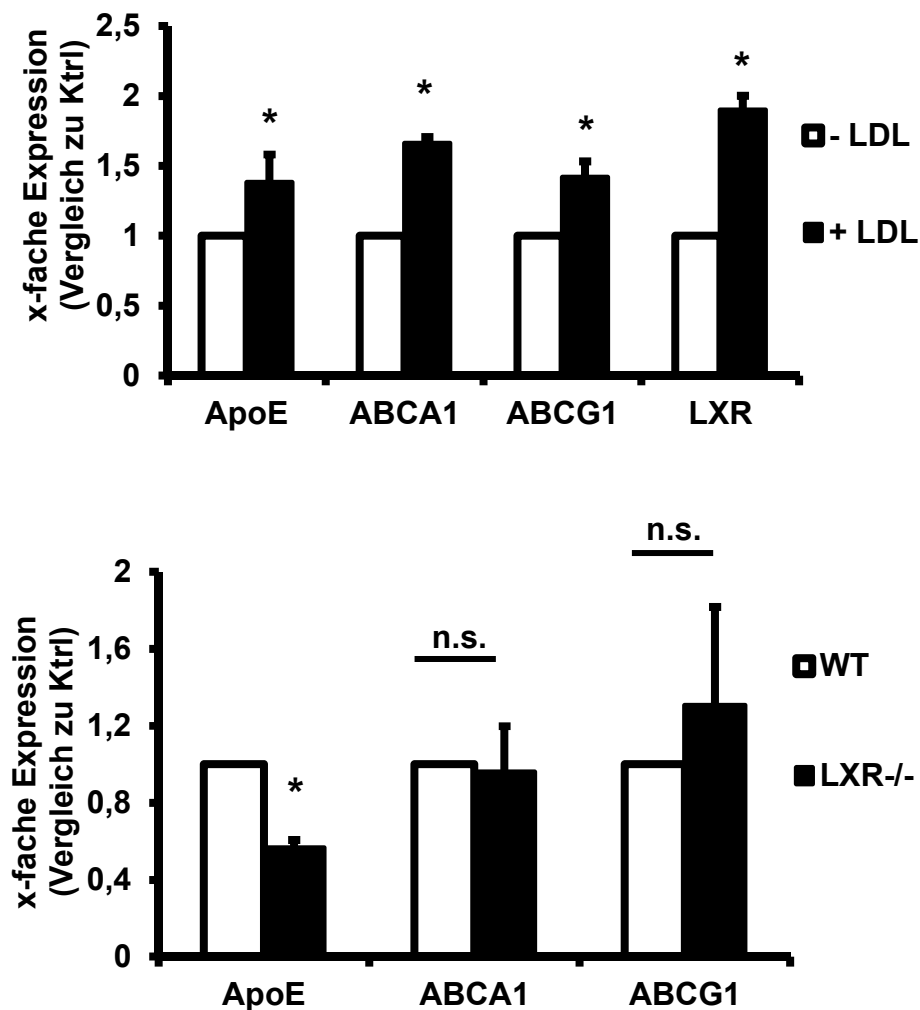


Abbildung 18: Analyse der Genexpression verschiedener für den Cholesterolexport wichtiger Gene in acLDL beladenen Knochenmarks-DCs aus WT Mäusen (oben). Die Expression von ABCA1 sowie LXR ist in beladenen Zellen signifikant erhöht, nicht jedoch jene von ApoE und ABCG1. In LXR -/- Mäusen ist die Expression von ApoE in Knochenmarks-DCs signifikant vermindert (unten).

4.13 Generierung von DC- und leberspezifischen ApoE Knockout Mäusen

Um die Effekte von ApoE aus DCs genauer untersuchen zu können, wurden CD11c.cre positive Mäuse oder Albumin.cre positive Mäuse mit Tieren, in welchen das ApoE Gen „gefloxt“ vorliegt, gekreuzt. So konnte ApoE selektiv nur in CD11c positiven (CD11cApoE -/-) bzw. in Albumin-exprimierenden (AlbApoE -/-) Zellen, welche hauptsächlich in der Leber zu finden sind, ausgeschaltet werden. Die Tiere

wurden über einen Zeitraum von 12 Wochen mit cholesterolreicher Diät gefüttert und anschließend die entnommenen Aorten mit Ölrot O gefärbt, um die Plaques darstellen und quantifizieren zu können (Abbildung 19).

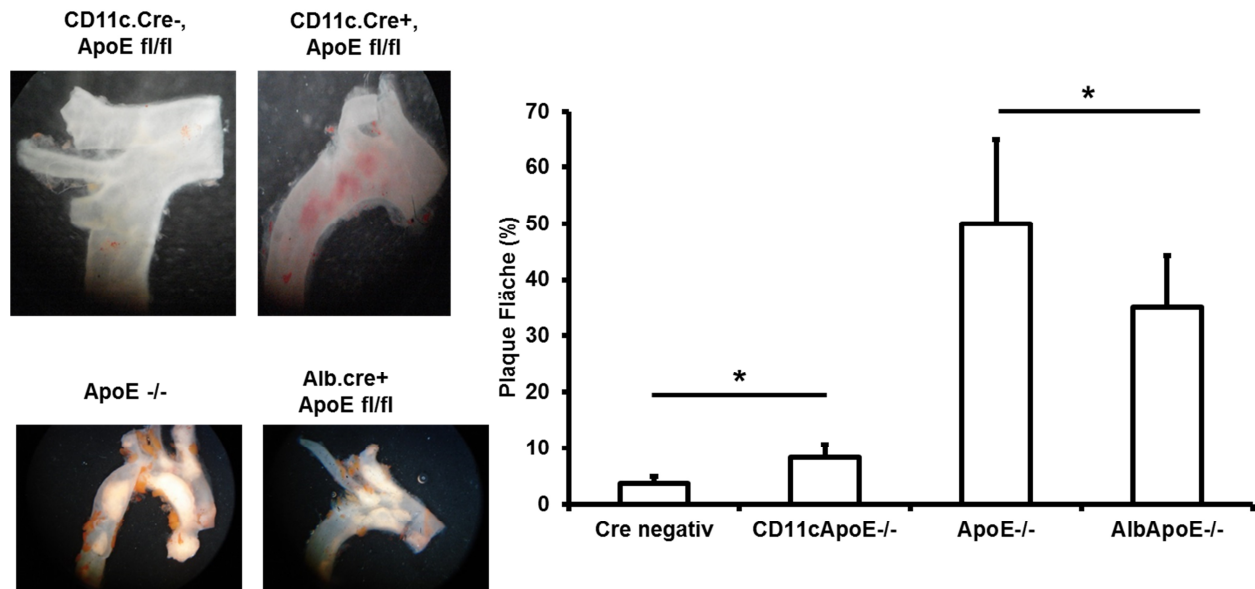


Abbildung 19: Ölrot O Färbung und Quantifizierung der atherosklerotischen Läsionen der entnommenen Aorten von cholesterolreich gefütterten CD11c.cre ApoE fl/fl und Alb.cre ApoE fl/fl Mäusen. Die mit 4% PFA perfusionsfixierten Gefäße wurden mittels Ölrot O gefärbt und die Plaquefläche mittels AxioVision Software ausgemessen. CD11c.cre ApoE fl/fl Tiere weisen im Vergleich zu ihren cre-negativen Wurfgeschwistern eine signifikant größere Plaquefläche auf. Auch Alb.cre ApoE fl/fl positive Tiere entwickeln signifikant größere Plaqueflächen als cre negative Tiere, jedoch signifikant weniger als ApoE knockout Mäuse. Im Diagramm dargestellt sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten +/- Standardabweichung. Die Bilder zeigen repräsentative Ölrot O Färbungen aus jeweils einem Kontrolltier (links) sowie einem behandelten Tier (rechts).

In Tieren, welche defizient für ApoE in DCs sind, ist die Plaquefläche signifikant größer als in den CD11c.cre negativen Kontrolltieren, auch zwischen Albumin.cre positiven und Albumin.cre negativen Tieren besteht ein signifikanter Unterschied. Im Vergleich zu ApoE knockout Mäusen ist bei leberspezifischen ApoE -/- Mäusen die Plaquefläche signifikant kleiner (Abbildung 19).

Hinsichtlich der Cholesterolverte im Serum ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen CD11c.cre negativen und CD11c.cre positiven Tieren feststellen. Nur bei Albumin.cre positiven Tieren lagen die Cholesterolverte im Serum deutlich höher als bei allen andern Gruppen im Versuch, siehe Abbildung 20.

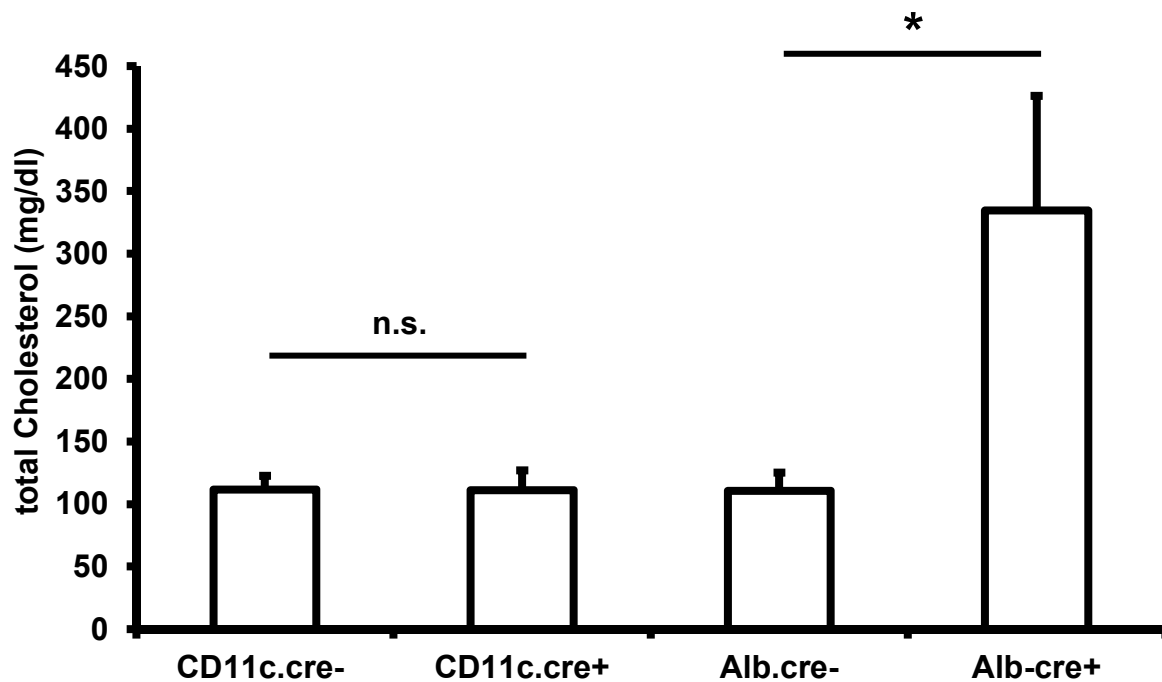


Abbildung 20: Ermittlung der Gesamtcholesterolverte im Serum der zellspezifischen ApoE knockout Mäuse. Gemessen wurde mittels enzymatischem Assay. Nur bei Albumin.cre positiven Tieren liegen die Cholesterolverte im Serum deutlich höher als bei allen andern Gruppen im Versuch. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten +/- Standardabweichung.

Im Serum der Tiere wurden die ApoE Gehalte mittels Western Blot bestimmt. In Abbildung 21 ist zu sehen, dass in DC-spezifischen ApoE knockout Mäusen sich der ApoE Gehalt um ca. 25% verringert im Vergleich zu WT Tieren, während in Leberspezifischen ApoE knockout Mäusen der ApoE Gehalt im Serum um ca. 70% verringert ist.

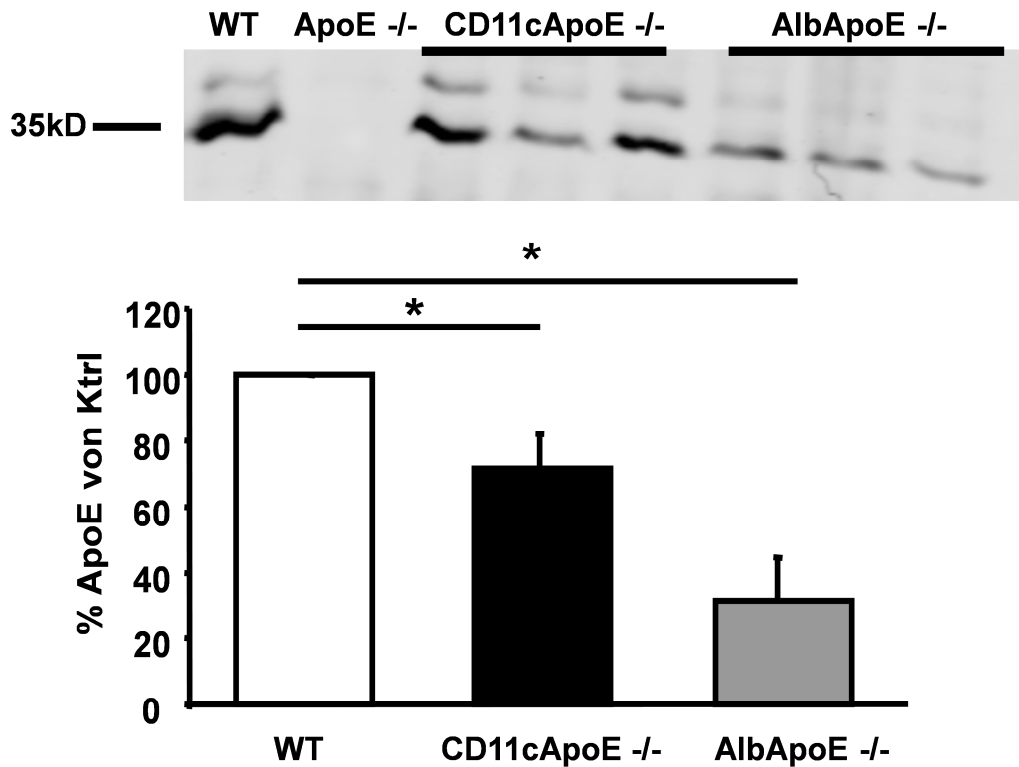


Abbildung 21: Quantifizierung von ApoE im Serum der zellspezifischen ApoE knockout Mäuse. Eine densitometrische Auswertung zeigt die verringerten ApoE Werte im Serum der zellspezifischen ApoE knockout Tiere. Die Daten repräsentieren Werte von 9 Tieren pro Gruppe, das Bild zeigt einen repräsentativen Blot. Dargestellt im Diagramm sind Mittelwerte +/- Standardabweichung.

4.14 Generierung von transgenen ApoE - Mäusen

Beim Menschen liegt das ApoE Gen in 3 verschiedenen Isoformen vor, mit unterschiedlichen Auswirkungen auf den Träger. Um zu untersuchen, ob es hinsichtlich Atheroskleroseentwicklung bzw. Schutz vor Atherosklerose Unterschiede bei den drei verschiedenen ApoE Formen gibt, wurden Chimären erzeugt (wie beschrieben), die jeweils transgen waren für eines der drei verschiedenen humanen ApoE Gene, selbst jedoch kein murines ApoE exprimieren (ApoE -/- Tiere als KM-Empfänger, Donoren: Mäuse transgen für humanes ApoE*2 oder ApoE*3 oder ApoE*4). Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 12 Wochen mit cholesterolreicher Diät gefüttert und am Schluss die Aorten sowie das Serum untersucht. Hinsichtlich der Plaque-Entwicklung ließen sich mittels Ölrot O Färbung keine signifikanten Unterschiede feststellen (Abbildung 22), während bei der Untersuchung des Serum-Cholesterols auffallend war, dass bei ApoE -/- Tieren

transgen für humanes E*2 bzw. E*3 signifikant weniger Cholesterol im Serum zu finden war (Abbildung 23).

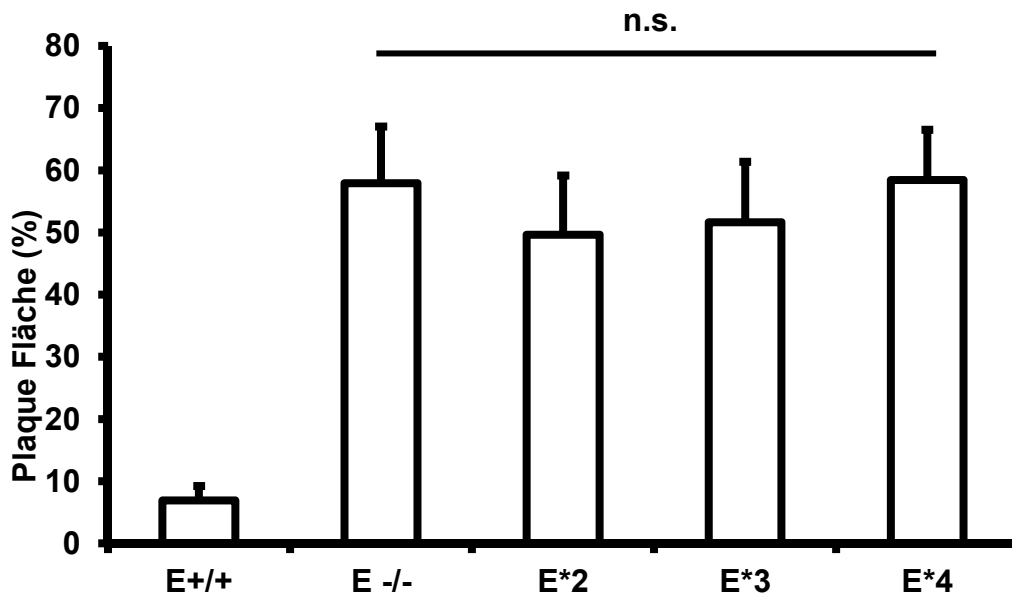


Abbildung 22: Quantifizierung der atherosklerotischen Läsionen in ApoE -/- Tieren transgen für jeweils eine humane ApoE Isoform (Knochenmarkschimären). Die mit 4% PFA perfusionsfixierten Gefäße wurden mittels Ölrot O gefärbt und die Plauefläche mittels AxioVision Software ausgemessen. Es besteht zwischen den transgenen Tieren kein signifikanter Unterschied. Im Diagramm dargestellt sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten +/- Standardabweichung.

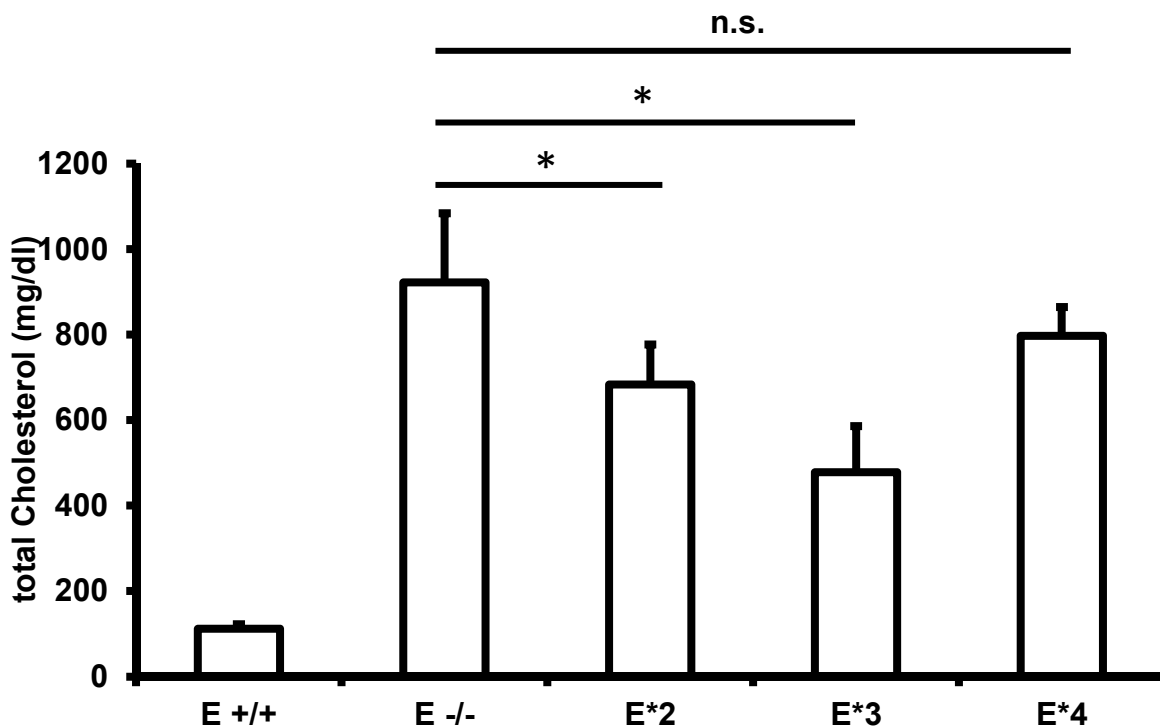


Abbildung 23: Ermittlung der Gesamtcholesterolwerte im Serum der transgenen ApoE knockout Mäuse. Gemessen wurde mittels enzymatischem Assay. Bei Tieren

transgen für humanes ApoE*2 bzw. ApoE*3 liegen die Werte signifikant niedriger als bei ApoE knockout Mäusen ohne Transgen oder bei Mäusen transgen für humanes ApoE*4. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten +/- Standardabweichung

5 Diskussion

Atherosklerose ist die Hauptursache für Morbidität und Mortalität in der westlichen Welt [1].

Die Ursachen für das Entstehen der Atherosklerose sind noch immer nicht restlos aufgeklärt, jedoch ist bekannt, dass Entzündungsgeschehen, bedingt sowohl durch Immunreaktionen der angeborenen sowie der adaptiven Immunabwehr, an der Atherogenese beteiligt sind [5, 6]. Bereits in frühen Stadien der Atherosklerose können in den Plaques Zellen der Immunabwehr, wie zum Beispiel Makrophagen, gefunden werden. Dendritische Zellen finden sich in der sogenannten Schulterregion der Plaques [88, 89].

Als „Dendritische Zellen“ wird eine Familie professionell Antigen-präsentierender Zellen bezeichnet, welche die Fähigkeit besitzen, eine primäre T-Zell-Antwort zu induzieren. Diese Zellfamilie umfasst mehrere Subtypen, die sich durch das Auftreten verschiedener Oberflächenmoleküle voneinander unterscheiden [32, 33].

Auch in dieser Arbeit konnte im Rahmen einer DC-Verteilungsuntersuchung mittels FACS Analyse gezeigt werden, dass DCs verstärkt in Gefäßen atherosklerotischer Mäuse auftreten. Möglicherweise ist dies durch eine verstärkte Rekrutierung der DCs an die atherosklerotischen Läsionen bedingt. Durch die Züchtung einer sogenannten „DC-Reportermaus“ konnte in dieser Arbeit auch das Auftreten sowie die Verteilung der DCs in der Plaque während der Atherogenese bildlich dargestellt werden. Die CD11c positiven DCs akkumulieren im Verlauf des Krankheitsgeschehens, hier bestätigen unsere Daten die bereits vorhandenen Ergebnisse früherer Publikationen [50, 51, 88, 89].

Es wurden in den letzten Jahren widersprüchliche Daten zu DCs in der Atherosklerose publiziert. Hervorgehoben sollen hier zwei Arbeiten aus dem Jahr 2010, welche mit Hilfe des CD11c.DTR Tiermodells und einer Kurzzeitdepletion der DCs genau das Gegenteil voneinander aussagen. Zum einen ist das die Arbeit von Gautier et al. mit dem Ergebnis, dass eine in vivo Expansion von DCs (Bcl-2 Expression unter CD11c Promoter) die Atherosklerose reduziert [55], zum anderen die Arbeit von Paulson et al. mit der Kernaussage „In vivo Kurzzeit-Depletion (CD11c-diphtheria toxin receptor (DTR) Modell) von DCs inhibiert die Atherosklerose“ [56].

Diese Arbeiten stützen sich auf ein Tiermodell, welches es möglich macht, DCs kurzzeitig zu depletieren. Dies geschieht über einen Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR) aus dem Affen, welcher genetisch an die CD11c exprimierenden DCs gekoppelt ist. Mäuse sind resistent gegen das Diphtherietoxin [90]. Alle Zellen, die jedoch durch diese genetische Modifikation den DTR tragen, nehmen über diesen das Toxin auf und gehen bedingt durch die Inaktivierung des Elongationsfaktors 2 in Apoptose [91, 92].

Das Problem bei diesem Modell ist, dass mehr als eine Injektion von DT lethal für die Tiere ist, was höchstwahrscheinlich dadurch begründet ist, dass auch CD11c exprimierende Zellen des Nervensystems durch das Toxin depletiert werden [84, 93].

Das Ziel dieser Arbeit war daher, ein Tiermodell zu etablieren, welches es möglich macht, DCs über einen längeren Zeitraum hinweg zu depletieren und somit deren Rolle in der Atherosklerose studieren zu können. Die Grundlage hierfür stellte die Generierung von Knochenmarks-Chimären (KM-Chimären) dar, wobei ApoE ^{-/-} Mäuse als Rezipienten und CD11c.DTR transgene Mäuse, die zudem GFP an die CD11c positiven DCs gekoppelt haben, als KM-Spender dienten.

Der Transfer des Knochenmarks war erfolgreich, was durch den Nachweis des DTR Transgens mittels PCR im Blut der Rezipiententiere bewiesen werden konnte.

Es wurde anfangs mit einer Dosis von 4ng DT pro Gramm Körpergewicht depletiert – diese Dosis entspricht jener der Publikationen, in welchen DCs kurzzeitig depletiert wurden [84]. Diese Dosis erwies sich jedoch für eine Langzeitdepletion als zu niedrig. Sechs Wochen nach Start der Depletionsphase war mit dieser Dosis keine signifikante Depletion der DCs nachweisbar, was möglicherweise mit Resistenzen zu begründen ist. Eine Dosiserhöhung auf 8ng/g Körpergewicht zweimal wöchentlich erzielte allerdings auch nach sechswöchiger Depletionsphase eine Reduktion der DC-Zahl um circa 80%. Eine Untersuchung auf spezifische Antikörper gegen DT im Serum der KM-Chimären ergab zwar messbare IgG-Spiegel, jedoch in einer solch niedrigen Konzentration, dass diese als nicht neutralisierend angesehen werden konnten. Die gemessenen Konzentrationen entsprechen jener der in der Publikation von Buch et al. gemessenen Werte – in dieser Publikation wurde ein cre-induzierbares DTR-Ablationsmodell zur T-Zelldepletion entwickelt. In derselben Publikation wurde zudem gezeigt, dass diese anti-DT-IgGs nicht neutralisierend wirken [94].

Ein wichtiger Aspekt eines Zelldepletions-Modells ist auch, dass die Depletion spezifisch für den gewünschten Zelltyp ist. Dass dies bei dem im Rahmen dieser Arbeit etablierten Modell der Fall ist, konnte durch eine FACS Analyse auf zellspezifische Oberflächenmarker gezeigt werden. Die FACS Analyse zeigt, dass nicht generell alle CD11c positiven Zellen depletiert werden. Die Zahl der CD11c/CD11b doppelpositive Zellen, als konventionelle DCs bezeichnet, bleibt in diesem Modell nach DT-Behandlung nahezu unverändert. Nur die Zahl der CD11c einzelpositiven Zellen, also der plasmazytoiden DCs, verringert sich signifikant. Diese Beobachtung wurde auch in einer Publikation von Koltsova et al. nach Kurzzeitdepletion mit DT gemacht [95]. Um die Ursache für diesen Effekt zu klären, sind weitere Untersuchungen notwendig, die nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden sollten.

Die Gesamtzahlen von Leukozyten sowie Erythrozyten im Blut der KM-Chimären blieb in unseren Experimenten nach Langzeitbehandlung mit DT unverändert. Bei den Thrombozyten wurde ein leichter Anstieg beobachtet, der jedoch nicht signifikant war. Diese Beobachtung lässt sich damit begründen, dass in der Atherosklerose generell eine erhöhte Thrombozytenzahl gemessen werden kann [96-99]. Diese Beobachtung steht also in keinem direkten kausalen Zusammenhang mit der DC-Depletion.

Die wichtigste Beobachtung dieser Arbeit war, dass die Langzeitdepletion der CD11c einzelpositiven, plasmazytoiden DCs eine signifikant verstärkte Atherosklerose zur Folge hat. Die DT-behandelten Tiere wiesen im Vergleich zu den kontrollbehandelten KM-Chimären eine circa dreimal so große Plauefläche in den Aorten auf und zeigten signifikant veränderte Serumlipid-Parameter. So waren Triglyzeride, LDL und Gesamtcholesterol signifikant erhöht. Bei der äußerlichen Beurteilung der DC-depletierten Tiere fiel auf, dass diese im Vergleich zu den Kontrolltieren fettleibiger sind. Das zeigt, dass plasmazytoide DCs auch eine Rolle im Fettstoffwechsel spielen müssen. Diese These wird unterstützt durch verschiedene Publikationen, welche zeigen, dass DCs eine Rolle in Diabetes mellitus spielen [100-102].

Dass die beobachteten Effekte dieser Arbeit spezifisch durch die DC-Depletion und nicht durch das Toxin selbst verursacht wurden, konnte durch ein Kontrollexperiment gezeigt werden, in welchem ApoE ^{-/-} Mäuse über einen Zeitraum von sechs Wochen mit derselben Dosis DT wie im KM-Chimären Modell zweimal wöchentlich behandelt

wurden. Diese Tiere weisen im Vergleich zu kontrollbehandelten ApoE Mäusen keine verstärkte Atherosklerose auf.

Die Ursache für die verstärkte Atherogenese bei den DT behandelten Chimären könnte sein, dass plasmazytoide DCs Apolipoprotein E (ApoE) sekretieren. Eine Publikation aus dem Jahre 1995 zeigte, dass ein Knochenmarks-Transfer von Wildtyp-KM in ApoE -/- Mäuse diese vor Atherosklerose schützt. Als Grund hierfür wurde, auch in anderen Studien, publiziert, dass Makrophagen aktiv Cholesterolexport betreiben und ApoE sekretieren. Dieses von Makrophagen sezernierte ApoE macht einen Anteil von 20% im Serum aus, es wurden jedoch die Zellen, welche das ApoE sekretieren, bisher nie genauer charakterisiert [74, 103]. Apolipoprotein E stellt den Hauptfaktor im Prozess der Entfernung von cholesterolreichen Chylomikronen sowie „Very Low Density Lipoproteins“ (VLDL) Remnants dar [61, 62].

Eine Kontrolle der Serum-ApoE Werte in den KM-Chimären mittels Western Blot und ELISA zeigte tatsächlich eine signifikante Reduktion des ApoE bei den DC depletierten Tieren. Selbst eine einmalige DT-Behandlung führte zu einem signifikant verminderten ApoE-Gehalt im Serum. Außerdem zeigte eine immunhistochemische Färbung in entstehenden Plaques undepletierter KM-Chimären, das Vorhandensein von ApoE – wahrscheinlich sezerniert von den Wildtyp-Spenderzellen.

Um diese These zu unterstützen, wurden in vitro kultivierte, aus dem Knochenmark von C57Bl/6J Mäusen isolierte, DCs mit acLDL beladen und 24 Stunden später der Kulturüberstand mittels Western Blot auf sekretiertes ApoE untersucht. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die einem künstlichen, „atherosklerotischen“ Milieu ausgesetzten Zellen verstärkt ApoE sekretieren. Eine Analyse der Genexpression dieser Zellen mit Hilfe einer qPCR zeigte eine Hochregulation der für Cholesterolexport verantwortlichen Gene Liver X Receptor (LXR) sowie ATP binding Cassette A1 (ABCA1).

Um den Effekt von ApoE aus DCs noch genauer zu untersuchen, wurden zellspezifische ApoE knockout Mäuse gezüchtet: Zum einen Tiere, welche defizient für ApoE in allen CD11c positiven Zellen sind, zum anderen leberspezifische ApoE knockout Mäuse (defizient für ApoE in allen Albumin exprimierenden Zellen). Verglichen mit CD11c.cre negativen Wurfgeschwistern zeigten die CD11c.cre positiven Tiere tatsächlich eine verstärkte Plaque-Entwicklung, wenngleich der Effekt nicht so stark ist wie bei den Chimären. Dies bestätigt die Daten aus den

Experimenten mit den Knochenmarkschimären. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte durch die Bestrahlung oder die DT-Behandlung bedingt sind. Dass der Effekt bei den Chimären stärker ist, lässt sich erklären durch eine Verschiebung des Auftretens anderer Zelltypen, welche durch die Depletion der CD11c positiven Zellen geschieht. Möglicherweise werden durch die DC Depletion vermehrt andere Zelltypen in die Plaques rekrutiert, die zusätzlich zum Fehlen DC-spezifischen ApoEs atherogen wirken. Dies wäre auch eine Erklärung dafür, warum die Lipidwerte bei den Knochenmarkschimären unter DC Depletion stark verändert sind, nicht jedoch bei den zellspezifischen ApoE knockout Mäusen.

Gleichzeitig zeigen leberspezifische ApoE knockout Tiere zwar verstärkte Plaqueentwicklung, jedoch signifikant weniger als komplette ApoE -/- Mäuse. KM-Chimären sind durch Transfer von WT-KM jedoch komplett vor Atherosklerose geschützt. Es sind weitere Untersuchungen sinnvoll, um aufzuklären, warum die schützenden Effekte in transplantierten Tieren stärker sind.

Im ApoE Gehalt im Serum gleichen sich DT-behandelte Knochenmarkschimären und DC-spezifische ApoE knockout Tiere. In leberspezifischen ApoE knockout Tieren ist der ApoE Gehalt um ca. 25% verringert, was genau dem Anteil an ApoE, das von DCs gebildet wird, entspricht. Im Menschen liegt das Gen für ApoE in 3 unterschiedlichen Isoformen vor, mit unterschiedlichen Auswirkungen auf den Träger. Um zu untersuchen, ob es Unterschiede in der atheroprotektiven Wirkung gibt, wurden Knochenmarkschimären generiert, wobei ApoE -/- Mäuse mit KM von Mäusen die transgen für jeweils eine humane ApoE Isoform sind. Diese Mäuse zeigten jedoch nach Abschluss der 6-wöchigen cholesterolreichen Diät allesamt starke Atherosklerose. Lediglich bei den Lipidwerten gab es Unterschiede. Dabei haben die Tiere, welche mit ApoE*3 transplantiert wurden, die niedrigsten Cholesterolverte, diejenigen welche KM von ApoE*4 transgenen Mäusen erhalten haben, zeigen die höchsten Cholesterolverte. Auch beim Menschen ist ApoE*4 mit Atherosklerose assoziiert [61].

In einer Publikation von Van Eck et al. wurden bereits ApoE -/- Tiere mit Knochenmark von ApoE*2 transgenen Mäusen transplantiert. Auch diese Tiere zeigten atherosklerotische Läsionen. In dieser Publikation wurde gezeigt, dass sich die Lipidwerte bei den Tieren, welche mit humanem ApoE*2 KM transplantiert wurden, initial besserten, nach 4 Wochen aber wieder langsam verschlechterten [103].

Humanes ApoE jeder Isoform scheint in Mäusen nicht dieselbe atheroprotektive Wirkung zu erzielen wie murines ApoE.

Bisher wurde publiziert, dass von Makrophagen sekretiertes ApoE Mäuse vor Atherosklerose schützt [74] – diese Aussage stützt sich auf KM-Transplantationsexperimente, wobei niemals genauer untersucht wurde, welche KM Zellen es genau sind, die das ApoE sekretieren und die Tiere schützen. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Aussage zu, dass plasmazytoide DCs ApoE sekretieren und damit, vermutlich über Cholesterolexport, atheroprotektiv wirken.

Die Resultate und Schlussfolgerungen dieser Arbeit führen zu weiteren Fragen.

Um zu evaluieren, ob DCs nur in einem speziellen Stadium der Atherosklerose ihre protektive Wirkung entfalten, sollten weitere Experimente durchgeführt werden, wobei die Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Atherogenese depletiert werden. Außerdem wäre es interessant, das Experiment in die „umgekehrte“ Richtung durchzuführen, das heißt, zu analysieren, ob es zu einer Besserung der Atherosklerose, beziehungsweise einer Verringerung der Plaqueflächen in den Gefäßen kommt, wenn man atherosklerotische ApoE -/- Mäuse mit plasmazytoiden (Wildtyp-)DCs supplementiert.

Von klinischer Relevanz sind die erzielten Daten, weil sie fundamentale Hinweise darauf geben, dass durch Expansion plasmazytoider DCs eine Abschwächung der Atherogenese erzielt werden könnte.

6 Zusammenfassung

Atherosklerose ist nach wie vor die Haupttodesursache in den entwickelten Ländern. Es ist mittlerweile bekannt, dass es sich hierbei um eine entzündliche Erkrankung handelt, bei der verschiedene Immunzellen zur Atherogenese beitragen.

Bisher wurde gezeigt, dass T-Zell-Wechselwirkungen mit Antigen-präsentierenden Zellen (APC) zu einer chronischen Entzündung bei Atherosklerose beitragen. Die genauen Mechanismen, wie APC die Atheroprogression modulieren, sind jedoch unvollständig charakterisiert.

Mit Hilfe einer LacZ-Reportermaus konnten wir zeigen, dass CD11c-positive Zellen im Aortenbogen von ApoE ^{-/-} Mäusen unter cholesterolreicher Diät angereichert werden. Die systemische Langzeitdepletion von CD11c-positiven Zellen nach Transfer von Knochenmark von CD11c-GFP-Diphtherie Toxin Rezeptor (CD11c-DTR) -Mäusen in ApoE ^{-/-} Mäuse durch Injektion von Diphtherietoxin führte zu einer signifikant erhöhten Plaquebildung in der Aorta, wie durch Ölrot O Färbung gezeigt wurde, während die Behandlung mit Diphtherietoxin ohne Knochenmarkstransfer keinen Einfluss auf die Plaquebildung hatte.

Interessanterweise haben wir bei Stimulation mit acetyliertem LDL (acLDL) erhöhte Mengen an ApoE im Überstand von aus dem Knochenmark stammenden dendritischen Zellen (DCs) gemessen. Außerdem haben wir verringerte ApoE-Serumspiegel in mit CD11c-DTR-Knochenmark rekonstituierten ApoE ^{-/-} Mäusen beobachtet nach Depletion von CD11c-positiven Zellen im Vergleich zu Kontroll-behandelten Tieren.

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass CD11c - positive Zellen die Atherosklerose in ApoE ^{-/-} Mäusen möglicherweise durch die Sekretion von ApoE mindern.

7 Summary

Atherosclerosis still is the major cause of death in developed countries. It is considered to be an inflammatory disease with different immune cells contributing to atherogenesis.

Previously, it has been demonstrated that T-cell interactions with antigen presenting cells (APC) contribute to chronic inflammation in atherosclerosis. The exact mechanisms, how APC modulate atheroprogession, however, are incompletely characterized.

Using a LacZ reporter mouse, we observed that CD11c positive cells are enriched in the aortic arch of ApoE ^{-/-} mice fed a high cholesterol diet. Systemic long term depletion of CD11c positive cells after transfer of bone marrow of CD11c-GFP-diphtheria toxin receptor (CD11c-DTR) mice into ApoE ^{-/-} mice by injection of diphtheria toxin resulted in significantly increased plaque formation in the aorta as demonstrated by oil red staining, whereas diphtheria toxin treatment without bone marrow transfer had no effect on plaque formation. Interestingly, we measured increased amounts of ApoE in the supernatant of bone marrow derived dendritic cells (DCs) upon stimulation with acetylated LDL (acLDL), and we observed reduced serum levels of ApoE in ApoE ^{-/-} mice reconstituted with CD11c-DTR bone marrow after depletion of CD11c positive cells compared to control treated animals.

In conclusion, CD11c positive cells ameliorate atherosclerosis in ApoE ^{-/-} mice potentially by the secretion of ApoE.

8 Literaturverzeichnis

1. Mathers, C.D., T. Boerma, and D. Ma Fat, *Global and regional causes of death*. Br Med Bull, 2009. **92**: p. 7-32.
2. Murray, C.J. and A.D. Lopez, *Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study*. Lancet, 1997. **349**(9063): p. 1436-42.
3. Herrington, W., et al., *Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease*. Circ Res, 2016. **118**(4): p. 535-46.
4. Organisation, W.H., *Classification of atherosclerotic lesions. Report of a study group*, in *World Health Organ Tech Rep Ser*. 1958. p. 1-20
5. Galkina, E. and K. Ley, *Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*)*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 165-97.
6. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(9): p. 2045-51.
7. Chobanian, A.V., et al., *Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. Hypertension*, 2003. **42**(6): p. 1206-1252.
8. Howard, G., et al., *Cigarette smoking and progression of atherosclerosis: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study*. JAMA, 1998. **279**(2): p. 119-24.
9. Meigs, J.B., et al., *Coronary artery calcification in type 2 diabetes and insulin resistance: the framingham offspring study*. Diabetes Care, 2002. **25**(8): p. 1313-9.
10. Graham, G., et al., *Impact of coronary artery calcification on all-cause mortality in individuals with and without hypertension*. Atherosclerosis, 2012. **225**(2): p. 432-7.
11. Talayero, B.G. and F.M. Sacks, *The role of triglycerides in atherosclerosis*. Curr Cardiol Rep, 2011. **13**(6): p. 544-52.
12. Yusuf, S., et al., *Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study*. Lancet, 2004. **364**(9438): p. 937-52.
13. Herder, M., et al., *Risk factors for progression of carotid intima-media thickness and total plaque area: a 13-year follow-up study: the Tromso Study*. Stroke, 2012. **43**(7): p. 1818-23.
14. Strong, J.P., et al., *Prevalence and extent of atherosclerosis in adolescents and young adults: implications for prevention from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth Study*. JAMA, 1999. **281**(8): p. 727-35.
15. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature, 1993. **362**(6423): p. 801-9.
16. McGill, H.C., Jr., et al., *Association of Coronary Heart Disease Risk Factors with microscopic qualities of coronary atherosclerosis in youth*. Circulation, 2000. **102**(4): p. 374-9.
17. van Dijk, R.A., et al., *The natural history of aortic atherosclerosis: a systematic histopathological evaluation of the peri-renal region*. Atherosclerosis, 2010. **210**(1): p. 100-6.

18. Jonasson, L., et al., *Expression of class II transplantation antigen on vascular smooth muscle cells in human atherosclerosis*. J Clin Invest, 1985. **76**(1): p. 125-31.
19. Cai, H. and D.G. Harrison, *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress*. Circ Res, 2000. **87**(10): p. 840-4.
20. Glass, C.K. and J.L. Witztum, *Atherosclerosis. the road ahead*. Cell, 2001. **104**(4): p. 503-16.
21. Steinberg, D., *Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance*. J Biol Chem, 1997. **272**(34): p. 20963-6.
22. Stellos, K., et al., *Binding of oxidized low-density lipoprotein on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndromes and induces platelet adhesion to vascular wall in vivo--brief report*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(8): p. 2017-20.
23. Cybulsky, M.I. and M.A. Gimbrone, Jr., *Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis*. Science, 1991. **251**(4995): p. 788-91.
24. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
25. Galis, Z.S., et al., *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques*. J Clin Invest, 1994. **94**(6): p. 2493-503.
26. Falk, E., P.K. Shah, and V. Fuster, *Coronary plaque disruption*. Circulation, 1995. **92**(3): p. 657-71.
27. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
28. Bobryshev, Y.V., *Dendritic cells in atherosclerosis: current status of the problem and clinical relevance*. Eur Heart J, 2005. **26**(17): p. 1700-4.
29. Steinman, R.M., *Linking innate to adaptive immunity through dendritic cells*. Novartis Found Symp, 2006. **279**: p. 101-9; discussion 109-13, 216-9.
30. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. J Exp Med, 1973. **137**(5): p. 1142-62.
31. Geissmann, F., et al., *Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells*. Science, 2010. **327**(5966): p. 656-61.
32. Sorg, R.V., G. Kogler, and P. Wernet, *Identification of cord blood dendritic cells as an immature CD11c- population*. Blood, 1999. **93**(7): p. 2302-7.
33. Prechtel, A.T. and A. Steinkasserer, *CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells*. Arch Dermatol Res, 2007. **299**(2): p. 59-69.
34. Kubin, M., M. Kamoun, and G. Trinchieri, *Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells*. J Exp Med, 1994. **180**(1): p. 211-22.
35. Chistiakov, D.A., et al., *Dendritic cells in atherosclerotic inflammation: the complexity of functions and the peculiarities of pathophysiological effects*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 196.
36. Prechtel, A.T., et al., *CD83 knockdown in monocyte-derived dendritic cells by small interfering RNA leads to a diminished T cell stimulation*. J Immunol, 2007. **178**(9): p. 5454-64.
37. Villadangos, J.A. and L. Young, *Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells*. Immunity, 2008. **29**(3): p. 352-61.

38. Shortman, K. and S.H. Naik, *Steady-state and inflammatory dendritic-cell development*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(1): p. 19-30.
39. Naik, S.H., *Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little*. Immunol Cell Biol, 2008. **86**(5): p. 439-52.
40. Miloud, T., G.J. Hammerling, and N. Garbi, *Review of murine dendritic cells: types, location, and development*. Methods Mol Biol, 2010. **595**: p. 21-42.
41. Manthey, H.D. and A. Zerneck, *Dendritic cells in atherosclerosis: functions in immune regulation and beyond*. Thromb Haemost, 2011. **106**(5): p. 772-8.
42. Choi, J.H., et al., *Flt3 signaling-dependent dendritic cells protect against atherosclerosis*. Immunity, 2011. **35**(5): p. 819-31.
43. Hansson, G.K., *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. N Engl J Med, 2005. **352**(16): p. 1685-95.
44. Bobryshev, Y.V., *Dendritic cells and their role in atherogenesis*. Lab Invest, 2010. **90**(7): p. 970-84.
45. Lahoute, C., et al., *Adaptive immunity in atherosclerosis: mechanisms and future therapeutic targets*. Nat Rev Cardiol, 2011. **8**(6): p. 348-58.
46. Perrins, C.J. and Y.V. Bobryshev, *Current advances in understanding of immunopathology of atherosclerosis*. Virchows Arch, 2011. **458**(2): p. 117-23.
47. Weber, C., A. Zerneck, and P. Libby, *The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(10): p. 802-15.
48. Langer, H.F., et al., *Platelets recruit human dendritic cells via Mac-1/JAM-C interaction and modulate dendritic cell function in vitro*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(6): p. 1463-70.
49. Gawaz, M., K. Stellos, and H.F. Langer, *Platelets modulate atherogenesis and progression of atherosclerotic plaques via interaction with progenitor and dendritic cells*. J Thromb Haemost, 2008. **6**(2): p. 235-42.
50. Yilmaz, A., et al., *Emergence of dendritic cells in rupture-prone regions of vulnerable carotid plaques*. Atherosclerosis, 2004. **176**(1): p. 101-10.
51. Yilmaz, A., et al., *HMG-CoA reductase inhibitors suppress maturation of human dendritic cells: new implications for atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2004. **172**(1): p. 85-93.
52. Erbel, C., et al., *Functional profile of activated dendritic cells in unstable atherosclerotic plaque*. Basic Res Cardiol, 2007. **102**(2): p. 123-32.
53. Doherty, T.M., E.A. Fisher, and M. Arditi, *TLR signaling and trapped vascular dendritic cells in the development of atherosclerosis*. Trends Immunol, 2006. **27**(5): p. 222-7.
54. Llodra, J., et al., *Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(32): p. 11779-84.
55. Gautier, E.L., et al., *Conventional dendritic cells at the crossroads between immunity and cholesterol homeostasis in atherosclerosis*. Circulation, 2009. **119**(17): p. 2367-75.
56. Paulson, K.E., et al., *Resident intimal dendritic cells accumulate lipid and contribute to the initiation of atherosclerosis*. Circ Res, 2010. **106**(2): p. 383-90.
57. Gil-Pulido, J. and A. Zerneck, *Antigen-presenting dendritic cells in atherosclerosis*. Eur J Pharmacol, 2017. **816**: p. 25-31.
58. Gofman, J.W., et al., *Blood lipids and human atherosclerosis*. Circulation, 1950. **2**(2): p. 161-78.

59. Gofman, J.W., *Blood lipoproteins and atherosclerosis*. J Clin Invest, 1950. **29**(6): p. 815-6.
60. Gofman, J.W. and F. Lindgren, *The role of lipids and lipoproteins in atherosclerosis*. Science, 1950. **111**(2877): p. 166-71.
61. Mahley, R.W., *Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology*. Science, 1988. **240**(4852): p. 622-30.
62. Ji, Z.S., et al., *Role of heparan sulfate proteoglycans in the binding and uptake of apolipoprotein E-enriched remnant lipoproteins by cultured cells*. J Biol Chem, 1993. **268**(14): p. 10160-7.
63. Singh, P.P., M. Singh, and S.S. Mastana, *APOE distribution in world populations with new data from India and the UK*. Ann Hum Biol, 2006. **33**(3): p. 279-308.
64. Eisenberg, D.T., C.W. Kuzawa, and M.G. Hayes, *Worldwide allele frequencies of the human apolipoprotein E gene: climate, local adaptations, and evolutionary history*. Am J Phys Anthropol, 2010. **143**(1): p. 100-11.
65. Chawla, A., et al., *A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis*. Mol Cell, 2001. **7**(1): p. 161-71.
66. Ghebranious, N., et al., *Detection of ApoE E2, E3 and E4 alleles using MALDI-TOF mass spectrometry and the homogeneous mass-extend technology*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(17): p. e149.
67. Zuo, L., et al., *Variation at APOE and STH loci and Alzheimer's disease*. Behav Brain Funct, 2006. **2**: p. 13.
68. Breslow, J.L., et al., *Studies of familial type III hyperlipoproteinemia using as a genetic marker the apoE phenotype E2/2*. J Lipid Res, 1982. **23**(8): p. 1224-35.
69. Corder, E.H., et al., *Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families*. Science, 1993. **261**(5123): p. 921-3.
70. Farlow, M.R., et al., *Impact of APOE in mild cognitive impairment*. Neurology, 2004. **63**(10): p. 1898-901.
71. Kraft, H.G., et al., *Changes of genetic apolipoprotein phenotypes caused by liver transplantation. Implications for apolipoprotein synthesis*. J Clin Invest, 1989. **83**(1): p. 137-42.
72. Linton, M.F., et al., *Phenotypes of apolipoprotein B and apolipoprotein E after liver transplantation*. J Clin Invest, 1991. **88**(1): p. 270-81.
73. Lin, C.T., et al., *Immunoreactive apolipoprotein E is a widely distributed cellular protein. Immunohistochemical localization of apolipoprotein E in baboon tissues*. J Clin Invest, 1986. **78**(4): p. 947-58.
74. Linton, M.F., J.B. Atkinson, and S. Fazio, *Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation*. Science, 1995. **267**(5200): p. 1034-7.
75. Boisvert, W.A., J. Spangenberg, and L.K. Curtiss, *Treatment of severe hypercholesterolemia in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation*. J Clin Invest, 1995. **96**(2): p. 1118-24.
76. Shi, W., et al., *Atherosclerosis in C3H/HeJ mice reconstituted with apolipoprotein E-null bone marrow*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(4): p. 650-5.

77. Shi, W., et al., *Effect of macrophage-derived apolipoprotein E on hyperlipidemia and atherosclerosis of LDLR-deficient mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **317**(1): p. 223-9.
78. Fazio, S., et al., *Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4647-52.
79. Boisvert, W.A. and L.K. Curtiss, *Elimination of macrophage-specific apolipoprotein E reduces diet-induced atherosclerosis in C57BL/6J male mice*. J Lipid Res, 1999. **40**(5): p. 806-13.
80. Gaudreault, N., et al., *Macrophage-specific apoE gene repair reduces diet-induced hyperlipidemia and atherosclerosis in hypomorphic Apoe mice*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e35816.
81. Murphy, J.R., *Corynebacterium Diphtheriae*, in *Medical Microbiology*, th and S. Baron, Editors. 1996: Galveston (TX).
82. Choe, S., et al., *The crystal structure of diphtheria toxin*. Nature, 1992. **357**(6375): p. 216-22.
83. Chang, T. and D.M. Neville, Jr., *Demonstration of diphtheria toxin receptors on surface membranes from both toxin-sensitive and toxin-resistant species*. J Biol Chem, 1978. **253**(19): p. 6866-71.
84. Jung, S., et al., *In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens*. Immunity, 2002. **17**(2): p. 211-20.
85. Valet, G., *Past and present concepts in flow cytometry: a European perspective*. J Biol Regul Homeost Agents, 2003. **17**(3): p. 213-22.
86. Gornall, A.G., C.J. Bardawill, and M.M. David, *Determination of serum proteins by means of the biuret reaction*. J Biol Chem, 1949. **177**(2): p. 751-66.
87. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
88. Bobryshev, Y.V. and R.S. Lord, *Ultrastructural recognition of cells with dendritic cell morphology in human aortic intima. Contacting interactions of Vascular Dendritic Cells in athero-resistant and athero-prone areas of the normal aorta*. Arch Histol Cytol, 1995. **58**(3): p. 307-22.
89. Bobryshev, Y.V. and R.S. Lord, *S-100 positive cells in human arterial intima and in atherosclerotic lesions*. Cardiovasc Res, 1995. **29**(5): p. 689-96.
90. Cha, J.H., J.S. Brooke, and L. Eidels, *Toxin binding site of the diphtheria toxin receptor: loss and gain of diphtheria toxin binding of monkey and mouse heparin-binding, epidermal growth factor-like growth factor precursors by reciprocal site-directed mutagenesis*. Mol Microbiol, 1998. **29**(5): p. 1275-84.
91. Middlebrook, J.L. and R.B. Dorland, *Response of cultured mammalian cells to the exotoxins of Pseudomonas aeruginosa and Corynebacterium diphtheriae: differential cytotoxicity*. Can J Microbiol, 1977. **23**(2): p. 183-9.
92. Middlebrook, J.L., R.B. Dorland, and S.H. Leppla, *Association of diphtheria toxin with Vero cells. Demonstration of a receptor*. J Biol Chem, 1978. **253**(20): p. 7325-30.
93. Probst, H.C., et al., *Histological analysis of CD11c-DTR/GFP mice after in vivo depletion of dendritic cells*. Clin Exp Immunol, 2005. **141**(3): p. 398-404.
94. Buch, T., et al., *A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration*. Nat Methods, 2005. **2**(6): p. 419-26.

95. Koltsova, E.K., et al., *Dynamic T cell-APC interactions sustain chronic inflammation in atherosclerosis*. J Clin Invest, 2012. **122**(9): p. 3114-26.
96. Ranjith, M.P., et al., *Significance of platelet volume indices and platelet count in ischaemic heart disease*. J Clin Pathol, 2009. **62**(9): p. 830-3.
97. Keatinge, W.R., et al., *Increased platelet and red cell counts, blood viscosity, and plasma cholesterol levels during heat stress, and mortality from coronary and cerebral thrombosis*. Am J Med, 1986. **81**(5): p. 795-800.
98. Slavka, G., et al., *Mean platelet volume may represent a predictive parameter for overall vascular mortality and ischemic heart disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(5): p. 1215-8.
99. Murat, S.N., et al., *Relation between mean platelet volume and severity of atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes*. Angiology, 2013. **64**(2): p. 131-6.
100. Jansen, A., M. van Hagen, and H.A. Drexhage, *Defective maturation and function of antigen-presenting cells in type 1 diabetes*. Lancet, 1995. **345**(8948): p. 491-2.
101. Price, J.D., et al., *DCIR2+ cDC2 DCs and Zbtb32 Restore CD4+ T-Cell Tolerance and Inhibit Diabetes*. Diabetes, 2015. **64**(10): p. 3521-31.
102. Beumer, W., et al., *The gene expression profile of CD11c+ CD8alpha-dendritic cells in the pre-diabetic pancreas of the NOD mouse*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e103404.
103. Van Eck, M., et al., *Effect of macrophage-derived mouse ApoE, human ApoE3-Leiden, and human ApoE2 (Arg158-->Cys) on cholesterol levels and atherosclerosis in ApoE-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(1): p. 119-27.

9 Anhang

9.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Geräte	13
Tabelle 2: verwendete Verbrauchsmaterialien	14
Tabelle 3: verwendete Reagenzien	14
Tabelle 4: verwendete Puffer und deren Zusammensetzung	15
Tabelle 5: verwendete Medien und deren Zusammensetzung	16
Tabelle 6: verwendete Primer und deren Sequenzen	22
Tabelle 7: Master-Mixe für PCRs	23
Tabelle 8: Temperaturprogramm 1 für PCRs	23
Tabelle 9: PCR Temperaturprogramme für ApoE floxed und Alb.cre.....	23
Tabelle 10: Rezeptur der verwendeten Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE....	28

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Visualisierung atherosklerotischer Plaques in murinen Aorten	5
Abbildung 2: FACS Analyse dendritischer Zellen (CD11c und MHC-II) in Blut und Aorten von atherosklerotischen ApoE -/- Mäusen.....	36
Abbildung 3: Generierung einer CD11c-Reportermaus.....	37
Abbildung 4: Nachweis der CD11c positiven Zellen mittels X-Gal-Färbung in Plaques der Reportermause	38
Abbildung 5: Quantifizierung der blau gefärbten CD11c positiven Zellen in den Plaques der Reportermause.	39
Abbildung 6: Nachweis des erfolgreichen KM-Transfers mittels PCR.....	40
Abbildung 7: Dosisermittlung von DT für eine erfolgreiche Langzeitdepletion.....	41
Abbildung 8: Evaluierung der DC-Depletionseffizienz.	42
Abbildung 9: Evaluierung der depletierten DC-Subsets.	43
Abbildung 10: Vollblut-Analyse der KM-Chimären nach 6 Wochen Fütterung und Depletion mittels Sysmex auf weiße Blutzellen (WBC), Erythrozyten (RBC) und Thrombozyten (TZ).....	44
Abbildung 11: ELISA im Serum der langzeitdepletierten KM-Chimären.....	45
Abbildung 12: Quantifizierung der atherosklerotischen Läsionen in den langzeitdepletierten KM-Chimären.	46
Abbildung 13: Ermittlung der Lipidparameter im Serum der langzeitbehandelten KM-Chimären.....	47
Abbildung 14: Quantifizierung des ApoE Gehaltes im Serum der KM-Chimären mittels Western Blot und ELISA.	48
Abbildung 15:	50

Abbildung 16: Nachweis von CD11c und ApoE in der entstehenden Plaque an Herzen von undepletierten KM-Chimären mittels IHC.....	51
Abbildung 17: Quantifizierung des ApoE Gehaltes im Überstand kultivierter Knochenmarks-DCs mittels Western Blot.	52
Abbildung 18: Analyse der Genexpression verschiedener für den Cholesterolexport wichtiger Gene in acLDL beladenen Knochenmarks-DCs aus WT Mäusen und LXR -/- Mäusen	53
Abbildung 19: Ölrot O Färbung und Quantifizierung der atherosklerotischen Läsionen der entnommenen Aorten von cholesteroreich gefütterten CD11c.cre ApoE fl/fl und Alb.cre ApoE fl/fl Mäusen.....	54
Abbildung 20: Ermittlung der Gesamtcholesterolverte im Serum der zellspezifischen ApoE knockout Mäuse.	55
Abbildung 21: Quantifizierung von ApoE im Serum der zellspezifischen ApoE knockout Mäuse.	56
Abbildung 22: Quantifizierung der atherosklerotischen Läsionen in ApoE -/- Tieren transgen für jeweils eine humane ApoE Isoform (Knochenmarkschimären).	57
Abbildung 23: Ermittlung der Gesamtcholesterolverte im Serum der transgenen ApoE knockout Mäuse.	57

9.3 Abkürzungsverzeichnis

ACD	Acid-Citrate-Dextrose
Alb	Albumin
ApoE	Apolipoprotein E
APS	Ammoniumpersulfate
AS	Atherosklerose
BCA	bicinchroninic acid
BSA	Rinderserumalbumin (Bovines Serum Albumin)
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of differentiation
cDC	klassische/konventionelle DCs
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DCs	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
D-PBS	Dulbecco´s phosphate buffered saline
DT	Diphtherietoxin
DTR	Diphtherietoxin Rezeptor
EDTA	Ethylendiaminteraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtOH	Ethanol
FACS	fluorescence activated cell sorting
g	Gramm
GFP	green fluorescent protein
GMCSF	granulocyte macrophage colony stimulationg factor
h	Stunde
HDL	high density Lipoprotein
HSP	Heparansulfat-Proteoglykan
IgG	Immunglobulin G
iNOS	inducible nitric oxide synthase
i.p.	intraperitoneal
kD	Kilodalton
KM	Knochenmark
Ktrl	Kontrolle

I	Liter
LDL	low density lipoprotein
LDLR	LDL Rezeptor
LRP	Lipoprotein receptor related protein
LXR	liver x receptor
M	Molar
mg	Milligramm
MHC-II	major histocompatibility complex II
ml	Milliliter
Min	Minute
μ M	Micrometer
mM	Millimolar
Mu	Murin
NK	natürliche Killerzellen
nM	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
oxLDL	oxidiertes LDL
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat buffered saline
PBST	Phosphat buffered saline Tween
PCR	Polymerase chain reaction
pDCs	plasmazytoide DCs
PFA	Paraformaldehyd
PPAR- γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin

TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Tween20	Polyoxyethylen-sorbitanmonolaureat
U	Units
V	Volumen
v/v	Volumen/Volumen (volume per volume)
VCAM-1	Vascular cell adhesion protein 1
VLDL	very low density lipoprotein
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp
w/v	Masse/Volumen (weight per volume)
x-GAL	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

9.4 Erklärung zum Eigenanteil

Erklärung gemäß § Absatz der Promotionsordnung zum Dr. rer. nat. der Universität Tübingen

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Lübeck, den 31.01.2019

Manuela Sauter

9.5 Danksagung

Vorrangig möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Harald Langer, danken für die Überlassung des spannenden Themas, die wissenschaftlichen Anregungen und Diskussionen sowie das fortwährende Interesse an und Vertrauen in meine(r) Arbeit. Durch seine positive Denkweise hat er stets dazu beigetragen, die Motivation nicht zu verlieren.

Herrn Prof. Robert Feil danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die gute Zusammenarbeit sowie die wertvollen Tipps.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei den Mitgliedern der „AG Langer“, speziell unserer MTA aka „Mädchen für Alles“ Sarah Gekeler. Ohne sie und ihre Hilfe wäre diese Arbeit nie fertig geworden. Besonders erwähnt sollen auch Rebecca Schleicher, Frederic Emschermann und Marcus Olbrich sein, die im Laufe der Jahre zu sehr guten Freunden geworden sind. Wir waren ein tolles Team.

Bei Dr. Tanja Schönberger möchte ich mich bedanken für das geduldige Einlernen in die Operationsmethoden am Tier und die stetige Hilfe.

Herrn Prof. Gawaz danke ich für die Zurverfügungstellung der Laborräumlichkeiten.

Ich danke von Herzen meinen Eltern, die mir die Möglichkeit gegeben haben, meinen eigenen Weg völlig selbstbestimmt zu gehen, meine eigenen Entscheidungen zu treffen (auch wenn manche davon nicht ganz nachvollziehbar waren) und nie versucht haben, mich in eine bestimmte Richtung zu drängen.

In der „AG Langer“ durfte ich 2010 meinen Ehemann Reinhard Sauter kennenlernen. Bei ihm möchte ich mich ganz herzlich für die unermüdliche Unterstützung beruflich sowie privat bedanken, für die wertvollen fachlichen Diskussionen und natürlich für die geduldige Unterstützung und Betreuung unserer Kinder während der Schreibphase.

9.6 Lebenslauf

9.7 Publikationen

1: Reinhard J. Sauter; **Manuela Sauter**; Marcus Obrich; Frederic N. Emschermann; Henry Nording; Johannes Patzelt; Hans Peter Wendel; Jan-Christian Reil, Frank Edlich, PhD; Harald F. Langer, MD. Anaphylatoxin Receptor C3aR contributes to platelet function, thrombus formation and in vivo haemostasis. *Thromb Haemost.* 2019 Jan;119(1):179-182. doi: 10.1055/s-0038-1676349. Epub 2018 Dec 31.

2: Mueller KAL, Patzelt J, **Sauter M**, Maier P, Gekeler S, Klingel K, Kandolf R, Seizer P, Gawaz M, Geisler T, Langer HF. Myocardial expression of the anaphylatoxin receptor C3aR is associated with cardiac inflammation and prognosis in patients with non-ischaemic heart failure. *ESC Heart Fail.* 2018 Oct;5(5):846-857. doi: 10.1002/ehf2.12298. Epub 2018 Aug 31. PubMed PMID:30168657; PubMed Central PMCID: PMC6165948.

3: Sauter RJ, **Sauter M**, Reis ES, Emschermann FN, Nording H, Ebenhöch S, Kraft P, Münzer P, Mauler M, Rheinlaender J, Madlung J, Edlich F, Schäffer TE, Meuth SG, Dürschmied D, Geisler T, Borst O, Gawaz M, Kleinschnitz C, Lambris JD, Langer HF. Functional Relevance of the Anaphylatoxin Receptor C3aR for Platelet Function and Arterial Thrombus Formation Marks an Intersection Point Between Innate Immunity and Thrombosis. *Circulation.* 2018 Oct 16;138(16):1720-1735. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034600. PubMed PMID: 29802205; PubMed Central PMCID: PMC6202244.

4: Müller I, Schönberger T, Schneider M, Borst O, Ziegler M, Seizer P, Leder C, Müller K, Lang M, Appenzeller F, Lunov O, Büchele B, **Fahrleitner M**, Olbrich M, Langer H, Geisler T, Lang F, Chatterjee M, de Boer JF, Tietge UJ, Bernhagen J, Simmet T, Gawaz M. Gremlin-1 is an inhibitor of macrophage migration inhibitory factor and attenuates atherosclerotic plaque growth in ApoE^{-/-} Mice. *J Biol Chem.* 2013 Nov 1;288(44):31635-45. doi: 10.1074/jbc.M113.477745. Epub 2013 Sep 3. PubMed PMID: 24003215; PubMed Central PMCID: PMC3814759.

5: Janssen MC, van Engelen B, Kapusta L, Lammens M, van Dijk M, Fischer J, van der Graaf M, Wevers RA, **Fahrleitner M**, Zimmermann R, Morava E. Symptomatic

lipid storage in carriers for the PNPLA2 gene. *Eur J Hum Genet.* 2013 Aug;21(8):807-15. doi: 10.1038/ejhg.2012.256. Epub 2012 Dec 12. Erratum in: *Eur J Hum Genet.* 2013 Aug;21(8):892. PubMed PMID: 23232698; PubMed Central PMCID: PMC3722672.

6: Stellos K, Sauter R, **Fahrleitner M**, Grimm J, Stakos D, Emschermann F, Panagiota V, Gnerlich S, Perk A, Schönberger T, Bigalke B, Langer HF, Gawaz M. Binding of oxidized low-density lipoprotein on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndromes and induces platelet adhesion to vascular wall in vivo--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Aug;32(8):2017-20. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.244707. Epub 2012 Jun 14. PubMed PMID: 22701021.

7: Lonsdorf AS, Krämer BF, **Fahrleitner M**, Schönberger T, Gnerlich S, Ring S, Gehring S, Schneider SW, Kruhlak MJ, Meuth SG, Nieswandt B, Gawaz M, Enk AH, Langer HF. Engagement of $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (GPIIb/IIIa) with $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrin mediates interaction of melanoma cells with platelets: a connection to hematogenous metastasis. *J Biol Chem.* 2012 Jan 13;287(3):2168-78. doi: 10.1074/jbc.M111.269811. Epub 2011 Nov 18. PubMed PMID: 22102277; PubMed Central PMCID: PMC3265895.

8: Langer HF, Orlova VV, Xie C, Kaul S, Schneider D, Lonsdorf AS, **Fahrleitner M**, Choi EY, Dutoit V, Pellegrini M, Grossklaus S, Nawroth PP, Baretton G, Santoso S, Hwang ST, Arnold B, Chavakis T. A novel function of junctional adhesion molecule-C in mediating melanoma cell metastasis. *Cancer Res.* 2011 Jun 15;71(12):4096-105. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2794. Epub 2011 May 18. PubMed PMID: 21593193; PubMed Central PMCID: PMC3117056.

9.8 Kongressbeiträge

M. Fahrleitner. Evaluation of cell-specific inflammatory mechanisms in the pathogenesis of Atherosclerosis. Vortrag, CardioWIND Meeting, Gastschloß Haigerloch, 10. März 2012.

R. Sauter, **M. Fahrleitner**, B. Krämer, R. Schleicher, M. Gawaz, H.-F. Langer. Complement receptor C3aR modulates platelet function - intersection between innate immunity and hemostasis. Vortrag, Young Investigator Award, experimentell, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, 2012.

Manuela Fahrleitner, Johannes Patzelt, Tanja Schönberger, Reinhard Sauter, Sarah Gekeler, Peter Seizer, Meinrad P. Gawaz, Andreas E. May and Harald F. Langer. Evaluation of cell-specific inflammatory mechanisms in the pathogenesis of Atherosclerosis. Vortrag, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, 2012.

M. Fahrleitner. Role of dendritic cells (DCs) in atherosclerosis. Vortrag, CardioWIND Meeting, Gastschloß Haigerloch, 02. März 2013

R. J. Sauter, **M. Fahrleitner**, R. Schleicher, B. Krämer, O. Borst, M. Gawaz, P. Kraft, C. Kleinschnitz, J. D. Lambris, H.-F. Langer. Anaphylatoxinreceptor C3aR on platelets contributes to arterial thrombosis - intersection between innate immunity and thrombosis. Clin Res Cardiol 102, Suppl 1, April 2013. Vortrag, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, 2013.

M. Sauter, R. J. Sauter, R. Schleicher, B. Kraemer, O. Borst, M. Gawaz, P. Kraft, C. Kleinschnitz, J.D. Lambris, H.F. Langer. Anaphylatoxinreceptor C3aR on platelets contributes to arterial thrombosis – intersection between innate immunity and thrombosis. Vortrag. 7th International Conference on Complement Therapeutics, Olympia, Greece. 2014

M. Sauter. DCs in atherosclerosis and vascular inflammation. Vortrag, CardioWIND Meeting, Gastschloß Haigerloch, 18. Juli 2015.

M. Sauter, F. Emschermann, S. Autenrieth, M. Gawaz, H.-F. Langer. The role of antigen-presenting cells in atherosclerosis. Vortrag, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, 2015.

M. Sauter, F. Emschermann, S. Autenrieth, K. Ley, HF. Langer. ApoE derived from CD11c positive cells ameliorates atherosclerosis. Poster. Gordon Research Conference on atherosclerosis, Newry, United States , 2015.

R. J. Sauter, **M. Sauter**, S. Ebenhöch, R. Schleicher, B. Krämer, O. Borst, M. Gawaz, P. Kraft, C. Kleinschnitz, J. D. Lambris, H. Langer. Anaphylatoxinreceptor C3aR on platelets contributes to arterial thrombosis - intersection between innate immunity and hemostasis. Vortrag, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, 2016.

M. Sauter. The role of dendritic cells (DCs) in experimental atherosclerosis. Vortrag, KardioWIND Meeting, Gastschloß Haigerloch, 2017.

M. Sauter, D. Wolf, F. Emschermann, S. Autenrieth, K. Ley, H.F. Langer. ApoE derived from CD11c positive cells ameliorates atherosclerosis. Poster. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, 2017

R. J. Sauter, **M. Sauter**, S. Ebenhöch, R. Schleicher, B. Krämer, O. Borst, M. Gawaz, P. Kraft, C. Kleinschnitz, J. D. Lambris, H. Langer. Platelet Anaphylatoxinreceptor C3aR in thrombus formation. Poster. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, 2018